

学 術

移植可能胚の生産効率向上を目指したウシ卵子・胚培養法の改良に関する研究

坂上 信忠¹⁾, 玉田 尋通²⁾

1) 神奈川県畜産技術センター

2) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻
(現 大阪公立大学大学院獣医学研究科)

近年、経膈採卵 (ovum pick-up: OPU)-体外胚生産 (in vitro embryo production: IVP) 技術により、生産現場でも体外受精で子ウシが得られるようになってきた。しかしながら、体外受精による胚盤胞発生率は依然として低く、この点を改善できれば、より多くの後継牛や肥育素牛の生産が可能である。そこで著者らは卵子と卵丘細胞の間のギャップ結合崩壊時間に着目した新しい成熟培養法を検討し、次に発生培養法の改良に取り組んだ。さらに、それを応用して正常な産子を得たのでここに報告する¹⁾。

はじめに

現在の我が国の酪農・肉用牛経営における課題として、飼養頭数の減少が挙げられる(農林水産省「畜産統計」)。その主な要因は、経営者の高齢化及び後継者不足等であり、今後もこれらの問題は継続することが予測され、将来の畜産経営を取り巻く環境は厳しさが増すものと考えられる。今後、飛躍的な増頭を進めるためには、雌ウシを効率的に活用し、いかに優良な子ウシを効果的に増産していくかがカギを握る。この問題に対応する手法の一つとして、エリート牛をドナー牛として、短期間に多数の胚を生産し、それを移植することで多数の優良な子ウシを生産する胚移植技術が挙げられる。

これまで雌ウシの優良形質保存に向けた胚生産は、過排卵処理を施した供胚牛に人工授精して7日目に胚を回収する方法が主体であった。しかし、国際胚

技術学会の報告²⁾では、この手法で得られる正常な胚はドナー牛1頭あたり、世界平均で6.2個であり、ホルモン剤を多量に使用することから、胚の採取は年間数回しか実施できない。一方、生体内の卵巣を超音波画像診断装置で観察しながら、専用の採卵針を用い、卵巣内卵胞から卵子を吸引採取して体外で受精させるOPU-IVP技術が開発され、短期間で多数の胚を生産することが可能となってきた。OPU-IVP技術では、妊娠牛³⁾や肢蹄傷害等⁴⁾のウシからも卵子が採取でき、家畜の改良に有効な新しい繁殖技術として期待されており、海外はもとより全国各地の現場獣医師がこの技術を取り入れ、多くの子ウシが生産されている。

OPUで採取した卵子から移植可能胚を生産するには、卵子の成熟培養、体外受精、胚の発生培養が必要不可欠である。しかし、これらの体外培養では採取した卵子の20~30%程度しか移植可能胚が得られておらず⁵⁾、また、過大子が産まれること^{6,7)}や、雌雄の比率に差がある^{8,9)}等の課題が報告されている。この培養技術を改善できれば、より多くの後継牛や肥育素牛の生産が可能である。そこで著者らは新しい成熟培養法や無血清培地の発生培養法の改良に取り組み、それらの技術を組み合わせ、子ウシ生産を実現できたのでその概要について報告する。

1. ウシ卵子の体外成熟培養時におけるU0126添加が胚盤胞発生率に及ぼす影響

ウシでは、食肉処理場で得られた卵巣または生体

の卵巣から卵子を採取して体外培養を行い、移植可能胚を作成する技術が広く浸透しているが、胚盤胞の作出効率は卵子の成熟度に大きく影響を受ける。卵子の成熟には細胞質成熟と核成熟があるが、細胞質成熟は卵丘細胞卵子複合体 (COC) のギャップ結合を介した卵丘細胞から卵子への各種因子の供給に依存している¹⁰⁾。卵子の減数分裂再開は、LHサーージ後にmitogen-activated protein kinase (MAPK) を介して卵子と卵丘細胞との間のギャップ結合が崩壊し、卵子内のcyclic adenosine monophosphate (cAMP) 濃度が低下して起こる。しかし、体外成熟では培養液中の成長因子等がMAPKを活性化し、ギャップ結合が早く崩壊して細胞質成熟が不十分のまま減数分裂が再開される。その結果として、体外成熟卵子の胚盤胞発生率は、体内成熟卵子と比較して低くなるものと考えられている^{4, 10~13)}。従って、移植可能胚を効率的に生産するには、体内成熟卵子を使用することが有効である。しかし、生産現場で体内成熟卵子を得るには、排卵直前に卵子を採取しなければならず、OPUを行う時間が限定されること、膨化した卵丘細胞の粘濁性が高く、ピペットでの取り扱いが煩雑で検索に時間がかかることなどの課題がある。これらを勘案すると、体内成熟卵子と同様の胚発生を得るための体外成熟培養の改善が必要と考えられる。そこで、著者らはギャップ結合の崩壊を一時的に阻害することにより、卵子の細胞質成熟が促進され、胚盤胞発生率が向上することを期待して、ウシ卵子の成熟培養初期にMAPKを活性化するMAPK kinase (MAPKK) の阻害剤であるU0126を添加してギャップ結合と体外受精後の胚発育を調べた¹⁴⁾。

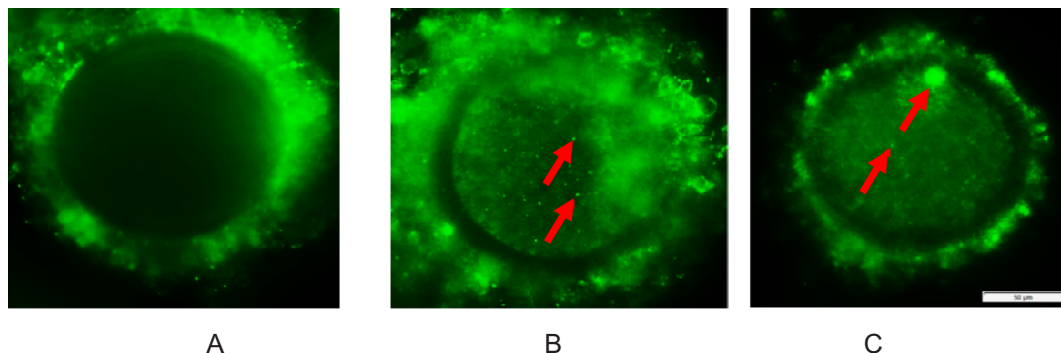
食肉処理場で得た卵巣の卵胞から吸引したCOCを、化学的組成の明らかな血清無添加成熟培養液にU0126を添加して2時間培養した。対照群にはU0126の溶媒のみを添加した。その後、COCをU0126を含まない成熟培養液に移して21~22時間成熟培養を継続した。続いて市販の培養液を用いて媒精と発生培養を行い、胚盤胞発生率を調べた。まずU0126の濃度の検討では、他の報告^{15~19)}で使用されている10 μ Mを基準とし、5 μ Mと比較検討した。その結果、胚盤胞発生率は対照群 (15%) と比較して5 μ M添加群 (28%) で有意に増加したが、10 μ M添加群 (18%) では差が認められなかった (表1)。その原因は明らかではないが、高濃度ではギャップ結合が長時間維持されて成熟が大幅に遅延した可能性や、U0126がMAPKK以外にも多種のキナーゼを抑制する作用を持つ¹⁵⁾ ことによる影響等が考えられた。続いて、成熟培養中のCOCに対してギャップ結合構成因子であるコネキシン43 (Cx43) の免疫蛍光染色を実施し、ギャップ結合の崩壊の進行度を推定した。すなわち、ギャップ結合の崩壊により、Cx43の免疫染色が卵子細胞質内に認められることを指標とした (図1)。U0126 5 μ M処置後4時間における細胞

表1 成熟培養初期のU0126の添加が胚発生に及ぼす影響

	総卵子数	実験回数	分割率* (%)	胚盤胞発生率* (%)
対照群	200	8	57 \pm 3	15 \pm 3 ^a
U0126 5 μ M	200	8	65 \pm 6	28 \pm 4 ^b
U0126 10 μ M	200	8	66 \pm 3	18 \pm 2 ^a

*: 平均値 \pm 標準誤差

^{ab}: 異符号間で有意差あり (P<0.05)



矢印はCx43のspotを示す。

A: No signal: 卵子細胞質内にCx43の染色像が見られないもの B: Spot signal: 卵子細胞質内にCx43の小さな染色像が見られるもの C: Spot signal: 時間が経過して、卵子細胞質内のCx43の染色像がぼやけたもの

バーは50 μ m

図1 COCにおけるCx43の免疫蛍光染色

質内陽性染色すなわち"Spot signal"を示す卵子の割合 (25%) は, 対照群 (44%) と比較して有意に低かった (図2). そしてU0126 処置18, 24時間後では両群の値は75%以上であり, 群間に差はなかったことから, Cx43の分解, つまりギャップ結合の崩壊がU0126添加により遅延したことが示された. これらの結果から, ウシ卵子の成熟培養の初めの2時間にU0126 5 μ Mを添加することにより, ギャップ結合の崩壊が遅延し, 胚盤胞発生率が増加することが明らかとなった.

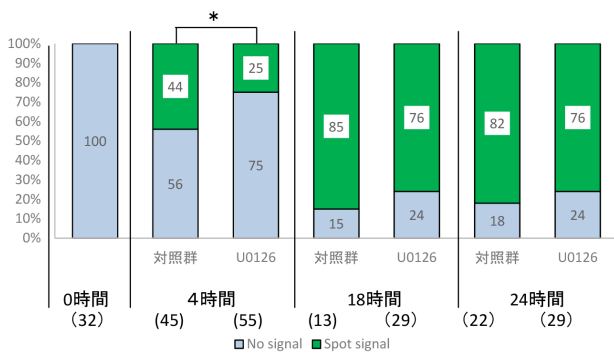


図2 成熟培養開始後の卵子におけるCx43染色像に及ぼすU0126の影響
括弧内は使用卵子数を示す. * P<0.05

2 ウシ胚発生培養時におけるインスリン様成長因子-I (IGF-I) と上皮成長因子 (EGF) の添加が胚盤胞発生率に及ぼす効果

一般的に体外でウシ胚を生産する際は, 培養液にウシ胎子血清 (FCS) を添加するが, FCSのロットにより発生率が大きく異なる. 過去の報告では, 血清を添加しない化学的組成の明らかな培養液を用いた場合, 血清²⁰⁾ やウシ血清アルブミン (BSA)²¹⁾ を添加した培養液と比較して胚盤胞発生率が低いことが示されている. これらのことから, より安定した胚生産を行うためには, 血清を用いない化学的組成の明らかな培地を用いた胚盤胞発生効率の高い培養法の確立が望ましい. 一方, 無血清培地に成長因子等を添加して胚盤胞発生率が向上したという報告が数多くある^{22~30)} が, いずれも良質な血清を添加した場合と同等の胚盤胞発生率は達成できていない. そこで, より高品質な胚を安定的により多く採取することを目的として, 2つの成長因子に着目し, それ

らの無血清発生培養液への添加が胚発生に及ぼす影響を検討した³¹⁾.

インスリン様成長因子-I (IGF-I) のレセプターはウシの卵子から胚盤胞に至る全ての発育過程で発現し^{32,33)}, IGF-Iはアポトーシスを抑制して^{27,34,35)}, 胚盤胞発生率を向上させることが報告されている^{27,28,30,35,36)}. また, 上皮成長因子 (EGF) のレセプターは, ウシの卵子および胚盤胞に発現しており³²⁾, 成熟培養液や発生培養液へのEGFの添加により, 胚盤胞発生率が向上することが報告されている^{23,27)}. そこで, これら2つの成長因子を血清無添加培地に添加して胚盤胞発生率を調べ, 添加濃度や相互作用について検討した.

まず初めに無血清合成卵管液 (SOFAa-PVA)³¹⁾ に各濃度の IGF-I (0, 2, 10, 50, 100ng/ml) を添加して発生培養を実施した. その結果, 胚盤胞発生率は IGF-I 50あるいは100ng/ml添加群においてIGF-I無添加群と比べて有意に高く, IGF-I 50ng/ml添加群で最も高かった (図3).

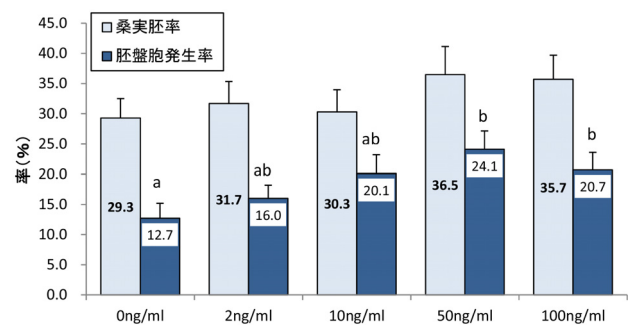


図3 発生培養液へのIGF-I添加の胚発生に及ぼす効果
各試験の平均値±標準誤差を示す(n=449-473), a-b: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

Pintoら³⁷⁾ はマウス胚においてIGF-Iが細胞膜のレセプターに結合してグルコーストランスポーター8の移動を促進し, 結果としてアポトーシスを抑制すると推察している. 本研究のIGF-I 50あるいは100ng/ml添加群では, IGF-I無添加群と比べて胚盤胞発生率が高かっただけでなく, ここにはデータを示していないが, 胚盤胞の直径と内細胞塊および栄養外胚葉の細胞数の増加も認められた. これらの結果から, IGF-Iは50あるいは100ng/mlの濃度で明らかな胚細胞増殖効果を示すものと考えられた. Ni

ら³⁸⁾はマウス胚において、高い濃度のIGF-IはIGF-Iレセプターのダウンレギュレーションを起こし、アポトーシスを誘導することを報告している。Prelleら³⁹⁾もウシ胚において100ng/mlのIGF-I添加は無添加群と比較して有意に胚盤胞発生率を増加する一方、IGF-Iレセプターの転写が有意に低下することを報告している。これらの報告と本実験の結果から、SOFaa-PVAへのIGF-Iの添加濃度は100ng/mlより50ng/mlの方が適していると考えた。

次にEGFの効果を検討した。EGFを、0, 1, 10, 100 ng/mlの濃度で培養液に添加し、Day 8における胚発育を調べ、一部の胚盤胞で細胞数を測定した。その結果、EGFを100ng/ml添加することにより胚盤胞発生率が無添加群と比較して有意に高くなり(図4)、さらに、詳しいデータは示していないが、内細胞塊の細胞数も1 ng/mlと100ng/ml添加群で無添加群と比較して増加した。これらの結果から、SOFaa-PVAにEGFを100 ng/mlの濃度で添加することにより、胚の発育が促進されるものと考えた。

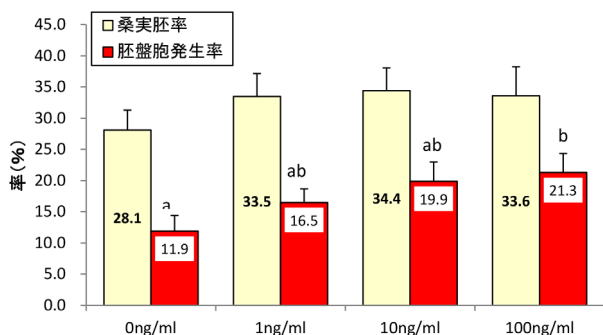


図4 発生培養液へのEGF添加の胚発育に及ぼす効果
各試験の平均値±標準誤差を示す(n=420-446), a-b: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

続いてIGF-I 50ng/ml, EGF 100ng/mlの単独および両方を添加して培養を行った。また5% FCSを添加して陽性対照群を設けた。その結果、無添加対照群、EGF添加群、IGF-I添加群、両成長因子添加群、FCS添加群の順で胚盤胞発生率が高くなった(図5)。さらに、内細胞塊の細胞数も無添加群(21.5個)と比較してIGF-I添加群(31.5個)、両成長因子添加群(41.3個)、FCS添加群(38.2個)で有意に増加した。これらの結果から、両成長因子をSOFaa-PVAに添加することにより、胚の発育が著し

く促進されるものと考えた。

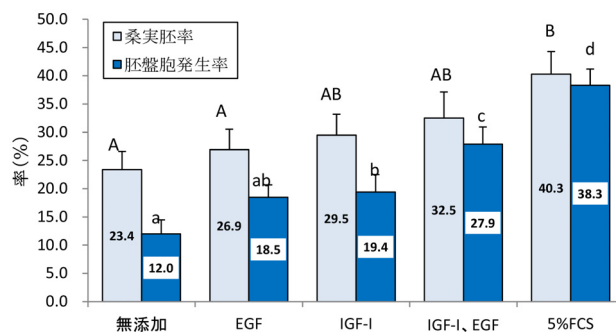


図5 発生培養液へのIGF-IおよびEGF添加の胚発生に及ぼす効果
各試験の平均値±標準誤差を示す(n=424-428), A-B, a-d: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

Sirisathienら²⁸⁾は、4細胞期からIGF-I 50ng/mlとEGF 5ng/mlのどちらか一方を添加することにより胚盤胞発生率が増加することを報告しているが、両成長因子の添加による発生率向上効果は確認していない。本研究では、IGF-I 50ng/mlとEGF 100ng/mlを同時に媒精直後から培養液に添加することにより、胚盤胞発生率は無添加群より15%高くなり、さらにこの値はどちらか一方の単独添加群と比べても有意に高い値であった。結論として、発生培養において、SOFaa-PVAへのIGF-I (50ng/ml) またはEGF (100ng/ml) の添加は胚盤胞発生率を高め、両成長因子の同時添加は相加効果をもたらすことが明らかとなった。

3 ウシ胚発生培養時におけるグルコース、トランスフェリンおよびセレンの添加が胚盤胞発生率に及ぼす影響

無血清培養液を用いた胚の発生培養におけるグルコースの添加が胚発育に及ぼす影響は未だ不明な点が多い。また、無血清培養液にトランスフェリンやセレンを添加することで胚盤胞発生率が高くなることが報告されている²⁹⁾。そこで、著者らはSOFaa-PVAにIGF-I 50ng/mlとEGF 100ng/mlを添加した培養液(SOF-IE)へのグルコースの添加量や添加時期が胚盤胞発生率に及ぼす影響について検討し、さらにトランスフェリンとセレン添加の胚盤胞発生率と胚活性の指標となる呼吸量に及ぼす効果を調べた。呼吸量は走査型電気化学顕微鏡を用いた酸素消費量

表2 発生培養液へのグルコース添加の濃度と時期が胚盤胞発生率に及ぼす影響

培地への添加時期 ^{b)} (時間)	卵子数 (供試回数)	各グルコース濃度 (mM)での胚盤胞発生率 ^{a)}				
		0	1.5	2.0	4.0	5.6
0	1205 (9)	19.2±2.5 ^{c)}	24.0±3.1 ^{c)}	20.2±3.5 ^{c)}	12.6±3.6 ^{cd)A)}	3.1±1.7 ^{d)A)}
72	549 (6)	19.6±4.1	19.7±3.7	20.1±3.7	24.7±5.1 ^{AB)}	16.9±3.4 ^{B)}
144	600 (6)	16.9±2.0 ^{c)}	22.9±3.2 ^{cd)}	27.8±3.7 ^{cd)}	31.3±3.7 ^{d)B)}	29.0±2.3 ^{cd)C)}

a) 平均値±標準誤差

b) 媒精後のグルコース添加までの時間

c-d) 同行異符号間に有意差あり (p<0.05)

A-C) 同列異符号間に有意差あり (p<0.05)

の測定値を指標とした。

まず、SOF-IEに1.5~5.6mMのグルコースを媒精後0, 72, 144時間に添加して8日後に胚盤胞発生率を調べた。培精後0時間から添加した群では、濃度が高くなるに従って胚盤胞発生率は低くなった(表2)。次に媒精72時間後から各濃度のグルコースを添加した群では、胚盤胞発生率に差はなかった。一方、SOF-IEに各濃度のグルコースを媒精144時間(6日)後から添加したところ、4mM添加群の胚盤胞発生率は無添加群と比べて有意に高かった。これらの結果から、発生培地としてSOF-IEを用いた場合、6日後から4mMの濃度でグルコースを加えることにより、胚盤胞発生率が高くなることが明らかになった⁴⁰⁾。

次に、SOF-IEにグルコース4mMを媒精6日後から添加する培養法に加えて、トランスフェリン5μg/mlとセレン5ng/mlを媒精直後から添加し、胚盤胞発生率と胚の呼吸量を調べた。なお、陽性対照として5%FCSを加えた培養液を用いた。その結果、

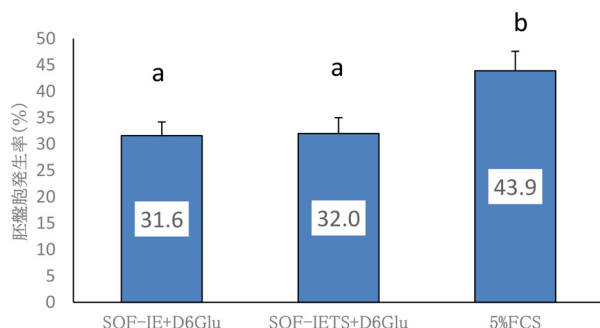


図6 改良発生培養液(SOF-IE+D6Glu), トランスフェリンとセレンを添加した改良発生培養液(SOF-IETS+D6Glu)及びFCS添加培養液を用いた発生培養による胚盤胞発生率

各試験の平均値±標準誤差を示す(n=442-454), a-b: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

トランスフェリンとセレンの添加により、胚盤胞発生率の増加はみられなかった(図6)が、胚の呼吸量は有意に増加し、陽性対照群と比べても差はなかった(図7)。

以上の結果から、SOF-IEにトランスフェリン5μg/mlとセレン5ng/mlを添加した培養液にグルコース4mMを媒精6日後から添加する発生培養法(SOF-IETS+D6Glu)により、高い胚盤胞発生率と胚活性が得られることが明らかになった。

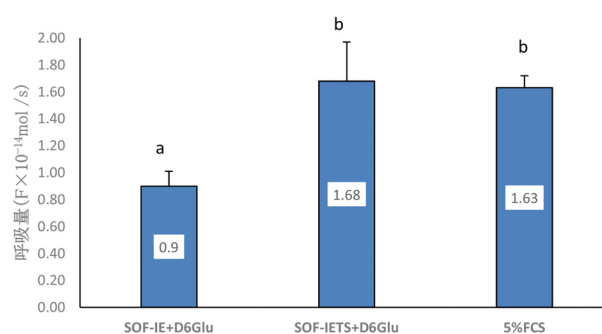


図7 発生培養液(SOF-IE+D6Glu)へのトランスフェリンとセレン添加(SOF-IETS+D6Glu)が胚の呼吸量に及ぼす影響

各試験の平均値±標準誤差を示す(n=13-27), a-b: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

4 新規培養法でOPU由来卵子から得られた胚による子ウシ生産

1~3の結果を基に、OPUにより採取した未成熟卵子を用いて成熟培養初期にU0126 5μMを添加あるいは無添加の培養液で成熟培養し、体外受精後にSOF-IETS+D6Gluで発生培養を実施して胚盤胞発生率を調べた。また、得られたU0126処置群の胚

表3 U0126処置がOPU-IVPにおける胚発生に及ぼす効果

群	試験回数	平均卵子数	平均分割卵子数	平均胚盤胞数	胚盤胞発生率(%)
対照群	8	10.8±3.5	6.9±3.0	2.4±0.9	22.1
U0126群	8	10.9±1.9	7.5±1.6	4.3±0.7 [†]	41.6 [*]

平均値±標準誤差

*：対照群と比較して有意差あり (P<0.05)

†：対照群と比較して傾向あり (P<0.10)

表4 U0126処置群から採取した胚の移植成績

移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	流産頭数	雄子牛			雌子牛		
				頭数	体重(kg)	妊娠期間(日)	頭数	体重(kg)	妊娠期間
8	5	62.5	1 [*]	3	40.5±2.0	287.7±0.3	1	40.9	289.0

*:D62で胎子喪失で流産と判定

盤胞を受胎牛に移植して子ウシの生産を試みた。なお、OPUで採取した卵子を培養する場合、採卵から培養開始まで40分程度の処理時間が必要なことから、U0126の添加は成熟培養時の培養液だけでなく卵子回収液にも添加した。

黒毛和種経産牛を2頭用いた。前処理としてFSH 20AUを皮下投与し、その3日後にOPUを行った。1回のOPU採取時に2頭を対照群と試験群に振り分けた。OPUは4週間以上の間隔で対照群と試験群に用いた牛を反転して8回実施した。U0126処置群と対照群の胚盤胞発生率を調べ、U0126処置群の一部の胚盤胞を採取直後あるいは凍結保存して受胎牛に移植し、子ウシの生産を試みた。その結果、U0126処置群の胚盤胞発生率は対照群と比べて有意に高かった(表3; P<0.05)。また、U0126処置群から得た8個の採取直後の胚と2個の凍結胚を移植したところ、正常な産子がそれぞれ4頭(表4)と1頭得られた⁴⁾。

これらの結果から、OPUで得られたCOCを本研究で改良した成熟培養・発生培養法を用いてOPU-IVPすることで高い胚盤胞発生率が得られ、それらの胚の移植により正常な子ウシが得られることが明らかになった。

5 今後の展望

著者らは、無血清培養液について様々な改良を行ってきたが、結果として血清添加培地に迫る胚盤胞発生率を達成した。加えて脂肪滴染色の結果、この無血清培地を用いることにより胚盤胞における細胞内脂肪滴の数が減少した(未発表データ)ことから、本報告で作出した胚は凍結融解後の生存性が高い可能性が考えられる。今後もデータを蓄積し、さらなる検討を行う予定である。

筆者が勤務する神奈川県内では平成27年度から、「かながわ酪農活性化対策事業」として後継牛確保対策に取り組んでいる。具体的には、モデル農家の乳牛を用いてOPU-IVPを実施し、子牛をより多く生産するとともに、これと子牛生産の繁殖計画作成支援(プランニング)をセットとして後継牛確保対策を行うものである。酪農家の乳牛を対象にOPUを行い、採取したCOCをU0126を用いて輸送することは、これ単独でも高い胚盤胞発生成績を得ている。今後は凍結胚の移植も実施する予定であり、その結果に期待したい。

引用文献

- 1) 坂上信忠. 移植可能胚の生産効率向上を目指したウシ卵子・胚培養法の改良に関する研究. 大阪府立大学 論叢 第246号, <http://doi.org/10.24729/00016866>. 2019.
- 2) Joao HM Viana. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals Divergent trends for IVD and IVP embryos, https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf. IETS Data Retrieval Committee 2021.
- 3) Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Pau JB, Godke LRA. Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in vitro fertilization. *Journal of Animal Science* 1995;73:967-74. <https://doi.org/10.2527/1995.734967x>.
- 4) 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. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80050-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80050-0).
- 5) 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. *Molecular Reproduction and Development* 2002;61:234-48. <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>.
- 6) Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Reproduction* 1999;117:97-105. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170097>.
- 7) Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, et al. Cellular and Molecular Deviations in Bovine In Vitro-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome1. *Biology of Reproduction* 2002;67:767-75. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004481>.
- 8) Kimura K, Spate LD, Green MP, Roberts RM. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development* 2005;72:201-7. <https://doi.org/10.1002/mrd.20342>.
- 9) Camargo LSA, Freitas C, de Sa WF, de Moraes Ferreira A, Serapiao RV, Viana JHM. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of in vitro-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. *Animal Reproduction Science* 2010;120:10-5. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.013>.
- 10) Gershon E, Plaks V, Dekel N. Gap junctions in the ovary: Expression, localization and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2008;282:18-25. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.001>.
- 11) Dieleman SJ, Hendriksen PJM, Viuf D, P.D.Thomsen, Hyttel P, Knijn HM, et al. Effects of on vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 2002;57:5-20.
- 12) Matoba S, O' Hara L, Carter F, Kelly AK, Fair T, Rizos D, et al. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2012;95:1257-66. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4649>.
- 13) 秋山清, 坂上信忠, 中川浩, 瀬田剛史, 河合愛美, 長井誠, et al. 多排卵処理後に採取した卵胞内卵子と性選別精液の体外受精によるウシ性判別胚の生産. *日本畜産学会報* 2016;87:107-13.
- 14) Shinohara T, Ohta Y, Kawate N, Takahashi M, Sakagami N, Inaba T, et al. Treatment with the MAPK kinase inhibitor U0126 during the first two hours of in vitro maturation improves bovine oocyte developmental competence. *Reproduction in Domestic Animals* 2018;53:270-3. <https://doi.org/10.1111/rda.13096>.
- 15) Jin CT, Eun YK, Jeon K, Keum SL, Chang HL, Yeon OK, et al. A MAPK pathway is involved in the control of cortical granule reaction and mitosis during bovine fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 2008;75:1300-6. <https://doi.org/10.1002/mrd.20777>.
- 16) Kalma Y, Granot I, Galiani D, Barash A, Dekel N. Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: Inhibition of translation. *Endocrinology* 2004;145:1617-24. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1051>.
- 17) Prochazka R, Blaha M, Nemcova L. Signaling pathways regulating FSH-and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction* 2012;144:535-46. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0191>.
- 18) Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology* 2006;147:2280-6. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1011>.
- 19) Sela-Abramovich S, Chorev E, Galiani D, Dekel N. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology* 2005;146:1236-44. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1006>.
- 20) Pinyopummintr T, Bavister BD. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of Reproduction* 1991;45:736-42.
- 21) Krisher R, Lane M, Bavister B. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction* 1999;60:1345-52. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1345>.
- 22) Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine aneuploid embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992;37:963-78. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90096-A](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90096-A).
- 23) Lee ES, Fukui Y. Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1995;44:71-83. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00149-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00149-3).

- 24) Yoshioka K, Suzuki C, Iwamura S. Activin A and follistatin regulate developmental competence of In vitro-produced bovine embryos. *Biology of Reproduction* 1998;59:1017-22. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.5.1017>.
- 25) Spanos S, Becker DL, Winston RM, Hardy K. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biology of Reproduction* 2000;63:1413-20.
- 26) Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Rajamahendran R, Suzuki T. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogenology* 2003;59:1393-402. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01163-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01163-9).
- 27) Sirisathien S, Brackett BG. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. *Molecular Reproduction and Development* 2003;65:51-6. <https://doi.org/10.1002/mrd.10263>.
- 28) Sirisathien S, Hernandez-Fonseca.H.J., Brackett BG. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Animal Reproduction Science* 2003;77:21-32. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00272-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00272-5).
- 29) George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology* 2008;69:612-23. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.008>.
- 30) Neira JA, Tainturier D, Peña MA, Martal J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2010;73:595-604. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.015>.
- 31) Sakagami N, Umeki H, Nishino O, Uchiyama H, Ichikawa K, Takeshita K, et al. Normal calves produced after transfer of embryos cultured in a chemically defined medium supplemented with epidermal growth factor and insulin-like growth factor I following ovum pick up and in vitro fertilization in Japanese black cows. *Journal of Reproduction and Development* 2012;58:140-6. <https://doi.org/10.1262/jrd.11-050M>.
- 32) Yoshida Y, Miyamura M, Hamano S, Yoshida M. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. *The Journal of Veterinary Medical Science* 1998;60:549-54.
- 33) Yaseen MA, Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction* 2001;122:601-10. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220601>.
- 34) Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Regulation of Apoptosis in the Bovine Blastocyst by Insulin and the Insulin-Like Growth Factor (IGF) Superfamily. *Growth Factors* 2002;495:489-95. <https://doi.org/10.1002/mrd.10153>.
- 35) Makarevich A, Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biology of Reproduction* 2002;66:386-92.
- 36) Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 2002;57:895-907. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00694-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00694-X).
- 37) Pinto AB, Carayannopoulos MO, Hoehn A, Dowd L, Moley KH. Glucose transporter 8 expression and translocation are critical for murine blastocyst survival. *Biology of Reproduction* 2002;66:1729-33. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1729>.
- 38) Ni H, Sheng X, Cui X, Gu M, Liu Y, Qi X, et al. Epidermal growth factor-mediated mitogen-activated protein Kinase3/1 pathway is conducive to in vitro maturation of sheep oocytes. *PLoS ONE* 2015;10:1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120418>.
- 39) Prella K, Stojkovic M, Boxhammer K, Motlik J, Ewald D, Arnold GJ, et al. Insulin-like growth factor I (IGFI) and long R 3 IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in in vitro produced bovine embryos. *Endocrinology* 2001;142:1309-16.
- 40) Sakagami N, Nishino O, Adachi S, Umeki H, Uchiyama H, Ichikawa K, et al. Improvement of Preimplantation Development of In Vitro-Fertilized Bovine Zygotes by Glucose Supplementation to a Chemically Defined Medium. *Journal of Veterinary Medical Science* 2014;76:1403-5. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0543>.
- 41) Sakagami N, Konda K, Hashimura S, Kawate N, Inaba T, Tamada H. Production of Japanese black calves by the transfer of embryos developed from in vitro-fertilized oocytes derived by ovum pick up and matured in culture with the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126. *Journal of Veterinary Medical Science* 2019;81. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0460>.

プロフィール

広島県呉出身，横須賀市在住。父方の祖父は淡路島で数頭の黒毛和種を飼育していた

1988年 明治大学農学部農学科を卒業し，神奈川県入庁
2002年～2019年まで神奈川県畜産技術センターで豚，牛の繁殖に関する研究を行う。

2016年に岡山大学より豚繁殖技術に関して博士（農学）を，
2019年に大阪府立大学（現大阪公立大学）より牛胚培養技術に関して博士（獣医学）を授与

2019年より神奈川県畜産課勤務

本稿は，2002年～2019年に府県連携共同研究「効率的胚生産技術の開発」により，大分県，山口県，宮崎県，高知県，奈良県，三重県，青森県，宮城県との共同研究の成果を取りまとめ，大阪府立大学で博士論文として取りまとめた内容を一部修正して紹介したものである