

プロナーゼを用いた透明帯菲薄化処理が牛胚の発育及び 受胎率に及ぼす影響

谷山 敦^{1),3)} 西野要治²⁾ 井上哲郎¹⁾ 田浦保穂³⁾ 高木光博³⁾
音井威重³⁾ 佐藤真澄⁴⁾ 窪田 力^{3),5)†}

- 1) 長崎県農林技術開発センター (〒 859-1404 島原市有明町湯江丁 3600)
- 2) 長崎県 開業 (西野動物医院: 〒 859-1404 島原市有明町湯江丁 1273)
- 3) 山口大学大学院連合獣医学研究科 (〒 753-8515 山口市吉田 1677-1)
- 4) 獣食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒 305-0856 つくば市観音台 3-1-5)
- 5) 鹿児島大学共同獣医学部 (〒 890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24)

(2012年11月16日受付・2014年6月11日受理)

要 約

牛胚において受胎率向上を目的に、タンパク質分解酵素であるプロナーゼを用いたアシストハッチング(AH)処理の効果を検証した。その結果、体外受精由来桑実胚を用いた培養試験において、プロナーゼ処理は新鮮胚及び凍結胚の胚盤胞期への発生率に悪影響を与えず、胚がハッチングする割合を有意に向上させることが確認された。さらに体内受精胚を用いた新鮮胚及び凍結胚の移植試験において、良質胚では効果がみられないが、低品質胚において新鮮胚移植では有意に受胎率が向上したものの、凍結胚移植では効果が認められなかった。以上よりプロナーゼによるAH処理は、採胚施設において特別な器材や技術を必要としない簡易な方法であり、低品質胚の新鮮胚移植における受胎率向上に有効な方法であることが示唆された。——キーワード：アシストハッチング、牛胚、受胎率、プロナーゼ。

-----日獣会誌 67, 833~838 (2014)

牛胚移植技術は、効率的な優良牛の生産、牛群の改良に広く活用されている。胚移植における受胎率は、胚の品質や凍結の有無、受胎牛の状態等に影響される [1] が、低品質胚においては透明帯から脱出(ハッチング)できないことが低受胎率の要因として考えられる。また体外受精胚は体内受精胚に比べ受胎率が低く [2, 3]、凍結融解後のハッチング率が低いと報告されている [4]。近年、人胚において脱出を補助するアシストハッチング技術として、マイクロニードルを用いた透明帯切開、酸性タイロイド液やレーザーを用いた透明帯菲薄化処理が行われ、受胎率の向上が試みられている [5-10]。また、筆者ら [11] はこれまでに牛低品質胚の新鮮胚移植において透明帯切開により受胎率が向上することを報告している。

本研究では、体外受精胚及び体内受精胚において、より簡便に行えるアシストハッチング法として、透明帯に

対するタンパク質分解酵素であるプロナーゼ処理が胚の発育や脱出補助効果及び受胎率に及ぼす影響を検証した。

材料及び方法

試験構成：体外受精胚及び体内受精胚を用い、アシストハッチング処理としてプロナーゼ処理及び透明帯切開処理と無処理の3群の比較により、その効果を検証した。

試験1：体外受精胚を用い、プロナーゼ処理を施し、新鮮胚及びプロナーゼ処理後凍結融解した胚の透明帯の厚さを調査した。

試験2：体外受精 Good 胚を用い、プロナーゼ処理後、凍結を行わない新鮮胚と処理後凍結-融解を行う凍結胚についてそれぞれ培養試験を行い、プロナーゼ処理の胚盤胞期への発生率及び脱出に及ぼす影響を比較した。

試験3：体内受精胚を用い、新鮮胚と凍結胚の移植試

† 連絡責任者：窪田 力 (鹿児島大学共同獣医学部)

〒 890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24 ☎・FAX 099-285-8736 E-mail: k7980336@kadai.jp

験を行い、受胎率を比較した。

供試胚：体外受精胚は Kubota ら [12] の方法に従って作出した。つまり、食肉センターにおいて採材した牛卵巣に存在する 5mm 以下の卵胞から卵子を吸引し、10% 牛胎子血清 (Invitrogen, U.S.A.) 加 TCM-199 (Invitrogen, U.S.A.) 液により 5% CO₂, 95% 空気, 38.5°C の条件下で 21 時間成熟培養を行った。次に 1 頭の黒毛和種雄牛の凍結融解精液を用いて体外受精を行い、その後 10% 牛胎子血清加 CR1a 液 [13] により 5% CO₂, 95% 空気, 38.5°C の条件下で体外培養し、受精後 6 日目に桑実胚まで発育した Good 胚 (正常な発育で変性細胞がほとんどないもの) [14] を供試した。

体内受精胚は、黒毛和種供胚牛に卵胞刺激ホルモン製剤 (アントリン[®], 共立製薬(株), 東京) 14 単位または 20 単位の漸減投与及びプロスタグランジン製剤 (プロナルゴン F, ファイザー社, ベルギー) による過剰排卵処理を行い、黒毛和種の凍結融解精液を人工授精、その 7 日後にバルーンカテーテルを用いて採胚した。得られた収縮桑実胚及び初期胚盤胞を用い、形態学的に Good, Fair, Poor に区分し (Good 胚は変性細胞がほとんどないもの, Fair 胚は変性細胞が 20% 前後のもの, Poor 胚は 30% 以上変性細胞があるもの) 試験に供した。

アシストハッチング処理：体外受精胚は、体外受精後 6 日目の桑実胚をランダムに 3 群に分け、そのうち 2 つの群はプロナーゼ処理群と透明帯切開処理群としてアシストハッチング処理を行った。その後各群において凍結しない新鮮胚培養試験とダイレクト法により凍結・融解後培養する凍結胚培養試験を実施した。体内受精胚は、人工授精後 7 日目の採胚時にアシストハッチング処理を行い、新鮮胚及び凍結胚移植に用いた。

マイクロニードルを用いたアシストハッチング (スリット区)：処理は、約 25°C のクリーンベンチ内で、透明帯を切開するマイクロニードル (#3-000-210-G, Drummond Scientific Co., U.S.A.) と胚を吸引保定するホールディングピペット (G-1, Narishige Co., 東京) を取り付けマイクロマニピュレーター (MO-202, Narishige, 東京) を用い、顕微鏡下で胚透明帯の切開を行った [11]。まず 20% 子牛血清 (Invitrogen, U.S.A.) 加修正ダルベッコリン酸緩衝液 (D-PBS, Invitrogen, U.S.A.) のドロップ中において、ホールディングピペットにより胚を保定し、内細胞塊を傷つけないよう透明帯にカッティングニードルを穿刺した後、カッティングニードルとホールディングピペットを擦り合わせることで透明帯にスリットを作成した。透明帯へのスリットは胚の円周の 10~15% とした。

プロナーゼを用いたアシストハッチング処理 (プロナーゼ区)：室温 (約 25°C) 下で D-PBS で 3% に調整したプロナーゼ (アクチナーゼ E, 科研化学(株), 東京)

液に透明帯の変形が確認されるまで胚を浸漬した。透明帯の変形は、体外受精胚で 20 秒から 1 分の間、体内受精胚で 1 分から 3 分の間認められ、その後胚を 20% 子牛血清 (Invitrogen, U.S.A.) 加 D-PBS または 10% 牛胎子血清加 TCM-199 培地により洗浄し、凍結保存または培養試験に供した。

胚の凍結及び融解方法：胚の凍結保存は、アシストハッチング処理後ダイレクト法により行った。方法は、5% エチレングリコール (和光純薬工業(株), 大阪) + 6% プロピレングリコール (Sigma, U.S.A.) + 0.1M スクロース (Sigma, U.S.A.) 添加 20% 子牛血清加 D-PBS 液 [12] を用い、0.25ml ストロー (imv, France) に封入した。その後プログラムフリーザー (ET-1, 富士平工業(株), 東京) を用いて、-7°C で 2 分間保持後植水し、8 分間保持、氷晶形成を確認後 -30°C まで毎分 -0.3°C のスピードで冷却した後、液体窒素中に保存した。胚の融解方法は、5 秒間空気中に保持した後、30°C の温湯により融解した。

アシストハッチング処置後の胚の体外培養：培養液は、10% 牛胎子血清加 TCM-199 に 100 μM β-メルカプトエタノール (Sigma, U.S.A.) を添加して用いた。処理胚は、38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 水蒸気飽和下で 4 日間培養して発育を観察した。胚の発育は、透明帯から完全に脱出した胚をハッチト胚、あるいは脱出途中の胚をハッチング胚として区分した。

培養試験は、各群 1 回につき 7~19 個の処理胚により行い、新鮮胚においては 7 回、凍結胚においては 11 回の反復を行った。

胚の移植：胚移植は、発情 7 日目 (発情日 = 0 日) に受胎牛の黄体側に非外科的に移植した。受胎確認は、発情後 45~60 日の間に直腸検査により行った。

透明帯の計測：一部の供試胚を 0.1M リン酸緩衝液により希釈した 2.5% グルタルアルデヒド (和光純薬工業(株), 大阪) により 45 分間の前固定、0.1M リン酸緩衝液により希釈した 2% 四酸化オスミウム (ナカライテスク(株), 京都) により 45 分間の後固定を行い、2% 酢酸ウランで 30 分間処理、脱水後 Quetol 653 (TAAB, U.K.) で包埋した。80nm の厚さに作成した切片を酢酸ウラン及びクエン酸鉛により染色した後、切片を電子顕微鏡 (H-7500, (株)日立製作所, 東京) で観察し、撮影した写真を用いて透明帯の厚さを計測した。なお透明帯の厚さは、それぞれの試験区各 4 個の胚について 4 カ所 (0, 45, 90, 135 度) を測定した。

統計解析：統計は、透明帯の厚さについては Student's *t*-検定を行い、脱出率については、各項目を逆正弦変換法による分散分析を行い、区間の検定には Tukey 多重検定で解析した。受胎率については、分散分析を行った。各項目は *P* < 0.05 で有意差ありとした。

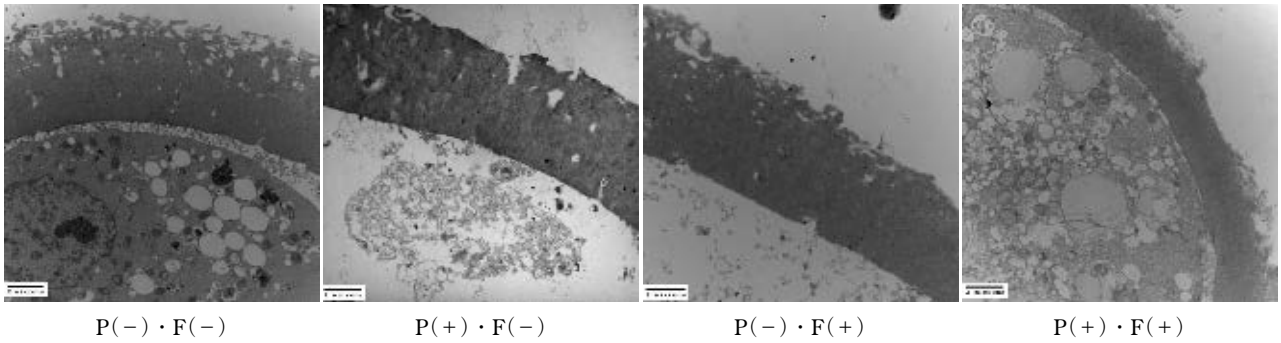


図1 プロナーゼ処理の有無，凍結融解の有無による透明帯の変化

P(+): プロナーゼ処理有り, P(-): プロナーゼ処理無し, F(+): 凍結融解有り, F(-): 凍結融解無し

表1 プロナーゼ処理の有無による透明帯の厚さの比較

凍結の有無	プロナーゼ処理の有無	計測数	透明帯の厚さ (μm)
無 (新鮮胚)	無し	16	4.95 ± 1.75 ^{a)}
	有り	16	3.66 ± 0.98 ^{b)}
有 (凍結胚)	無し	16	4.74 ± 1.31 ^{a)}
	有り	16	3.88 ± 0.97 ^{b)}

a), b) 異符号間に有意差あり (P<0.05)
(平均 ± 標準偏差)

表2 体外受精胚におけるアシストハッチング処理の有無が胚の発育に及ぼす影響 (新鮮胚)

試験区	供試胚数	胚盤胞発生数 (%) ^{*1}	ハッチング胚数 (%) ^{*2}	ハッチト胚数 (%) ^{*3}	合計胚数 (%) ^{*4}
無処理区	92	77 (83.7)	16 ^{a)} (20.8)	15 ^{a)} (19.5)	31 ^{a)} (40.3)
プロナーゼ区	101	84 (83.2)	21 (25.0)	37 ^{c)} (44.0)	58 ^{c)} (69.0)
スリット区	97	80 (82.5)	30 ^{b)} (37.5)	29 ^{b)} (36.3)	59 ^{c)} (73.8)

プロナーゼ区: 3%プロナーゼを用いた透明帯非薄処理
スリット区: マイクロニードルを用いた透明帯切開処理

a), b): 同列異符号間に有意差有り (P<0.05)

a), c): 同列異符号間に有意差有り (P<0.01)

*1: 胚盤胞発生数/供試胚数

*2: ハッチング胚数/胚盤胞発生数

*3: ハッチト胚数/胚盤胞発生数

*4: (ハッチング胚数+ハッチト胚数)/胚盤胞発生数

なお、本研究は、動物福祉に配慮して、供試牛に苦痛を増大させないように体内受精胚の回収、胚移植等を行った。

成 績

試験1: プロナーゼ処理による透明帯厚の変化

新鮮胚，凍結胚ともにプロナーゼ処理後，透明帯の表層が薄くなっていることが観察された(図1)。透明帯の厚さを比較した結果，新鮮胚，凍結胚ともにプロナー

表3 体外受精胚におけるアシストハッチング処理の有無が胚の発育に及ぼす影響 (凍結胚)

試験区	供試胚数	胚盤胞発生数 (%) ^{*1}	ハッチング胚数 (%) ^{*2}	ハッチト胚数 (%) ^{*3}	合計胚数 (%) ^{*4}
無処理区	155	57 (36.8)	8 ^{a)} (14.0)	10 ^{a)} (17.5)	18 ^{a)} (31.6)
プロナーゼ区	141	53 (37.6)	8 (15.1)	27 ^{c)} (50.9)	35 ^{c)} (66.0)
スリット区	145	52 (35.9)	17 ^{b)} (32.7)	19 ^{b)} (36.5)	36 ^{c)} (69.2)

プロナーゼ区: 3%プロナーゼを用いた透明帯非薄処理

スリット区: マイクロニードルを用いた透明帯切開処理

a), b): 同列異符号間に有意差有り (P<0.05)

a), c): 同列異符号間に有意差有り (P<0.01)

*1: 胚盤胞発生数/供試胚数

*2: ハッチング胚数/胚盤胞発生数

*3: ハッチト胚数/胚盤胞発生数

*4: (ハッチング胚数+ハッチト胚数)/胚盤胞発生数

ゼ処理区が無処理区に比べ約1μm薄く，有意な差 (P<0.05) がみられた (表1)。

試験2: 体外受精胚を用いた培養試験では，桑実胚におけるアシストハッチング処理区の胚盤胞期への発生率は，無処理区と比較して，新鮮胚 (表2)，凍結胚 (表3) ともに有意な差はみられなかった。

新鮮胚の培養4日目までのハッチト胚数の割合は，無処理区に比べプロナーゼ区 (P<0.01)，スリット区 (P<0.05) とも有意に高く，ハッチング胚数を含めた胚数も無処理区に比べ有意 (P<0.01) に高かった (表2)。また凍結胚においても同様の成績であった (表3)。

試験3: 移植試験を野外で実施したため，新鮮胚移植は野外で実施可能な無処理区とプロナーゼ区の2区を比較した結果，プロナーゼ区の実胎率は Good, Fair 品質胚では無処理区との間に差はみられなかったが，Poor 胚では無処理区に比べ有意 (P<0.05) に高くなった (表4)。

凍結胚移植では無処理区，スリット区，プロナーゼ区の3区を比較した結果，プロナーゼ区，スリット区の受

表4 体内受精胚におけるアシストハッチング処理の有無が受胎率に及ぼす影響

凍結の有無	試験区	胚の品質									計		
		Good			Fair			Poor					
		移植数	受胎数	受胎率 (%)	移植数	受胎数	受胎率 (%)	移植数	受胎数	受胎率 (%)	移植数	受胎数	受胎率 (%)
無 (新鮮胚)	無処理区	25	18	72.0	29	16	55.2	51	14	27.5 ^{a)}	105	48	45.7
	プロナーゼ区	21	16	76.2	23	14	60.9	55	26	47.3 ^{b)}	99	56	56.6
有 (凍結胚)	無処理区	84	47	56.0	61	28	45.9	31	7	22.6	176	82	46.6
	プロナーゼ区	48	26	54.2	38	18	47.4	36	14	38.9	122	58	47.5
	スリット区	30	14	46.7	32	15	46.9	19	7	36.8	81	36	44.4

a), b) 異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)

胎率は、Good, Fair, Poor のいずれの品質胚でも無処理区と有意な差はみられなかった (表4)。

考 察

胚移植において胚の品質は受胎率に影響を与え、特に低品質胚は受胎率が低い [15]。また Abe ら [16] は、品質を形態学的に分類した牛桑実胚の微細構造を比較した結果、低品質胚の卵割球数が少ないことを報告している。そこで Alvarez ら [17] は、低品質胚の短期体外培養により割球数を増やすことで良質胚と同等の受胎率が得られると報告している。このように割球数と胚品質には相関があり、高品質の胚は透明帯からの脱出率も高くなる。受胎するためには胚が透明帯から脱出することが必要であり、低品質胚の受胎率を改善するために、透明帯からの脱出率を向上させることも大きな要因となる。また Iwasaki ら [18] は、体外受精胚は内部細胞塊の接触が弱く、細胞数が少ないと報告し、Numabe ら [3] は高品質の牛胚を用いた移植試験において、体内受精胚に比べ体外受精胚の受胎率が低いのは細胞数が少ないことによると考察している。Niemann ら [19] は、牛の7日齢桑実胚及び胚盤胞において透明帯切開処理は凍結・融解後の生存性に影響しないと報告している。また Kane [20] は、ウサギ体内桑実胚において *Streptomyces grieseus* 由来 Pronase (プロナーゼ) の培地への添加は胚盤胞への発育に影響なく、透明帯やムチン層を融解し、胚が透明帯から脱出するために必要な酵素であると報告している。現在、人胚においては人為的に脱出を助ける処置 (アシストハッチング) として、マニピュレーターを用いた透明帯切開 [5, 8, 9]、タイロッド液 [5, 10] やプロナーゼ [5] 処理、レーザー [5-7] を用いた菲薄処理が試みられ、受胎率の向上が図られている。

本研究では、牛胚において畜産現場で簡易な方法で透明帯からの脱出補助を行うことを目的に、プロナーゼ液を用いたアシストハッチング効果を検証した。その結果、体外受精 Good 胚において、新鮮胚、凍結胚ともに

胚盤胞期への発生率に悪影響を与えず、胚のハッチング割合を有意に向上させることを確認した。さらに体内受精胚を用いた移植試験の結果、低品質胚において新鮮胚では有意に受胎率が向上した。筆者ら [11] は、牛体内受精胚新鮮移植においてマニピュレーターを用いた透明帯切開が低品質胚の受胎率を向上させることを報告しており、今回プロナーゼを用いた透明帯菲薄処理も同様に低品質胚新鮮移植において受胎率改善の効果が認められた。しかし Good 胚、Fair 胚においてはその効果は認められず、また Poor 胚においても凍結胚ではその効果が小さいと思われた。これは、Poor 胚は変性細胞が多く、加えて胚の凍結及び融解処理により受胎性が低下する影響が大きく、アシストハッチング処理の効果が小さくなったと思われる。

牛胚移植において低品質胚の有効活用は、貴重な胚による優良牛の増産に必要な技術であり、そのためには凍結保存技術も含めた受胎率の向上が求められている。今回の結果は、今後低品質胚の有効活用技術の一助となると思われる。

以上、プロナーゼによるアシストハッチング処理は、畜産現場の採胚施設において特別な器材や技術を必要としない簡易な方法であり、受胎率向上に有効な方法である。

引用文献

- [1] Hasler JF : Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle, *Theriogenology*, 56, 1401-1415 (2001)
- [2] Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA : Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results, *Theriogenology*, 43, 141-152 (1995)
- [3] Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, Horiuchi T : Production efficiency of Japanese black calves by transfer of bovine embryos produced *in vitro*, *Theriogenology*, 54, 1409-1420 (2000)
- [4] Leibo SP, Loskutoff NM : *Cryobiology of in vitro*

- derived bovine embryos, *Theriogenology*, 39, 81-94 (1993)
- [5] Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A : A comparison of four different techniques of assisted hatching, *Hum Reprod*, 17, 1239-1243 (2002)
- [6] Antionori S, Selman HA, Caffa B, Panci C, Dani GL, Versaci C : Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy, *Hum Reprod*, 11, 2488-2492 (1996)
- [7] Blake DA, Forsberg AS, Johansson BR, Wikland M : Laser zona pellucida thinning - an alternative approach to assisted hatching, *Hum Reprod*, 16, 1959-1964 (2001)
- [8] Check JH, Hoover L, Nazari A, O'Shaughnessy A, Summers D : The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer, *Fertil Steril*, 65, 254-257 (1996)
- [9] Dokras A, Ross C, Gosden B, Sargent IL, Barlow DH : Micromanipulation of human embryos to assist hatching, *Fertil Steril*, 61, 514-520 (1994)
- [10] Yano K, Yano C, Kubo T, Ohashi I, Maeda N, Fukaya T : Chemical zona pellucida thinning with acidified Tyrode's solution: comparison between partial and circumferential techniques, *J Assist Reprod Genet*, 24, 471-475 (2007)
- [11] Taniyama A, Watanabe Y, Nishino Y, Inoue T, Taura Y, Takagi M, Kubota C, Otoi T : Assisted hatching of poor-quality bovine embryos increases pregnancy success rate after embryo transfer, *J Reprod Dev*, 57, 543-546 (2011)
- [12] Kubota C, Yang X, Dinnyes A, Todoroki J, Yamakuchi H, Mizoshita K, Inohae S, Tabara N : *In vitro* and *in vivo* survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation, *Mol Reprod Dev*, 51, 281-286 (1998)
- [13] Rosenkrans CF Jr, First NL : Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage; Effect of amino acids and vitamins, *Theriogenology*, 35, 266 (1991)
- [14] Robertson I, Nelson RE : Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow DA, Seidel SM, eds, *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3rd ed, 103-134, IETS, Savoy, IL (1998)
- [15] Lindner GM, Wright RW Jr : Bovine embryo morphology and evaluation, *Theriogenology*, 20, 407-416 (1983)
- [16] Abe H, Matsuzaki S, Hoshi H : Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation, *Theriogenology*, 57, 1273-1283 (2002)
- [17] Alvarez RH, Meneghel M, Martinez AC, Pires RM, Schammass E : Transfer of bovine blastocysts derived from short-term *in vitro* culture of low quality morulae produced *in vivo*, *Reprod Domest Anim*, 43, 57-60 (2008)
- [18] Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T : Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*, *J Reprod Fert*, 90, 279-284 (1990)
- [19] Niemann H, Pryor JH, Bondioli KR : Effects of slitting the zona pellucida and its subsequent sealing on freeze-thaw survival of day 7 bovine embryos, *Theriogenology*, 28, 675-681 (1987)
- [20] Kane MT : A survey of the effects of proteases and glycosidases on culture of rabbit morulae to blastocysts, *J Reprod Fert*, 78, 225-230 (1986)

Effects of Chemical Zona Pellucida Thinning with Pronase on the Development of Bovine Embryos

Atsushi TANIYAMA^{1),3)}, Youji NISHINO²⁾, Tetsurou INOUE¹⁾, Yasuho TAURA³⁾,
Mitsuhiro TAKAGI³⁾, Takeshige OTOI³⁾, Masumi SATO⁴⁾
and Chikara KUBOTA^{3),5)†}

- 1) *Nagasaki Agricultural and Forestry Technical Development Center, 3600 Yuetei, Shimabara, 859-1404, Japan*
- 2) *Nishino Animal Hospital, 1273 Yuetei, Shimabara, 859-1404, Japan*
- 3) *The United Graduate School of Veterinary Science, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, 753-8515, Japan*
- 4) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*
- 5) *Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan*

SUMMARY

In bovine embryos, the effect of assisted hatching (AH) processing using pronase, which is a protein-splitting enzyme, was verified for the purpose of improving the pregnancy rate. As a result, in the culture examination using morulae produced by *in vitro* fertilization, it was confirmed that pronase treatment did not have a negative influence on blastocyst development, and that it also significantly improved the hatching rate of embryos in examinations of both fresh and frozen-thawed embryos. Furthermore, in the embryo transfer examination using embryos recovered from superovulated Japanese Black donors, it was suggested that pronase treatment possibly improves the pregnancy rate following the transfer of poor-quality fresh embryos. In conclusion, AH processing using pronase is a simple method that does not require special equipment or technology for on-farm application, and it is an effective method of improving the pregnancy rate of poor-quality fresh embryos. — Key words : assisted hatching, bovine embryo, pregnancy rate, pronase.

† *Correspondence to : Chikara KUBOTA (Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)
1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan
TEL · FAX 099-285-8736 E-mail : k7980336@kadai.jp*

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 833 ~ 838 (2014)