

経膈採卵を用いたウシ体外胚生産系の高度化に関する研究

江頭 潤将

2019

目次

第1章 緒言	1
第2章 暑熱ストレスが OPU により採取されたウシ卵丘細胞-卵母細胞複合体の品質 に及ぼす影響	
第1節 緒言	7
第2節 材料と方法	9
第3節 結果	13
第4節 考察	14
第5節 小括	18
第3章 OPU 由来体内成熟卵を用いた効率的な体外胚生産系の検討	
第1節 緒言	27
第2節 材料と方法	29
第3節 結果	35
第4節 考察	37
第5節 小括	41
第4章 発生動態を指標とした高受胎率が望める体外生産胚の客観的選別法の確立	
第1節 緒言	52
第2節 材料と方法	53
第3節 結果	55

第4節 考察	56
第5節 小括	59
第5章 総括	66
謝辞	70
引用文献	71

第 1 章 緒言

家畜の改良増殖を目的とした人工授精の研究は 1900 年代に開始され、第二次世界大戦以降には複数の家畜種において各国で広く普及することとなった。わが国では 1950 年代からウシの人工授精が実用化され、凍結精液を用いた人工授精技術の開発・普及は優秀な種雄牛の精液から効率的に子牛を生産することを可能とし肉用牛および乳牛の育種改良を飛躍的に促進した。現在では、わが国における子牛生産のほぼ 100%がこの技術を用いて行われている。

一方、雌側からの遺伝的改良を目的とした胚移植技術においても様々な動物種で研究が行われ、ウシでは Willett らが人工授精後 5 日目の屠殺した供胚牛から採取した胚を用いて産子を得ることに初めて成功し[1]、1965 年に Sugie によって非外科的胚移植による子牛生産が報告されている[2]。さらに、1973 年には Wilmut らによりウシ凍結胚の移植による受胎率が報告され、胚の長期保存が可能となった[3]。このことは空間的および時間的な壁を超えて胚を流通させることを可能とし、家畜の増殖や育種改良のさらなる効率化へと繋がった。現在では、過剰排卵処理を施した遺伝的に優れた供胚牛に人工授精を行って多数の体内生産胚を採取し、別の受胚牛の子宮内に移植することで子牛を生産することが一般的に行われている。このように、胚移植技術は優秀な能力を有する雌牛の遺伝形質を受け継いだ産子の増産が期待できることから、種雄牛の作出や高能力雌牛の生産のために国内外で広く活用されており家畜繁殖に欠かせない技術となっている。

さらに、1986 年、Hanada らは屠場由来卵巣から未成熟卵を採取して体外成熟培養 (*in vitro maturation ;IVM*) および体外受精 (*in vitro fertilization ;IVF*) 後に発生した胚を受胚牛に移植して産子を得ることに成功した[4]。Hanada らの報告では媒精後の胚をウサギ卵管内で体内発生培養を行ったが、その後の研究により卵管内培養を必要としない体外発生培養 (*in vitro culture ;IVC*) 系が確立された[5]。と場由来卵母細胞を用いた胚の効率的生産により遺伝資源を有効に活用することが可能となった一方で、黒毛和種におい

では公益社団法人全国和牛登録協会が実施している血統登録がなされていない場合や個体識別が困難な胚由来の産子は種畜として利用することができず経済的価値が下がってしまう。また、個体識別ができたとしても、屠畜されたウシの卵巣から卵母細胞を採取する場合、体外生産胚が得られる機会は一度きりと限られるため、屠場由来卵巣の子牛生産への利用は限定的であるといえる。

近年、超音波画像診断装置を用いて生体内卵巣から卵母細胞を採取する Ovum Pick-Up (OPU) 法が開発され [6]、雌牛から繰り返し卵母細胞を採取することが可能となっており、IVF 技術と組み合わせることによって前述の体内生産胚と比べて効率的に胚を生産することができ、優良雌牛の遺伝資源の有効利用を目的とした OPU 法の現場レベルでの普及が現在推進されている[7-9]。また、OPU 法を適用することで体内生産胚を作成することが困難な繁殖障害牛や未経産牛、妊娠初期のウシにおいても胚を生産することが可能となることもこの技術の利点であるといえる[10-14]。したがって、OPU 法を利用して体外で胚を生産することは、任意の雌雄個体から優良形質を受け継いだ子牛のより効率的な生産に加えて、現在、現場レベルでその活用が広まりつつある黒毛和種牛のゲノム育種価の活用の促進にも大いに貢献することから、今後ますますその需要が高まると考えられる。しかしながら、体外胚生産 (*in vitro* production ;IVP) システムに関して過去数十年にわたって研究がなされてきたにもかかわらず、体外生産胚の移植後の受胎率および凍結保存後の生存性は体内生産胚のそれと比較して未だに低く [8, 9]、これらは体外生産胚を利用した子牛生産における最大の問題といえる。したがって、体外生産胚による子牛生産に対する期待や需要に応えるために、体外生産胚の高品質化を成し遂げることが、当該分野における喫緊の課題と考えられる。

一方、近年では気候変動に起因すると考えられる夏季の猛暑日、高夜温日数の増加を伴った高温環境が家畜の繁殖性を大きく低下させることが生産現場で大きな問題となっている。なかでも、全国有数の畜産県が多く存在し、肉用牛に関していえば、国内の

約30%が飼育されている九州地方では、もともと温暖な地域であるということも重なり、夏季の人工授精における受胎率が約10%も低下することが知られている[15, 16]。この夏季の人工授精の受胎率低下は、繁殖雌牛の空胎期間の長期化を引き起こし、繁殖農家の経営を圧迫している。さらに、九州地方は国内でも有数の肉用子牛の生産拠点でもあるため、子牛の生産性低下は全国の子牛価格の高騰を招き、ひいては肥育農家の経営にも影響を及ぼしている。この夏季の人工授精における受胎率低下の主な原因として暑熱ストレスの影響が知られており、これまでも暑熱ストレスに関する研究が盛んに行われてきているが、夏季の暑熱ストレスの影響を直接的に回避する決定的な技術は未だ確立されていない。そこで、暑熱ストレスが生殖細胞に与える影響についてはこれまでも盛んに調べられているが、その多くは体外モデルを用いた研究であり、実際に生体内の生殖細胞にどのような影響を及ぼしているのかについて精査した報告は少ない。加えて、上述したようにIVPシステムではOPU由来卵母細胞を用いることが現実的であるが、暑熱ストレスがそれらの品質に与える影響を調べたこれまでの報告では、体外発生率のみを指標としたものがほとんどである。したがって、OPU由来卵母細胞を用いて日常的に高品質な胚を体外生産するという目的を達成するためには、季節間での品質の違いについて多角的な評価を行っておく必要があると考えられる。

以上の背景のもと、本研究では OPU 由来卵母細胞を用いたウシ体外胚生産系 (OPU-IVP) の高度化を目的として、以下の3つの研究課題について検討を行った。

- ① 採卵季節の異なる OPU 由来卵母細胞における特徴解析
- ② 体内成熟卵母細胞を用いた体外胚生産システムの検討
- ③ 発生動態を指標とした高受胎率が望める体外生産胚の客観的選別法の確立

具体的には、体外生産胚の高品質化に寄与することを目的として、暑熱期および冷涼期に OPU により採取された卵母細胞の特徴解析、体内および体外成熟卵母細胞を用いた体外生産胚における発生能および品質の比較を行った。さらに、受胎率向上による

OPU-IVP の高度化に寄与することを目的として、胚の発生動態に着目した高受胎率が望める体外生産胚の客観的選別法についての検討を行った。

第2章 暑熱ストレスが OPU により採取された
ウシ卵丘細胞－卵母細胞複合体の品質に及ぼす影響

第1節 緒言

夏季の高温・高湿度環境下では家畜の生産性が低下することが知られている。ウシにおいて、暑熱は体温や呼吸数を増加させて生産性を低下させること[17]、加えて、繁殖性の低下も引き起こし、特に乳用牛では夏季の受胎率が著しく低下することが多く報告されている[15, 18-20]。これまでの研究から、暑熱ストレスが不十分な卵成熟[21, 22]、受精の不成立[23]および初期胚の損耗[24]など様々な障害を引き起こすことが示されており、これらが受胎率の低下を引き起こす要因として考えられている[16]。特に、生体内で長期間にわたって暑熱ストレスに曝露される卵胞内の卵丘細胞－卵母細胞複合体（COCs）の品質低下は受胎率低下と大きく関係すると推察される。OPUにより採取されたCOCsを用いて体外成熟および体外受精を行って生産された胚の発生成績を比較した場合、冬季と比較すると夏季で胚発生率が低いことが報告されており[25]、冬季に比べ夏季ではCOCsの品質が低いことが示唆されている[21, 24]。暑熱ストレスを受けた個体では、ホルモン分泌やそれに対する反応性に異常が生じるとの報告がなされていることから[26]、これらが卵胞発育に悪影響を与え、結果的に卵胞内COCsの品質低下を引き起こしている可能性が考えられている。しかしながら、個体への暑熱ストレスが卵胞内COCsにどのような変化を引き起こしているのかについてはあまり理解が進んでいないのが現状である。

COCsの品質を評価する指標の一つに卵丘細胞の健全性が挙げられる。卵丘細胞は顆粒膜細胞から分化した細胞であり、卵母細胞を覆う細胞層を形成し、ギャップ結合を通じて卵母細胞に栄養素や成長因子などを供給している。したがって、その健全性が卵母細胞の発育、成熟、さらにはその後の発生能に大きく影響を及ぼすことが報告されている[27-29]。過去の研究では、卵丘細胞においてアポトーシス（DNA断片化）が誘導されることによって、それらが取り囲む卵母細胞の発生能力が低下することが明らかとなっている[30]。加えて、体外成熟培養時の暑熱ストレス負荷による影響を調査した研究

においても、暑熱ストレスにより卵丘細胞のアポトーシスが誘導されること、さらに体外受精後の胚発生率が低下することが観察されている[31]。これらの知見は、卵丘細胞のアポトーシスレベルがCOCsの品質を評価する上で指標となりうることを示している。また、卵母細胞自体の品質に関与する因子についてもこれまでいくつか報告されているが[32]、そのうちの一つにミトコンドリアが挙げられる。ミトコンドリアはアデノシン三リン酸（ATP）合成、活性酸素種（ROS）産生、カルシウムシグナル伝達、ホメオスタシスの維持、アポトーシスなど非常に多くの細胞機能に関与する細胞小器官として知られており、卵母細胞の品質とも密接に関係していることが多くの研究によって明らかにされている[33-35]。具体的には、卵細胞質内のミトコンドリア分布とその代謝活性は卵成熟中に変化すること[36]、発生能の低い卵母細胞では異常なミトコンドリア分布を示すことが報告されており[37, 38]、卵母細胞の品質を評価するうえで重要な指標の一つと言える。そこで、本章では、黒毛和種繁殖雌牛を用いて暑熱期と冷涼期にOPUを実施し、採取したCOCsにおける卵丘細胞のアポトーシスレベルおよび卵母細胞のミトコンドリア分布を評価することによって、COCsの品質に季節間で差があるかどうかについて明らかにすることを目的とした。

第2節 材料と方法

1. 試薬

特に記載がない場合は、全てSigma-Aldrich (St. Louis, USA) から購入した。

2. 供試動物および試験区

本研究は佐賀県畜産試験場で飼養している黒毛和種繁殖雌牛を暑熱期5頭(7.8±1.0歳, 6.4±0.9産, 442.6±20.1kg, (平均±標準誤差))、冷涼期3頭(8.7±1.3歳, 6.3±1.7産, 450.0±20.8kg)を用いて実施した。暑熱期は2016年8月から9月まで、冷涼期は2017年2月から3月までの期間とした。また、OPU実施時に供試牛の直腸温をデジタル体温計(ThermoVISION, アステック, 茨城)を用いて測定し、呼吸数を視診により測定した。各試験区の供試牛は日本飼養標準(中央畜産会 2009)に従って粗飼料および濃厚飼料を給与され、同様の環境で管理された。なお、本実験は佐賀県畜産試験場動物実験等実施規程に基づき、佐賀県畜産試験場の承認のもと行われた。

3. 温湿度指数 (THI) の算出

気温と相対湿度データは佐賀地方気象台から入手し、温湿度指数 (THI) は下記のモデルを用いて計算した[39]。

$$THI=0.81T+0.01H (0.99T-14.3) + 46.3 (Tは温度、Hは1日の平均相対湿度)$$

暑熱期における実験地点の平均最低気温と平均最高気温はそれぞれ23.8±0.3℃、32.3±0.5℃(平均気温27.4±0.3℃)、平均最小相対湿度と平均最大相対湿度はそれぞれ52.1±1.8%、88.2±1.0%(平均73.3±1.2%)、平均最小THIと平均最大THIはそれぞれ72.3±0.4、85.2±0.8(平均THI77.8±0.5)であった。一方、冷涼期における実験地点の平均最低気温と平均最高気温はそれぞれ4.0±0.4℃、13.6±0.4℃(平均気温8.5±0.3℃)、平均最小相対湿度と平均最大相対湿度はそれぞれ38.4±1.4%、85.2±1.2%(平均64.0±1.1%)、平均最小

THIと平均最大THIはそれぞれ43.1±0.6、56.8±0.6（平均THI49.5±0.5）であった。

4. OPUによるCOCsの採取

OPUは発情周期の任意の時期に週に1回の頻度で、1頭当たり暑熱期では1-5回（延べ15回）、冷涼期では6回（延べ18回）実施した。OPUはTakumaら[39]の方法に従った。供試牛を柵場に保定し、キシラジン塩酸塩（セラクター2%注射液，バイエル薬品株式会社，東京）10 mgの頸部筋肉内投与による鎮静処理を行った後、塩酸リドカイン（リドカイン注2%，ファイザー株式会社，東京）100 mg の尾椎硬膜麻酔を行った。OPUは7.5 MHz のコンベックス型プローブを接続した超音波診断装置（ECHOPAL □，日立メディコ，東京）と吸引装置（FV4，富士平工業，東京）に接続した17ゲージ×540 mmの採卵針（COVA Needle，ミサワ医科工業，茨城）を用いて一定の陰圧（120 mmHg，20-25 ml/分）で行った。超音波ガイド下にて採卵針を卵巣に誘導し、直径2 mm以上の全ての卵胞を穿刺して卵胞液と共に卵胞内卵母細胞を吸引した。また、吸引した卵胞の数および大きさを記録した。回収液には10 IU/mlヘパリンナトリウム（ヘパリンNa注5千単位，持田製薬，東京）、0.5%（v/v）子牛血清および抗菌薬（Antibiotic-Antimycotic，GIBCO，CA）を添加した乳酸加リンゲル液（ハルゼンV注射液，日本全薬工業，福島）を用いた。全ての手技は同一の獣医師によって行われた。

5. 検卵およびCOCsの分類

OPU後すぐに回収液を入れたコニカルチューブを実験室に搬送し、メッシュ付きシャーレ（セルコレクター，ニプロ医工，東京）を用いて洗浄および濾過した後、実体顕微鏡下で検卵した。回収したCOCsは既報に従って卵丘細胞層の数に基づいて以下のように形態学的に分類した[39]（図1）。

グレード1：3層以上の卵丘細胞を有するCOCsおよび均質な卵母細胞の細胞質

グレード2：少なくとも1層の卵丘細胞

グレード3：完全に裸化した卵母細胞

グレード4：膨化した卵丘細胞

グレード5：細胞質が変性した卵母細胞

また、OPU時に観察された卵胞数に対する回収されたCOCs数の割合を回収率として算出した。

6. TUNEL法によるアポトーシス細胞の検出

採取したCOCsのうち、正常な卵丘細胞を有するグレード1および2のCOCsをサンプルとして用いた。卵丘細胞におけるアポトーシス細胞はTUNELアッセイキット (In situ Cell Death Detection Kit, Roche Applied Science, IN, USA) を用いて検出した。COCsをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に4% (w/v) パラホルムアルデヒドを添加した溶液 (pH 7.4) で20-30分間固定した。固定後、PBSに0.05% (w/v) ポリビニルピロリドン (PVP; ナカライテスク, 京都) を添加したPVP-PBSで5分間、3回洗浄を行った。次に0.5% TritonX-100を加えたPVP-PBSで20分間透過処理し、PVP-PBSで5分間、3回洗浄した。卵丘細胞の断片化したDNA末端をフルオレセイン-130dUTPにて38.5℃で60分間標識した。インキュベーション後、COCsをPVP-PBSで5分間、3回洗浄し、スライドグラスにDAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を含む蛍光褪色防止液 (Vectashield with DAPI, Vector Laboratories, CA, USA) と共にマウントした。蛍光顕微鏡を用いてTUNEL陽性細胞をアポトーシス細胞としてその数を計測した (図2A)。

7. ミトコンドリア分布パターンの評価

採取したCOCsのうち、正常な卵丘細胞を有するグレード1および2のCOCsをサンプルとして用いた。0.1% (w/v) ヒアルロニダーゼを添加したTCM-199 (Thermo Fisher Scientific,

MA, USA) 中でCOCsをガラスピペットによりピペッティングして卵丘細胞を除去した。裸化卵母細胞をPVP-PBSで3回洗浄した後、0.5 μ M MitoTracker® Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) と5% (v/v) 子牛血清を添加したTCM-199中で38.5°Cで20分間反応させた。反応後、卵母細胞をPVP-PBSで3回洗浄し、スライドガラスに蛍光褪色防止液 (Vectashield, Vector Laboratories, CA, USA) と共にマウントし共焦点レーザー顕微鏡 (C1, ニコン, 東京) を用いて観察した。ミトコンドリア分布は、Breviniら[37]の方法に従って3つのパターンに分類した。peripheral型：細胞膜直下に均一に分布、semiperipheral型：細胞膜周辺に分布、diffused型：細胞質全体に分布 (図3)。

8. 統計解析

ミトコンドリア分布に関しては観察した例数に対する各分布パターンの割合を示し、カイ二乗検定を用いて試験区間の差の解析を行った。また、その他のデータについては平均 \pm 標準誤差で示し、Studentのt検定により試験区間の差の解析を行った。%データは解析の前にアークサイン変換を行った。全てのデータにおいて $p < 0.05$ の場合、統計的に有意な差が認められると判断した。

第3節 結果

試験期間中の体温と呼吸数を測定した結果（表1）、試験牛の平均体温は暑熱期の方が冷涼期よりも有意に高かった（ $38.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$ vs. $38.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$, $p < 0.01$ ）。また、呼吸数も暑熱期の方が冷涼期よりも有意に高かった（ 37.4 ± 3.1 vs. 18.4 ± 1.4 回/分、 $p < 0.01$ ）。暑熱期と冷涼期におけるOPU時の卵胞数はそれぞれ大卵胞 0.9 ± 0.1 および 0.9 ± 0.2 個、中卵胞 1.1 ± 0.4 および 0.6 ± 0.2 個、小卵胞 14.4 ± 1.4 および 12.6 ± 0.7 個、総卵胞数 16.4 ± 1.5 および 14.2 ± 0.7 個であり、全て試験区間で有意な差は認められなかった（表2）。暑熱期と冷涼期におけるOPUで採取されたCOCsのグレードと数は、それぞれグレード1： 4.1 ± 0.8 および 3.4 ± 0.6 個、グレード2： 4.7 ± 0.5 および 4.6 ± 0.5 個、グレード3： 0.9 ± 0.2 および 1.1 ± 0.3 個、グレード4： 0.4 ± 0.3 および 0.9 ± 0.4 個、グレード5： 1.8 ± 0.4 および 1.3 ± 0.3 個、合計 11.3 ± 1.2 個であり、全て試験区間で有意な差は認められなかった（表3）。COCsの回収率は暑熱期が $77.7 \pm 8.3\%$ 、冷涼期が $78.9 \pm 6.6\%$ で試験区間に有意な差は認められなかった（表3）。一方、卵丘細胞におけるTUNEL陽性細胞の検出を行った結果、暑熱期では観察した全てのCOCs（22/22）でTUNEL陽性細胞が観察されたのに対して、冷涼期では、観察したCOCsのうち42.1%（16/38）でTUNEL陽性細胞が観察された。加えて、暑熱期では冷涼期と比べてTUNEL陽性細胞の数が有意に多い結果であった（ 55.7 ± 13.2 vs. 1.5 ± 0.5 個、 $p < 0.01$ 、図2）。卵母細胞のミトコンドリア分布を比較した結果、暑熱期ではperipheral型の割合が42.9%であったのに対し、冷涼期では62.9%と、暑熱期で有意に低い値となった（ $p < 0.05$ 、表4）。

第4節 考察

THIは暑熱ストレスの指標として利用されており、乳用牛ではTHI71を超えると繁殖性に影響が出ると言われており[40]、高THI環境では体温が上昇し受胎率は低下する[15]。また、比較的暑熱に強いと言われている肉用牛においても、冬季と比べて夏季では日中に体温が約0.5℃ 上昇し[41]、受胎率が低下することが報告されている[41-44]。今回の研究では、暑熱期における供試牛の体温は冷涼期よりも有意に高く、呼吸数も有意に多くなった（表1）。これは暑熱期における平均THIが77.8 と冷涼期よりも高値であったことから、生体への暑熱ストレスの影響によるものと考えられ、同じく黒毛和種を用いたSakataniら[41]らの報告とも一致する。すなわち、この結果は今回の研究で設定した暑熱期にあるウシが暑熱ストレスを受けている状態にあったことを示している。

乳用牛において、暑熱ストレスは卵胞発育やホルモン分泌といった卵巣機能に悪影響を及ぼすことが報告されている[45]。一方で、肉用牛である黒毛和種を用いた今回の研究では、OPU時の卵胞数や回収COCsの数および形態学的グレードに試験区間で有意な差は認められなかった（表2および3）。これは、黒毛和種においてはOPU由来卵母細胞におけるグレード1および2のCOCsの割合に季節間で差はないとするTakumaら[39]の報告と一致する。これらの結果は、肉用牛である黒毛和種では、暑熱ストレスが卵巣における卵胞数や回収されたCOCsの形態学的グレードに及ぼす影響が少ないことを示唆している。この理由としては、乳用牛と肉用牛間での飼養管理の違いや、肉用牛は乳用牛と比較してその牛体体積が小さいことから効率的な熱の放出が行えることなどが考えられている[41]。また、これまでの研究において、品種間で暑熱ストレスに対する生殖細胞の耐性が異なることも示唆されているが[46, 47]、この品種間での暑熱耐性の違いを引き起こす要因はいまだ明らかとなっておらず、これらの要因を明らかにする研究の進展が期待される。

卵丘細胞は顆粒膜細胞から分化した卵母細胞を取り囲む細胞層であり、ギャップ結合

を通じて未成熟卵母細胞への栄養素の供給、成長や成熟を調節するシグナル伝達[30]、減数分裂の停止と再開の制御機能[48, 49]および受精調節機能[50]を有している。また、卵丘細胞での遺伝子発現パターンの違いが卵母細胞の発生能に大きく影響を及ぼすことも示されている[28]。すなわち、卵丘細胞は卵母細胞の品質およびその後の発生能に深く関与していることが推察できる。このことは、周囲を取り囲んでいる卵丘細胞が高いレベルでアポトーシスを起こしている場合、卵母細胞の受精率やその後の発生能が低下することを示した過去の報告からも支持される[51, 52]。この卵丘細胞のアポトーシス増加による卵母細胞の発生能低下の原因として、アポトーシスを起こしている卵丘細胞からの有害な代謝産物がギャップ結合を介して卵母細胞に移動していることが示唆されており[53]、卵丘細胞のアポトーシスレベルは卵母細胞の品質と負の相関があると考えられており、COCsの品質を評価するための有益なマーカーとなると考えられる。通常、採取された直後のCOCsでは、アポトーシスを起こしている卵丘細胞はほとんど検出されないことが報告されているが[30]、本研究において、COCsにおける卵丘細胞のアポトーシス陽性細胞数は冷涼期と比較して暑熱期で増加した（図2）。この結果は、暑熱ストレスを受けた黒毛和種雌牛の卵巢では、卵胞数や卵胞内のCOCsの形態学的な観察では品質に差が認められないが、卵丘細胞におけるアポトーシスレベルを指標とした場合、COCsの品質が低下しているということを示している。卵丘細胞でのアポトーシスを誘導する原因として、ROSの過剰な産生が知られているが[54]、過去の研究において、暑熱ストレスが生体内のROSレベルを増加させることが示されており[55]、今回観察された卵丘細胞でのアポトーシス細胞の増加も生体内のROSレベルの上昇が原因として考えられる。また、暑熱ストレスがCOCsにおけるタンパク質分解酵素の活性を過剰に高めることも報告されており[31]、これらとの関係についても今後調査する必要があると考えられる。

さらに、本研究では、卵母細胞のミトコンドリア分布においても季節間で違いが観察

された(表4)。卵母細胞のミトコンドリアはATP産生やROS産生、Ca²⁺シグナル伝達の調節などの発生過程における重要な役割を担っており、その機能は卵母細胞および胚の発生能や生存性に大きく関係している[56]。特に、ウシ卵母細胞におけるATP産生の重要性が明らかにされており、高いATPレベルを有する卵母細胞は高い発生能を有することが示されている[54]。ウシ卵母細胞において、ミトコンドリア分布は未成熟であるGV期では主に細胞膜周辺にミトコンドリアが分布するperipheral型を示し、成熟中に再配置され、MⅡ期では主に卵母細胞の中心部に位置するdiffused型を示すことが報告されている[57]。ヒト卵母細胞を用いたLiuら[58]の報告においても同様の分布パターンを示すことから、哺乳類の卵母細胞におけるミトコンドリア分布は、その成熟過程でperipheral型からdiffused型へ変化することが正常であると考えられている。この卵成熟過程におけるミトコンドリア分布の変化は、減数分裂における染色体の移動と同様に細胞骨格によって引き起こされるが[59]、この変化とATP産生との間には密接な関係があり、異常なミトコンドリア分布はATPレベルを低下させることが示されている[38]。と畜卵巣由来ウシ卵母細胞を用いた研究によると、夏季では冬季に比べて異常なミトコンドリア分布を示す卵母細胞の割合が多く、これが卵母細胞の発生能における季節性変化の原因の一つとして考えられている[60]。また、Nagaiら[61]はMⅡ期マウス卵母細胞における異常なミトコンドリア分布は発生遅延の原因となる可能性を示唆している。ミトコンドリア分布パターンとそれが意味する生理的機能についてはいまだ不明な点も多く、議論の余地があるが、少なくとも、これらの知見は卵母細胞が成熟過程に適したミトコンドリア分布を有することがその後の発生能に有利に働く可能性を示唆しており、ミトコンドリア分布は卵母細胞の品質を評価する指標となり得ると推察される。本研究でOPUにより採取された卵母細胞はそのほとんどが小卵胞由来のものであり、この時期の卵母細胞におけるミトコンドリアはperipheral型の分布を示すものが正常であると考えられるが、冷涼期に比べて暑熱期ではperipheral型の割合が有意に低く、暑熱ストレスによるミトコ

ンドリア分布への影響が示された。これらの分布異常が卵母細胞の生理的機能にどのような影響を与えるのかは今後の研究で明らかにしていく必要があるが、暑熱ストレスを受けた個体では、卵丘細胞でのアポトーシスレベルと同様、ミトコンドリア分布にも影響を受ける可能性が示された。

本研究において、黒毛和種繁殖雌牛において夏季の暑熱ストレスは卵胞数や卵母細胞の形態学的グレードに影響はないものの、卵丘細胞のアポトーシスが増加し、卵母細胞のミトコンドリア分布にも異常が見られることが明らかとなった。これらの結果は、暑熱ストレスを受けた個体ではCOCsの品質が低下している可能性を示唆している。一方で、今回の研究では調査を実施しなかったが、黒毛和種において暑熱ストレスの影響で直腸温の上昇だけでなく、発情周期の延長や血中酸化ストレスマーカーの上昇が報告されており[41]、これらの変化と併せてOPU由来COCsの品質を精査することで暑熱ストレスが引き起こすCOCsの品質低下についてより深い理解が得られるかもしれない。さらに、今後、夏季にOPUにより採卵された卵母細胞由来の胚を用いた大規模な胚移植試験を実施し、今回観察されたCOCsの品質低下が受胎率に及ぼす影響を明らかにすることは、OPUを用いて移植用の胚を体外生産する際の重要な情報を提供することになると考えられる。

第5節 小括

本研究では、黒毛和種において暑熱期と冷涼期にOPUを実施し、COCsの品質に季節間で違いがみられるかについて検討を行った。暑熱期では供試牛5頭から延べ15回、冷涼期では供試牛3頭から延べ18回のOPUを実施し、得られたCOCsを形態学的に分類した後、卵丘細胞のアポトーシスおよび卵母細胞のミトコンドリア分布を評価した。その結果、OPU時の直腸温および呼吸数は暑熱期において上昇したが、卵胞数やCOCsの形態学的グレードについては両区間で違いはみられなかった。一方で、暑熱期において卵丘細胞のアポトーシス細胞数が増加し、卵母細胞におけるミトコンドリア分布においても異常な分布を示すものが増加した。以上の結果から、夏季に暑熱ストレスを受けた黒毛和種の個体ではCOCsの品質が低下している可能性が示唆された。

表1 経膣採卵（OPU）時の直腸温および呼吸数

試験区	体温（C°）	呼吸数（回／分）
暑熱期	38.7 ± 0.1 ^a	37.4 ± 3.1 ^a
冷涼期	38.3 ± 0.1 ^b	18.4 ± 1.4 ^b

数値は平均値±標準誤差で示した。

^{a, b}同列内の異文字間で有意差あり ($p < 0.01$)

表2 経膈採卵（OPU）時の卵巣内卵胞の大きさおよび卵胞数

試験区	卵巣内卵胞数 [†]			
	大卵胞	中卵胞	小卵胞	合計
暑熱期	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.4	14.4 ± 1.4	16.4 ± 1.5
冷涼期	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2	12.6 ± 0.7	14.2 ± 0.7

数値は平均値±標準誤差で示した。

[†]卵胞はそれぞれの直径の大きさに従って次のように分類した。

大卵胞：>8mm，中卵胞：5mm-8mm，小卵胞：<5mm

表 3 経膈採卵 (OPU) で回収された卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COCs) の数、形態学的グレードおよび回収率

試験区	回収された COCs 数 [†]					回収率 [‡]	
	グレード1	グレード2	グレード3	グレード4	グレード5		合計
暑熱期	4.1 ± 0.8	4.7 ± 0.5	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.3	1.8 ± 0.4	12.0 ± 1.2	77.7 ± 8.3
冷涼期	3.4 ± 0.6	4.6 ± 0.5	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.4	1.3 ± 0.3	11.3 ± 1.2	78.9 ± 6.6

数値は平均値±標準誤差で示した。

[†]回収した COCs は Takuma ら[39]に従って卵丘細胞層の数に基づいて以下のように形態学的に分類した。グレード

1: 3層以上の卵丘細胞を有する COCs および均質な卵母細胞の細胞質、グレード2: 少なくとも1層の卵丘細胞、
 グレード3: 完全に裸化した卵母細胞、グレード4: 膨化した卵丘細胞を有する COCs、グレード5: 細胞質が変
 性した卵母細胞。

[‡]OPU時に観察された卵胞数に対する回収された COCs 数の割合を回収率として算出した。

表 4 卵母細胞におけるミトコンドリア分布パターン

試験区	観察数	ミトコンドリア分布パターン [†]		
		peripheral (%)	semiperipheral (%)	diffused (%)
暑熱期	35	15 (42.9) ^a	9 (25.7)	11 (31.4)
冷涼期	39	27 (69.2) ^b	6 (15.4)	6 (15.4)

[†]ミトコンドリア分布は、Brevini ら[39]の方法に従って3つのパターンに分類した。peripheral 型：細胞膜直下に均一に分布、semiperipheral 型：細胞膜周辺に分布、diffused 型：細胞質全体に分布。

^{a, b} 同列内の異文字間で有意差あり ($p < 0.05$)。

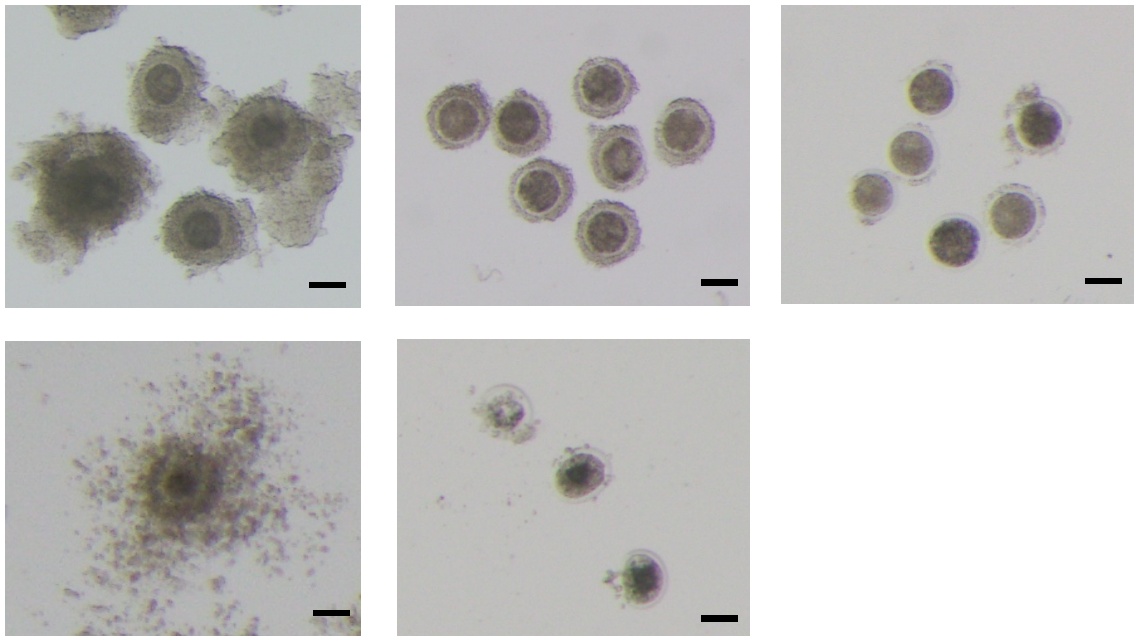
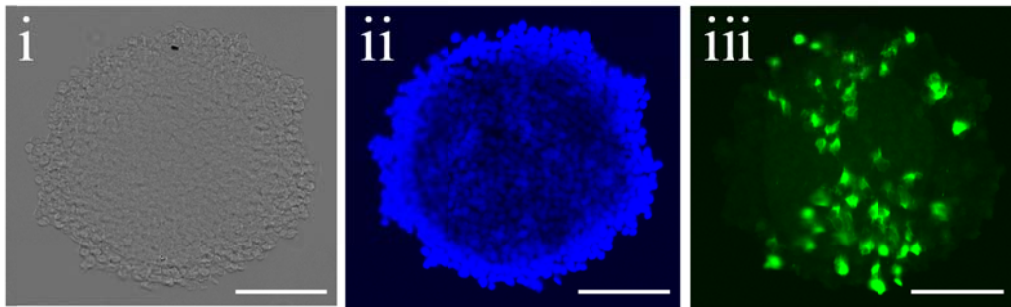


図1 回収した COCs の分類

回収した COCs は Takuma ら[39]に従って卵丘細胞層の数に基づいて以下のように形態学的に分類した。グレード1：3層以上の卵丘細胞を有する COCs および均質な卵母細胞の細胞質、グレード2：少なくとも1層の卵丘細胞、グレード3：完全に裸化した卵母細胞、グレード4：膨化した卵丘細胞、グレード5：細胞質が変性した卵母細胞。スケールバーは100 μ mを示す。

(A)



(B)

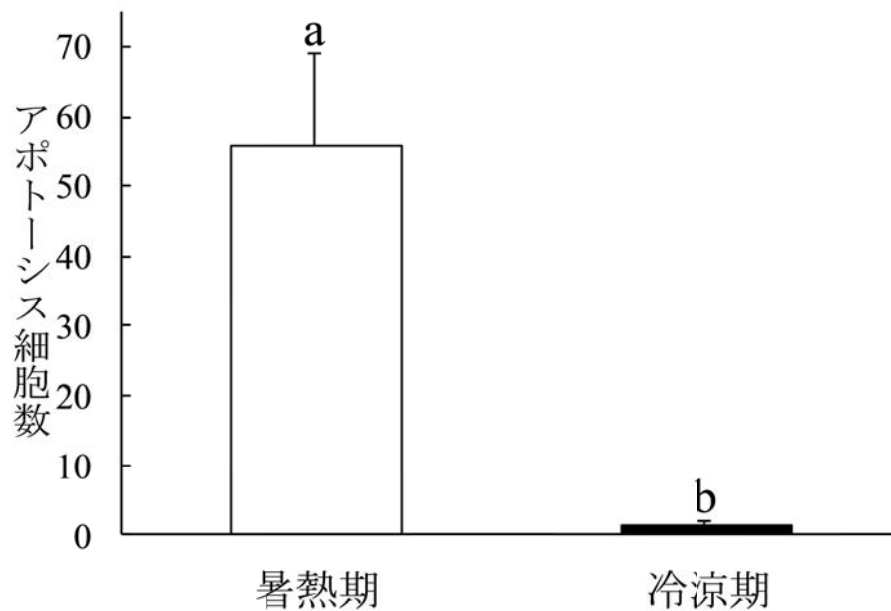


図2 卵丘細胞におけるアポトーシス細胞の検出

(A) TUNEL法による卵丘細胞におけるアポトーシス細胞の検出、画像はそれぞれ明視野 (i)、DAPI染色 (ii)、TUNEL染色 (iii) を示し、緑色蛍光を発するTUNEL陽性細胞の数をアポトーシス細胞として計測を行った。スケールバーは50 μ mを示す。(B) 各試験区のアポトーシス細胞数を平均値 \pm 標準誤差で示した。

a, b異文字間で有意差あり ($p < 0.01$)。

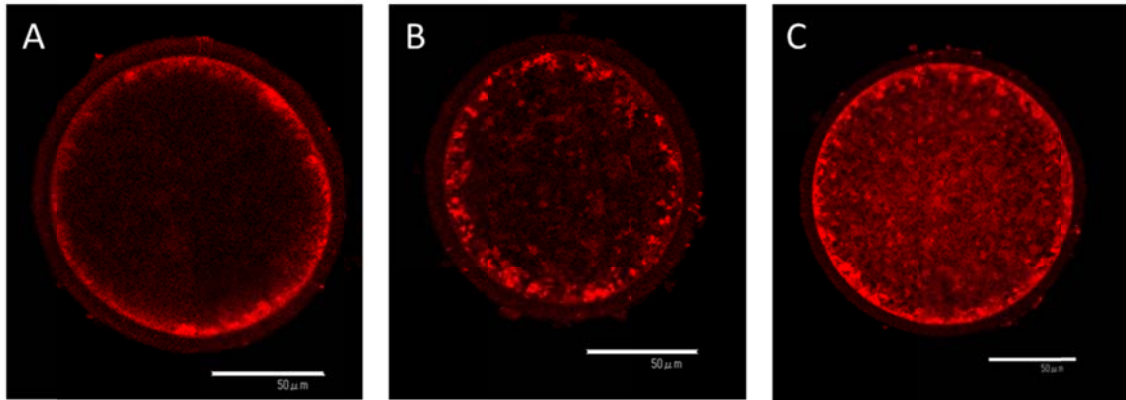


図3 卵母細胞におけるミトコンドリア分布パターン

赤色蛍光がミトコンドリアの分布を示す。卵細胞質内における分布パターンは Brevini
ら[37]に従って、以下の3つに分類した。(A) peripheral 型：細胞膜直下に均一に分布、
(B) semiperipheral 型：細胞膜周辺に分布、(C) diffused 型：細胞質全体に分布。
スケールバーは 50 μ m を示す。

第3章 OPU由来体内成熟卵を用いた 効率的な体外胚生産系の検討

第1節 緒言

現在、過剰排卵処理と人工授精を組み合わせた体内受精胚生産および胚移植技術 (multiple ovulation and embryo transfer ;MOET) は牛群の遺伝的改良のために広く利用されている[62]。一方、IVM、IVF、IVCによるIVPシステムの開発に伴い体外生産胚を利用した子牛生産も増加しており、今日、体外生産胚の移植数は体内生産胚に匹敵するまでになっている (International Embryo Technology Society http://www.iets.org/comm_data.asp)。体外生産胚を作製する場合、生まれてくる子牛の登記の問題から、血統登録された雌牛からOPUにより採取した卵母細胞を使用することが望ましい。すなわち、移植用の体外生産胚を作製するためには血統が不明である屠場由来の卵巣を用いるのではなく、OPU-IVPによって生産されるのが一般的である。また、OPUは発情周期の時期にかかわらず実施でき、妊娠初期や繁殖障害、若齢のウシからも卵母細胞を採取することが可能であることから[10-12, 14]、MOETよりも胚の生産効率が高いことが示されている[8]。加えて、採取された卵母細胞に複数の種雄牛の精液を受精させることにより、生産胚の遺伝的な組み合わせを増加させることも可能である[9]。したがって、OPU-IVPを活用することで、選抜圧を高めることや世代間隔の短縮につながり、MOETよりも効率的にウシの遺伝的改良が達成できる可能性が示されている[9, 63]。

しかしながら、現在までにIVPに関する様々な研究が行われてきたにもかかわらず、体外で生産された胚が正常に発育する割合は体内で生産された胚よりも未だ低く[64]、実際に、OPU-IVPにより生産された胚の移植後の受胎率はMOETにより生産された胚よりも低い[62, 65]。これらの問題を解決するためには、より発生能の高い胚を生産することが可能なIVPシステムの確立が必要であると考えられる。体外生産胚の発生能に影響を与える最も重要な要因としてIVP開始時の卵母細胞の品質が挙げられ[9, 66]、体内成熟卵は体外成熟卵よりも高い発生能を有することが報告されている[66-70]。この理由

の一つとして、体外成熟卵では細胞小器官や分子の再分布、タンパク質やmRNAの合成といった細胞質成熟が損なわれていることが示されている [9]。これらのことを考慮すると、今後も特にIVMに着目したIVPの改良が必要であると考えられる一方で、OPU-IVPにおいて効率的に高品質な体外生産胚を作製するためには、現時点では体内成熟卵を利用することが合理的であると考えられる。

一方、IVPにおける初期胚の発生动態はその後の発生成と関係があることが複数の研究によって示されている[71-74]。特に、個々の胚を経時的に観察することが可能なタイムラプスシネマトグラフィ（time-lapse cinematography ;TLC）を用いた研究では、IVF後の第1卵割パターンが体外発生成[75]や胚移植後の受胎率[76, 77]に関連性があることを明らかにしている。また、第1卵割において正常卵割を経た胚は受胎率が高いことも報告されている[76, 77]。第1卵割において異常卵割が起こる原因や異常卵割を経た胚が低受胎率を引き起こす要因を解明するためにはさらなる研究が必要であると考えられるが、これらの知見はOPU-IVPにおいて正常な第1卵割由来の胚を効率的に生産することにより受胎率を向上させることが可能であることを示唆している。しかしながら、OPU-IVPにおいて体内成熟卵を用いて胚の第1卵割パターンや発生成の関係を調査した研究はない。

そこで、本章では過剰排卵処理を行った黒毛和種繁殖雌牛から採取された体内成熟卵を用いて、それらの細胞質成熟の状態や胚の第1卵割パターン、発生成および受胎性を体外成熟卵と比較することにより、体外での効率的な胚生産および移植後の受胎率向上に寄与するかどうかについて調査することを目的とした。

第2節 材料と方法

1. 試薬

特に記載がない場合は、全てSigma-Aldrich (St. Louis, USA) から購入した。

2. 供試動物および管理方法

本研究は佐賀県畜産試験場で飼養している黒毛和種繁殖雌牛 ($n = 7$, 6.4 ± 1.4 歳, 5.0 ± 1.3 産) を用いて実施した。供試牛は日本飼養標準 (中央畜産会 2009) に従って粗飼料および濃厚飼料を給与され、同様の環境で管理された。実験の開始時の平均ボディコンディションスコア (BCS, Wagyu Registry Association's Guide) は約 3.5 であった。なお、本実験は佐賀県畜産試験場動物実験等実施規程に基づき、佐賀県畜産試験場の承認のもと行われた。

3. 過剰排卵処理法および試験区の設定

過剰排卵処理後に体内成熟卵を採取する群を試験区とした。試験区における過剰排卵処理はMatobaら[78]の方法を一部改変して行った (図1)。発情周期の任意の時期に膈内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR ; ファイザー, 東京) を挿入し (0日目)、5.5日目に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone : GnRH) 類縁体 (酢酸フェルチレリン, スポルネン, 共立製薬, 東京) 100 μg を筋肉内投与した。8日目に水酸化アルミニウムゲルと混合した卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone : FSH) 製剤 (アントリンA1 ; 共立製薬) 30 AUを頸部皮下に単回投与し、10日目にプロスタグランジン $F2\alpha$ (PGF 2α) 類縁体 (エストラメイト ; インターベット, 東京) 500 μg を筋肉内投与した。10.5日目に膈内留置型黄体ホルモン製剤を抜去し、11.5日目にGnRH 100 μg を筋肉内投与した (0時間目)。二回目のGnRH投与後25~26時間目にOPU、30時間目にIVFを行った。

未成熟卵を採取する群を対照区とした。対照区は事前の処理は行わずに発情周期の任意の時期にOPUを実施した。対照区と試験区におけるOPU時の卵巢超音波画像を図2示した。

4. OPUによるCOCsの採取

第2章 第2節の方法に従い、OPUを行った。なお、卵胞液を吸引する際の吸引圧は対照区、試験区でそれぞれ120 mmHg、130 mmHgとした。

5. 検卵およびCOCsの分類

第2章 第2節の方法に従い、検卵を行った。対照区は第2章 第2節の方法に従い、COCsの分類を行った。試験区はMatobaら[78]の方法に従い、採取されたCOCsを形態学的に評価し、卵丘細胞が膨化して細胞質に異常が認められない卵母細胞を正常な成熟卵母細胞とした。

6. IVP

対照区は、グレード1-3の未成熟卵母細胞を5% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、0.02 IU/ml FSH (共立製薬) および50 µg/mlゲンタマイシン (ナカライテスク) を添加したTCM-199 (Thermo Fisher Scientific) 培養液を用いて38.5℃、5%CO₂気相にて22時間のIVMを行った。IVM終了後、IVFを行った。試験区では、卵丘細胞が膨化した成熟卵母細胞を5% FBSおよび50 µg/mlゲンタマイシンを添加したTCM-199培養液を用いて38.5℃、5%CO₂気相にて約3時間培養し、供試牛のGnRH投与から30時間後にIVFを行った。

ウシ凍結精液を 37℃の温湯にて 20 秒間融解し、90% (v/v) パーコール溶液 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Stockholm, Sweden) を用いて 2100 rpm、10 分間の遠心処

理を行った。上清を除去した後、IVF100（機能性ペプチド研究所，山形）で希釈し、1500 rpm、5分間の遠心処理により洗浄した。さらに精子の最終濃度が 3.0×10^6 個/ml になるように IVF100 にて希釈し、精液 100 μ l のドロップに流動パラフィンを重ねた媒精培地を準備した。成熟卵母細胞を 20~25 個/ドロップとなるように調整して 38.5°C、5%CO₂ 気相にて 6 時間媒精した。媒精終了後、5%FBS を添加した CR1aa[77]にて卵丘細胞をピペッティングにより機械的に除去した。IVC は個々の胚を識別するために個別管理培養ディッシュ（LinKID micro25；大日本印刷株式会社，東京）を用いて、5%FBS 加 CR1aa で作製した 100 μ l ドロップにて媒精後の卵母細胞を 20~25 個/ドロップとなるように調整して 38.5°C、5%O₂、5%CO₂ 気相にて 8 日間行った。

7. 表層顆粒（cortical granules：CGs）の染色

体外および体内成熟卵における CGs の分布を Carneiro ら[80]の報告に従って評価した。簡潔に述べると、まず、1 mg/ml のアクチナーゼ E（ナカライテスク）を添加した TCM-199 溶液中で COCs の膨化した卵丘細胞および透明帯をピペッティングにより機械的に除去した。次に、4%（w/v）パラホルムアルデヒド（pH7.4）にて 60 分間固定し、0.05%PVP-PBS で 3 回洗浄した後、0.05%（v/v）TritonX-100 を添加した PVP-PBS で 5 分間の透過処理を行った。PVP-PBS で 3 回洗浄した後、卵母細胞を 1%（w/v）ウシ血清アルブミン加 PBS にて 15 分間のブロッキングを行い、10 μ g/ml fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled Lens culinaris agglutinin (LCA)（LCA-FITC, FL-1041, Vector Labs, Inc., Burlingame, CA）にて遮光下で 30 分間インキュベーションした。卵母細胞を PVP-PBS で 3 回洗浄した後、スライドガラスに蛍光褪色防止液と共にマウントし、共焦点レーザー顕微鏡（C1, ニコン，東京，励起：488nm、発光：515nm）を用いて CGs 分布を観察した。

8. 胚移植および妊娠診断

胚移植には International Embryo Technology Society (IETS) マニュアル[81]で定められている基準に従って code 1 と評価した培養から 7-8 日後の胚盤胞期胚を用いた。受胎牛には 5 つの農場で飼養されているホルスタイン種を用いて、シダーシンク法[82]にて排卵同期化処理を行い、発情から 7-8 日後に黄体側の子宮角に新鮮胚を 1 個移植した。発情から 35-40 日後に超音波画像診断装置 (iMAGO ; ECM, France) を用いて妊娠診断を行った。

9. 実験計画

実験 1 : OPU 前の過剰排卵処理が採卵成績に及ぼす影響

OPU 時の卵胞の大きさや数、採取された卵母細胞の数やグレードを対照区と試験区で比較した。対照区ではグレード 1-3 の未成熟卵母細胞を IVM およびその後の実験に用いた。対して、試験区では正常な成熟卵母細胞のみをその後の実験に用いた。

実験 2 : 体外および体内成熟卵における CGs 分布

対照区の体外成熟卵および試験区の体内成熟卵における細胞質成熟の状態を評価するためにそれぞれの CGs 分布パターンを調査した。両区の成熟卵母細胞を LCA-FITC を用いて染色した。CGs の分布パターンは Hosoe と Shioya[83]の報告に従って以下の 4 つに分類した。

パターン I : 細胞質中にクラスター状に分布するもの

パターン II : 細胞膜直下に分散または部分的にクラスター状に分布するもの

パターン III : 細胞膜直下に分散して分布するもの

パターン IV : CGs が検出されないもの

細胞膜直下に CGs が分布する卵母細胞 (パターン II および III) を正常に分布しているものとして分類した。

実験 3 : 体外および体内成熟卵における発生成績の比較

対照区の体外成熟卵および試験区の体内成熟卵における IVF 後の発生成績を比較した。胚盤胞期胚まで発生した胚の第 1 卵割は IVF 後 25.9 ± 1.9 時間 (hpi) であったとする報告[76]に従い、第 1 卵割パターンを 28 hpi で形態的に評価し、以下のように分類した (図 3)。

正常卵割胚 : 2つの割球の大きさが均等でフラグメンテーションを有さない胚

異常卵割胚 : 2つの割球の大きさが不均等である胚、2つの割球と突出部またはフラグメンテーションを有する胚、1細胞から直接3または4細胞に分割した胚、28 hpi 以降に分割した胚

50 hpi に分割率、IVC から 8 日後に胚盤胞発生率を計測した。胚盤胞の品質は IETS マニュアル[81]に従って形態学的に評価した。code 1 を凍結可能胚、code 1 および 2 を移植可能胚とした。

実験 4 : 卵割パターンが受胎率に及ぼす影響

試験区において作製した第 1 卵割が正常卵割および異常卵割由来の胚盤胞期胚、または、対照区において作製した第 1 卵割が正常卵割由来の胚盤胞期胚を受胎牛に移植し、それぞれの受胎率を比較した。

10. 統計解析

CGs 分布および胚盤胞発生率はカイ二乗検定を用いて試験区間の差の解析を行った。受胎率はフィッシャーの直接確率検定を用いて試験区間の差の解析を行った。また、他のデータについては Student の t 検定により試験区間の差の解析を行った。%データは解析の前にアークサイン変換を行った。 $p < 0.05$ の場合を統計的に有意な差が認められ

ると判断した。

第3節 結果

実験1：OPU前の過剰排卵処理が採卵成績に及ぼす影響

対照区と試験区におけるOPU時の卵胞数および採取された卵母細胞の数を表1に示した。OPU時の卵胞の総数は対照区と試験区で有意な差は認められなかった。大卵胞(>8 mm)および中卵胞(5-8 mm)の数は対照区と比べて試験区で有意に多かったが($p < 0.01$ および $p < 0.05$)、小卵胞(<5 mm)の数は有意に少なかった($p < 0.01$)。試験区および対照区で採取された卵母細胞の典型的な画像をそれぞれ図4Aおよび図4Bに示した。OPUにより採取された卵母細胞の総数および回収率(卵母細胞数/卵胞数)に有意な差は認められなかった。

実験2：体外および体内成熟卵におけるCGs分布

CGsの各分布パターンの典型的な画像を図5に示した。CGsが正常な分布を示す卵母細胞の割合は、対照区に比べて試験区で有意に高かった($p < 0.05$; 表2)。

実験3：体外および体内成熟卵における発生成績の比較

対照区の体外成熟卵および試験区の体内成熟卵を用いた体外発生成績を表3に示した。分割率および胚盤胞発生率に有意な差は認められなかったが、正常卵割胚および凍結可能胚(code 1)の割合は対照区と比べて試験区で有意に高かった($p < 0.05$)。また、移植可能胚(code 1および2)のうち第1卵割が正常な胚の割合は対照区と比べて試験区で有意に高かった($p < 0.01$)。さらに、両区の分割した胚を正常卵割と異常卵割に分けてそれぞれの体外発生成績を比較した(表4)。胚盤胞発生率は両区とも異常卵割胚と比べて正常卵割胚で有意に高かった($p < 0.05$)。code 2の胚の割合に有意な差は認められなかったが、code 1の胚の割合は両区とも異常卵割胚と比べて正常卵割胚で有意に高く、加えて、対照区の正常卵割胚よりも試験区の正常卵割胚で有意に高かった(p

< 0.05)。code 3 の胚の割合は両区とも正常卵割胚と異常卵割胚の間で有意な差は認められなかったが、試験区と比べて対照区で有意に高かった ($p < 0.05$)。

実験 4：卵割パターンが受胎率に及ぼす影響

試験区において、第 1 卵割が正常卵割または異常卵割由来の胚盤胞期胚を移植した結果、受胎率はそれぞれ 61.9% (13/21)、12.5% (1/8) であり、異常卵割由来と比べて正常卵割由来の胚盤胞期胚で有意に高くなった ($p < 0.05$)。さらに、対照区において、第 1 卵割が正常卵割由来の胚盤胞期胚を移植した結果、受胎率は 50.0% (5/10) であった。第 1 卵割が正常卵割由来の胚盤胞期胚の受胎率に両区で有意な差は認められなかった。

第4節 考察

ウシの育種改良を促進する上で OPU-IVP は MOET よりも有効であると考えられるが、体外生産胚の発生能は体内生産胚と比較して低いことが効率的な子牛生産の妨げとなり、OPU-IVP の現場レベルでの利用拡大にとって大きな問題となっている。IVP システムの改良に関しては、過去数十年にわたって多くの研究がなされてきたが、体外生産胚の発生能は体内生産胚のそれに未だに及ばないのが現状である[84]。その一方で、個々の胚の発生能をあらかじめ評価し、移植胚を選別することにより体外生産胚からの子牛生産効率を向上させることを目的とした研究が近年行われており、初期胚の発生動態、特に第 1 卵割のタイミングとそのパターンによって高い受胎率が期待できる胚を選別することが可能であることが明らかとなってきた[75-77]。そこで、本章では、体内成熟卵を用いて作製した体外生産胚の発生能をその発生動態も含めて解析を行った。

対照区と比べて試験区では、大および中卵胞の数が多く小卵胞の数が少なかった。対して、採取された卵母細胞の総数および回収率に両区の間で有意な差は認められなかった。これらの結果は過去の報告[78]とも一致している。一方、OPU で採取された卵母細胞に対する過剰排卵処理の影響を調査した研究では、体内成熟卵は体外成熟卵よりも体外発生能が高いことが示されているが[66-69, 78]、それらの間で細胞質成熟の状態を比較した研究はほとんどない。したがって、本研究では無処理または過剰排卵処理を行ったウシから体外または体内成熟卵をそれぞれ採取して、細胞質成熟の状態を調べるために CGs の分布[83, 86]を指標として調査を行った。CGs は卵母細胞の成熟における最終段階では細胞膜付近に分布しており[83, 86]、CGs が細胞質膜直下に存在する場合のみ CGs は卵細胞膜と融合し、その内容物を囲卵腔に放出させることができる[78, 83]。この CGs のエキソサイトーシスは多精子受精を防止するために最も重要な事象であると考えられており[83, 87]、細胞質成熟の指標の一つとして用いられている。本研究の結果では、CGs が正常分布している卵母細胞の割合が対照区よりも試験区で有意に高か

った。また、最近の研究によると、OPU 前に過剰排卵処理したウシから採取した卵母細胞は、無処理のウシのそれと比較して多精子受精の割合が低かったことが報告されている[85]。したがって、本研究の結果と併せて考えると、体内で成熟した卵母細胞はその細胞質成熟中に正常な CGs の再分布が起こることにより効率的に多精子受精を防止することができる一方、体外で成熟した卵母細胞は異常な CGs 再分布により多精子受精が高頻度で発生していることが考えられる。以上の結果から、体内成熟卵の多精子受精率に関しては今後検討する必要があるが、体内成熟卵では、体外成熟卵と比較して細胞質成熟がより適切に起こっていることが示された。

今回の研究では、対照区と試験区において胚盤胞発生率に有意な差は認められなかったが、体内成熟卵を用いることで形態学的評価に基づく胚の品質は向上した。これらの結果は、体内成熟卵を用いることで高品質胚の産生は可能であるが、体外発生能は改善されなかったという過去の報告と一致していた[78, 88]。対照的に、別の報告では無処理のウシと比較して、過剰排卵処理を行ったウシから採取した卵母細胞では胚盤胞発生率が高いことが示されている[70]。加えて、体外成熟した卵母細胞と比較して、体内成熟卵を用いることでより多くの胚盤胞を産生できることも報告されている[68]。これらの結果が我々を含めた研究グループ間で一致しなかった原因の1つとして、過剰排卵処理プロトコルが異なることが考えられる。ホルモン剤の投与量といった最適な過剰排卵処理プロトコルは品種ごとに異なり、不適切な過剰排卵処理は MOET における卵胞発育や排卵率、胚の生存性に悪影響を及ぼすことが報告されており[89, 90]、過剰排卵処理プロトコルの違いが体外発生率の違いを生んだのかもしれない。本研究で用いたプロトコルはホルスタイン種の過剰排卵処理のために設計されたものを参考にしおり、今後は黒毛和種に最適なプロトコルを設計し、得られた卵母細胞およびそれらを用いて生産された胚について再度精査することで、より良い結果が得られる可能性が期待できる。

一般的に、移植前のウシ胚の品質評価は形態学的分類によって行われている。しかし

ながら、この評価法は主観的で評価者によって結果にばらつきが生じ、結果として、移植後の受胎率にも影響を及ぼす可能性が否めない。最近の研究によると、個別管理培養ディッシュと TLC システムを用いて胚の個別管理および個々の胚の発生動態を継時的に観察することが可能となっている[76, 77]。さらに、第 1 卵割のタイミングおよび割球数、フラグメンテーションの有無といった形態の動的指標が、高い発生能を有する胚を選別するための新しい指標として確立されている[76]。しかしながら、TLC システムは非常に高価であり使用できる技術者は限られていることから、現在のところ、子牛生産の現場では広く普及していない。本研究では、高い発生能を有する胚は第 1 卵割パターンを評価することで選別が可能であるとする過去の報告[76]を参考に、TLC システムを用いずに第 1 卵割パターンを IVF から 28 時間後に評価した。TLC システムを用いた研究によると、第 1 卵割後に均等な割球を有する胚は、1 細胞から直接 3 つまたは 4 つの割球に分割した胚や不均等な割球を有する胚、突出部またはフラグメンテーションを有する胚といった異常な卵割を経た胚より受胎率が高いことが報告されており、第 1 卵割パターンを解析することは胚移植後の妊娠損失の危険性を減らすことができる可能性を示している[77]。本研究の結果はこの報告と一致しており、形態学的に同等の品質の胚であっても、異常卵割胚と比べて正常卵割胚で受胎率が有意に高くなる結果が得られた。すなわち、本研究で用いた胚の分類法は移植後の生存性が高い胚の選別に有効な手法であることを示している。しかしながら、本研究では第 1 卵割パターンの評価時刻を 28 hpi と固定しているため、観察前に 2 細胞期を経ているにもかかわらずその時点で 3 つまたは 4 つの割球を有する胚を異常卵割胚と分類した可能性も考えられる。TLC システムを用いた予備実験では、28 hpi までに 3 細胞以上に分割した胚の約 10%が 1 細胞から直接 3 つまたは 4 つの割球に分割した胚ではなく 2 細胞期を経た胚であった（未発表データ）。したがって、第 1 卵割パターンの分類精度をより向上させるためには、観察回数を増やすといった評価方法の修正が必要であると考えられる。加えて、正常卵

割を経た胚盤胞期胚の受胎率は対照区と試験区の間で同等であったことから、正常卵割胚の移植後の生存性は用いた卵母細胞の成熟方法が体外成熟であったのか、または体内成熟であったのかということは関係が無いことが示された。すなわち、高い受胎率を得るためには必ずしも体内で成熟された卵母細胞から胚を生産する必要はなく、単純に正常卵割胚を選択して移植することが重要であることを示唆している。しかしながら、本研究において、体内成熟卵を用いた場合、体外成熟卵を用いた場合と比較して、より多くの正常卵割を経た移植可能胚が得られた。この結果と第1卵割が正常な胚の受胎率が高いという移植試験の結果を考慮すると、OPU-IVP に体内成熟卵を用いることは大きな利点であるといえる。すなわち、OPU-IVP に体内成熟卵を用いることで形態学的だけでなく、発生動態の観点からも品質が高い胚を高率で生産することが可能であり、結果として移植可能胚の生産効率、あるいは受胎率の向上に寄与することを示唆している。

本研究では、OPU-IVP に体内成熟卵を用いることで、第1卵割が正常な胚および凍結可能な高品質胚の生産性が向上することを示した。さらに、正常卵割胚を移植することで、高い受胎率が得られた。このような胚の発生能に対する体内成熟卵の有効性は、正常なCGs分布から示されるように、適切な卵母細胞の成熟によるものと考えられる。これらの結果から、過剰排卵処理を行った黒毛和種繁殖雌牛からOPUにより採取した体内成熟卵を用いることで、形態学的および発生動態的に高品質な胚の生産性を向上させることができ、OPU-IVPによる効率的な子牛生産に寄与するものと考えられる。

第5節 小括

過剰排卵処置を行った黒毛和種繁殖雌牛から OPU により採取した体内成熟卵を用いることで、体外での胚生産性および品質の改善が可能かどうか調査した。OPU 前に過剰排卵処理を行った試験区では、無処理の対照区と比べて有意に OPU 時の大および中卵胞が多く、小卵胞が少なかった。また、採取された卵母細胞の総数および回収率に違いは認められなかった。多精子受精を防ぐために重要である CGs 分布を比較したところ、対照区と比べて試験区で正常な分布を示す卵母細胞の割合が有意に高かった。また、分割率および胚盤胞発生率に有意な差は認められなかったが、正常卵割胚および凍結可能胚の割合、正常卵割を経た移植可能胚の割合は対照区に比べ試験区で有意に高かった。さらに、異常卵割を経た胚盤胞期胚と比べて正常卵割を経た胚盤胞期胚の受胎率は有意に高かった。以上より、体内成熟卵を胚生産に用いる本法は、効率的に高品質胚を生産できることが示された。特に、移植後の受胎率が高いことが報告されている正常卵割を経た移植胚をより多く生産できることは体外生産胚の受胎率向上および OPU-IVP による効率的な子牛生産に寄与するものと考えられる。

表1 1頭あたりのOPU時の卵胞数と採取した卵母細胞の比較

	対照区	試験区
OPU頭数	7	6
OPU時の卵胞数		
大卵胞 (>8 mm)	1.1 ± 0.3**	40.2 ± 4.2**
中卵胞 (5-8 mm)	3.3 ± 0.7*	15.5 ± 6.4*
小卵胞 (<5 mm)	47.9 ± 8.9**	7.5 ± 2.8**
合計	52.3 ± 8.9	63.2 ± 12.5
卵母細胞数		
正常な卵母細胞 (グレード1-3)	29.0 ± 4.1	
異常な卵母細胞 (グレード4, 5)	5.4 ± 1.4	
膨化した卵丘細胞を有する卵母細胞		36.0 ± 7.0
膨化していない卵丘細胞を有する卵母細胞		8.3 ± 1.7
変性した卵母細胞		2.0 ± 1.4
合計	34.4 ± 3.7	46.3 ± 9.2
回収率 (%) ^a	69.8 ± 5.6	73.8 ± 2.9

数値は平均値±標準誤差で示した。

対照区は未処理の供試牛から、試験区は過剰排卵処理した供試牛からOPUを行った。

^a OPU時の卵胞数に対する採取された卵母細胞数の割合を回収率として算出した。

*,** 同一行の数値間で有意差あり (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)。

表 2 卵母細胞における CGs 分布パターン

区分	観察数	CGs 分布パターン				CGs 分布が正常な 卵母細胞数 (%)
		I	II	III	IV	
対照区	26	11	10	4	1	14 (53.8)*
試験区	31	5	11	14	1	25 (80.6)*

CGs 分布は図 5 に従って 4 つに分類した。パターン II および III を正常な分布とした。

対照区および試験区ではそれぞれ体外および体内成熟卵を用いた。

* 同一列の数値間で有意差あり ($p < 0.05$)。

表 3 体外および体内成熟卵を用いた体外発生成績の比較

	対照区	試験区
供試胚数	200	204
分割胚数 (%) ^a	166 (83.0)	160 (78.4)
正常卵割胚数 (%) ^b	86 (51.8)*	105 (65.6)*
胚盤胞発生数 (%) ^b	100 (60.2)	96 (60.0)
移植可能胚数 (%) ^b	81 (48.8)	92 (57.5)
凍結可能胚数 (%) ^b	42 (25.3)*	59 (36.9)*
正常卵割を経た移植可能胚数 (%) ^b	49 (29.5)**	73 (45.6)**

対照区は未処理の供試牛 7 頭から、試験区は過剰排卵処理した供試牛 6 頭から OPU を行い、それぞれ体外および体内成熟卵を IVF に用いた。code 1 を凍結可能胚、code 1 および 2 を移植可能胚とした。

^a : 供試胚に対する 50 hpi において分割した胚の割合とした。

^b : 分割胚に対する胚の割合とした。

*, ** 同一行の数値間で有意差あり (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)。

表4 卵割パターンによる発生成績の比較

	対照区		試験区	
	正常卵割胚	異常卵割胚	正常卵割胚	異常卵割胚
分割胚数	86	80	106	55
胚盤胞発生数 (%) [†]	60 (69.8) ^a	40 (50.0) ^b	76 (71.7) ^a	20 (36.4) ^b
code 1 (%) [†]	28 (32.6) ^a	14 (17.5) ^b	51 (48.1) ^c	8 (14.5) ^b
code 2 (%) [†]	21 (24.4)	18 (22.5)	22 (20.8)	11 (20.0)
code 3 (%) [†]	11 (12.8) ^a	8 (10.0) ^{ac}	3 (2.8) ^b	1 (1.8) ^{bc}

[†]分割胚に対する胚の割合とした。

^{a, b, c} 同一行の数値間で有意差あり ($p < 0.05$)。

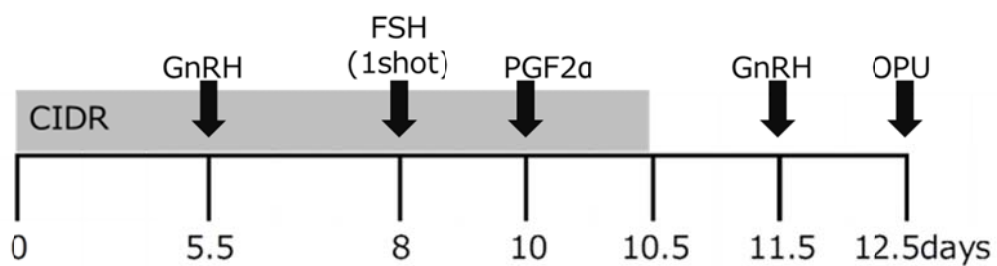


図1 過剰排卵処理プロトコル

供試牛の過剰排卵処理は発情周期の任意の時期に Matoba ら[78]の方法を一部改変して行った。OPU および IVF は 2 回目の GnRH 投与から、それぞれ 25-26 時間および 30 時間後に行った。

CIDR : 膣内留置型黄体ホルモン製剤

GnRH : 性腺刺激ホルモン放出ホルモン

FSH : 卵胞刺激ホルモン

PGF2 α : プロスタグランジン F2 α

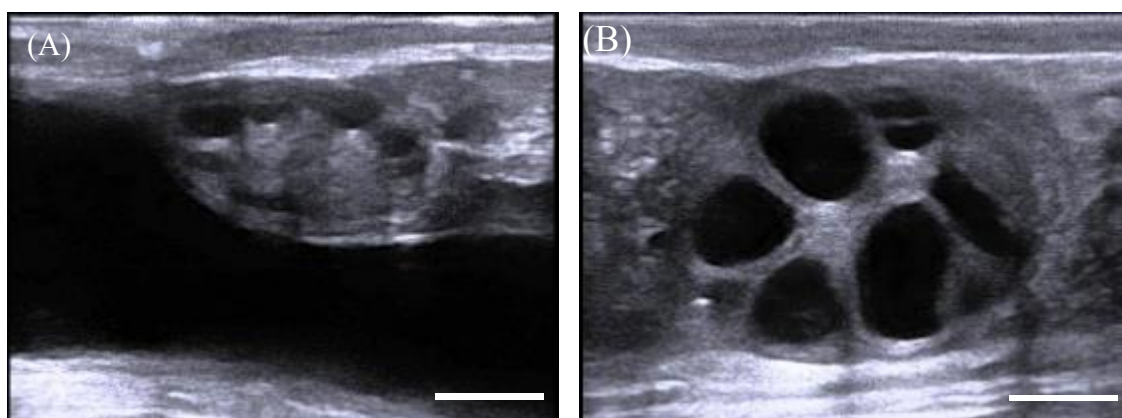


図2 OPU 時における卵巣の超音波画像

対照区および試験区における OPU 時の卵巣超音波画像を示す (A および B)。スケールバーは 10mm を示す。

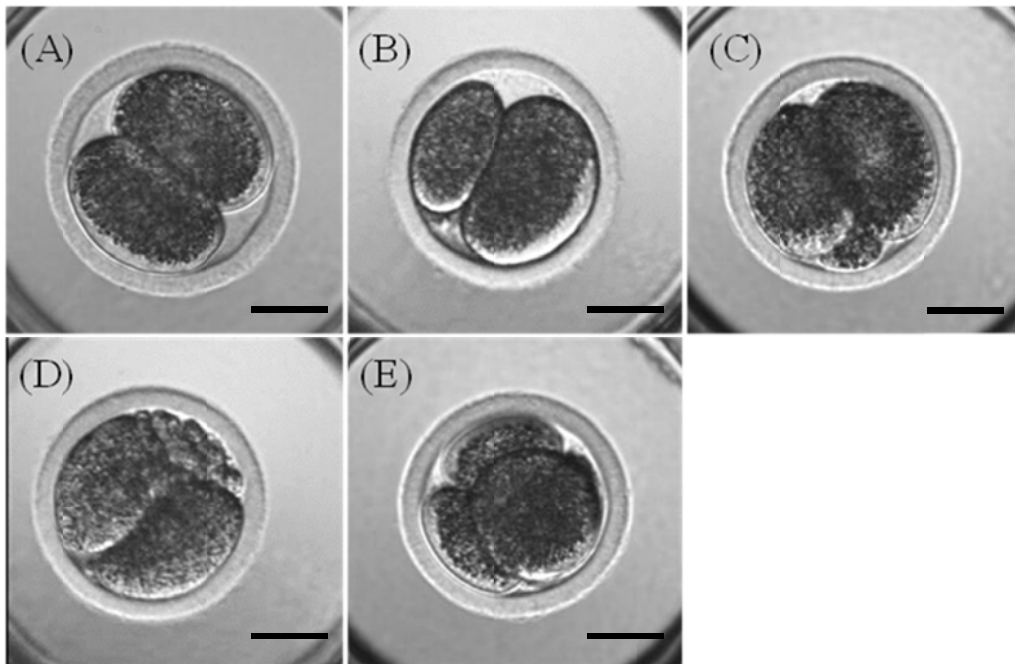


図3 第1卵割パターンの形態学的分類

28 hpi に第1卵割パターンを形態学的に評価し、以下のように分類した。(A) 2つの割球の大きさが均等でフラグメンテーションを有さない胚、(B) 2つの割球の大きさが不均等である胚、(C) 2つの割球と突出部を有する胚、(D) 2つの割球とフラグメンテーションを有する胚、(E) 1細胞から直接3または4細胞に分割した胚。スケールバーは50 μ mを示す。

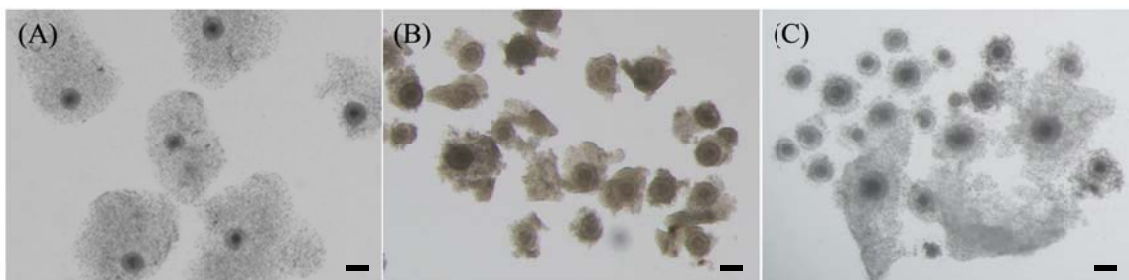


図4 採取された卵母細胞の形態

試験区および対照区において採取された卵母細胞を示す (A および B)。試験区では、膨化した卵丘細胞に覆われた卵母細胞のみを体内成熟卵として実験に用いた (A)。対照区において採取された未成熟卵母細胞は IVM を行い、体外成熟卵として実験に用いた (C)。スケールバーは 150 μ m を示す。

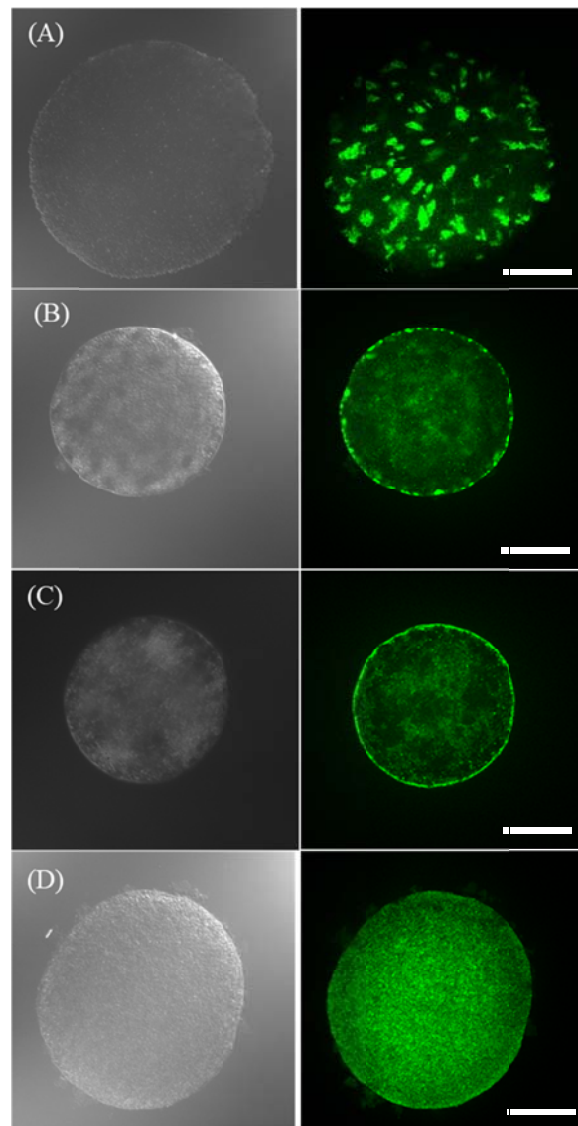


図5 CGs 分布パターン分類

緑色蛍光が CGs の分布を示す（左：明視野、右：CGs）。卵細胞質内における分布パターンを Hosoe と Shioya [83] の分類に基づき、以下の4つに分類した。パターン I：細胞質中にクラスター状に分布するもの（A）、パターン II：細胞膜直下に分散または部分的にクラスター状に分布するもの（B）、パターン III：細胞膜直下に分散して分布するもの（C）、パターン IV：CG が検出されないもの（D）。スケールバーは 50 μ m を示す。

第4章 発生動態を指標とした高受胎率が 望める体外生産胚の客観的選別法の確立

第1節 緒言

第3章の結果より黒毛和種繁殖雌牛において、OPU 前の過剰排卵処理および採取した体内成熟卵を IVP に用いることで、高い受胎率が望める形態学および発生動的に高品質な胚を効率的に生産できることが示された。また、IVF から 28 時間後に胚の第1卵割パターンを観察し、選別した正常卵割胚を移植することで高い受胎率を得られることが示された。

しかしながら、この観察法では第1卵割のタイミングを正確に測定することは困難であり、胚の詳細な発生動態を分析することができない。一方、TLC システムは体外生産胚の経時的な観察が可能であり、インキュベーターから培養ディッシュを取り出すことなく非侵襲的に胚の発生動態や卵割パターンを詳細に分析することができる[91]。ヒトの不妊治療における高度生殖補助医療（Assisted Reproductive Technology : ART）では胚の非侵襲的かつ客観的な評価指標の一つとして第1卵割のタイミングが提案されている。すなわち、第1卵割が遅い胚に比べて、早い胚は有意に高品質胚が多いことや胚盤胞発生率が高いこと[92, 93]、移植後の妊娠率が高いこと[94]が報告されている。第3章で正常な第1卵割を経た胚を移植することで高い受胎率が示されたことから、TLC システムを用いて第1卵割のタイミング等の発生動態をより詳細に調査することにより、高い受胎率が望める胚の客観的選別法を開発するための有益な知見を得られることが予想される。

そこで、本章では過剰排卵処理を行った黒毛和種繁殖雌牛から採取された体内成熟卵を用いて IVF 後の胚を TLC システムにより観察し、発生した胚盤胞期胚の移植後の受胎率との関係を分析することで高い受胎率が望める胚の選別が可能かどうかについて調査することを目的とした。

第2節 材料と方法

1. 試薬

特に記載がない場合は、全てSigma-Aldrich (St. Louis, USA) から購入した。

2. 供試動物および管理方法

本研究は佐賀県畜産試験場で飼養している黒毛和種繁殖雌牛 ($n = 6$, 6.4 ± 1.7 歳, 5.0 ± 1.5 産) を用いて実施した。供試牛は日本飼養標準 (中央畜産会 2009) に従って粗飼料および濃厚飼料を給与され、同様の環境で管理された。実験の開始時のボディコンディションスコア (BCS, Wagyu Registry Association's Guide) は約 3.5 であった。なお、本実験は佐賀県畜産試験場動物実験等実施規程に基づき、佐賀県畜産試験場の承認のもと行われた。

3. 過剰排卵処理法および試験区の設定

第3章 第2節の方法に従い、過剰排卵処理区 (試験区) および未処理区 (対照区) の設定を行った。

4. OPUによるCOCsの採取

第3章 第2節の方法に従い、COCsを採取した。

5. IVP

第3章 第2節の方法に従い、IVM、IVFおよびIVCを行った。

6. TLCを用いた発生動態の観察

タイムラプス観察システム (CCM-IVF ; アステック, 福岡) を用いて胚の発生動態

を観察した。胚の撮影は 15 分間隔で行い、IVF 開始から 2、3、4、5 細胞に到達した時間 (hpi) を測定した。また、第 1 卵割パターンについては、得られた撮影画像を基に第 3 章 第 2 節の分類 (第 3 章 図 3) に従い分類した。なお、第 3 章では 28 hpi 以降に第 1 卵割を行った胚は異常卵割胚と分類したが、本章においては卵割様式が正常であれば 28 hpi 以降に分割した胚であっても正常卵割胚に分類した。

7. 胚移植および妊娠診断

第 3 章 第 2 節の方法に従い、胚移植および妊娠診断を行った。なお、第 3 章では、胚移植には International Embryo Technology Society (IETS) マニュアル[79]で定められている基準に従って code 1 と評価した胚のみを使用していたが、本章においては code 1 に加えて code 2 と評価した胚盤胞期胚も用いた。

8. 統計解析

胚盤胞発生率はカイ二乗検定を用いて試験区間の差の解析を行った。受胎率はフィッシャーの直接確率検定を用いて試験区間の差の解析を行った。また、他のデータについては Student の t 検定により試験区間の差の解析を行った。 $p < 0.05$ の場合を統計的に有意な差が認められると判断した。

第3節 結果

試験区および対照区で作製した42個の胚を受胎牛に移植した結果、全体で22頭の受胎が確認された(52.4%)。発生胚および未発生胚における第1卵割時間を表1に示した。全ての区で第1卵割時間は未発生胚と比べて発生胚で有意に早かった($p < 0.01$)。また、IVFに使用した精液のうち種雄牛AおよびBについて、各試験区における種雄牛毎の体外発生成績を表2に示した。各試験区の種雄牛間の体外発生成績に有意な差は認められなかった。さらに、各試験区における種雄牛毎の第1卵割時間を表3に示した。対照区では、全体、異常卵割胚、発生胚、未発生胚において種雄牛Bと比べて種雄牛Aで第1卵割時間が有意に早くなった($p < 0.05$)。試験区では、正常卵割胚、発生胚において種雄牛Bと比べて種雄牛Aで第1卵割時間が有意に早くなった($p < 0.01$)。受胎の成否と2、3、4、5細胞到達時間との関係を表4に示した。対照区の5細胞到達時間を除き受胎した胚の方が受胎しなかった胚よりも卵割のタイミングは早かったが有意な差は認められなかった。また、種雄牛毎の受胎率および移植胚における第1卵割時間を表5に示した。種雄牛間で受胎率に有意な差は認められなかったが、第1卵割時間に有意な差が認められた($p < 0.01$)。さらに、第1卵割パターンが正常な胚と異常な胚の2、3、4、5細胞到達時間および受胎率を表6に示した。全ての区で正常卵割胚の方が異常卵割胚よりも2細胞到達時間が早かったが有意な差は認められなかった。受胎率に関しても、異常卵割胚と比べて正常卵割胚で高い傾向($p = 0.11$)はみられたが、有意な差は認められなかった。一方、全体では3、4、5細胞到達時間において異常卵割胚の方が正常卵割胚よりも有意に早かった($p < 0.05$)。

第4節 考察

近年、ウシ胚における TLC を用いた研究で、胚の発生動態がその後の発生能に影響を及ぼすことが報告されている[75-77]。我々も第3章において、第1卵割パターンが移植後の受胎率に影響を与えることを示した。一方で、ウシ体外生産胚において、第1卵割パターンに加えて、第1卵割のタイミング、第1卵割時のフラグメンテーションの有無、第4卵割後の割球数および胚盤胞期の酸素消費量といった指標を加えることで、高い精度で移植胚の受胎の有無を推測できることが報告されている[76]。また、ヒト胚においても第1卵割のタイミングは移植後の妊娠の成否と関係があるとして注目されている[92-94]。そこで、本章では体内成熟卵を用いて作製した胚の第1卵割パターンに加えて卵割時間も胚の選別指標として用いて、高い受胎率が望める移植胚の選別法を確立するために調査を行った。

まず、発生胚と未発生胚の第1卵割時間を比較した。その結果、各試験区にかかわらず、正常卵割および異常卵割胚のそれぞれの第1卵割時間は未発生胚と比べて発生胚で有意に早かった。これは第1卵割が早い胚は高い発生能を有するとする過去の報告と一致している[76]。次に、受胎した胚と受胎しなかった胚のそれぞれの卵割時間を比較したところ、試験区および対照区いずれにおいても卵割時間に有意な差は認められなかった。また、正常卵割および異常卵割胚においても、第1卵割時間に差は認められなかった。一方、異常卵割胚において3、4、5細胞到達時間が正常卵割胚と比較して有意に早かったが、異常卵割胚では1細胞から直接3または4細胞に卵割する **direct cleavage** が観察された胚が多かったためと考えられる。また、試験区において有意差はなかったものの正常卵割胚で受胎率が高い傾向がみられた (64.7% vs 28.6%, $p = 0.11$)。これらの結果は、第1卵割パターンは移植後の胚の生存性と正の相関があったが、卵割のタイミングでは相関がなかったとする Sugimura ら [77] の報告と一致している。卵割時間に関しては、主にヒトにおいて第1卵割時間が早い胚の方が妊娠率を含めた発生能が高いこと

が報告されており[92-94]、本研究の結果とは矛盾している。この理由についての詳細は不明であるが、今回使用した精液の種雄牛毎に体外発生成績や第1卵割時間を算出したところ、発生成績に有意な差は認められなかったにもかかわらず、第1卵割時間に種雄牛間で有意な差が認められた。すなわち、第1卵割時間は使用する精液に大きく影響を受けることが示された。この原因の一つとして、凍結精液の品質の違いが考えられる。季節間で精子生存率に差があると報告されていることから[95]、それぞれの種雄牛で精液採取日が異なる場合には精液性状にばらつきが生じる可能性がある。また、凍結精液を製造している機関によって凍結液の組成や凍結プロトコルが異なることも品質の違いに繋がると考えられる。通常、移植胚の生産現場では、複数の種雄牛からの精液を生産者の希望に応じてその都度使い分けることが一般的であり、さらに、一度のOPUで採取された卵母細胞を分けて別々の精液で受精させる場合もある。実際に、本研究における移植試験においても、協力農家からの希望に合わせるために、複数の種雄牛からの精液を使用して胚の生産・移植を行わざるを得なかった。したがって、これらのことを考慮すると精液側の影響が大きい卵割時間を指標として移植胚の評価・選別を行うことは生産現場レベルでは困難であるといえる。しかしながら、本章で当初計画していた体内成熟卵由来の胚において第1分割パターンと第1卵割時間を組み合わせて評価した場合の受胎率との関係について明らかにすることは学術的に価値のあることと考えられ、今後、各種雄牛ごとの例数を増やすことによりそれらを明らかにしていきたい。

加えて、屠場卵巣由来の卵母細胞を用いた実験において、第1卵割のタイミングとそのパターンの異常は胚盤胞期胚での染色体数にも影響があり、特に、第1卵割において27時間以降に卵割した胚やdirect cleavageが観察された胚では高頻度で染色体異常が観察されている[75, 76]。すなわち、これらの結果はたとえ正常な第1卵割パターンを示した胚でも染色体異常を有する胚が含まれている可能性が否定できないということを示している。したがって、OPUで採取した卵母細胞、特に体内成熟卵母細胞を用いた

場合も同様の結果が得られるのかについて検討することは、本研究で示した体外成熟卵の有用性を裏打ちするためだけでなく、現場レベルでの本成果の利用を考えた場合にも重要であると考えられる。

以上の結果より、高い受胎率が望める胚を選別するためには、胚盤胞期胚の形態学的な評価に加えて第1卵割が正常であることを指標にすることが現時点で簡便かつ有効であると示唆された。一方、卵割時間を指標とした胚の受胎能の評価には注意が必要であり、今後、卵割時間およびパターンに影響する要因やそれらの受胎率との関係についてのより詳細な研究が必要であると考えられる。

第5節 小括

本研究では体内および体外成熟卵を用いて IVF 後の発生動態を TLC システムにより観察し、発生胚の移植後の受胎成績を調査した。体内、体外成熟由来にかかわらず、受胎した胚および受胎しなかった胚の卵割時間に有意な差は認められなかった。さらに、第1卵割時間は使用する精液の種雄牛ごとに有意に異なり、精液の影響を強く受けることが示された。一方、体内成熟卵から作製した胚において、第1卵割が正常なものは受胎率が高い傾向が認められた。

以上の結果から、第1卵割の正常性を指標とした胚の選抜法は簡便かつ客観的であり、子牛の生産性向上に寄与するものと考えられた。

表 1 発生胚および未発生胚における第 1 卵割時間の比較

	対照区		試験区	
	正常卵割	異常卵割	正常卵割	異常卵割
発生胚	27.2±0.4*	28.6±0.5*	25.3±0.3*	26.8±0.7*
未発生胚	34.5±2.3*	32.8±0.9*	27.5±1.1*	32.0±2.1*

数値は平均値±標準誤差で示した。

IVF開始から第 1 卵割までの時間を示す (hpi)。

*同一列の数値間で有意差あり ($p < 0.01$)。

表 2 各試験区における種雄牛毎の体外発生成績の比較

種雄牛	供試胚数	分割胚数 (%)	胚盤胞発生数 (%)		
			全体 ^a	正常卵割胚 ^b	異常卵割胚 ^c
対照区					
A	35	29 (82.9)	15 (51.7)	10 (62.5)	5 (38.5)
B	40	33 (82.5)	21 (63.6)	14 (73.7)	7 (50.0)
試験区					
A	39	35 (89.7)	22 (62.9)	11 (78.6)	11 (52.4)
B	33	25 (75.8)	17 (68.0)	12 (63.2)	5 (83.3)

^a 分割胚に対する発生胚の割合とした。^b 正常卵割胚に対する発生胚の割合とした。^c 異常卵割胚に対する発生胚の割合とした。

表3 各試験区における種雄牛毎の第1卵割時間の比較

種雄牛	対照区					試験区				
	全体	正常卵割胚	異常卵割胚	発生胚	未発生胚	全体	正常卵割胚	異常卵割胚	発生胚	未発生胚
A	28.0±0.8*	28.0±1.0	27.9±1.3*	26.0±0.6*	30.1±1.3*	28.0±1.5	24.7±1.4**	30.2±2.1	24.8±0.6**	33.5±3.3
B	31.2±1.2*	30.4±1.6	32.3±1.7*	28.5±1.1*	35.8±2.1*	29.4±0.8	28.8±0.5**	31.3±3.1	28.0±0.3**	32.5±2.1

数値は平均値±標準誤差で示した。

IVF開始から第1卵割までの時間を示す (hpi)。

*, ** 同一行の数値間で有意差あり (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)。

表 4 移植胚における卵割時間と受胎の成否との関係

	全体		試験区		対照区	
	受胎	不受胎	受胎	不受胎	受胎	不受胎
n	23	19	13	11	10	8
t2	26.7±0.8	28.0±1.0	25.2±0.8	26.6±0.8	29.6±0.9	31.1±2.5
t3	35.5±1.2	37.1±1.2	32.8±1.2	34.7±1.1	39.2±1.7	40.4±1.9
t4	36.2±1.3	37.6±1.4	32.8±1.2	34.8±1.1	40.7±1.6	41.6±2.4
t5	44.5±1.4	45.4±1.6	40.7±1.3	41.9±1.7	49.5±1.6	50.1±1.9

数値は平均値±標準誤差で示した。

IVF開始から第1卵割までの時間を示す (hpi)。

t2 : 2細胞到達時間、t3 : 3細胞到達時間、t4 : 4細胞到達時間、t5 : 5細胞到達時間。

試験区および対照区では、それぞれ体内成熟卵および体外成熟卵を用いた。

表5 種雄牛毎の受胎率および移植胚における第1卵割時間の比較

種雄牛	受胎率(%)	全体 [†]	受胎 [†]	不受胎 [†]
A	60.0	23.9 ± 0.6 ^a	22.6 ± 0.1 ^a	23.9 ± 0.6 ^a
B	46.2	28.2 ± 0.6 ^b	28.0 ± 0.6 ^b	28.2 ± 0.6 ^b

試験区において体内成熟卵から作製した胚を用いた。受胎率以外の数値は平均値±標準誤差で示した。

[†]全体、受胎、不受胎はそれぞれ移植胚全体、受胎した胚、不受胎であった胚のIVF開始から第1卵割までの時間(hpi)を示す。

a, b 異文字間で有意差あり ($p < 0.01$)。

表6 移植胚における卵割パターン、卵割時間および受胎率の関係

	全体		試験区		対照区	
	正常卵割	異常卵割	正常卵割	異常卵割	正常卵割	異常卵割
n	33	9	17	7	16	2
t2	26.9±0.7	28.4±1.4	25.3±0.7	27.1±0.9	29.7±1.0	32.8±5.0
t3	37.2±0.9*	32.6±1.9*	34.4±0.9	31.8±1.7	40.2±1.1	35.5±7.8
t4	38.0±1.0*	32.6±1.9*	34.5±0.9	31.8±1.7	41.8±1.2	35.5±7.8
t5	46.2±1.0*	40.2±2.6*	42.3±1.0	38.7±2.6	50.3±1.0	45.6±8.4
受胎率(%)	60.6	33.3	64.7	28.6	56.3	50.0

数値は平均値±標準誤差で示した。

IVF開始から第1卵割までの時間を示す (hpi)。

t2：2細胞到達時間、t3：3細胞到達時間、t4：4細胞到達時間、t5：5細胞到達時間。

試験区および対照区では、それぞれ体内成熟卵および体外成熟卵を用いた。

*：同一グループ、同一行内の数値間で有意差あり ($p < 0.05$)。

第5章 総括

生きた家畜から繰り返し卵母細胞を採取することが可能なOPU法とIVF技術を組み合わせた体外胚生産は家畜の育種改良におけるメリットが多く国内でも技術の活用の広がりを見せており、今後の需要の拡大も期待される。しかしながら、体外生産胚は体内生産胚と比較して品質が低いことから、移植後の受胎率や凍結保存後の生存率も低くなることが問題となっている。

また、近年の気候変動に起因すると考えられる夏季の高温環境は家畜の生産性を著しく低下させている。暑熱ストレスは家畜の受胎率低下といった繁殖成績にも悪影響を及ぼすことから畜産農家の経済的損失を引き起こす。しかしながら、現在までも夏季の暑熱ストレス対策に関する様々な研究が行われてきたが、直接的に暑熱ストレスを回避する有効な手段は見出されていない。胚は発育ステージによって高温に対する感受性が異なることが知られており、受精後7日目の胚盤胞期胚は発生初期の胚よりも暑熱環境に強いことが報告されている。したがって、体外胚生産技術と胚移植技術を活用することは夏季の人工授精における低受胎率対策に有効であると考えられる。

これらのことから、体外生産胚の高品質化は家畜改良の効率を高めるだけでなく、夏季における受胎率低下の回避策としても期待できることが考えられる。そこで、本研究では暑熱環境と非暑熱環境における生体内卵母細胞の特徴ならびに異なる成熟方法による卵母細胞を用いた体外胚生産を検討することで体外生産胚を高品質化することを目的とした。

1. 季節間における卵母細胞の品質の違い

高温環境は卵母細胞および初期胚の品質を低下させることが知られているが、その損耗メカニズムは体外培養系を用いて調査されたものがほとんどである。そのため、暑熱による生体内での生殖細胞の変化を明らかにすることは夏季の受胎率低下の対策を考えるうえで有効であると考えられることから、暑熱期と冷涼期に OPU を行い生体内卵

母細胞の季節間の違いを調査した。暑熱期において直腸温および呼吸数の上昇を伴う暑熱ストレスの影響が観察されたが、OPU 時の卵胞数や採取された COCs の形態学的グレードについては両区間で違いは認められなかった。一方で、暑熱期では卵丘細胞のアポトーシス細胞数が増加し、ミトコンドリアの異常分布がみられる卵母細胞の割合が増加した。以上のことから、夏季の黒毛和種牛においては暑熱ストレスの影響により COCs の品質が低下している可能性が示唆された。

2. 成熟方法の違いが体外胚生産に及ぼす影響

体内成熟卵の使用が体外生産胚の生産性および品質に及ぼす影響について調査した。OPU 前の過剰排卵処理による採取された卵母細胞の総数に違いは認められなかった。細胞質成熟の指標である CGs 分布を調べたところ、試験区の方が対照区よりも正常な CGs 分布を示す卵母細胞の割合が有意に高かった。また、分割率および胚盤胞発生率に有意な差はなかった。一方で、正常卵割率および凍結可能胚数、正常卵割由来の移植可能胚の割合は試験区の方が対照区よりも有意に高かった。さらに正常卵割胚の受胎率は異常卵割胚と比較して有意に高かった。以上のことから、体内成熟卵を用いた胚生産は、体外での移植可能胚の生産性を向上させるとともに、移植後に高い受胎率が望める正常卵割由来胚をより多く生産できることが示唆された。

3. 高受胎率が望める体外生産胚の選別手法の検討

TLC システムを用いて成熟方法の異なる卵母細胞の IVF 後の発生動態を観察し、生産された胚を移植することで発生動態と受胎性との関係を調査した。体内、体外成熟由来にかかわらず、受胎の可否における卵割時間の差は認められなかった。一方で、使用した精液の種雄牛ごとに第 1 卵割時間を調べた結果、卵割時間は使用した精液の由来に大きく影響を受けることが明らかとなった。また、正常卵割を経た体内成熟由来胚では

受胎率が高い傾向が認められた。以上のことから、高品質胚を選抜するためには移植前の形態学的な評価に加えて第1卵割の正常性を指標とすることが簡便かつ客観的な方法であることが示唆された。

4. 今後の展望

今回の研究で、夏季における生体の卵巣内では卵丘細胞のアポトーシスの増加や卵母細胞のミトコンドリア分布の異常といった変化が起きており、これらのことが夏季の受胎性の低下に関与していることが考えられる。また、体内成熟卵を用いることで高品質な胚を効率よく体外で生産することができ、正常卵割胚を移植することで受胎率を向上させる得ることが示された。さらに第1卵割パターンを観察することで受胎の可能性の低い異常卵割胚を除外することができ、従来の胚の評価法と組み合わせることで高品質胚を簡便に選抜できることが明らかとなった。これらの知見は、OPU法により高い受胎率が望める高品質な胚を体外で生産する際の有意義な根拠を提供するだけでなく、人工授精受胎率が低下する夏季における暑熱対策として胚移植技術を活用するためにも有益な情報であると思われる。また、体内成熟卵を用いることで胚の品質が向上したという今回の結果は、体外胚生産系において特に未成熟卵母細胞の体外成熟培養法のさらなる改良が必要であることを示唆する重要な知見でもあるといえる。

今回明らかとなった知見を応用することで畜産・酪農現場における体外生産胚の低受胎率を改善していく一助になることを期待する。今後は、体外成熟卵を体内成熟卵と同等の品質にするための体外成熟培養法の検討やより詳細な胚の発生动態と受胎率の関係を調査することにより、さらなる生産性の向上につなげていきたい。

謝辞

本論文の執筆にあたり、終始御懇切な御指導、御助言を賜った鹿児島大学大学院連合農学研究科生物生産科学専攻動物資源生産科学連合講座 和田康彦教授、山中賢一准教授、建本秀樹教授、三好和睦教授、金野俊洋准教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、多大なる御協力をいただいた佐賀県畜産試験場の皆様、胚移植試験に御協力いただいた農家の皆様に心から深く感謝いたします。

最後に、温かく見守り様々な支援をいただいた家族にも心から感謝いたします。

引用文献

- [1] Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, Buckner PJ. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 1951;113:247.
- [2] Sugie T. Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *J Reprod Fertil* 1965;10:197-201.
- [3] Wilmut I, Rowson LE. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973;92:686-90.
- [4] Hanada A, Suzuki T, Y S. Birth of calves from non-surgical transfer of blastocyst originated from in vitro fertilized oocytes matured in vitro. 78th Ann Meet Jpn Zootech Sci 1986. p. 18.
- [5] Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst Stage. *Biol Reprod* 1990;42:114-9.
- [6] Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988;30:751-62.
- [7] Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PE, et al. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 2006;65:1631-48.
- [8] Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 2014;81:138-51.
- [9] Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003;59:651-74.
- [10] Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick

up from live donors. *Theriogenology* 2001;55:1341-57.

[11] Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 1994;41:67-72.

[12] Majerus V, De Roover R, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, et al. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology* 1999;52:1169-79.

[13] Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB, Godke RA. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in vitro fertilization. *J Anim Sci* 1995;73:967-74.

[14] Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW, et al. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 2000;62:206-13.

[15] Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan. *J Reprod Dev* 2011;57:450-6.

[16] Sakatani M. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. *J Reprod Dev* 2017;63:347-52.

[17] Collier RJ, Dahl GE, VanBaale MJ. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *J Dairy Sci* 2006;89:1244-53.

[18] De Rensis F, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow--a review. *Theriogenology* 2003;60:1139-51.

[19] Flamenbaum I, Galon N. Management of heat stress to improve fertility in dairy cows in Israel. *J Reprod Dev* 2010;56 Suppl:S36-41.

- [20] Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 2001;121:447-54.
- [21] Gendelman M, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 2010;140:73-82.
- [22] Shehab-El-Deen MA, Leroy JL, Fadel MS, Saleh SY, Maes D, Van Soom A. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. *Anim Reprod Sci* 2010;117:189-200.
- [23] Sakatani M, Yamanaka K, Balboula AZ, Takenouchi N, Takahashi M. Heat stress during in vitro fertilization decreases fertilization success by disrupting anti-polyspermy systems of the oocytes. *Mol Reprod Dev* 2015;82:36-47.
- [24] Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002;85:2803-12.
- [25] Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 1998;49:657-65.
- [26] Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:535-47.
- [27] Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 1998;145:27-37.
- [28] Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, et al. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high

developmental competence. *Sci Rep* 2017;7:6815.

[29] Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002;61:414-24.

[30] Ikeda S, Imai H, Yamada M. Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. *Reproduction* 2003;125:369-76.

[31] Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani M, Kawahara M, Hegab AO, Zaabel SM, et al. Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes exposed to heat shock during in vitro maturation. *Reproduction* 2013;146:407-17.

[32] Moussa M, Shu J, Zhang XH, Zeng F. Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". *Anim Reprod Sci* 2015;155:11-27.

[33] Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 2009;15:553-72.

[34] Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 2011;11:797-813.

[35] Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001;16:909-17.

[36] Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001;64:904-9.

- [37] Brevini TA, Vassena R, Francisci C, Gandolfi F. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biol Reprod* 2005;72:1218-23.
- [38] Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA, Swann K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol* 2010;224:672-80.
- [39] Takuma T, Sakai S, Ezoe D, Ichimaru H, Jinnouchi T, Kaedei Y, et al. Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. *J Reprod Dev* 2010;56:55-9.
- [40] Bruno RG, Rutigliano H, Cerri RL, Robinson PH, Santos JE. Effect of feeding yeast culture on reproduction and lameness in dairy cows under heat stress. *Anim Reprod Sci* 2009;113:11-21.
- [41] Sakatani M, Balboula AZ, Yamanaka K, Takahashi M. Effect of summer heat environment on body temperature, estrous cycles and blood antioxidant levels in Japanese Black cow. *Anim Sci J* 2012;83:394-402.
- [42] Azzam SM, Kinder JE, Nielsen MK. Conception rate at first insemination in beef cattle: effects of season, age and previous reproductive performance. *J Anim Sci* 1989;67:1405-10.
- [43] De Rensis F, Lopez-Gatius F, Garcia-Ispuerto I, Morini G, Scaramuzzi RJ. Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology* 2017;91:145-53.
- [44] Garcia-Ispuerto I, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz JL, Nogareda C, Lopez-Bejar M, et al. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology* 2006;65:799-807.
- [45] Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R, Wolfenson D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in

cows. *J Reprod Fertil* 2000;120:83-90.

[46] Sakatani M, Yamanaka K, Balboula AZ, Takahashi M. Different thermotolerances in in vitro-produced embryos derived from different maternal and paternal genetic backgrounds. *Anim Sci J* 2017;88:1934-42.

[47] Silva CF, Sartorelli ES, Castilho AC, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM, et al. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2013;79:351-7.

[48] Shimada M, Ito J, Yamashita Y, Okazaki T, Isobe N. Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells is responsible for both suppression of spontaneous maturation and induction of gonadotropin-stimulated maturation of porcine oocytes. *J Endocrinol* 2003;179:25-34.

[49] Shimada M, Terada T. Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34(cdc2) kinase activity during meiotic progression, especially beyond the MI stage. *Mol Reprod Dev* 2002;62:124-31.

[50] Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Noma N, Kawashima I, Mori T, et al. Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development* 2008;135:2001-11.

[51] Bosco L, Chiarelli R, Roccheri MC, Matranga D, Ruvolo G. Relationship between apoptosis and survival molecules in human cumulus cells as markers of oocyte competence. *Zygote* 2017;25:583-91.

[52] Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:490-8.

[53] Wang Q, Frolova AI, Purcell S, Adastra K, Schoeller E, Chi MM, et al. Mitochondrial

- dysfunction and apoptosis in cumulus cells of type I diabetic mice. *PLoS One* 2010;5:e15901.
- [54] Roth Z. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *J Anim Sci* 2015;93:2034-44.
- [55] Megahed GA, Anwar MM, Wasfy SI, Hammadeh ME. Influence of heat stress on the cortisol and oxidant-antioxidants balance during oestrous phase in buffalo-cows (*Bubalus bubalis*): thermo-protective role of antioxidant treatment. *Reprod Domest Anim* 2008;43:672-7.
- [56] Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007;77:21-49.
- [57] Bavister BD, Squirrell JM. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 2:189-98.
- [58] Liu S, Li Y, Gao X, Yan JH, Chen ZJ. Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. *Fertil Steril* 2010;93:1550-5.
- [59] Sun QY, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 2006;131:193-205.
- [60] Gendelman M, Roth Z. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. *Biol Reprod* 2012;87:118.
- [61] Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, et al. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med* 2006;210:137-44.
- [62] van Wagtenonk-de Leeuw AM. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 2006;65:914-25.

- [63] Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CL, Vander Zwaag DF, Ferre LB. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology* 2003;59:125-38.
- [64] Lonergan P, Fair T. The ART of studying early embryo development: progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology* 2014;81:49-55.
- [65] Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 2001;55:151-70.
- [66] Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim* 2003;38:259-67.
- [67] Bordignon V, Morin N, Durocher J, Bousquet D, Smith LC. GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. *Theriogenology* 1997;48:291-8.
- [68] Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002;61:234-48.
- [69] van de Leemput EE, Vos PL, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology* 1999;52:335-49.
- [70] Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CR, Moreira RJ, et al. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* 2014;82:318-24.
- [71] Dinnyes A, Lonergan P, Fair T, Boland MP, Yang X. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1999;53:318-24.

- [72] Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, Fuente JD, et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 2000;57:146-52.
- [73] Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1999;117:159-67.
- [74] Brevini TA, Lonergan P, Cillo F, Francisci C, Favetta LA, Fair T, et al. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 2002;63:510-7.
- [75] Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, et al. Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by in vitro fertilization or parthenogenesis. *J Reprod Dev* 2010;56:200-7.
- [76] Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, et al. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS One* 2012;7:e36627.
- [77] Sugimura S, Akai T, Somfai T, Hirayama M, Aikawa Y, Ohtake M, et al. Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: a novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biol Reprod* 2010;83:970-8.
- [78] Matoba S, Yoshioka H, Matsuda H, Sugimura S, Aikawa Y, Ohtake M, et al. Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *J Dairy Sci* 2014;97:743-53.
- [79] Rosenkrans CF, Jr., Zeng GQ, GT MC, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993;49:459-62.
- [80] Carneiro GF, Liu IK, Hyde D, Anderson GB, Lorenzo PL, Ball BA. Quantification and

distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Mol Reprod Dev* 2002;63:451-8.

[81] Robertson I, Nelson RE. Certification and identification of embryos. *Manual of the International Embryo Transfer Society* 2010:86-105.

[82] Sakase M, Kawate N, Nakagawa C, Fukushima M, Noda M, Takeda K, et al. Inhibitory effects of CIDR-based ovulation-synchronization protocols on uterine PGF₂α secretion at the following luteal phase in early postpartum non-cycling beef cows. *J Reprod Dev* 2006;52:497-502.

[83] Hosoe M, Shioya Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote* 1997;5:371-6.

[84] Sirard MA. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction* 2018;156:R1-R7.

[85] Ribas BN, Missio D, Junior Roman I, Neto NA, Claro IJ, Dos Santos Brum D, et al. Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. *Anim Reprod Sci* 2018.

[86] Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47:23-32.

[87] Wang W, Hosoe M, Li R, Shioya Y. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. *Dev Growth Differ* 1997;39:607-15.

[88] Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 2002;57:5-20.

[89] Oliveira AC, Mattos MC, Bastos MR, Trinca LA, Razza EM, Satrapa RA, et al. Efficiency

of superstimulatory protocol P-36 associated with the administration of eCG and LH in Nelore cows. *Theriogenology* 2014;82:715-9.

[90] Ree TO, Colazo MG, Lamont AG, Kastelic JP, Dyck MK, Mapletoft RJ, et al. The effect of porcine luteinizing hormone in the synchronization of ovulation and corpus luteum development in nonlactating cows. *Theriogenology* 2009;72:120-8.

[91] Massip A, Mulnard J. Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J Reprod Fertil* 1980;58:475-8.

[92] Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002;17:407-12.

[93] Neuber E, Mahutte NG, Arici A, Sakkas D. Sequential embryo assessment outperforms investigator-driven morphological assessment at selecting a good quality blastocyst. *Fertil Steril* 2006;85:794-6.

[94] Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997;12:1531-6.

[95] Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Seasonal changes in the proteome of cryopreserved bull semen supernatant. *Theriogenology* 2019;126:295-302.