山口農林総技セ研報（Bull. Yamaguchi Agri. & For. Gen. Tech. Ctr）8：46-52. 2017.

経腟採卵・体外受精（OPU－IVF）による黒毛和種胚生産の効率化に関する研究　～卵胞発育調整プログラムの省力化に係る検討

田中　昌子・竹下　和久

Study on Effective Embryo Production by Ovum Pick Up (OPU) / In Vitro Fertilization in Japanese Black Cows: Investigation of Simplified Synchronization Program of Follicular Development

Masako TANAKA, Kazuhisa TAKESHITA

Abstract: The Ovum pick up (OPU) technique allows for the repeated production of embryos from live donors in a short period and is an alternative technique to embryo production by conventional superovulation. To promote the OPU technique in the field, we designed the present study to examine the effect of a simple synchronization program of follicular development before OPU treatment. In Experiment 1, the method of FSH stimulation prior to OPU was examined. There were no differences in the number of follicles and recovered oocytes between the superovulatory stimulation by single and quadruple administration (25.7 vs. 27.0 and 18.6 vs. 20.0, respectively). In Experiment 2, the effect of the removal method of the dominant follicle (DF) before FSH stimulation was examined. When a progesterone-releasing intravaginal device (PRID) was inserted into donor cows before FSH stimulation, the transition of the follicular wave was not different from that of DF aspiration by using a transvaginal ultrasound-guided technique except for a period of DF disappearance. The numbers of recovered oocytes were similar between the treatments of PRID and DF aspiration (14.8 vs. 14.5, respectively). In Experiment 3, the synchronization method before FSH stimulation was examined. The donor cows were synchronized by the PRID treatment at the start of a serial treatment with use of a single FSH administration. The numbers of follicles at the time of OPU and of recovered oocytes were significantly higher in the PRID treatment group (12.0 and 10.0, respectively) than in the control group without the pre-treatment before OPU (8.4 and 6.6, respectively). Moreover, the development rate was higher for the blastocysts derived from the PRID treatment group than from the control group (12.7% vs. 5.4%). These results indicate that the simple program of PRID + single FSH administration before OPU is effective for follicular development and subsequent in-vitro embryo production. Previous complex treatments are labor intensive and are highly stressful to the donor cow, owner, and operator. However, the above program may minimize this problem and be suitable for wide use in the field.

Key Words：follicle control, FSH treatment, PRID, simplification,
キーワード：FSH１回投与、簡易プログラム、プリッド

緒　言

経腟採卵（以下、OPU）とは、牛生体の卵巣から卵子を吸引採取し、その後体外受精（以下、IVF）等によって胚を作出する技術で、ドナー牛をと畜することなく、生体から繰り返し卵子を回収できる。本技術は、

1985年頃から人間の産婦人科領域で盛んに研究されており（京野ら，2005)、ヒトの不妊治療で用いる卵子の採取法を牛に応用したものである。Pieterseらが牛のOPU技術を開発（Pieterseら，1988，1991a,b）して以来、畜産領域においても世界各地で取り組まれるようになり、従来の過剰排卵処置による体内受精胚採取（以下、SOV-ER）を補完・代替する生殖補助技術として注目されている（Galliら，2001、今井・及川，2016)。

OPUの利点は、繁殖障害牛や老齢牛からも卵子を回収できることであり、SOV-ERで正常胚が得られない供卵牛から胚を作出する有効な手段となる。また、SOV-ERでは処置の間隔を３ヶ月以上空ける必要があるが、OPUは１週間程度の短い間隔で反復可能であり、貴重な遺伝資源の更なる活用につながる。

一般に、品質の高い卵子を採取するためには、OPU実施前にドナー牛の卵胞発育を調整しておくことが重要となる（Baruselliら，2012)。過去には、前葉性卵胞刺激ホルモン（以下、FSH）投与による卵胞刺激処置を施した後にOPUを実施することで、中卵胞数が増加し、卵子の品質およびIVF後の胚発生成績が向上するとの報告が多く認められる（今井ら，2010、 及川ら，2011、Vieiraら，2014、 山本・白田，2010)。

一方で、従来から行われているOPU前の卵胞発育調整プログラムは煩雑であり、畜種・ドナー・技術者の負担を伴うため、生産現場へのOPU普及を妨げる一因となっている。

この問題を改善するため、本研究では、煩雑なOPU実施前の処置をより省力化することで、現場で取り組みやすい簡易プログラムについて検討した。

材料および方法

１　供試牛

山口県農林総合技術センター畜産技術部内で飼養し、繁殖障害等の理由でSOV-ER成績が不良な黒毛和種経産牛（延べ17頭）を供試した。

２　経膣採卵および卵子の回収

供試牛に尾椎硬膜外麻酔を実施後、超音波画像診断装置（本多電子HS-2000V、以下、エコー）のプローブ（コンベックス型、7.5MHz）を腟内に挿入し、卵巣内の卵胞数を確認した。OPUは「ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル」(家畜改良センター，2009）に基づいて実施し、エコーで描出可能な卵胞は全て吸引対象とした。プローブに装着した採卵用針（ミサワ医科工業19G・490mm）を腟壁から穿刺し、卵胞液とともに卵子を吸引採取した。卵子の回収および洗浄には、４％牛血清、１％ヘパリン、0.2%抗生物質（ペニシリンーストレプトマイシン、以下PS）を添加した修正ダルベッコPBSを用いた。

吸引後の回収液は、セルコレクター（ニプロ医工）で洗浄・検卵し、坂口らの報告（坂口ら，1995）に従って品質分類した。卵丘細胞の付着状況や卵細胞質の状態から６等級（グレード１～６）に分類し、上位４等級（グレード１～４）をその後の試験に供した。

３　体外成熟培養

成熟培養液として、0.02AU／mL FSH（アントリンR・10、共立製薬)、1μg／mL Estradiol-17β（SIGMA)、0.2mMピルビン酸（SIGMA)、0.1%PSおよび５%FBS（Hyclone）添加TCM199（GIBCO）を用いた。洗浄した卵子をミネラルオイルでカバーした100μLドロップに移し、５%CO_2・38.5℃・湿潤の気相条件下で20～22時間培養した。

４　媒精（体外受精）

凍結精液を融解し、体外受精を行った。媒精液としてIVF100（機能性ペプチド研究所）を用い、最終精子濃度５×10^6／mLの懸濁液に成熟培養後の卵子を移して、５%CO_2・38.5℃・湿潤の気相条件下で６時間培養した。

５　体外発生培養

発生培養液として、合成卵管液SOF（Takahashi・First，1992、機能性ペプチド研究所に作成依頼）に20μL／mL BME（SIGMA)、10μL／mL MEM（GIBCO）および５%FBS（Hyclone）を添加した修正SOF培地（以下、m-SOF）を用いた。媒精後、卵子周囲に付着している卵丘細胞をピペティング操作で物理的に除去し、裸化・洗浄した。１個あたり５μLに調整したm-SOFドロップに移し、５%CO_2・５%O_2・90%N_2・38.5℃・湿潤の気相条件下で媒精後８日目まで培養し、分割および胚の発育状況を観察した。

６　統計処理

統計処理は統計ソフトStat Viewを用いて実施し、数値をアークサイン変換した後、分散分析Post hocテストにて検定を行った。

７　試験の構成

従来から実施していた処置を対照区、新たに省力化して実施した処置を試験区として、両区を比較検討した。試験１～３として、段階的に各処置の簡易化に取

プログラム	初日	→	４日後	→	２～４日後	→	２日後
	卵胞発育　調整				卵胞刺激		卵子回収
試験１	全卵胞吸引	→	優勢卵胞 吸引除去（DFA）	→	FSH投与 （１回投与）	→	OPU
試験２	全卵胞吸引	→	PRID挿入	→	FSH投与 （１回投与）	→	OPU
試験３	省略		PRID挿入	→	FSH投与 （１回投与）	→	OPU

第１図　　卵胞発育調整プログラムの省力化

り組んだ（第１図）。

試験１）卵胞刺激処置の省力化：FSH の投与方法

OPU 実施前の卵胞刺激処置として、FSH（アントリンR･10、共立製薬）の投与方法について検討した。生理食塩水を溶媒として、従来の２日間・４回の減量投与（9:00 および 16:00、初日は 3AU／1.5mL、翌日は 2AU／1.0mL、筋肉内注射）を対照区、１回投与（9:00、10AU／10mL、皮下注射）を試験区とした。プログラムは、全卵胞吸引を Day０として、Day５で優勢卵胞の吸引除去（以下、DFA）、Day７～８で FSH 投与（試験区は Day７のみ）、Day９で OPU を実施し、卵胞数および回収卵数を調べた。

試験２）卵胞発育調整の省力化：優勢卵胞の除去方法

OPU 実施前に行う、優勢卵胞の除去方法について検討した。従来の吸引除去（DFA）を対照区、腟内留置型ホルモン製剤 PRID（プリッド テイゾー、あすか製薬）の挿入を試験区として、卵胞数の推移をサイズごとに（大卵胞：10mm 以上、中卵胞：６～９mm、小卵胞：５mm 以下）調べた。プログラムは、全卵胞吸引を Day０として、対照区では Day４で DFA、Day６で FSH１回投与（10AU／10mL、皮下注射）、Day８で OPU を実施、試験区では Day４で PRID 挿入、Day８で FSH１回投与（対照区と同様）、Day10 で OPU を実施した。

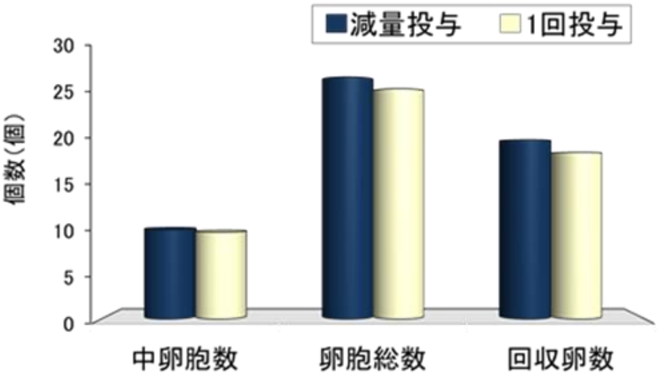
試験３）卵胞発育調整の省力化：OPU 実施前の全卵胞吸引処置の省略

従来、OPU 実施前のプログラム初日に行っていた Day0 の全卵胞吸引処置について、省略可能か検討した。対照区では事前の処置を一切行わず OPU のみを実施、試験区では事前の全卵胞吸引処置を行わず、試験２の PRID 挿入プログラム（発情前後３日間を避けて Day０で PRID 挿入、Day４で FSH１回投与、Day６で OPU 実施）を用いて、卵胞数や回収卵数、その後の胚発育について調査した。

結　果

試験１）FSH の投与方法

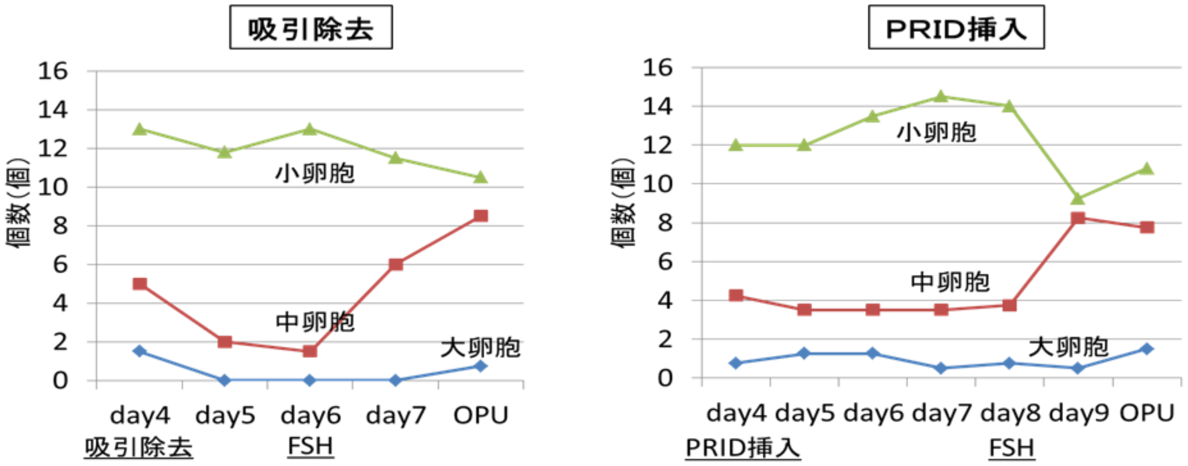
各区３頭を供試し、OPU 実施時の１頭当たり中卵胞数および卵胞総数は、試験区において 9.7 個、25.7 個となり、対照区の 10.0 個、27.0 個と差を認めなかった。また、１頭あたり回収卵数は、試験区 18.6 個、対照区 20.0 個となり回収率にも差を生じなかった（第２図）。



第２図　FSHの投与方法による比較（試験１）

試験２）優勢卵胞の除去方法

各区４頭を供試した。DFA を行った対照区では大卵胞が翌日から消失し、FSH 投与後に小卵胞が発育して、OPU 実施時の１頭あたり中卵胞数は 8.5 個、卵胞総数は 19.8 個であった。一方、PRID を用いた試験区では挿入から３日後に大卵胞の消失を認める個体が多く、FSH 投与後は対照区と同様の卵胞推移を示した。また、OPU 実施時の１頭あたり中卵胞数は 7.8 個、卵胞総数は 20.1 個で対照区と差を認めなかった（第３図）。



第３図　優勢卵胞の除去方法による比較（試験２）

なお、１頭当たりの回収卵数およびグレード１～４卵子数（以下、供試卵数）はそれぞれ、対照区で14.5個、9.0個、試験区で14.8個、8.5個となり、OPUの回収率や卵子の品質にも差を生じなかった。

試験３）OPU実施前の全卵胞吸引処置の省略

各区10頭を供試した。試験区において、１頭あたりの中卵胞数および卵胞総数はそれぞれ3.4個、12.0個で、対照区の1.8個、8.4個に比べて有意に（$P<0.05$）増加した。また、両区の回収率に差を認めなかったため、回収卵数（試験区10.0個、対照区6.6個）も試験区で有意に（$P<0.05$）増加した。

一方、体外培養成績について、全体の分割率および胚盤胞発生率はそれぞれ、対照区で45.9%、5.4%、試験区で49.1%、12.7%と、いずれも有意差を認めなかった。ただし、試験区では回収卵数が増加したのに伴い、供試卵数も増加傾向であったため、試験区において対照区よりも多くの胚盤胞数が得られた（第１表）。

考　察

OPUによる胚生産技術は生産現場においても注目が高いが、現在その利用は試験研究機関および一部の民間獣医師に留まっており、従来のSOV-ERによる胚生産に取って代わるまでには至っていない。要因として、高額な機械や体外胚生産施設を要すること、また、専門技術者の確保が困難なことが挙げられる。

従来の知見から、OPUで効率的に卵子を回収するためには事前にドナー牛の卵胞発育を調整することがきわめて重要であり（Baruselli ら，2012）、OPU実施前に複数回、吸引機材と技術者を要する処置が行われてきた（今井ら，2014）。この事前処置の簡易化が可能となれば、技術者の確保が困難という問題点は解消され、現場へのOPU普及を妨げる障壁が軽減される。

試験１に関して、Blondin らは、OPUの前処置としてFSH投与による卵胞刺激を行うことで、採取卵子の発生能が向上したと報告している（Blondin ら，2002）。従来SOV-ERにおいても６～８回程度のFSH減量投与が一般的であったが、近年、労力軽減のため、溶媒の種類や量を調整することでFSHの１回投与を試みた報告が散見される。平泉らの報告では、SOV-ERにおける溶媒とFSHの投与量を検討して、１回投与でも従来の減量投与法と差のない良好な採胚成績を得ており、溶媒量を増加させることでFSHの吸収が緩やかとなったため持続的に作用したものと考察している（Hiraizumi ら，2015）。我々の試験においても、FSH（計10AU）を４回に分けて筋肉内に減量投与した区と、溶媒を増やして１回で皮下投与した区で、卵胞数・回収卵数とも両区に差を認めなかったため、FSHの投与方法は、減量投与から皮下１回投与に代替可能と推察された。なお、事前にFSHで卵胞刺激処置を行ったOPUについては、卵子の回収率が向上した報告（山本・白田，2010）または低下した報告（今井ら，2010、Vieira ら，2014）ともに認められており、ドナーの品種等に応じて、各研究機関で様々なFSHの処置法が検討されている。

試験２では、優勢卵胞の除去方法について検討した。Chaubal らは、OPUの72時間前に吸引除去（DFA）を行うことで、その後の胚盤胞発生率が倍増したと報告している（Chaubal，2006）。同様に、今井らの報告によると、OPU実施の２日前に優勢卵胞（主席卵胞）のDFA

第１表　ＯＰＵ実施時の卵子回収状況およびＩＶＦ後の分割と発育（試験３）

区	頭数	平均卵胞数			卵胞総数(平均)	回収卵数(平均)	回収率	供試卵数(平均)	供試率	分割胚数(%)	発育胚数	
		大	中	小							≧桑実胚(%)	胚盤胞(%)
対照区(無処置)	10	0.4	1.8 a	6.2	84 a (8.4)	66 a (6.6)	78.6%	37 (3.7)	56.1%	17 (45.9)	2 (5.4)	2 (5.4)
試験区(PRID・FSH)	10	1.2	3.4 b	7.4	120 b (12.0)	100 b (10.0)	83.3%	55 (5.5)	55.0%	27 (49.1)	8 (14.5)	7 (12.7)

異符号間に有意差（Ｐ＜0.05）あり

を実施することで、回収卵子の正常性が有意に向上している（今井ら，2014）。主席卵胞は、エストラジオール17βやインヒビンを分泌することで下垂体前葉からのFSH分泌を抑制し、次席卵胞以下の発育を抑制することが知られている（Ginther，2001）。その主席卵胞を機械的に除去することで、次席以下の小～中卵胞が閉鎖退行せずに正常性を保てるため、OPU前にDFAを行うことで回収卵子の正常性が向上すると推察される。

一方、DFAの実施はOPUと同じ手技で行うため、吸引機材一式および技術者の確保に苦慮することから、試験２では本処置をホルモン製剤（PRID）の挿入に替えて比較検討した。PRIDは、プロゲステロンに加えて安息香酸エストラジオールカプセルも含有しており、優勢卵胞を退行閉鎖させる作用を有する。PRID挿入により従来のDFAと同様の卵胞推移と卵胞数が得られたため、卵胞発育の制御は本法でも可能と推察された。本プログラムを用いた場合、従来と大卵胞の消失時期が異なるため２日間プログラムが延長するものの、DFA実施と同等数の回収卵数および供試卵数が得られ、卵子の品質にも差を認めないことから、優勢卵胞の除去方法は、従来のDFAからPRID挿入に代替可能であると考えられた。

試験３では、OPU実施前の処置として最初に行う全卵胞吸引処置の省略について検討した。ドナーの卵巣には様々な発育段階の卵胞が存在し、その卵胞のばらつきがFSHに対する反応性として現れるため、採卵成績が安定しないと考えられる。これを受けて今井らは、卵胞のばらつきを解消するため卵巣に存在する全ての卵胞を吸引除去して新たな卵胞波を誘起し、発育してきた主席卵胞を機械的に除去（DFA）する卵胞の発育同調法を開発した（今井ら，2010）。従来は事前の卵胞発育調整プログラムの初日に全卵胞吸引を実施していたが、本処置はDFA同様、OPUと同一の機材と手技を要するため煩雑である。

一方で、最初に全卵胞吸引を行わずFSHによる卵胞刺激処置を実施したドナー牛において、高い胚盤胞発生率を得たとの報告（大竹ら，2009）もあることから、本試験区では初日の全卵胞吸引処置を省略し、その他の処置は試験１，２の結果を受けて、PRID挿入およびFSH１回投与により実施した。無処置の対照区（事前の卵胞発育調整を一切行わずOPUのみ実施）と比較すると、試験区において卵胞数および回収卵数が有意に増加していることからFSH投与の効果が認められ、卵胞発育も適切に調整されていると推察された。また、有意差は無いものの供試卵数においても増加傾向を認めたため、分割胚および胚盤胞の実数が増加した。以上の結果から、現場で卵子の回収に取り組む際は、対照区のように無処置でOPUを行うよりも、試験区のような省力化した処置を導入することでOPU前に卵胞発育の調整を実施するのが効果的と考えられた。本簡易プログラムを用いてより多くの移植可能胚が得られたことから、全卵胞吸引処置を省略しても問題ないと推察され、現場において受精卵移植実施の機会を増やすことが期待される。

一方、本試験の培養成績について、分割率ならびにその後の胚盤胞発生率が依然として低いことが課題であり、今後も引き続き改善に向けた取り組みが必要である。近年、リアルタイム細胞観察装置を活用することで、第１卵割の時間や形態、胚盤胞の酸素消費量等を指標にしたIVF胚の客観的評価指標が報告されており（Somfaiら，2010、Sugimuraら，2012）、現場においても胚の選別に活用されている（金田，2016）。選別胚を移植することで70%を超える高い受胎率も得られており、今後、非常に有用と考えられる。

以上、試験１，２，３の結果より、初日の全卵胞吸引処置を省略しDFAをPRID挿入に代替すれば、事前にOPU機材や技術者を要する処置が無くなるため、OPU実施前の全ての処置について、畜主自らで行うことが可能となる。また、事前の吸引処置が無くFSHの注射

も１回のためドナー牛への侵襲は著しく軽減され、畜種・ドナー・技術者それぞれの負担も低減し、一連のOPU作業の煩雑さが解消される。本プログラムは、処理開始日が広範で事前の卵胞発育調整が簡易に行えるため、現場でのOPU普及に適しており、省力的な作業と効率的な胚生産を目指すうえで有効なプログラムであると推察された。

摘　要

経膣採卵（OPU）は、牛生体の卵巣から短期間に繰り返し卵子を採取することができ、従来の体内受精胚採取を補完・代替する技術として注目されている。現場での普及を目的として、OPU実施前に行う煩雑な卵胞発育調整プログラムの簡易化について検討した。試験１としてFSHの投与方法（４回の減量投与または１回投与）を比較したが、卵胞総数・回収卵数とも差を認めなかった。試験２として、優勢卵胞の除去方法（吸引除去またはPRID挿入）を比較したが、大卵胞の消失時期を除いて各サイズの卵胞発育は同様に推移し、回収卵数も同等であった。試験３として、事前の全卵胞吸引処置を省略し、PRID挿入およびFSH１回投与のみで卵胞発育調整を試みたところ、無処置区と比較して卵胞総数・回収卵数が有意に増加し、より多くの胚盤胞が発育した。本プログラムは、事前の卵胞発育調整が簡易に行えるため現場でのOPU普及に適しており、省力的な作業と効率的な胚生産を目指すうえで有効なプログラムであると推察された。

引用文献

Baruselli PS, Sá Filho MF, Ferreira RM, Sales JN, Gimenes LU, Vieira LM, Mendanha MF and Bó GA. 2012. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. Reprod Domest Anim. 47 Suppl 4:134-41.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F and Sirard MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biol. Reprod. 66(1):38-43.

Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PE, Riesen JW, Tian X and Yang X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. Theriogenology. 65(8):1631-48.

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R and Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. Theriogenology. 55(6):1341-57.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX and Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. Biol Reprod. 65(3):638-47.

Hiraizumi S, Nishinomiya H, Oikawa T, Sakagami N, Sano F, Nishino O, Kurahara T, Nishimoto N, Ishiyama O, Hasegawa Y, and Hashiyada Y. 2015. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle-stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over three days. Theriogenology. 83(4):466-473.

今井敬・及川俊徳. 2016. OPU-IVFによる効率的な胚の生産. 臨床獣医. 第34巻第9号：11-22.

今井敬・大竹正樹・相川芳雄・松田秀雄・山之内忠幸・稲葉泰志・的場理子・杉村智史・橋谷田豊. 2014. 卵胞波を調整した経膣採卵－体外受精による効率的な胚生産. 日本胚移植学雑誌. 36(2):109-114.

今井敬・大竹正樹・杉村智史・稲葉泰志・タマス ソムファイ・平山宗幸・相川芳雄・吉岡一・橋谷田豊・小林修司・小西一之. 2010. 卵胞刺激処理およびOPU-IVFによるウシ胚生産. 平成21年度 核移植・受精卵移植技術全国会議 要旨 ： 41-44.

(独)家畜改良センター. 2009. 技術マニュアル19「ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル」.

金田義之. 2016. OPU-IVF技術導入農場における胚生産・胚移植成績. 臨床獣医. 第34巻第9号：23-27.

京野廣一・中條友紀子・熊谷志麻・佐々木幸子. 2005. 総説 採卵と胚移植. J. Mamm. Ova. Res. 22:198-205.

及川俊徳・阿部玲佳・板橋知子・沼邊孝. 2011. FSH投与量および投与開始時間の違いがOPU-IVF成績に与える影響. 第26回東日本胚移植技術研究会大会資料. 26巻 ： 36-37.

大竹正樹・的場理子・稲葉泰志・相川芳雄・小林修司・

今井敬. 2009. 東日本家畜受精卵移植技術研究会報. 25:50-51.

Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA and Taverne MA. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology, 30(4):751-62.

Pieterse MC, Vos PL, Kruip TA, Willemse AH and Taverne MA. 1991a. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. Theriogenology. 35(2):401-13.

Pieterse MC, Vos PL, Kruip TA, Wurth YA, van Beneden TH, Willemse AH and Taverne MA. 1991b. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. Theriogenology. 35(4):857-62.

坂口慎一・井口光国・小林直彦・藤谷泰裕・三溝成樹・内海恭三. 1995. 超音波診断装置を利用した繁殖不適和牛からの連続経膣採卵. 日本胚移植学雑誌. 17:94-101.

Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K and Imai K. 2010. 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. 56(2):200-7.

Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K and Imai K. 2012. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. PLoS One. 7(5):e36627.

Y. Takahashi and N.L. First. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriongenology. 37(5):963-78.

Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CR, Moreira RJ, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ and Baruselli PS. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. Theriogenology. 82(2):318-24.

山本伸治・白田聡美. 2010. 過剰排卵処理を組み入れた経膣採卵技術の検討. 第17回日本胚移植研究会大会 発表抄録.