

東京農業大学

学位論文

高受胎を得るためのウシ胚移植技術の開発

Development of embryo transfer technology
for high pregnancy rate

2020 年

農学研究科 畜産学専攻

野 口 龍 生

指導教員 教授 岩田 尚孝

論文題目

高受胎を得るためのウシ胚移植技術の開発

博士学位論文 目次

第一章 緒論	1
第二章 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で得られたウシ胚盤胞間の遺伝子発現とミトコンドリア数の比較	
第一節 緒言	5
第二節 材料および方法	7
第三節 結果	12
第四節 考察	14
付表および付図	17
第三章 ウシの妊娠率向上に向けた単為生殖胚追い移植	
第一節 緒言	32
第二節 材料および方法	35
第三節 結果	42
第四節 考察	46
付表および付図	50
第四章 ウシの分娩前後における血漿中 DNA の性質および血液成分値との関係	
第一節 緒言	58
第二節 材料および方法	61
第三節 結果	65
第四節 考察	67
付表および付図	71

総括	77
Summary	80
謝辞	84
引用文献	85

第一章 緒論

畜産業にとって飼養家畜の繁殖成績は経営基盤を安定させるための最も重要な因子の一つである。経営形態としてウシを対象とした場合、乳用牛と肉用牛を飼養する経営体に分けることができる。乳用牛を飼養する経営体を酪農家と呼び、主な収入源は飼養牛から搾乳した生乳を販売することで得ているが、一方で生まれた子牛の販売収入も重要な収入源となっている。国内において肉用牛を飼養する経営体は、繁殖農家と呼ばれる繁殖雌牛を飼養する経営体と、肥育農家と呼ばれる牛を肥育する経営体に分かれることが多いが、このうち繁殖農家は、子牛を販売することで生計を立てている。酪農家や和牛繁殖農家にとって、飼養牛の繁殖成績はそのまま収入に直結する看過できない項目であるが、その人工授精（Artificial Insemination; AI）による初回受胎率は、家畜改良事業団の調査によると（<http://liaj.or.jp/giken/hanshoku/jyutai.html>）乳用牛で平成元年に 62.4%であったものが、平成 29 年には 41.6%と激減している。肉用牛も乳用牛ほどではないにしろ、平成元年に 67.5%であったものが平成 29 年には 51.9%とこちらも減少している。

一方このような状況下において国は、国産乳肉の国内需要が今後も伸びると予測しており、また、Trans-Pacific Partnership Agreement・Free Trade Agreement・Economic Partnership Agreement での協定および日米貿易協定などを最大限に活用し、輸出拡大を図る計画も策定している。家畜改良増殖法（昭和 25 年法律第 209 号）第 3 条の 2 第 2 項に基づき令和 2 年 3 月策定された家畜改良増殖目標では、「繁殖雌牛の増頭や 乳用牛への受精卵移植技術を活用した和牛生産など、より一層の肉用牛の生産 基盤強化を推進する必要がある」と明記している。具体的には、和牛の初産を令和 2 年度の 24.5 月齢から令和 12 年度には 23.5 月齢に短縮することおよび分娩間隔を

令和 2 年度の 400 日から令和 12 年度には 380 日へ短縮させることが謳われており、飼養頭数も肉専用種で、令和 2 年度の 172 万頭から令和 12 年度には 243 万頭に増頭することを目標としている。

家畜改良増殖目標に掲げる数値目標を達成するためには、単一の要素にとどまらず、繁殖にかかわる複数要因の解明と対策が必要不可欠である。生産性向上に向けた取り組みは古くから取り組まれており、雄側や雌側の要因および管理上の要因に分けられる。

雄側の要因としては、精子の質および量などが挙げられ、雌側の要因としては胚の質、卵管および子宮環境などが挙げられる。また、雌雄共通に遺伝的要因および感染症なども繁殖性に影響を与える。管理上の要因としては、ウシの栄養管理、AI および胚移植 (Embryo Transfer; ET) 技術さらには早期妊娠診断技術などがある。これら多くの要因が複雑に関係しあっているため、生産性向上は困難を極めている。

本研究では、特に雌側の要因を解明することで生産性向上の一助となることを目的とした。

まず胚の品質において、良質の胚とは受胎性が高く正常な産子を効率的に得られる胚のことを言うが、**International Embryo Technology Society (IETS)** のマニュアルによると受精からの時間にあつた発育ステージを示していること、変性細胞が少ないこと、細胞の色調が明るいことおよび細胞数が十分であることなどの基準となり (https://www.iets.org/pub_manual.asp)、主に顕微鏡下での目視確認が主流であるが、判定者による差が大きく問題がある。胚の細胞数については発情から 7 日目の体内発生 (*in vivo* developed; IVD) 胚の場合報告により差があるものの、約 120 前後であり、栄養膜外胚葉/内細胞塊比は約 3 前後と報告があるが (Ann *et al.*,1997; Deog-Bon *et al.*,2002)、全て染色標本とするため受胎性との関連付けができなかった。そこで、近年開発された走査型

電気化学顕微鏡を用い、非侵襲的に胚の酸素消費量を測定することで、体外受精により作出した (*in vitro* produced; IVP) 胚の酸素消費量が胚の品質の指標となることが報告され (Shiku *et al.*,2001)、ウシ胚盤胞における酸素消費量はその細胞数と相関があるとの報告もあり(今井ら,2015)、さらに、一定値以上の酸素消費量の胚盤胞を移植することで高い受胎率が得られるとの報告もある (Lopes *et al.*,2007)。しかしながらこれらの報告は IVP 胚での報告であり、IVD 胚での報告は見当たらない。現在ウシの IVP 胚は、と畜場卵巢由来の物および生体内卵子吸引由来の物が生産されているが、IVD 胚と比べると受胎率およびウシへの生産率で劣るとの報告がある (Takashi *et al.*, 2001)。その要因は移植胚の品質によるものであり、本研究では双方の相違点を検討した。

次に ET の方法について検討した。ウシの非外科的胚移植は 1965 年に杉江博士により速報として報告された (杉江ら,1965)。その後 ET は子宮頸管経由で行われるようになり普及した。受胎率を向上させるため移植方法の検討は移植器を改良する他 (高橋ら,1982 ; 佐々木ら,2004)、二胚同時移植 (鈴木ら,1986)、追い移植 (Anderson *et al.*,1979 ; Sreenan *et al.*,1981 ; 鈴木ら,1996) および栄養膜小胞 (Trophoblastic Vesicle、以下 TBV) の供移植 (Nagai *et al.*,2009 ; 下司ら,2010) など様々な試みが行われ現在に至る。この内二胚同時移植、追い移植は双子生産による増産を狙ったものであったが、ウシで異性双子の場合、フリーマーチンの出現が課題となっていた。その後受胎は、胚より放出される妊娠認識シグナルの存在が証明され (Imakawa *et al.*,1987)、このインターフェロンタウ (Interferon τ ; 以下 IFNT) の増強効果と双子による事故低減を狙いに TBV の供移植が研究されたが単為発生 (parthenogenesis; 以下 PA) 胚からも IFNT が産生されていることが明らかとなり (Michael *et al.*,2003)、 TBV の作出より時間やコスト的にも簡便な手法であるため、PA 胚の受胎性向上効果について検討し

た。

さらに母牛の状態と妊孕性について検討した。高品質の胚が卵管および子宮内に存在する場合または高受胎率が期待できる ET を行った場合、最終的に受胎を決定づけるのは母牛の状態である。受胎率に影響をおよぼす母牛の要因としては、ウイルス、細菌および原虫などの病原微生物感染、暑熱などによる酸化ストレス、給与飼料の栄養的アンバランスおよび性ホルモンなどのアンバランスな分泌など多岐にわたる。これらの要因の影響は末梢血液に反映されるため、血液性状を把握することは受胎もしくは不受胎の要因を精査するのに重要である。近年は牛群の代謝プロファイルテストを行うことで群全体の繁殖性を向上させる試みもなされマニュアル化されている(独立行政法人 家畜改良センター鳥取牧場、2016)。一方、現在抹消血液から得られる情報は多岐にわたり、中でも核酸およびその断片から得られる情報については、新たな知見が数多く発表され、ヒトでは一回の採血で 50 種余りの悪性新生物の検出とその存在部位を正確に特定できるとの報告もされた(Liu *et al.*,2020)。しかしながらウシの抹消血液中における細胞外 DNA (cfDNA) の報告は少なく、生化学性状と併せて評価することで、母体の受胎性における新たな指標について検討した。

効率的な胚移植には、胚の質、移植技術および受胎牛の状態が重要な要因として挙げることができる。本研究は胚移植に対しこれら 3 つの要因に対して研究を進め良質な胚に必要な条件、高受胎率を得るための手法の開発そして繁殖雌牛の状態を把握する手法の開発を行った。

第二章 *in vitro* および *in vivo* で得られたウシ胚盤胞間の遺伝子発現とミトコンドリア数の比較

第一節 緒言

現在のウシ生産において、胚移植は広く利用されている生殖技術である。

ウシ胚盤胞の生産には *in vitro* および *in vivo* の 2 つの方法があり、ウシの生産に関しては、同様に使用されているが、胚の品質には根本的な生物学的違いがある。

一般的に、胚盤胞胚を受胎牛に移植した場合の妊娠率は、*in vivo* で発生した (*in vivo developed*; 以下 IVD) 胚が *in vitro* で発生した (*in vitro produced*; 以下 IVP) 胚より高く、胚の質は IVP 胚盤胞で、変性率が高いことが報告されている (Barnwell *et al.*, 2015)。IVD および IVP 胚を比較した初期の研究では、胚の由来により卵割速度と得られた子牛の体重の違いが報告されており (Farin *et al.*, 1995; Ushijima *et al.*, 2008)、これは *in vitro* の培養条件 (Thompson *et al.*, 1997; Iwata *et al.*, 2000) に起因すると述べられている。

ゲノム解析技術を使用した最近の研究では、IVD と IVP 胚の遺伝子発現の違いやメチル化パターンの違いが明らかになっており、これら分子背景の違いが胚の質の変化にあることが示唆されている (Bauer *et al.*, 2010; Salilew-Wondim *et al.*, 2018)。

胚移植を広く活用していく上で、胚の質を限りなく *in vivo* に近づけることが最も自然な方法であり、このような報告は、IVP 胚盤胞の異常を特定し、IVP 胚生産の培養条件を改善することに役立つ。しかしながら、IVD 胚を多数取得することは、高価な胚を生産する和牛から得た胚を侵襲的な評価に供することになるため、困難であり、IVD および IVP 胚の違いに関する研

究はほとんどみあたらない。

本研究では、次世代シーケンシング技術を用いて同定した遺伝子発現を由来の異なる胚間で比較し、その結果を踏まえて胚の有するミトコンドリア数や機能を測定し比較検討した。

第二節 材料および方法

1) 試薬と培地

この試験で使用したすべての薬剤は、特に明記しない限り、ナカライテスク (Kyoto, Japan) から購入した。

ウシ卵子の体外成熟培養には 10%ウシ胎子血清 (FCS) (FCS; 5703H; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA) および 5 mM タウリンを添加した Medium 199 を使用した (IVM 培地)。

体外受精 (IVF) および体外培養 (IVC) には、合成卵管液 (SOF) を使用した (Iwata *et al.*, 2004)。

IVF では、5 mg / ml BSA (Bovine Serum Albumin-fatty acid free) および 10 U / ml ヘパリン (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を、また、IVC には、必須および非必須アミノ酸 (Sigma-Aldrich)、1%FCS、5 mM タウリン、および 1.5 mM グルコースを SOF に添加した。

2) 卵巣および卵母細胞の採取

卵巣は、食肉処理場より黒毛和種から採取し、10 mM グルコース、10 mM スクロース、および抗生物質を含むリン酸緩衝液 (PBS) で 25° C に保管し、4 時間以内に研究室に輸送した。

卵丘細胞卵母複合体 (COCs) は、注射筒に 18 G の注射針を装着し、各ウシの卵巣から吸引した。

3) 体外成熟と体外受精

COCs は IVM 培地で 21 時間培養し熟成させた (10 COCs / 100 μ l drop)。成熟した COCs は、IVF 培地で洗浄後、黒毛和種の凍結融解精液と共培養した。

凍結精液は融解後 45～60%パーコール溶液 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) にて密度勾配遠心分離法により洗浄し (800×g、10min) 受精に用いた。精子と COCs は 6 時間共培養し (IVF 培地の精子濃度 1×10^6 cells / ml)、その後 COCs は 1%FCS 添加 IVC 培地で培養した。

4) 胚の体外培養

受精処理後、COCs を IVC 培地で 2 日間培養した。その後、7 細胞期以上の胚の卵丘細胞を除去し、新たな $50 \mu\text{l}$ ドロップの IVC 培地に移し、さらに 5 日間培養した。培養の気相条件は、IVM、IVF、および最初の IVC (受精後 48 時間まで) では 5%CO₂、95% in 空気、2 回目の IVC (48 時間から受精後 7 日まで) では 5%CO₂、5%O₂、90%N₂ とした。

IVC 7 日後に得られた胚盤胞期胚の品質は International Embryo Technology Society (IETS) マニュアル [https://www.iets.org/pub_manual.asp]により評価し、grade 1 に分類された胚のみを試験に用いた。

5) 過排卵処理と胚の回収

15 頭の黒毛和種牛を *in vivo* での胚生産には 15 頭の黒毛和種を供試した。過排卵処理は、まず黄体期の供試牛膈内に留置型プロゲステロン徐放剤 (controlled internal drug release (CIDR)、Livestock improvement corporation, Tokyo Japan) を挿入した。

CIDR 挿入日を 0 日とし、1 日目に安息香酸エストラジオール (Asuka, Tokyo, Japan) を 2 mg 投与し、6 日目から 3 日間漸減投与方法により合計 20AU の FSH (Antrin、Kyoritsu, Tokyo, Japan) を投与した。8 日目の 9:00 に、PGF₂α (d-cloprostenol, Dalmazin, Kyoritsu, Tokyo, Japan) 0.15 mg 投与し、17:00 に CIDR を抜去した。PGF₂α 投与 2 日後の 17:00 に人工授

精を実施した。また、使用した精液は体外受精に用いた精液と同一黒毛和種の凍結融解精液を用いた。

授精後 6.5 日で子宮から非外科的に子宮洗浄により胚を回収した。得られた胚の品質は IETS マニュアルにより分類し、grade 1 に分類した胚のみ実験に用いた。ウシの過剰排卵処理は、東京農業大学の動物実験倫理委員会に承認を受けて行った。

6) ミトコンドリア DNA コピー数の評価

胚盤胞のミトコンドリア DNA コピー数 (Mt 数) は、リアルタイム PCR によって測定した。各胚盤胞は、6 μ l の溶解バッファー (20 mM Tris, 0.4 mg/ml proteinase K, 0.9% Nonidet-40, and 0.9% Tween 20) により 55 °C, 30 分間、次いで 95 °C, 5 分間で溶解した。Mt 数は、Rotor-Gene 6500 リアルタイムロータリーアナライザー (Corbett Research, Sydney, Australia) を用いてリアルタイム PCR で測定した。PCR プライマーセット (5'-ACCCCTTGACCTTTTGCAT-3' and 5'-TCTGGTTTCGGGCTGCTTAG -3', 81bp) は、ウシミトコンドリアの全ゲノムシーケンス (NC_006853.1) に基づいた Primer3Plus ツールを用いて設計した。

PCR 条件は initial denaturation 95°C, 1 min 行った後、98°C, 5 s さらに 60°C, 10s を 1 PCR サイクルとして 40 サイクル行った。標準曲線は、外部標準の 10 倍希釈系列を用いて、測定ごとに作成した。使用した外部標準は、Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてベクターにクローニングされた対応する遺伝子の PCR 産物で、使用前に配列をシーケンスによって確認した。全試験の増幅効率は > 1.98 だった。

7) ATP 量の測定

胚の ATP 含有量は、ATP 依存性ルシフェリン-ルシフェラーゼ生物発光アッセイ (ATP assay kit; Toyo-Inc., Tokyo, Japan) により発光量として測定した。発光量は、個々の胚を溶解し、プレートリーダー (Sperk 10M Tekan, Tokyo, Japan) を用いて直ちに測定した。

8) 免疫染色

供試胚を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.9%TritonX-100を含むPBSで30min透過処理した後、5 mg / ml BSAを含むPBSでブロッキングした。一次抗体にはウサギ抗 TOMM20 (Santacruz Biotech、1 : 200) を、二次抗体には Alexa Fluor 555 (Cell signaling) と結合した抗ウサギ IgG Fab2 を使用した。次に、退色防止試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた胚をスライドガラスに載せ、蛍光顕微鏡 (DMI 6000 B; Leica, Wetzlar, Germany) で観察した。

9) トランスクリプトーム解析

24 個の *in vivo* で生産された胚盤胞期胚は、過排卵後の黒毛和種 6 頭から回収され (4 blastocysts/head ; IETS standard で grade1 および 2)、RNA-seq に供試した。さらに、100 頭の黒毛和種から *in vitro* で発生した 200 個の胚盤胞期胚を RNA-seq に供試した。胚盤胞期胚の総 RNA 抽出は RNAqueous kit (Life Technologies、Carlsbad、CA、USA) を用いた。RNA の品質は 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies、Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を用いて確認し、cDNA ライブラリーは TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて調製した。ライブラリーの品質と量は、それぞれ Agilent 2100Bioanalyzer と KAPALibrary Quantification Kit (KAPA Biosystems、Wilmington, MA, USA) を用いて決定した。cBot (Illumina) でクラスター

を生成し、HiSeq 2500 (Illumina) で、増幅したサンプルの 1 レーンを 100 bp で読み取り (single read) シーケンスした。画像解析の、ベースコール、品質フィルタリングは、メーカーの指示に従って bcl2fastq2 (Illumina) ソフトウェアを使用して行った。シーケンスデータはフィルター処理して、アダプター配列、不明なヌクレオチド、および低品質の配列を除外した。残りのシーケンスデータを Bos Taurus genome sequence (ARS-UCD1.2 / bosTau9) に合わせてマッピングしカウントした。

マップされたシーケンスデータを、各遺伝子の発現値と差次的に発現した遺伝子を統計分析で用いて決定した。フィルタリング、マッピング、およびその後の分析は、CLC Genomics Workbench ソフトウェア (Qiagen、Redwood City、CA、USA) を使用して行った。統計的有意性は、DGE tool を使用した実証分析によって決定した (Robinson *et al.*, 2010)。差次的に発現した遺伝子 (fold-change ≥ 2.0 , FDR adjusted $P < 0.05$, and $q < 0.2$ (Benjamini *et al.*, 1995)) をさらなる分析に用いた。

発現に有意な差がある遺伝子の上流の因子を予測するために、Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェア (IPA、Qiagen) を用いた。同定された 4 遺伝子の統計比較には Fisher's exact test を用い、 $P < 0.01$ を有意な差とした。なお遺伝子の解析データは DDJB に登録した (DRA006210)。

10) 統計分析

ミトコンドリア数、総細胞数、免疫染色後の蛍光強度、および 2 種類の胚盤胞間の ATP 含有量は Student's t-test を用いて比較した。 $P < 0.05$ を統計的に有意であるとした。

第三節 結果

IVP および IVD 胚間で有意に発現が異なる (2.5 倍の高発現) 遺伝子について、IVP (2488 個) または IVD (1174 個) を functional annotation tool (DAVID ソフトウェア、<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて解析した。

IVP 胚盤胞では、焦点接着、細胞外基質 (ECM) 受容体相互作用、PI3K-Akt シグナル伝達に関与する遺伝子群が高発現しており、IVD 胚では、酸化還元プロセス、ミトコンドリア、およびミトコンドリア翻訳に関与する遺伝子がより高い発現を示した (Table 1)。そこで、ミトコンドリアタンパク質に関連する遺伝子の発現を比較したところ、IVP 胚と比べて IVD 胚でミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子の発現レベルは低く、核にコードされる遺伝子の発現レベルは高かった (Table 2)。

さらに、IPA 解析により 194 の上流調節因子 (Supplementary Table 1 A-I) を明らかにした。これらの上流因子には、IVD 胚のアクティベーターとして miRNA が含まれ、IVP 胚のアクティベーターとしては脱アセチル化酵素の阻害剤である trichostatin A、メチル化酵素の阻害剤である 5-azacitidine、過酸化水素、p38MAPK、ERK、および caspase が含まれた (Table 3)。

さらに、胚盤胞期胚のミトコンドリア数と機能を検討した。IVD 胚盤胞のミトコンドリア DNA コピー数は $130,793 \pm 21,527$ であり、IVP 胚のそれ ($180,560 \pm 30,426$) よりも有意に少なかった ($P < 0.01$, Figure 1-A)。また、IVD 胚盤胞の ATP 含有量は、IVP 胚盤胞で観察されたものよりも少なかった (0.40 ± 0.1 and 2.3 ± 0.2 , $P < 0.01$, Figure 1-B)。IVP 胚のミトコンドリアのコピー数が多いことは、これらの胚での TOMM20 の高発現レベルによっても確認された (1.44-fold, $P < 0.01$, Figure 2-A)。

明視野で胚を観察すると、IVD 胚はより透明に見えたが、2つの胚盤胞グループの合計細胞数は差が認められなかった (Figure 2-B)。

第四節 考察

本研究では、IVP および IVD 胚盤胞期胚の遺伝子発現を調査し、発現が異なる遺伝子の上流調節因子を用いて分子背景を推測した。さらに、IVP および IVD 胚盤胞間で、ミトコンドリア数と ATP 含有量に有意な差を見いだした。

これまで、IVP および IVD 胚の遺伝子発現の違いを報告した研究は、コントロールとしてハウスキーピング遺伝子 H2A、B2M、ACTB、GAPDH などを使用した逆転写 PCR に依存していた (Tesfaye *et al.*, 2004)。しかし、本試験の結果は、IVP および IVD 胚の間でハウスキーピング遺伝子の発現レベルの違いを明らかにした (Supplementary Table 2)。したがって、以前の遺伝子発現研究の結果の引用は慎重に行う必要があると考えられた。

機能性解析の後、IVP 胚にける発現上昇遺伝子は、細胞の接着、ECM-受容体の相互作用、および PI3K-Akt シグナル伝達と関連していることが判明した。これらの結果は、*in vitro* 培養条件が胚と培養環境間の相互作用を介した影響を胚に与えていることを示唆している。さらに、機能解析に加えて IPA を用いて発現変動遺伝子の上流因子を同定した。

IVP 胚で予測された活性化因子 (134 個) は、IVP 胚では高アセチル化や低メチル化が起こっていることを示唆している。trichostatin A と 5-azacitidine が上流因子として含まれており、以前の研究でも同様に、*in vitro* 培養条件が遺伝子やヒストンのメチル化とアセチル化に変化を誘発することを報告している (Wu *et al.*, 2012)。さらに、過酸化水素、p38 MAPK、caspase、および NF κ B も上流の調節因子として予測される。これらの結果は、培養条件に活性酸素およびアポトーシスを誘起する細胞へのストレス要因が含まれることを意味しており、これらが IVP 胚に影響している可能性があることを示している。また、いくつかの microRNA (miRNA) が、

IVD 胚に正に影響する上流因子として機能することが推定された。このことは体内の培養環境に miRNA が存在し胚に影響を与えていることを意味するが、ウシ胚発生におけるこれらの miRNA の機能に関する報告はほとんど見当たらない。このような miRNA はウシ卵管液および子宮液ではエキソソーム中に存在する。miRNA が上流因子であるという仮説は、特定の miRNA が *in vivo* で胚の発生を調節することを示唆しており、今後の培養液の改善に有用な知見であると考えられる。

核コードされたミトコンドリア遺伝子は IVD 胚でより高い発現レベルにあったが、ミトコンドリア自身のゲノムにコードされた遺伝子は、IVD 胚の発現レベルが低かった (Table 3)。これらの結果は、胚のミトコンドリアが *in vitro* と *in vivo* の条件の下で異なった状態で制御されていることを示している。

卵母細胞の場合、ミトコンドリア含有量が多いことは良好な卵母細胞の指標と報告されている (Zeng *et al.*, 2007; Wai *et al.*, 2010) が、胚盤胞期胚の場合は同様ではない。

近年、胚盤胞でミトコンドリア含量が低い場合、高い発達能力を有しているとの報告が散見される (Diez-Juan *et al.*, 2015; Seli *et al.*, 2016)。さらに、ウマにおいて IVD 胚と比較して、IVP 胚盤胞期胚では、ミトコンドリア DNA コピー数が高いと報告されている (Hendriks *et al.*, 2019)。また、ミトコンドリア DNA 含量が高いことは、胚の異数性と関連していることも報告されている (Maria *et al.*, 2018; Klimczak *et al.*, 2018)。本研究結果では、胚盤胞期胚の総細胞数は同じであるが、mtDNA のコピー数と TOMM20 (外側のミトコンドリア膜タンパク質) の発現レベルは、IVP 胚盤胞の方が高いことを示した。

ATP の産生はミトコンドリア機能の主要な 1 つであり、ATP は卵母細胞の品質を反映するマーカーの 1 つである (Stojkovic *et al.*, 2001; Ge *et al.*,

2012)。IVP および IVD ウシ胚盤胞の ATP 含有量に関する知見これまでに少なく、初期のマウスにおける研究 (Spielmann *et al.*, 1984) では、胚を *in vitro* で培養すると胚盤胞の ATP 含有量が増加したと報告している。本研究でも、IVP 胚盤胞の ATP 含有量が著しく高いことを観察した。これらの結果は、*in vitro* 培養条件でミトコンドリアの活性が異常に高いことを示唆している。

本研究の危惧される点は、*in vitro* で成熟、受精、および発生した胚盤胞と過排卵処理したウシから回収した胚盤胞を使用したことである。それぞれの胚作成ステップまたは過剰排卵プロセスは、胚の品質に影響を与えた可能性があるとの報告がある (Urrego *et al.*, 2014)。本研究で供試した胚は、IVD 胚盤胞が授精後 6.5 日であったのに対し、IVP 胚盤胞は受精後 7.0 日であり、IVD 胚が若い胚であった。さらに、受精のタイミング、すなわち、排卵および卵管内の精子-卵母細胞相互作用のタイミングは、IVD 胚については不明である。この違いは、供試した胚に異なる発達段階の胚が含まれていた可能性を示唆し、これらが遺伝子発現に影響した可能性がある。したがって、IVD と IVP 胚間に認められる差の原因因子を完全に定義することはできなかった。これらの問題を解決するためにはさらに、より多くの牛を供試した研究を行う必要がある。

本章の結論として、遺伝子発現レベルは IVP および IVD 胚間で異なり、体外で胚の質に悪影響を及ぼす分子背景とその結果が明らかとなり、高受胎や良質な胚を作成する基盤知識となりうると思う。

Table 1. IVD 胚と IVP 胚で発現が異なっていた(2.5 倍)遺伝子の機能解析

Origin	Term	P-Value
	Focal adhesion	7.24151E-11
	ECM-receptor interaction	1.8947E-09
IVP	PI3K-Akt signaling pathway	1.3372E-06
	Oxytocin signaling pathway	3.22306E-06
	Protein digestion and absorption	1.1462E-05
	Oxidation-reduction process	3.37163E-16
	Mitochondrion organization	3.79235E-12
IVD	Mitochondrial translation	7.73522E-12
	Cellular respiration	4.16333E-11
	Respiratory electron transport chain	5.72642E-10

Table 2. IVP 胚と比較し IVD 胚でのミトコンドリアタンパクをコードした核もしくはミトコンドリアゲノムの遺伝子発現の変化

Origin	Location	No of genes		
		Total	Down	Up
Mitochondria		19	19	0
	Inner membrane	58	5	53
	Outer membrane	23	5	18
Nucleus	Matrix	82	19	63
	Cytoplasmic side	24	7	18
	Integral membrane	59	13	46

変量が<-1.0 を Down,>1.0 を Up とした.

Table 3. IVD と IVP 胚間の発現変動遺伝子の上流因子

Chemical drug	Activation in VIVO Activation z-score	P value
curcumin	2.741	0.00584
mir-210	3.096	0.000303
mir-17	2.537	0.000852
mir-10	2.341	0.00171
mir-15	2.214	0.0293
mir-193	2.530	0.0377
mir-25	3.106	0.0481
5-azacytidine	-2.775	0.00384
Akt	-3.785	0.00412
caspase	-2.035	0.00296
Creb	-2.541	0.0000136
D-glucose	-2.184	5.39E-11
ERK	-3.030	0.0000464
hydrogen peroxide	-3.589	0.000283
NFkB (complex)	-2.321	0.000851
P38 MAPK	-3.852	0.00606
Tgf beta	-3.942	0.00164
trichostatin A	-2.403	0.00000227
Vegf	-2.077	8.86E-08

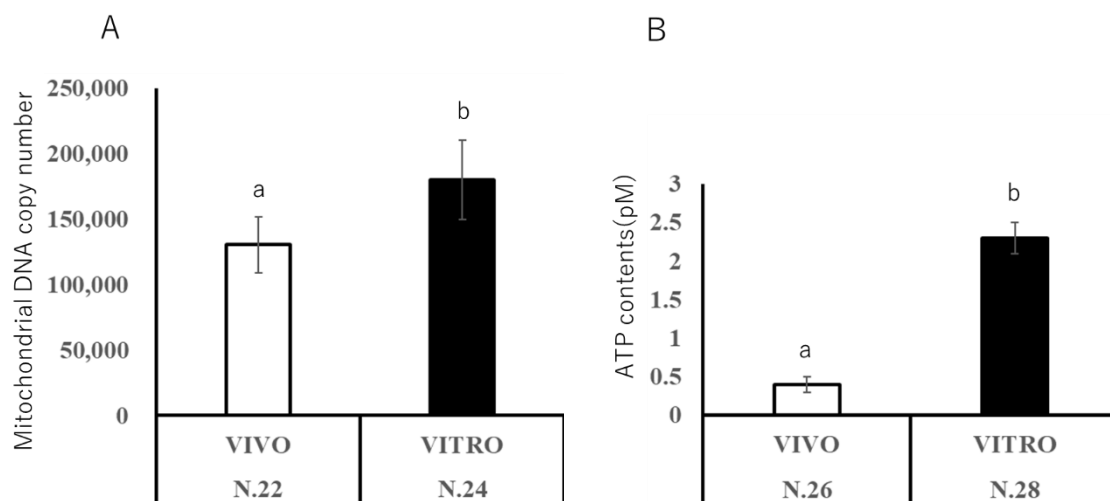


Fig. 1. IVD・IVP 胚盤胞期胚中のミトコンドリアゲノムコピー数と ATP 含量. a-b 間で有意差あり ($P < 0.05$)

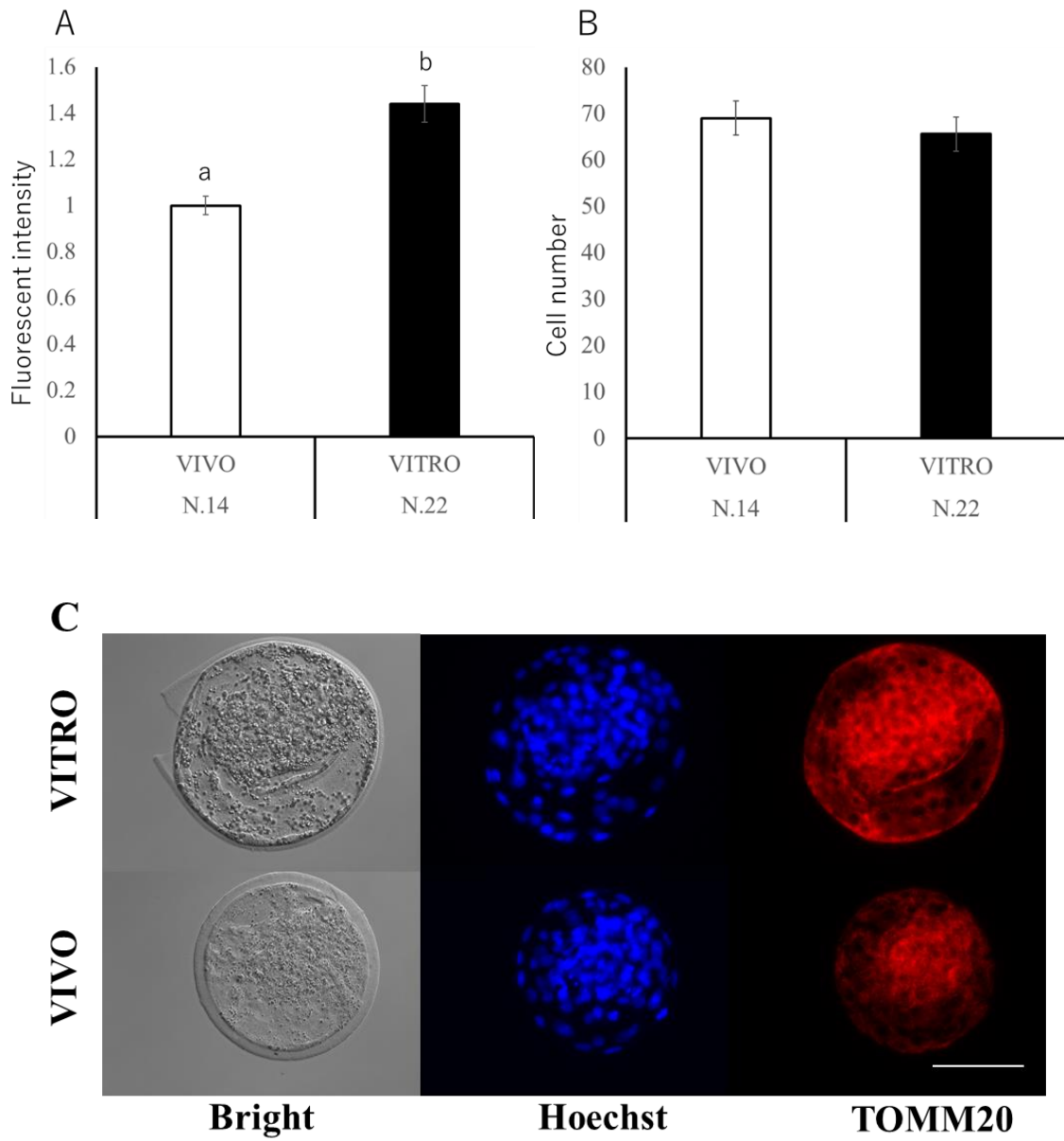


Fig. 2. TOMM20 発現レベル (A) と胚盤胞期胚の総細胞数 (B) IVD 胚の輝度を 1.0 に標準化 C:代表的な画像. a-b 間で有意差あり ($P < 0.05$)

Supplementary Table 1 A. IVD および IVP 胚間で発現が異なる遺伝子の
上流レギュレーター

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted State	Activation z-score	p-value of overlap
geldanamycin	chemical - endogenous non-mammalian	Activated	2.452	0.0396
LY294002	chemical - kinase inhibitor	Activated	3.713	3.4E-06
PD98059	chemical - kinase inhibitor	Activated	2.975	1.35E-05
SB203580	chemical - kinase inhibitor	Activated	4.307	0.0129
PP2/AG1879 tyrosine kinase inhibitor	chemical - kinase inhibitor	Activated	2.332	0.0482
sirolimus	chemical drug	Activated	2.262	1.48E-10
camptothecin	chemical drug	Activated	3.233	8.13E-10
plicamycin	chemical drug	Activated	3.478	2.26E-06
arsenic trioxide	chemical drug	Activated	2.347	9.74E-05
halofuginone	chemical drug	Activated	2.621	0.00382
curcumin	chemical drug	Activated	2.741	0.00584
actinomycin D	chemical drug	Activated	3.557	0.00871
vitamin E	chemical drug	Activated	2.297	0.0221
ramipril	chemical drug	Activated	3.162	0.029
eplerenone	chemical drug	Activated	2.597	0.0323
cycloheximide	chemical reagent	Activated	3.207	0.000497
1,2-dithiol-3-thione	chemical reagent	Activated	2.474	0.000676
BAPTA-AM	chemical reagent	Activated	2.097	0.0176
4-nitroquinoline-1-oxide	chemical toxicant	Activated	2.236	0.0318
KRAS	enzyme	Activated	2.035	1.17E-10
RHEB	enzyme	Activated	2.382	7.85E-05
POR	enzyme	Activated	3.573	0.00114
ACACB	enzyme	Activated	2.425	0.0318

Suupplementary Table 1 B.

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted State	Activation z-score	p-value of overlap
GPR37	g-protein coupled receptor	Activated	2.216	0.0138
estrogen receptor	group	Activated	2.135	3.26E-08
ADRB	group	Activated	3.903	2.28E-06
ANGPT1	growth factor	Activated	2.419	0.0204
PKD1	ion channel	Activated	2.65	0.000211
PEX5L	ion channel	Activated	2.425	0.00851
PRKAA2	kinase	Activated	2.034	0.0116
AHR	ligand-dependent nuclear receptor	Activated	2.003	0.000976
NR0B2	ligand-dependent nuclear receptor	Activated	2.764	0.0153
miR-200b-3p	mature microRNA	Activated	2.668	0.00726
mir-210	microRNA	Activated	3.096	0.000303
mir-17	microRNA	Activated	2.537	0.000852
mir-10	microRNA	Activated	2.341	0.00171
mir-15	microRNA	Activated	2.214	0.0293
mir-193	microRNA	Activated	2.53	0.0377
mir-25	microRNA	Activated	3.106	0.0481
FBN1	other	Activated	3.12	0.0013
MIR17HG	other	Activated	2.474	0.00134
LMNB1	other	Activated	2.621	0.00192
CR1L	other	Activated	3.212	0.00273
UPF2	other	Activated	2.01	0.00424
NPPB	other	Activated	2.596	0.00424
PEBP1	other	Activated	2.183	0.0226
RBM5	other	Activated	2.012	0.0331
RB1	transcription regulator	Activated	2.3	3.29E-08

Suupplementary Table 1 C.

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted State	Activation z-score	p-value of overlap
VHL	transcription regulator	Activated	2.212	3.29E-07
E2F3	transcription regulator	Activated	2.201	2.27E-06
KLF3	transcription regulator	Activated	2.017	8.53E-06
SNAI1	transcription regulator	Activated	2.331	1.62E-05
SPDEF	transcription regulator	Activated	3.549	3.43E-05
SMAD7	transcription regulator	Activated	4.241	9.69E-05
SMAD5	transcription regulator	Activated	2.395	0.000197
TAF4	transcription regulator	Activated	2.688	0.0017
HOXC8	transcription regulator	Activated	2.138	0.00189
FOXA1	transcription regulator	Activated	2.011	0.00326
FOXF2	transcription regulator	Activated	2.425	0.0228
WWC1	transcription regulator	Activated	2.236	0.0376
GnRH analog	biologic drug	Inhibited	-2.008	1.04E-10
ghrelin	biologic drug	Inhibited	-2	0.00765
vancomycin	biologic drug	Inhibited	-2.2	0.041
D-glucose	chemical - endogenous mammalian	Inhibited	-2.184	5.39E-11
tretinoin	chemical - endogenous mammalian	Inhibited	-4.333	6.22E-11
dihydrotestosterone	chemical - endogenous mammalian	Inhibited	-2.458	7.39E-07
nitric oxide	chemical - endogenous mammalian	Inhibited	-2.156	0.000134

Suupplementary Table 1 D.

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted State	Activation z-score	p-value of overlap
hydrogen peroxide	chemical - endogenous mammalian	Inhibited	-3.589	0.000283
cholic acid	chemical - endogenous mammalian	Inhibited	-2.17	0.00348
sphingosine-1-phosphate	chemical - endogenous mammalian	Inhibited	-2.055	0.0313
benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu aldehyde	chemical - protease inhibitor	Inhibited	-3.489	0.00351
lactacystin	chemical - protease inhibitor	Inhibited	-3.017	0.00471
lipopolysaccharide	chemical drug	Inhibited	-3.055	1.36E-09
dexamethasone	chemical drug	Inhibited	-2.709	3.03E-09
decitabine	chemical drug	Inhibited	-5.924	2.61E-07
doxorubicin	chemical drug	Inhibited	-3.26	4.13E-07
trichostatin A	chemical drug	Inhibited	-2.403	2.27E-06
CD 437	chemical drug	Inhibited	-2.083	4.08E-06
fulvestrant	chemical drug	Inhibited	-2.138	1.81E-05
valproic acid	chemical drug	Inhibited	-2.991	2.01E-05
calcitriol	chemical drug	Inhibited	-3.271	6.82E-05
cocaine	chemical drug	Inhibited	-2.644	0.000623
phorbol myristate acetate	chemical drug	Inhibited	-3.847	0.000705
dimethyl sulfoxide	chemical drug	Inhibited	-2.25	0.000902
isoquercitrin	chemical drug	Inhibited	-2.975	0.00102
ezetimibe	chemical drug	Inhibited	-2.796	0.0012
mitomycin C	chemical drug	Inhibited	-2.191	0.00169
bexarotene	chemical drug	Inhibited	-2.086	0.00191
5-azacytidine	chemical drug	Inhibited	-2.775	0.00384
isoproterenol	chemical drug	Inhibited	-2.968	0.00583
SN-38	chemical drug	Inhibited	-2.449	0.00719
lovastatin	chemical drug	Inhibited	-3.109	0.0132

Suupplementary Table 1 E.

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted State	Activation z-score	p-value of overlap
phenacetin	chemical drug	Inhibited	-2.271	0.0176
pitavastatin	chemical drug	Inhibited	-2.957	0.0249
gentamicin C	chemical drug	Inhibited	-2.236	0.0263
gemcitabine	chemical drug	Inhibited	-2.019	0.0293
daunorubicin	chemical drug	Inhibited	-2.037	0.0323
triamterene	chemical drug	Inhibited	-2.046	0.0423
metribolone	chemical reagent	Inhibited	-2.101	0.000327
cobalt chloride	chemical reagent	Inhibited	-2.1	0.000774
hexamethylene bisacetamide	chemical reagent	Inhibited	-2.054	0.00633
fenamic acid	chemical reagent	Inhibited	-2.303	0.0364
thioacetamide	chemical toxicant	Inhibited	-3.622	3.66E-05
benzo(a)pyrene	chemical toxicant	Inhibited	-2.059	5.09E-05
thapsigargin	chemical toxicant	Inhibited	-2.209	0.0116
hexachlorobenzene	chemical toxicant	Inhibited	-2.099	0.0179
NFkB (complex)	complex	Inhibited	-2.321	0.000851
Cg	complex	Inhibited	-2.381	0.00324
PI3K (complex)	complex	Inhibited	-4.168	0.00418
Smad2/3-Smad4	complex	Inhibited	-2.184	0.0134
T3-TR-RXR	complex	Inhibited	-3.85	0.0139
OSM	cytokine	Inhibited	-3.165	1.17E-08
EDN1	cytokine	Inhibited	-3.909	5.37E-06
PRL	cytokine	Inhibited	-2.273	1.92E-05
CD40LG	cytokine	Inhibited	-2.103	0.000238
IL4	cytokine	Inhibited	-2.305	0.00107
IFNA2	cytokine	Inhibited	-2.73	0.00236
CD44	enzyme	Inhibited	-3.066	2.1E-06
OGT	enzyme	Inhibited	-2	8.82E-05
CYP7A1	enzyme	Inhibited	-2.538	0.000153

Suupplementary Table 1 F.

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted State	Activation z-score	p-value of overlap
GNA12	enzyme	Inhibited	-2.262	0.00728
AKR1B1	enzyme	Inhibited	-2.213	0.0217
ADORA2A	g-protein coupled receptor	Inhibited	-2.003	0.00127
GPER1	g-protein coupled receptor	Inhibited	-2.077	0.0054
FSHR	g-protein coupled receptor	Inhibited	-2.975	0.0242
Vegf	group	Inhibited	-2.077	8.86E-08
Creb	group	Inhibited	-2.541	1.36E-05
ERK	group	Inhibited	-3.03	4.64E-05
Tgf beta	group	Inhibited	-3.942	0.00164
caspase	group	Inhibited	-2.035	0.00296
Akt	group	Inhibited	-3.785	0.00412
P38 MAPK	group	Inhibited	-3.852	0.00606
TGFB1	growth factor	Inhibited	-5.719	1.81E-16
TGFB3	growth factor	Inhibited	-3.907	3.62E-05
NGF	growth factor	Inhibited	-2.201	3.66E-05
AGT	growth factor	Inhibited	-4.727	5.18E-05
TGFB2	growth factor	Inhibited	-3.416	6.82E-05
INHBA	growth factor	Inhibited	-3.805	0.000117
FGF2	growth factor	Inhibited	-2.853	0.00132
IGF1	growth factor	Inhibited	-3.388	0.00764
TGFA	growth factor	Inhibited	-2.097	0.0362
PTK2	kinase	Inhibited	-2.01	6.19E-06
PRKCE	kinase	Inhibited	-2.667	0.00181
RAF1	kinase	Inhibited	-2.439	0.00314
EIF2AK4	kinase	Inhibited	-2.382	0.0066
CHUK	kinase	Inhibited	-2.8	0.00902
MAPK9	kinase	Inhibited	-2.555	0.0109
IKBKB	kinase	Inhibited	-2.886	0.014

Suupplementary Table 1 G.

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted State	Activation z-score	p-value of overlap
MAP2K1	kinase	Inhibited	-2.414	0.0247
ESR1	ligand-dependent nuclear receptor	Inhibited	-2.925	5.21E-24
AR	ligand-dependent nuclear receptor	Inhibited	-2.692	0.00001
PGR	ligand-dependent nuclear receptor	Inhibited	-2.598	0.000269
RICTOR	other	Inhibited	-4.097	1.23E-11
NRG1	other	Inhibited	-2.662	2.29E-05
PTH	other	Inhibited	-2.027	0.000292
SERPINA3	other	Inhibited	-2	0.000452
CYR61	other	Inhibited	-3.485	0.0058
AMER1	other	Inhibited	-2	0.0192
SH2B3	other	Inhibited	-2	0.0192
F2	peptidase	Inhibited	-2.937	2.59E-06
MBTPS1	peptidase	Inhibited	-2.333	0.000219
HTT	transcription regulator	Inhibited	-3.072	1.64E-11
CTNNB1	transcription regulator	Inhibited	-3.814	1.58E-10
KDM5A	transcription regulator	Inhibited	-3.979	1.89E-08
SP1	transcription regulator	Inhibited	-3.785	6.25E-08
HIF1A	transcription regulator	Inhibited	-4.284	1.02E-07
EGR1	transcription regulator	Inhibited	-3.813	1.28E-06
GLI1	transcription regulator	Inhibited	-3.195	1.49E-06
CDKN2A	transcription regulator	Inhibited	-3.474	1.72E-06

Suupplementary Table 1 H.

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted State	Activation z-score	p-value of overlap
TCF7L2	transcription regulator	Inhibited	-4.288	2.95E-06
SMARCA4	transcription regulator	Inhibited	-3.328	4.42E-06
EP300	transcription regulator	Inhibited	-2.298	2.12E-05
PPARGC1B	transcription regulator	Inhibited	-2.566	2.18E-05
SREBF2	transcription regulator	Inhibited	-3.535	2.26E-05
ERG	transcription regulator	Inhibited	-3.772	2.52E-05
KLF4	transcription regulator	Inhibited	-3.073	3.07E-05
MYOCD	transcription regulator	Inhibited	-2.316	4.76E-05
SREBF1	transcription regulator	Inhibited	-5.135	5.09E-05
SOX4	transcription regulator	Inhibited	-3.211	0.000744
MYOD1	transcription regulator	Inhibited	-2.386	0.00151
EGR2	transcription regulator	Inhibited	-2.672	0.00254
CEBPA	transcription regulator	Inhibited	-2.794	0.00293
HNF1A	transcription regulator	Inhibited	-2.886	0.00307
ATF4	transcription regulator	Inhibited	-2.91	0.0033
ETV4	transcription regulator	Inhibited	-2.155	0.0166
EBF1	transcription regulator	Inhibited	-2.839	0.0169
ARNT	transcription regulator	Inhibited	-2.093	0.0174
CDX2	transcription regulator	Inhibited	-2.002	0.0177
TOB1	transcription regulator	Inhibited	-2.164	0.0232

Suupplementary Table 1 I.

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted State	Activation z-score	p-value of overlap
SMAD2	transcription regulator	Inhibited	-2.19	0.0414
SMARCB1	transcription regulator	Inhibited	-2.277	0.0425
ITGA5	transmembrane receptor	Inhibited	-2.991	0.000437
ATP7B	transporter	Inhibited	-2.5	0.00104
ABCB6	transporter	Inhibited	-3.015	0.0037

Supplementary Table 2 IVD および IVP 胚間のハウスキーピング遺伝子の発現レベル

Name	Fold Change	P-Value
ATP5F1B	3.472468306	0
ATP5F1C	2.72931513	0
ATP5F1D	3.111822042	0
ATP5F1E	2.336884366	0
RPLP0	-2.399189941	0
RPS18	-1.94437609	0
PPIA	2.26404619	0
TFRC	-4.344992075	0
RPLP1	-2.548654792	0
HPRT1	3.427693936	0
TBP	2.055735901	0
GAPDH	1.570291761	6.197E-11
ACTB	3.476044971	0
B2M	1.9113208	0
PGK1	2.174724813	0
GUSB	1.234961642	0.003732
YWHAZ	2.170849883	0

第三章 ウシの妊娠率向上に向けた単為生殖胚追い移植

第一節 緒言

泌乳期の乳牛における繁殖成績は、日本を含む世界各国で徐々に低下しており、中でもリピートブリーダーはウシの最も重大な生殖障害の一つである。リピートブリーダーは一般的に、生殖器に解剖学的な異常がなく、または感染性疾患はなく、明瞭な発情周期を示すにも関わらず、3回以上の交配やAIを試みた後も受胎しないウシとして定義されている (Dochi *et al.*, 2008)。この状態の生理学的な原因は多岐に渡り、特定することは難しい。ウシにおけるリピートブリーダー症候群の発症メカニズムは複雑であり、プロゲステロン (P4)、エストラジオール、上皮成長因子、黄体形成ホルモンなどの複数の内分泌機能障害を示す (Båge *et al.*, 2002; Canu *et al.*, 2010; Katagiri *et al.*, 2013)。

リピートブリーダー症候群を予防および改善するために、内分泌機能の調節を目的とした多くの治療法が試みられ、提案されてきた。例えば、リピートブリーダーの受胎率の改善には、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、P4製剤 (controlled internal drug release)、外因性安息香酸エストラジオール、およびこれらの組み合わせなどが報告されている (Son *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007)。

リピートブリーダーの繁殖対策として胚の利用も検討されてきた。ウシ胚の栄養膜小胞と IVP 胚の同時移植では、妊娠初期での IVP 胚の受胎性を高め (Hashiyada *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2012)、AI 後に ET を実施する“追い移植”では、リピートブリーダーの受胎率が改善され、生殖補助技術として使用できることが分かってきた (Dochi *et al.*, 2008; Canu *et al.*, 2010)。

筆者らはリピートブリーダーに AI 後に IVP 胚を追い移植することで、反芻動物の妊娠認識シグナルである IFNT の産生と放出が起こり (Imakawa *et al.*, 1987)、受胎率が改善したことを報告している (Yaginuma *et al.*, 2019)。

しかし、AI 後の ET では、リピートブリーダーでの双子発生率 (6.25～18.4% (Dochi *et al.*, 2008; Canu *et al.*, 2010; Yaginuma *et al.*, 2019)) が、通常の AI での双子発生率 (乳牛で 0.3%～5%) に比べ、かなり高率であるとの報告があり、双子の発生と分娩事故の発生率との間には強い関連性があるため (Miyake *et al.*, 2010)、双子を回避し且つ受胎率を改善する別の方法が求められている。

PA 胚は、オスの配偶子なしで卵母細胞が発生する胚であり、哺乳類では自然発生しないプロセスである。受精中に、精子は卵母細胞で細胞内遊離カルシウムの律動的な振動を引き起こす。この細胞内カルシウムパターンは、いくつかの化学物質によって再現でき、精子なしで卵母細胞を活性化するため、食肉処理場由来のウシ卵巢の卵子から簡単に PA 胚を生産できる (Gómez *et al.*, 2009; Labrecque *et al.*, 2011)。

PA 胚は IFNT を産生および分泌する可能性があるが (Hirayama *et al.*, 2014)、子宮内で受胎することはなく、胎子まで発育した場合も心拍はなく最大 48 日間存在したとの報告がある (Fukui *et al.*, 1992)。

平山らは、PA 胚と低グレードの IVP 胚を同時移植することにより、同グレードの IVP 胚単独での移植と比較して、40 日目の妊娠率が大幅に改善されたと報告している (Hirayama *et al.*, 2014)。これは、PA 胚が妊娠の母親の認識を高めるのに十分な IFNT 量を供給したことを示唆している。しかしながら、ウシに AI 後、PA 胚を移植した影響を調べた報告はほとんど見当たらない。

そこで、PA 胚は双子の危険性を回避しながら IFNT 分泌を高める可能性

があり、AI 後に PA 胚を移植する生殖技術は、リピートブリーダーの受胎率を改善できると仮定した。

リピートブリーダーで大規模な PA 胚追い移植試験を実施する前に、実験室レベルで PA 胚使用の有効性と安全性を詳細に確認する必要があると考えられた。

したがって、本研究では、まず PA 胚の IFNT 産生および他の細胞に対する IFN 応答性について、IVP 胚と比較した。次に、*in vivo* で PA 胚の役割を明らかにするため、黄体機能（血漿 P4 濃度）および IFN 応答（interferon-stimulated genes (ISG)、IFN のマーカー遺伝子を用いた評価）に対する PA 胚移植の影響を健康な黒毛和種の末梢血サンプルを用い調査した。また、リピートブリーダーに対して PA 胚追い移植試験を実施した。

第二節 材料および方法

1) 体外成熟と体外受精

in vitro での成熟と受精は、既報により (Hamano *et al.*, 1993) 下記のとおり行った。

食肉処理場由来のウシ卵巣を実験室に運び、直径 2~5mm の卵胞より卵丘細胞卵子複合体 (COCs) を吸引し、5%ウシ胎児血清 (FBS; HyClone、GE Healthcare UK Ltd.、Buckinghamshire、England) を添加した 20 mM HEPES を含む TCM-199 (Gibco BRL、Rockville、MD、USA) で 3 回洗浄した。

COCs は、気相条件 2%CO₂、98% in air で 100%湿度、38.5°C で 20~21 時間成熟培養した。

その後、10 mg/ml ウシ血清アルブミンと 10 µg/ml ヘパリンを含む BO 液 1 ml の中で、成熟した卵母細胞と黒毛和種凍結融解精液 (2×10⁷ 細胞/ml に調整) を共培養し、気相条件 5%CO₂、95% in air で 100%湿度、38.5°C で 5 時間媒精した。

2) 単為発生

ウシ卵母細胞の体外成熟は上記 1) と同様に行った。

成熟後、ヒアルロニダーゼを使用して卵母細胞から卵丘細胞を除去した。

卵母細胞は、7%エタノール加里ン酸緩衝液中に 1 分間暴露を 2 回行い、次に、10 µg/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich, St. Louis, CA, USA) および 5 µg/ml cytochalasin B (Sigma-Aldrich) を含む修正合成卵管液で、気相条件 5%CO₂、95% in air で 100%湿度、38.5°C で 6 時間培養することで活性化させた。

活性化させた卵母細胞は洗浄し、下記のように培養した。

3) IVP および PA 胚培養および胚の凍結

体外受精 (IVF) または単為発生 of 活性化の後、卵母細胞を新鮮な TCM-199 培地に入れ、既報のとおり胚を卵丘細胞と共培養した (Hamano *et al.*, 1993)。

培地は 2 日ごとに交換した。7 日目に、IETS マニュアル [https://www.iets.org/pub_manual.asp]により評価し、grade 1 および 2 の胚盤胞に発達した胚は、細胞数カウントのために染色、もしくは遺伝子発現を分析するために供試した。

IVP および PA の 10 個以上の拡張胚盤胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、ヨウ化プロピジウムで染色、顕微鏡下で細胞数を計測した。

さらに、7 日目に発生した良質の胚は、20 mM HEPES および 5%FCS を補充した 0.35 mg / ml 重炭酸ナトリウムを含む修正 TCM-199 に 1.4 M glycerol を添加した凍結培地中で凍結した。胚は凍結培地に直接移し、各胚を 0.25 ml のプラスチックストロー (Fujihira, Tokyo, Japan) に封入した。

胚を封入したストローは、-6°C に予冷しておいたプログラムフリーザー (EYELA, Tokyo, Japan) のアルコール槽に入れ、1 分後植氷、さらに 9 分間維持した後、-0.33°C / min の速度で -25°C に冷却した。その後 5 分間保持し、液体窒素に浸漬し保存した。

4) RNA 抽出、cDNA 生成、リアルタイム PCR

胚の総 RNA は、RNAqueous total RNA isolation kit を用いて製造元 (Thermo Fisher Scientific Inc., Tokyo, Japan) の指示に従い調製した。

RNA の抽出と cDNA の生成は、市販のキット (ReverTra Ace; Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いた。

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) は、CFX Connect™ Real Time

PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて行われ、IFNT、ISG15、MX dynamin like GTPase 2 (MX2)、または glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現を検出するには市販キット (Thunderbird SYBR qPCR Mix; Toyobo Co., Ltd) を用いた。

リアルタイム PCR に使用したプライマーは以下のとおり。

IFNT は forward, 5' - CATCTTCCCCATGGCCTTCG-3' and reverse, 5' - TCATCTCAAAGTGAGTTCAG-3' (accession no. AF238613); ISG15 は forward, 5' -GGTATGATGCGAGCTGAAGCACTT-3' and reverse, 5' -ACCTCCCTGCTGTCAAGGT-3' (accession no. NM_174366); MX2 は forward, 5' - GGACAGCGGAATCATCAC-3' and reverse, 5' - CTCCCGCTTTGTCAGTTTCAG-3' (accession no. NM_173941); GAPDH は forward, 5' - ACAGTCAAGGCAGAGAACGG-3' and reverse, 5' - CCACATACTCAGCACCAGCA-3' (accession no. NM_001034034)。

RT-qPCR は、SYBR Green 10 μ l、蒸留水 7.8 μ l、100 μ M フォワードおよびリバースプライマー 0.1 μ l、および cDNA テンプレート 2 μ l を含む最終反応量 20 μ l で 2 回繰り返して実行した。

増幅プログラムは、95°C で 5 分間の変性とそれに続く 40 サイクルの増幅 (95°C で 15 秒間、60°C で 20 秒間、および 72°C で 10 秒間) とした。

各ターゲット遺伝子の発現レベルは、 $\Delta \Delta$ CT comparative method (Presicce et al., 1994) を用い、対応する GAPDH threshold cycle (CT) 値で正規化した。

各 PCR 産物の相対量は、GAPDH を内部標準として、比較計算した。

5) *in vitro* の場合 : IVP 胚の生産と馴化培地の収集

IVF または単為発生活性化の後、COCs は新たな TCM-199 培地に入れ、

共培養とした（100 fertilized embryos/1 ml of culture medium）。

7日間培養した後、胚の発生状況を確認した、また、3～5回の反復した実験でそれぞれ培地を回収した。IVPの場合、culture-conditioned media (CM) 中に、平均 15.3 個の脱出胚盤胞と 38.6 個の胚盤胞胚が存在し、PA では、CM 中に、平均で 9.2 個の脱出胚盤胞と 41.0 個の胚盤胞胚が存在した。

CM サンプル (n = 3-5) は、供試するまで凍結保存した。

7日間培養した後、孵化していない IVP および PA 拡張胚盤胞 (grades 1 or 2) を選択し、個別のドロップ (50 μ l) に移し、さらに 1日間培養し、各胚の孵化状態 (透明帯からの脱出の有無) を確認した後、個々の胚を培養した CM をサンプリングした。

合計で、孵化した IVP-CM を 15 サンプル、非孵化の IVP-CM を 30 サンプル、孵化した PA-CM を 6 サンプル、および非孵化の PA-CM を 46 サンプル供試材料とした。これらの CM サンプルは、ISG15 プロモーター活性を調べるまで凍結保存した。

6) *in vitro* の場合：脾臓免疫細胞の調製と胚培養 CM の処理

胚培養の CM が他の細胞におよぼす影響を調べるために、免疫細胞の代表例として脾細胞を使用した (Yaginuma *et al.*, 2019)。

食肉処理場由来の脾臓を小片に切断し、ヘパリンと抗生物質 (amphotericin B and gentamicin, Sigma-Aldrich) を含む PBS で細かく刻み、500 \times g で 10 分間遠心分離した。試験管底に沈殿した細胞のペレットを再懸濁し、ろ過した (70 μ m, Corning Incorporated, Corning, NY, USA)。細胞を洗浄し、赤血球の溶解のために Ammonium-Chloride-Potassium lysing buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) で処理し、5%FBS を含む RPMI 1640 培地 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)

に再懸濁した。

次に、脾臓の免疫細胞を、IVP 胚および PA 胚の CM で、38° C で 6 時間処理した。この際、vehicle CM は、卵丘細胞のみの培養とした。

培養後、細胞を ISOGEN II (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いてサンプリングし、mRNA 発現を分析した。また、分析に供試するまでは-80° C で保存した。

7) *In vitro* の場合 : ISG15 promoter luciferase assay

胚培養に用いた CM における IFNT 活性を測定するため、ISG15 promoter-reporter vector を導入した MDBK 細胞を使用した (Yaginuma *et al.*, 2019; Livak *et al.*, 2001)。

細胞は、抗体と 5%FBS を含む DMEM / F-12 (Sigma-Aldrich) を用い、96 ウェル細胞培養プレートに 1.0×10^5 細胞/ウェルの密度で播種し 24 時間培養した。

細胞は、IVP 胚および PA 胚の CM で、38° C で 6 時間処理した。この際、vehicle CM は胚の無い CM (卵丘細胞のみの培養) とした。

MDBK 細胞の培養培地をサンプリングした後、ルシフェラーゼ活性を Luciferase Reporter Assay System を用い、製造元 (Promega Co., Madison, WI, USA) 指示に従って測定した。蛍光度の測定は、マイクロプレートリーダー (Spark 10M; TECAN Group Ltd., Männedorf, Switzerland) を用いて行った。

8) *in vivo* の場合 : 受胎牛と PA 胚移植

すべての実験手順は、東京農業大学の産業動物の管理と使用に関するガイドラインに準拠しており、すべての供試動物の管理手順は、本学の動物実験委員会によって承認された。

直腸検査によって、健康な子宮と卵巣を持った本学農場の黒毛和種を供試した。

AI は、発情周期の 0 日目に、1 本の凍結精液（市販されている黒毛和種）を 38°C の温湯に 15 秒浸漬、解凍した後直腸腔法で行った。

PA 胚は、発情周期の 7 日目に、黄体を伴う卵巣の同側の子宮角に非外科的に移した。

供試牛は 3 グループに分けた：Group1 (n = 10) は AI を実施、Group2 (n = 4) は PA 胚移植を実施、Group3 (n = 15) は AI 実施後 7 日目に PA 胚を追い移植した。

発情周期の 7、14、21、28 日目に血液サンプルを尾静脈より採取した。mRNA 発現変化の測定には、Blood RNA Cards (FortiusBio LLC、San Diego、CA) を用い、製造元の指示に従い全血を吸着させ、2 時間乾燥させた後、-20° C で凍結、分析まで保管した。

妊娠診断は、授精後 40 日目に直腸検査による触診で行った。

9) P4 測定

血漿中 P4 濃度の測定は、直接酵素免疫測定法 (EIA) を用いて既報により実施した (Miyamoto *et al.*, 1992)。P4 のアッセイ内およびアッセイ間変動係数は、それぞれ 4.7 および 6.5% であった。

10) 受胎牛と PA 胚：野外移植試験

北海道東部地域の酪農場飼養のリピートブリーダー (Dochi *et al.*, 2008) と診断されたホルスタイン種を受胎牛して供用した。

供試牛の選定条件は、(1) 発情周期は不規則なことがあるが、発情行動は認められ、(2) 直腸検査による触診により子宮および卵巣に異常を認めず、さらに (3) 正常な発情行動に続く 3 回以上の授精で不受胎であることとし

た。

これらの供試牛は、4～6回または7～9回のAIで妊娠しなかった牛群に分け、成績をまとめた。

PA胚の追い移植はAIの7または8日後に実施した。また、市販の黒毛和種凍結精液をAIに用いた。

PA胚は、黄体のある卵巣の同側の子宮角に非外科的に移植した。

繁殖記録から、4～6回または7～9回のAIで受胎しなかったホルスタイン種のその後のAIによる受胎成績を対照とした。

妊娠診断は、授精後40～60日目に直腸検査による触診で実施した。

11) 統計分析

すべてのデータは平均値±標準誤差として示した。

データ間の統計的有意性は、Student's t-test または一元配置分散分析とその後の Bonferroni's multiple comparison test によって検討した。

第三節 結果

IVP および PA 胚の特性の比較

培養 7 および 8 日後に胚盤胞期に発達した IVP および PA 胚の割合を Table 4. に示す。培養 8 日目までに胚盤胞期まで発生した胚は、PA 胚よりも IVP 胚で高率であった。

8 日目に培養中の IVP および PA 胚の代表的な写真を Figure 3-A に示す。PA 胚は IVP 胚よりも総細胞数が少なかった (Figure 3-A)。

既報と同様に、IFNT mRNA の発現は、凍結および解凍に関係なく、IVP 胚よりも PA 胚で有意に高かった (Figure 3-B)。

IVP および PA 胚の CM 処理後の IFN 活性の比較

IVP および PA 胚双方共、末梢免疫細胞を含む他の細胞に影響をおよぼす IFNT の産生を調査するため、IVP または PA 胚もしくは CM または cultured vehicle CM (卵丘細胞のみ) を Figure 4-A および 4-B に示す。

ISG15 と MX2 双方の mRNA 発現は、IVP および PA 胚を CM で処理することで明らかに刺激された。

MX2 mRNA 発現の増加の刺激効果は、IVP 胚の CM と比較して PA 胚の CM でより高かった (Figure 4-B)。

ISG15 転写に対する培養 IVP および PA 胚の効果を確認するために、ISG15 promoter-reporter vector を導入した MDBK 細胞を使用した。

CM で処理した細胞は、IVF および PA 胚の CM と反応性の特異的な増加を示したが、cultured vehicle CM は示さなかった (Figure 4-C)。

ISG15 プロモーター活性の増加は、IVP 胚の CM と比較して PA 胚の CM の方が高かった (Figure 4-C)。

これらの結果は、IVP および PA 胚の両方が IFNT を生産および放出し、

ISG15 遺伝子発現の刺激をもたらすことを示唆している。

IVP および PA 胚の CM で処理した孵化前と孵化後の胚盤胞間での IFN 活性の比較

透明帯からの孵化は、着床前胚が子宮に付着するための前提条件である。

透明帯から孵化した後、胚盤胞期胚は伸長胚となり、IFNT の分泌が増加する。逆に、7 日目で非孵化のウシ胚は子宮内で IFNT を分泌し、*in vivo* で子宮の微小環境に影響することが報告されている (Rashid *et al.*, 2018)。そこで、孵化していない胚と孵化した胚を別々に培養して、それぞれの IFN 活性を比較した。

供試した卵母細胞数または胚盤胞数の双方に対して、孵化した PA 胚よりも IVP 胚の割合が有意に高かった (Table 5)。さらに、ISG15 プロモーター活性に対する個別培養した孵化前または孵化後の IVP および PA 胚での CM の効果を調べた (Figure 5)。

孵化していない IVP および PA 胚の CM が ISG15 プロモーター活性を著しく刺激した。孵化した IVP および PA 胚の CM は、孵化していない IVP および PA 胚の CM よりも有意に高い IFN 活性を示した。

孵化したかどうかにかかわらず、PA 胚の IFN 活性は IVP 胚よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。

黒毛和種における PA 移植の影響

合計 29 頭の黒毛和種を供試し、PA 移植の影響を調査した (Table 6)。

AI グループを対照群としたが、その妊娠率は 60.0%であった。PA 胚移植の安全性を IVP 胚移植の安全性と同程度とする確認のため、発情周期の 7 日目に、PA 胚 1 個を非黄体側の子宮角に移植した。PA 胚を移植したすべてのウシは受胎しなかった。AI 後の PA 胚移植 (AI + PA) の結果、妊娠率

は 53.3% であり、AI のみの場合と同等の妊娠率であった。また、AI、PA、および AI + PA グループで受胎しなかったウシが発情回帰した平均日数は、それぞれ 20.5、26.0、および 28.4 日であった。AI から 28~40 日で子宮の超音波画像診断により、AI での妊娠群では胎子を確認したが、PA 群では胎子の確認はできなかった。さらに、受胎を確認した全ての供試牛で、双子生産は確認されなかった。AI + PA 群において後期胚吸収または流産の確認はできず、すべての供試牛で正常な分娩が観察された。

発情から 7、14、21、および 28 日に採血し、血漿中 P4 濃度および白血球における ISG の mRNA 発現に対する PA 胚移植による影響を調査した。

血漿中 P4 濃度は AI および PA 群と比較して AI + PA 群では 14 日目（移植後 7 日）で高かった（Figure 6-A）。21 日目では、PA および AI + PA（非妊娠）群で漸減したが、AI（妊娠）および AI + PA（妊娠）群ではより高いレベルで維持した。28 日目では、AI + PA（妊娠）群が他の群よりも有意に高い値を示した（ $p < 0.05$ ）。

Figure 6-B および 6C に、ISG15 および MX2 の mRNA 発現を示す。

ISG15 および MX2 の mRNA 発現は、発情から 21 日目に、AI + PA（非妊娠）群よりも AI（妊娠）群で有意に高かった。さらに、AI + PA（妊娠）群が他の 3 つの群よりもさらに高い値を示した。また、PA 群では、実験を通して漸増した。

リピートブリーダーのホルスタイン種における PA 胚追い移植の影響：野外試験

リピートブリーダーと診断されたホルスタイン種 95 頭に PA 胚の追い移植を実施した結果、38.9% が受胎した。対照として診断後も AI を実施した牛群では 32.0% であり PA 胚追い移植群で受胎率が高い傾向が認められた。

この結果をさらに詳細に検討するため、AI 4~6 回受胎しなかった群と 7

～9回受胎しなかった群に分けたところ、AI 4～6回の群では追い移植を実施した群の受胎率は37.9% (22/58頭)でありAIのみの群32.7% (603/1,843頭)と有意な差は認められなかったが、AI 7～9回の群では、40.5% (15/37頭)と29.4% (158/536頭)となりPA胚移植群で有意に高い受胎率を示した (Table 7)。

第四節 考察

本研究では、まず PA 胚の特徴を特定した。

胚の透明帯からの脱出は、子宮に着床するための必須な条件である。胚盤胞期の胚は孵化した後、細長く伸長し、IFNT の分泌が増加する。一方、7 日目に孵化していないウシ胚も IFNT を分泌し、子宮内の微小環境を調節するとの報告もある (Rashid *et al.*, 2018)。

PA 胚の生産効率は胚盤胞発生率および孵化率で IVP 胚と比較して有意に低かった。

この理由として、第一に PA 胚の細胞周期の長さは、IVP 胚の細胞周期の長さよりも長いとの報告 (Somfai *et al.*, 2010) や、本研究と同様の活性化方法によって作成された PA 胚では、細胞が極端に少ない (Velásquez *et al.*, 2013) との報告、また、PA 胚のアポトーシス指数は IVP 胚のアポトーシス指数よりも高い (Wang *et al.*, 2008) との報告があることから PA 胚の総細胞数が少ないため、透明帯から孵化するのに必要な物理的圧力が不十分であった可能性考えられた。

次にウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子は、ウシの透明帯の溶解酵素であることが報告 (Berg *et al.*, 1992) されており、PA 胚には、この酵素量が不足している可能性が考えられた。さらに、透明帯の硬化度が、PA 胚では他の胚とは異なる可能性が考えられた。

Koester らは (Koester *et al.*, 2011)、PA 胚の透明帯からの孵化率 (37%) が IVP 胚 (52%) よりも低く、透明帯の birefringence intensity が胚盤胞形成および孵化能力に関連していたことを報告しているが、一方で PA 胚の細胞総数と発生は、生産方法によって変化すると考えられている。例えば、ionomycin や 6-dimethylaminopurine などを使用した PA 胚の生産方法では、IVP 胚よりも総細胞数と胚盤胞発生率が高く、透明帯からの孵化率も同

様であった (Gómez *et al.*, 2009a; Gómez *et al.*, 2009b) と報告しており、活性化方法を検討することで、生産効率を向上させる可能性を示唆している。

次に、IFNT の産生および他の細胞に対する IFN の応答性における PA 胚の役割を IVP 胚と比較した。

IFNT の mRNA 発現は、IVP 胚よりも PA 胚で有意に高いとの報告がある (Labrecque *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2009b)。さらに、PA および IVP 胚の CM を使用した実験では、PA 胚の CM は、孵化の有無にかかわらず、IVP 胚の CM よりも ISG 活性を大きく刺激することを実証し、このことは、PA 胚の IFNT 生産能力の高さを示した。

Yao らは、IFNT mRNA が IVP 胚では 16 細胞期、PA 胚では胚盤胞期に発現し始めることを報告している (Yao *et al.*, 2009)。さらに Rashid らは、孵化していない胚盤胞が IFNT を産生および分泌し、ウシ子宮に抗炎症反応を誘導することを実証した (Rashid *et al.*, 2018)。

本研究の前段として、AI 後の IVP 胚追い移植が IFNT 応答を増加させ、リピートブリーダーの受胎率を改善する可能性があることを示し (Yaginuma *et al.*, 2019)。これらの成績は、リピートブリーダーに PA 胚を追い移植することで IFNT を補完できる可能性を示唆している。

AI 後の IVP 胚の追い移植は、IFNT を強化することになり、リピートブリーダーの受胎性を改善するための効果的な方法と考えられている (Dochi *et al.*, 2008; Canu *et al.*, 2010)。ただし、この方法では移植胚も AI による発生胚と共に受胎する可能性があり、双子妊娠発生率の増加が懸念される。

そこで本研究では、PA 胚を用いることにより双子受胎を回避し、且つ IFNT 量の増強による受胎性改善の可能性があると考え、健康な黒毛和種を供試し検証した結果、双子は発生せず、また、その他の悪影響も確認されなかったことから AI 後の PA 胚追い移植による安全性が確認された。さらに既報と同様に、妊娠グループでは、AI 単独と比較して AI 後の PA 胚移植後

21 日目に末梢白血球で ISGs mRNA 発現レベルが増加したことを確認した (Figure 6)。

妊娠成立の有無にかかわらず、AI 後 14 日目の血漿中 P4 濃度は、AI 単独 (妊娠) よりも AI+PA 胚の方が高い傾向があり、AI 後の PA 胚移植の妊娠群では、AI 後 28 日目まで、期間を通じてより高いレベルで継続した。

Hirayama らは、PA 胚の移植により PA 胚が IFNT を分泌し、黄体退行を阻害することでウシの血漿中 P4 濃度が高レベルに維持されることを実証した (Hirayama *et al.*, 2014)。

ウシの生体内では、胚により生産された IFNT は子宮内膜を通過し子宮静脈に入り (Oliveira *et al.*, 2008)、妊娠中の黄体を含む組織の変化に重要な役割を果たす (Bott *et al.*, 2010) と言われている。残念ながら、IFNT には P4 産生を直接調節する役割はないが (Nitta *et al.*, 2011)、好中球の化学誘引物質である interleukin-8 (IL-8) を刺激し、好中球を黄体内に蓄積する (Shirasuna *et al.*, 2015)。さらに、IFNT 活性化好中球と IL-8 の双方は、*in vitro* で黄体細胞からの P4 分泌を刺激、加速させる役割が示唆されている。これらの報告は、AI 後の PA 胚追い移植でウシの妊娠を助長、確立するのに十分な IFNT を補完することを示唆している。

本研究において、PA 胚移植は、健康な黒毛和種の受胎率に影響を与えなかった。

これは、ホルスタイン種の通常受胎率と比較して高い受胎率 (本研究の供試牛群では 60%) の黒毛和種牛を供試したため、もしくは PA 胚の孵化率が低かったことによる結果と考えられた。

一方、規模はそれほど大きくないが、野外試験で AI 後の PA 胚追い移植により、リピートブリーダーであったホルスタイン種の受胎率を改善することを示した。したがって、PA 胚追い移植は、繁殖状態の悪いリピートブリーダーのホルスタイン種の繁殖能力を改善できる可能性は示唆されたが、正

常な繁殖牛の繁殖性をさらに向上させる結果にはならなかった。

予備実験では、IVP 胚と同様に、本研究で発生させた PA 胚が *in vivo* で透明帯から孵化できることを確認している。しかし、リピートブリーダーホルスタイン種へ追い移植成績として、PA 胚と比較し IVP 胚が 44.8% と高い受胎率であった。これらの成績から、PA 胚の作製方法を改良し、透明帯からの孵化率を改善して IFNT の *in vivo* での効果をさらに高める必要があると考える。

結論として、本研究では、胚盤胞期のウシ PA 胚は IVP 胚よりも IFNT を分泌する可能性が高いが、胚盤胞への発生率と透明帯からの孵化率が低いことを明らかにした。

さらに、PA 胚は IFNT を産生および分泌し、ISGs の発現が増加し、ウシの血漿中 P4 レベルが高く維持されることを確認した。

リピートブリーダーホルスタイン種では、AI 後の PA 胚追い移植により、対照群 (AI のみ) の受胎率よりも高い受胎率が得られたことから、AI 後の PA 胚追い移植の繁殖技術は、双子受胎を回避し、リピートブリーダーの受胎を改善するのに有益と考えられた。

本研究結果を普及させるためには、大規模な野外実証試験を行い、リピートブリーダーの受胎率における PA 胚移植による改善効果の調査と *in vivo* でのメカニズムを調べる必要がある。

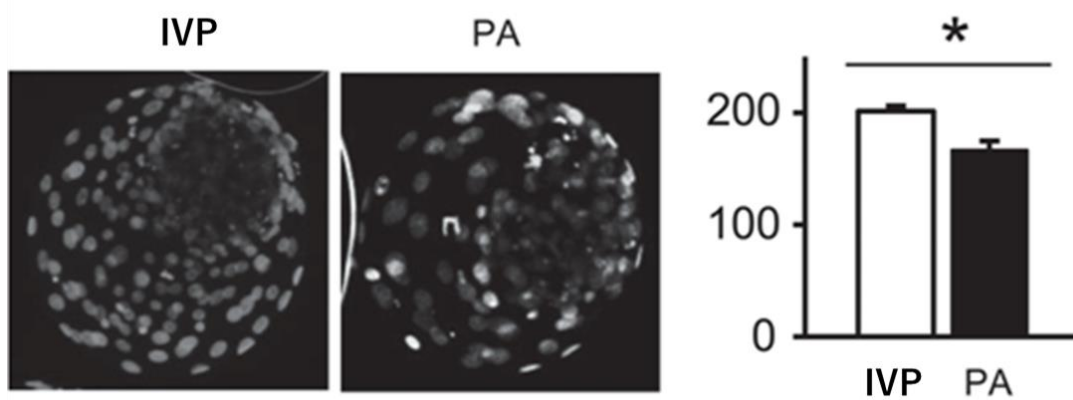
Table 4. *In vitro* produced (IVP) および parthenogenetic (PA)胚の発生率の比較

作製方法	胚盤胞期胚発生率 (%) *	
	Day 7	Day 8
IVP 胚	33.3 (35/105)	38.7 ^a (74/191)
PA 胚	24.8 (165/665)	26.3 ^b (175/665)

* 括弧内の数字は使用した卵子から発生した胚の数を示す.

a, b 異なる肩文字に有意差あり

(A) Cell number in embryos



(B) *IFNT* mRNA

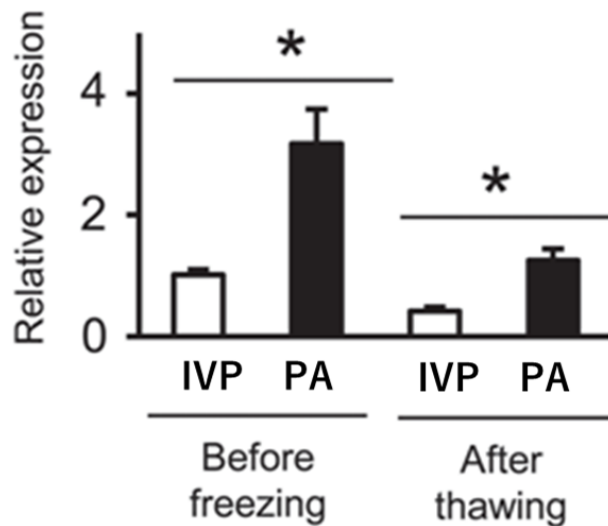


Fig. 3. IVP および PA 胚の特徴の比較. 培養後 8 日目の IVP および PA 胚をそれぞれ 4%パラホルムアルデヒドで固定し、顕微鏡下で胚の細胞数を計測した (n=10 以上、A). 特徴的な IVP および PA 胚の画像を示した. 培養後 7 日目の胚盤胞期胚を回収し、*IFNT* mRNA 発現を測定した(B、*GAPDH* mRNA 発現量で補正). データは mean ± SEM で示した. * は統計的に有意な差があることを示している ($P < 0.05$).

Noguchi et al. J Reprod Dev. 2019; 65(5): 443–450.

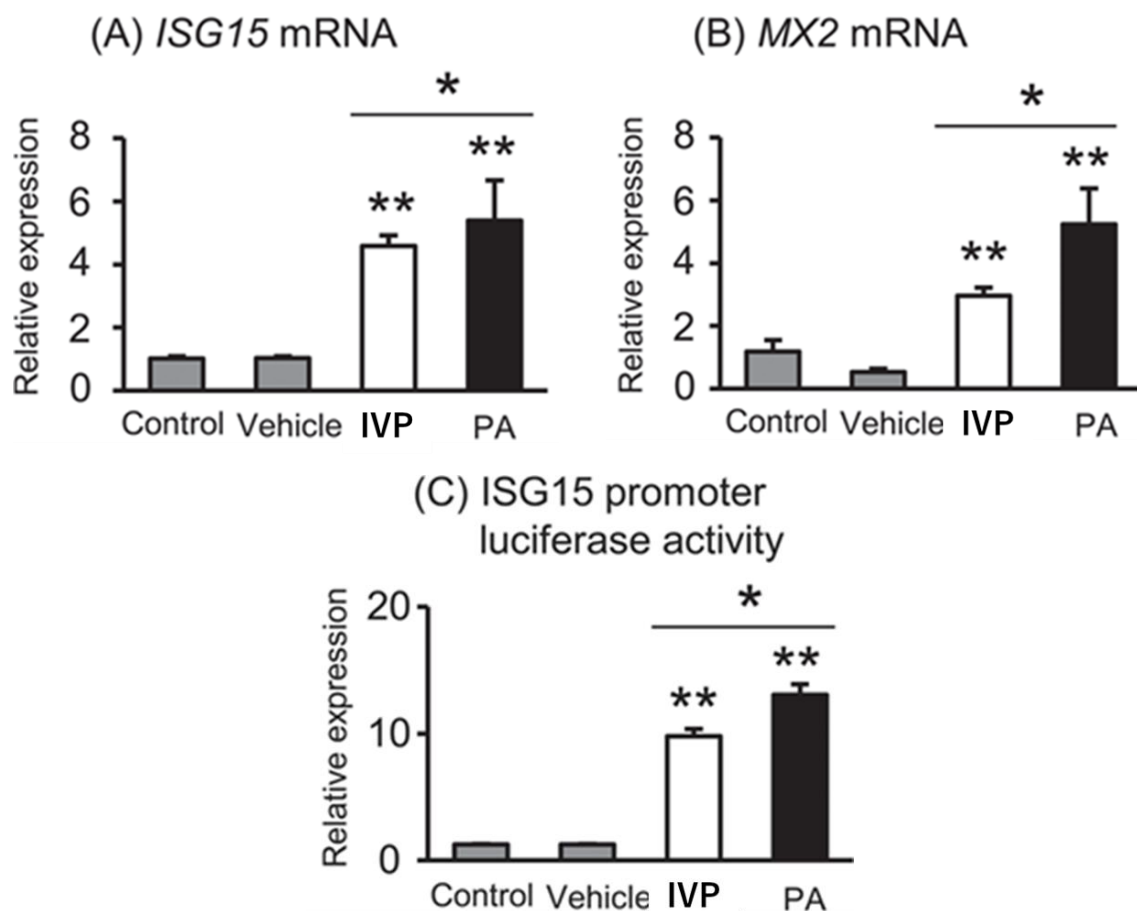


Fig. 4. IVP および PA 胚の CM 処理による IFN 活性の比較. (A–B) ウシ脾臓から単離した免疫細胞に Control 液 (培養液)、Vehicle 液 (胚非存在の卵丘細胞培養液)、IVP 液 (卵丘細胞と IVP 胚の培養液) または PA 液 (卵丘細胞と PA 胚の培養液) を 6 時間添加した.回収後、ISG15 と MX2 mRNA 発現を測定した (n = 3–5, 各実験区). (C) ISG15 promoter-reporter vector を導入した MDBK 細胞に各種培養液を 6 時間添加した (n = 3–5, 各実験区). MDBK 細胞の培養液を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した.

*および**は統計的に有意な差があることを示している ($P < 0.05$ and 0.01).

Noguchi et al. J Reprod Dev. 2019; 65(5): 443–450.

Table 5. *In vitro* produced (IVP) と parthenogenetic (PA) 胚の脱出率の比較

作製方法	Day 9 における脱出率 *	
	使用卵子に対する割合	胚盤胞期胚に対する割合
IVP 胚	26.2% ^a (50/191)	67.6% ^a (50/74)
PA 胚	8.6% ^b (57/665)	32.6% ^b (57/175)

* 括弧内の数字は使用した卵子から発生した胚の数を示す.

a, b 異なる肩文字に有意差あり

ISG15 promoter luciferase activity

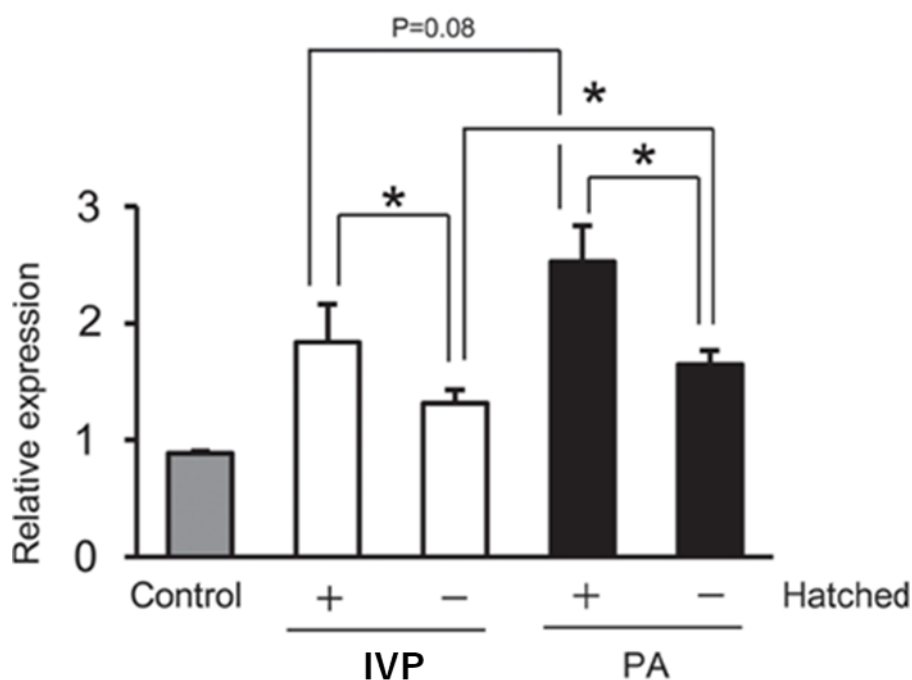


Fig. 5. IVP および PA 胚の脱出の有無による IFN 活性の比較. 培養 7 日目に非脱出の IVP および PA 拡張期胚を回収し、さらに 1 日の個別培養を実施した. 透明帯からの脱出の有無を確認し、各培養液を回収した. ISG15 promoter-reporter vector を導入した MDBK 細胞に各種培養液を添加し 6 時間培養した. MDBK 細胞の培養液を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した.

*は統計的に有意な差があることを示している ($P < 0.05$).

Table 6. AI、PA 胚移植や PA 胚追い移植による黒毛和種の受胎率および双子率の変化.

処置	実施頭数	受胎頭数	受胎率 (%)	双子率 (%)
AI	10	6	60	0
PA	4	0	0	0
AI + PA	15	8	53.3	0

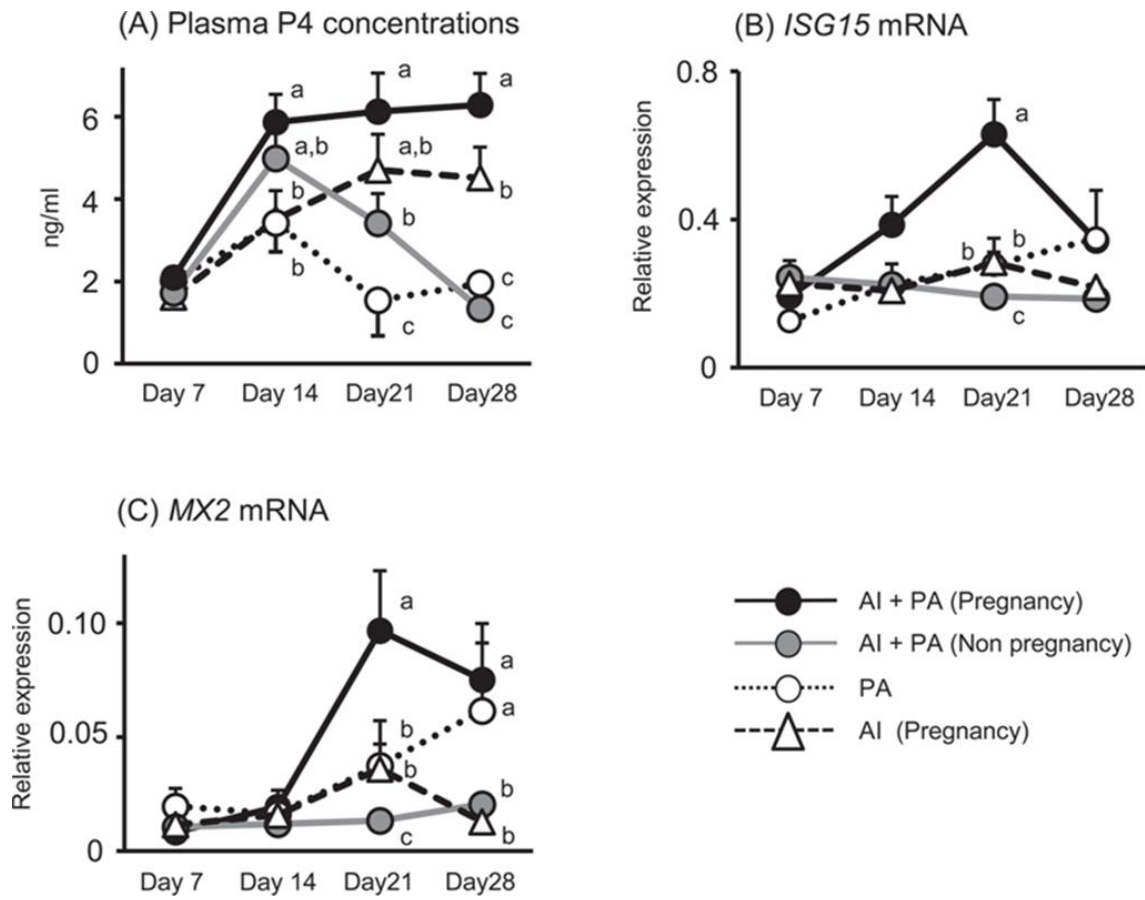


Fig. 6. 黒毛和種における PA 胚移植の効果. 発情後の days 7, 14, 21 と 28 から採血を行い、血漿および末梢血白血球を回収した. 血漿中 P4 濃度 (A) を EIA 法で、末梢血白血球の ISG15 (B) と MX2 (C) mRNA 発現を測定した. 'a, b, c'は同測定日において実験区間で有意な差があることを示している ($P < 0.05$).

Table 7. リピートブリーダーのホルスタイン種牛に対する AI または PA 胚追い移植の受胎率

処置	AI 実施 4-6 回		AI 実施 7-9 回	
	実施頭数	妊娠率 (%)	実施頭数	妊娠率 (%)
AI	1843	603 (32.7)	536	158 (29.4) ^a
AI + PA	58	22 (37.9)	37	15 (40.5) ^b

a, b 異なる肩文字に有意差あり

第四章 ウシの分娩前後における血漿中 DNA の性質および血液成分値との関係

第一節 緒言

養牛農家において人工授精後の受胎率は経営に大きく影響する。家畜改良事業団の受胎率調査(家畜改良事業団 2017)によると、凍結精液を用いた乳用雌牛の AI 後の受胎率は年々低下している。そのため、受胎率の低下に歯止めをかけることは養牛農家の喫緊の課題である。

酪農家および肉牛繁殖農家にとって、分娩後早期に次回の AI を行うことで分娩サイクルを短縮することが経営上重要であり、そのためには分娩後のウシを適切な健康状態を維持する必要がある。しかし、母体の状態を評価する方法はボディーコンディションスコアや飼養者の経験によるところが大きく、客観的な判断は困難である。

母牛の健康状態は様々な方法で評価されている。乳牛では分娩後、負のエネルギーバランスに陥り繁殖成績に影響を及ぼすことが知られているが、これは遊離脂肪酸(NEFA)やトリグリセリド(TG)などの血液成分の変化によって評価される。この負のエネルギーバランスは卵巣機能にも負の影響をおよぼすことが報告されている(Leroy *et al.*, 2011)。負の栄養状態時に血中で高く検出される NEFA は、卵胞液のそれと正の相関がある事(Vanet *et al.*, 2014)が報告されており、高い NEFA 濃度が卵子の能力を低減させることも(Desmet *et al.*, 2016)報告されている。これらの血中の成分はウシの状態を把握することに広く使われているが、さらに新しい指標を見つけることはウシの状態をより正確に把握するのに有効である。近年では血中に存在する cfDNA が動物の健康状態を反映していると考えられはじめた。cfDNA とは細胞から血中に放出された DNA であり、ヒトでは血液中の cfDNA の遺伝子異常を解析することにより、新生物の発見が可能であると報告されている

(Bettegowda *et al.*, 2014)。さらに、生殖に関連する知見ではヒト精漿中の cfDNA 量が精液の質のマーカーとなるとする報告 (Chou *et al.*, 2004) やヒト卵胞液中の cfDNA 量が胚移植後の受胎率と相関があるとする報告 (Dimopoulou *et al.*, 2014) がある。また、妊娠中の母体では胎子に由来する DNA が母方の血液中に見受けられ、ヒトでは母親の血液中 cfDNA を用いて胎児の性判別している例があり、高い判別率が報告されている (Elena *et al.*, 2013)。ウマにおいてもこれと類似した試みがあり 85% の判別率が報告されているが (Priscila *et al.*, 2012) ウシでの報告は無い。このような cfDNA と個体の生殖能力と関連した報告が多数なされている一方で、cfDNA の濃度変化においては性周期間で変動がないことや、妊娠率とも関係ないことから妊孕性や繁殖生理を反映しないとする報告もある (Hart *et al.*, 2005)。血中 cfDNA は核由来とミトコンドリア由来のものがあるが、ミトコンドリア由来細胞外 DNA (cf-mtDNA) は、細胞あたりのコピー数が多いため、リアルタイム PCR (RT-PCR) にて正確に測定することができる (Kansaku *et al.*, 2018)。卵胞液から抽出した cf-mtDNA を吸光度で測定し、これと RT-PCR で測定した cf-mtDNA を比べると非常に高い相関がある (Kansaku *et al.*, 2018) ことが報告されている。そのため RT-PCR を用いて cfDNA 量を測定し、これがウシの健康状態の評価に利用できるならば、ウシの状態をより正確に把握することが可能になる。

酪農経営においては牛乳生産にかかわるウシの高受胎と健康維持のほか、産まれる子牛の性別も重要な関心事であり、計画的に雌畜を得る手法は古くから試みられてきた。胚移植を用いた性判別では、胚から細胞の一部を切り取り PCR 法や FISH 法によって性別を判定した後移植する試みが行われていたが (Hua *et al.*, 2013)、この方法は手技が煩雑であり、受胎率も低下するため広く普及はしなかった。近年では性選別精液を用いた AI が可能となり普及しているが (Filho *et al.*, 2012)、通常の凍結精液より高額であ

り、精子数が少なく活力も低くなるため受胎率が低いこと (Sales *et al.*, 2011) が課題である。さらに受胎率を通常凍結精液と同等にするため、子宮深部注入などの試みを併用しなければいけないことなど、新たな AI 技術の導入も必要とされ課題となっている。特定の性を得る方法のほかに、胎生期に胎子の性を判別する方法があり、これは繁殖計画を立てる上で有効と考えられる。この試みは古くから行なわれており、Muller らは超音波診断により生殖原基の判定から胎子の性別を診断している (Müller *et al.*, 1986)。また、羊水から回収した細胞の染色体の分析による性判別 (Bongso *et al.*, 1975)、あるいは同様の細胞に対して PCR 方法を用いた性判別 (Kamimura *et al.*, 1997) が行われているが、いずれも羊水の回収が手間であるのが課題であった。そこで本章にて検討するミトコンドリアゲノム由来の cfDNA (cf-mtDNA) の他に核由来の DNA を調べることによって胎子の性判別が可能かどうか明らかにすることで cfDNA の応用の幅が広がると考えた。

本研究では、分娩前後の時期を対象に、cf-mtDNA 量の変化と、血液生化学 (NEFA、TG、乳酸脱水素酵素 (LDH)、グルコース) 数値との関係性および AI 時の妊孕性について検討するとともに、妊娠牛の血漿を用いた胎子の性判別の可能性を検討した。

第二節 材料および方法

供試牛

供試牛は本学富士農場飼養の雌ウシとした。

試験 1 は発情周期が正常であることが確認できたホルスタイン種 15 頭(平均月齢 39.2 ± 3.8 平均産歴 1.7 ± 0.2)を用いた。また、試験 2 は黒毛和種 9 頭とホルスタイン種 5 頭(受胎牛：平均月齢 64.4 ± 18.8 平均産歴 3.4 ± 1.3 不受胎牛：平均月齢 67.1 ± 14.9 平均産歴 2.6 ± 0.9)を用いた。さらに試験 3 では黒毛和種雌に、黒毛和種精液で AI を行い、授精後 24～32 日の妊娠鑑定で受胎を確認した 16 頭を用いた。

これらのウシの飼養管理は、ホルスタイン種、黒毛和種ともに昼間放牧で、朝・夕方に自家産グラスサイレージを与える富士農場の通常管理にて実施した。血液採取は本学の実験動物委員会の承認を得て行った。

血液採取

供試牛を繋留し、無保定下で尾静脈よりヘパリンナトリウム入り真空採血管にて血液を採取した。採取した血液は直ちに遠心分離にて血漿を分離、測定まで -80°C で凍結保存した。

血漿成分の測定

血漿中の NEFA と TG、グルコース濃度は富士フィルム和光純薬株式会社(大阪)のキット(ラボアッセイ TM、NEFA ラボアッセイ TM トリグリセライド、ラボアッセイ TM グルコース)を、LDH の吸光度はタカラバイオ株式会社の乳酸脱水素酵素測定キット(LDH Cytotoxicity Detection kit)を用いて測定した。方法は添付のプロトコールに従い、測定は 2 回測定した平均値を用いた。

cf-mtDNA コピー数の測定

血漿は DNase RNase free 水 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で 400 倍希釈した。希釈倍率は血漿由来タンパクが反応を阻害しない濃度を前実験にて決定した。DNA の抽出は (Kansaku *et al.*, 2018) の方法に従い抽出液 (最終濃度、20 mmol/L トリス塩酸、0.9% Nonidet P-40、0.9% Tween-20、Proteinase K 200 µg/ml、pH 7.8) と希釈血漿を等量混合し、55°C で 30 分、98°C で 5 分処理し冷蔵保存した。

PCR は KAPA SYBER (KAPA Biosystems) 10µL とテンプレート 6µL およびそれぞれ 2µL のプライマー (最終濃度 0.5µM) で合計 20µL にして、CFX Connect RT-PCR 機 (Bio-Rad, CA, USA) にて行った。プライマーのデザインはウシミトコンドリアゲノム配列 (NC_006853.1) を基に 1626–1706 の部分 81 bp を対象に primer3 plus を用いて設計した forward: 5'-acccttgtagcttttgcatt-3', reverse: 5'-tctgggttcgggctgcttag-3' を用いた。PCR の条件は 95°C で 3 分後、97°C で 5 秒、60°C で 10 秒の 2 ステップを 40 回繰り返した。絶対定量のため PCR 産物をベクター (PCR-Blunt2-TOPO) に組込み、シーケンスにて配列を確認したもので 10 倍希釈系列を作成してスタンダードとして用いた。すべての反応効率 は 2.0-1.97 であった。

性判別と条件設定

血漿中の DNA は、NucleoSpin Plasma XS (タカラ社) を用いプロトコールに従い抽出した。

性判別は、オス特異的な DNA を検出している既報 (Lemos *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2011; Surachai *et al.*, 2011; Larson *et al.*, 2001) から Table 8 に示す 4 種類のプライマーを用いた。またアニーリングの温度については、グラジエント機能を用いて 55-65°C の間で最も明瞭な結果が得られた温度を採用したため既報とは異なっている。

PCR は KAPA SYBER (KAPA Biosystems) 10 μ L とテンプレート 6 μ L およびそれぞれ 2 μ L のプライマー (最終濃度 0.5 μ M) で合計 20 μ L にして行った。反応は Table 8 に示すアニーリングの温度を用い、最初に 95 $^{\circ}$ C で 3 分、それ以後 97 $^{\circ}$ C 5 秒、アニーリング 17 秒を 39 回繰り返した。反応終了後、電気泳動してバンドを確認した。

Figure 7 に、それぞれのプライマーを用いて PCR を行い電気泳動したゲルの写真を示す。P1 では濃いテンプレートに対し、オスとメスのバンドの位置が異なっているがテンプレートが薄くなると判別が困難になった。P2 では、P1 と同様に薄いテンプレートでは同じ位置にバンドが見られ P3 では、濃い場合にオスとメスの判別が難しく 1,000 から 100 万倍希釈では良好な判別が出来るが、薄くなるとバンドの位置そのものがずれる結果となった。P4 は多くの論文で用いられているプライマーではあるが、バンドの形で判別が可能である反面、薄くなると判別が難しい。その他のウシの血液を用いて追試したが、再現性が最も高かったプライマー 3 と 4 を選び妊娠牛の血液に用いた。

子牛の性判別

子牛の性は分娩後に目視で生殖器を確認した。

試験 1 分娩後の cf-mtDNA 変動と血液性状との関係

血液性状として NEFA、TG、LDH、グルコースを測定し、RT-PCR で測定した cf-mtDNA 量と相関を調べた。血液採取は、対象牛 15 頭(全頭ホルスタイン種)から分娩前 30 日～分娩後 60 日までの間の計 11 回、給餌後 2 時間以内に、尾静脈より採取した。血液はヘパリン処理し、3000 rpm で 20 分間の遠心分離により血漿化し、これを実験に用いた。採血間隔は 30 日、3 日前、4 日、11 日、20 日、30 日、33 日、37 日、44 日、51 日そして 60

日後とした。

試験 2 人工授精時の血液性状と cf-mtDNA 量と妊孕性

対象牛 14 頭に対して、AI 時(授精直後)の静脈血を尾静脈より採取し、実験 1 と同様の方法で血漿化したのち、性状の測定を行った。さらに cfDNA を抽出し、cf-mtDNA を RT-PCR 法で測定した。また AI は定法により、妊娠鑑定は授精後 60 日目に胎膜触診と超音波診断にて行った。測定した血液性状と cf-mtDNA は受胎と不受胎のウシ間で比較した。

試験 3 細胞外 DNA を用いた性判別

オスおよびメス子牛から血液を採取し、DNA を抽出した。次いで、血液中に混入する胎子由来の DNA の量が希少であることを推測し、それぞれの DNA を 1,000、5,000、10,000、100,000、1,000,000 および 10,000,000 倍に希釈して PCR により DNA を増幅し、電気泳動結果を求めた。前実験の結果、プライマー 3 および 4 を用いて 16 頭の妊娠牛の性判別を行った。

統計解析

測定した各項目間の相関係数はエクセルに付属の CORREL 関数を用いて測定した。また 2 区間の比較には Welch の t-test を用い $P < 0.05$ を有意差ありとした。

第三節 結果

試験 1 分娩後の cf-mtDNA 変動と血液性状との関係

乳牛 15 頭の分娩 30 日前から 60 日後までの血漿中生化学値および cf-mtDNA コピー数を Fig. 8 に示す。血漿中 NEFA 量は、分娩 30 日前と比較し分娩 3 日前から分娩 51 日後までは有意に高い値となった($P < 0.05$)。その後分娩 60 日後には有意差がなくなり、同等の値に低下した(Fig. 8-A)。血漿中 TG 量は分娩 30 日前と比較し、分娩 4 日以降において有意に低くなりそのまま低値で推移した($P < 0.05$) (Fig. 8-B)。血漿中 LDH の吸光度は、分娩 30 日後から分娩 51 日後までは有意に高い値となり($P < 0.05$)、その後分娩 60 日後には有意差がなくなり、同等の値に低下した(Fig. 8-C)。血漿中グルコース量は、分娩後緩やかに上昇し、分娩後 33 日以降、分娩前 30 日に比べて有意に高い値となった($P < 0.05$) (Fig. 8-D)。また、血漿中 cf-mtDNA コピー数は分娩 30 日前と比較し、分娩 4 日後から有意に高い値となった($P < 0.05$) (Fig. 8-E)。

各測定項目平均値間の相関関係を Fig. 8 に示した。cf-mtDNA コピー数が増加すると LDH が増加する正の相関関係が認められた($P < 0.05$)(Fig. 9-A)。一方で、グルコース濃度と LDH 間に正の相関、cf-mtDNA コピー数と TG 濃度間、TG 濃度と LDH 間そしてグルコース濃度と NEFA 濃度の間に負の相関関係が認められた($P < 0.05$)(Fig. 9-B~E)。その他の組み合わせである cf-mtDNA と NEFA およびグルコース間には相関が認められなかった(Fig. 9F~G)。

試験 2 AI 時の血液性状と cf-mtDNA 量と妊孕性

ウシ 14 頭の AI 時の血液性状と cf-mtDNA コピー数を Table 9 に示した。非妊娠の個体と比較し、妊娠した個体の血漿中 NEFA 濃度は有意に高い値

となった($P < 0.05$)。一方で cf-mtDNA コピー数は、受胎の成否による差は認められなかった。また 14 頭にはホルスタイン種 5 頭と黒毛和種 9 頭で構成されるため、品種間毎で比較したがすべての項目で差がなく、品種ごとに分けて受胎・不受胎間の比較を行ったところ、NEFA および cf-mtDNA では妊娠牛が両種とも非妊娠に比べて値が高いものの、有意差は認められなかった(ホルスタイン種 vs. 黒毛和種, NEFA, 0.17 ± 0.02 vs. 0.17 ± 0.02 ; cf-mtDNA, $4,657.15 \pm 1,469.45$ vs. $2,814.81 \pm 808.60$ 、ホルスタイン種受胎 vs. 不受胎, NEFA, 0.21 ± 0.01 vs. 0.12 ± 0.01 ; cf-mtDNA, $5,609.30 \pm 2,169.98$ vs. $3,228.92 \pm 1,100.31$ 、黒毛和種受胎 vs. 不受胎, NEFA, 0.19 ± 0.01 vs. 0.15 ± 0.02 ; cf-mtDNA, $3,537.10 \pm 1,126.52$ vs. $2,236.97 \pm 463.10$)。

試験 3 性判別用プライマーの選択と判別

性判別を行った結果を Table 10 に示す。プライマー 3,4 共にオスと考えられる、もしくは一方でオス、片方で判別しがたい場合もオスと判定した。供試牛 16 頭中誕生した子牛の性が母牛の血液検査で予測した結果と同様であった割合は、68.8%(11/16)であった(Table 10)。

採血時の妊娠期間を 140 日以内と 140 日以降に分けて判別率を算出すると、それぞれ 50 および 80% であった。

第四節 考察

本実験では、リアルタイム PCR 法を用いて測定した cfDNA 量が、分娩前後の生理状態が著しく変化する時期において大きく変動すること、この値が血漿成分の LDH と正の相関が、TG 濃度と負の相関関係にあることが認められた。一方で AI による受胎牛と非受胎牛の間には cfDNA 量に有意な差は観察されなかった。

分娩前後で血液性状は大きく変化することは一般に知られているが試験 1 においても血液性状の変化が確認できた。血漿中 NEFA 濃度は分娩後の脂肪動員により上昇することがこれまで報告されている (Monteiro *et al.*, 2017; McCarthy *et al.*, 2016)。また、分娩後の NEFA 濃度の上昇は急激な泌乳開始に伴う脂肪動員が関係していることが報告されている (Kunz *et al.*, 1985)。我々の試験においても分娩後、有意な NEFA 濃度の上昇が認められたが、この値と cf-mtDNA には相関が認められなかった。血漿中の TG 濃度は、分娩後、泌乳開始とともに低下することが報告されている (Nowroozi-Asl *et al.*, 2016)。本研究では同様の変動を確認し、この値は、cf-mtDNA コピー数と負の相関が認められた。これまでの既報では、血漿中 TG 濃度が減少する個体は高泌乳であることが示唆されており (木村ら, 1993)、母体への負荷の高さを cf-mtDNA 量が反映していると考えられる。

血中の LDH 量は一般的に、動物の体内での炎症などの指標として用いられている。また乳牛に過剰排卵などの処理を加えると血中の LDH が上昇するという報告もある (Hwang *et al.*, 2013)。我々の試験では分娩後 30 日後にゆるやかな上昇が認められた。乳牛では血中 LDH 濃度には大きな変化が観察されないとの報告があり (Wall *et al.*, 2015)、今回の結果とは異なっている。彼らの報告既報では変化がない理由として血中 LDH が乳中に排出されているからと考察されているが、異なった報告の原因には使用したウシや

農場の環境にあるのではないかと推測している。一方で血中の LDH を cf-mtDNA 量と比べた場合、両者には正の相関が認められた。一般に LDH は細胞傷害を測定する指標として広く用いられており、様々な細胞動物種において利用されている (Simon *et al.*, 2017; Decker *et al.*, 1988)。ブタの顆粒層細胞の培養において、膜電位喪失剤でミトコンドリアに障害を与えた場合、cf-mtDNA が増えること (Kansaku *et al.*, 2019)、胞状卵胞内で顆粒層細胞のアポトーシス率と卵胞液中 cf-mtDNA 量に正の相関があることが報告されており (Ichikawa *et al.*, 2020)、これら LDH と cf-mtDNA 間で正の相関が認められたことから、cf-mtDNA 量は分娩後の母体の細胞や組織に何らかの障害があり、これにより血中に cf-mtDNA が放出されることが考えられた。この LDH は前述の TG と負の相関が認められたことから、体内で起こる細胞の炎症や機能不全が多いと cfDNA が高く、TG が低いという関係が予想されるが、今後この点は確認する必要がある。

次に cf-mtDNA とウシの妊孕性の関係を明らかにするために、AI 後の妊娠の可否と授精時の血漿中成分を比較した。血漿成分では NEFA 濃度が受胎牛群において高くなっていた。低 NEFA 値は慢性的なエネルギー不足の指標とされているが、今回の測定では他の成分値を測ることが出来なかったため栄養生理を評価する他項目について再確認する必要がある。また cf-mtDNA の量は受胎牛と不受胎牛の二区間で比較した結果では有意差が見られなかった。本試験では本学農場内の限られた数のウシを供試した検討であったため、品種、産歴や分娩後の日数に大きなばらつきがあり、斉一な牛群を用いた大規模な検討が必要であると考えられた。

最後に母牛の抹消血液で胎子の性別判定の可能性を検討した。オスおよびメス牛の血液 240 μ L から回収した cfDNA を 1000 から 1000 万倍に希釈して性別用プライマーを用い PCR で増幅し性別判定に用いたところ、希釈濃度は判定結果に大きく影響し、特にある濃度より薄くなると電気泳動後のバ

ンドでの判定が難しくなったが、一定濃度の量が確保できれば明確な性別判定が可能であった。本試験において、母牛の抹消血液を用いて胎子の性を判別した場合、68%程度の判定率となり、高い判定は難しい結果となった。

母牛の血液に胎子の DNA が混入することが本方法の前提条件となる。一方で母牛の血液を解析した試験では胎子の細胞が存在しないという報告がされている (Hiroya *et al.*, 1996)。この報告では一つの可能性として DNA 量が非常に少ないことを上げている。一方で PCR を用いて母牛の血液から抽出した DNA に胎子の DNA が存在することを示した報告もある (Yang *et al.*, 1996)。本試験では判別率が低調であったが、母牛に混入する胎子の DNA 量が結果に影響していると考えられた。ウマを用いた同様の実験で母馬の血液から子馬の性を正確に判定している報告がある (Priscila *et al.*, 2012)。またヒトでは血液を用いた判定が可能であることも報告されている (Elena *et al.*, 2013)。この品種間の差異について原因は明らかではないが、胎盤の組織学的構造が一因と考えられた。ウシの胎盤構造は結合絨毛胎盤であり、血絨毛胎盤のヒトとは母体血液と胎子側細胞の接触のしかたが大きく異なっている。ウマは上皮絨毛胎盤であるが、毛細血管の解剖学的距離がウシより近いことが示されている (Silver *et al.*, 1973)。このため、ウシの場合解剖学的にも胎子の DNA が母体の血液に移行する確率が低くなっている可能性が考えられた。

本試験において妊娠時期を前半後半と分けてその判定率を比較したところ、後半での判定率が高くなっており、既報と同様の傾向を示し (Lauretta *et al.*, 2007)、胎子の DNA が混入する確率は妊娠後期で高くなる可能性が示唆された。

本研究では、血漿中の cf-mtDNA 量が分娩後大きく変動することや、血液中の LDH や TG など特定の成分濃度と関連がある事が示されたが、妊孕性との相関は見られなかった。また、母牛の抹消血液中に胎子の DNA 断片

が存在することが示唆されたが、胎子の性判別を確実に行うには至らなかった。

Table 8. 実験に用いたプライマーセット

プライマー		配列	アニーリング温度
P1	F	5'-CCCGCACCTTCCAAGTTGTG-3'	63
	R	5'-AACCTCCACCTCCTCCACGATG-3'	
P2	F	5'-CCCGCACCTTCCAAGTTGTG-3'	65
	R	5'-TGCTCCTCCACCGTCTTCT-3'	
P3	F	5'-CTCAGCAAAGCACACCAGAC-3'	63
	R	5'-GAACTTTCAAGCAGCTGAGGC-3'	
P4	F	5'-ATCAGTGCAGGGACCGAGATG-3'	63
	R	5'-AAGCAGCCGATAAACACTCCTT-3'	

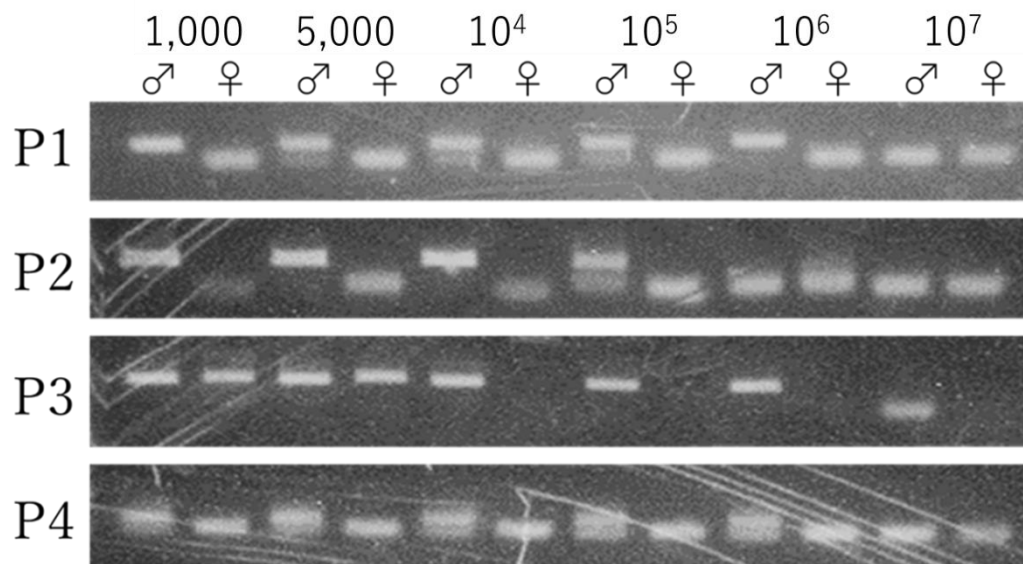


Figure 7. 血漿から抽出した DNA の希釈倍率と性判別結果

オスとメス子牛の黒毛和種から採血し、抽出した DNA を 1000 から 1000 万倍に希釈して PCR 反応を行った。左 P1-P4 はプライマーの別、上は用いたドナーの性別。

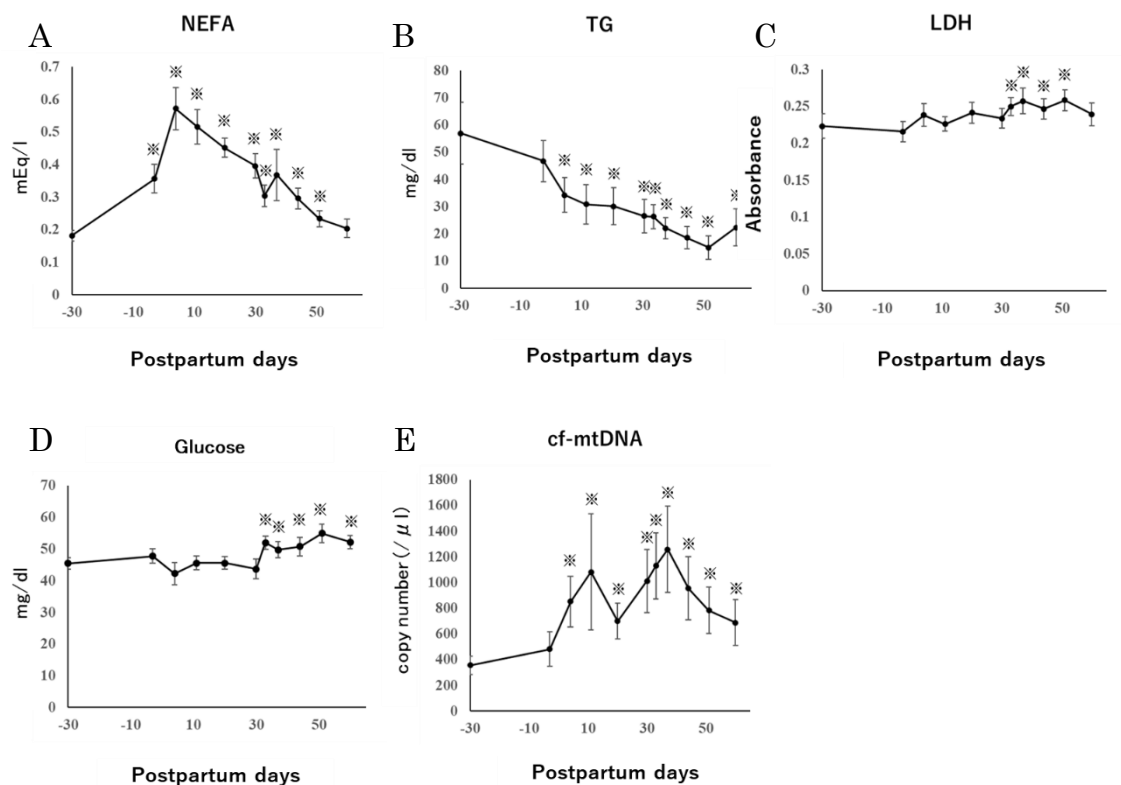


Figure 8. 分娩前後の血漿中成分値の推移

ホルスタイン種 15 頭の血漿中の成分値 (NEFA, TG, LDH, グルコース, cf-mtDNA) を測定し, 日数ごとの平均値と標準誤差を示した. A は NEFA 濃度の推移を, B は TG 濃度の推移を, C は LDH の吸光度の推移を, D はグルコース濃度の推移を, そして E は cf-mtDNA コピー数の推移を示している. 縦軸は測定値を, 横軸は分娩日を 0 とした日数を表している. ※は分娩 30 日前 (-30) と比較し有意差があり ($P < 0.05$).

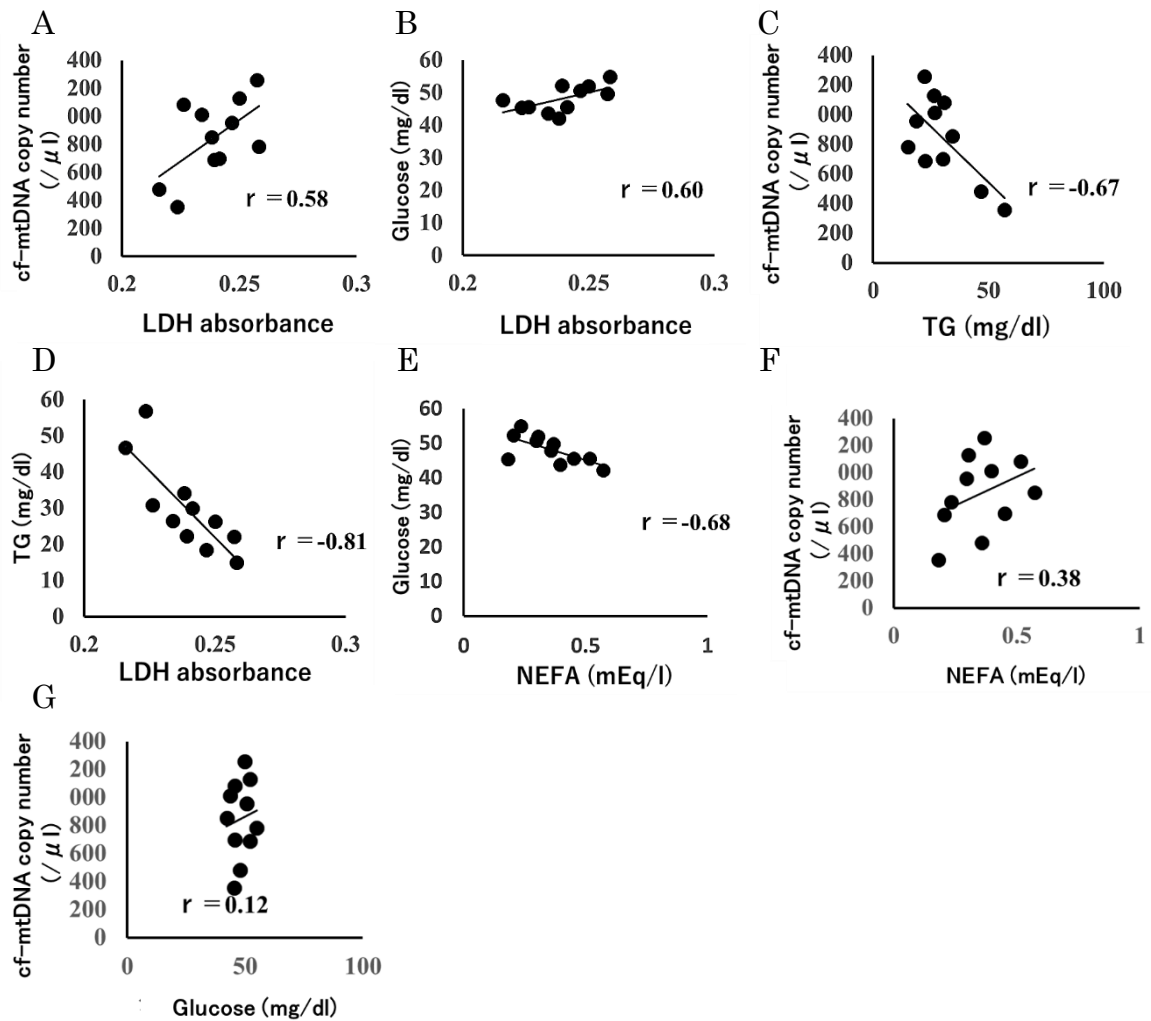


Figure 9. 血液性状間の相関関係

ホルスタイン種 15 頭の測定値の平均値をもとめ各項目間の相関係数を算出した。有意な相関が認められた項目を Figure に示す。A：血漿中 cf-mtDNA コピー数（縦軸）と LDH の吸光度（横軸）。両者の間に正の相関有り ($P < 0.05$)。B：血漿中グルコース濃度（縦軸）と LDH の吸光度（横軸）。両者の間に正の相関有り。C：血漿中 cf-mtDNA コピー数（縦軸）と TG 濃度（横軸）。両者の間に負の相関有り。D：血漿中 TG 濃度と LDH の吸光度（横軸）。両者の間に負の相関関係有り。E：血漿中グルコース濃度（縦軸）と NEFA 濃度（横軸）。両者の間に負の相関有り。

野口ら. 日畜会報. 2020; 91(3): 227-232

Table 9. AI の後の受胎の成否と血液性状および cfmtDNA コピー数

検査項目	受胎牛 (n=7)	不受胎牛 (n=7)
NEFA (mEq/l)	0.20±0.01a	0.14±0.01b
TG (mg/dl)	17.63±10.46	16.2±6.11
Glucose (mg/dl)	49.64±5.79	47.07±4.85
LDH (absorbance)	0.98±0.04	0.93±0.03
Cf-mtDNA (copy)	4425.19±1195.28	2520.39±486.76

受胎牛 7 頭と不受胎牛 7 頭の血液性状と血漿 1 μ l 中の cf-mtDNA コピー数を示した. a-b 間は有意差有り. 値は平均値±標準誤差で示す.

Table 10. cfDNA による性判別と子牛の性

No	生年月日	AI 時の 月齢	産次	採血時の日齢	判定結果	性別
1	2004/ 5/ 3	153.5	10	274	M	M
2	2008/ 8/23	104.7	7	212	F	F
3	2014/ 8/ 8	35.6	2	170	F	F
4	2008/ 8/23	106.2	6	167	F	F
5	2010/ 8/ 6	83.2	5	164	M	M
6	2011/ 9/ 6	70.6	3	158	M	F
7	2013/ 6/30	49.2	2	154	F	M
8	2011/ 3/24	16.8	0	154	F	F
9	2010/ 5/30	85.7	6	153	M	M
10	2011/ 9/ 7	70.9	4	146	M	M
11	2014/ 4/21	40.6	2	123	F	F
12	2012/ 7/17	61.6	2	120	M	F
13	2013/ 9/18	49.5	3	67	F	F
14	2013/11/23	47.7	2	56	M	F
15	2016/ 2/25	21.1	0	52	M	F
16	2007/10/ 1	120.8	9	46	M	M

総括

酪農経営において、受胎率の低下が問題となっており、このことは直接酪農家の収益に損害を与えているが、その原因は多岐にわたり明らかになっていない部分が多い。酪農家の収入源として子牛の販売は重要であり、その生産手法として胚移植 (Embryo Transfer; 以下 ET) が広く用いられている。黒毛和種の肥育素牛価格は高騰しており、黒毛和種子牛の増産が求められている。このため、ET 技術は乳牛に黒毛和種生産をさせるためには欠かすことのできない技術であり、効率的な ET による子牛生産は我が国畜産業の発展に寄与する。

効率的な ET には、胚の質、移植技術および受胎牛の状態が重要な要因として挙げることができる。本研究は胚移植に対しこれら 3 つの要因に対して研究を進め良質な胚に必要な条件、高受胎率を得るための手法の開発そして繁殖雌牛の状態を把握する手法の開発を行った。

まず、胚の質に対する研究として、体内発生 (in vivo developed; 以下 IVD) 胚と体外受精により作出した (in vitro produced; 以下 IVP) 胚の遺伝子発現の差について検討した。胚は一般的に体内から採取する IVD 胚と卵巣内の卵子を体外受精させて作成する IVP 胚がある。IVP 胚は長年の培養技術の進展にもかかわらず IVD 胚に比べて品質に劣る。そこで IVD 胚を大量に確保し、IVP 胚と次世代シーケンサーを用いて比較したところ IVP 胚で酸化ストレスや増殖因子による影響が観察され、またミトコンドリアに関する遺伝子発現に大きな差が認められた。ミトコンドリアの DNA コピー数をリアルタイム PCR で測定すると体内胚におけるミトコンドリア数が少なく、さらにミトコンドリアの機能の一つである ATP 量を比較すると IVD 胚で低い結果となった。このことは卵子と異なり良質な胚盤胞はミトコンドリア数が少なく ATP が少ないという最近の知見と合致していた。これらの結果

より、IVP 胚の作成においては異常なミトコンドリアの増加を防ぎ、酸化ストレスを減らすような培養環境の必要性が明らかとなった。

次に効率的な ET 技術の確立を目指し、新たな ET 方法の開発に取り組んだ。胚は妊娠因子の 1 つであるインターフェロンを分泌することが知られており、子宮内に複数胚が存在する場合、この量も増加する。ただし、ウシは単胎の動物であるため、多胎となった場合様々な事故が生じる。単為発生 (parthenogenesis; 以下 PA) 胚は受胎することがないがインターフェロンの分泌量が通常の胚に比べて多く、IVP 胚および PA 胚の培養液上清でも細胞にインターフェロンへの応答産物である ISG15 を確認できる結果を得た。そこで人工授精 (Artificial Insemination; 以下 AI) 後に、受胎しない PA 胚を移植した。PA 胚単独の移植からは受胎は観察されず、AI 後に胚を移植した場合は高い受胎結果が得られた。この手法を受胎困難な乳牛のリピーターブリーダーに適用したところ受胎が確認できたため PA 胚を凍結保存し、人工授精後に移植する手法により低受胎牛の繁殖技術として有用であることが判明した。

3 つめの課題として受胎牛の受胎に影響する生理的な状態の新たな把握方法ならびに母牛の末梢血を利用した胎子の性判別の可能性について検討した。これまで受胎牛選定の判断は視覚によるボディコンディションスコアを評価の指標の主体としてきたが、今回の研究では細胞外 DNA に着目した。血中には細胞に由来する DNA が含まれるがこの量は生理状態と比例すると考えられている。まず最も生理状態が変化する分娩前後を対象に 15 頭のウシから 4 日おきに採血し、血液中のミトコンドリアに由来する細胞外 DNA をリアルタイム PCR によって測定した。測定値は分娩後上昇しその後低下した。このデータと血液生化学データを比較するとトリグリセライドと負の、LDH と正の相関がある事が明らかとなった ($P < 0.05$)。このことから血液中のミトコンドリア由来細胞外 DNA 量はウシの生理状態で大きく

変化することが明らかになった。次に AI 時に採血を行い受胎結果と比較したところ、受胎牛において高いミトコンドリア由来 DNA 量が確認できた。この結果よりミトコンドリア由来の細胞外 DNA を測定することでその牛群の受胎性の把握に活用することが出来ると考えられた。また、ヒトではすでに活用されている母体の末梢血による胎児の遺伝情報の収集について、ウシでは胎盤の構造より困難とされていたが、本研究において母牛の末梢血中にも胎子の細胞外 DNA が存在することが証明され、これを用い新たな性判別方法の可能性が示唆された。しかし母体の末梢血中に遊出している胎子の細胞外 DNA 量は不安定であり、胎齢によっても差があることが示唆された。胚移植による受胎性は胚、移植技術、受胎牛の把握と選抜という要因によって成立する。胚移植を用いた子牛生産には今後 IVP 胚の活用比率が高まると考えられ、本研究知見は胚作成方法の改善に資すると考える。また乳牛における受胎率向上の有効な対応策として PA 胚の併用が有効である事が判明し、これは新しい胚移植技術として活用が出来ると考える。最後に様々な牛群において受胎性が大きく異なっているがその分子背景は不明なこと多く、細胞外 DNA の測定は非常に簡単な手法であるため牛群の受胎性把握に活用できると考える。また胎子の性判別のみならず種々の遺伝的形質の娩出前診断に活用できると考える。

Summary

Development of embryo transfer technology for high pregnancy rate

Tatsuo Noguchi

Management of a dairy farm depends on high pregnancy rates that follow artificial insemination (AI) and/or embryo transfer (ET) and the income obtained from calves. In Japanese dairy farms, animals are suffering from low pregnancy rates, and the development of countermeasures against these low pregnancy rates is crucial. In addition, milk type calves are sold at a low price, whereas meat type calves, such as Japanese Black Cow (JBC), are sold at a high price. Therefore, the production of JBC by ET is an effective countermeasure for increasing the income of dairy farms. In line with this, increasing numbers of *in vitro*-produced (IVP) embryos, obtained from slaughter house-derived JBC ovaries, are being used for cattle production; however, the quality of IVP embryos is lower than that of *in vivo*-developed (IVD) embryos. Furthermore, conditions of cows profoundly affect pregnancy outcomes; however, the lack of molecular markers for cow conditions hampers the improvement of pregnancy rate following insemination and/or ET.

In this study, I first explored the factors affecting embryo quality by comparing the quality of embryos IVD with that of embryos IVP. Second, I examined the effect of co-transfer of parthenogenetic (PA) embryos on pregnancy outcomes following AI or ET. Third, I examined a novel method of evaluating the condition of recipients using the cell-free mitochondrial DNA (cf-mtDNA) content in serum.

Experiment 1. ET uses embryos IVD or IVP for cattle production; however, there is a difference in quality of the embryos obtained using the two methods. The first study explored the differences in gene expression between blastocysts developed *in vitro* and those developed *in vivo*. IVD blastocysts were flushed from the uteri of super-ovulated cows, while blastocysts IVP were derived from *in vitro*-matured and fertilized embryos. The same batch of frozen bull sperm was used for insemination and *in vitro* fertilization. Blastocysts were subjected to RNA sequencing. Differentially expressed genes upregulated in IVP blastocysts were annotated to focal adhesion, extracellular matrix-receptor interaction, and PI3K-Akt signaling. Genes upregulated in IVD blastocysts were annotated to oxidation-reduction processes, mitochondrion organization, and mitochondrial translation. Although the total cell numbers of the two types of blastocysts were similar, mitochondrial quantity (determined by mitochondrial DNA copy numbers and expression levels of TOMM20) and ATP content in the blastocysts were lower in IVD blastocysts than in IVP blastocysts. In conclusion, RNAseq revealed the differential molecular backgrounds between IVP and in IVD blastocysts; mitochondrial number and function were found to be responsible for these differences.

Experiment 2. Repeat breeding is a reproductive disorder in cattle. ET following AI improves pregnancy rate by replenishing interferon tau (IFNT); however, it results in a notably high rate of twin occurrence. In the second section, I conducted an experiment to test the hypothesis that PA embryo transfer following AI (AI + PA) improves conception rate because the PA embryo becomes a supplemental source of IFNT without twins. PA embryos showed higher IFNT mRNA expression than IVP

embryos. Examination of the effect of cultured conditioned media (CM) of PA or IVP embryos on Madin-Darby bovine kidney cells with stably introduced promoter-reporter constructs of interferon-stimulated gene 15 (ISG15, marker of IFN response) showed higher stimulation levels of ISG15 promoter activity in PA embryos than in IVP embryos. We investigated the *in vivo* effect of AI + PA on healthy JBC. Cattle transferred with PA embryo alone were non-fertile, while those that underwent AI + PA showed a pregnancy rate of 53.3%, similar to that observed with AI alone (60%). For pregnant cattle in the AI + PA group, adding the PA embryo upregulated the expression of ISGs and plasma progesterone concentration. No twins were generated in the AI-only and AI + PA groups. Using repeat breeding, Holstein cows, which did not become pregnant with 4–9 instances of AI and transfer of PA embryo following AI, had higher pregnancy rates than those in the control group (AI only). We suggest that AI + PA may be beneficial for improving maternal pregnancy recognition in repeat breeder cattle while avoiding twin generation.

Experiment 3. Cell-free DNA is observed in the blood of cows, and mitochondrial DNA is easily detected by real-time PCR. The third experiment addressed whether the amount of cf-mtDNA in serum is affected by maternal physical condition and associated with pregnancy outcomes following AI. I observed that the concentration of Nonesterified Fatty Acid, Triglyceride (TG), Lactate Dehydrogenase (LDH), and glucose content in serum notably changed after parturition. Significant positive and negative correlations were observed between the amount of cf-mtDNA and LDH and between the amount of cf-mtDNA and TG,

respectively ($p < 0.05$). There was no significant difference in serum cf-mtDNA levels between pregnant and non-pregnant cows at AI.

In conclusion, results of the present study reveal the molecular background underlying the low quality of IVP embryos and effectiveness of using PA embryos in improving pregnancy rates following AI. In addition, this study sheds light on the possibility of using cf-mtDNA in evaluating the physiological conditions of cows.

謝辞

本稿を終わるに臨み、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、また本研究の遂行ならびに本論文のご校閲を頂きました、東京農業大学動物生殖学研究室教授 岩田尚孝博士ならびに同研究室教授 白砂孔明博士に深甚なる謝意を表します。また、本論文の審査にあたり主査の労を執っていただきました東京農業大学動物遺伝学研究室教授 野村こう博士ならびに副査の労を執っていただきました名古屋大学大学院生命農学研究科 附属ワールド科学教育研究センター准教授 松山秀一博士に深謝いたします。

本研究遂行上、データの集積および解析など多岐にわたりご協力をいただきました、相澤拓朗修士に心から感謝いたします。また、多くのご助言およびご協力をいただきました、家畜改良事業団の職員の皆様、自らの研究が忙しい中真摯にご協力いただきました動物生殖学研究室の大学院生、学生ならびに卒業生の皆様、そして研究に使用したウシの日常管理および採材などにご協力いただきました本学富士農場の職員の皆様に心中より感謝の意を捧げます。

最後に私の研究活動に常に理解をしていただき、物心ともに協力してくれました妻および息子たちに感謝します。

引用文献

一般社団法人 家畜改良事業団家畜改良技術研究所. 受胎調査成績. 2017.
<http://liaj.or.jp/giken/hanshoku/jyutai.html>

International Embryo Technology Society Manual

https://www.iets.org/pub_manual.asp

黒毛和種繁殖雌牛における代謝プロファイルテスト診断マニュアル. 独立
行政法人 家畜改良センター鳥取牧場 2016

今井敬, 杉村智史, 松田英雄, 稲葉泰志, 橋谷田豊. 受胎性の高いウシ体外
受精胚の選別指標とその方法. 日本胚移植学雑誌. 2015; 36(1): 37-41.

木村容子, 新井一博, 湊和之, 阿部伸司, 野呂明弘. 高泌乳牛の各泌乳期
における生乳、血液および第一胃液成分の変動. 日本獣医師会雑誌 1993;
46: 385-391.

下司雅也, 橋谷田豊, 小川増弘. 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. 日本農業研究所研究報告. 2010; 23: 231-244.

佐々木恵美, 長谷川清寿, 安部亜津子, 高仁敏光. ウシ胚移植に使用する移
植器の違いが受胎成績に及ぼす影響の検討. 島根県立畜産試験場研究報告.
2004; 37: 6-10.

杉江侑, 相馬正, 大沼秀男. 牛の受精卵移植に関する研究,特に非手術的方

法による受精卵移植成功例について(速報). 家畜繁殖誌. 1965; 10(4): 124-127.

鈴木修, 下司雅也, 米内美晴, 坂口実. 牛胚の両側子宮角移植および人工授精後の追い移植による子牛生産. 日畜会報. 1996; 67(8): 732-739.

鈴木達行, 下平乙夫, 酒井豊, 松田修一, 三浦秀夫, 伊藤一伸. 片側子宮角への受精卵移植によるウシの双子生産について. 家畜繁殖誌. 1986; 32: 44-47.

高橋芳幸, 鈴木達行, 下平乙夫. ウシ受精卵の頸管経由移植に関する試験—移植器具に付けた紙の覆いが受胎率および子宮内細菌汚染防止に及ぼす効果について—. 家畜繁殖誌. 1982; 28(1): 30-35.

Anderson GB, Cupps PT, Drost M. Induction of Twins in Cattle with Bilateral and Unilateral Embryo Transfer. J ANIM SCI. 1979; 49: 1037-1042.

Ann Van Soom, Marleen L Boerjan, Peter Bols, Geert Vanroose, Ann Lein, Marc Coryn, Aart de Kruif. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation Biology of Reproduction. 1997; 57(5): 1041-1049.

Båge R, Gustafsson H, Larsson B, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H. Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns.

Theriogenology 2002; 57: 2257–2269.

Barnwell CV, Farin PW, Whisnant CS, Alexander JE, Farin CE. Maternal serum progesterone concentration and early conceptus development of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Domest Anim Endocrinol* 2015; 52: 75-81.

Bauer BK, Isom SC, Spate LD, Whitworth KM, Spollen WG, Blake SM, Springer GK, Murphy CN, Prather RS. Transcriptional profiling by deep sequencing identifies differences in mRNA transcript abundance in in vivo-derived versus in vitro-cultured porcine blastocyst stage embryos. *Biol Reprod* 2010; 83: 791-798.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 1995; 57: 289-300.

Berg DA, Menino AR Jr. Bovine embryos produce a urokinase-type plasminogen activator. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 14–19.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine* 2014; 6(224): 224ra24.

Bongso TA, Basrur PK. Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis. *Vet Rec* 1975; 96(6): 124-126.

Bott RC, Ashley RL, Henkes LE, Antoniazzi AQ, Bruemmer JE, Niswender GD, Bazer FW, Spencer TE, Smirnova NP, Anthony RV, Hansen TR. Uterine vein infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biol Reprod* 2010; 82: 725–735.

Canu S, Boland M, Lloyd GM, Newman M, Christie MF, May PJ, Christley RM, Smith RF, Dobson H. Predisposition to repeat breeding in UK cattle and success of artificial insemination alone or in combination with embryo transfer. *Vet Rec* 2010; 167: 44–51.

Carneiro MCA, Takeuchi PL, Araújo A, Lôbo RB, Elias FP, Vila RA, Miranda-Furtado CL, Ramos ES. Sexing single bovine blastomeres using TSPY gene amplification. *Genet Mol Res* 2011; 10(4): 3937-3941.

Chou JS, Jacobson JD, Patton WC, King A, Chan PJ. Modified isocratic capillary electrophoresis detection of cell-free DNA in semen. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2004; 21(11): 397-400.

Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* 1988.; 115(1): 61-69.

Deog-Bon Koo, Yong-Kook Kang, Young-Hee Choi, Jung Sun Park, Ha-Na Kim, Keon Bong Oh, Dong-Soo Son, Humdai Park, Kyung-Kwang

Lee, Yong-Mahn Han. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biology of Reproduction*. 2002; 67(2): 487-492.

Desmet KL, Van Hoeck V, Gagné D, Fournier E, Thakur A, O'Doherty AM, Walsh CP, Sirard MA, Bols PE, Leroy JL. Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations: integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts. *BMC Genomics* 2016; 17(1): 1004.

Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, Martinez S, Al-Asmar N, Riboldi M, Díaz-Gimeno P, Valbuena D, Simón C. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertil Steril* 2015; 104: 534-541.

Dimopoulou M, Anifandis G, Messini CI, Dafopoulos K, Kouris S, Sotiriou S, Satra M, Vamvakopoulos N, Messinis IE. Follicular fluid oocyte/cumulus-free DNA concentrations as a potential biomolecular marker of embryo quality and IVF outcome. *BioMed Research International* 2014; 289306 doi: 10.1155/2014/289306

Dochi O, Takahashi K, Hirai T, Hayakawa H, Tanisawa M, Yamamoto Y, Koyama H. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 124–128.

Ordoñez E, Rueda L, Cañadas MP. Evaluation of Sample Stability and Automated DNA. Extraction for Fetal Sex Determination Using Cell-Free FetalDNA in Maternal PlasmaBioMed Research International 2013; doi.org/10.1155/2013/195363

Farin PW, Farin CE. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. Biol Reprod 1995; 52: 676-82.

Filho MFS, Girotto R, Abe EK, Penteado L, Campos FEP, Moreno JF *et al.*. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. Journal of Animal Science 2012; 90(6): 1816–1823.

Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N, Iwazumi Y, Ohsaki K. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after in vitro maturation. Mol Reprod Dev 1992; 33: 357–362.

Ge H, Tollner TL, Hu Z, Dai M, Li X, Guan H, Shan D, Zhang X, Lv J, Huang C, Dong Q. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. Mol Reprod Dev 2012; 79: 392-401.

Gómez E, Gutiérrez-Adán A, Díez C, Bermejo-Alvarez P, Muñoz M, Rodríguez A, Otero J, Alvarez-Viejo M, Martín D, Carrocera S,

Caamaño JN. Biological differences between in vitro produced bovine embryos and parthenotes. *Reproduction* 2009;137: 285–295.

Gómez E, Caamaño JN, Bermejo-Alvarez P, Díez C, Muñoz M, Martín D, Carrocera S, Gutiérrez-Adán A. Gene expression in early expanded parthenogenetic and in vitro fertilized bovine blastocysts. *J Reprod Dev* 2009; 55: 607–614.

Hamano S, Kuwayama M. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology* 1993; 39: 703–712.

Hart EA, Patton WC, Jacobson JD, King A, Corselli J, Chan PJ. Luteal phase serum cell-free DNA as a marker of failed pregnancy after assisted reproductive technology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2005; 22(5): 213-217.

Hashiyada Y, Okada M, Imai K. Transition of the pregnancy rate of bisected bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from in vivo-cultured in vitro-fertilized embryos. *J Reprod Dev* 2005; 51: 749–756.

Hendriks WK, Colleoni S, Galli C, Paris DBBP, Colenbrander B, Stout TAE. Mitochondrial DNA replication is initiated at blastocyst formation in equine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2019; 31: 570-578.

Hirayama H, Moriyasu S, Kageyama S, Sawai K, Takahashi H, Geshi M, Fujii T, Koyama T, Koyama K, Miyamoto A, Matsui M, Minamihashi A. Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. *Theriogenology* 2014; 81: 1108–1115.

H Michael Kubisch, Terri A Rasmussen, Kelly M Johnson. Interferon-tau in bovine blastocysts following parthenogenetic activation of oocytes: pattern of secretion and polymorphism in expressed mRNA sequences. *Mol Reprod Dev.* 2003; 64(1): 79-85.

Hwang SJ, Cho TH, Kim IS. In vivo gene activity of human mesenchymal stem cells after scaffold-mediated local transplantation. *Tissue Engineering Part A* 2013; 20(17-18): 2350-2364

Ichikawa K, Shibahara H, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Cell-free DNA content in follicular fluid: a marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reproductive Medicine and Biology* 2020; 19(1): 95-103

Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM. Inter-feron-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature.* 1987; 330: 377–379.

Iwata H, Minami N, Imai H. Postnatal weight of calves derived from in

vitro matured and in vitro fertilized embryos developed under various oxygen concentrations. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12: 391-396.

Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K, Miyake M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 2004; 127: 159-164.

Kadokawa H, Takusari N, Minezawa M, Takahashi H, Kariya T. Absence of fetal cell in bovine jugular and uterine vein blood. *J. Reprod. Dev* 1996; 42(3): 205-208.

Kamimura S, Nishiyama N, Ookutsu S, Goto K, Hamana K. Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. *Theriogenology* 1997; 47(8): 1563-1569.

Kansaku K, Munakata Y, Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Mitochondrial dysfunction in cumulus-oocyte complexes increases cell-free mitochondrial DNA. *Journal of Reproduction and Development* 2018; 64(3): 261-266.

Kansaku K, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Mitochondrial cell-free DNA secreted from porcine granulosa cells. *Zygote* 2019.; 27(5): 272-278.

Katagiri S, Moriyoshi M. Alteration of the endometrial EGF profile as a potential mechanism connecting the alterations in the ovarian steroid hormone profile to embryonic loss in repeat breeders and high-producing cows. *J Reprod Dev* 2013; 59: 415–420.

Kim UH, Suh GH, Hur TY, Kang SJ, Kang HG, Park SB, Kim HS, Kim IH. Comparison of two types of CIDR-based timed artificial insemination protocols for repeat breeder dairy cows. *J Reprod Dev* 2007; 53: 639–645.

Klimczak AM, Pacheco LE, Lewis KE, Massahi N, Richards JP, Kearns WG, Saad AF, Crochet JR. Embryonal mitochondrial DNA: relationship to embryo quality and transfer outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2018; 35: 871-877.

Koester M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Montag M, Rings F, Schimming T, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M. Evaluation of bovine zona pellucida characteristics in polarized light as a prognostic marker for embryonic developmental potential. *Reproduction* 2011; 141: 779–787.

Kunz PL, Blum JW, Hart IC, Bickel H, Landis J. Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Animal Science* 1985; 40(2): 219-231.

Labrecque R, Sirard MA. Gene expression analysis of bovine blastocysts produced by parthenogenic activation or fertilisation. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23: 591–602.

Larson MA, Kimura K, Kubisch HM, Roberts RM. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(17): 9677-9682.

Lauretta Turin, Pietro Invernizzi, Marion Woodcock, Francesca R Grati, Federica Riva, Giulia Tribbioli, Götz Laible. Bovine fetal microchimerism in normal and embryo transfer pregnancies and its implications for biotechnology applications in cattle. *Biotechnol J* 2007; 2: 486-491.

Lemos DC, Takeuchi PL, Rios AFL, Araújo A, Lemos HC, Ramos ES. Bovine fetal DNA in the maternal circulation: Applications and implications. *Placenta* 2011; 32(11): 912-913,

Leroy JL, Rizos D, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S, Bols PE. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. *Reproduction, Fertility and Development* 2011; 24(1): 1-12.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$

Method. Methods 2001; 25: 402–408.

Maria José de Los Santos, Antonio Diez Juan, Amparo Mifsud, Amparo Mercader, Marcos Meseguer, Carmen Rubio, Antonio Pellicer. Variables associated with mitochondrial copy number in human blastocysts: what can we learn from trophoctoderm biopsies? Fertil Steril 2018; 109: 110-117.

McCarthy MM, Yasui T, Felipe MJ, Overton TR. Associations between the degree of early lactation inflammation and performance, metabolism, and immune function in dairy cows. Journal of Dairy Scienc 2016.; 99(1): 680-700.

Liu MC, Oxnard GR, lein EA, Swanton C, Seiden MV. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. Annals of Oncology. 2020; 33(6): 745-759.

Lopes AS, Madsen SE, Ramsing NB, Løvendahl P, Greve T, Callesen H. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. Human Reproduction 2007; 22(2):558–566.

Miyake Y, Miyoshi K, Moriya H, Matsui M, Haneda S. Stduies on the accident rate in single and multiple births in dairy cows. Jpn J Large Anim Clin 2010; 1: 5–9.

Miyamoto A, Okuda K, Schweigert FJ, Schams D. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *J Endocrinol* 1992; 135: 103–114.

Monteiro APA, Bernard JK, Guo JR, Weng XS, Emanuele S, Davis R, Dahl GE, Tao S. Effects of feeding betaine-containing liquid supplement to transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2017; 100(2): 1063-1071

Mori M, Kasa S, Hattori MA, Ueda S. Development of a single bovine embryo improved by co-culture with trophoblastic vesicles in vitamin-supplemented medium. *J Reprod Dev* 2012; 58: 717–721.

Müller E, Wittkowski G. Visualization of male and female characteristics of bovine fetuses by real-time ultrasonics. *Theriogenology* 1986; 25(4): 571-574

Nagai K, Sata R, Takahashi H, Okano A, Kawashima C, Miyamoto A, Geshi M. 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*. 2009; 55(4): 454-459.

Nitta A, Shirasuna K, Haneda S, Matsui M, Shimizu T, Matsuyama S, Kimura K, Bollwein H, Miyamoto A. Possible involvement of

IFNT in lymphangiogenesis in the corpus luteum during the maternal recognition period in the cow. *Reproduction* 2011; 142: 879–892.

Nowroozi-Asl A, Aarabi N, Rowshan-Ghasrodashti A. Ghrelin and its correlation with leptin, energy related metabolites and thyroidal hormones in dairy cows in transitional period. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2016; 19(1): 197-204.

Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, Horiuchi T. *Journal of Veterinary Medical Science* 2001; 63(5): 525-519.

Oliveira JF, Henkes LE, Ashley RL, Purcell SH, Smirnova NP, Veeramachaneni DN, Anthony RV, Hansen TR. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology* 2008; 149: 1252–1259.

Presicce GA, Yang X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 380–385.

Priscila Marques Moura de Leon, Vinicius Farias Campos, Odir Antônio Dellagostin, João Carlos Deschamps, Fabiana Kömmling Seixas, Tiago Collares. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). *Theriogenology* 2012; 77(3): 694-698.

Rashid MB, Talukder AK, Kusama K, Haneda S, Takedomi T, Yoshino H, Moriyasu S, Matsui M, Shimada M, Imakawa K, Miyamoto A. Evidence that interferon-tau secreted from Day-7 embryo in vivo generates anti-inflammatory immune response in the bovine uterus. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 500: 879–884.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; 26: 139–140.

Rodrigues CA, Teixeira AA, Ferreira RM, Ayres H, Mancilha RF, Souza AH, Baruselli PS. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2010; 118: 110–117.

Sales JNS, Neves KAL, Souza AH, Crepaldi GA, Sala RV, Fosado M, Campos FEP, Faria M, SáFilho MF, Baruselli PS. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2011; 76(3): 427-435

Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M, Hoelker M, Gebremedhn S, Poirier M, Pandey HO, Tholen E, Neuhoff C, Held E, Besenfelder U, Havlicek V, Rings F, Fournier E, Gagné D, Sirard MA, Robert C, Gad A, Schellander K, Tesfaye D. Genome-wide DNA methylation patterns of

bovine blastocysts derived from in vivo embryos subjected to in vitro culture before, during or after embryonic genome activation. *BMC Genomics* 2018; 19: 424.

Seli E. Mitochondrial DNA as a biomarker for in vitro fertilization outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2016; 28: 158-163.

Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, Matsue T, Abe H, Hoshi H, Kobayashi M. Oxygen Consumption of Single Bovine Embryos Probed by Scanning Electrochemical Microscopy. 2001; *Anal. Chem.*: 73(15): 3751-3758.

Shirasuna K, Matsumoto H, Matsuyama S, Kimura K, Bollwein H, Miyamoto A. Possible role of interferon tau on the bovine corpus luteum and neutrophils during the early pregnancy. *Reproduction* 2015; 150: 217–225.

Silver M., Steven D.H., Comline R.S., , Placental exchange and morphology in ruminants and the mare. *Foetal and Neonatal Physiology* 1973; *Proceedings of the Sir Joseph Barcroft Centenary Symposium*, Cambridge University Press, Cambridge: 245–271.

Simon Kaja, Andrew J Payne, Yuliya Naumchuk, Peter Koulen. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. *Curr Protoc Toxicol* 2017; doi: 10.1002/cptx.21.

Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, Imai K. 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* 2010; 56: 200–207.

Son DS, Choe CY, Cho SR, Choi SH, Kim HJ, Hur TY, Jung YG, Kang HG, Kim IH. A CIDR-based timed embryo transfer protocol increases the pregnancy rate of lactating repeat breeder dairy cows. *J Reprod Dev* 2007; 53: 1313–1318.

Spielmann H, Jacob-Mueller U, Schulz P, Schimmel A. Changes of the adenine ribonucleotide content during preimplantation development of mouse embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 1984; 71: 467-473.

Sreenan JM, Diskin MG, McDonagh T. Induction of twin-calving by non-surgical embryo transfer: a field trial. *The Vet Record*. 1981;109(4): 77-80.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; 64: 904-909.

Surachai Rattanasuk, Rangsun Parnpai, Mariena Ketudat-Cairns. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. *J Reprod Dev* 2011; 57(4): 539-42.

Tesfaye D, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Schellander K. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. *Reprod Domest Anim* 2004; 39: 396-404

Thompson JG. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 341-354.

Toji N, Koshi K, Furusawa T, Takahashi T, Ishiguro-Oonuma T, Kizaki K, Hashizume K. A cell-based interferon-tau assay with an interferon-stimulated gene 15 promoter. *Biomed Res* 2018; 39: 13–20.

Urrego R, Rodriguez-Osorio N, Niemann H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics* 2014; 9: 803-815.

Ushijima H, Akiyama K, Tajima T. Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: in vivo collected and in vitro produced embryos. *J Reprod Dev* 2008; 54: 239-43.

Van Hoeck V, Bols PE, Binelli M, Leroy JL. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: a possible pathway to subfertility? *Animal Reproduction Science*. 2014; 149(1-2): 19-29.

Velásquez AE, Manriquez JR, Castro FO, Rodriguez-Alvarez LI. Effect of zona pellucida removal on early development of in vitro produced bovine embryos. *Arch Med Vet* 2013; 45: 7–15.

Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod* 2010; 83:52-62.

Wall SK, Gross JJ, Kessler EC, Villez K, Bruckmaier RM. Blood-derived proteins in milk at start of lactation: Indicators of active or passive transfer. *Journal of Dairy Science* 2015; 98(11): 7748-7756.

Wang ZG, Wang W, Yu SD, Xu ZR. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis, and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. *Anim Reprod Sci* 2008; 105: 292–301

Wu FR, Liu Y, Shang MB, Yang XX, Ding B, Gao JG, Wang R, Li WY. Differences in H3K4 trimethylation in in vivo and in vitro fertilization mouse preimplantation embryos. *Genet Mol Res* 2012; 11: 1099-108.

Yaginuma H, Funeshima N, Tanikawa N, Miyamura M, Tsuchiya H, Noguchi T, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K, Hamano S.

Improvement of fertility in repeat breeder dairy cattle by embryo transfer following artificial insemination: possibility of interferon tau replenishment effect. *J Reprod Dev* 2019; 65: 223–229.

Yang H, Zhong F, Yang Y, Wang X, Liu S, Zhu B. Sex determination of bovine preimplantation embryos by oligonucleotide microarray. *Animal Reproduction Science* 2013; 139(1–4): 18-24.

Yang J, Wang L, Jiang X, Jiang Y, Liu L. Detection of bovine fetal Y-specific Sry sequence from maternal blood. *Chin J Biotechnol* 1996; 12(3): 185-188.

Yao N, Wan PC, Hao ZD, Gao FF, Yang L, Cui MS, Wu Y, Liu JH, Liu S, Chen H, Zeng SM. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 132–139.

Zeng HT, Ren Z, Yeung WS, Shu YM, Xu YW, Zhuang GL, Liang XY. Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in in vitro matured human oocytes. *Hum Reprod* 2007; 22: 1681-1686.