

多排卵処理後に採取した卵胞内卵子と性選別精液の 体外受精によるウシ性判別胚の生産

秋山 清¹・坂上信忠¹・中川 浩²・瀬田剛史²・河合愛美³・長井 誠^{3,a}・
林みち子³・的場理子⁴・稲葉泰志^{4,b}・松田秀雄⁵・今井 敬^{5,c}・下司雅也⁴

¹ 神奈川県畜産技術センター, 海老名市 243-0417

² 新潟県農業総合研究所畜産研究センター, 三条市 955-0143

³ 石川県農林総合研究センター畜産試験場, 石川県宝達志水町 929-1325

⁴ 国立研究開発法人農研機構畜産草地研究所, つくば市 305-0901

⁵ 独立行政法人家畜改良センター, 福島県西郷村 961-8511

(2015. 11. 5 受付, 2016. 1. 12 受理)

要約 ホルスタイン種泌乳牛に多排卵処理 (SOV 区) または卵胞発育同調処理 (FGT 区) を行った後に生体内卵子吸引により卵胞内卵子を採取した。卵子はホルスタイン種の性選別精液で体外受精し, 性判別胚の生産効率と子牛生産状況を調査した。採取卵子数は試験区間に有意差は認めなかったが, SOV 区は採取卵子の 62.1% が体内成熟卵子であり, FGT 区はすべて未成熟卵子であった。媒精後 7~9 日目の胚盤胞期胚率は試験区間に有意差は認めなかったが, 供卵牛 1 頭当たりの胚盤胞期胚数は SOV 区が有意に多かった ($P < 0.05$)。また, 性判別胚の移植後の受胎率, 在胎日数および産子の生時体重は試験区間に有意差は認められず, 産子の 95.0% が雌であった。このことから, 多排卵処理後のホルスタイン種泌乳牛から採取した卵子と性選別精液を体外受精することで多数の性判別胚を得ることが可能であり, 後継牛の計画的生産に利用できることが示唆される。

日本畜産学会報 87 (2), 107-113, 2016

キーワード: 生体内卵子吸引, 性選別精液, 体外受精, 体内成熟卵子, 多排卵処理

酪農経営において畜主が希望する性別の子ウシを得ることは, 後継牛の計画的な生産を実現し, 経営の安定化と効率化のために極めて有効な手段になると考えられる。最近, 希望する性別の子ウシを 90% 以上の確率で生産することができる性選別精液が市販されるようになり, 後継牛生産に利用することが期待されている (Tubman ら 2004 ; Hayakawa ら 2009 ; 木村 2009)。しかし, 性選別精液はストロー 1 本当たりに充填された精子数が通常精液に比べて少ないことなどから, 経産牛では人工授精後の受胎率が低いこと (Andersson ら 2006 ; DeJarnett ら 2008, 2011 ; Schenk ら 2009) や, 多排卵処理後に採取した胚の移植可能胚率が低いこと (Hayakawa ら 2009 ; Peippo ら 2009 ; Larson ら 2010) などが指摘されており, 技術普及のために改善が望まれている。

生体内卵子吸引 (Ovum Pick-Up, 以下, OPU) - 体外受精技術は, 超音波画像診断装置を用いて生体卵巢から

採取した卵子を体外成熟させた後に体外受精して胚を生産する技術である。これまで, 本技術は子宮灌流による体内受精由来胚の採取の代替え, あるいはこれを補完する胚生産技術として開発が進められてきた (坂口ら 1995 ; 今井と田川 2006)。また, 卵胞波調節と卵胞刺激を組み合わせた卵胞発育同調 (follicle growth treatment, 以下, FGT) 処理後に採取した卵子において, 体外受精後の初期発生期の改善と胚盤胞期胚への発生率が高まることが報告されている (今井ら 2014)。

一方, 体内成熟卵子については, 体外成熟卵子に比べて体外受精後の発生能が高いことが知られている (Van de Leemput ら 1999 ; Dieleman ら 2002) が, その利用についての検討は行われていない。Matoba ら (2014) は, 乾乳牛を対象として多排卵 (superovulation, 以下, SOV) 処理後に OPU で採取した体内成熟卵子と性選別精液を体外受精することにより多数の性判別胚が生産できることを

現所属: ^a 国立大学法人東京農工大学農学部, 府中市 183-8538

^b 独立行政法人家畜改良センター十勝牧場, 北海道音更町 080-0572

^c 酪農学園大学農食環境学群, 江別市 069-8501

連絡者: 秋山 清 (fax : 046-238-8634, e-mail : akiyama.xqnm@pref.kanagawa.jp)

報告している。しかし、体内成熟卵子と性選別精液を利用した性判別胚の生産に関する報告や生産した性判別胚の受胎性に関する報告は少なく、生産現場での普及性や実用性に関する検討はほとんど行われていない。

そこで、ホルスタイン種泌乳牛を対象として SOV 処理あるいは FGT 処理後に OPU で採取した卵子と性選別精液を体外受精することによる性判別胚の生産効率と生産した性判別胚の移植による子ウシ生産状況について調査した。

材料および方法

1. 供試牛

神奈川県畜産技術センター、新潟県農業総合研究所畜産研究センターおよび石川県農林総合研究センター畜産試験場で飼養するホルスタイン種泌乳牛 14 頭(産次 2.1 ± 0.4 産, 分娩後日数 200.9 ± 23.1 日)を供試した。それぞれの供試牛には、以下に示す SOV 区および FGT 区の処理を 60 日以上の間隔で反転して実施した。

なお、本研究におけるすべての動物実験は各機関における動物実験実施に関する規程に基づき実施した。

2. SOV 処理

SOV 区は Matoba ら (2014) の方法に従って処理を行った。すなわち、発情周期の任意の時期の供試牛に腔内留置型黄体ホルモン製剤 (以下、シダー 1900; ファイザー製薬, 東京) を留置 (0 日目) し, 5 日目に直径 8mm 以上の全卵胞を吸引除去した。6 日目夕方から 10 日目の朝まで卵胞刺激ホルモン製剤 (以下, FSH, アントリン R10; 共立製薬, 東京) を漸減投与 (夕朝 8 回, 6, 6, 4, 4, 3, 3, 2, 2 AU, 合計 30 AU) し, 8 日目夕方にプロスタグランジン F₂α 製剤 (以下, PGF₂α, 0.225 mg, ダルマジン; 共立製薬, 東京) を投与し, 9 日目朝に CIDR を抜去して発情を誘起した。10 日目朝に性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (以下, GnRH, 0.2 mg, スポルネン; 共立製薬, 東京) を投与し, 11 日目午前中 (GnRH 投与後 25~26 時間) に直径 5 mm 以上の全卵胞を吸引して卵子を採取した (図 1)。

日	9:00	16:00
0		直径3mm以上の全卵胞の吸引
5	直径5mm以上の全卵胞の吸引 CIDR留置	
7	FSH	FSH
8	FSH	FSH
9	FSH, PGF ₂ α	FSH
10	FSH	FSH
11	CIDR抜去, OPU(11:00)	

図 2 FGT 区 of ホルモン処理

CIDR: 腔内留置型黄体ホルモン製剤
FSH: 卵胞刺激ホルモン製剤
PGF₂α: プロスタグランジン F₂α 製剤
GnRH: 性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤

3. FGT 処理

FGT 区は今井ら (2014) の方法に従って処理を行った。すなわち、発情周期の任意の時期の供試牛の直径 3mm 以上の全卵胞を吸引し (0 日目), 5 日目に直径 8mm 以上の全卵胞の吸引と CIDR 留置を行い, 7 日目朝から FSH を漸減投与 (朝夕 8 回, 6, 6, 4, 4, 3, 3, 2, 2 AU, 合計 30 AU), 9 日目朝に PGF₂α (0.225 mg) を投与した。その後, 11 日目午前中に CIDR を抜去して直径 5 mm 以上の全卵胞を吸引して卵子を採取した (図 2)。

4. 卵胞数

OPU 実施日の卵胞数は超音波画像診断装置 (SSD3500; アロカ, 東京) で計数し, 卵胞の直径により 5 mm 未満, 5 mm 以上 8 mm 未満, 8 mm 以上に分類した。

5. 卵子採取と成熟培養

卵子採取は今井と田川 (2006) の方法に従って行った。すなわち, 供試牛に 2% 塩酸プロカイン溶液 (ロカイン注 2%; 扶桑薬品工業, 大阪) で尾椎硬膜外麻酔を施した後に, 腔内に挿入したプローブで確認した直径 5 mm 以上の卵胞を採卵針 (COVA Needle; ミサワ医科工業, 東京) で穿刺した。SOV 区では 130 mmHg, FGT 区では 120 mmHg の吸引圧で 50-mL コニカルチューブに卵胞液を吸引採取した。吸引溶液は 1% 新生子ウシ血清 (new born calf serum, 以下, NBS) と 10 IU/mL ヘパリン

日	9:00	16:00
0		CIDR留置
5	直径8mm以上の卵胞の吸引	
6		FSH
7	FSH	FSH
8	FSH	FSH, PGF ₂ α
9	FSH, CIDR抜去	FSH
10	FSH, GnRH	
11	OPU(10:00, GnRH後25~26時間)	

図 1 SOV 区 of ホルモン処理

CIDR: 腔内留置型黄体ホルモン製剤
FSH: 卵胞刺激ホルモン製剤
PGF₂α: プロスタグランジン F₂α 製剤
GnRH: 性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤

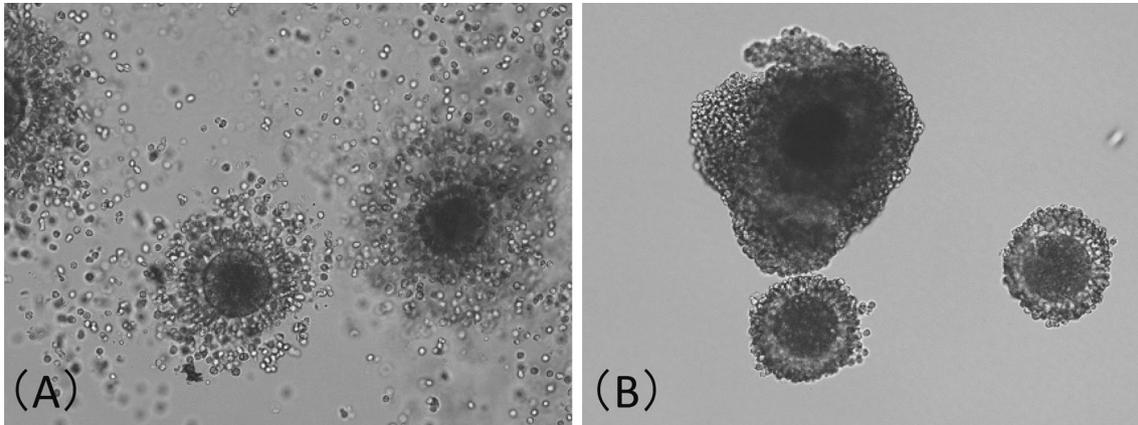


図 3 採取した卵子の形態
(A) 膨化した卵丘細胞の付着する卵子
(B) 緊密な卵丘細胞の付着する卵子

(ヘパリンナトリウム注；味の素製薬，東京) を添加した乳酸加リンゲル液（ハルゼン-V 注射液；日本全薬，東京）を用いた。

SOV 区では，コニカルチューブ 1 本当たり 5 個程度の卵胞液を採取し，90 mm シャーレに移した沈さを実体顕微鏡下で検索し，膨化した卵丘細胞から 21G 注射針を用いて卵子を切り出した。FGT 区では，コニカルチューブに回収した卵胞液を受精卵回収用フィルター（エムコンフィルター；野沢組，東京）でろ過した後に，90 mm シャーレに移し実体顕微鏡下で検索して，卵子を採取した。

採取した卵子は，膨化した卵丘細胞が付着する卵子と極体を確認した裸化卵子を体内成熟卵子，緊密な卵丘細胞が付着する卵子および第一極体を確認できない裸化卵子を未成熟卵子と判定した。体内成熟卵子は 3 時間，未成熟卵子は 22 時間，38.5℃，5%CO₂，95% 空気，湿度飽和の条件で成熟培養を行った。成熟培地は 0.02 AU/mL FSH および 5%NBS 添加 TCM199 (Gibco, Invitrogen, Grandland, NY, USA) を用いた。

6. 体外受精および体外培養

体外受精は Matoba ら (2014) の方法に従って行った。すなわち，凍結保存されたホルスタイン種（4 頭）の雌選別精液（ジェネティクス北海道，北海道）1 本を 37℃ の温水中で融解した。融解後の精液はパーコール液（45% および 60%）に重層して遠心分離（740×g，10 分間）し，次いで沈下部分を媒精液（IVF-100；機能性ペプチド研究所，山形）に混合して遠心分離（540×g，5 分間）した。その後，精子濃度を 5×10⁶/mL に調整し，媒精用精子ドロップを作成した。成熟培養後の卵子は媒精液で洗浄した後に精子ドロップに導入し，38.5℃，5%CO₂，95% 空気，湿度飽和の条件で，6 時間媒精した。

媒精後の卵子は，ピペッティングにより裸化し，5% NBS および 0.25 mg/mL リノール酸アルブミン添加 CR1aa 中で，38.5℃，5%CO₂，5%O₂，90%N₂，湿度

飽和の条件で，媒精後 9 日目まで培養した。媒精後 48 時間に卵割状況，7～9 日目に胚盤胞期胚への発生状況を調査した。胚盤胞期胚の品質は国際胚移植学会の評価基準 (Stringfellow と Givens 2010) に準じて評価した。媒精後 7 および 8 日目の胚盤胞期胚および脱出途中胚盤胞期胚を新鮮胚，凍結胚あるいはガラス化胚として移植に用いた。

7. 凍結保存・融解

凍結保存は，浜野 (1994) の方法に準じて行った。すなわち，10% グリセリン，20%NBS 添加 Hepes 緩衝 TCM199 に胚を室温で 10 分間平衡し，10% グリセリン，0.2 mol/L シュークローズおよび 20% NBS 添加 Hepes 緩衝 TCM199 に移して直ちに 0.25-mL ストローへ充填した。ストロー内には胚を入れた 10% グリセリン，0.2 mol/L シュークローズおよび 20% NBS 添加 Hepes 緩衝 TCM199 を挟んで 0.2 mol/L シュークローズ，20% NBS 添加 Hepes 緩衝 TCM199 を充填した。胚を封入したストローは -6℃ に保持したプログラムフリーザーに投入し，1 分後に植氷した。さらに，同温度で 9 分間保持した後に，-25℃ まで 0.3℃/分 で冷却し，-25℃ で 5 分間保持した後に液体窒素中へ投入した。融解はストローを液体窒素から取り出し，空气中で 10 秒間保持後，30℃ 温水中で氷晶が消えるまで保持して行った。

8. ガラス化・加温

ガラス化は，佐野ら (2010) の方法に準じてクライオトップ (cryotop-ag；北里バイオファルマ，富士宮) を用いて行った。すなわち，7.5% エチレングリコールおよび 7.5% DMSO 添加 Hepes 緩衝 TCM199 に胚を室温で 3 分間平衡した。その後，ガラス化液（15% エチレングリコール，15% DMSO，0.5 mol/L シュークローズ添加 Hepes 緩衝 TCM199）とともに胚をクライオトップ先端部上に移した。直ちにクライオトップ先端部を液体窒素に浸漬してガラス化した。ガラス化胚の加温およびガラス化

液の希釈は、38.5℃に加温した0.2 mol/L シュークロー
スおよび20% NBS 添加 PBS 液中に胚を載せたクライオ
トップ先端部分を浸漬し5分間保持して行った。

9. 移植

新鮮胚は、20% NBS 添加 PBS とともに0.25-mL プ
ラスチックストローに充填し移植した。凍結胚は、融解後
にストローから胚を取り出すことなく直ちに移植した。ガ
ラス化胚は加温後に0.1 mmol/L β メルカプトエタノ
ールおよび20% NBS 添加 TCM199 で1~3時間培養し、
生存胚を20% NBS 添加 PBS とともに0.25-mL プラス
チックストローに充填し、受胎牛に移植した。

受胎牛は、新潟県農業総合研究所、石川県農林総合研
究センター畜産試験場、神奈川県畜産技術センター、およ
び各県の農家で飼養するホルスタイン種および交雑種の雌ウ
シを用いた。胚は発情確認後7~8日目の受胎牛の黄体側
子宮角に子宮頸管経由により移植した。妊娠鑑定は胚移
植後35日以降に直腸検査法で行い、在胎日数と産子の性
別および生時体重を調査した。

10. 統計処理

データはすべて平均値±標準誤差で示した。統計処理は、

コンピューターソフト SPSS (SPSS 16.0J ; SPSS Inc.,
東京)を用い、卵子採取成績は分散分析により、胚生産成
績は分散分析後に Tukey HSD で多重検定を行った。な
お、卵子の採取率と胚の発生率はあらかじめ角変換を行っ
た後に検定を行い、受胎率については Pearson の χ^2 乗
検定または Fisher の直接確率計算法を用いて検定を行っ
た。危険率5%未満 ($P < 0.05$) を有意差ありとした。

結 果

表1に卵子採取成績を示す。SOV区およびFGT区に
おける吸引卵胞数、卵子数、採取率に有意差は認められな
かった。SOV区は採取卵子のうち $62.1 \pm 8.4\%$ が体内
成熟卵子であったが、FGT区の採取卵子はすべて未成熟
卵子であった。

表2に体外受精後の胚生産成績を示す。SOV区の成熟
卵子、未成熟卵子およびFGT区の媒精後48時間の卵割
胚率に有意差は認められなかったが、5細胞期以上胚率は
SOV区の成熟卵子がSOV区の未成熟卵子およびFGT区
に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。SOV区の成熟卵子、
未成熟卵子およびFGT区の媒精後7~9日目の胚盤胞期

表1 卵子採取成績

試験区		SOV区	FGT区
頭数		14	14
OPU時の卵胞数	直径8mm以上	27.1 ± 5.4	20.1 ± 4.0
	直径5-8mm	2.9 ± 0.7	5.1 ± 0.9
	直径5mm未満	1.6 ± 1.1	3.3 ± 1.2
	合計	31.6 ± 4.8	28.6 ± 3.2
	吸引卵胞	30.0 ± 5.2	25.3 ± 3.9
卵子数	合計	21.1 ± 3.9	15.1 ± 2.6
	成熟卵子	12.0 ± 2.5	0.0 ± 0.0
	未成熟卵子	9.1 ± 2.7	15.1 ± 2.6
	成熟卵子率	62.1 ± 8.4	0.0 ± 0.0
採取率 (%)		71.7 ± 4.0	66.3 ± 8.0
平均値 ± 標準誤差			

表2 胚生産成績

試験区		SOV区			FGT区
		合計	成熟卵子	未成熟卵子	未成熟卵子
頭数	頭	14	14	11	14
培養卵子	個	20.1 ± 3.7	11.6 ± 2.5	10.7 ± 2.6	13.1 ± 2.7
卵割胚率	%	77.4 ± 3.9	70.7 ± 9.1	64.8 ± 8.0	59.4 ± 8.0
5細胞期以上胚率	%	60.6 ± 5.1 ab	63.6 ± 9.0 a	33.0 ± 7.4 b	34.1 ± 7.9 b
胚盤胞期胚	数	6.3 ± 1.4 c	4.3 ± 1.1 cd	2.5 ± 0.8 cd	2.2 ± 0.7 d
	率	34.0 ± 4.3	34.8 ± 6.0	20.7 ± 6.9	21.8 ± 7.3
Good以上胚	数	5.1 ± 1.2	3.3 ± 1.0	2.4 ± 0.8	1.9 ± 0.6
	率	28.5 ± 5.0	28.7 ± 6.6	18.1 ± 7.1	18.7 ± 7.3

ab間, cd間に有意差あり ($P < 0.05$)

平均値 ± 標準誤差

胚率に有意差は認められなかったが、供卵牛1頭当たりの胚盤胞期胚数はSOV区合計がFGT区に比べて有意に多かった ($P < 0.05$)。

表3に生産した性判別胚の移植成績を示す。新鮮胚、凍結胚、ガラス化胚および合計の受胎率はSOV区で50.0%、36.1%、50.0%および37.5%、FGT区で46.2%、28.6%、0.0%および35.7%であった。

表4に性判別胚による子ウシ生産成績を示す。子ウシの雌率はSOV区が92.9%、FGT区が100%であり、在胎日数(受胎牛の発情日から分娩までの日数)および生時体重は試験区間に有意差は認められなかった。

考 察

本研究では、ホルスタイン種泌乳牛においてSOV処理およびFGT処理後にOPUにより採取した卵子と性選別精液を体外受精し、性判別胚の生産効率と性判別胚の移植による子ウシ生産状況を調査した。その結果、SOV区で採取した体内成熟卵子はFGT区およびSOV区の未成熟卵子に比べて5細胞期以上胚率が有意に高く ($P < 0.05$)、SOV区の合計の胚盤胞期胚数はFGT区に比べて有意に増加した ($P < 0.05$)。また、性判別胚の受胎率、在胎日数および生時体重に有意差は認められなかった。

Matobaら(2014)は、SOV処理後の乾乳牛を対象に歩数計を用いた発情開始時間の調査や超音波画像診断による排卵時間の調査の結果をもとにGnRH投与後25時間に卵胞内卵子を採取したところ、採取時に卵丘細胞が膨化した卵子の割合は95.9%であり、GnRH投与後30時間

には膨化卵子の83.3%が第一極体を放出していることを確認している。本研究のSOV区では、Matobaら(2014)と同様の処理を泌乳牛に対して行い卵胞内卵子を採取した。その結果、Matobaら(2014)に比べて低率ではあったが、泌乳牛においても乾乳牛と同様の処理で体内成熟卵子が採取できることが確認された。

体内成熟卵子の体外受精後の発生能は、体外成熟卵子に比べて高いことが報告されている(Van de Leemputら1999; Hendriksenら2000; Rizosら2002; Humblotら2005)。Hendriksenら(2000)は、と畜場由来の体外成熟卵子と比較して、Matobaら(2014)はOPUで採取した未成熟卵子と比較して、体内成熟卵子において体外受精後の発生能が高いことを報告している。本研究ではFGT区およびSOV区で採取した未成熟卵子と比べてSOV区で採取した体内成熟卵子において体外受精後の発生能が高く、これまでの報告を支持する結果であった。

SOV区およびFGT区で生産した性判別胚を新鮮胚、凍結胚およびガラス化胚として移植した合計の受胎率は37.5%および35.7%であり、国内における同時期の体外受精由来胚の受胎率(農林水産省2013)や性選別精液を用いて生産した体外受精由来胚の受胎率(Wilsonら2005)と同程度であった。

Matobaら(2014)は、体内成熟卵子の体外受精後に発生した胚盤胞期胚は形態観察により高品質胚の割合が高いことを報告している。しかし、体内成熟卵子由来体外受精胚の耐凍性や受胎性についての報告は少なく、SOV区で生産された性判別胚の耐凍性や受胎性については今後より詳細な検討が必要と考えられる。また、性判別胚の移植により生産された子ウシの在胎日数と生時体重は試験区間に有意差は認められなかった。さらに、SOV区およびFGT区で生産された子ウシの性比は試験区間に差は認められず、両区ともに期待された通りに90%以上の確率で雌子ウシが得られることが確認された。このことは、これまでの報告(Tubmanら2004; 木村2009; Hayakawaら2009)と同様であり、性選別精液を用いて生産した性判別胚を利用したウシの雌雄産み分けが実用可能な技術であることを示すものであった。

OPUは、繁殖障害牛、高齢牛、若齢牛、肥育牛など、通常は多排卵処理による採胚に適さない供卵牛から胚生産を可能にする技術として開発されてきた(坂口ら1995; 今

表3 性判別胚の移植成績

試験区	胚の区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
SOV区	新鮮胚	6	3	50.0
	凍結胚	36	13	36.1
	ガラス化胚	4	2	50.0
	合計	46	18	37.5
FGT区	新鮮胚	13	6	46.2
	凍結胚	14	4	28.6
	ガラス化胚	1	0	0.0
	合計	28	10	35.7

表4 子ウシ生産成績

試験区	産子数	性別			在胎日数	生時体重(kg)
		雌	雄	雌率(%)		
SOV区	14	13	1	92.9	278.9 ± 1.4	45.3 ± 1.7
FGT区	6	6	0	100.0	276.2 ± 1.7	41.8 ± 3.1
合計	20	19	1	95.0	278.1 ± 1.1	44.5 ± 1.5

平均値 ± 標準誤差

井と田川 2006). とくに, 体内成熟卵子は体外受精後の発生能が優れることが報告されており (Van de Leemputら 1999; Dielemanら 2002), 本研究では性選別精液を用いた体外受精における発生成績の向上を期待して体内成熟卵子を採取した. その結果, SOV 区では供卵牛 1 頭あたり 6.3 個の性判別胚が得られ, 本研究の移植成績 (受胎率 37.5%) および子ウシ生産成績 (雌率 92.9%) からの試算では 1 回の OPU において 2.2 頭の雌子ウシが生産できることが推測された.

多排卵処理後に性選別精液を人工授精した採胚では, 1 回の採胚あたり 3.8~6.4 個の正常胚が得られることがこれまでに報告されている (Hayakawaら 2009; Larsonら 2010; Kaimioら 2013). 本研究の SOV 区の性判別胚の生産はこれらの報告と比べて遜色のないものであり, 1 回の OPU で複数の後継牛を生産することが可能な技術と考えられる. さらに, 多排卵処理後の採胚では, 1 回の採胚のために性選別精液の人工授精を複数回行うことが必要ことが報告されている (Hayakawaら 2009; 高岡ら 2014). 本研究では, これらの報告に比べて少ない本数の性選別精液を用いて多数の性判別胚の生産が可能である. このことは, 優良種雄牛の性選別精液の効率的な利用につながるものと考えられる.

これらのことから, ホルスタイン種泌乳牛に対して SOV 処理後に OPU により採取した卵子と性選別精液を体外受精して性判別胚を生産する方法は, 後継牛の計画的な生産に利用可能な新しい性判別胚の生産方式であることが示唆された.

謝 辞

本研究の実施にあたり, 各研究機関の職員諸氏には家畜管理に多大な支援を賜った. また, 性判別胚の移植に協力いただいた各県の移植技術者の皆様に深く感謝いたします. なお, 本研究は, 「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業 (22016)」の助成により実施した.

文 献

Andersson M, Taponen J, Kommeri M, Dahlbom M. 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reproduction Domestic Animal* **41**, 95-97.

DeJarnett JM, Nebel RL, Marshall CE. 2011. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* **71**, 49-58.

DeJarnett JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW. 2008. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* **91**, 1778-1785.

Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijnen HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL. 2002. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on

developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* **57**, 5-20.

浜野晴三. 1994. 牛体外受精卵の移植. *日本胚移植学雑誌* **1**, 30-37.

Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* **71**, 68-73.

Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* **53**, 11-20.

Humbolt P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarré A-S, Joly CG, Herrmann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H. 2005. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* **63**, 1149-1166.

今井 敬, 大竹正樹, 相川芳雄, 松田秀雄, 山之内忠幸, 稲葉泰志, 的場理子, 杉村智史, 橋谷田豊. 2014. 卵胞波を調節した経膈採卵—体外受精による効率的な胚生産. *日本胚移植学雑誌* **36**, 109-114.

今井 敬, 田川真人. 2006. OPU-IVF によるウシ胚の作出, その効率と汎用性. *日本胚移植学雑誌* **28**, 29-35.

Kaimio I, Mikkola M, Lindeberg H, Heikkinen J, Hasler JF, Taponen J. 2013. Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology* **80**, 950-954.

木村博久. 2009. 牛 XY 選別精液の生産とその課題. *家畜人工授精* **251**, 1-16.

Larson JE, Lamb GC, Funnell BJ, Bird S, Martins A, Rodgers JC. 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sex-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology* **73**, 698-703.

Matoba S, Yoshioka H, Matsuda H, Sugimura S, Aikawa Y, Ohtake M, Hashiyada Y, Seta T, Nakagawa K, Lonergan P, Imai K. 2014. Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *Journal of Dairy Science* **97**, 743-753.

農林水産省生産局畜産部. 2013. 受精卵移植実施状況 (平成 25 年度). 農林水産省生産局畜産部, 東京; [cited 22 December 2015]. Available from URL : http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/pdf/h25_gaiyou.pdf

Peippo J, Vartia K, Kananen-Anttila K, Ráty M, Korhonen K, Hurme T, Myllymäki H, Sairanen A, Mäki-Tanila A. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* **111**, 80-92.

Rizos D, Ward P, Duffy M, Boland P, Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst field and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* **61**, 234-248.

坂口慎一, 井口光国, 小林直彦, 藤谷泰裕, 三溝成樹, 内海恭三. 1995. 超音波診断装置を利用した繁殖不適和牛からの連続経膈採卵. *日本胚移植学雑誌* **17**, 94-101.

性選別精液の体外受精

- 佐野文彦, 北山智広, 増山龍一, 白石 徹, 河野良輝, 稲谷憲一, 小田頼政, 林みち子, 森 安悟, 稲葉泰志, 今井 敬. 2010. ウシ性判別胚の超急速保存法—クライオトップ法の直接移植へ向けての検討—. *日本胚移植学雑誌* **32**, 113-119.
- Schenk JL, Cran DG, Everett RW, Seidel Jr GE. 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm : Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* **71**, 717-728.
- Stringfellow DA, Gievens MD. 2010. *Manual of the International Embryo Transfer Society : A Procedural Guide and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology Emphasizing Sanitary Procedures*. 4th edn. International Embryo Transfer Society. International Embryo Transfer Society Inc., Champaign, IL.
- 高岡亜沙子, 谷口雅康, 音井威重. 2014. ホルスタイン種牛の過剰排卵処理における雌雄選別精液の有用性の検討. *日本胚移植学雑誌* **36**, 59-64.
- Tubman LM, Brink Z, Suh TK, Seidel GE Jr. 2004. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *Journal of Animal Science* **82**, 1029-1036.
- Van de Leemput EE, Vos PL, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ. 1999. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology* **52**, 335-349.
- Wilson RD, Weigel KA, Fricke PM, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Matthews DL, Schutzkus VR. 2005. In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *Journal of Dairy Science* **88**, 776-782.