Pregnancy by Bovine Blastocysts Developed in Co-Culture with Cumulus/Uterine Endometrial Cells after *in Vitro* Fertilization

Yutaka KAJIHARA, Naoko KOMETANI, Satomi KOBAYASHI, Yuji SHITANAKA²⁾, and Kazufumi GOTO¹⁾

Technical Research Center, Marubeni Shiryō Co., Ltd., Otaru 1292, Shinbe-cho, Ono, Hyogo 675-13

¹⁾Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890

²⁾ITOHAM FOODS INC., Takahata 4-27, Nishinomiya, Hyogo 663

(Accepted for publication February, 1991)

Summary. This study determines the optimum time of transfer for bovine blastocysts derived from *in vitro* matured follicular oocytes fertilized *in vitro*. A slightly modified method of bovine *in vitro* fertilization previously described was used. Frozen-thawed spermatozoa were washed 3 times with modified Brackett and Oliphant medium after thawing, then pre-incubated for 2 to 3 hr before incubation with matured oocytes. Seventy-eight to 83 hr after fertilization, the cumulus cells removed from the oocytes were cultured at the bottom of the culture dish along with those already released. The oocytes were cultured in dishes with cumulus cells (CCL) or with combinations of cumulus cells and monolayer of uterine endometrial cells (CUL) to examine further development. The embryos that developed into blastocysts were transferred to recipients on days 7 to 9 post-fertilization (day of insemination=day 0). One to 3 blastocysts were non-surgically transferred to recipients on days 5.5 to 8.5 of the estrous cycle (estrus=day 0). Ultrasonography was used to diagnose pregnancy around 50 days post-transfer. Developmental rate of embryos to the blastocyst stage was higher ($P<0.01$) in CUL than in CCL culture system (39.4% vs 25.9%). The relative synchrony between day of the estrous cycle of recipients and the age of embryos effected on pregnancy rates. Pregnancy rates were higher ($P<0.01$) in 2 days than in 3 days asynchronous transfer between estrous cycle stages of recipient and embryo ages. To date 29 single births, 10 sets of twins and 2 sets of triplets have resulted from these experiments.

KEY WORDS: *IN VITRO* FERTILIZATION, FOLLICULAR OOCYTES, CO-CULTURE, BLASTOCYST, EMBRYO TRANSFER.

Jpn J Anim Reprod 37, 177-184, 1991

卵丘細胞・子宮内膜上皮細胞との共培養により得られた 体外受精由来胚盤胞期胚の移植成績

梶原 豊・米谷 尚子・小林 里美

下中 裕次²⁾・後藤 和文¹⁾

丸紅飼料株式会社 技術センター 〒675-13 兵庫県小野市新部町小垂1292

¹⁾鹿児島大学農学部 家畜繁殖学教室 〒890 鹿児島市郡元1-21-24

²⁾伊藤ハム株式会社 国内原料部 〒663 兵庫県西宮市高畑町4番27号

わが国の肉牛生産における当面の課題は、コストの低減に伴う経営の安定化であり、経営規模の拡大とともに乳肉複合経営を推進する必要性がある。その一手段として体外受精由来胚（黒毛和種×黒毛和種）を交雑種とし

くはホルスタイン種に移植して生まれ、その子牛を肥育素牛として利用する低コスト和牛生産体制の確立、普及が望まれている。

牛の体外受精における精子の受精能獲得法は雌生殖器官を用いた Iritani と Niwa (1977), 牛卵胞液を用いた Von Bregulla ら (1974), 高張のイオン濃度液を用いた Brackett ら (1982), カルシウムイオノフォア液を用いた Byrd ら (1981) の先駆的研究により進展し, Brackett ら (1982) が体外受精胚の移植による最初の産子を得た。その後 Lambert ら (1986), Sirard と Lambert (1986) は内視鏡を用いて卵巣から成熟卵子を取り出し, 体外受精する方法で子牛の作出に成功した。一方, Hanada ら (1986), Crister ら (1986) (1986年2月に産子を得たと共同実験者の Leibfried-Rutledge が1989年に報告している) は体外成熟卵の体外受精による子牛の作出に成功し, 今日の実用的技術への基盤を成した。

近年, Minato ら (1989) は牛卵胞卵子を体外受精後に偽妊娠ウサギの卵管を用いて培養し, 発育した胚の移植により多数例の受胎, 分娩例を報告した。そのなかで, 体外受精—ウサギ卵管内発育胚では, 移植胚の日齢と受胎牛の性周期日齢との差の許容範囲が大きいことを示している。

ウサギ卵管を用いる培養法は, 一連の操作が複雑なこと, 初期胚の発生機構の解明が困難であることなどから完全体外発育培養系の開発・実用化が望まれてきた。

その後, 卵丘細胞を用いた完全体外培養系により作出された牛胚盤細胞期胚の移植によりあいついで産子を得られた (Goto *et al.*, 1988, 1989; Lu *et al.*, 1988; Eyestone and First 1989; Fukuda *et al.*, 1990; Kajihara *et al.*, 1990)。このことにより, 体外培養由来胚の正常性の一端が証明され, その実用化が試みられつつある。

本研究では, 体外成熟—体外受精後, 卵丘細胞と子宮内膜上皮細胞を用いた完全体外培養系により作出した牛胚盤細胞期胚について, 移植所要時間, 移植に用いた胚日齢, 移植に用いた受胎牛の性周期日齢等が受胎性におよぼす影響について調べた。

材料と方法

卵子：供試卵巣は加古川市食肉センターで採材した。卵巣表面に存在する直径1～7 mmの小卵胞から, 20Gの注射針を付けた注射筒で卵胞液とともに卵胞卵子を吸引採取した。卵胞卵子は, ピペットで時計皿間を移動することにより, 夾雑物と卵胞液を除去した。卵丘細胞が卵子の周囲に1/3以上付着しており細胞質が形態的に均

一で良好な卵子のみを選抜し, 洗浄後, 成熟培養に供した。成熟用培養液および発生用培養液は前報 (Kajihara *et al.*, 1987) に準じた。なお, 成熟培養時間は20～22時間とした。

精子：人工授精用の和牛凍結精液ストローを温水 (32～35℃) 中で解凍し, テオフィリン (Sigma, T-1633) 5 mM, 牛血清アルブミン (Sigma, A-4378) 2.5 mg/ml, ヘパリン (Sigma, H-9133) 10 μ g/ml (Parrish *et al.*, 1986; Niwa and Ohgoda, 1988) を添加した m-B.O. 液 (原法 Brackett and Oliphant, 1975) を加え, 700 g, 5分間の遠心操作を3回繰り返して洗浄した。精子濃度は15 $\times 10^6$ /mlに調整し, 直径35 mmのシャーレに100 μ lの水滴とし, 上面は流動パラフィンで覆って2～3時間の前培養を行った。

体外受精及びその後の胚の発生方法：体外成熟の終わった卵子を m-B.O. 液にて洗浄し, 上記の前培養の終了した精子水滴内に移して体外受精を行った。

授精開始から20～21時間後にサンプリングを行い, 標本を作製した。カルノア液で固定し, オルセイン染色を施した。第一・第二極体, 膨化した一対の雄雌両前核の存在をもって正常受精胚とした (Table 1)。

体外受精開始6～7時間後に子牛血清1%と抗生物質を含む25 mM HEPES 緩衝 TCM-199中に卵子を移した。前報 (Kajihara *et al.*, 1987) に準じた培養系 (CCL区), 及び授精後0, 2, 3日目に子宮内膜上皮細胞に添加した培養系 (以下CU0, CU2, CU3区) により発生培養を行った。授精後78～83時間に卵丘細胞層または卵丘細胞と子宮内膜上皮細胞の混在する層より胚および卵子を遊離させ, 同時に培養液を交換し, さらに2日後にも培養液の交換を行った。授精後2日目及び3日目に8細胞期以降に発育した胚の数, 5日目に桑実胚期以降に発育した胚の数, 7～10日目に胚盤胞期に発育した胚の数を調べた (Table 2)。

新鮮体外受精胚の移植方法：上記の培養系により授精後7～9日目に得られた新鮮胚盤胞期胚を移植または凍結に用いた。

限定した5人の観察者により Standing 発情 (以下S.E.) または発情と報告された延べ134頭の未経産牛 (ホルスタイン種, 交雑種) と1頭の経産牛 (交雑種), 計135頭を受胎牛とした。この135頭のうち延べ6回の移植によっても受胎しなかった2頭, 黄体形成不全, 中～大卵胞共存, 重症の下痢等の理由により移植しなかった延べ13頭についてはデータの解析から除いた。また, 延べ7頭については移植器の頸管通過が不能であり, 移植を

Table 1. *In vitro* maturation and fertilization rates of bovine follicular oocytes

Semen donor	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes matured*	No. (%) of oocytes fertilized*	No. (%) of polyspermy
I	46	44 (95.7)	27 (58.7)	11 (23.9) ^b
K	70	65 (92.9)	46 (65.7)	5 (7.1) ^a
Combined	116	109 (94.0)	73 (62.9)	16 (13.8)

* Follicular oocytes were matured for 20–22 hr and then examined after additional culture with spermatozoa for 20–21 hr.

^{a,b} Means with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$, χ^2 -test).

Table 2. The effects of cell types used for co-culture on *in vitro* development of bovine embryos

Type of cells*	No. (%) of embryos developed to		
	≤ cells	≤ Morulae	≤ Blastocysts
CCL	322/883 (36.4) ^d	247/888 (27.7) ^d	232/888 (25.9) ^b
CU0	84/226 (37.2) ^d	59/226 (26.1) ^d	73/226 (32.3) ^{ab}
CU2	76/137 (55.5) ^c	60/137 (43.8) ^c	54/137 (39.4) ^a
CU3	165/450 (36.7) ^d	117/450 (26.0) ^d	133/450 (29.6) ^{ab}

* CCL=Embryos were cocultured with cumulus cell (CC) layers from day 0 to the end of culture.

CU0=Embryos were cocultured with CC and uterine endometrial cell (UE) layers from day 0 to the end of culture.

CU2=Embryos were cocultured with CC layer from day 0 to day 1 and then cocultured with the combination of CC and UE layers from day 2 to the end of culture.

CU3=Embryos were cocultured with CC layer from day 0 to day 2 and then cocultured with the combination of CC and UE layers from day 3 to the end of culture.

^{a,b} Means with different superscripts in the same column are significantly different (a vs. b: $P < 0.01$, c vs. d: $P < 0.001$, χ^2 -test).

断念した。

0.25 ml 容量のカスー製ストローを用い、1～3個の胚を Suzuki ら (1989) および Yamashina (1990) の報告を参照してなるべく両側子宮角に非外科的移植を施した。移植用液として m-PBS と TCM-199 を等量混合したものに子牛血清を 20% 添加して用いた。移植は 3 名に限定して行った。

受胎の確認方法：胎児日齢約 55 日 (移植日より約 48 日目) に 2 名以上による直腸検査と超音波診断により受胎の有無、胎児数を推定した。

検討項目と検討方法：1：移植器を牛体に挿入した時点から移植完了までの時間が 14 分以内の場合と、15 分～50 分かった場合にわけて受胎率を比較した (Table 3)。

2：授精日を 0 日目として 7.0 から 9.0 日目に得られた胚盤胞期胚を S.E. より 6.0～7.5 日齢の受胎牛に移植し、移植に用いた胚日齢が受胎率に及ぼす影響を検討した (Table 4)。

3：S.E. を確認、もしくは S.E. と推定した日を day 0 として、5.5 から 8.5 日齢にある受胎牛に 7.0 から 8.5 日齢の胚盤胞期胚を移植し、受胎牛の日齢が受胎率に及ぼす影響を検討した (Table 5)。

4：移植に用いた胚日齢と受胎牛の性周期日齢間の差が受胎率におよぼす影響を検討した。日齢差 -2.0 日は、授精後 8.0 日の胚を S.E. 確認から 6.0 日目の受胎牛に移植したことを示す (Table 6)。

統計処理： χ^2 検定により各実験区間の有意差を検定し

Table 3. The effect of the time required for embryo transfer on pregnancy rates

Time (min) Mean±S.D.	No. of recipients	No. pregnant	Pregnancy rate (%)
2 to 14 6.8±3.0	72	41	56.9
15 to 50 21.8±8.3	31	17	54.8

Means were not significantly different with χ^2 -test ($P>0.05$).

Table 4. The effect of the day IVF embryos reached the blastocyst stage on pregnancy rate

Days of embryo*	No of recipients	No. pregnant	Pregnancy rate (%)
7.0	14	7	50.0 ^b
7.5	17	15	88.2 ^a
8.0	26	17	65.4 ^{ab}
8.5	19	13	68.4 ^{ab}
9.0	7	2	28.6 ^{bc}

*Day 0= day of *in vitro* insemination

^{a-c} Means with different superscripts in the same column are significantly different (a vs. b: $P<0.05$, a vs. c: $P<0.01$, χ^2 -test).

た。

結 果

体外受精率：本研究では6頭の種雄牛に由来する凍結精液を用いたが、主として用いた2頭の精液による授精後20～21時間における卵胞卵子の体外成熟率および体外受精率をTable 1に示した。

授精20～21時間後に検査したすべての供試卵子についての正常受精率は、種雄牛Iで58.7% (27/46)、種雄牛Kでは65.7% (46/65)であり、有意な差はみられなかったが、種雄牛Iでは、多精子侵入率が23.9% (11/46)と種雄牛Kの7.1% (5/70)に比べて有意 ($P<0.05$)に高かった。また、I、K兩種雄牛をまとめた受精率は62.9% (73/116)であった。

なお6頭の種雄牛に由来する体外受精胚の非外科的移植によりいずれの個体でも受胎例を得ることができた。

胚の発生成績に及ぼす共培養に用いた細胞の影響：従来から用いてきた培養系 (CCL区)と、授精後0、2、3日目に子宮内膜上皮細胞を添加した培養系 (CU0、

Table 5. The effect of the day of the recipient estrous cycle on pregnancy rate

Day of estrous cycle*	No. of recipients	No. pregnant	Pregnancy rate (%)
5.5	12	4	33.3 ^b
6.0	30	22	73.3 ^a
6.5	33	22	66.7 ^{ac}
7.0-7.5	16	8	50.0 ^{ab}
8.0-8.5	7	2	28.6 ^{bc}

*Day 0= day of standing estrus

The embryos of blastocyst stage were used for transfer.

^{a-c} Means with different superscripts in the same column are significantly different (a vs b or c: $P<0.05$, χ^2 -test).

Table 6. The effect of recipient day of synchrony and age of embryos on pregnancy rate

Days from synchrony	No. of recipients	No. pregnant	Pregnancy rate (%)
-3.0	10	3	30.0 ^b
-2.5	8	5	62.5 ^{ab}
-2.0*	22	18	81.8 ^a
-1.5	17	10	58.8 ^{ab}
-1.0	27	16	59.3 ^{ab}
0 to +1.0	13	6	46.2 ^{ab}

*The recipients were 2 days behind the embryos.

^{a, b} Means with different superscripts in the same column are significantly different ($P<0.01$, χ^2 -test).

CU2, CU3区)による発生成績をTable 2に示した。

8細胞期以上への発育率はCU2区が他の3区に比べて有意 ($P<0.001$)に高かった。

桑実胚期以上への発育率も同様にCU2区が他の3区に比べて有意 ($P<0.001$)に高かった。胚盤胞期以上への発育率はCU2区が他の3区に比べて高く、とくにCCL区に対しては有意 ($P<0.01$)に高かった。

移植所要時間と受胎率：移植に要した時間が受胎率に及ぼす影響をTable 3に示した。14分以内 (平均6.8±3.0分)に移植できた場合の受胎率は、56.9% (41/72)であり、15分～50分 (平均21.8±8.3分)かかった場合の受胎率54.8% (17/31)とはほぼ同様の値であった。黄体は左右別に41頭と62頭となり右にある場合が多かった。

胚日齢と受胎率：移植に用いた胚日齢が受胎率におよぼす影響についてはTable 4に示した。授精後7.0、7.5、8.0、8.5、および9.0日目に得られた胚盤胞期胚を移植した場合の受胎率はそれぞれ50% (7/14)、88.2% (15/17)、

65.4% (17/26), 68.4% (13/19), および28.6% (2/7)であった。受胎率は7.5日目に得られた胚が、7.0日目 ($P < 0.05$) あるいは9.0日目 ($P < 0.01$) に得られた胚よりも有意に高かった。8.0日目および8.5日目に得られた胚の受胎率は、他の区と比べ有意差はなかった。

受胚牛の性周期日齢と受胎率：移植に用いた受胚牛の性周期日齢が受胎率におよぼす影響については Table 5 に示した。S.E. より5.5, 6.0, 6.5, 7.0~7.5および8.0~8.5日目の受胚牛に7.0~8.5日齢の胚盤胞期胚を移植した場合の受胎率はそれぞれ、33% (4/12), 73.3% (22/30), 66.7% (22/33), 50% (8/16), および29% (2/7)であった。受胚牛の日齢が6.0日目であった場合の受胎率は、5.5および8.0~8.5日目であった場合よりも有意に ($P < 0.05$) 高く、6.5日目であった場合の受胎率は、5.5日目の場合よりも有意 ($P < 0.05$) に高かった。また7.0~7.5日目であった場合の受胎率は、他の区に比べ有意差はなかった。

移植胚日齢と受胚牛の性周期日齢との日齢差と受胎率：移植胚の日齢と受胚牛の性周期日齢差が受胎率に及ぼす影響については Table 6 に示した。日齢差が-3.0, -2.5, -2.0, -1.5, -1.0および0~+1.0であった場合の受胎率はそれぞれ30% (3/10), 63% (5/8), 81.8% (18/22), 58.8% (10/17), 59.3% (16/27) および46% (6/13)であった。受胎率は日齢差が-2.0日ずれている場合が-3.0日ずれている場合に比べ有意 ($P < 0.01$) に高かった。-2.5, -1.5, -1.0および0~+1.0日ずれている場合は、他の区に比べ有意差はなかった。

分娩成績：妊娠確認後に妊娠牛の死亡 (1例), および出荷 (1例) があり、56頭の妊娠牛より41の出産例を得た。流産率は26.8% (15/56)であった。子牛の内訳は29頭の単子、10組の双子、2組の三子となり雌雄別にそれぞれ21頭、34頭であった。

考 察

CU0およびCU3区では、授精7~10日目の観察で胚盤胞期胚への発育率が桑実経胚への発育率を上回っていたが、これは桑実期胚への発生に対してCU0およびCU3区は発生培養系として不完全 (時間的に) である可能性を示している。Sugie (1973) は排卵後屠殺までの日数別に採卵部位 (卵管と子宮) を調べた結果、子宮からの胚の採取率は2日目で28.9% (24/83), 3日目で53.1% (111/209), 4日目では74.6% (170/232) であったと報告しており、授精後3日目に半数以上の胚が子宮角先端部に移行していることが示されている。本実験

で胚の体外培養系に子宮内膜上皮細胞を添加した例では、子宮内膜上皮細胞は培養皿底面に約24時間かかって接着し、その後増殖、代謝が開始され、子宮内と同じ様な環境が作り出されていくものと考えられる。これがCU2区において胚の8細胞期への発育と8細胞期を越えての発育に好影響をもたらしたものと考えられる。実際に本培養系に由来する胚の移植に関する予備試験で既に受胎例が得られている (Kajihara *et al.*, 1989)。

本実験で移植に要した時間の長さは受胎率に影響を及ぼさなかった。このことは、頸管への長時間 (50分以内) の刺激は受胎率にさほど影響しないこと、本実験で用いた m-PBS と TCM-199 の等量混合液に子牛血清を20%添加した液は移植用として適切であったことなどを示唆している。

これまでに体外成熟—授精—培養により得られた胚盤胞期胚 (以下 IVMFC 胚), さらにそれらの分割や凍結—融解後の胚の移植による多数の受胎分娩例が報告されている。しかし一方で IVMFC 胚の移植により過大産子の発生 (Miura *et al.*, 1989; Minato *et al.*, 1989), 妊娠期間の延長 (Minato *et al.*, 1989) などが報告されており、これらが体外培養系の不備に起因していることも考えられる。これまでに 1) IVMFC 胚は、過排卵処理に由来する胚に比べて、コレセミド耐性が低く染色体数異常率の高い (Tokumaru *et al.*, 1989) こと, 2) IVMFC 胚の19.3%で、内細胞塊の細胞数が計測できなかったか、認められなかった (Iwasaki *et al.*, 1990) こと, 3) IVMFC 胚の割球数には大きな変異がみられた (Kajihara *et al.*, 1988) こと, さらに4) 牛 IVMFC 胚は生体回収胚に比べて透明体の弾力性が弱く、割球間の結合がゆるい (Goto, 私信) こと等が報告されている。これらの報告は現在の牛体外成熟—体外受精—体外培養系はいまだ胚の正常発生にとって完全なものではないことを示唆している。

本研究において、体外受精後7.5~8.5日目に得られた胚を移植した例では、受胎率は9.0日目に得られた胚よりも高く、Goto ら (1988a, b) の報告と同様な結果であった。また、Kometani ら (1989) が体外受精後、7, 8および9日目に凍結した IVMFC 胚を融解後に培養して得た生存率 (7日目: 76.2%, 8日目: 68.8%, 9日目: 43%) をみても、9日目の胚よりも前2者がすぐれていた。以上の結果より9日目に得られた IVMFC 胚は7~8日目に得られた IVMFC 胚に比べて異なる環境への順応性が低く、移植後の発生率も劣っていると思われる。また、Kajihara ら (1988) は胚盤胞期で17%

(7/41) であった染色体異常率が脱出途中～脱出胚盤胞期では35% (6/17) に上昇したことを報告しており、長期間の培養、もしくは胚盤胞期への発育に長時間を要した胚では染色体、染色体数等に異常をきたした可能性が高い。このことから受精後7、8日目に胚盤胞期胚にまで発育するような培養系を今後開発する必要があると考えられる。

生体からの過排卵一回収胚を用いた Hasler *et al.*, (1987) によれば、供胚牛と受胚牛の発情周期日数の差が ± 1.5 日であれば、受胎率は良好であったと報告している。本研究の IVMFC 胚を用いた例では、 -2.5 日から $+1.0$ 日間のずれの範囲でも受胎率は良好であり、特に -2.0 日ずれている場合にすぐれた結果が得られた。このことは、胚盤腔形成を経て同様に胚盤胞期の形態をしていても IVMFC 胚は、生体からの回収胚に比べて割球数が少なく発育が遅れているので、若いステージの子宮に移植した方が胚の生存率並びに受胎率が高くなることを示唆している。また体外受精胚は生体由来胚と異なり、体内のホルモン支配下におかれていなかったため、比較的移植後の新しい子宮環境に順応する能力、つまり日齢の許容範囲が大きい可能性がある。さらに筆者ら(未発表)はガス分圧等の胚の培養条件が変わると移植に最適の胚と受胚牛の日齢差が変わってくることを経験している。

流産率は26.8%と高かったが、これは受胚牛の多くが一産取肥育のために妊娠確認後も肥育を続けたのが主因と思われ、また複数の胚を移植した (Izaike *et al.*, 1988) こと、さらに完全体外培養系で胚盤胞期にまで発育させた胚を使ったことなど複合的な要因が重なったことに起因していると考えられる。

出産された子牛の性別は雌21頭、雄34頭でやや雄の比率の高い傾向がうかがえた。この種の研究初期には雄産子が生まれる割合が高いことが知られている (Goto *et al.*, 1989; Miura *et al.*, 1989). 前報 (Kajihara *et al.*, 1988) で、本研究とほぼ同様の培養系に由来する胚について染色体数の異常を検討した結果、雌胚で37%、雄胚で14%の割合であった。このことと生産された子牛に占める雄産子の割合が高かったこととは何らかの関係があるかも知れない。

謝 辞

本稿を校閲された京都大学農学部入谷 明教授とルイジアナ州立大学の Dr. R.A. Godke, Dr. E.G. Blakewood に深甚なる謝意を表す。なお本研究の遂行に際して、

協力いただいた菱山和洋氏、小柴雄二氏、本田直樹氏、加古川市食肉センター、兵庫県食肉衛生検査センター、伊藤ハム株式会社、岡山県小林牧場、兵庫県藤原牧場、兵庫県佐用幸友ファーム、岡山県中央牧場、兵庫県村田牧場の関係各位、および家畜受精卵移植技術研究組合に深く感謝する。

文 献

- Brackett BG, Oliphant G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 12: 260-274.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA (1982) Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27: 147-158.
- Byrd W (1981) *In vitro* capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J Exp Zool* 215: 35-46.
- Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WE, Northey DL, First NL (1986) Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 25: 150 (abstr).
- Eyestone WH, First NL (1989) Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert* 83: 753-758.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y (1990) Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 42: 114-119.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K (1988) Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *J Reprod Fert* 83: 753-758.
- Goto K, Kahihara Y, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K (1988) Pregnancy in cattle after transfer of bisected blastocysts obtained from *in-vitro* fertilization of oocytes matured *in-vitro*. *Asian-Aust J Anim Sci* 1: 153-156.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K, Oku T, Fujiyama M, Yoshida Y (1989) Normalities of calves obtained from the transfers of blastocysts produced by totally *in-vitro* technique. *Asian-Aust J Anim Sci* 2: 591-593.
- Hanada A, Suzuki T, Shioya Y (1986) Birth of calves from non-surgical transfer of blastocyst originated from *in vitro* fertilized oocytes matured *in vitro*. 18 *Jpn J Zootech Sci* (in Japanese, abstr).
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH (1987) Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27: 139-168.
- Iritani A, Niwa K (1977) Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fert* 50: 119-121.
- Iwasaki S, Yoshida Y, Watanabe S, Nakahara T (1990)

- Differential nuclear staining and cell count of trophoctoderm and inner cell mass of bovine blastocyst fertilized *in-vitro* by double fluorochrome dye technique. *Jpn J Anim Reprod* 60: 60–65 (in Japanese).
- Izaike Y, Suzuki O, Shimada K, Fujita K, Kosugiyama M (1988) Twin pregnancy diagnosis and early embryonic loss after bilateral egg transfer in beef cattle. *Jpn J Anim Reprod* 34: 236–242.
- Kajihara Y, Goto K, Kosaka S, Nakanishi Y, Ogawa K (1987) In vitro fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 33: 173–180 (in Japanese).
- Kajihara Y, Goto K, Tokumaru M, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K (1988) Number of blastomeres and chromosome abnormalities of bovine blastocysts obtained from *in vitro* matured, fertilized and cultured follicular oocytes. *Jpn J Anim Reprod* 34: 191–198 (in Japanese).
- Kajihara Y, Kometani N, Koyama K, Kobayashi S, Koshiba Y, Hishiyama K (1989) Bovine *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Jpn J Anim Artif Insemin* 134: 8–16 (in Japanese).
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y, Koshiba Y, Hishiyama K, Shiraiwa K, Goto K (1990) Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *Theriogenology* 33: 264 (abstr).
- Kometani N, Kajihara Y, Kobayashi S, Shitanaka Y, Saitou S, Koshiba Y, Hishiyama K, Shiraiwa K (1989) Cryopreservation of bovine embryos fertilized *in vitro* in the medium with glycerol and sucrose. *Jpn Soc Zootech Sci* 115 (in Japanese, abstr).
- Lambert RD, Sirard MA, Bernard C, Beland R, Rioux JE, Leclert P, Menard DP, Bedoya M (1986) In vitro fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* and collected at laparoscopy. *Theriogenology* 25: 117–133.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL (1989) In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31: 61–74.
- Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M, McGovern H (1988) Births of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet Res* 122: 539–540.
- Minato Y (1988) An application of *in vitro* fertilization to beef cattle production from dairy cow. *East Jpn J Anim ET Tech* 5: 11–14 (in Japanese).
- Miura H, Ito K, Suzuki T, Ishii R (1989) Reproductive activity of bull produced from *in vitro* fertilization. *Animal Husbandry* 43: 48–50 (in Japanese).
- Niwa K, Ohgoda O (1988) Synergistic effect of caffeine and heparin on *in-vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30: 733–741.
- Parrish JJ, Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyston WH, First NL (1986) Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591–600.
- Sirard MA, Lambert RD (1986) Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet Rec* 119: 167–169.
- Sugie S (1973) Study of bovine embryo transfer. *Jpn Natl Agric Ins Tec Series* 62, Tokyo pp 1–72 (in Japanese).
- Suzuki T, Ishida T, Sakai Y, Shimohira I (1989) Induction of twinning in dairy heifers by ipsilateral or bilateral transfer of two frozen embryos. *Theriogenology* 31: 261 (abstr).
- Tokumaru M, Goto K, Kajihara Y, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K, Inohae S, Tasaki M, Oota H, Tateyama S, Kawabata T (1989) Methodological investigation on chromosomal preparation of bovine embryos—comparison of *in vivo* developed blastocysts and those obtained in culture after *in vitro* fertilization. *Jpn J Zootech Sci* 60: 761–770 (in Japanese).
- Von Bregulla K, Gerlach U, Hahn R (1974) Experiments on the extra-corporal maturation, fertilization and cultivation with bovine sperm cells. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 81: 465–476.
- Yamashima H (1990) A practical studies for bovine embryo transfer. *Jpn J Anim Reprod* 35: 20–24 (in Japanese).

要 約

体外成熟，体外受精後，卵丘細胞又は卵丘細胞と子宮内膜上皮細胞を用いた体外培養系により作出した胚盤胞期胚について，移植所要時間，移植に用いた受胚牛の性周期日齢が受胎率におよぼす影響，および胚日齢と受胚牛の性周期日齢の日齢差の許容範囲について検討を行った．移植は受精後7～9日目に得られた新鮮胚盤胞期胚を用い，胎児日齢55日前後に直腸検査と超音波診断により受胎の有無を確認した．主なる結果は次のとおりであった．

- 1．卵丘細胞を用いる体外培養系に子宮内膜上皮細胞をさらに組み合わせて添加する場合は，体外受精後2日目に添加するのが有効であった．
- 2．移植に要した時間については，14分以内と15～50分を比べても受胎率に影響は見られなかった．
- 3．移植に用いた胚日齢は受胎率に影響し，受精後7.5日目に得られた胚が，7.0日目，あるいは9.0日目に得られた胚よりも受胎率が有意に高かった．
- 4．移植時の受胚牛の性周期日齢は受胎率に影響し，性周期日齢が6.0日齢であった場合は，5.5あるいは8.0～8.5日齢であった場合よりも受胎率が有意に高く，同様に6.5日齢の方が5.5日齢の場合よりも有意に受胎率が高かった．
- 5．移植胚の日齢と性周期日齢の日齢差は受胎率に影響し，日齢差が－2.0日ずれている方が－3.0日ずれている場合に対して有意に受胎率が高かった．
- 6．体外成熟，体外受精，体外培養胚の移植によって29頭の単子，10組の双子，2組の三子を得た．また生産された子牛の性別は雌21頭，雄34頭の割合であった．