

## PMSG-hCG処理した3及び4か月齢子牛の卵母細胞の 体外受精による胚の発生能及び受胎性

藪上 剛\*・福島護之\*\*・富永敬一郎\*・秦谷 豊\*

### 要 約

4か月齢黒毛和種(以下JBと呼ぶ)6頭, 3か月齢JB4頭及びホルスタイン種(♀)とJB(♂)の交雑種(以下F<sub>1</sub>と呼ぶ)4頭にPMSG2,000IUとhCG1,500IUを投与して卵胞発達を誘起した。開腹手術後, 卵巣から吸引採取した卵母細胞を体外受精(以下IVFと呼ぶ)し, 得られた胚の発生能及び受胎性について検討した。

- 1 1頭あたりの平均回収卵数では, 3か月齢JBがF<sub>1</sub>に比べて有意に多く, 採取時に膨化した卵丘を有する卵母細胞(以下膨化卵子と呼ぶ)の割合では, 4か月齢JBが3か月齢JB及びF<sub>1</sub>に比べて有意に高かった。
- 2 膨化卵子のIVF72時間後の8細胞期への発生率では, 4か月齢JBが3か月齢JBに比べて有意に高かったが, IVF7~8日目の胚盤胞期への発生率は, 4か月齢JB, 3か月齢JB及びF<sub>1</sub>の間に有意差は認められなかった。
- 3 3か月齢JBの膨化卵子を採卵直後に, 未膨化卵子を体外成熟培養24時間後に, IVFした結果, 1頭あたり平均2個の胚盤胞が得られた。
- 4 4か月齢JBから得られた胚盤胞を6頭の受胎牛に移植した結果, 2頭が受胎し正常な雄性子牛を分娩した。

## Developmental Capacity of *in vitro* Fertilized Oocytes from PMSG-hCG Stimulated Calves of 3-4 Months of Age

Tsuyoshi YABUUE, Moriyuki FUKUSHIMA,  
Keiichiro TOMINAGA and Yutaka HATAYA

### Summary

The purpose of this experiment was to evaluate the developmental capacity of *in vitro* fertilized (IVF) oocytes recovered from 6 Japanese Black cattle (JB) of 4 months of age (JB-4M), 4 JB of 3 months of age (JB-3M) and 4 crossbred calves of Holstein (♀) and JB (♂) (F<sub>1</sub>-3M) stimulated with 2,000IU PMSG and 1,500IU hCG.

- (1) The average number of the recovered oocytes from JB-3M was significantly higher than that of F<sub>1</sub>-3M. The incidence of oocytes with an expanded cumulus was highest in JB-4M.
- (2) The ability to develop to the blastocyst stage of the oocytes with an expanded cumulus was not different among JB-4M, JB-3M and F<sub>1</sub>-3M.
- (3) Two blastocysts in each JB-3M calf were produced by IVF. Two of them were derived from oocytes with a compact cumulus. They had been matured for 24 hours *in vitro* before IVF.
- (4) When 6 blastocysts derived from JB-4M were transferred to 6 JB recipients, 2 cows became pregnant and each delivered a normal calf (34.5kg and 34.0kg).

キーワード: 子牛, 卵母細胞, 成熟, 体外受精, 胚盤胞

### 緒 言

肉用牛の改良速度を高めるためには, 世代間隔を短縮することが重要である。胚移植技術を利用して, より早

期にその産子の遺伝的産肉形質の情報が得られれば改良がスピードアップされる。

春期発動前の雌牛から子牛を得るには, 8か月齢<sup>1), 2)</sup> または6か月齢<sup>3)</sup> が下限であると言われている。

最近, 2~6か月齢子牛から卵母細胞を採取し, 体外

1996年8月30日受理

\* 中央農業技術センター \*\* 現北部農業技術センター

受精(以下IVFと呼ぶ)技術により胚盤胞を作出して、胚移植により子牛を生産する試みがなされている。しかし、胚盤胞への発生率が低いため、実用的な技術とはなっていない<sup>2, 15, 21, 23)</sup>。

本研究では、生後3及び4か月齢子牛に卵胞発育誘起処理を行い<sup>1)</sup>、種差、月齢差による採卵成績と、体内で成熟したと思われる膨化した卵丘を有する卵母細胞(以下膨化卵子と呼ぶ)を採卵直後にIVF-体外発生培養(以下IVCと呼ぶ)を行い、胚盤胞への発生能を検討した。同時に、卵丘の未膨化卵母細胞(以下未膨化卵子と呼ぶ)を成熟培養(以下IVMと呼ぶ)し、卵子の成熟段階を検査するとともに、IVM-IVF-IVCで胚盤胞へと発生させることによって、膨化卵子と未膨化卵子の併用による1頭あたりの胚の生産効率の改善を試みた。また、生産された胚盤胞の受胎性についても検討した。

#### 材料及び方法

##### 1 供試牛

4か月齢黒毛和種(以下JB-4Mと呼ぶ)6頭(平均体重±標準偏差, 94.3±10.9kg)、3か月齢JB(以下JB-3Mと呼ぶ)4頭(74.0±12.2kg)及びホルスタイン種(♀)とJB(♂)の交雑種(以下F<sub>1</sub>-3Mと呼ぶ)4頭(72.5±4.4kg)を用いた。

##### 2 卵胞発育誘起処理方法

子牛から卵子を採取するための卵胞発育誘起処理方法を図1に示した。妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)2,000IU(国際単位)を皮下注射し、72時間後にヒト絨毛性腺刺激ホルモン(hCG)1,500IUを筋肉内注射した。

##### 3 採卵方法

採卵はhCG投与22~24時間後に行った。子牛を全身麻酔後、保定台に尾部を高く頭部を低くして仰臥保定し、前乳房の中間点から正中線を前方に切開して、片手で卵巣を切開創まで引き出した。卵巣からの採卵は、あらかじめ10単位/mlのヘパリンを添加した修正リン酸緩衝液を20mlの注射器に約10ml入れ、18Gの針で直径5mm以上

の卵胞を穿刺し、卵胞液と共に卵母細胞を吸引して3~4個の卵胞を吸引後、注射器を交換するという操作を繰り返して行った。

##### 4 膨化卵子のIVF・IVCと発生検査

膨化卵子は採卵当日に福島ら<sup>10)</sup>の方法でIVFを行った。

IVF用の精液処理は、凍結精液を37°Cの温湯で融解し、2.5mg/mlウシ血清アルブミン、2.5mMカフェイン及び10μg/mlヘパリンを加えた修正タイロド液(BO液)で2回精子を洗浄(700g, 5分)した。精子濃度を50万/mlに調整した精子浮遊液で100μlのドロップを作り、流動パラフィンで覆って、38.8°Cのマルチガス培養器(5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)で2時間前培養した。膨化卵子をBO液で洗浄後、前培養した精子懸濁ドロップに約10個導入してマルチガス培養器で5時間IVFを行った。IVF後、精子を除去し、1%非動化子牛血清加修正合成卵管液に卵子を移した。72時間後に1%非動化子牛血清加25mMヘス緩衝TCM-199液(以下M199と呼ぶ)に胚を移し変え、それ以降48時間毎に培地を交換した。

発生率は、IVF72時間後の8細胞期への発生数及びIVF7~8日目の胚盤胞への発生数と供試卵子数との比率で、それぞれ8細胞率及び胚盤胞率として算出した。

##### 5 未膨化卵子のIVMと成熟検査及び体外発生検査

未膨化卵子は、5%子牛血清加M199中で福島ら<sup>9)</sup>の方法で24時間のIVMを行った。

IVM後、卵丘細胞を0.1%ヒアルロニダーゼで除去し、カルノア液で固定後アセトオルセイン染色を行い、位相差顕微鏡で卵子の核相を観察して成熟段階を検査した。また、JB-3Mのうち3頭から得られた未膨化卵子については、IVM後、IVF-IVCを行い、膨化卵子と併せた1頭あたりの胚の発生数を算出した。

##### 6 胚移植

JB-4Mの膨化卵子からIVF-IVCによって得られた胚盤胞6個を、発情終了後8日目のJB受胎牛6頭に新鮮胚移植を行って胚の受胎性を検討した。

#### 結 果

##### 1 採卵成績

回収卵数は、表1に示すように、F<sub>1</sub>-3M、JB-3M及びJB-4Mでそれぞれ、平均13.8個、31.8個及び21.5個となり、F<sub>1</sub>-3Mからの回収卵数がJB-3Mに比べ有意に少なかった(P<0.05)。同じJBでは、3か月齢子牛からの回収卵数が4か月齢に比べやや多かったが、有意差はなかった。回収卵数の個体差は大きかった。

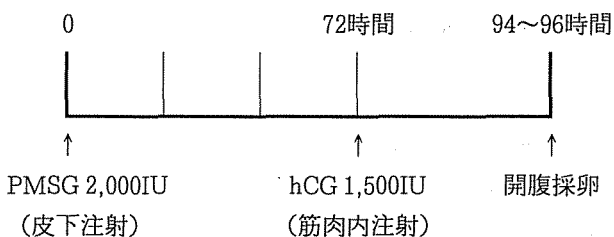


図1 卵胞発育誘起処理方法

表1 採卵成績

月 齢	品 種	頭 数	回収卵数	回収卵数/頭*	膨化卵子数(%)	未膨化卵子数(%)
3	F <sub>1</sub>	4	55	13.8±10.0 <sup>a</sup>	13 (23.6) <sup>a</sup>	18 (32.7)
3	JB	4	127	31.8±8.44 <sup>b</sup>	50 (39.4) <sup>b</sup>	30 (23.6)
4	JB	6	129	21.5±7.39	84 (65.1) <sup>c</sup>	26 (20.2)

\*平均±標準偏差 a, b, c: 異符号間に有意差あり (ab: P<0.05 ac, bc: P<0.01)

表2 膨化卵子の体外受精成績

月 齢	品 種	頭 数	供試卵数	IVF後72時間			IVF後7-8日
				1細胞	2-7細胞	8細胞	胚盤胞
3	F <sub>1</sub>	4	13	6 (46.2)	3 (23.1)	4 (30.8)	0 (0.0)
3	JB	4	50	32 (64.0) <sup>a</sup>	6 (12.0)	12 (24.0) <sup>c</sup>	3 (6.0)
4	JB	6	84	27 (32.1) <sup>b</sup>	22 (26.2)	35 (41.7) <sup>d</sup>	13 (15.5)

注) ( )内は%

a, b, c, d: 異符号間に有意差あり (ab: P<0.01cd: P<0.05)

膨化卵子の回収卵に占める割合は、JB-4 MがF<sub>1</sub>-3 M及びJB-3 Mより有意に高かった (P<0.01)。また、同じ3か月齢ではJBから得られた膨化卵子の割合がF<sub>1</sub>より有意に高かった (P<0.05)。

未膨化卵子の回収卵に占める割合は、F<sub>1</sub>-3 M, JB-3 M及びJB-4 Mの間で有意差はなかった。

回収卵のうち、膨化卵子及び未膨化卵子以外はすべて退行した卵母細胞であった。

## 2 膨化卵子のIVF成績

子牛から得られた膨化卵子のIVF成績を表2に示した。

IVF72時間後の8細胞率はF<sub>1</sub>-3 M, JB-3 M及びJB-4 Mでそれぞれ30.8%, 24.0%及び41.7%となり、JB-4 Mの8細胞率がJB-3 Mに比べて有意に高かった (P<0.05)。また、JB-4 Mの1細胞の割合はJB-3 Mに比べて有意に低かった (P<0.01)。

IVF7~8日目の胚盤胞率はF<sub>1</sub>-3 M, JB-4 M及びJB-4 Mでそれぞれ0%, 6.0%及び15.5%であり、JB-4 Mで高い傾向であったが有意差はなかった。胚盤胞が得られた個体は、F<sub>1</sub>-3 Mで4頭中0頭、JB-3 Mで4頭中3頭、JB-4 Mで6頭中4頭であった。

## 3 未膨化卵子の成熟検査成績

F<sub>1</sub>-3 MとJB-4 Mから得られた未膨化卵子のIVM後の成熟段階を表3に示した。未膨化卵子のうち、24時間のIVMにより第2減数分裂中期 (以下M-IIと呼ぶ) に達した卵子はF<sub>1</sub>-3 MとJB-4 Mで有意差はなかった。

## 4 未膨化卵子のIVF成績

表3 未膨化卵子の体外成熟後の成熟段階

月 齢	品 種	頭 数	供試卵数	各成熟段階にある卵子数		
				GV*	M-I~T-I	M-II
3	F <sub>1</sub>	4	18	3 (16.7)	9 (50.0)	6 (33.3)
4	JB	4	26	8 (30.8)	10 (38.5)	8 (30.8)

注) ( )内は%

\*GV: 卵核胞期 M-I: 第1減数分裂中期

T-I: 第1減数分裂終期 M-II: 第2減数分裂中期

表4 JB-3 Mの未膨化卵子の体外受精成績 (n=3)

供試卵数	IVF後72時間			IVF後7-8日
	1細胞	2-7細胞	8細胞	胚盤胞
30	20(66.7)	4 (13.3)	6 (20.0)	3 (10.0)

注) ( )内は%

表5 JB-3 Mの個別別体外受精成績

個体番号	供試卵数	IVF後72時間			IVF後7-8日
		1細胞	2-7細胞	8細胞	胚盤胞
A	21	8 (38.1)	5 (23.8)	8 (38.1)	3 (14.3)
B	13	5 (38.5)	3 (23.1)	5 (38.5)	1 (7.7)
C	20	13 (65.0)	2 (10.0)	5 (25.0)	2 (10.0)
計	54	26 (48.1)	10 (18.5)	18 (33.3)	6 (11.1)

注) ( )内は%

JB-3 Mのうち3頭から得られた未膨化卵子のIVF成績を表4に示した。IVF72時間後の8細胞率は20.0%, IVF7~8日目の胚盤胞率は10.0%であり、表2に示した同じJB-3 Mの膨化卵子の8細胞率、胚盤胞率と変わらなかった。また、JB-3 Mの膨化卵子と未膨化卵子をあわせた個別IVF成績を表5に示した。8細胞率、胚盤胞率はそれぞれ33.3%, 11.1%であり、1頭あたり平均2個の胚盤胞の生産となり、JB-4 Mの膨化卵子を用いた成績と変わらなかった。

## 5 移植成績

JB-4Mの膨化卵子より得られた胚盤胞6個を6頭のJB受胎牛に移植した結果、同じ供卵牛に由来する胚盤胞を移植した2頭が受胎(受胎率33.3%)し、雄子牛を分娩した。妊娠期間はそれぞれ282日および296日であり、子牛の生時体重は34.5kgおよび34.0kgであった。

### 考 察

子牛1頭あたりの平均回収卵数は、体重による差が見られなかったにもかかわらず、F<sub>1</sub>-3MがJB-3Mに比べて有意に少なかった。梶原ら<sup>14)</sup>は、2~6か月齢の子牛を用いた実験で、F<sub>1</sub>の平均回収卵数がホルスタイン種に比べて有意に少ないことを報告し、この理由として人工哺乳の歴史が長いホルスタイン種は種としての選抜強度が強く、ホルモン処理というストレスに対して、F<sub>1</sub>に比べて強いのではないかと推論している。しかし、本試験では、母牛からまだ離乳していないJBと人工哺乳しているF<sub>1</sub>の結果であるため、あてはまらなると考えられ、F<sub>1</sub>がJBに比べ採卵成績が低かった原因は明らかでなかった。

子牛から得られた卵母細胞のうち、膨化卵子の割合はJB-4MがJB-3Mに比べて有意に高かった。生体内において、卵胞刺激ホルモン(FSH)の作用により、黄体形成ホルモン(LH)の受容体が増加する。FSHは卵丘細胞に作用してグリコサミノグリカンの分泌を促進し、卵丘が膨化する<sup>6)</sup>ことが知られている。ホルモンが高濃度で血中に存在しても受容体がなければその作用は発揮されない。このことから、同じJBでも、4か月齢子牛の卵丘細胞のFSH受容体は3か月齢子牛のものより多数あったため、膨化卵子の割合は4か月齢子牛において多かったと推察される。同様に、同じ3か月齢であっても、JBの膨化卵子の割合がF<sub>1</sub>に比べて高かったのは、JBの方がF<sub>1</sub>に比べてFSH受容体が多かったためと考えられる。

福島ら<sup>11)</sup>は膨化卵子はM-II期に達していることを確認しており、Bordignonら<sup>4)</sup>も若雌牛から経膈採卵によって得られた卵子で卵丘が膨化したものは、IVMを行わないですぐにIVFを行った方が胚盤胞率が有意に高かったとしている。本試験の子牛においても、卵丘が膨化し粘濁性のある卵母細胞は、体内で既に減数分裂を再開<sup>1)</sup>しているものと考えられる。

体内においては、卵丘の膨化により卵胞液中の卵母細胞成熟抑制因子の作用経路が断たれて卵母細胞の減数分裂が再開され、成熟が始まるとの考えがある<sup>22)</sup>。子牛の体内でPMSGによる感作を受けなかったと考えられる

未膨化卵子のIVM後の核相を調べたところ、M-IIの割合はF<sub>1</sub>-3MとJB-4Mで差がなかった。これは、F<sub>1</sub>-3MとJB-4MのPMSGによる体内での卵丘の膨化率から推測される卵母細胞の成熟における差を考えると、未膨化卵子ではホルモン受容体の不足にもかかわらず、IVMにより核は減数分裂を開始したことを示唆している。また、JB-3Mから得られた未膨化卵子のIVM-IVF-IVCによって1頭あたり1個の胚盤胞が得られ、同一個体の膨化卵子を用いたIVF-IVCによる胚盤胞を併せると、1頭あたり2個の胚盤胞の生産となり、JB-4Mの膨化卵子を用いた成績と変わらないものとなった。これは、JB-3Mにおいても、膨化卵子ではJB-4Mに比べて8細胞率が低かったにもかかわらず、FSH受容体がなくPMSGの感作を受けなかった卵母細胞がIVMによって体外で成熟し、IVFにより発生能を獲得できたことを示している。IVMにおいて子牛の卵母細胞がその成熟抑制を解除されたか、あるいはM199と子牛血清の中の何らかの因子が影響したために成熟できたと考えられる。このことにより、卵胞発育誘起処理したJB子牛における卵丘のホルモン受容体は3か月齢と4か月齢で差があるものの、採取された卵母細胞の卵丘の膨化、未膨化の状態によってIVFの時期をずらすことによって、より多くの胚盤胞が得られることが明らかとなった。Armstrongら<sup>2, 3)</sup>は、膨化卵子と未膨化卵子とのIVFによる胚盤胞率は、採卵後すぐにIVFした膨化卵子とIVM-IVFした未膨化卵子とで変わらない成績を示しており、ホルモン処理方法に違いはあるものの本試験結果と一致する。

しかし、本試験の卵母細胞の胚盤胞への発生率は従来の当所<sup>10)</sup>の成牛由来のものに比べて低い結果であった。Revelら<sup>21)</sup>は、と殺した3~4か月齢子牛と成牛から得た卵母細胞をIVM-IVF-IVCを行った結果、受精率および分割率に差はないものの胚盤胞率に有意差(9%vs 21%)を認めている。これは子牛における性腺刺激ホルモンの受容体の数が不十分であり、卵胞が形成される時にmRNAの質的変異が増加し、卵母細胞が胚盤胞へ発生するための何らかの不足要因が存在しているためではないかと推察しており、Palmaら<sup>18)</sup>、Tornerら<sup>24)</sup>も同様の結果を得ている。本試験においても子牛の卵母細胞では、生体内及び生体外において、成熟に関わる何らかの不足要因が存在したために、M-II率及び胚盤胞率が低かったものと考えられる。

Damianiら<sup>5)</sup>は、子牛の卵母細胞は成牛のものに比べて、細胞内Ca<sup>2+</sup>の調節因子と考えられているイノシトール3リン酸の感受性が低いとしている。さらに、Dubyら<sup>7, 8)</sup>は、子牛から得た卵母細胞のIVFでは、多

精子受精ばかりでなく、染色質の凝集した異常受精も多いことを確認しており、細胞内での表層顆粒の移動が遅れており、175日齢以下の子牛では、卵細胞質の成熟が不完全ではないかと推察している。本試験の胚盤胞率の低さの原因にも細胞質の成熟が遅れていることが関与している可能性がある。

本試験の子牛の卵胞発育誘起処理には、PMSG2,000 IU、72時間後にhCG1,500IUを投与して22～24時間後に採卵する方法を用いた。当研究室<sup>1)</sup>は、これまで2か月齢と4か月齢のホルスタイン種子牛に、FSH (15, 30 AU) または PMSG (1,000, 2,000, 3,000IU) を投与し、3日目にhCG1,500IUを投与した場合、M-IIの卵子がPMSG2,000IU区において有意に多いことを報告している。

本試験の方法はFSH作用をもつPMSGで卵胞の発育を誘起し、LH作用のあるhCGを組み合わせることによって、より多くの膨化卵子を採取することを目的としたものであった。しかし、卵母細胞の成熟は卵丘細胞、核および細胞質の成熟が完了して初めて完全と言える。PMSGとhCGにより体内で卵丘細胞と卵母細胞の核の成熟を同調させることで胚盤胞への発生能を改善しようとしたが、未膨化卵子では細胞質の成熟が不完全であったのではないかと考えられた。しかし、JB-3Mの体内で、FSHの受容体がなかったと考えられる未膨化卵子からもIVM-IVF-IVCにより胚盤胞が得られたことから、細胞質の成熟がIVMで補なわれた可能性がある。

子牛から成牛と同様な発生率で胚盤胞を得ている報告もある<sup>13, 16, 19)</sup>が、今後、3及び4か月齢子牛における卵母細胞の核の成熟だけでなく、体内及び体外でのホルモン処理方法を含めた卵丘および卵母細胞の細胞質の成熟条件について検討する必要があると考えられる。

本試験で採卵したJB子牛はその後正常な春期発動を示し、人工授精により受胎・分娩している<sup>12)</sup>ことから、卵母細胞を採取するために子牛に開腹手術を行っても、その後の繁殖性に影響しないことが確認されている。

子牛から得た卵母細胞を利用して、1991年にKajiharaら<sup>15)</sup>、1992年にArmstrongら<sup>2)</sup>、1995年にRevelら<sup>21)</sup>が子牛を各1頭ずつ生産しているが、本試験のように1頭の子牛から複数の子牛を生産した報告はない。このことから、より早期に、より正確な遺伝的産肉情報が得られることが実証され、本試験の技術は、肉用牛の遺伝的改良量の促進に応用できる可能性が示唆された。

## 引用文献

- (1) Armstrong, D.T., P.Holm, B.Irvine, B.A.Petersen, R.B.Stubbings, D.McLean, G.F.Stevens and R.F.Seamark (1991) : Laparoscopic aspiration and in vitro maturation of oocytes from calves : *Theriogenology* 35, 182
- (2) Armstrong, D.T., P.Holm, B.A.Petersen, R.B.Stubbings, D.McLean, G.Stevens and R.F.Seamark (1992) : Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration : *Theriogenology* 38, 667-678
- (3) Armstrong, D.T., B.J.Irvine, C.R.Earl, D.McLean and R.F.Seamark (1994) : Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes : *Theriogenology* 42, 1227-1236
- (4) Bordignon, V., N.Morin, J.Durocher, D.Bousquet and L.C.Smith (1996) : Effect of GnRH injection on recovery rate, meiotic synchronization and developmental competence of oocytes aspirated from superstimulated heifers : *Theriogenology* 45, 352
- (5) Damiani, P., R.A.Fissore, J.B.Cibelli, J.M.Robl and R.T.Duby (1995) : Evaluation of cytoplasmic maturation of calf oocytes : *Theriogenology* 43, 191
- (6) Dekel, N., T.Hillensj and P.F.Kraicer (1979) : Maturation effects of gonadotropins on the cumulus oocytes complex of the rat : *Biol.Reprod.* 20, 191-197
- (7) Duby, R.T., P.Damiani, C.R.Looney, C.R.Long, J.J.Balise and J.M.Robl (1995) : Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes : *Theriogenology* 43, 202
- (8) Duby, R.T., P.Damiani, C.R.Looney, R.A.Fissore and J.M.Robl (1996) : Prepuberal calves as oocytes donors : Promises and problems : *Theriogenology* 45, 121-130
- (9) 福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊 (1990) : 牛卵母細胞成熟培養時の酸素濃度が成熟率及びその後の体外受精率に及ぼす影響 : 兵庫中農技研報 (畜産) 26, 1-4
- (10) 福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊 (1994) : ウシ体外受精における個別別胚生産 : 兵庫中農技研報 (畜産) 30, 33-38

- (11) 福島護之・富永敬一郎・岩本英治・壽円正克・秦谷豊(1995): 2又は4か月齢雌子牛から過剰排卵処理後回収された卵子の成熟段階と体外受精後の胚発生能: 第90回日本畜産学会大会講演要旨, 114
- (12) 秦谷 豊・福島護之・富永敬一郎・藪上 剛(1995): 生後4か月齢の和牛からの胚盤胞作出と移植による子牛生産及び採卵牛のその後の繁殖性: 第6回西日本胚移植研究会講演要旨, 24
- (13) Irvine, B., D.T.Armstrong, C.Earl, D.McLean and R.F.Seamark (1993): Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration: *Theriogenology* 39, 237
- (14) 梶原 豊・米谷尚子・下中裕次・斉藤 聡・小柴雄二・菱山和洋(1990): 子牛から得た卵胞卵子の体外受精について: 食肉に関する助成研究調査成果報告書 8, 13-18
- (15) Kajihara, Y., E.G.Blakewood, M.W.Myers, N.Kometani, K.Goto and R.K.Godke (1991): In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves: *Theriogenology* 35, 220
- (16) Lazzari, G., R.Duchi, R.Landriscina, N.Colombo and C.Galli (1996): Developmental capacity of IVM-IVF calf oocytes from eCG stimulated donors of 2-3 months of age: *J.Reprod.Fertil.Abs.* 17, 17
- (17) Looney, C.R., P.Damiani, B.R.Lindsey, C.R.Looney, C.L.Gonseth, D.L.Johnson and R.T.Duby (1995): Use of prepuberal heifers as oocyte donors for IVF: effect of age and gonadotrophin treatment: *Theriogenology* 43, 269
- (18) Palma, G.A., A.Clement-Sengewald and H.Kreff (1993): In vitro production of cattle embryos from calf oocytes: *Theriogenology* 39, 278
- (19) Palma, G.A. (1994): Effects of FSH and estradiol-17 $\beta$  for maturation of calf oocytes on the in vitro development to blastocysts: *Theriogenology* 41, 267
- (20) Presicce, G.A., S.Jiang, M.Simkin and X.Yang (1995): Oocyte quality and embryo development in prepubertal calves: *Biol.Reprod.* 52, Supplement 1, 283
- (21) Revel, F., P.Mermillod, N.Peynot, J.P.Renard and Y.Heyman (1995): Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows: *J. Reprod. Fertil.* 103, 115-120
- (22) Sato, E. and S.S.Koide (1987): Biochemical transmitters regulating the arrest and resumption of meiosis in oocytes: *Int. Rev. Cytol.* 106, 1-33
- (23) 塩谷康生・細江実佐・川田隆作・川邊亮次・岩本多恵子・加世木蔵人(1995): 2か月齢の子牛卵巣を用いた体外受精による胚生産: 25回世界獣医師大会講演要旨, 169
- (24) Torner, H., Hannelore Alm and I.Goristanov (1992): IVM/IVF of calf oocytes: 12th Int. Congr. Anim.Reprod. 1, 381-383