

体外受精を活用した良質胚多量確保技術の開発

平山忠一¹ 緒方喜代子² 波谷弥生³ 中嶋達彦⁴ 野田伸司⁴ 後藤孝一⁵ 峯 英征⁵ 川辺邦彦⁴

Development of production system for a large number of excellent bovine embryos using IVF

Tadakazu Hirayama, Kiyoko Ogata, Yayoi Sibuya, Tatumiko Nakasima,
Sinji Noda, Kouiti Gotou, Hideyuki Mine, Kunihiko Kawanabe

I 緒言

平成3年度より実施された牛肉の輸入自由化によって品質面で競合する乳用種メレ子価格は低落し酪農経営を圧迫している。また、肉用種においても、ここ数年生産頭数が伸び悩み、肉用素牛不足が懸念されている。

このようななかで食肉処理場で処理される肉専用種の卵巣を利用して体外受精により低コストで胚を生産し、後継牛を必要としない乳牛に移植することで、肉専用種の肥育素牛を生産する方法が開発された。また、乳牛、肉牛を問わず優良遺伝子を確保するため、個体毎の体外受精法の確立も必要とされている。

しかし、経済的に価値のある子牛を得るまでには体外受精胚を生産するための体外受精法、卵子及び胚の保存法、培養法、双子を得るための移植、妊娠診断、維持、事故防止、哺育育成など問題点が残されている。そこで5ヶ年計画(平成3年度～7年度)で、これらの諸問題を解決し、体外受精胚の安定供給技術、双子生産技術の確率を行うことを目的とし、検討を行った。

II 材料及び方法

褐毛和種及びホルスタイン種の卵子を2%CO₂、38.5℃条件下培養液(TCM199)で21～22時間の成熟培養を行い体外受精に供した。

試験に用いた精液は、当センター繋養の褐毛和種1頭と家畜改良事業団繋養の黒毛和種1頭から採取したものである。媒精後、5時間目に卵子を発生培地に移し替え、72時間目に分割検査を行った。7日から8日目に出現した胚盤胞期胚は移植または凍結保存後移植及び培養試験に用いた。

1 個体別体外受精法の確立

1) 卵子回収における吸引法において、注射針の挿入切

断面が上向きあるいは下向きにした場合の回収卵子数、卵子のランク、回収時間を検討した。

- 2) 注射針の大きさ(18G×1½と20G×1½)における回収卵子数、卵子のランク、回収時間を検討した。
- 3) 2頭の種雄牛について1本の精液を融解後、10及び20mMテオフィリン添加BO液で精子洗浄を行い、牛血清アルブミン(1mg/ml)及びヘパリン(10mg/ml)を含むBO液で12×10⁶個/mlに希釈し体外受精を行った。媒精後18～22時間後に卵子のホールマウント標本作製し、固定、染色後、受精率を検査した。
- 4) 上と同様の方法で精子洗浄を行い1/2倍及び、更にその1/2倍の精子濃度で体外受精を行い、受精率を検討した。

2 卵子保存法の開発

- 1) MII期末受精卵の凍結における凍結プログラムの検討を行った。
 - (1) 耐凍剤: 1.8Mエチレングリコール+0.1、0.2Mシュクロース及び10%グリセロール+0.1、0.2Mシュクロース
 - (2) 液体窒素浸漬温度: -25℃、-30℃、-35℃、-40℃
- 2) 体外受精胚のダイレクト法による凍結における耐凍剤の検討を行った。

3 体外培養技術の確立

- 1) TCM199+5%CSの発生培地を基本にβ-メルカプトエタノール無添加区、50μM、100μM、200μM添加区において胚盤胞発生状況の検討を行った。
100μMのβ-MEを媒精日を0とし、2～6日目に添加してそれぞれにおける胚盤胞発生率を観察した。
- 2) 発生培地の違いによる胚盤胞細胞数の比較における

1 畜産開発公社出向 2 川本喜代子 3 井上弥生 4 城北家畜保健衛生所 5 阿蘇家畜保健衛生所

体外受精胚品質評価法の検討を行った。

培養液：TCM199+5%CS、TCM199+50 μ M β -ME、TCM199+50 μ M β -ME、TCM199+100 μ M β -ME、TCM199+150 μ M β -ME、CR1aa

4 双子妊娠の確保技術の開発

1) 複数黄体形成の血中プロゲステロン (P) 濃度と受胎率及び双子率との関連性の検討を行った。

2) 複数黄体形成牛の血中P濃度と双胎妊娠維持能力との関連性の検討を行った。

なお、血中成分の測定時期は、移植日・移植後35日目・妊娠2ヶ月と5ヶ月・分娩予定前2ヶ月と1ヶ月の時点、また対照牛としての人工授精牛は授精後35日目・妊娠2ヶ月と5ヶ月・分娩予定前2ヶ月と1ヶ月の時点で行った。

3) 複数黄体を誘起した受卵牛への1卵移植を行い、受胎性について検討した。

4) 複数黄体を誘起する際のFSH投与方法について、ポリビニールピロリドン (PVP) を用いた1回投与方法の有効性について検討した。

5 多胎診断技術の確立

1) 複数黄体2卵移植牛34頭について、移植後28~30日・53~55日目に直腸検査及び超音波による早期妊娠診断を実施した。

2) 血中生化学検査により3-ヒドロキシ酪酸・遊離脂肪酸・グルコースを測定し、後期妊娠診断を行った。
なお、血中成分の測定時期は、移植日・移植後35日・妊娠2ヶ月と5ヶ月・分娩予定2ヶ月前と1ヶ月の時点で行った。

6 分娩予知技術の開発

1) 朝、夕の直腸温測定による分娩時期予知の検討を行った。

2) 夕方1回給餌による昼間分娩誘起法の検討を行った。

7 双子牛の哺育・育成技術の確立

地域バイオテックにおいて開発した哺育育成マニュアルに基づき、体外受精産子の発育性の調査を行い、その結果を基に体外受精双子牛に適した哺育育成方法を検討した。

III 結果及び考察

1 個体別体外受精法の開発

吸引法における卵子の回収において、針の挿入角度を下向きにすることによって、回収卵数が多くなる傾向が認められ、さらにAランクの回収卵率は有意に高くなった。針を下向きにすると吸引時における針と卵子との摩擦が少なく、卵丘細胞の剥離が軽減されるためだと推察される (第1表)。

20Gの針を用いると、回収卵数は多くなる傾向にあったが、B・Cランク卵率が高まり、更に回収時間も長くなる傾向にあった。これは、針が細くなると吸引漏れは少なくなるが、狭い空間をより早い速度で吸引されるため卵丘細胞の剥離が激しくなるためと思われる (第2表)。

精子数を 12×10^6 個/mlに希釈して用いた場合、添加するテオフィリン濃度は10mMより20mMで正常受精率が改善される傾向が認められた。

しかし、発生率に差は認められなかった (第3表、第4表)。

第1表 吸引法における注射針の挿入角度による卵子回収率 a VS b; p<0.01

挿入角度	卵巣数	回収卵数	Aランク (%)	Bランク (%)	Cランク (%)	回収時間
上向き	60	590	206 (35)a	218 (37)	166 (28)	85分
下向き	60	635	324 (51)b	216 (34)	95 (15)	80分

第2表 吸引法における注射針の太さによる卵子回収率

針の太さ	卵巣数	回収卵数	Aランク (%)	Bランク (%)	Cランク (%)	回収時間
18G \times 1 $\frac{1}{2}$	30	331	162 (49)	122 (37)	47 (14)	40分
20G \times 1 $\frac{1}{2}$	30	384	153 (40)	150 (39)	81 (21)	55分

また、精子数を 6×10^6 個/ml に希釈して用いると、正常受精率が改善される傾向にあったが、 3×10^6 個/ml に希釈すると、受精率及び正常受精率ともに低下する傾向が認められた (第5表)。

2 卵子保存法の開発

未受精卵の凍結では耐凍剤に10%グリセロール+0.1Mシュクロースを用い、 -25°C で液体窒素に浸漬したも

のが、凍結融解後の形態的正常卵率 (75.0%) 及び体外受精後の発生率 (胚盤胞率9.8%) は高い傾向にあった (第6~9表)。

体外受精胚のダイレクト法による凍結では、1.8Mエチレングリコール+0.1Mシュクロースで凍結したものが、融解培養後の脱出胚盤胞率が高い傾向にあった (第10表)。

未受精卵及び体外受精胚の各ステージ毎の凍結保存技

第3表 一定精子数 (12×10^6 個/ml) 下におけるテオフィリン濃度の影響
a VS b; $p < 0.01$

種雄牛	テオフィリン濃度	供試卵数	受精卵数(%)	正常受精卵数(%)
A	10mM	120	111(92.5)	75(62.5)
	20mM	87	79(90.8)	63(72.4)
B	10mM	132	119(90.2)	83(62.9)a
	20mM	164	151(92.1)	139(84.8)b

第4表 一定精子数 (12×10^6 個/ml) 下におけるテオフィリン濃度の発生率への影響

種雄牛	テオフィリン濃度	供試卵数	2 cell ≤ (%)	8 cell ≤ (%)	胚盤胞
A	10mM	175	138(78.8)	82(46.8)	24(13.7)
	20mM	163	142(87.1)	79(48.5)	21(12.9)
B	10mM	131	110(83.9)	63(48.1)	17(12.9)
	20mM	136	122(89.7)	66(48.5)	17(12.5)

第5表 精子濃度による受精率および正常受精率への影響

種雄牛	精子濃度 (個/ml)	供試卵数	受精卵数(%)	正常受精卵数(%)
A	12×10^6	94	86(91.5)	69(73.4)
	6×10^6	54	49(90.7)	44(81.5)
	3×10^6	74	45(60.8)	37(50.0)
B	12×10^6	120	110(91.7)	94(78.3)
	6×10^6	69	62(89.9)	59(85.5)
	3×10^6	85	46(54.1)	32(37.6)

第6表 耐凍剤エチレングリコール+0.1Mシュクロース

液体窒素 浸漬温度	供試卵数	形態的正常卵数(%)	2 Cell ≤ (%)	8 Cell ≤ (%)	胚盤胞(%)
-25	62	12(19.3)	1(1.3)	0(0.0)	0
-30	84	31(36.9)	9(10.7)	3(3.6)	0
-35	89	53(59.6)	18(20.2)	7(7.9)	1(1.1)
-40	91	50(54.9)	13(14.2)	2(3.3)	0

第7表 耐凍剤エチレングリコール+0.2Mシュークロース

液体窒素 浸漬温度	供試卵数	形態的正常卵数(%)	2 Cell \leq (%)	8 Cell \leq (%)	胚盤胞(%)
-25	54	12(22.2)	0(0.0)	0(0.0)	0
-30	48	14(29.1)	2(4.2)	1(2.1)	0
-35	64	29(45.3)	9(14.1)	5(7.8)	2(2.9)
-40	68	20(29.4)	8(11.8)	2(2.9)	0

第8表 耐凍剤グリセロール+0.1Mシュークロース

ab:P < 0.05

液体窒素 浸漬温度	供試卵数	形態的正常卵数(%)	2 Cell \leq (%)	8 Cell \leq (%)	胚盤胞(%)
-25	92	65(75.0)	36(39.1)	24(26.1)	9(9.8)a
-30	65	35(53.8)	22(33.8)	10(15.4)	3(4.6)
-35	84	38(45.2)	29(34.5)	12(14.3)	0 b
-40	79	30(38.0)	18(22.8)	8(10.1)	0 b

第9表 耐凍剤グリセロール+0.2Mシュークロース

液体窒素 浸漬温度	供試卵数	形態的正常卵数(%)	2 Cell \leq (%)	8 Cell \leq (%)	胚盤胞(%)
-25	71	44(62.0)	20(28.2)	12(16.9)	0
-30	87	46(52.9)	21(24.1)	10(11.5)	0
-35	65	22(33.8)	15(23.1)	6(9.2)	1(4.5)
-40	82	27(32.9)	13(15.9)	10(12.2)	0

第10表 体外受精受精胚のダイレクト法による耐凍剤別融解後の成績

ab:p < 0.05

耐凍剤	供試胚数	形態的正常胚数(%)	脱殻数(%)
エチレングリコール+0.1Mシュークロース	12	10(83.3)	8(66.6)a
エチレングリコール+0.2Mシュークロース	18	9(50.0)	6(33.3)
グリセロール+0.1Mシュークロース	20	11(55.0)	7(35.0)
グリセロール+0.2Mシュークロース	14	6(42.9)	4(28.6)
プロパンジオール	18	8(44.4)	6(33.3)
プロパンジオール+エチレングリコール	20	6(30.0)	3(15.0)a

第11表 発生培地への β -MEの添加が発生率に及ぼす影響

培養条件	供試卵数	8 cell \leq (%)	胚盤胞(%)
無添加	156	70(44.9)	20(12.8)
50 μ M添加	136	60(44.1)	26(19.2)
100 μ M添加	150	72(48.0)	42(28.0)
150 μ M添加	158	74(46.8)	40(25.3)
200 μ M添加	156	72(46.2)	22(14.1)

術を確立するため、さらに耐凍剤及び液体窒素浸漬温度などの検討が必要である。

3 体外培養技術の開発

発生培地における β -MEの添加効果の有無については、8 cell発生率では対照区(44.9%)に比べ各添加区間とも差は見られなかった。

しかし、胚盤胞発生率については、対照区(12.8%)に比べ、100 μ M添加区(28.0%)、150 μ M添加区(25.3%)で有意に高い値が得られた(第11表)。

媒精日を0日とし2~6日目に β -MEの添加を行った場合の7日目及び8日目の胚盤胞発生率については、7日目では5日目以降に添加した方が高い傾向にあったが、8日目では添加時期による差はなくなることから、

発生の早い時期での β -MEの添加は胚の発生速度を遅らせるのではと思われた(第12表)。

培養液毎の胚盤胞の平均細胞数においては、TCM199+100 μ M β -ME及びCR1aa培地を用いた場合に多くなる傾向が見られた。また、どの培養液を用いた場合でも発生が遅くなるにつれ、細胞数が少なくなる傾向にあった。

4 双胎妊娠の確保技術の開発

移植成績は受胎率62.5% (35/56) で、超音波診断の

結果11頭は双胎と推定され他については不明であった(第14表)。

複数黄体を有するET受胎牛の血中P濃度は、単一黄体のAI受胎牛のそれと比較して、妊娠期間を通して有意に高い値で推移していた。

複数黄体受胎牛のうち流産牛における血中P濃度は、35日目において複数黄体分娩牛との有意差が認められた(第15表)。

このことにより流産防止対策として35日令での血中P濃度測定により、低値の場合にはホルモン剤投与などを

第12表 β -MEの添加時期による胚盤胞発生時期の差

媒 精 日 からの数	供試卵数	7 日 目		8 日 目	
		胚盤胞数	胚盤胞率(%)	胚盤胞数	胚盤胞率(%)
2日目	74	12	16.2	19	25.7
3日目	76	11	14.5	17	22.4
4日目	81	17	21.0	19	23.5
5日目	84	20	23.8	21	25.0
6日目	88	23	26.1	23	26.1

第13表 培養液の違いによる胚盤胞細胞数

培 養 液	平均細胞数 (個)		
	7日目	8日目	8日目
TCM199+5%CS	102 \pm 26	99 \pm 36	92 \pm 38
TCM199+50 μ M β -ME	108 \pm 32	102 \pm 42	89 \pm 39
TCM199+100 μ M β -ME	121 \pm 41	113 \pm 33	103 \pm 52
TCM199+150 μ M β -ME	99 \pm 45	91 \pm 41	87 \pm 43
CR1aa	135 \pm 38	105 \pm 43	90 \pm 53

第14表 複数黄体誘起受卵牛への2卵移植成績

卵 別	移 植 頭 数	妊 否 不 明			受胎率(%)	流産率(%)	双子率(%)	分 娩 事故率(%)	正常子牛 生産率(%)
		+	±	-					
凍結2卵	30	18	0	12	60.0	11.1	28.6	5.6	121.4
体外受精	30	17	4	9	65.4	17.6	36.4	20.0	109.1
合 計	60	35	4	21	62.5	14.3	32.0	12.1	116.0

流産率=流産頭数/受胎頭数

双子率=双子分娩頭数/分娩頭数

分娩事故率=分娩前後死亡子牛頭数/分娩子牛頭数

正常子牛生産率=正常子牛頭数/分娩頭数

第15表 妊娠日令における血中プロジェステロン濃度の比較

区 分	頭 数	血中プロジェステロン濃度平均値 (ng/ml)					
		7日	35日	60日	150日	226日	264日
ET流産	3	14.0 \pm 7.5	13.0 \pm 3.0	14.3 \pm 0.3	17.0 \pm 0		
ET分娩	8	14.4 \pm 5.7	19.6 \pm 3.5	18.4 \pm 6.2	16.5 \pm 5.0	19.1 \pm 4.7	19.2 \pm 4.5
AI分娩	4	-	9.0 \pm 1.9	6.3 \pm 3.3	8.1 \pm 3.0	10.8 \pm 3.4	9.9 \pm 2.0

行う必要がある。

複数黄体誘起受卵牛への1卵移植成績は受胎率60.0% (6/10) で単一黄体牛における受胎率に比べて稍高い傾向を示し、複数黄体誘起法の受胎率向上に対する有効性が示唆された(第16表)。

PVP及び生理食塩水融解FSHの1回投与では、PVP融解10AU+生理食塩水融解5AUの同時1回投与によ

第16表 複数黄体誘起受卵牛への1卵移植成績

卵別	移植頭数	妊否			受胎率
		+	±	-	
凍結1卵	10	6	0	4	60.0

る形成黄体数は8.6個、受胎率は50.0% (4/8) であり、PVP融解15AU+生理食塩水融解5AUでは12.1個、63.6% (7/11) であった(第17、18表)。

このことより、PVPを用いたFSHの1回投与方法の有効性が示されたが、残存卵胞への対策が必要と思われた。

第17表 FSH1回投与による移植成績

FSH投与量	処理頭数	移植頭数	妊否			受胎率
			+	±	-	
(1) 10AU+5AU	11	8	4	4	50.0	
(2) 15AU+5AU	13	11	7	4	63.6	

- (1) PVP融解10AU+生食融解5AU
(2) PVP融解15AU+生食融解5AU

第18表 FSH1回投与による卵巣反応

FSH投与量	移植頭数	黄体数	卵胞残存頭数	残存卵胞数
(1) 10AU+5AU	8	8.6±3.2	3	1.0±0.0
(2) 15AU+5AU	11	12.1±8.1	5	2.0±1.0

- (1) PVP融解10AU+生食融解5AU
(2) PVP融解15AU+生食融解5AU

第20表 3-ヒドロキシ酪酸の妊娠日令による比較

単位: $\mu\text{M}/\ell$

	7日	35日	60日	150日	195日	225日	265日
ET双子	523.3 ±68.0	453.3 ±167.7	426.7 ±154.9	358.3 ±113.7	786.7 ±195.0	871.7 ±400.1	1704.0 ±1230.2
ET単子	481.3 ±206.6	506.7 ±203.9	418.0 ±133.3	358.0 ±119.5	362.7 ±101.5	380.7 ±120.3	498.7 ±155.8
AI単子	-	430.0 ±87.5	467.5 ±144.3	272.5 ±122.8	-	275.0 ±86.7	615.0 ±283.2

第19表 直腸検査並びに超音波診断による妊否判定成績

移植後28~30日	検査	直腸検査		超音波診断					
	目頭数	+	(++)	±	-	+	(++)	±	-
50	0	(0)	44	6	27	(10)	12	11	

移植後53~55日	検査	直腸検査		超音波診断					
	目頭数	+	(++)	±	-	+	(++)	±	-
50	30	(3)	5	15	32	(11)	0	18	

※(++)は双胎の内数

5 多胎診断技術の確立

初回の直腸検査では、6頭の不受胎が確認できたのみであったが、超音波では38頭中27頭の妊娠が確認でき、さらに27頭中10頭は双胎と推定された。第2回の直腸検査では、50頭中45頭の妊否が確認され、30頭中3頭が双胎と推定された。また、超音波では32頭中11頭が双胎と推定された(第19表)。

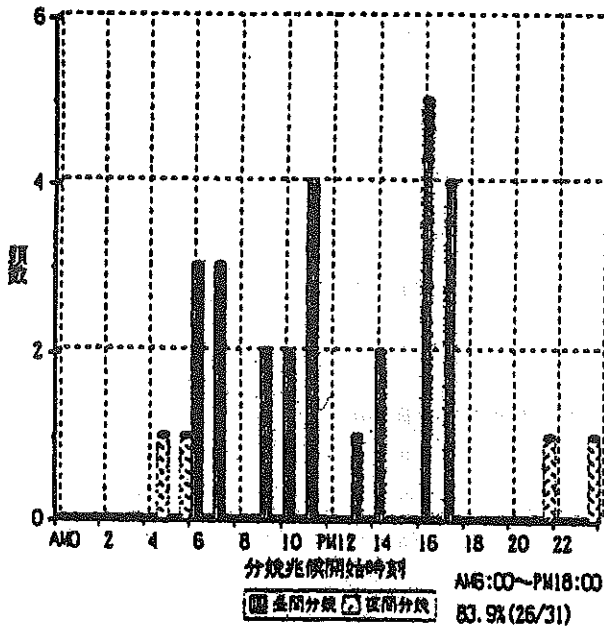
3-ヒドロキシ酪酸は分娩前60日まで放牧による粗飼料主体の飼養条件下での試験牛を用いたところ、双胎牛において分娩前60日に単子に比べ有意に高い値が認められた(第20表)。

しかし遊離脂肪酸及びグルコースについては、分娩前60日以降、母牛の代謝改善のために舎飼いによる増し飼いを行ったため、いずれの試験区においても差は認められなかった。

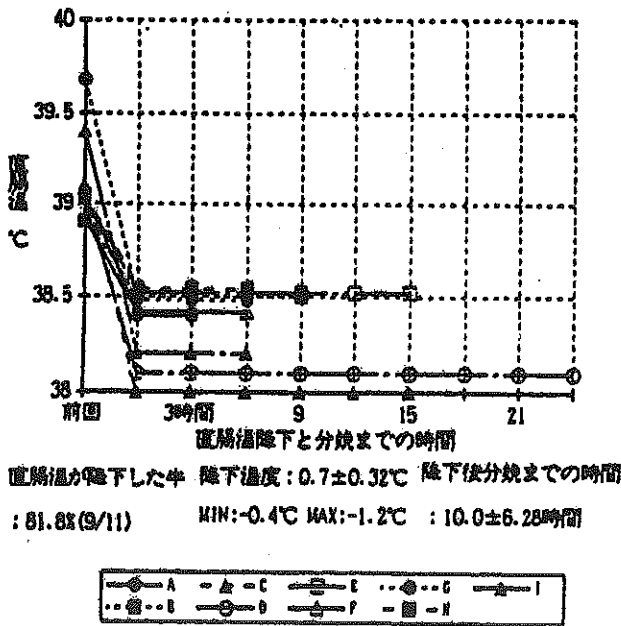
6 分娩予知技術の開発

昼間分娩誘起法として分娩予定日の2週間前から夕方1回給餌することにより、31頭中26頭(83.9%)の牛が午前6時から午後6時までの間に分娩徴候が認められた(第1図)。

分娩予知法として午前6時から7時及び午後4時に直腸温を測定した結果、11頭中9頭(81.8%)の牛で前日



第1図 分娩兆候の開始時刻



第2図 分娩予知

同時刻に比べ $0.7 \pm 0.32^\circ\text{C}$ の低下がみられ、低下後 10.0 ± 6.3 時間で分娩した(第2図)。

以上の結果から、昼間分娩誘起法及び直腸温測定による分娩予知を併用することにより、分娩時の立ち会いが容易となるため、事故の軽減が可能と思われた。

7 双胎牛の哺育・育成

生後7日まで初乳を3回/日給与し、21日令までは代用乳 $150\text{g} \times 3$ 回/日、以降は代用乳 $250\text{g} \times 2$ 回/日の給与を90日令まで行ったところ、4ヶ月令でのDGは 0.81kg であった。

以上のことから21日令までの初乳及び代用乳の給与回数は2回よりも3回が優れ、単子とほぼ同程度の発育を認めた(第21表)。

IV 摘要

体外受精は、と畜場で解体された雌牛の卵巣由来の卵子が利用でき、通常の胚移植に比べて技術確立ができれば非常に安価に胚を大量に生産できる。

今回、平成3年度から平成7年度にかけて胚を生産する過程での卵巣の採材、卵子の採取、未受精卵子の体外成熟、体外受精、体外培養など、また、体外受精胚移植による双胎妊娠の確保技術、多胎妊娠診断技術、分娩予知技術、双子牛の哺育育成技術等の各ステップについて検討し、ある程度の技術が確立できた。

今後、これらの技術を活用することにより遺伝的に優れた肉専用雌牛から大量に体外受精胚を生産しホルスタインなどに移植して肉用子牛の大量生産が出来れば酪農との両立も可能である。このことから、肉用牛増産のためには不可欠な技術と考えられるため、一般に普及できる技術については迅速に伝達する必要がある。

第21表 双子産子の生時体重及び発育値

単位: kg

区分	頭数	0	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月
3回/日給与	4	27.6	38.5	59.0(0.52)	91.0	125.0(0.81)
2回/日給与	4	27.0	37.6	55.8(0.48)	86.3	107.2(0.67)
単子	10	32.4	49.3	74.9(0.71)	107.2	135.2(0.86)

() はDG

眼でみる成果

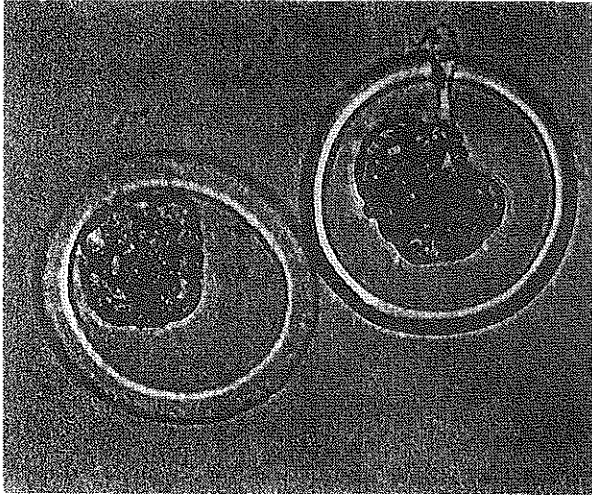


写真1 2分割胚

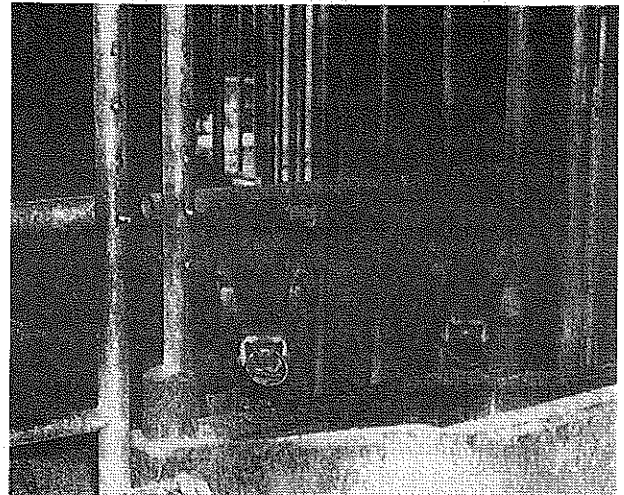


写真2 2分割胚移植により生まれた1卵性双子



写真3 分娩予知による介護分娩



写真4 凍結2胚移植による双子 (H8.2.22)



写真5 体外受精胚2胚移植による双子 (H8.2.26)

V 引用文献

- 1 浜野晴三、桑山正成、(1991) 牛体外受精における異なる種雄牛の凍結・融解精子処理条件の検討。東日本受精卵移植研究会講演要旨
- 2 音井威重、立川 進、近藤正治、(1991) 鈴木達行プロピレングリコールを用いた未受精卵の凍結保存。東日本受精卵移植研究会講演要旨
- 3 福島護之ら (1991) 牛卵母細胞の凍結条件が体外受精率に及ぼす影響。東日本受精卵移植研究会講演要旨
- 4 Otoi, et al (1991) Theriogenology. 38.711-719.
- 5 立川 進、音井威重、近藤正治 (1991) プロピレングリコールを用いた体外受精胚の1段階希釈凍結保存法の開発。繁殖技術会誌 13巻3号 131-138。

Summary

Development of production system for a large number of excellent bovine embryos using IVF

These experiments were designed to store excellent IVF bovine embryos at low - cost and develop the twins production system with embryo transfer.

- 1 At the collection of follicular oocytes using aspiration with an 18 - gauge needle, excellent oocyte - cumulus complexes increase when insert the tip face of a needle into follicles in down direction.
- 2 In the cryopreservation of MII oocytes, it tended to increase morphological normality and development after IVF of frozen - thawed bovine oocytes, to frozen using 10% Glycerol + 0.1M Sucrose and plunged in liqued nitrogen at - 25°C.
In the culture of frozen - thawed IVF bovine embryos by direct method with different solution, the group of frozen by 1.8M Ethylene glycol + 0.1M Sucrose tended to increase the frequency of hatching blastocyst.
- 3 Pregnancy rate of single embryo transfers to the recipient occuring several corpus luteum was 60%, and it tended to increase the pregnancy rate more than recipient with single corpus luteum.
Single injection treatment of 15AU FSH diluted with 30% PVP and 5AU FSH diluted with physiological salt solution were more effective than 10AU FSH diluted with 30% PVP and 5AU FSH diluted with physiological salt solution for superovulation treatment.
- 4 By ultrasonic diagnosis at 28~30 days after embryo transfers, 71.1%(27/38) calves became pregnant and 37.0%(10/27) of them were presumed twins.
By biochemical examination of blood, twins showed higher level of 3 - hydroxybutric acid than singles at 60 days before parturition.
- 5 Occuring parturition in the daytime by single feeding in the afternoon and expecting parturition by twice measuring rectal temperatures will avail the prevention of accident.
- 6 Until 21 days old, three times feeding a day foremilk and artificial milk were more effective than twice for twins, and developed equivalent to singles.