［東北畜産学会報 74(1): 1 ～ 8. 2024］

総　説

ウシ顕微授精技術の改善と子牛生産

及川　俊徳*

宮城県畜産試験場　酪農肉牛部　宮城県大崎市岩出山南沢字樋渡 1

キーワード：ウシ，活性化処理，子牛生産，精子処理，卵細胞質内精子注入

Improvement of bovine intracytoplasmic sperm injection technique and production of calves

Toshinori OIKAWA

Miyagi Prefectural Livestock Experiment Station
1 Aza Hiwatashi, Minamisawa, Iwadeyama, Oosaki, Miyagi, 989-6445, Japan

Keywords：Activation treatments, Bovine, Intracytoplasmic sperm injection, Production of calves, Sperm pretreatments

令和5年12月18日受付，令和6年6月5日受理

1．はじめに

顕微授精のうち卵細胞質内精子注入法（Intracytoplasmic sperm injection，ICSI）は，卵細胞質内に1つの精子を直接注入する方法である。ヒトではUeharaとYanagimachi（1976）によりハムスター卵子にヒト精子を注入し正常な雄性前核になることを最初に報告したことから始まる。それ以来，産子を得ることを目的として多くの研究が行われ，ウサギをはじめウシ，ヒト，マウスなど様々な種で産子生産が報告された。

ヒトICSIは，生殖補助技術（Assisted reproductive technology，ART）として世界中のクリニックで不妊治療として導入され，男性因子の不妊治療のひとつとして広く用いられており（Van Steirteghemら，1993；Palermoら，1997；Nagyら，1998），運動精子を用いることで高い受精率と妊娠率が得られている。

ウシについてもICSIによる胚および子牛生産方法について検討されている。ヒトおよびマウスではICSIにより正常な産子の生産が報告されているが，ウシICSIでの産子生産の報告は少ない（Gotoら，1990；Hamanoら，1990）。ウシで最初の産子の報告となるGotoら（1990）は，死滅精子を用いたICSIにより1990年に子牛を生産しており，次いでHamanoら（1990）は，フローサイトメーターで分別したY精子のICSIにより10頭の子牛を得たと報告した。しかし，妊娠率および分娩率は21％と低率であったことや，生産胚の中に単為発生胚が混入することも報告している。著者らはPIEZOマイクロマニピュレーターにより生存精子を注入し，精子注入後4時間目に活性化処理をすることで高い卵割率と胚盤胞への発生率が得られることを報告し，2002年に子牛の生産に成功した（Horiuchiら，2002）。

* 連絡者：及川　俊徳（おいかわ　としのり）
（宮城県畜産試験場　酪農肉牛部）
〒 989-6445　宮城県大崎市岩出山南沢字樋渡 1
TEL：0229-72-3101
E-mail: oikawa-to316@pref.miyagi.lg.jp

2．顕微授精とは

顕微授精法は主として卵子の透明帯をバイパスさせる方法であり，①透明帯切開法，②囲卵腔内精子注入法，③ICSI の 3 つの方法に大別される。透明帯切開法は，透明帯に小孔を開け精子の透明帯通過を容易にさせる。顕微授精法の中では比較的手技が容易なため，妊娠・分娩が早かった方法であるが，卵子表面に傷がつく，多精子受精が起こるなどの欠点がある。囲卵腔内精子注入法は，透明帯切開法よりも確実に精子を卵細胞表面に送り込むことができるが，多精子受精の問題は解決できなかった。ICSI は，高度な技術を必要とするが，1 つの精子を卵細胞質内に直接注入するため多精子受精の問題はクリアされる。最近では，野生動物や動物園動物の種の保存に顕微授精を含めた生殖補助技術が適応され始めている。顕微授精は，現在，ヒト精子に関連する不妊治療の技術として認識される場合が多いことから畜産分野でのこの技術の認識は低い。

3．ウシにおける ICSI の意義

ICSI 技術は最も少ない精子数で受精卵を作出することが可能であり，精子の利用効率が最も高い。理論的には精子の数だけ受精卵を作出することが可能である。家畜でのこの技術の有効性は，遺伝的あるいは経済的に優れた貴重な精子を効率的に活用することが考えられる。ウシの繁殖は現在ほとんどが凍結精液で行われており，貴重な遺伝形質（例えばサシがよく入る肥育牛を生産する黒毛和種など）を持つ種雄牛が存在するため，凍結精液の在庫が少ない場合は人工授精や体外受精（IVF）に利用することが難しく，ICSI を用いることで精子の有効利用は高まる。また，最近は経腟採卵（OPU）が畜産現場でも行われるようになり，OPU では少ない卵子で IVF を行うため胚発生率が低い個体が課題であり，それらの改善策としても ICSI 技術の活用が考えられる。さらに，IVF での受精率の低い精子が存在した場合，ICSI を応用することで改善できるかもしれない。

4．ウシ ICSI の改良

ヒトの ICSI では注射針のような先端に鋭いスパイクを付けた注入用ピペットを用いる。ヒトでの ICSI の成功のカギは，卵子内に注入ピペットを差し込んだ後に卵細胞膜を吸引して確実に破ることにある。この方法はウシで応用されたが改善は見られなかった。その理由として，ウシ精子頭部の幅はヒト精子頭部の幅の 3 倍以上あり，ウシでは注入するピペットのサイズが大きくなり，細胞膜が破れにくいこと，強く吸引し破ると損傷が大きく，その後の培養で卵細胞質が細胞外へ流失し卵子は死滅してしまうことなどの課題があった。また，ピペットのサイズが大きくなると注入するポリビニルピロリドン（PVP）を含む液量が多くなり卵割率および胚発生率に大きな影響を与え胚盤胞期胚が得られなくなってしまう。そこで，上記を改善する方法としてピエゾマイクロマニピュレーターを使用する方法がある。Kaytayose ら（1999）は，ピエゾマイクロマニピュレーターによる高い受精率を報告している。また，著者らもピエゾマイクロマニピュレーターを使用するとともに，ウシ運動精子を不動化処理し注入すること，ICSI 後 4 時間目に第二極体放出卵子を選別し 7％エタノールで 5 分間処理することによって卵割率および胚盤胞率が高まることを報告した（Horiuchi ら，2002）。この方法で生産した胚の移植で今までに 40 頭以上の産子を得ている。このように産子生産の報告が少ない中で，我々が開発した方法は実用的な方法であると考えられた。

本総説では，著者らがウシ ICSI による子牛生産を目的として研究を行い，その中で課題を解決するために試行錯誤し，いくつか成果が得られた研究について紹介したい。

5．ウシ ICSI の問題点

（1）低い胚発生率

上述のようにウシ ICSI を改良し安定した胚発生率が得られるようになったが，依然，体外受精成績よりも低い成績にとどまっている。精子注入後の前核形成は良好ではあるが，ヒトの場合と異なり，活性化処理しない場合の胚発生は低率であることが知られている。その原因として，体外受精後に低下する卵子成熟促進因子（maturation promoting factor，MPF）が ICSI 後に低下しないことが知られている（Fujinami ら，2004）。MPF を低下させるためにイオノフォア（Goto ら，1990；Chen ら，1997；），エタノール（Hamano ら，1990；Emuta ら，2001），電気刺激（Hwang，2000）および 6-dimethylaminopurine（DMAP）（Rho ら，1998；Chung ら，2000；Suttner ら，2000；Ock ら，2003）による活性化処理方法が検討されており，卵割率および胚盤胞期胚への発生率は改善されることが報告されている。ヒトおよびマウスでは ICSI 後に活性化処理は必要とせず，それにより生産された胚を移植し正常な産子が得られている（Yanagimachi，1998；Teserik と Mendoza，2003）。

ウシ ICSI における卵割率,胚発生率を改善するために,精子注入後の卵子活性化処理方法について多くの研究がされているが，活力の高い胚および子牛を生産するための優れた活性化処理方法を示した報告（Wei と Fukui, 2002）は少ない。

ICSI 後にイオノマイシンと DMAP のコンビネーションによる活性化処理で高い胚発生率が得られたが，この活性化処理での子牛生産は報告されていない（Susko-Parrish ら，1994；Rho ら，1998)。ICSI において胚発生率と移植による子牛生産性の関連性を確認することは非常に重要である。ICSI 後の卵子の活性化は，単為発生を引き起こすこと（Hamano ら，1990；Li ら，1999）や染色体での倍数性の異常を引き起こすことが報告（Ock ら，2003）されているため，子牛の生産性まで確認することが必要と考えられる。

そこで，高い胚発生率が得られると報告にあるイオノマイシンと DMAP のコンビネーションが胚発生および子牛生産に及ぼす影響を検討した結果，ICSI 後にイオノマイシン +DMAP 処理することにより高い卵割率および胚発生率が得られることが明らかとなった（表 1；Oikawa ら,2005)。単為発生試験においても同様の成績であった。

胚移植試験では，エタノール処理区では 17 頭に移植し 10 頭の受胎が得られたが，イオノマイシン +DMAP 処理区では 8 頭に移植したが 1 頭のみの受胎にとどまり，受胎率において有意な差が認められた。分娩された子牛は，エタノール処理区で 9 頭（雌 3 頭，雄 6 頭；平均生時体重 27.4±2.5kg）が，イオノマイシン +DMAP 処理区で 1 頭（雄;生時体重 21kg）がそれぞれ生産された。エタノール処理区による移植個数当たりの子牛生産率（47.4%）は，イオノマイシン +DMAP 処理区（9.2%）よりも有意に高い成績であった（表 2；Oikawa ら，2005)。

以上の結果より，高い胚発生成績が得られたとしても受胎性はそれに伴わない可能性があることがわかった。従って，受精卵移植を実際に行って子牛の生産性を確認することは重要である。

ウシ ICSI では胚発生率を向上させるために活性化処理が必要であるが，ICSI 後の卵子に活性化処理を行い生産された胚盤胞期胚の中に単為発生や染色体異常が認められるとの指摘がある。今回，ICSI 後に第二極体を確認した卵子のみを培養していることから，発生した胚の中に占める単為発生胚は少ないものと考えられた。しかし，イオノマイシン +DMAP 処理による胚盤胞期胚において

表 1　顕微授精後の活性化処理法が胚発生成績に及ぼす影響

活性化処理法	精子注入	供試卵子数	胚発生	
			卵割数（卵割率）	胚盤胞数（胚盤胞率）
イオノマイシン	+	132	76(57.6)[b]	24(18.2)[b]
	-	46	4(8.7)[d]	0(0.0)[c]
イオノマイシン+DMAP	+	137	115(83.9)[a]	55(40.1)[a]
	-	56	30(53.6)[b]	6(10.7)[b]
エタノール	+	160	121(75.6)[a]	47(29.4)[ab]
	-	53	16(30.2)[c]	6(11.3)[b]
未処理	+	48	23(47.9)[b]	4(8.3)[b]
	-	53	3(5.7)[d]	0(0.0)[c]

(a-d) 異符号間に有意差あり；$P < 0.05$
DMAP：ジメチルアミンプリン

表 2　顕微授精後の活性化処理方法の違いが受精卵移植成績に及ぼす影響

活性化処理	胚区分	移植頭数	移植胚数	妊娠頭数（妊娠率）	分娩頭数（分娩率）	流産頭数（流産率）	分娩頭数（分娩率）*
イオノマイシン + DMAP	1胚	5	5	1	1	0	1*
	2胚	3	6	0	0	0	0*
	総数	8	11	1(12.5)[b]	1(12.5)	0(0)	1(9.2)[b]
エタノール	1胚	15	15	8	7	1	7*
	2胚	2	4	2	2	0	2*
	総数	17	19	10(58.8)[a]	9(52.9)	1(5.9)	9(47.4)[a]

(a,b) 異符号間に有意差あり；$P < 0.05$
*全ての子牛は単子にて生まれた
DMAP：ジメチルアミンプリン

40 ～ 50%で染色体の倍数性の異常が報告（Susko-Parrish ら，1994；Rho ら，1998）されていることから，本試験において受胎率や子牛生産率が低いことに影響を及ぼしたものと考えられた。

（2）精子核の脱凝縮

もう１つの問題点としては，ウシ精子ではマウス，ヒト，ハムスターと異なり容易に脱凝縮が起こらないことが知られている。通常の受精過程において，卵子内に侵入した精子は精子核に存在するジスルフィド結合が卵子内の還元型グルタチオン（GSH）で切断されることから始まり（Perreault ら，1988；毛利ら，1992；Sutovsky ら，1997），受精後に精子核タンパクのプロタミン間におけるジスルフィド結合が減少し，卵子内のヒストンによりプロタミンを置換する（脱凝縮）（Zirkin，1989；Katayose ら，2007）。その後，精子核の核膜が消失し雄性前核が形成され，雌性前核と融合し受精が始まることが知られている。しかし，ICSI の場合，卵丘細胞や透明帯は物理的に通過（バイパス）されるため，通常の精子に起こる受精様式と異なる。体外受精において人為的に精子細胞膜透過性，先体反応および精子頭部の脱凝縮を促進させる物質としてヘパリン（Wei と Fukui，1999；Keefer ら，1990；Chen ら，1997），カフェイン（Iwasaki と Li，1994；Goto ら，1990；Keefer ら，1990；Chen ら，1997；Wei と Fukui，1999），イオノフォア（Chen ら，1997；Wei と Fukui，1999）が知られている。これらの薬剤を用いることで安定した体外受精成績を得ることが可能となっている。さらに，還元剤であるジチオスレイトール（Dithyothreitol，DTT）で精子を処理することで人為的にジスルフィド結合を脆弱化することができるため，雄性前核形成を促進させる（Calvin，1971；Bedford と Calvin，1974；Tateno と Kamiguchi，1999）ことが報告されており，精子の DTT 処理は ICSI にも応用されている（Qian ら，1996；Wei と Fukui，1999；Szczygiel と Ward，2002）。

精子が卵丘細胞や透明帯を通過し，卵細胞質内に到達して受精するためには受精能獲得や先体反応といった重要なイベントがある。しかし ICSI の場合それらの変化は起こらずに直接卵子内に運ばれる。通常，受精過程において卵子内に到達した精子は卵子内の GSH が主体となり，精子核内のジスルフィド結合が還元され脱凝縮を引き起こし，精子核膨化の間に核タンパクはプロタミンからヒストンへと置換される（毛利ら，1992；Katayose ら，2007）。同時に，この過程の進行には卵子が活性化されていることが条件とされる。未活性の場合，精子核は早期染色体凝縮（Premature chromachin condensation，PCC）により紡錘糸を有する染色体を形成し停止する。卵子の活性化には MPF が関与しており，細胞内カルシウムイオンの反復的上昇，いわゆるカルシウムオシレーションが精子由来因子により起こるとされている（Ito，2012）。

還元剤などで精子を前処理し人為的にジスルフィド結合を脆弱化させることで雄性前核形成の促進が可能である（Calvin，1971；Bedford と Calvin，1974；Tateno と Kamiguchi，1999）。還元剤としては主に DTT が用いられ，精子の DTT 処理は ICSI にも応用されているが，精子の処理時間は様々である（Rho ら，1998；Wei と Fukui，1999；Chung ら，2000；Galli ら，2003；Yong ら，2005；Watanabe ら，2009；Chankitisakul ら，2013；Arias ら，2014）。

そこで，ICSI に用いる精子の DTT 処理時間について検討するとともに，ICSI 後の活性化処理条件と胚発生成績について検討した（Oikawa ら，2016）。図１には DTT 処理精子のジスルフィド結合切断割合を示した。各時間の蛍光強度は 0 分のものを 1 として算出した。DTT 処理におけるモノブロモビメン染色後の精子頭部の蛍光強度は DTT 処理することで無処理区よりも有意に高い成績であった。また，処理時間は 10 分でも 60 分でも同様の成績であったことから，DTT 処理時間は 10 分間が最適であると判断した。

精子の DTT 処理の影響を調べる目的で，DTT 処理精子の注入（ICSI-DTT）または DTT 処理しない（ICSI-Sp），そして精子注入後に 7%エタノールにて活性化処理するまたは活性化処理しない計 4 区について試験を実施した。精子の DTT 処理時間は図 1 の結果から 10 分間とした。表 3 に ICSI 後の胚発生成績を示した。精子処理方法として ICSI-DTT を選択した場合，ICSI 後の活性化処理は必要ないこと，さらには生産された胚は高品質な胚であることが明らかとなった。

ウシ精子に対する DTT 処理の影響について検討した

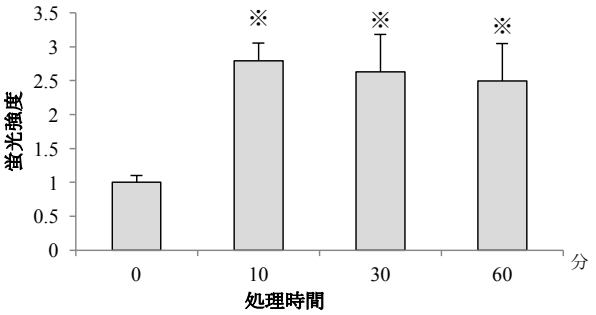


図１　ジチオスレイトール処理精子のジスルフィド結合強度
精子のジスルフィド結合の状態をモノブロモビメン染色で蛍光を検出し０分の蛍光強度を１として算出した。
※；$P < 0.05$

ところ，10 分間の処理で精子頭部のジスルフィド結合が切断されることが明らかとなった。ウシ精子核は強固なジスルフィド結合を形成しているが（Perreault ら，1988），その理由としてクロマチンを強固に安定させるために脱凝縮から精子核を防御している（Sutovsky と Schatten，1997）ことや，ウシ精子クロマチンにおけるプロタミンは，安定的なクロマチン構造を持つ cystein-rich type 1 により強固に保護されていることが報告されている（Bedford，1988）。一方，DTT は精子クロマチンのジスルフィド結合を特異的に減少させ，クロモソームの脱凝縮の結果，プロタミンのジスルフィド結合減少により精子核被覆膜を通過して精子核に作用するとされている（Sutovsky と Schatten，1997；Rho ら，1998）。さらに，DTT 処理することにより，精子頭部の脱凝縮および卵子の活性化に関与する因子が放出されるとの報告もある（Kolbe と Holtz，2000；Galli ら，2003；Probst と Rath，2003）。今回，DTT を精子処理方法に選択した場合，その後の活性化処理を実施しなくても良好な成績が得られたのは，DTT 処理により精子原形質膜が破壊され放出された因子が卵子の活性化を引き起こした可能性も考えられた。

GSH も精子の還元剤として知られている。DTT で行った試験と同様に，精子を 10 分間 GSH で作用させた後 ICSI した成績では，GSH 処理精子を ICSI することでエタノールの活性化処理をしなくても高い胚発生率が得られ，胚盤胞の細胞数は多く，良質な胚が生産される結果となり，DTT 処理で示した表 3 および表 4 と同様の成績を示した（Oikawa ら，2018）。加えて，精子尾部の鞭毛運動に必須となるエネルギー源であるアデノシン三リン酸（ATP）濃度を測定したところ，GSH 処理精子は高い ATP 濃度を示した（図 2;Oikawa ら，2018）。さらに，ATP 濃度の高さに加えてミトコンドリアの機能も高く

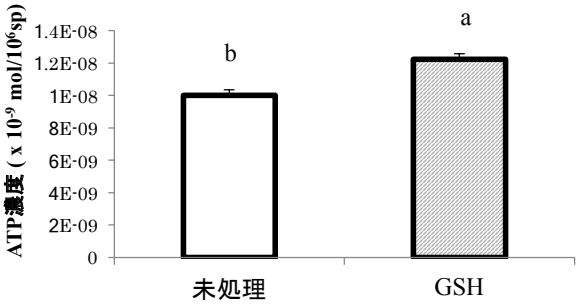


図 2　グルタチオン（GSH）処理精子のアデノシン三リン酸（ATP）濃度

GSH 処理 10 分後に精子の ATP 濃度をルシフェラーゼ発光法で実施し，ルミノメーターにて測定した。
(a, b) 異符号間に有意差あり；$P < 0.05$

表 3　精子処理の違いが顕微授精後の胚発生成績に及ぼす影響

処理方法	エタノール処理	供試卵子数	卵割数（卵割率）	胚盤胞数（胚盤胞率）
ICSI-DTT	＋	89	67 (76.4)^{b}	16 (18.0)^{b}
ICSI-DTT	－	96	74 (77.1)^{b}	32 (33.3)^{a}
ICSI-Sp	＋	80	71 (88.8)^{a}	15 (18.8)^{b}
ICSI-Sp	－	82	58 (70.7)^{b}	6 (7.3)^{c}

(a-c) 異符号間に有意差あり；$P < 0.05$
卵割率および胚盤胞率はそれぞれ精子注入後 72 時間および 192 時間に観察し算出した。エタノール処理は 7%エタノール（5 分間）実施した。ICSI-DTT は 5 mM ジチオスレイトール（DTT）で 10 分間処理後に顕微授精を、ICSI-Sp は精子洗浄液で洗浄して顕微授精を、それぞれ実施した。
ICSI：卵細胞質内精子注入

表 4　精子処理方法の違いにより生産された胚盤胞の細胞数

処理方法	エタノール処理	供試胚数	細胞数		
			栄養膜	内細胞塊	総数
ICSI-DTT	＋	16	104.1 ± 7.9^{ab}	47.3 ± 5.8	151.4 ± 10.8^{ab}
ICSI-DTT	－	32	116.3 ± 8.2^{a}	49.3 ± 2.9	165.6 ± 8.5^{a}
ICSI-Sp	＋	15	86.3 ± 7.6^{ab}	38.2 ± 3.9	124.5 ± 9.8^{b}
ICSI-Sp	－	6	69.2 ± 8.7^{b}	40.3 ± 6.4	109.5 ± 10.3^{b}

(a,b) 異符号間に有意差あり；$P < 0.05$
エタノール処理は 7%エタノール（5 分間）実施した。ICSI-Sp は精子洗浄液で洗浄し顕微授精を実施した。ICSI-DTT は 5mM ジチオスレイトール（DTT）で 10 分間処理後顕微授精を実施した。
ICSI：卵細胞質内精子注入

（図 3；Oikawa ら，2018），その結果，運動性も長く維持されることが確認された。これは，GSH 処理で ATP 濃度が高い値であったが，処理しない精子では精子処理過程（凍結融解を含め）で発生した活性酸素によりミトコンドリアに影響を及ぼし，運動性にも影響が及んだためと考えられたため，ATP 濃度が高くなったのではなく維持されたものと推測された。GSH は生体由来の抗酸化物質として知られており，細胞内でアミノ酸から合成される。GSH はその濃度の高さと細胞での酸化還元状態の維持に重要な役割を果たしていることから，最も重要な細胞性抗酸化物質である。GSH は哺乳動物細胞における主要な非タンパク質チオール化合物であり，アミノ酸輸送，DNA およびタンパク質合成，ジスルフィド結合の還元および酸化的ストレスに対する保護を含み多くの細胞機能に関与している。

Cheng ら（2009）は，ブタの ICSI で精子の DTT 処理と GSH 処理で作出した胚の染色体分析をしたところ，DTT 処理精子で作出された胚の 80％が 1 倍体であり，GSH 処理精子で作出された胚は 66％が 2 倍体であったと報告している。DTT は GSH よりも還元作用は強いことから，同様の胚発生成績であったことを考えると，GSH を選択することで正常胚を得られる可能性が高くなると考えられた。

Wei と Fukui（2002）は，運動精子の尾部を切断しピエゾ -ICSI することで活性化しなくても卵割および胚発生に有効であり，5 頭の健康な子牛を生産したことを報告している。これは，ウシ精子の卵活性化因子が胚発生に十分であることを示しており，活性化処理をしないウシ ICSI は高い胚発生率と健康な子牛を生産するために重要であると考えられた。

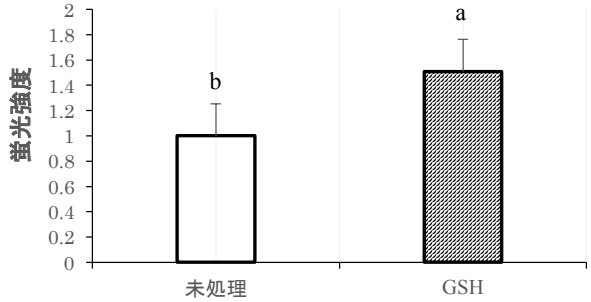


図３　グルタチオン（GSH）処理が精子のミトコンドリアに及ぼす影響

GSH 処理 10 分後に R123 で染色し蛍光強度を測定した。
(a, b) 異符号間に有意差あり；$P < 0.05$

６．今後の展望

現在，著者らはウシ精子の新たな保存方法として凍結乾燥（フリーズドライ）を高知大学と共に検討しており，未発表ではあるが世界初となる子牛の誕生に成功している。この技術は液体窒素の不要なウシ精子の保存法であり，確立されれば新たな方向への展開が期待される。しかし，現在の技術では，凍結乾燥された精子の運動性は維持されないため，胚および子牛生産のためには顕微授精技術が不可欠である。

７．おわりに

顕微授精のように卵子の活性化および精子の処理条件を検討する場合，胚発生率や実験室内でのデータのみで判断するのではなく，実際に生産された胚を移植し産子への生産性を確認することで正確な評価が可能となる。しかし，ウシの ICSI では受精現象について未だ不明なことが多い。ICSI する精子自体の問題や卵子の ICSI 後の反応に問題を残していることが考えられる。ICSI による胚発生率を高めることおよび子牛の生産性を改善するためには，更なる受精現象の解析が必要である。このようにウシ顕微授精技術は，発展途上の技術であり研究する余地が残っており，今後も研究の積み重ねが不可欠である。ウシの ICSI は，貴重なウシ精子を効率的に利用することで家畜改良または優良種畜の増産が可能となり，生産性向上あるいは OPU と組み合わせることでウシの生殖補助医療に寄与できるものと考えられる。

謝　辞

これまでのウシ顕微授精に関連する研究について多大なるご指導いただきました県立広島大学名誉教授 堀内俊孝博士，公益社団法人みやぎ農業振興公社参与 沼辺孝博士に深謝いたします。

引用文献

Arias ME, Sánchez R, Risopatrón J, Pérez L, Felmer R. Effect of sperm pretreatment with sodium hydroxide and dithiothreitol on the efficiency of bovine intracytoplasmic sperm injection. Reprod. Fertil. Dev., 26:847-854. 2014.

Bedford JM. The bearing of epididymal function in strategies for in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer.

Ann. NY. Acad. Sci., 541: 284-291. 1988.

Bedford JM, Calvin HI. The occurrence and possible functional significance of –S-S-crosslinks in sperm heads, with particular reference to euterian mammals. H. Exp. Zool., 188: 137-156. 1974.

Calvin HI, Bedford JM. Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Reprod. Fertil. Suppl., 13: 65-75. 1971.

Chankitisakul V, Am-in N, Tharasanit T, Somfai T, Nagai T, Techakumphu M. Sperm pretreatment with dithiothreitol increase male pronucleus formation rates after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in swamp buffalo oocytes. J. Reprod. Dev., 59: 66-71. 2013.

Chen SH, Seidel GE. Effect of oocytes activation and treatment of spermatozoa on embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in cattle. Theriogenology, 48: 1265-1273. 1997.

Cheng WM, An L, Wu ZH, Zhu YB, Liu JH, Gao HM, Li XH, Zheng SJ, Chen DB, Tian JH. Effect of disulufide bond reducing agents on sperm chromatin structural integrity and developmental competence of in vitro matured oocytes after intracytoplasmic sperm injection in pigs. Reproduction, 137: 633-643. 2009.

Chung JT, Keefer CL, Downey BR. Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology, 53: 1273-1284. 2000.

Emuta C, Horiuchi T. Effect of timing of activation and aging of bovine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on cleavage and subsequent embryonic development in vitro. J. Reprod. Dev., 47: 399-405. 2001.

Fujinami N, Hosoi Y, Kato H, Matsumoto K, Saeki K, Iritani A. Activation with ethanol improves embryo development of ICSI-derived oocytes by regulation of kinetics of MPF activity. J. Reprod. Dev., 50: 171-178. 2004.

Galli C, Vassiliev I, Lagutina I, Galli A, Lazzari G. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. Theriogenology, 60: 1467-1480. 2003.

Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killedsperm. Vet. Rec., 127: 517-520. 1990.

Hamano K, Li X, Funauchi K, Furudate M, Minato Y. Gender preselection in catlle, with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. Biol. Reprod., 60: 1194-1197. 1990.

Horiuchi T, Emuta C, Yamauchi Y, Oikawa T, Numabe T, and Yanagimachi R. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovne ooctes: a methodological approach. Theriogenology, 57: 1013-1024. 2002.

Hwang S, Lee E, Yoon J, Yoon B, Lee J, Choi D. Effect of electric stimulation on bovine oocyte activation and embryo development in intracytoplasmic sperm injection procedure. J. Assist. Reprod. Genet., 17: 310-314. 2000.

Ito J. Regulation of calcium signaling during fertilization. J. Mamm. Ova. Res., 29: 146-154. 2012.

Iwasaki S, Li X. Experimental production of triploid bovine embryos by microinjection of two sperm and their development. J. Reprod. Dev. 40: 317-322. 1994.

Katayose H, Yanagida K, Shinoki T, Kawahara T, Horiuchi T. Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a piezo-driven pipette. Theriogenology, 52: 1214-1224. 1999.

Keefer L, Younis AI, Brackett BG. Cleavage development of bovine oocytes fertilized by sperm injection. Mol. Reprod. Dev. 25: 281-285. 1990.

Katayose H, Takayama T, Suganuma R, Hayashi S, Yanagida K, Sato A. Relationship between assessment of sperm nuclear quarities and embryo development in vitro. J. Mamm. Ova. Res., 24: 153-160. 2007.

Kolbe T, Holtz W. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Anim. Reprod. Sci., 64: 97-101. 2000.

Li X, Hamato K, Qian XQ, Funauchi K, Furudate M, Minato Y. Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. Zygote, 7: 233-237. 1999.

毛利秀雄 . 精子学 . 東京大学出版会 . 68-79. 1992.

Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem AC. Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. Hum. Reprod., 13(suppl.): 143-154. 1998.

Ock SA, Bhak JS, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY, Rho GJ. Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. Zygote, 11: 69-76. 2003.

Oikawa T, Takada N, Kikuchi T, Numabe T, Takenaka M, Horiuchi T. Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. Anim. Reprod. Sci., 86: 187-94. 2005.

Oikawa T, Itahashi T, Numabe T. Improved embryo development in Japanese black cattle by in vitro fertilization using ovum pick-up plus intracytoplasmic sperm injection with dithiothreitol. J. reprod. Dev., 62: 11-16. 2016.

Oikawa T, Itahashi T, Yajima R, Numabe. Glutathione treatment of Japanese Black bull sperm prior to intracytoplasmic sperm injection promotes embryo development. J. reprod. Dev., 64: 303-309. 2018.

Palermo GD, Avrech OM, Colombero LT, Wu H, Wolny TM, Fissore RA, Rosenwaks Z. Human sperm cytosolic factor triggers Ca2+ oscillations and overcomes activation failure of mammalian oocytes. Mol. Hum. Reprod., 3: 367-374. 1997.

Perreault SD, Barbee RR, Slot VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. Development Biology, 125: 181-186. 1988.

Probst S, Rath D. Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted bore semen and artificially activated oocytes. Theriogenology, 59: 961-973. 2003.

Qian XQ, Inagaki H, Sasada H, Sugawara S. Decondensation and pronuclear formation in bovine oocytes after microinjection of bovine sperm pre-treated by with disulfide bond reducing agents. J. Mamm. Ova. Res., 13: 118-121. 1996.

Rho GJ, Kawarsky S, Johnson WH, Kochhar K, Betteridge KJ. Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. Biol. Reprod., 59: 918-924. 1998.

Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Nothey DL, Schtzkus V, First NL. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycle without meitotic completion. Dev. Biol., 166: 729-739. 1994.

Sutovsky P, Schatten G. Depletion of glutachione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decodensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. Biol. Reprod., 56: 1503-1512. 1997.

Suttner R, Zakhartchenko V, Stojkovic P, Muller S, Alberio R, Medjugorac I, Brem G, Wolf E, Stojkovic M. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. Theriogenology, 54: 935-948. 2000.

Szczygiel MA, Ward WS. Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. Biol. Reprod., 67: 1532-1537. 2002.

Tateno H, Kamiguchi Y. Dithiothreitol induces sperm nuclear decondensation and protects against chromosome damage during male pronuclear formation in hybrid zygotes between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes. Zygote, 7: 321-327. 1999.

Teserik J, Mendoza C. Using male gamate for assisted reproduction: past, present, and future. J. Andol., 24: 317-328. 2003.

Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Biol. Reprod. 15: 467-470. 1976.

Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisant A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 8: 1061-1066. 1993.

Watanabe H, Akiyama J, Bhuiyan MMU, Fukui Y. Enhanced oocyte activation by intracytoplasmic sperm injection of porcine spermatozoa pre-treatment with dithiothreitol. J. Mamm. Ova. Res., 26: 54-60. 2009.

Wei H, Fukui Y. Effect of bull, sperm type and sperm pretreatment on male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection. Reprod. Fertil. Dev., 11: 59-65. 1999.

Wei H, Fukui Y. Birth of calves derived from embryos produced by intracytoplasmic sperm injection without exogenous oocyte activation. Zygote, 10: 149-153. 2002.

Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. Hum. Reprod., 13 (Suppl.): 87-98. 1998.

Yong HY, Hong JY, Kang SK, Lee BC, Lww ES, Hwang WS. Sperm movement in the ooplasm, dithiothreitol pretreatment and sperm freezing are not required for the development of porcine embryos derived from injection of head membrane-damaged sperm. Theriogenology, 63: 783-794. 2005.

Zirkin BR, Perreault SD, Naish SJ. Formation and function of the male pronucleus during mammalian fertilization. In The Molecular Biology of fertilization. San. Diego. CA. Academic. Press., 91-114: 1989.