

ウシ体外受精胚由来栄養膜小胞と胚との共移植が 受胎率に及ぼす影響

下司 雅也 （（独）農研機構畜産草地研究所）

橋谷田 豊 （（独）農研機構畜産草地研究所・現（独）家畜改良センター）

小川 増弘 （（財）日本農業研究所）

目 次

1. はじめに
2. 体外受精胚由来栄養膜小胞と胚との共移植が受胎率に及ぼす影響の解明
 - 1) 研究の目的
 - 2) 研究の方法
 - (1) 供試牛
 - (2) 栄養膜小胞の作出
 - (3) 共移植試験
 - 3) 研究の結果と考察
3. ETによる繁殖牛群の系統交代促進
4. おわりに

1. はじめに

牛は単胎動物で妊娠期間も約285日前後に及ぶため、通常は一年に一頭しか子牛を産めない。そのため、遺伝的に優れた能力を持った雌牛であっても一生涯に生産することができる子牛の数は、一般の牛と変わらない。しかし優秀な資質を持った種雄牛と雌牛から胚を生産して数頭の雌牛に移植すれば、優れた資質を受け継いだ子牛を多数得ることが可能となる。これが胚（受精卵）移植（ET）技術であり、高品質な畜産物を生産するために利用されている。具体的には、1）優秀な雌牛（供胚牛）に多数の卵子を排卵させ、2）優秀な雄牛の精液を交配（人工授精）後に、3）胚を体外に取り出し（採胚）、4）他の雌牛（受

胚牛) に移植し、5) 優秀な雌牛と雄牛の資質を受け継いだ子牛を多数出産させる、という一連の技術である。ET技術は、1) 家畜の改良、2) 特定品種の増産、3) 多胎生産、4) 特定性別の増産、4) 新規家畜の導入、6) 希少品種や特定系統の保存、7) 防疫対策等に利用されている。

以上のように、牛ET技術は、酪農・肉牛繁殖農家にとって人工授精と共に重要な繁殖技術の1つであり、優良牛の胚を移植することによって効率的な家畜生産・改良を可能とする。従って、借り腹としたホルスタイン種に黒毛和種の胚を移植して、黒毛和種産子を生産するなど需要の高い肉用牛の増殖にも適している。ETの受胎率は、体内から採取した胚の新鮮1個胚移植が全国平均で51%、凍結1個胚移植が46%、体外受精胚の新鮮1個胚移植が42%、凍結1個胚移植が38%であり (H20年度：農林水産省)、農林水産省の掲げる受胎率「ETチャレンジ50 (体内由来胚での受胎率50%以上)、IVFチャレンジ40 (体外受精胚での受胎率40%以上)」の目標値と比較し、未だ凍結胚の受胎率は低い。また、体外受精胚で細胞の一部を採取して性判別した胚について、新鮮胚、ガラス化保存胚および凍結胚のETによる受胎率の比較を行った結果、50%、44%および23%と報告されており (Agcaら 1998)、体外操作を受けた胚の耐凍性は低く、受胎率が低下することは明らかである。我が国の胚移植に使用される胚の約8割は凍結胚であり、凍結胚・性判別胚等の操作胚の受胎率向上が課題となっている。

牛では、受精後20日目頃から胎盤形成が始まり、30～35日目が着床時期となる。ただし、受精後16～17日目に胚が子宮内に存在していなければ妊娠は成立せず、黄体は退行し、発情が回帰することから、この時期は妊娠認識期間と呼ばれる。受精後に卵割を繰り返しながら子宮内に進入した胚は、将来胎子になり得る内部細胞塊と胎盤を形成する栄養膜細胞の2種類の細胞群に分化した胚盤胞期に達する。胚の栄養膜細胞からは、妊娠認識物質であるインターフェロンタウ (IFN τ) が産生され、これにより母体が胚の存在を認識して着床に適した子宮内環境を整えるしくみになっている (Imakawa ら 1987; Stewart ら 1987)。妊娠せずに発情周期が再び繰り返される場合、発情後17～18日目頃から黄体は退行を始める。すなわち、黄体から産生されるオキシトシンにより子宮からのプロスタグランジンF $_2$ α (PGF $_2$ α) 産生が促され、黄体が退行する。

しかし、妊娠認識時期においてIFN τ が子宮内に存在すると、IFN τ は子宮内膜に存在するオキシトシンレセプターの発現を抑制し、黄体退行阻害因子として働く (Flint ら 1992 ; Spencer ら 1995 ; Robinson ら 1999) (図1)。

これまでの研究から、2個胚移植における受胎率は1個胚や2分割胚より明らかに高い。これはIFN τ の分泌動態が妊娠成立に重要であり、胚・子宮・卵巣間のクロストークが移植された胚の細胞数や質に関係することを示す。すなわち、妊娠認識時期に、凍結胚や体外受精胚のように体外操作でストレスを受けた胚、あるいは、性判別胚のように栄養膜細胞の一部をバイオプシーされた胚は、IFN τ を母親が認識できるほど十分に産生できず、着床に適した子宮内環境が整わないために受胎率が低く、または早期胚死滅に陥りやすいのではないかと推測されている。

そこで、本研究では、(財)日本農業研究所実験農場における黒毛和種牛群の改良を行うとともに、ETにおける受胎率向上・早期胚死滅率減少を目的として、凍結・融解胚移植時における体外受精胚由来栄養膜小胞の共移植によるIFN τ の補強が受胎率に及ぼす影響について検討した。

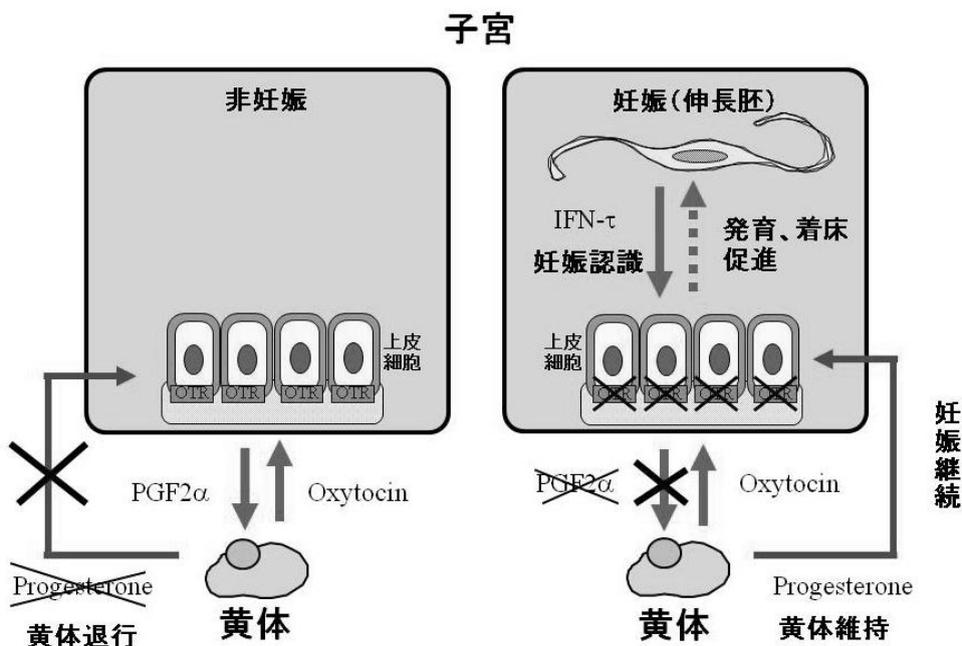


図1 反芻家畜における妊娠認識機構

2. 体外受精胚由来栄養膜小胞と胚との共移植が受胎率に及ぼす影響の解明

1) 研究の目的

ET技術は、牛の改良増殖の有効な手段として成果を上げてきており、性判別胚などの体外操作胚の利用も増加しているものの、受胎率の低さが問題となっている。受胎すなわち妊娠維持には黄体の存続が必須であり、妊娠初期の牛では胚の栄養膜細胞から分泌されるインターフェロントウ(IFN τ)を母体が認識して黄体が存続、妊娠が成立すると考えられている。ETにおける早期胚死滅の要因のひとつとして、胚からのIFN τ 分泌量の不足が想定されおり、妊娠認識時期にIFN τ を補充することで黄体機能が維持され、妊娠の継続が期待できる。これまでに、IFN τ の補強目的で、IFN τ 産生能を有する生体から回収した伸長胚を細切して作出した栄養膜小胞と体外操作胚等との共移植が試みられ、受胎率が向上したと報告されている(Heymanら 1987;Hashiyadaら 2005)。また、我々は、体外成熟・受精・培養によって作出した拡張胚盤胞期胚から作成した栄養膜小胞を子宮内に投与することにより、約半数の個体で発情周期が延長したことを報告している(Nagaiら 2009)。そこで、大量生産が可能な体外受精系で作出した胚に由来する栄養膜小胞と凍結・融解胚との共移植が受胎率に及ぼす影響を明らかにすることを目的に本研究を行った。

2) 研究の方法

(1) 供試牛

(財)日本農業研究所実験農場(以下、実験農場)において、家畜福祉に配慮して飼養されている黒毛和種繁殖雌牛9頭(のべ17回移植)を供試した。供試牛は、分娩後、概ね正常な発情周期を反復し、臨床的に繁殖機能に問題のない健康牛であった。一般的な飼養管理は以下のとおりである。繁殖牛は群管理とし、年間を通してみると放牧期と舎飼期に分けられる。放牧期は、4～10月の期間で昼間は放牧し、夕方～翌朝は舎飼とした。舎飼期は上記を除いた期間で、終日舎飼とし、農場で生産されたイタリアンライグラスおよびオーチャードグラスのロールベールサイレージ(水分35%、乾物中の粗蛋白質およびTDN含量はそれぞれ約10%および約57%)を給与した。放牧期であっても、放牧地

の草量が不足していると判断された場合は、ロールベールサイレージを補足的に給与した。一方、分娩前後の飼養管理は以下のとおり行った。妊娠牛は、分娩予定日の10日前から分娩房で単独飼養し、配合飼料2kgとロールベールサイレージを適量給与した。分娩後は、1ないし2週間で母牛と子牛を分離し、母牛は牛群に戻した。

凍結・融解胚と栄養膜小胞との共移植は、平成19年10月～平成20年3月と平成20年10月～平成21年2月にかけて実施した。また、この報告における動物実験は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所動物実験実施に関する要領に基づいて実施した。

(2) 栄養膜小胞の作出

体外受精胚由来栄養膜小胞の作出は、既報 (Nagaiら 2009) の方法に基づいて行った。すなわち、食肉処理場より採取した卵巣をリン酸緩衝液 (PBS(-)) 中に入れて搬送し、研究所到着後にPBS(-)で洗浄後に15℃の恒温器中で一晩保存した。BSE検査によって陰性が確認された後、18Gの注射針をつけた10-mlシリンジを用いて直径3～7mmの小卵胞から卵丘細胞卵子複合体 (COC) を吸引・採取し、実体顕微鏡下で、卵丘細胞層が3層以上密着し、細胞膜がはっきりとしたCOCを選別した。成熟培地は0.02AU/ml FSH (アントリン)、0.055mg/ml ピルビン酸ナトリウム、10%ウシ胎子血清 (FCS : CANSERA INTERNATIONAL INC., CANADA) 添加TCM199 (FCS-199) とし、選別されたCOCをFCS-199で洗浄後、100 μ lのドロップ内に約20個ずつ入れ、38.5℃、5% CO₂ in airで21～24時間成熟培養を行った。1頭の黒毛和種雄牛の凍結精液を37℃の温湯で融解後、10mMカフェイン添加Bracket and Oliphant`s液 (caffein-B0) を用いて、遠心分離 (600 \times g, 5min, 室温) により洗浄した。caffein-B0を用いて精子濃度が10.0 \times 10⁶/mlになるよう調整したのち、20mg/ml BSA添加B0 (BSA-B0) で等量希釈し、最終的な精子濃度を5.0 \times 10⁶/mlとして媒精用ドロップを作製した。成熟培養後のCOCを100 μ lの媒精用ドロップに約20個ずつ移し、38.5℃、5% CO₂ in air で6時間媒精を行った。媒精終了後、ピペッティングにより卵子を裸化し、0.3% BSA添加Charles Ronsenkrans medium (BSA-CR1aa, Rosenkransら 1993) に移し、38.5℃、5% CO₂、5% O₂、90% N₂、の気相下で培養した。

媒精日をDay 0 として、Day 5 に0.3% BSA添加TCM199に胚を移し替え、培養を継続した (図2)。

Day 7 の夕方に、内部細胞塊の明瞭な拡張胚盤胞期胚を選別し、栄養膜小胞の作出に用いた。バイオプシー緩衝液のドロップ内に内部細胞塊が側面に位置するように透明帯をシャーレ底面に接着させ、金属メス (FUTABA No. 14) を用いて実体顕微鏡下で胚から内部細胞塊を切除した。栄養膜細胞のみを38.5℃、5% CO₂、5% O₂、90% N₂の環境下で0.1mMシステアミン、20% FCS添加TCM199を用いて培養した。培養24時間以内に小胞を形成したものを生存と判断し、移植試験に用いた (図3)。

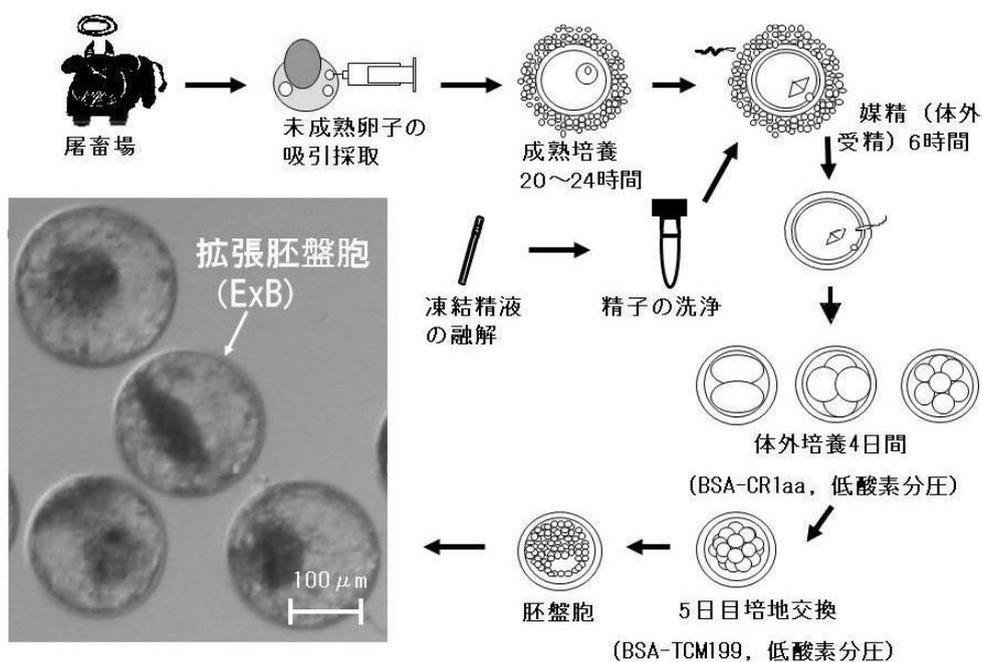


図2 体外受精の概要

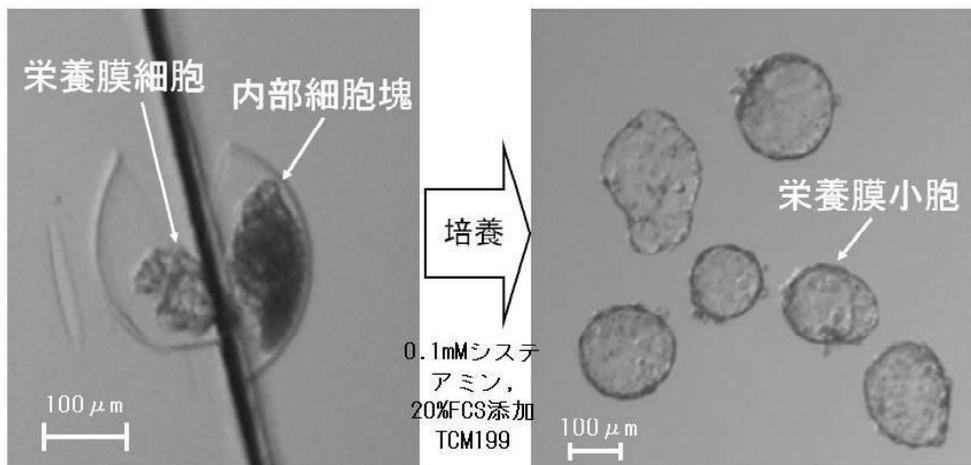


図3 栄養膜小胞の作出

(3) 共移植試験

自然発情あるいはプロスタグランジンF2 α 製剤（エストラメイト）を用いて誘起した発情を確認し、発情周期の7あるいは8日目（発情日＝0日）に機能的な黄体を持つ黒毛和種雌牛のべ17頭に対して、ダイレクト法で凍結された黒毛和種胚1個を庭先融解し、カスー式胚移植器を用いて、単独で黄体側子宮角内に（10頭：対照区）、あるいは胚の移植後に栄養膜小胞5個を同側の子宮角内に同様の操作で投与（7頭：共移植区）し、栄養膜小胞の共移植の有無が受胎率に及ぼす影響を検討した。妊娠診断は、超音波画像診断装置を用いて、発情から30日目以降に実施した。

3) 研究の結果と考察

凍結・融解胚を単独で、あるいは栄養膜小胞とともに移植したところ、超音波画像診断装置を用いた1回目の妊娠診断（発情後30～46日）においては、対照区の10頭中6頭（60%）、栄養膜小胞との共移植区の7頭中3頭（42.9%）が受胎していたが、対照区の2頭が流産し、発情後38日目と52日目に発情が回帰した（表1）。その後は、対照区の10頭中4頭（40%）、共移植区の7頭中3頭（42.9%）が妊娠を継続し、正常な産子（生時体重：対照区：26.5～37.6kg、共移植区：30.5～36.4kg）を分娩した（表2）。在胎日数は、対照区284～300日、共移植区285～294日で正常範囲であった（表2）。

表 1 胚と栄養膜小胞との共移植が受胎性に及ぼす影響

| | 移植頭数 | 受胎頭数 (妊鑑 1 回目) | 流産頭数 (発情回帰日) | 受胎頭数 (Day80以降) |
|------|------|-------------------|-----------------|-------------------|
| 対照区 | 10 | 6 | 2 (D38&56) | 4 |
| 共移植区 | 7 | 3 | 0 | 3 |

表 2 胚と栄養膜小胞との共移植が在胎日数および生時体重に及ぼす影響

| | 移植頭数 | 分娩頭数 | 在胎日数(日) | 性別 | 生時体重(kg) |
|------|------|------|---------|----|----------|
| 対照区 | 10 | 4 | 292 | 雌 | 37.5 |
| | | | 284 | 雌 | 30.0 |
| | | | 300 | 雄 | 26.5 |
| | | | 288 | 雄 | 37.6 |
| 共移植区 | 7 | 3 | 294 | 雄 | 34.0 |
| | | | 292 | 雌 | 30.5 |
| | | | 285 | 雌 | 36.4 |

胚移植における早期胚死滅の要因のひとつとして胚からのIFN τ 分泌量不足が想定されており、妊娠初期にIFN τ を補充することで黄体機能が維持され、妊娠の継続が期待できる。そのため、受胎性の低い凍結・融解胚や切断2分離胚に対して、IFN τ を産生する栄養膜小胞を子宮内に共移植することにより、受胎率が向上したとする報告がある (Heymanら 1987 ; Hashiyadaら 2005)。しかしながら、Day 7に拡張胚盤胞期に達した胚から作出した栄養膜小胞との共移植が胚の受胎性に及ぼす影響について検討した報告はこれまでなかった。我々は、今回と同様の方法で作成した栄養膜小胞の発情周期7日目の黄体側子宮内投与により、投与牛の約半数で発情周期が延長することをすでに報告しており (Nagaiら 2009)、これら栄養膜小胞が投与後に子宮内でIFN τ を産生する能力があると推察されたことから、本共移植試験を実施した。しかしながら、今回の試験においては、体外受精胚由来栄養膜小胞との共移植の有無による凍結・融解胚移植における最終的な受胎成績・分娩成績に差は認められなかった。凍結・融解胚のETによる受胎率は新鮮胚に比べて低いことが報告されており (Trounsonら 1978 ; Schneiderら 1980 ; StubbingとWalton 1986 ; Hasler 2001)、栄養膜小胞との共移植による受胎性の向上を期待した。しかしながら、

今回、黒毛和種繁殖牛群の改良促進のため、本試験においては優秀な血統の産子を得る必要があったことから、市販の高品質な凍結保存胚を移植試験に用いた。そのため、凍結・融解胚自体の生存性が高く、子宮内において十分にIFN τ が産生されたため、栄養膜小胞との共移植の有無による受胎成績・分娩成績に差が認められなかったことも考えられる。低品質胚や細胞数の少ない性判別胚・切断2分離胚では、胚の生存性が低いことや妊娠認識物質であるIFN τ の分泌量が少ないことが受胎率の低下を招いていると考えられることから、今後、明らかに細胞数が少ない切断2分離胚等の体外操作胚と栄養膜小胞との共移植が受胎率に及ぼす影響についての検討が必要である。一方、共移植により生まれた子牛は、形態は正常であり、在胎日数・生時体重とも対照区とともに正常範囲であり、栄養膜小胞が子宮内で胚および胎子に悪影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上の結果より、今回の試験においては、体外受精胚由来栄養膜小胞との共移植の有無による凍結・融解胚移植における最終的な受胎成績・分娩成績に差は認められなかった。例数が少ないこと、また、今回は、市販の高品質な凍結保存胚を移植試験に用いたために受胎率・分娩率に差が認められなかったことも考えられることから、今後、明らかに細胞数が少ない切断2分離胚等の体外操作胚と栄養膜小胞との共移植が受胎率に及ぼす影響についての検討が必要である。

3. ETによる繁殖牛群の系統交代促進

実験農場では、約40頭の黒毛和種繁殖牛を飼養し、それらが分娩した雌子牛からの後継牛づくりが行われてきたが、繁殖牛の資質向上は重要な課題であり、絶えずその改良が求められる。当地域（茨城県）の子牛せり市の出場名簿を見ると母の父および祖母の父が記載され、購買者の重要な情報となっている。久保田は、和子牛価格に対する影響は種雄牛と出荷体重が大きな影響力を有するが、種雄牛の代わりに2代祖までの血統（種雄牛と母牛の父との組み合わせ）がより大きな影響力を有する場合が多いことを紹介している（久保田（1999））。このように繁殖牛の系統は子牛生産にとって重要であり、ET利用に

よる系統交代促進への期待が大きい。

そこで、実験農場のより迅速な系統交代を目的として行う繁殖のなかで、フィールドにおける栄養膜小胞との共移植によるET受胎率向上の実証試験として、実際に後継牛づくりに取り組んだ。協定研究を含め、現時点（平成22年9月末）までに得られた成果は以下のとおりである。

ETには、実験農場で飼養されている黒毛和種12頭（延べ23頭）を供試した。供試した繁殖牛は、平成13年10月～平成15年4月に生まれ、約10ヶ月齢で子牛市場から購入した。ETに供する前の繁殖成績については、初産月齢24.7ヶ月、産次は平均4.2産、分娩間隔は平均362日、授精回数は平均2.1回であり、供試牛は概ね正常な発情周期を反復し、臨床的に繁殖機能に問題のない健康牛であった。その内、受胎し分娩に至った繁殖牛は13頭でその割合は57%であった。この間のET実施回数は30回、実施回数に占める分娩頭数は13頭でその割合は43%であった。分娩に至った繁殖牛13頭に限りてみるとこの13頭にETを実施した回数（20回）に占める分娩頭数13頭の割合は65%であった（表3）。

ETによって生産された子牛は13頭で、その内訳は雌9頭、雄4頭であった。雌は全頭を繁殖用後継牛として飼養し、現時点で分娩に至ったのは6頭（内2頭は2産）であり、平均初産月齢は25.1ヶ月、初産から2産の分娩間隔は2頭で平均10.9ヶ月であった（表4）。初産次および2産次の延べ8頭の平均人工授精回数は1.4回であった。実験農場において人工授精によって生産・育成された自家産繁殖牛7頭の繁殖成績（産次数は平均3.7）は、初産月齢25.1ヶ月齢、延べ分娩回数26回における平均授精回数1.4回、平均分娩間隔11.9ヶ月であったがこれらと比較しても、ETによって生産され、その後他の自家産後継牛と同様に育成された繁殖牛の繁殖成績は現時点では人工授精によるものと遜色なく良好と言えよう。

ETを実施し始めておおよそ4年間でET産子の6頭が牛群の一角を形成するまでになり、その意味では系統交代の加速化が図られたと言えよう。今後、これら後継繁殖牛から生産された子牛の市場評価や肥育牛の枝肉成績を検討する必要がある。

表3 ET実施牛の実績

| 項 | 目 | 成績 |
|---------------------|-----------|-----|
| 延べET実施頭数 | (頭) (A) | 23 |
| 延べET実施回数 | (頭) (B) | 30 |
| 分娩牛でのET実施回数 | (頭) (C) | 20 |
| 分娩頭数 | (頭) (D) | 13 |
| 全ET実施回数に対する分娩頭数の割合 | (%) (D/B) | 43 |
| 分娩牛の平均ET実施回数 | (回) (C/D) | 1.5 |
| 延べET実施頭数に対する分娩頭数の割合 | (%) (D/A) | 57 |

表4 ET産子（後継牛）の繁殖状況

| 項 | 目 | 成績 |
|----------------|-------|------|
| ET産子の繁殖用後継牛 | (頭) | 9 |
| 初産分娩頭数 | (頭) | 6 |
| 初産産子の性別 | 雄 (頭) | 4 |
| 同 | 雌 (頭) | 2 |
| 初産子の平均生時体重 | (kg) | 27 |
| 初産平均月齢 | (月) | 25.1 |
| 2産分娩頭数 | (頭) | 2 |
| 2産産子の性別 | 雄 (頭) | 1 |
| 同 | 雌 (頭) | 1 |
| 初産次と2産次の平均分娩間隔 | (月) | 10.9 |
| 初産～2産の平均人工授精回数 | (回) | 1.4 |

4. おわりに

今回の協定研究の試験においては、胚移植における受胎率向上・早期胚死減率減少を目的とし、凍結・融解胚と体外受精胚由来栄養膜小胞との共移植によるIFN τ の補強が受胎率に及ぼす影響について検討した。しかし、体外受精胚由来栄養膜小胞との共移植の有無による凍結・融解胚移植における最終的な受胎成績・分娩成績に差は認められなかった。例数が少ないこと、また、今回は、市販の高品質な凍結保存胚を移植試験に用いたために受胎率・分娩率に差が認

められなかったことも考えられることから、今後、明らかに細胞数が少ない切断2分離胚等の体外操作胚と栄養膜小胞との共移植が受胎率に及ぼす影響についての検討が必要である。

また、ETを実施し始めておおよそ4年間でET産子の6頭が、実験農場における牛群の一角を形成するまでになり、その意味では系統交代の加速化が図られたと言えよう。今後、これらETによって生産された後継繁殖牛が分娩した後継繁殖牛から生産された子牛の市場評価や肥育牛の枝肉成績を検討する必要がある。

なお、本論文は、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所と(財) 日本農業研究所の協定研究「インターフェロンタウ産生細胞等を利用したウシの黄体機能制御技術の開発に関する研究」によるもので、一部は協定研究に先だって実施された予備試験 (ET実施者 塩谷康生氏) の結果も含まれている。本研究の推進に当たり、(財) 日本農業研究所実験農場において供試牛 (繁殖牛) の飼養管理やETを実施するに当たっての補助は、宮下好広、岩崎敬、吉澤哲および井出豊松が行った。

用語

インターフェロン τ (インターフェロンタウ (IFN τ))

反芻動物における母体の妊娠認識に不可欠な妊娠確認物質であり、妊娠認識ならびに黄体機能の維持に重要な役割を果たす物質。発見当初はTrophoblastic Proteinと命名されていたが、構造的にI型インターフェロンに属するために、現在はインターフェロン τ と呼ばれる。反芻家畜の胚栄養膜細胞から分泌され、牛では、伸長した胚が子宮内膜に接着するころをピークとした一過性分泌を示す。

栄養膜小胞

胚の栄養膜細胞部分を切断後培養し、小胞を形成したもの。

参考文献

- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Peschel DE, Schaefer DM and Rutledge JJ (1998) Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology*. 50:129-145.
- Flint APF, Stewart HJ, Lamming GE and Payne JH (1992) Role of the oxytocin receptor in the choice between cyclicity and gestation in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 45:53-58.
- Hashiyada Y, Okada M and Imai K (2005) Transition of the pregnancy rate of bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from in vivo cultured in vitro fertilized embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 51:6, 749-756.
- Hasler JF (2001) Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56:1401-1415.
- Heyman Y, Chesne P, Chunpin D and Menezo Y (1987) Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*. 27:477-484.
- Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, and Roberts RM (1987) Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature*. 330: 377-379.
- 久保田哲史 (1999) 産地家畜市場における去勢和子牛価格形成の特徴. 九州農業研究成果情報. 14:587-588
- Nagai K, Sata R, Takahashi H, Okano A, Kawashima C, Miyamoto A and Geshi M (2009) Production of Trophoblastic Vesicles Derived From Day 7 and 8 Blastocysts of In Vitro Origin and the Effect of Intrauterine Transfer on the Interestrus Intervals in Japanese Black Heifers. *Journal of Reproduction and Development*. 55:454-459
- 農林水産省 (2010) 牛受精卵移植実施状況(H20年度). 農林水産省ホームページ (http://166.119.78.61/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/pdf/20juseiran.pdf)
- Robinson RS, Mann GE, Lamming and Wathes DC (1999) The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *Journal of Endocrinology*. 160:21-33.
- Rosenkrans CFJ, Zeng GO, McNamara GT, Schoff PK and First NL (1993) Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biology Reproduction*. 49:459-462

- Schneider HJ, Castleberry RS Jr. and Griffin JL (1980) Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*. 13:73-85
- Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF and Bazer FW (1995) Ovine interferon- τ regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. *Biology of Reproduction*. 53:732-745.
- Stewart HJ, McCann SHE, Barker PJ, Lee KE, Lamming GE and Flint APF (1987) Interferon sequence homology and receptor binding activity of ovine trophoblast antiluteolytic protein. *Journal of Endocrinology*. 115:R13-R15.
- Stubbings RB and Walton JS (1986) Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryo. *Theriogenology*. 26:145-155.
- Trounson AO, Shea BF, Ollis GW and Jacobson ME (1978) Frozen stage and transfer of bovine embryos. *Journal of Animal Science*. 47:677-681.