

2 0 2 2 年 度  
修 士 論 文

ウシ胚の凍結保存技術および黒毛和種  
における過剰排卵誘起処置技術の改善  
に関する研究

**Study on improved techniques for cryopreservation  
of bovine embryos and superovulation treatment of  
Japanese Black cattle**

22131008

佐野 将之

Masayuki Sano

指導教員 家畜繁殖学 教授 堂地 修

酪農学園大学大学院酪農学研究科

## 目 次

|         |  |              |
|---------|--|--------------|
| 緒 論     | ・ ・ ・ ・ ・                                      | 1            |
| 第 I 章   | 乾式凍結器で凍結保存したウシ体外受精胚および体内受精胚の生存率および受胎率          |              |
| 第 1 節   | 緒 言  | ・ ・ ・ ・ ・ 5  |
| 第 2 節   | 材 料 お よ び 方 法                                  | ・ ・ ・ ・ ・ 7  |
| 第 3 節   | 結 果  | ・ ・ ・ ・ ・ 13 |
| 第 4 節   | 考 察  | ・ ・ ・ ・ ・ 17 |
| 第 5 節   | 要 約  | ・ ・ ・ ・ ・ 19 |
| 第 II 章  | 黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始時期が卵巣反応および採胚成績に及ぼす影響 |              |
| 第 1 節   | 緒 言  | ・ ・ ・ ・ ・ 20 |
| 第 2 節   | 材 料 お よ び 方 法                                  | ・ ・ ・ ・ ・ 22 |
| 第 3 節   | 結 果  | ・ ・ ・ ・ ・ 26 |
| 第 4 節   | 考 察  | ・ ・ ・ ・ ・ 30 |
| 第 5 節   | 要 約  | ・ ・ ・ ・ ・ 33 |
| 第 III 章 | 総 括  | ・ ・ ・ ・ ・ 34 |

|         |                                 |     |
|---------|---------------------------------|-----|
| 謝 辭     | • • • • • • • • • • • • • • • • | 4 1 |
| 引 用 文 獻 | • • • • • • • • • • • • • • • • | 4 2 |
| 英 文 要 約 | • • • • • • • • • • • • • • • • | 5 4 |

## 緒 論

今日、ウシの育種改良において胚移植技術は必要不可欠な技術である。胚移植技術は多くの技術で成りたっており、なかでも過剰排卵誘起処置技術と胚の凍結保存技術は特に重要である。ウシの胚移植と過剰排卵誘起処置は 1940 年代から 1950 年代にかけて開発された。

ウシ胚の凍結保存に関する研究では、1973 年に Wilmut ら [1] が初めてウシ凍結胚から産子を生産することに成功している。

ウシ胚の凍結保存技術は、今日では育種改良や遺伝的高能力牛の生産に必要不可欠である。哺乳動物胚の凍結保存には主に 3 つの段階が必要である [1]。ひとつは胚を  $-5^{\circ}\text{C}$  から  $-7^{\circ}\text{C}$  付近から  $-30^{\circ}\text{C}$  から  $-35^{\circ}\text{C}$  付近まで  $0.3\sim 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$  の速度で冷却することである [2]。この冷却速度により、水が浸透圧によって細胞外に出るのに十分な時間が確保でき、細胞内での氷晶形成が起らない。次は、細胞が過度な脱水状態になる前に、予備冷却した ( $-30^{\circ}\text{C}$  から  $-35^{\circ}\text{C}$ ) 胚を液体窒素に投入して凍結を完了することである。最後に、融解した細胞から浸透圧による細胞の膨張と収縮を最小限に抑えて凍結保護物質を除去することである [2]。この胚の凍結理論は凍結器（プログラムフリーザー）を用いた凍結方法に利用されている。これまで用いられてきた凍結器は、主にアルコールと液体窒素を冷媒とする凍結器が用いら

れてきた。最近、アルコールを用いない乾式受精卵凍結器が開発・販売されている。

ウシ胚の移植後の受胎率は、凍結胚が新鮮胚に比べて 10～13% 低い [3]。2017 年 Viana の報告 [4] では、世界で移植された生体由来胚は 495,054 個で、そのうち 60% が凍結胚であった。このことから、凍結胚の利用割合が高いことが分かる。今日の生産現場における胚移植技術の利用は、実験室を備えた車中で胚の凍結処理を行うなど、携帯型の凍結器の利用が必要である。そのため、冷媒としてアルコールを使用せず、軽量で持ち運びしやすい凍結器の利用が不可欠である。

ウシにおける最初の過剰排卵誘起処置は Casida ら (1943) [5] によって報告された。その後、Rowson (1951) [6] はウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) を用いて卵胞を刺激する方法を開発した。eCG による処置は、eCG の半減期が長いことため単回投与される。しかし、卵巢反応や採胚結果にばらつきがみられ、低品質の胚が多いなどの問題が知られている。その後 1958 年に Dziuk ら [7] はブタ由来の卵胞刺激ホルモン (FSH) を用いて 1 日 2 回 4 日間に渡って投与する漸減投与法を開発した。近年は、FSH の溶解液にヒアルロン酸を用いて 1 回または 2 回投与する方法 [8] と水酸化アルミニウムゲルを用いて皮下に 1 回投与す

る方法[9,10]が報告されている。これらの方法でも漸減投与法と差のない胚回収成績が得られることが報告されている[9,10]。

FSH は、発情後 8～13 日に投与を開始する。しかし、この方法では過剰排卵誘起処置前に発情を確認する必要がある[11]。近年は腔内留置型プロジェステロン製剤（Controlled intravaginal drug releasing device；CIDR）とエストラジオール 17 $\beta$ （E2）を用いた方法が報告されている[10,12]。この方法により、卵胞発育ウェーブの調整および発情の同期化が簡単かつ便利になった。Bo ら[13]は 1995 年にプロジェステロン製剤およびエストラジオール製剤を用いて処置した肉用牛は、処置後 4.3 $\pm$ 0.2 日目に新しい卵胞波が出現することを報告している。さらに、その翌年にはプロジェステロン製剤と E-17 $\beta$  の投与後 4 日目から FSH を投与開始する方法において、自然発情周期に FSH 投与を開始する方法と同等の胚回収成績が得られたことを報告している[14]。この報告以降、プロジェステロン製剤とエストラジオール製剤を用いた過剰排卵誘起処置方法が広く利用されるようになった。過剰排卵誘起処置の特徴として、個体によって卵巢反応および回収胚数が異なることがあげられる。Looney[15]は、2,000 頭以上の肉用牛に過剰排卵誘起処置した結果、平均移植可能胚数は 6.2 個であった報告している。また、Hasler ら[16]はホルスタイン種の移植可能胚数は

平均 6.4 個であったと報告している。2017 年に Moore ら [17] は、今日に至るまでの胚回収成績は実質的に変化してないと述べている。このことから、胚回収成績をさらに向上させ、安定させるためには、過剰排卵誘起処置の方法についてさらに検討する必要がある。

本研究では、第 I 章では乾式凍結器で凍結保存したウシの体外受精胚（体外胚）および体内受精胚（体内胚）の生存率および受胎率を明らかにし、第 II 章で CIDR と EB 投与による黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始日が胚回収結果に及ぼす影響について検討した。

# 第 I 章 乾式凍結器で凍結保存したウシ体外受精胚および体内受精胚の生存率および受胎率

## 第 1 節 緒 言

1990 年代にエチレングリコールを凍結保護物質として用いたウシ凍結胚のダイレクト移植法が報告された[18-20]。これらの報告によりエチレングリコールがウシ胚の凍結に有効であることが明らかになった。

その後、世界中でエチレングリコールを用いたダイレクト移植法と従来のステップワイズ法およびワンステップ・ストロー法との受胎率を比較する研究が行われ[21,22]、ダイレクト法は従来の方法と同等の受胎率が得られることが明らかになり、急速に普及した。さらに凍結融解後の生存性を向上させるためにエチレングリコールにショ糖を添加した凍結媒液の有効性に関する研究も行われた。堂地と今井[23]は 1.5M および 1.8M のエチレングリコールに 0.1M のショ糖を添加した場合、融解後の生存性が高かったと報告している。特に胚盤胞および拡張胚盤胞のような大きい胞胚腔を有する胚では、ショ糖を添加すると脱水後の急激な複水を緩和し、浸透圧障害を防止することができることを報告している[23]。



ダイレクト法の研究には、凍結保護物質の種類や濃度以外にも、凍結時の冷却速度、植氷温度に関する研究も行われた[24-26]。Massipら[25]は10%グリセリンと0.25Mショ糖の混合液を凍結媒液として用いた場合、植氷温度を-7℃とし、同温度で10分間温度保持したのち-25℃まで-0.3/分の冷却速度で冷却すると移植後の受胎率は高かったと報告している。エチレングリコールを用いた研究では、1997年に中川[24]は1.5Mエチレングリコールと0.1Mショ糖を含む凍結媒液を用いた場合の冷却速度は-30℃まで-0.3/分で冷却すると融解後の生存率および脱出胚盤胞率が高いと報告している。

ウシ胚の凍結保存に関する研究では、凍結媒液や冷却速度に関する研究が行われてきたが、凍結器の改良に関する報告は著者が知る限り多くはない。

世界で最初に胚の凍結保存に成功したWhittinghamら[27]は、熱伝導率の高い高濃度のアルコールを冷媒に用いた凍結器で成功している。この報告以降、アルコールを冷媒に用いた凍結器が多く販売されてきた。アルコール液槽式凍結器は、機械が大型かつアルコール液を利用するため、実験器具を装備した車輛（ET車）に搭載するには利便性が低い。2019年にアルコールや液体窒素等の冷媒使用しない乾式凍結器が開発された[28]。この凍結器の特徴は、これまでの凍結器と違い冷媒を用い

ず、80 Hz の微細振動を加えながら凍結を行う点にある。また、凍結器自体の重量が約 12kg で、従来の凍結器より軽量で移動が容易である。さらに、従来の凍結器と異なり、乾式凍結器の冷却にはスターリングエンジンの機構が用いられている[28]。平田ら[29]によると次のように説明されている。スターリングエンジンの基本原理は、空気の温度変化と容積変化の関係を利用している。気体は熱が加わると膨張し、熱が奪われて温度が低下すると収縮する。この原理を用いることにより、アルコールを用いなくても冷却することができる。この原理を採用した凍結器は、最近開発・販売されたが著者らが知る限りこの凍結器を用いて凍結したウシ胚の生存性および受胎性について調べた報告は見あたらない。本研究では、乾式凍結器で凍結した体外胚の生存性および体内胚の移植受胎率を調べ、その有用性について検討した。

## 第 2 節 材料および方法

### 1. 凍結器

本研究で用いた乾式凍結器は、YT Freezer80（ヤマネテック）の Ver1（YT1）、Ver2（YT2）を、アルコール液槽式凍結器は ET-UM（フジ矢野化学）をそれぞれ使用した。

凍結器に設定されている冷却曲線を図 1 に示した。

### 2. 体外胚の生産方法

本研究で生産した体外胚はすべて食肉処理場から採取した卵巣から生産した。採取した卵巣はパウチパックに入れ発砲スチロールの箱に入れ実験室に持ち帰った。実験室で卵巣から卵巣間膜を切除し、オートクレーブで滅菌した生理食塩水で数回洗浄し、乾熱滅菌したキムタオルで水分および血液を拭き取った。

未受精卵子は 19G の注射針を装着した 10ml シリンジに 3% 子牛血清（以下 CS）を添加したダルベッコリン酸緩衝液（D-PBS）を少量吸引してシリンジ内を洗浄した後、同液を約 0.5ml 吸引し、直径 2～6mm の卵胞から卵胞液とともに卵子を採取した。採取した液は 50ml 遠沈管（テルモ）中に集めた。

採取した液の入った 50ml 遠沈管を 2 分間静置して卵子を沈殿させた後、アスピレーターで上清を除去した。再度 3% CS を添加した D-PBS を 25ml 加え希釈し 2 分間静置して卵子を沈殿させた

後、アスピレーターで上清を除去した。残った沈殿物を 90mm プラスチックシャーレに入れ、実体顕微鏡下で検索した。卵子は 10% CS を加えた D-PBS を入れた 35ml シャーレ (greiner BIO-ONE、# 627160) に集めた。その後、卵子の洗浄には 35mm シャーレに 10% CS を添加した D-PBS を用いて 3 回洗浄した。卵子の品質は、卵子周囲に卵丘細胞が 2 層以上付着し細胞質が均一なものを Grade1、卵丘細胞が卵子周囲に 1 層以上付着し細胞質が均一なものを Grade2 とし本試験では Grade1 および 2 の未成熟卵子を使用した。

体外成熟培養液には 0.02AU/ml FSH および 5% CS を添加した Hepes 緩衝 TCM-199 (Gibco) を用いた [30]。未成熟卵子は、10% CS を添加した D-PBS で 3 回、体外成熟培養液を流動パラフィン (ナカライテスク、# 26114-75) で液面を覆ったもので 2 回洗浄した。洗浄後の卵子は、60mm プラスチックシャーレ (FALCON、# 351007) に作製した 100 $\mu$ l の体外成熟培養液のドロップを流動パラフィンで覆い、各ドロップに 20~25 個ずつ入れた。体外成熟培養は 38.5 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、95% in air、湿度飽和の気相条件で 20 時間培養した。

体外受精には 1 頭のホルスタイン種の凍結精液を用いた。凍結精液は 37 $^{\circ}$ C の温湯内に 30 秒間浸漬して融解し、パーコール密度均衡法により生存精子を分離した [31]。パーコール (Cytiva、

17089101) 溶液および 10 倍濃度の BO 液を用いた 90% パーコールを調製し、10 倍濃度の BO 液 [32] と 90% パーコールを同量ずつ混合し、45% パーコールを調製した。15ml プラスチック遠沈管に 90% パーコールと 45% パーコールを各 2ml ずつ加え重層した。融解精液を 45% パーコールの上に重層し、2000rpm で 20 分間遠心分離を行った後、上清をアスピレーターで吸引除去した。精子の受精能獲得には、パーコールで選別した精子に 10mM ヒポタウリン (持田製薬、N22D) および 4U/ml ヘパリン (Sigma、H1384-1G) を添加した精子洗浄液を 6ml 加え、1800rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清をアスピレーターで吸引除去した。受精能獲得処理後、精子はガラス遠沈管に入った 990 $\mu$ l の 3% NaCl 水溶液に 10 $\mu$ l 添加し 100 倍希釈を行った。希釈後トーマ血球計算盤を用いて精子数を計測し、精子洗浄液で  $10 \times 10^6$ /ml の濃度に調整して、さらに等量の 20mg/ml ウシ血清アルブミン (以下 BSA、SIGMA、A4378) を添加した BO 液を加えて最終濃度を  $5 \times 10^6$ /ml に調整し、精子浮遊液を調整した。精子浮遊液で 60mm プラスチックシャーレに 100 $\mu$ l のドロップを作製し、流動パラフィンで覆ったものを体外受精培地とした。成熟培養後の卵子は 10mg/ml BSA を添加した BO 液で 3 回洗浄した後、各ドロップに 20~25 個ずつ導入し、体外成熟培養と同じ気相条件下で 6 時間媒精を行った。

体外発生培養液は、5%CSを添加したCR1aaを用いた。媒精後の卵子は、流動パラフィンで覆った体外発生培養液中でピペッティングにより卵丘細胞を完全に除去した後に3回洗浄を行った。洗浄した胚は60mmプラスチックシャーレに体外発生培養液で胚1個あたり5 $\mu$ lになるように培養ドロップを作製し1ドロップに20～25個導入して培養した。体外発生培養は38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>、湿度飽和の気相条件下で、媒精日を0日目として27、31、55時間後に卵割率を検査し、7、8および9日目に胚盤胞発生率を検査した。胚の品質は、国際胚移植技術学会（The International Embryo Technology Society: IETS）の基準に基づいて判定した[33]。本研究では、Code-1およびCode-2の胚盤胞のみを使用した。実験に使用した胚数は、Code-1が253個、Code-2が225個である。

### 3.体内受精胚の生産方法

体内胚の生産方法は、過剰排卵誘起処置を施した供胚牛より採取した。供試胚数は、黒毛和種から採取した6個、ホルスタイン種から採取した53個を使用した。体内凍結胚は、黒毛和種でCode-1を32個、Code-2を12個の合計44個使用した。ホルスタイン種は、Code-1を28個、Code-2を8個の合計36個使用した。

### 4.凍結・融解方法

本研究の凍結方法は、堂地ら[34]の方法に準じて行った。すなわち、1.5M エチレングリコール（EG、和光、058-00986）に 0.1M のショ糖（和光、193-09545）、10% の CS を加えた凍結媒液を使用した。胚を 10% CS + D-PBS で 3 回洗浄したのち、凍結媒液に移し直ちに 0.25ml のプラスチックストロー（IVM、005565）に吸引して各凍結器にセットした。次いで 2 分後に植氷を行った。ストローの封入方法は、西井ら[35]の方法に準じて行った。ストローは、-7℃ から -30℃ まで -0.3℃ / 分の速度で冷却した後、ストローを液体窒素に投入した。

融解は、ストローを空気中に 7 秒間保持したのち 30℃ の温湯に 20 秒間浸漬した。融解後、体内胚は受精卵牛に移植して受胎率を調べ、体外胚は体外培養して生存率および脱出胚盤胞率を調べた。

#### 5. 体外胚の培養および胚の観察方法

融解後の培養方法は、Imai ら[36]の方法に準じて行った。TCM199 に 0.1mM βメルカプトエタノール（和光、139-14652）と 20% 胎児血清（FCS、Gibco、16010-159）を加えた培養液で 3 回洗浄後、個別にドロップを作製し 72 時間後まで培養した。

胚の生存性は融解直後、24、48、72 時間目に調べた。生存性の判定は、融解直後は正常な形態の胚を生存、24、48 および 72 時間目では再拡張および脱出胚盤胞を生存胚とした。

## 6. 体内胚の移植および妊娠診断の方法

体内胚移植は、本研究で発情後 7 日目に YT ガン（ヤマネテック）およびカスーガン（IVM）を用いて移植した。

妊娠診断は発情後 30、40、50、60 日目に超音波診断装置を用いて、胎子像および心臓の拍動を確認したものを妊娠とした。

## 7. 凍結器の冷却速度の測定方法

熱電対センサーをストロー内に収納して冷却温度を調べた。温度記録計には EB22005（CHINO）を用いた。冷却速度は、温度記録から計算した。植氷温度の保持時間の正確性、植氷温度から  $-30^{\circ}\text{C}$  までの毎分あたりの冷却速度を計測した。



### 第 3 節 結 果

各凍結器における体外胚（Code-1）の生存率および脱出胚盤胞率を表 1 に示した。融解直後および培養 24 時間目の生存率は、YT1 および ET-UM に比べ YT2 が有意に高かった（ $P<0.01$ ）。培養 72 時間目の脱出胚盤胞率は、YT1 に比べ YT2 および ET-UM が有意に高かった（ $P<0.05$ ）。

各凍結器における体外胚（Code-2）の生存率および脱出胚盤胞率を表 2 に示した。融解直後および培養 24 時間目の生存率は、YT1 および ET-UM に比べ YT2 が有意に高かった（ $P<0.05$ ）。48 時間目では、YT1 に比べ YT2 が有意に高かった（ $P<0.05$ ）。72 時間後では、YT1 に比べ、YT1 および ET-UM が有意に高かった（ $P<0.05$ ）。脱出胚盤胞率に有意な差はみられなかった。

ET-UM および YT2 のストロー内および凍結器内の冷却曲線を図 2 および 3 に示した。それぞれの  $-7.0^{\circ}\text{C}$  から  $-30.0^{\circ}\text{C}$  までの冷却速度は ET-UM が  $-0.28/\text{分}$ 、YT2 が  $-0.29/\text{分}$  であった。

各凍結器および凍結時の品質が移植後の受胎率に及ぼす影響について表 3 に示した。凍結器および胚の種類による受胎率に差はなかった。

表 1.凍結器の方式が体外胚（Code-1）の凍結融解後の生存率に及ぼす影響

| 凍結器       | 個数  | 生存胚个数（％）                 |                       |          |          | 脱出胚盤胞数（％） |          |                       |
|-----------|-----|--------------------------|-----------------------|----------|----------|-----------|----------|-----------------------|
|           |     | 0 時間                     | 24 時間                 | 48 時間    | 72 時間    | 24 時間     | 48 時間    | 72 時間                 |
| 乾式 YT1    | 50  | 43(86.0) <sup>b</sup>    | 34(68.0) <sup>b</sup> | 26(52.0) | 23(46.0) | 6(12.0)   | 12(24.0) | 15(30.0) <sup>d</sup> |
| 乾式 YT2    | 103 | 100(97.1) <sup>a c</sup> | 96(93.2) <sup>a</sup> | 64(62.1) | 55(53.4) | 28(27.2)  | 45(43.7) | 52(50.5) <sup>c</sup> |
| 液層式 ET-UM | 100 | 85(85.0) <sup>d</sup>    | 72(72.0) <sup>b</sup> | 60(60.0) | 57(57.0) | 24(24.0)  | 40(40.0) | 47(47.0) <sup>c</sup> |

<sup>a b</sup> 異符号間に有意差あり（ $P<0.01$ ）

<sup>c d</sup> 異符号間に有意差あり（ $P<0.05$ ）

表 2. 凍結器の方式が体外胚（Code-2）の凍結融解後の生存率に及ぼす影響

| 凍結器       | 個数 | 生存胚個数（％）              |                       |                       |                        | 脱出胚盤胞数（％） |          |          |
|-----------|----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------|----------|----------|
|           |    | 0 時間                  | 24 時間                 | 48 時間                 | 72 時間                  | 24 時間     | 48 時間    | 72 時間    |
| 乾式 YT1    | 62 | 50(80.6) <sup>b</sup> | 36(58.1) <sup>b</sup> | 23(37.1) <sup>b</sup> | 16(25.8) <sup>b</sup>  | 3(4.8)    | 14(22.6) | 15(40.3) |
| 乾式 YT2    | 85 | 83(97.6) <sup>a</sup> | 80(94.1) <sup>a</sup> | 56(65.9) <sup>a</sup> | 42(49.4) <sup>a</sup>  | 17(20.0)  | 30(35.3) | 34(40.0) |
| 液層式 ET-UM | 78 | 65(83.3) <sup>b</sup> | 54(69.2) <sup>b</sup> | 42(53.8)              | 36 (46.2) <sup>a</sup> | 13(16.7)  | 20(25.6) | 27(34.6) |

<sup>a b</sup> 異符号間に有意差あり（ $P < 0.01$ ）

表 3.凍結器の方式が体内胚（Code-1 および Code-2）の移植後の受胎率に及ぼす影響

| 胚の品質   | 凍結器の種類      | 移植頭数 | 受胎頭数 | 受胎率（％） |
|--------|-------------|------|------|--------|
| Code-1 | 新鮮胚         | 46   | 33   | 71.7   |
|        | 乾式 YT1      | 6    | 3    | 50.0   |
|        | 乾式 YT2      | 28   | 20   | 71.4   |
|        | 液層式 ET - UM | 26   | 15   | 57.7   |
| Code-2 | 新鮮胚         | 13   | 9    | 69.2   |
|        | 乾式 YT1      | 1    | 1    | 100    |
|        | 乾式 YT2      | 11   | 5    | 41.7   |
|        | 液層式 ET - UM | 8    | 4    | 50.0   |

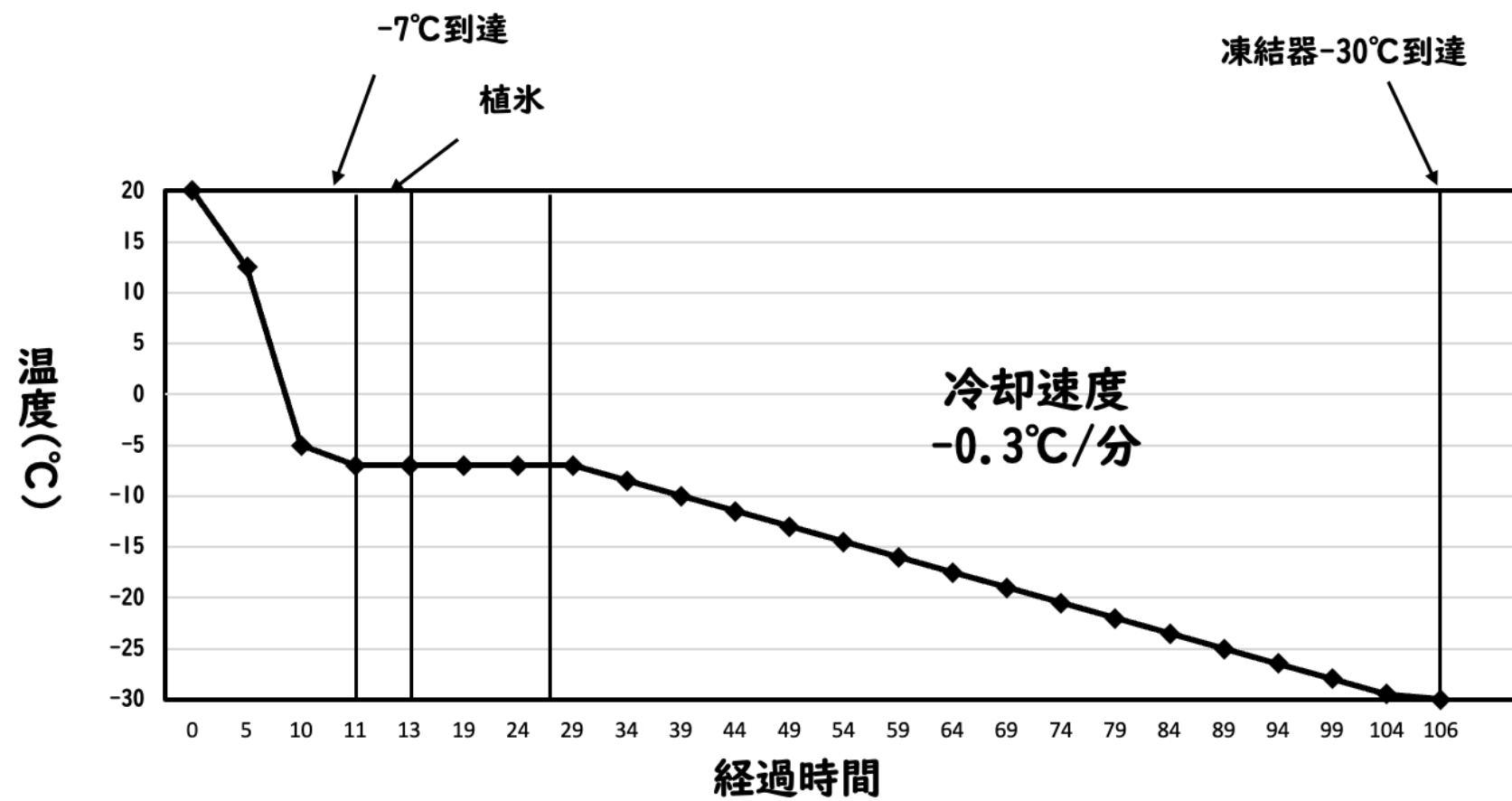


図 1.ウシ胚の凍結のための冷却プログラム

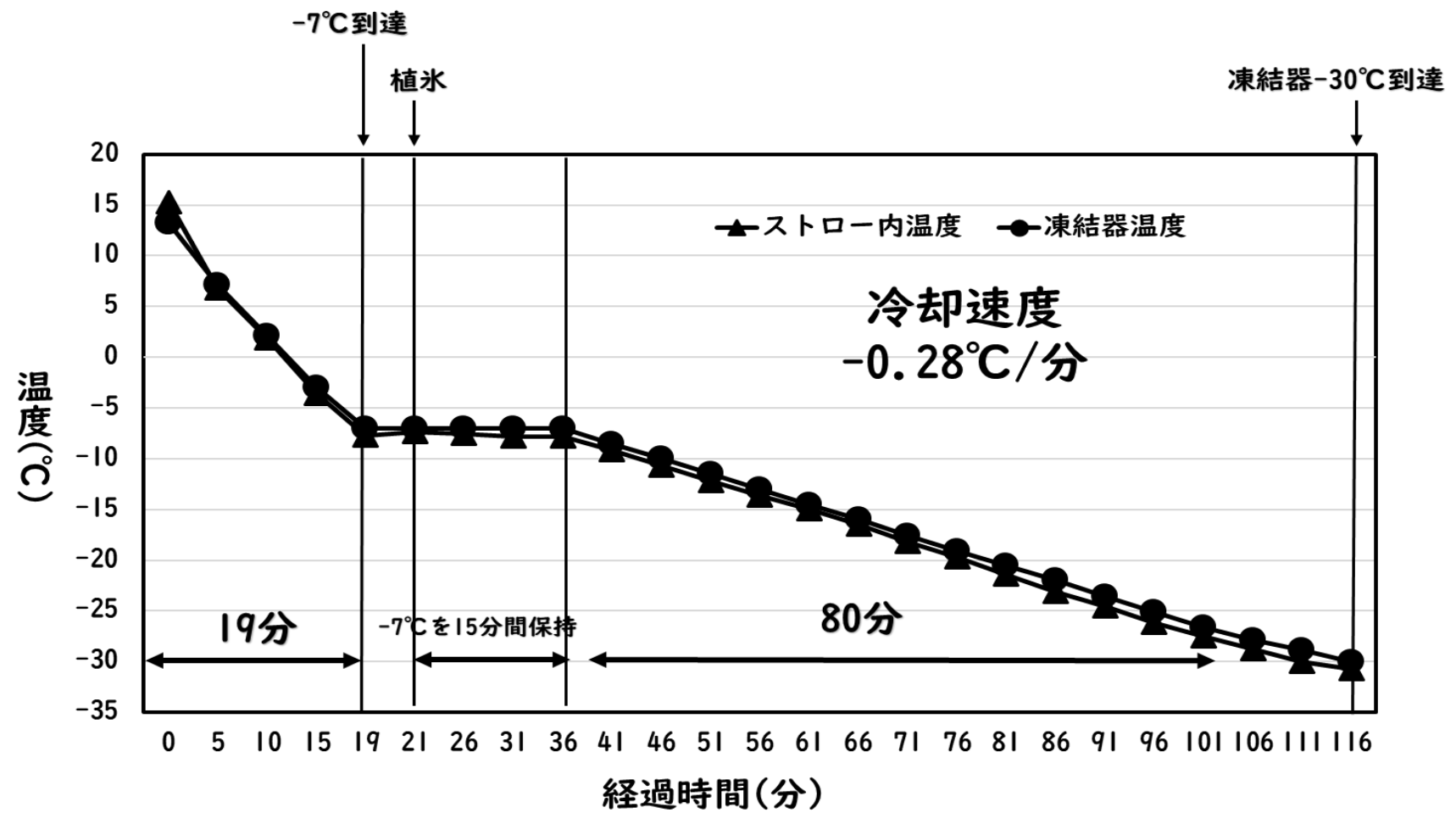


図 2. ET-UM の冷却速度および冷却時間がストロー内の温度に与える影響

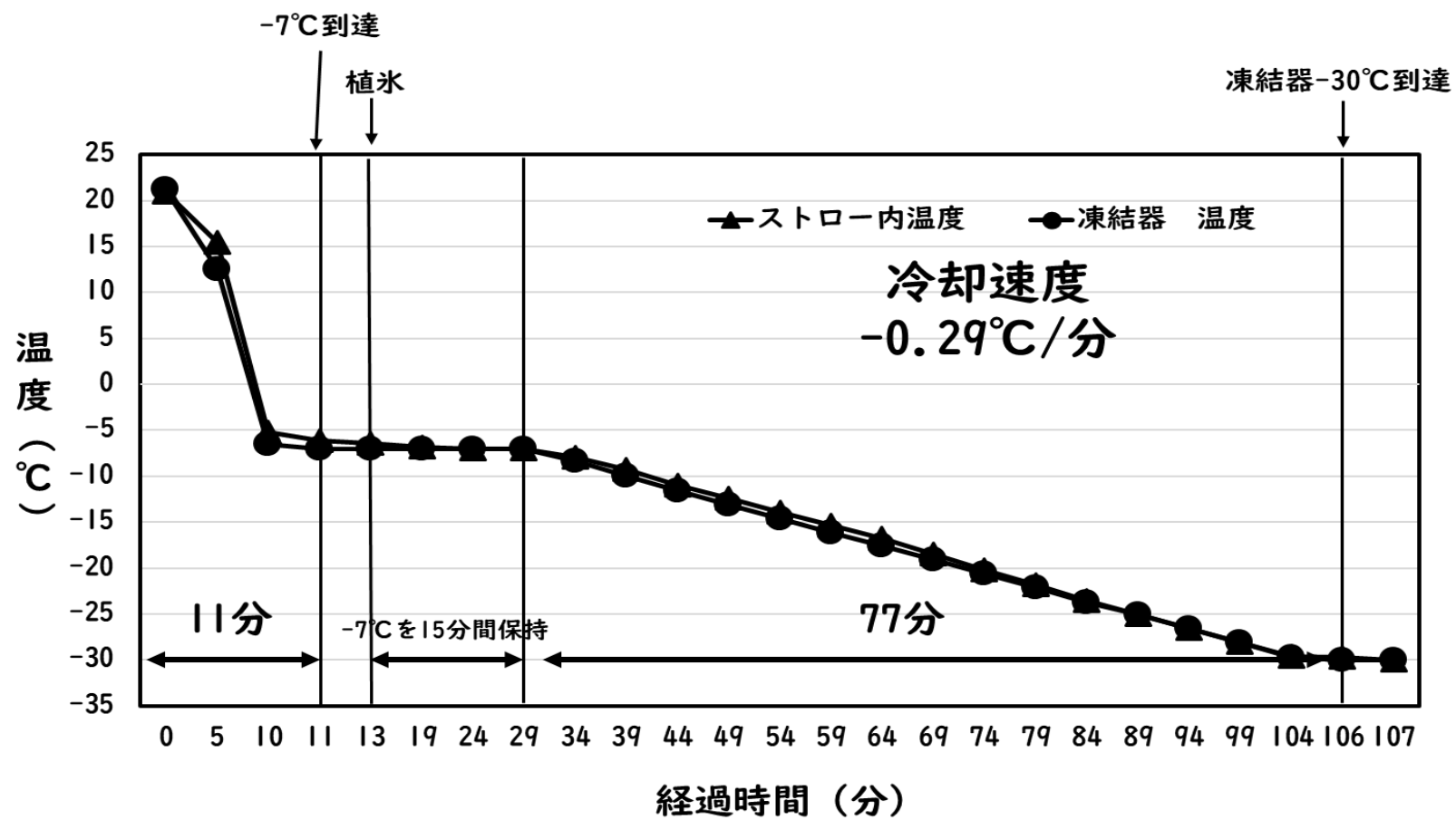


図 3. YT2 の冷却速度および冷却時間がストロー内の温度に与える影響

#### 第 4 節 考 察

本研究における体外胚の凍結融解後の生存率は、YT2 および ET-UM が高かった。受胚牛への移植後の受胎率に凍結器間の有意差は無かったが、YT2 と ET-UM の受胎率は新鮮胚と同等であった。

本研究で使用した乾式凍結器は、80Hz の振動を加えながら凍結する特徴がある。YT2 は YT1 に比べ振動のコントロール精度をより高くなるように改良が加えられている。多田ら[37]は、細胞内外の氷結晶を粉砕および微細化するために凍結時に 28kHz の超音波を照射することにより氷結晶の細分化が可能であると報告している。また、2005 年には冷却中に超音波を照射することにより、音波の持つ波動エネルギーの一部が媒体を動かす力学的エネルギーに変換される音響流の作用により熱伝導率が向上し、さらに、細胞の最大氷結晶通過時間が短縮されることが明らかになった。この方法で凍結された試料は、融解後の細胞の亀裂が少なく、損傷した細胞が、少ないことが報告されている[38]。このことから、YT2 は微細な振動を加えながら凍結することにより、熱伝導率の向上、氷結晶の微細化による細胞内外に与えるダメージが軽減されると考えられる。

本研究で用いた乾式凍結器は体外胚の生存率および脱出胚盤胞率において、従来のアルコール液槽式の凍結器と遜色のない結



果であった。また、体内受精胚の移植後の受胎率は新鮮胚のそれと差がなかったことから、乾式凍結器の性能が高いことが明らかになった。また、乾式凍結器はストロー内の冷却曲線が $-0.29/\text{分}$ と凍結器の設定温度とほぼ同様の温度を示したことから、乾式凍結器は性能が高く、重量も約  $12\text{kg}$  と軽量で ET 車への搭載も容易であることから実験室および現場での実用性も高いと考えられる。従来のアルコール液槽式と違い、高濃度のアルコールを使用しなくてもよいことから管理・維持も容易である。今後は、実際に ET 車に搭載した際の運転時の振動が、胚の生存性および移植後の受胎率に及ぼす影響について調査する必要がある。

## 第 5 節 要 約

本研究では、乾式凍結器で凍結した体外胚の生存性および体内胚の移植受胎率を調べ、その有用性について検討した。体外胚は、Code-1 を 253 個 (YT1:50 個、YT2:103 個、ET-UM:100 個)、Code-2 を 225 個 (YT1:62 個、YT2:85 個、ET-UM:78 個) 使用した。体内受精胚は、黒毛和種の新鮮胚を 6 個、凍結胚を 44 個、ホルスタイン種の新鮮胚を 53 個、凍結胚を 36 個使用した。体外胚 (Code-1) の生存率および脱出胚盤胞率は、融解直後および 24 時間目の生存率で YT1 および ET-UM に比べ YT2 が有意に高かった ( $P<0.01$ )。培養 72 時間目の脱出胚盤胞率は、YT1 に比べ YT2 および ET-UM が有意に高かった ( $P<0.05$ )。体外胚 (Code-2) の生存率および脱出胚盤胞率は融解直後および培養 24 時間目の生存率は、YT1 および ET-UM に比べ YT2 が有意に高く ( $P<0.05$ )、48 時間後では、YT1 に比べ YT2 が有意に高かった ( $P<0.05$ )。72 時間後では、YT1 に比べ、YT1 および ET-UM が有意に高かった ( $P<0.05$ )。

以上のことから、乾式凍結器は、従来の凍結器と遜色のない結果であった。このことから、乾式凍結器の性能が高いことが明らかになった。

## 第Ⅱ章 黒毛和種の過剰排卵誘起処置におけるFSH投与開始時期が卵巣反応および採胚成績に及ぼす影響

### 第1節 緒言

国際胚移植技術学会（The International Embryo Technology Society：IETS）の報告[39]では、2020年に世界中で（日本の報告は含まれていない）ウシ胚が1,518,150個生産された。全体の生産個数は、2019年に比べ7.0%増加しているが、体内受精胚の生産数は6.7%減少している。さらに移植された体内受精胚の個数も7.9%減少している。反対に体外受精胚は、生産数および移植個数ともに2019年に比べ10%以上増加している。

2015年に農林水産省が報告[40]した胚の種類ごとの移植頭数および移植受胎率の推移では、体内胚の移植頭数は76,745頭で体外胚は23,567頭であった。国内では体内胚の移植頭数は体外胚よりも多い。移植後の受胎率は、体内新鮮胚が50%、体内凍結胚が45%、体外新鮮胚が36%、体外凍結胚が37%と体内胚の受胎率が高いことから、体内胚の需要は依然として高いと考えられる。

これまで、過剰排卵誘起処置の成績向上のために様々な研究が行われてきた[6-10,12,14,41-43]。過剰排卵誘起処置の成績には、使用する薬剤の種類、薬剤を投与する時期、産歴、個体に

よる差が大きく、体内胚を用いた胚移植技術の大きな問題点と言える[44-50]。特に個体による採胚成績に差が生じる理由については不明である。小西らは[48、49]、産歴別の採胚成績は、未経産牛の採胚数が少なく、産次数が増えるごとに成績が向上し5、6産目が最も成績が良好で、それ以降は徐々に低下したことを報告している。

過剰排卵誘起には、eCGが用いられてきたがホルモンの特性上半減期が長く単回投与での処置が行われたが、卵巢反応や採胚結果、胚の品質が安定しなかった。その後、半減期が短いブタ由来のFSHを1日2回3～4日間にかけて投与する方法が開発された[7]。さらに20AUまたは30AUのFSHを50mlの生理食塩水に溶解し単回皮下投与する方法[11]やFSHの希釈剤としてヒアルロン酸を用いて投与する方法[8]、水酸化アルミニウムゲルを用い1回投与する方法[6,7]が開発された。これらの方法は、漸減投与法と差がないと報告されている。

過剰排卵誘起処置開始時に主席卵胞が存在することにより採胚成績が低下し、反対に主席卵胞を除去後に採胚成績が向上するという報告がある[51]。また、Stockら[52]は主席卵胞が存在することにより卵胞の排卵を阻害する可能性を示唆している。そのため、過剰排卵誘起処置の成績が向上するためには主席卵胞を除去する必要がある。小西らは[53]、物理的に主席卵胞を除

去する以外の方法として、安息香酸エストラジオール（EB）を CIDR 挿入後翌日に投与することにより、FSH 投与開始時の大卵胞数が減少し採胚成績が向上することを報告した。現在、肉用牛では Bo ら [14] の報告から、CIDR 挿入後 4 日目から FSH を投与する方法が一般的に行われている。しかし、同方法において FSH の投与時期が採胚成績に及ぼす影響について検討した報告は少ない。

本研究では CIDR と EB を用いた黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始日が胚回収成績に及ぼす影響について検討した。

## 第 2 節 材料および方法

### 1. 供試牛および過剰排卵誘起処置

本研究の 2021 年 1 月から 2022 年 7 月の過剰排卵誘起処置は酪農学園大学動物実験規定第 6 条 1 に基づき、同動物実験委員会の承認（DH26C4, DISO24EK）を得て実施した。それ以外については過去の過剰排卵誘起処置成績を比較データとして用いた。

供試牛は、黒毛和種経産牛 151 頭である。これらの牛には、発情周期の任意の時期に膣内留置型プロジェステロン製剤

(Control Internal Drug Releasing device、CIDR,シダー 1900、ゾエティス・ジャパン) を腔内に挿入し、同時に EB (エストラジオール注「KS」共立製薬) を 2mg 筋肉内投与した。CIDR 挿入および EB 投与日を 0 日目とした。

卵胞刺激ホルモン (FSH、アントリン R・10、共立製薬) の投与日開始日および投与方法の違いより A、B、C および D 法の 4 つの試験区に分けた (図 1、2)。A 法は 6 日から 8 日目に FSH 合計 24AU (5,5,4,4,3,3AU) を 1 日 2 回筋肉内投与し、8 日目の朝にプロスタグランジン F2 $\alpha$  類縁体 (クロプロステノール) 750  $\mu$ g (PGF、エストラメイト、共立製薬) を筋肉内投与し、夕方に CIDR を抜去した PGF 投与後 48 時間目に GnRH100  $\mu$ g (スポルネン、共立製薬) を筋肉内に投与し、同日の夕方に黒毛和種の凍結精液を用いて人工授精を行った。

B 法は 4 日から 6 日目にかけて A 法と同じ方法で FSH 合計 24AU (5,5,4,4,3,3AU) を 1 日 2 回筋肉内投与した。C および D 法は、CIDR 挿入後 5 日目に頸部皮下内に FSH (30AU) を全量投与した。C 法は、水酸化アルミニウムゲルに FSH 全量溶解して投与し、D 法は生理的食塩水に FSH 全量を溶解して投与した。B 法、C 法および D 法は、FSH 投与後はすべて A 法と同じ方法で PGF、GnRH を投与し、人工授精および胚回収を実施した。

## 2. 胚回収および胚の品質判定

胚回収は、すべての方法において発情後 7 日後に、バルーンカテーテル（富士平工業）を子宮内に留置し、1% 子ウシ血清を添加した乳酸リンゲル（日本全薬）を用いて子宮内還流により行った。また、採胚時に黄体がなかった牛は、採胚を中止した。

IETS の基準[32]に準じて、倒立顕微鏡下（Nicon）で発育ステージおよび品質を判定した。品質は、5 段階（Good、Fair、Poor, 変性および未受精卵）に分類した。

## 3. 黄体数および残存卵胞数の計測

卵巣の観察は、超音波画像診断装置（HS-101V、本田電子）を用いて胚回収前に黄体個数および残存卵胞数を計測した。

## 4. 統計分析

統計分析は、エクセル統計の一元配置の分散分析を用いて 4 つの方法の採胚時の黄体数、残存卵胞個数、回収胚数、胚の品質別の個数を比較した。採胚実施率は、カイ二乗検定を用いた。

### 第 3 節 結 果

各方法の採胚供試率、採胚時の黄体数および残存卵胞個数、回収胚数、品質ごとの回収数の結果を表 4 および 5 に示した。

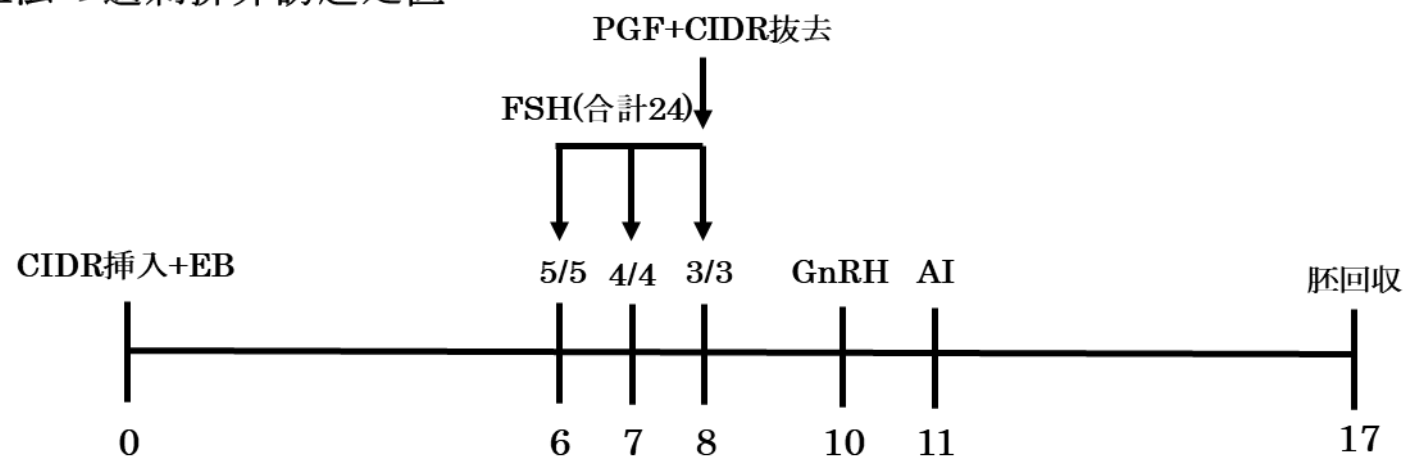
採胚実施率は、D 法に比べ B 法の供試率が有意に高かった ( $P<0.05$ )。採胚時の黄体個数は、A 法が B および C 法に比べ有意に多かった ( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )。また、B および C 法が D 法に比べ有意に黄体個数が多かった ( $P<0.01$ )。残存卵胞個数は、A 法が他の 3 つの方法に比べ有意に多く ( $P<0.01$ )、B 法は D 法に比べ有意に個数が多かった ( $P<0.05$ )。

回収胚数は、A および B 法が D 法に比べ有意に多かった ( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )。正常胚数は、A 法が B および D 法に比べ有意に多く ( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )、C 法は D 法に比べ有意に多かった ( $P<0.05$ )。変性胚数および未受精卵の個数に方法間の差はなかった。

Good 胚の個数は A 法および C 法が D 法に比べ有意に多かった ( $P<0.01$ )。また、A 法は B 法に比べ多い傾向がみられた ( $P<0.0577$ )。Fair 胚の個数は、A 法が他の 3 つの方法に比べ有意に多かった ( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )。Poor 胚の個数は B 法が D 法に比べ有意に多かった ( $P<0.05$ )。



## A法の過剰排卵誘起処置



## B法の過剰排卵誘起処置

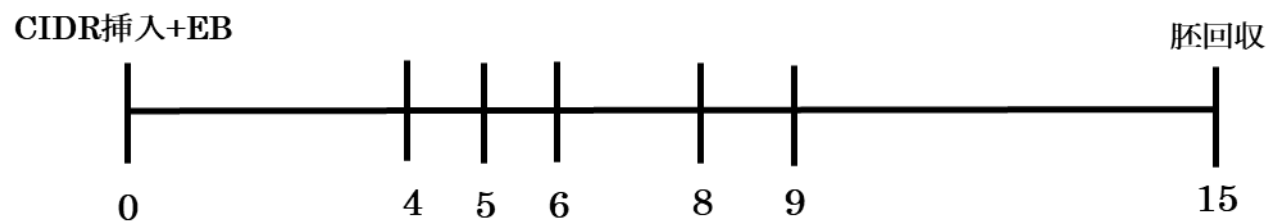


図 1. FSH 漸減投与法を用いた A および B 法の過剰排卵誘起処置

## CおよびD法の過剰排卵誘起処置

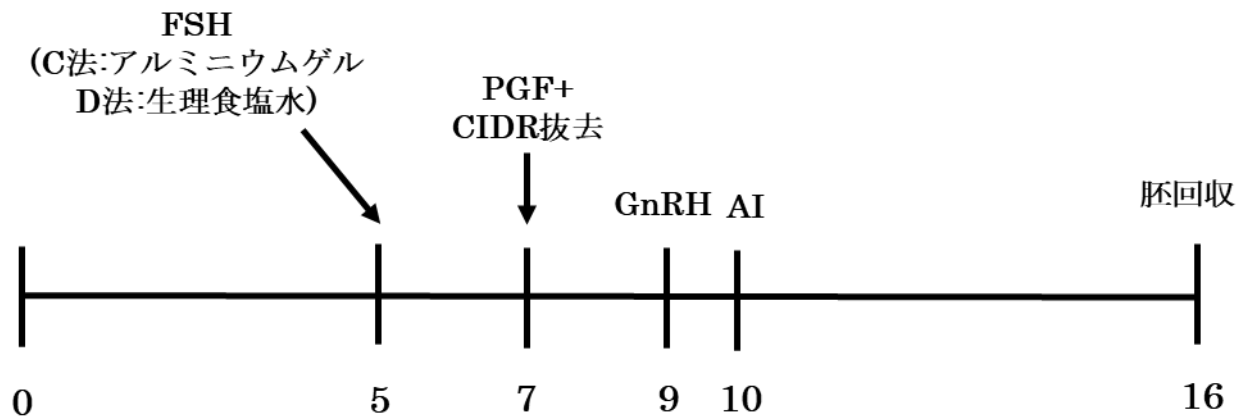


図 2. FSH 皮下内 1 回法を用いた C および D 法の過剰排卵誘起処置

表 4.FSH の投与開始時期が供試率および卵巣反応、採胚成績に及ぼす影響

| 区 分 | 供 試 頭<br>数 | 実 施 頭<br>数 | 実 施 率<br>( % )    | 黄 体 個 数                | 残 存 卵 胞 個 数           | 回 収 胚 数                 | 正 常 胚 数                 |
|-----|------------|------------|-------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| A 法 | 16         | 16         | 100               | 18.9±7.1 <sup>*c</sup> | 7.0±6.5 <sup>a</sup>  | 20.3±12.9 <sup>a</sup>  | 13.8±10.6 <sup>ac</sup> |
| B 法 | 50         | 50         | 100 <sup>c</sup>  | 16.1±8.8               | 3.4±3.8 <sup>bc</sup> | 16.1±8.8 <sup>c</sup>   | 8.7±9.2 <sup>d</sup>    |
| C 法 | 20         | 19         | 95.0              | 16.8±11.1              | 2.1±1.9 <sup>b</sup>  | 16.4±10.8               | 10.7±8.3 <sup>c</sup>   |
| D 法 | 65         | 57         | 87.7 <sup>d</sup> | 13.3±10.5 <sup>d</sup> | 1.8±2.7 <sup>bd</sup> | 11.5±11.3 <sup>bd</sup> | 5.7±6.1 <sup>bd</sup>   |

表 5.FSH の投与開始時期が回収した胚の品質に及ぼす影響

| 区 分 | 供 試 頭<br>数 | 胚 の 品 質               |                       |                      |         |         |
|-----|------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------|---------|
|     |            | Good                  | Fair                  | Poor                 | 変 性 胚 数 | 未 授 精 卵 |
| A 法 | 16         | 7.9±6.1 <sup>ae</sup> | 3.9±3.6 <sup>ac</sup> | 2.0±2.5              | 4.4±4.2 | 1.9±3.4 |
| B 法 | 50         | 5.1±6.1               | 1.8±2.2 <sup>b</sup>  | 2.0±3.8 <sup>c</sup> | 4.0±8.6 | 2.8±5.0 |
| C 法 | 20         | 7.6±5.9 <sup>af</sup> | 1.9±1.9 <sup>d</sup>  | 1.5±1.4              | 4.5±5.5 | 0.4±1.2 |
| D 法 | 65         | 3.6±3.4 <sup>b</sup>  | 1.5±2.4 <sup>b</sup>  | 0.8±1.5 <sup>d</sup> | 2.6±5.6 | 2.5±6.9 |

\*平均±標準偏差

ab 異符号間に有意差あり ( P<0.01 )

cd 異符号間に有意差あり ( P<0.05 )

ef 異符号間に傾向あり ( P<0.1 )

#### 第 4 節 考 察

CIDR および EB を用いて 6 日目から FSH 漸減投与を始めた報告は、著者が知る限り西寒水ら [54] の報告しか見あたらない。西寒水ら [54] は、本研究と同様の方法で過剰排卵誘起処置を行っており、5、6、7 日目にそれぞれ FSH 投与を開始して採胚成績に及ぼす影響を検討している。FSH 投与を 6 日目および 7 日目に開始した区は、投与 3 日目から発情にかけて小中卵胞が急激に減少し大卵胞数が増加したと報告している [54]。同様に小西ら [53] は、CIDR と EB の併用により 8 mm 以上の卵胞が減少し採胚数および黄体数が向上する傾向が見られたと報告している。

ホルスタイン種では、CIDR 挿入と EB 投与後の卵巢動態は、投与後 1 から 2 日後に大卵胞の長径が縮小し、小中卵胞が増加し、6 日目に 1～5 mm の卵胞数が増加し大卵胞数が減少していると報告している [59]。このことから卵胞波の同期化は CIDR 挿入および EB 投与後から 1 から 2 日で可能であり、4 日目に比べ 6 日目の方が FSH に反応する卵胞が揃っていたと考えられた。小西ら [53] は EB 投与後、エストロジェンの血中濃度が正常値に戻るまでに 4 日、estradiol valerate (EV) 投与後は 7 日を要すると報告している。肉用牛では、CIDR 挿入後、EV を 1 mg、2 mg、5 mg それぞれ投与後、新たな卵胞波の発現までに 1 mg で 3.2 日、2 mg で 3.4 日、5 mg で 4.8 日であったと報告している [60]。Bo ら [13]

や小西ら[53]も卵胞波の同期化には EV を 5mg 投与していた。岸田らは[59]、EB を 1mg 使用し同期化していた。それぞれの報告からエストラジオール 17 $\beta$  製剤の投与量および種類が新しい卵胞波の発現時期に影響したと考えられる。

FSH の分泌を抑制するインヒビンの濃度は、主席卵胞の発育とともに上昇し、排卵および閉鎖退行に伴い血中濃度が減少する[55]。また、Bo ら[13]は、肉用種での CIDR およびエストラジオール 17- $\beta$  を用いた過剰排卵誘起処置では、処置後に新たな卵胞波が発現するのに 4 日かかると報告している。処置後 4 日目に発現した小中卵胞は、閉鎖中の主席卵胞から分泌されたインヒビンの作用により FSH の分泌が抑制された環境下であり卵胞発育も抑制されたために B 法に比べ A 法の採胚成績が良好であったと考えられる。

採胚個数の多い牛は、血中のプロジェステロン濃度が高く、黄体の個数に比例している[56、57]。過剰排卵誘起処置時の黄体個数は、誘起発常時の卵巢反応が良好で卵胞数が多くても黄体数が激減するとの報告がある[58]。これは、卵胞閉鎖や排卵しなかったためであると考えられる。また、卵巢反応には個体差や使用する FSH 製剤による影響があることが報告[61]されている。

本研究の A 法の残存卵胞数は、他の方法に比べ多かったが、採胚時の黄体数、回収胚数、回収した胚の品質が良好であった。こ

のことは CIDR および EB 投与後に新たに立ち上がった卵胞発育ウェーブ中の卵胞が FSH に最も反応しやすい時期が 6 日目である可能性が高いことを示唆している。これまで CIDR と EB を用いる過剰排卵誘起処置では、4 日目に FSH 投与を開始する方法が広く普及しているが、本研究の結果および西寒水ら[54]の報告から、少なくとも黒毛和種においては、6 日目に FSH 投与する方法の方が従来の 4 日目開始よりも採胚成績が向上する可能性を示唆している。今後は、例数を増やして FSH の投与開始時期が採胚成績に及ぼす影響を詳細に検討する必要がある。

## 第 5 節 要 約

本研究では、CIDR と EB を用いた黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始日が胚回収成績に及ぼす影響について検討した。

CIDR を膣内に挿入すると同時に EB2 mg を筋肉内に注射した。A 法では、CIDR 挿入後 6 日目に FSH 投与を開始した B 法では、CIDR 挿入後 4 日目に FSH 投与を開始した。C 法では、CIDR 挿入後 5 日目に FSH (30AU) 全量をアルミニウムゲルに溶解して 1 回で皮下に投与し、D 法では、FSH (30AU) を生理食塩水に溶解した以外は C 法と同様の方法で実施した。

A 法の黄体個数は、B ( $P<0.01$ ) および C 法 ( $P<0.05$ ) に比べ有意に多かった。回収胚数は、A および B 法は、D 法に比べ有意に個数が多かった ( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )。正常胚数は、A 法が B および D 法に比べ有意に個数が多かった ( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )。Good 胚の個数は A 法および C 法は、D 法に比べ有意に個数が多く ( $P<0.01$ )、A 法が B 法に比べ多い傾向がみられた ( $P<0.1$ )。

黒毛和種の CIDR と EB を用いた過剰排卵誘起処置において CIDR と EB 処置後 6 日目に FSH 投与を開始すると胚回収成績が向上する可能性が示された。

### 第Ⅲ章 総 括

ウシ胚の凍結保存技術および黒毛和種における過剰排卵誘起処置技術の改善に関する研究

今日、ウシの育種改良において胚移植技術は必要不可欠な技術である。胚移植技術は多くの技術で成り立っているが、中でも過剰排卵誘起処置と胚の凍結保存技術は重要な技術である。すなわち、育種計画に胚移植を活用する場合、高品質胚をできるだけ多く生産することと凍結胚の受胎率をできるだけ高めることが重要である。さらに、これらの技術は簡易で実用性の高い技術が求められている。

本研究では、1) 乾式凍結器で凍結保存したウシの体外受精胚および体内受精胚の生存率および受胎率、および 2) CIDR と EB 投与による黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始日が胚回収結果に及ぼす影響、について検証した。

第Ⅰ章 乾式凍結器で凍結保存したウシ体外受精胚および体内受精胚の生存率および受胎率

最近、アルコール等の冷媒を用いない乾式凍結器が開発され市販されている。本研究では、乾式凍結器で凍結した体外受精胚（体外胚）の生存性および体内受精胚（体内胚）の移植後の受胎率を調べ、その有用性について検討した。



本研究で用いた凍結器は、乾式凍結器は YT Freezer80（ヤマネテック）ver1（YT1）および ver2（YT2）、アルコール液槽式 ET-UM（フジヤ矢野科学）の 3 種類である。実験 1 では、受精後 7 および 8 日目に発生した品質が IETS Code-1 および Code-2 の体外胚を供試胚とし、1.5MEG+0.1M ショ糖を凍結媒液として用い、それぞれの凍結器で凍結した（YT1: 50 個、YT2: 103 個、ET-UM: 100 個）。凍結保存した胚は、液体窒素からストローを取り出し、7 秒間空中保持し、30℃の温湯に 20 秒間浸漬して融解した。融解胚は 20% の牛胎子血清と 0.1mMβ-メルカプトエタノール添加 TCM-199 を用い、5% CO<sub>2</sub>、95% 空気および湿度飽和の気相で 72 時間体外培養した。培養後 0、24、48 および 72 時間目に胚の生存および脱出胚盤胞への発育を調査した。生存性の判断は、0 時間では正常な形状の胚を生存とし、24 時間後は再拡張した胚を生存とした。48 および 72 時間は脱出胚盤胞を生存胚とした。実験 2 では上記と同じ方法で凍結した黒毛和種（44 個）およびホルスタイン種（36 個）の体内胚計 80 個（YT1: 7 個、YT2: 39 個、ET-UM: 34 個）を、黒毛和種（37 頭）およびホルスタイン種（43 頭）の受卵牛に移植して受胎率を調べた。妊娠診断は発情後 30～60 日に超音波画像診断装置を用いて実施した。体外胚の融解直後の生存率は、YT1 が 86%（43/50）、YT2 が 97%（100/103）、ET-UM が 85%（85/100）であった。培養 24 時間目は YT1 が 68%

(34/50)、YT2 が 93% (96/103)、ET-UM が 72% (72/100) であった。培養 48 時間目は、YT1 が 24% (12/50)、YT2 が 44% (45/103)、ET-UM が 40% (40/100) であった。培養 72 時間目は、YT1 が 30% (15/50)、YT2 が 50% (52/103)、ET-UM が 47% (47/100) であった。融解直後および 24 時間目の生存率は、YT1 および ET-UM に比べ YT2 が有意に高かった ( $P<0.01$ )。48 時間の脱出胚盤胞率は、YT1 に比べ YT2 が有意に高かった ( $P<0.05$ )。72 時間の脱出胚盤胞率は、YT1 に比べ YT2 および ET-UM が有意に高かった ( $P<0.05$ )。胚移植後の受胎率は、YT1 が 57.1% (4/7)、YT2 が 64.1% (25/39)、ET-UM が 52.9% (18/34) で凍結器の間に差はなかった。以上の結果から、乾式凍結器は YT1 に比べ YT2 の生存率が高く、従来のアルコール液槽式と同等の生存率および受胎率が得られることが明らかになった。

第 II 章 黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始時期が  
卵巢反応および採胚成績に及ぼす影響

近年の過剰排卵誘起処置は、自然発情周期の黄体期（発情後 8 日～12 日）に開始する方法より、発情周期を人為的にコントロールして、開始する方法が主流となっている。なかでも、CIDR と EB を用いた過剰排卵誘起処置法の利用が多い。この CIDR と EB を用いた過剰排卵誘起処置においては、CIDR の膣内挿入と同時

に EB を筋肉内投与する。その 4 日後に FSH 投与を開始する方法が広く利用されている。しかし、CIDR と EB 処置後の FSH 投与開始日が胚回収成績に及ぼす影響に関する報告は少ない。そのため、本章では CIDR と EB を用いた黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始日が胚回収成績に及ぼす影響について検討した。

本研究では、4 つの過剰排卵誘起処置方法を用いた。供胚牛の発情周期の任意の時期に CIDR を膣内に挿入すると同時に EB2 mg を筋肉内に注射した（0 日目）。A 法では、CIDR 挿入後 6 日目に FSH 投与を開始した。FSH（5~3AU）は 1 日 2 回投与し、8 日目に PGF を筋肉内に注射するとともに CIDR を抜去した。その後 10 日目に GnRH を投与するとともに人工授精を実施した。B 法では、CIDR 挿入後 4 日目に FSH 投与を開始した。FSH（5~3AU）は 1 日 2 回投与し、6 日目に PGF を筋肉内に注射するとともに CIDR を抜去した。その後 8 日目に GnRH を投与するとともに人工授精を実施した。C 法では、CIDR 挿入後 5 日目に FSH 投与を開始した。FSH（30AU）は全量をアルミニウムゲルに溶解して 1 回で投与し、7 日目に PGF を筋肉内に注射するとともに CIDR を抜去した。その後 9 日目に GnRH を投与するとともに人工授精を実施した。D 法では、FSH（30AU）生理的食塩水に溶解した以外は C

法と同様の方法で実施した。胚回収はすべての方法で発情後 7 日に実施した。

採胚実施率は、A および B 法が 100% (A: 16/16、B: 50/50)、C 法 95% (19/20)、D 法 87.7% (57/65) であった。D 法に比べ B 法の実施率が有意に高かった ( $P<0.05$ )。黄体個数は、A 法  $18.9\pm7.1$  個、B 法  $16.1\pm8.8$  個、C 法  $5.1\pm5.2$  個、D 法  $13.3\pm10.5$  個であった。A 法は B ( $P<0.01$ ) および C 法 ( $P<0.05$ ) に比べ有意に黄体数が多かった。また、B および C 法は D 法に比べ有意に個数が多かった ( $P<0.01$ )。残存卵胞個数は、A 法  $7.0\pm6.5$  個、B 法  $3.4\pm3.8$  個、C 法  $2.1\pm1.9$  個、D 法  $1.8\pm2.7$  個であった。A 法は、他の 3 つの方法に比べ有意に残存卵胞数が多く ( $P<0.01$ )、B 法は、D 法に比べ有意に多かった ( $P<0.05$ )。

回収胚数は、A 法  $20.3\pm12.9$  個、B 法  $8.7\pm9.2$  個、C 法  $16.4\pm10.8$  個、D 法  $11.5\pm11.3$  個であった。A および B 法は、D 法に比べ有意に個数が多かった ( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )。正常胚数は、A 法  $13.8\pm10.6$  個、B 法  $8.7\pm9.2$ 、C 法  $10.7\pm8.3$  個、D 法  $5.7\pm6.1$  個であった。A 法は、B および D 法に比べ有意に個数が多く ( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )、C 法は D 法に比べ有意に個数が多かった ( $P<0.05$ )。変性胚数は A 法  $4.4\pm4.2$  個、B 法  $4.0\pm8.6$  個、C 法  $4.5\pm5.5$  個、D 法  $2.6\pm5.6$  個であった。未受精卵は A 法  $1.9\pm3.4$  個、B 法  $2.8\pm5.0$

個、C 法  $0.4 \pm 1.2$  個、D 法  $2.5 \pm 6.9$  個であった。変性胚数および未受精卵の個数に差はなかった。

Good 胚の個数は A 法  $7.9 \pm 6.1$  個、B 法  $5.1 \pm 6.1$  個、C 法  $7.6 \pm 5.9$  個、D 法  $3.6 \pm 3.4$  個であった。A 法および C 法は、D 法に比べ有意に個数が多かった ( $P < 0.01$ )。また、A 法は D 法に比べ多い傾向がみられた ( $P < 0.0577$ )。Fair 胚の個数は、A 法  $3.9 \pm 3.6$  個、B 法  $1.8 \pm 2.2$  個、C 法  $1.9 \pm 1.9$  個、D 法  $1.5 \pm 1.4$  個であった。A 法は他の 3 つの方法に比べ有意に個数が多かった ( $P < 0.05$ )。Poor 胚の個数は A 法  $2.0 \pm 2.5$  個、B 法  $2.0 \pm 3.8$  個、C 法  $1.5 \pm 1.4$  個、D 法  $0.8 \pm 1.5$  個であった。B 法 D 法に比べ有意に個数が多かった ( $P < 0.05$ )。

以上の結果から、乾式凍結器は従来のアルコール液槽式と同等の生存率および受胎率が得られることが明らかになり、実用性の高いことが示された。また、黒毛和種の CIDR と EB を用いた過剰排卵誘起処置において CIDR と EB 処置後 6 に日目に FSH 投与を開始すると胚回収成績が向上する可能性が示された。本研究のこれらの結果は、牛の育種計画への胚移植技術の利用促進に貢献する内容である。

## 謝 辞

終始ご指導賜りました酪農学園大学大学院酪農学研究科の家畜繁殖学研究室堂地 修教授、動物生殖工学研究室今井 敬教授、家畜改良生産学研究室西寒水 将講師、乾式凍結器をご提供いただきました株式会社ヤマネテックの山根誠一様ならびにご協力して頂いた動物生殖工学研究室、家畜繁殖学研究室、家畜改良生産学研究室所属学生各位に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- [1] Wilmut, I. and Rowson, L. E. A. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.
- [2] Seidel, G. E. Jr. 2015. Lessons from reproductive technology research. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 3:467-487.
- [3] Hasler, J. F. 2001. Factors affecting frozen and fresh frozen embryotransfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56:1401-1415.
- [4] Viana, J. 2017. Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. IETS Data Retrieval Committee.
- [5] Casida, L. E, Meyer R.K, Mcshan W. H, and Wisnicky W. 1943. Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. *Am.J.Vet.Res.* 4:76-79
- [6] Rowson L. E. 1951. Methods of inducing multiple ovulation in cattle. *The Journal of endocrinology*, 7, 260-270.

- [7] Dziuk P. J., Graham.E.F, and Petersen.W.E. 1954. The technique of electroejaculation and its use in dairy bulls. *J. Dairy Sci.* 37:1035–1041.
- [8] Tríbulo, A., Rogan, D., Tribulo, H., Tribulo, R., Alasino, R. V., Beltramo, D., Bianco, I., Mapletoft, R. J., and Bó, G. A. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Animal reproduction science*, 129: 7–13.
- [9] Kimura K. 2016. Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *The Journal of reproduction and development*, 62: 423–429.
- [10] Bó, G. A., Guerrero, D. C., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tribulo, R., Rogan, D., and Mapletoft, R. J. (2010) . New approaches to superovulation in the cow. *Reproduction, fertility, and development*, 22:106–112.
- [11] Hiraizumi, S., Nishinomiya, H., Oikawa, T., Sakagami, N., Sano, F., Nishino, O., Kurahara, T., Nishimoto, N., Ishiyama, O., Hasegawa, Y., and Hashiyada, Y. 2015. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle-stimulating hormone



- treatment or six intramuscular treatments over three days. *Theriogenology*, 83: 466–473.
- [12] Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81:38–48.
- [13] Bo, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., & Mapletoft, R. J. (1996). Effect of progestogen plus estradiol-17beta treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 45: 897–910.
- [14] Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81:38–48.
- [15] Looney, C. R. 1986. Superovulation in beef females. 5th Annual Conference of the AETA, Ft. Worth, TX. American Embryo Transfer Association, Champaign, IL. Pages 16–24 in Proc.
- [16] Hasler, J. F., McCauley, A. D., Schermerhorn, E.C., Foote, R.H. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19:83-99.

- [17] Moore, S. G., and Hasler, J. F. 2017. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of dairy science*, 100:10314–10331.
- [18] Voelkel, S. A., and Hu, Y. X. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37:687–697.
- [19] Kocoski, L. J, Dochi, O, Chan, H, del Sol A. B., Velasques, R. R., Sapalli, L. E. and Popovski, K.1991. The effect of different cryopreservation methods on the survival rate in bovine embryos. *Scientific Meeting, A.E.T.E*, 7:154
- [20] 堂地修, 今井敬, 高倉宏輔. 1991. ethylene glycol を用いて凍結したウシ胚の Direct transfer 法による移植. 第 84 回日本畜産学会大会講演要旨: 65.
- [21] Dochi, O., Yamamoto, Y., Saga, H., Yoshiba, N., Kano, N., Maeda, J., Miyata, K., Yamauchi, A., Tominaga, K., Oda, Y., Nakashima, T., and Inohae, S. 1998. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an

integrated embryo transfer

program. *Theriogenology*, 49:1051-1058.

- [22] Nibart. M, Humblot. P. 1997. Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology*, 47:371.

- [23] 堂地修, 今井敬. 1999. ウシ凍結胚の直接移植法. 日本胚移植学雑誌, 21: 28-34.

- [24] 中川邦昭. 1998. 実用化に向けた牛胚移植技術ーエチレングリコールを用いた牛胚のダイレクト移植法ー. 新潟畜試研報. No12

- [25] Massip. A, Van Der Zwalm. P, and Ectors. F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27: 69-79.

- [26] Massip A. 1996. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Embryo Transfer Newsletter* 14: 33.

- [27] Whittingham, D. G., Leibo, S. P., and Mazur, P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science (New York, N.Y.)*, 178 (4059), 411-414.

- [28] 株式会社 ヤマネテック 乾式凍結器 YT フリーザー 商品ホームページ <https://yamanetech.com/yt-freezer/>

- [29] 平田 宏一, 川田 正國. 2004. スターリングエンジンの原理と開発事例. *Science of machine* 56 : 941-949
- [30] Morgan, J. F., Morton, H. J., and Parker, R. C. 1950. Nutrition of animal cells in tissue culture; initial studies on a synthetic medium. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. *Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* , 73, 1-8.
- [31] Takahashi, Y., Hishinuma, M., Matsui, M., Tanaka, H. and Kanagawa, H. 1996. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 897-901.
- [32] Brackett, B. G., and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of reproduction*, 12: 260-274.
- [33] Wright, J.M. 2009. In: Stringfellow D.A. and Givens M.D. ( eds ) , Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In Manual of the International Embryo Transfer Society, Champaign, I L :141-144.

- [34] 堂地 修，今井 敬．1999．ウシ凍結胚の直接移植法．日本胚移植学雑誌 21:28-34
- [35] 西井里依，小川寅勝，宜保敬也，近藤伸一，佐々木涼，白石一馬，塚田このみ，平野政子，小山久一，高橋 茂，堂地修．2011．凍結ストロー作成における 3.5cm プラスチックシャーレの利用の有効性．北海道受精卵移植研究会会報 30:11-14
- [36] 今井 敬，富沢崇高，下平乙夫，奥地弘明，後藤裕司，斉藤政宏，堂地 修．1993． $\beta$ -メルカプトエタノールを用いたウシ体外受精由来胚盤胞の培養．繁殖技術会誌 15:35-40
- [37] 多田 幸生，瀧本 昭，塚本 春樹，大西 元．2008．組織体凍結に及ぼす超音波照射の影響．日本伝熱シンポジウム講演論文
- [38] 多田幸生，瀧本 昭，近谷 翼，林勇次郎．2005．超音波照射化における氷晶形成に関する研究．日本機械学会熱工学会コンファレンス講演論文，11:29-30．
- [39] Joao H.M., Viana, C. 2021. 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 2021
- [40] 農林水産省 平成 27 年度牛受精卵移植実施状況 [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www](https://www.affairs.go.jp/extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www)

w.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\_katiku/attach/pdf/index-10.pdf

- [41] 菅原 紀, 西寒水将, 斉藤徳子, 北村祥子, 松本亜希子, 家田祥子, 張山綾子, 堂地 修, 小山久一. 2000. 北海道牛受精卵移植研究会:52-56
- [42] Miyoshi, A, Sugawara, M, Kaneda, Y, Sekizawa, H, Dochi, O. 2017. Comparison of superovulatory responses to single subcutaneous FSH injection and twice-daily intramuscular FSH injection protocols in Japanese Black cows. *Reprod. Fertil.Dev.*,30: 237.
- [43] 西寒水 将, 新林琴乃, 田中明日香, 三好 彩, 森好政晴, 菅野実樹夫, 今井 敬, 堂地 修. 2018. 肉用牛における FSH1 回投与による過剰排卵誘起処置時のプロスタグランジン F2 $\alpha$  投与時期が胚回収成績に与える影響.日本胚移植学雑誌 41: 1-8
- [44] Boland, M.P., Goulding, D., & Roche, J.F. 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35:5-17.
- [45] Donaldson, L.E. 1984. The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. *Theriogenology*, 22:97-99.

- [46] Lerner, S. P., Thayne, W. V., Baker, R. D., Henschen, T., Meredith, S., Inskip, E. K., Dailey, R. A., Lewis, P. E., and Butcher, R. L. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *Anim. Sci. J.*, 63:176-183.
- [47] Breuel, K. F., Baker, R. D., Butcher, R. L., Townsend, E. C., Inskip, E. K., Dailey, R. A., and Lerner, S. P. (1991). Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*, 36:241-255.
- [48] 小西一之, 鈴木一男. 1991. 黒毛和種における過剰排卵誘起処理に及ぼす供胚牛の産次の影響. 第80回家畜繁殖学会講演要旨: 84
- [49] 小西一之, 鈴木一男. 1991. 黒毛和種における分娩をはさんだ反復過剰排卵誘起処理. 第80回家畜繁殖学会講演要旨: 85
- [50] Hasler, J. F., Brooke, G. P., and McCauley, A. D. (1981). The relationship between age and response to superovulation in holstein cows and heifers. *Theriogenology*, 15:109.

- [51] Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ko, J. C., and Ginther, O. J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 94:177-188.
- [52] Stock, A. E., Ellington, J. E., and Fortune, J. E. 1996. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology*, 45:1091-1102.
- [53] 小西一之，堂地 修，岡田真人，宮沢 彰，橋田谷豊，後藤裕二，小林修二，今井 敬．1997．黒毛和種経産牛における CIDR と FSH を用いた過剰排卵処理成績に及ぼす Estradiol- $17\beta$  .日本畜産学会報 68 : 1075-1084
- [54] 西寒水 将，高倉 良，岸 昌生，堂地 修．2019．黄体ホルモンとエストラジオールを用いた黒毛和種の過剰排卵誘起処置時の FSH 投与開始日が卵胞発育および胚回収成績に及ぼす影響．日本胚移植学会報 41:69-76
- [55] Adams, G. P., Nasser, L. F., Bo, G. A., Garcia, A., Del Campo, M. R., and Mapletoft, R. J. 1994. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology*, 42:1103-1113.



- [56] 齊藤則夫，小西一之，沢田 勉，丸尾善之，木村 滋，森  
純一．1985．FSHによる過剰排卵誘起処理牛における血中プロ  
ジェステロン濃度の変化ならびに採卵成績について．第 77 回  
日本畜産学会講演要旨：61．
- [57] 堂地 修，高倉宏輔，伊藤剛嗣，高橋博人，津田秋治，酒  
井 豊，中尾敏彦．1985．ホルスタイン種未経産における過剰  
排卵誘起処理に伴う血中プロジェステロン濃度の変動と採卵  
成績との関係．北海道牛受精卵移植研究会会報 4：22-28．
- [58] 佐藤 隆，大久保吉啓．2011．黒毛和種繁殖雌牛の過剰排  
卵誘起処理怪異指示に存在する大型卵胞および発情時の卵胞  
数と採卵成績．長野県畜産試験場研究報告，32：30-32
- [59] 岸田和美，西寒水 将，青木春佑，石原毅士，菅原 紀，  
堂地 修，小山久一．2003．CIDR および安息香酸エストラジ  
オールを用いた過剰排卵誘起処置牛の卵巢観察．北海道牛受  
精卵移植研究会報．22:15-19．
- [60] Mapletoft R.J., Colazo M.G., Small J.A., Ward D.R. and  
Kastelic J.P. 2004. 15 Effect of dose of estradiol valerate  
on ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cows.  
*Reprod. Fertil. Dev.* 16：130-130.

- [61] 佐藤 隆,大久保吉啓. 2011. 黒毛和種繁殖雌牛の過剰排卵  
処理開始時に存在する大型卵胞および誘起発情時の卵胞数と  
採胚成績.長野県畜産試験場研究報告.32:30-32.
- [62] Ginther O. J. 2016. The theory of follicle selection in  
cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 57:85-99.

## Study on improved techniques for cryopreservation of bovine embryos and superovulation treatment of Japanese Black cattle

Nowadays, embryo transfer technology is essential in cattle breeding improvement programs. Embryo transfer technology comprises of many techniques, among which superovulation treatment and embryo cryopreservation techniques are important. When using embryo transfer in breeding programs, it is important to produce as many high-quality embryos as possible to increase the conception rate of frozen embryos. These technologies should be simple and practical.

This study has two objectives: (1) verification of the survival rate of frozen *in vitro* fertilized (IVF) bovine embryos and conception rate of *in vivo* embryos using a newly developed dry-chamber program freezer, (2) investigating the effect of initiation time of Follicle-stimulating hormone (FSH) administration on embryo recovery in the superovulation in Japanese Black cows with CIDR and estradiol benzoate (EB) .

*Verification of survival rate of frozen in vitro fertilized bovine embryos and conception rate of in vitro fertilized embryos using a newly developed dry-chamber program freezer*

Dry-chamber program freezers that do not use any alcohol or refrigerants have been recently developed and commercialized. In this study, the viability of IVF embryos frozen using a dry-chamber freezer and the conception rate of frozen *in vivo* embryos were examined to assess their practical effectiveness.

Three types of program freezers were used in this study: two dry-chamber type (YT Freezer 80, YT1, and YT2) and one alcohol-chamber type ET-UM (Fujiya-Yano Science Co., Ltd.) . In Experiment 1, IETS Code -1 blastocysts that developed on days 7 and 8 after IVF were frozen in their respective freezers using 1.5 M ethylene glycol + 0.1 M sucrose (YT1:50 embryos, YT2:103 embryos, ET-UM:100 embryos) . Frozen embryos were thawed by removing straws from liquid nitrogen,

holding them in air for 7 days, and immersing them in water at 30 ° C for 20 s. The frozen-thawed embryos were cultured *in vitro*, supplemented with 20% fetal bovine serum and 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol in TCM-199 in 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% in air, and under humidity-saturated conditions for 72 h, to examine their viability. Embryos were examined for survival and development into hatching blastocysts at 0, 24, 48, and 72 h after culture. Embryos with normal morphology at 0 h and re-expansion at 24 h were estimated to be viable. Hatching blastocysts were used as viable embryos after 48 and 72 h of culture. In Experiment 2, a total of 80 (YT1:7 embryos, YT2:39 embryos, ET-UM:34 embryos) embryos from Japanese Black (44 embryos) and Holstein (36 embryos) were frozen by the same program freezers as described in Experiment 1 were transferred to recipients of Japanese Black (37 embryos) and Holstein heifers and cows (43 embryos) to determine the conception rate. Pregnancy diagnosis was performed using ultrasound between 30 and 60 d after estrus.

The survival rate of IVF embryos after thawing was 86% (43/50) for YT1, 97% (100/103) for YT2, and 85% (85/100) for ET-UM. At 24 h of culture, survival rates for YT1 was 68% (34/50), YT2 was 93% (96/103), and ET-UM was 72% (72/100). At 48 h of culture, survival rates of YT1 was 24% (12/50), YT2 was 44% (45/103), and ET-UM was 40% (40/100). After 72 h of culture, survival rates of YT1 was 30% (15/50), YT2 was 50% (52/103), and ET-UM was 47% (47/100). The survival rates after thawing and at 24 h were significantly higher for YT2 than for YT1 and ET-UM ( $P < 0.01$ ). The 48h hatching blastocyst rate was significantly higher for YT2 than for YT1 ( $P < 0.05$ ). The 72h hatching blastocyst rate was significantly higher for YT2 and ET-UM than for YT1 ( $P < 0.05$ ). Conception rates after embryo transfer did not differ with respect to the type of freezer used. The rates obtained were 57.1% (4/7) for YT1, 64.1% (25/39) for YT2, and 52.9% (18/34) for ET-UM. These results indicate that the embryos frozen using dry-chamber program freezer exhibited a higher survival rate for YT2 than for YT1, and that the survival and

conception rates were comparable to those of the conventional alcohol-chamber program freezer.

*Effect of initiation time of FSH administration on embryo recovery in superovulation induction treatment of Japanese Black cows with CIDR and EB.*

In recent years, superovulation treatments involve artificial control of the estrous cycle and initiation of FSH administration rather than starting at the luteal phase of the natural estrous cycle (8 to 12 days after estrus) . Superovulation methods using CIDR and EB are often used, where EB is administered intramuscularly at the same time as the vaginal insertion of CIDR. In this method, FSH administration is generally initiated 4 days after CIDR and EB treatment. However, to the best of our knowledge, only a few studies have investigated the effect of the initiation time of FSH administration after CIDR and EB treatments on embryo recovery. Therefore, this study discusses the effect of initiation time of FSH administration on embryo recovery in the

induction of superovulation in Japanese Black cows with CIDR and EB.

Four superovulation-inducing treatments were used in this study. On a random day of the donor's estrous cycle, the CIDR was inserted into the vagina, and 2 mg of EB was injected intramuscularly (day 0). In method A, FSH was initiated 6 days after CIDR insertion. FSH (24AU) was administered twice daily,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  analog (750  $\mu\text{g}$ , PGF) was injected intramuscularly, and CIDR was removed on day 8. GnRH (100  $\mu\text{g}$ ) was administered and artificial insemination was performed on the 10<sup>th</sup> day. In method B, FSH (24AU) was initiated 4 days after CIDR insertion twice daily. PGF was injected intramuscularly and CIDR was removed on day 6. GnRH (100  $\mu\text{g}$ ) was then administered and artificial insemination was performed on day 8. In method C, FSH was initiated 4 days after CIDR insertion. The total amount of FSH (30AU) was dissolved in aluminum gel and administered in a single dose, PGF (750  $\mu\text{g}$ ) was injected intramuscularly, and the CIDR was removed on day 6. GnRH (100  $\mu\text{g}$ ) was then administered, and artificial insemination was



performed on day 8. Method D was performed similarly as Method C, except that the solution was dissolved in FSH (30AU) physiological saline. Embryo recovery was performed 7 days after artificial insemination using all methods.

The percentage of inseminated animals was 100% (A c :16/16, B:50/50) for methods A and B, 95% (19/20) for method C, and 87.7% (57/65) for method D. There was a significantly higher rate of artificial insemination in method B than in method D ( $P < 0.05$ ). The number of corpora lutea was  $18.9 \pm 7.1$  in method A,  $16.1 \pm 8.8$  in method B,  $16.8 \pm 11.1$  in method C, and  $13.3 \pm 10.5$  in method D. There were significantly more corpora lutea in method A than in methods D ( $P < 0.01$ ). The number of remaining follicles was  $7.0 \pm 6.5$  in method A,  $3.4 \pm 3.8$  in method B,  $2.1 \pm 1.9$  in method C, and  $1.8 \pm 2.7$  in method D. Method A had significantly higher number of follicles than the other three methods ( $P < 0.01$ ), and method B had significantly higher numbers than method D ( $P < 0.05$ ).

The numbers of embryo collected were  $20.3 \pm 12.9$  in method A,  $8.7 \pm 9.2$  in method B,  $16.4 \pm 10.8$  in method C, and  $11.5 \pm 11.3$  in method D. Methods A ( $P < 0.01$ ) and B ( $P < 0.05$ ) produced significantly more embryos than method D. The numbers of transferable embryo were  $13.8 \pm 10.6$  in method A,  $8.7 \pm 9.2$  in method B,  $10.7 \pm 8.3$  in method C, and  $5.7 \pm 6.1$  in method D. Method A produced significantly more transferable embryos than methods B ( $P < 0.01$ ) and D ( $P < 0.05$ ), and method C produced significantly more transferable embryos than method D ( $P < 0.05$ ). The numbers of degenerated embryo were  $4.4 \pm 4.2$  in method A,  $4.0 \pm 8.6$  in method B,  $4.5 \pm 5.5$  in method C, and  $2.6 \pm 5.6$  in method D. The numbers of unfertilized egg were  $1.9 \pm 3.4$  in method A,  $2.8 \pm 5.0$  in method B,  $0.4 \pm 1.2$  in method C, and  $2.5 \pm 6.9$  in method D. No difference in the number of degenerated embryos or unfertilized eggs was noted.

The numbers of Good embryo were  $7.9 \pm 6.1$  in method A,  $5.1 \pm 6.1$  in method B,  $7.6 \pm 5.9$  in method C, and  $3.6 \pm 3.4$  in method D. Methods A and C produced significantly more Good embryos than method D ( $P < 0.01$ ). Method

A was more common than method B ( $P < 0.05$ ). The numbers of Fair embryo were  $3.9 \pm 3.6$  in method A,  $1.8 \pm 2.2$  in method B,  $1.9 \pm 1.9$  in method C, and  $1.5 \pm 1.4$  in method D. Method A had significantly more Fair embryos than the other three methods ( $P < 0.05$ ). The numbers of Poor embryo were  $2.0 \pm 2.5$  in method A,  $2.0 \pm 3.8$  in method B,  $1.5 \pm 1.4$  in method C, and  $0.8 \pm 1.5$  in method D. Method B had significantly more Poor embryos than method D ( $P < 0.05$ ).

In conclusion, these results indicate that the survival and conception rates of bovine frozen-thawed embryos obtained using dry-chamber program freezer are comparable to those of conventional alcohol-chamber program freezers, indicating its high practical usability. It was also shown that in superovulation treatment of Japanese Black cows using CIDR and EB, initiating FSH administration on day 6 after CIDR and EB treatment may improve embryo recovery results. The results of this study will contribute to the promotion of embryo transfer technology in cattle breeding programs.