

## ウシ体外受精卵の受胎性向上のための タイムラプス観察技術

真方文絵

ウシ受精卵移植における体外受精卵の需要は世界的に増加し続けている。体外受精卵の受胎率を向上させるために、品質の良い受精卵の選抜は最も重要な要因の一つである。受精卵のタイムラプス観察 (TLM) は、発育中の受精卵を連続的、非侵襲的、かつ客観的に評価できる新しい技術であり、ヒト生殖補助医療では TLM による受精卵の発育動態解析が普及している。ウシ体外受精卵においても卵割のタイミングや様式が受胎性に影響を及ぼす可能性が示されているが、技術の有効性と安全性を検証するための臨床試験が少なく、普及および実用化には至っていない。本総説では、ヒトおよびウシ体外受精卵の TLM 研究より得られた知見のうち、ウシ受精卵の選別に適用可能な指標に焦点を当てて紹介し、ウシ体外受精卵の受胎性向上のための TLM 技術の展望について概説する。まず、ウシ体外受精卵における TLM 技術の進歩について概説する。次に、TLM により得られた定量的・定性的指標による受精卵品質評価法について紹介する。最後に、胚盤胞期胚の収縮・孵化の観察によるウシ胚の品質評価と、染色体異常の検出および胚の性判別のための TLM 活用の可能性について考察する。

キーワード：ウシ、体外受精卵、タイムラプス観察、発育速度、異常卵割

### 【はじめに】

受精卵移植は、個々の牛の繁殖効率を向上させるだけでなく、高い遺伝的価値を持つ牛の増産によって育種改良を推進することから、乳肉牛の繁殖に不可欠な技術である (1, 2)。特に体外受精卵の需要は年々著しく増加しており、2014 年に世界で生産された受精卵の半数以上が体外受精卵であった (3)。一方で、体外受精卵は体内受精卵と比較して受胎率が 10~20%低いという問題があり、高い受胎率が望める体外受精卵作出技術の開発が急務である (4-6)。体外受精卵の受胎性を向上させるために、品質の良い受精卵の選抜は最も重要な要因の一つである。従来、移植に用いる体外受精卵は培養中および培養終了時の形態学的評価に基づいて選抜されてきた (7)。しかしこの方法では頻回の観察のために受精卵への侵襲が大きい

えに、観察者により評価基準が異なるという問題があった (4, 8, 9)。

受精卵のタイムラプス観察 (Time-lapse monitoring; TLM) は、発育中の受精卵を連続的、非侵襲的、かつ客観的に評価できる新しい技術である。可視光顕微鏡を搭載したタイムラプスインキュベーターにおいて一定時間ごとに画像撮影しながら受精卵を培養することで、受精直後から移植期にいたるまでの受精卵の発育動態を継続的に観察することができる。ヒトもしくはウシ受精卵を用いた研究により、受精後の第一卵割のタイミングや様式を詳細に解析することで、受胎する可能性の高い胚を選択できる可能性が示唆されている (10-15)。また、ヒト体外受精卵を用いた臨床研究では、初期の発育動態評価によって着床率を向上できることが示されている (16-20)。そのため、ヒト生殖補助医療では TLM 技術が急速に普

東京大学大学院農学生命科学研究科、東京都文京区弥生 1-1-1  
E-mail: afmagata@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

©2022 by the Society for Reproduction and Development この論文の著作権は公益社団法人日本繁殖生物学会に帰属します。  
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives (by-nc-nd) License. (CC-BY-NC-ND 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) この著作物を二次利用する場合には、本サイトを引用する必要がある、非営利目的な利用に限ります。また、いかなる場合も改変を禁止しております。

及し、収集された多くのデータに基づく胚選抜アルゴリズムが徐々に確立されてきた(21-24)。一方で、ウシ胚の TLM 研究はいくつか行われているものの、TLM で得られた発育動態指標と着床能との関連性についての情報は少なく、タイムラプス観察により品質評価をした体外受精卵の普及および実用化にはほど遠い状況である。そこで、本稿ではウシ体外受精卵の受胎性向上に資する TLM 技術の活用の可能性について概説する。特に、ヒトおよびウシの TLM 研究より得られた知見のうち、受胎性の高いウシ体外受精卵の選別に応用可能な知見に焦点を当てて紹介したい。

### 【ウシ体外受精卵における TLM 技術の進歩】

ウシ体外受精卵研究における TLM 技術の進歩について、表 1 にまとめた。タイムラプスシネマトグラフィーによる受精卵の観察は、生体内で生産された動物胚を用いた研究から始まった。1929 年に Lewis と Gregory は、卵管から採取したウサギ胚の 1 細胞期から孵化期までの発生過程を初めてタイムラプス解析した(25)。1980 年代初頭には、子宮角から採取したウシ桑実胚を 5 日間培養して発育動態を観察することで、ウシ胚は透明帯の切れ目から能動的に脱出して孵化することを明らかにした(26, 27)。ウシ体外受精卵の TLM は 1994 年に初めて行われ、4 ウェルディッシュを小型の体外培養チャンバーで覆い、倒立顕微鏡のステージに載せた装置を用いて行われた(28)。この研究では 130 個の胚について 1 細胞期から胚盤胞期までの発育を 8 日間撮影し、卵割のタイミング、各細胞周期の時間、および桑実期や胚盤胞期への到達時間を解析した。その結果、初期の発育動態と休止期開始のタイミングが桑実胚もしくは胚盤胞への発生能と関連することが明らかとなった。1990 年代後半から 2000 年代にかけて、同様のシネマトグラフチャンバーを用いてウシ体外受精卵の発育動態を解析する研究が盛んに行われた(29-35)。これらの研究は、ウシ体外受精卵の TLM 研究の基盤となり、卵割のタイミングや卵割初期における細胞周期の長さが胚盤胞期胚への発生能と関連する可能性を示した。その後、2008 年頃にインキュベーター内部に可視光顕微鏡を搭載したタイムラプスインキュベーターが市販され、ヒト生殖補助医療への導入が急速に進むとともに、ヒト体外受精卵の発育動態と移植成績との関係についての研究が盛んに行われるようになった(22, 24)。ウシにおいては、2010 年に Somfai らが初めて市販のタイムラプスインキュベーターを用いたウシ体外受精卵の TLM 研究を

行い、発育初期における細胞周期の長さとおよび卵割パターンが胚盤胞期胚への発生能と関連を示すことを明らかにした(14)。同年に Sugimura らは、受精卵の TLM のために最適な個別培養ディッシュ(well-of-the well ディッシュ)を開発し、発生能を維持した個別培養による発育動態観察が可能になった(36)。これら 2 つの研究は、ウシ体外受精卵の TLM 研究の新たな展開のために重要な基盤となった。その後、いくつかの研究によってウシ体外受精卵の発育動態指標と胚発生能や受胎性との関連性が検証されているが(15, 37-42)、技術の有効性と安全性を保証する実証試験は少なく、実用化には至っていない。

### 【定量的指標による体外受精卵の品質評価】

ヒト胚の選抜アルゴリズムをまとめた総説は、胚盤胞期胚への発生能は発育初期の定量的パラメーターによって予測できると結論づけている(21, 22, 24, 43)。具体的には、2 細胞期までの時間(44, 45)、5 細胞期までの時間(45, 46)、および 3 細胞期から 4 細胞期までの時間(19, 20, 45)などが胚発生能の指標として有用であると考えられている。ウシ体外受精卵においては、桑実胚期または胚盤胞期まで発育した生存胚では、途中で発育を停止した非生存胚と比較して第一、第二、および第三卵割の細胞周期が短いことが示されている(14, 32, 47)。さらに、初期の卵割が遅延した胚では、胚性ゲノムの活性化が起こるタイミング(受精後 112 時間)において、アポトーシスおよび細胞ストレス関連遺伝子の発現量が増加した(47)。ヒトおよびウシ胚におけるこれらの知見は、発育動態解析によって得られる定量的なパラメーターが移植後の受胎性予測にも応用できる可能性を示している。Mesenguer ら(2011)は、ヒト顕微授精胚における受胎の予測因子としての胚選抜アルゴリズムを世界で初めて提案し、発育が早すぎたり遅すぎたりする胚は着床率が低いことを示した(18)。ヒト胚をもちいた解析により、第二卵割までの時間(18, 46, 48-50)、5 細胞期までの時間(18, 46, 49, 50)、胚盤胞(46)もしくは拡張胚盤胞への到達時間(51)などによって着床能が予測できることが報告されており、発育が早い胚ほど着床能が高い可能性が示唆されている(21, 43)。ウシ体外受精卵を用いた研究においても同様の知見が得られており、第一卵割時間(受精後 27 時間以内)、第一卵割後の細胞数(2 細胞)やフラグメント形成(フラグメントなし)、休止期に入る際の細胞数(6~16 細胞)、および胚盤胞の酸素消費量( $0.84 \times 10^{-14}$  mol/s 以上)といった 5 個の指標

表1 ウシ体外受精卵研究におけるタイムラプス観察技術の進歩

著者	動物	観察装置	胚の培養	胚生産	観察開始	観察終了	観察期間	主な知見
Lewis と Gregory (1929)	ウサギ	顕微鏡にのせたスライドグラス (室温観察)	情報なし	卵管から回収	1細胞	孵化	情報なし	哺乳類受精卵の卵割と孵化を初めて観察した (25)。
Massip と Mulnard (1980)	ウシ	フラットキャピラリー管	情報なし	子宮角から回収	桑実胚もしくは凍結胚盤胞	孵化	5日間	透明帯の切れ目から能動的に脱出して孵化することを発見した (26)。
Grisart ら (1994)	ウシ	インキュベーションチャンバー付き倒立顕微鏡	50個/ドロップ	IVF	1細胞	胚盤胞期	8日間	初期の発育動態と休止期開始のタイミングが桑実胚もしくは胚盤胞への発生能と関連することを示した (28)。
Somfai ら (2010)	ウシ	可視光顕微鏡搭載タイムラプスインキュベーター	15-25個/ドロップ	IVF	1細胞	胚盤胞期	175時間	発育初期の細胞周期や卵割様式が胚盤胞への発生能と関連することを示した (14)。
Sugimura ら (2010)	ウシ	可視光顕微鏡搭載タイムラプスインキュベーター	個別培養	IVF	1細胞	胚盤胞期→移植	168時間	タイムラプス観察用 well-of-the well デイッシュの開発により、発生能を維持した個別培養・観察が可能になった (36)。
Sugimura ら (2012)	ウシ	可視光顕微鏡搭載タイムラプスインキュベーター	個別培養	IVF	1細胞	胚盤胞期→移植	168時間	第一卵割時間や様式、休止期の細胞数といった5個の指標の組み合わせにより、78.9%の受胎率が得られた (15)。
Yao ら (2018)	ウシ	インキュベーションチャンバー付き蛍光共焦点顕微鏡	個別培養	IVF	1細胞	胚盤胞期	8日間	ライブセルイメージングにより、染色体や前核の動態を観察。受精後の多核は direct cleavage と関連することを示した (69)。

が高い受胎性を予測するための因子として有用であることが報告された (15, 52)。受胎の予測精度は複数の指標を組み合わせることで向上し、5 個全ての指標の組み合わせによって 78.9%という高い受胎率が得られた。

**【定性的指標による体外受精卵の品質評価】**

ヒトとウシのいずれにおいても、異常卵割、フラグメント形成、不均等な卵割といった発育初期における定性的パラメータの異常が、胚発生能や着床能と関連する可能性が報告されている (11, 13-15, 21, 22, 24, 37, 53, 54)。このうち異常卵割として、卵割後の割球が融合する逆転卵割 (Reverse cleavage: RC) や (49)、1細胞から2

細胞を経ずに3細胞もしくは4細胞へ分裂する直接卵割 (Direct cleavage: DC) は (13)、ウシ胚においても高頻度で認められる (図1)。異常卵割の発生機序には不明な点が多いが、精子の品質や DNA 損傷、染色体異常、多極紡錘体、中心体異常などの関与が推測されている (11, 14, 55, 56)。RC の発生率は、ヒトで 0.4%~27.4% (11, 53, 57, 58)、ウシで 7.6~17.2% (37, 41) と報告されている。また DC の発生率は、ヒトで 4.4~26.1% (18, 53, 58-61)、ウシで 14.1~28.7% (14, 37, 41) である。驚くべきことに、我々の研究では、胚盤胞期まで到達した生存胚の 36%、および胚盤胞期に至らなかった発育停止胚の

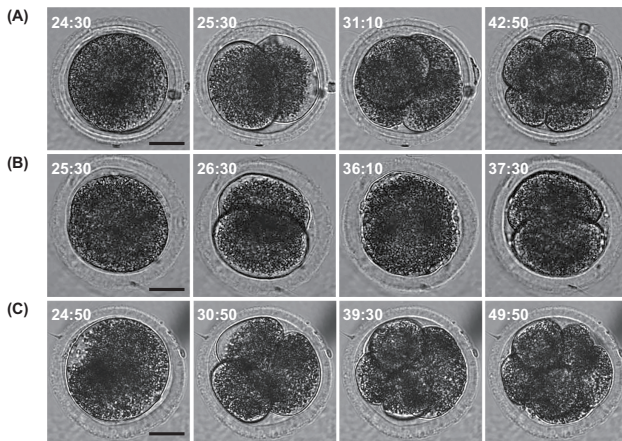


図1 第一卵割における卵割様式によるウシ体外受精卵の分類

(A) 1個の割球が、大きさの等しくフラグメントのない2個の割球へと分裂する(正常卵割)。(B) 卵割後の割球が融合する(Reverse cleavage)。(C) 1細胞から2細胞を経ずに3細胞もしくは4細胞へ卵割する(Direct cleavage)。左上の数字は体外受精後の時間を示し(h:min)精子と卵子を混合した時間を0:00とした。スケールバーは50 μm。Magataら(2019)をもとに作成(37)。

63%が発育初期にいずれかの異常卵割を呈していた。ヒトの研究では、異常卵割が胚盤胞期胚への発生能、着床能、および生児獲得率の低下と関連することが示されている(11, 13, 53, 58-62)。同様に、ウシ体外受精卵を用いた我々の研究において、第一卵割においてRCまたはDCを呈した胚では、正常卵割胚と比較して形態良好な胚盤胞への発生率が低かった(37)。一方で、異常卵割を起こした胚でも正常卵割胚と同様の品質の胚盤胞に発育するものもあり(図2)、従来行われてきた形態学的評価による異常卵割の検出は困難であると考えられた。TLMによる発育動態解析によって、RCおよびDC胚では、第一卵割および休止期開始

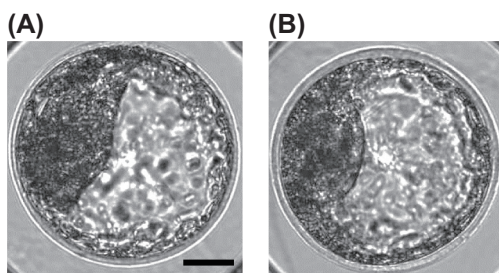


図2 体外受精後8日におけるウシ胚盤胞期胚

第一卵割において(A)正常卵割および(B)逆転卵割(Reverse cleavage)を呈した受精卵。第一卵割において異常な卵割様式を示した胚では、正常卵割胚と比較して形態良好な胚盤胞への発生率が低かったが、正常卵割胚と同様の品質の胚盤胞に発育するものも含まれていた。スケールバーは50 μm。

までの時間、桑実胚および胚盤胞への到達時間、さらに孵化に至るまでの時間が正常卵割胚より遅延することが明らかになった(37)。また、ウシ胚盤胞期胚のメタボローム解析では、ピルビン酸が

関与するいくつかの代謝経路の活性が正常卵割胚とDC胚とで異なっており、DC胚ではピルビン酸レベルが上昇していたことから、脂質からグルコース代謝への切り替えに障害がある可能性が示唆されている(41)。

### 【胚盤胞期胚の収縮と孵化】

TLMによって、胚盤胞の収縮と再膨張、および孵化に至るまでの発育動態を詳細に解析できるようになった(図3)。孵化とは、胚盤胞が拡張しながら透明帯から脱出する現象であり、着床に不可欠の過程である。一過性の胚の収縮と再拡張は孵化のために必須ではないものの、孵化前に頻りに繰り返されることが多い(54)。胚盤胞の収縮は、栄

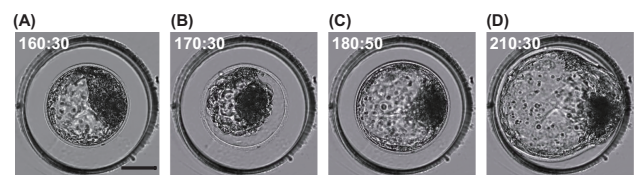


図3 ウシ胚盤胞期胚の収縮と孵化

(A) 収縮前、(B) 収縮中、(C) 再拡張後、および(D) 孵化中の胚盤胞期胚。左上の数字は体外受精後の時間を示し(h:min)、精子と卵子を混合した時間を0:00とした。スケールバーは50 μm。

養外胚葉の細胞結合が緩み、胚盤胞液が流出することによって起こる。その後、ナトリウムポンプを介した能動的輸送によって胚盤胞内に再び液体が流入することで、胚の再膨張が起こる(63, 64)。マウス胚を用いた研究により、弱い収縮は孵化に必須である一方、強い収縮は孵化に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている(65)。ヒト胚においては、強い収縮をおこした胚盤胞では収縮を示さなかった胚盤胞と比較して着床率が低いことが報告されている(63, 66)。胚の強収縮が着床率の低下を引き起こす機序は明確ではないが、機械的な圧力によるダメージや栄養外胚葉のギャップ結合の損傷、または再膨張のための過剰なエネルギー消費がその後の胚発生に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている(67)。ウシ体外受精卵を用いた我々の研究では、RC胚は正常卵割胚よりも胚盤胞の収縮および再膨張の回数が多く、孵化率が低かった(37)。一方DC胚では、孵化にいたるまでの収縮回数は増加しなかったが、正常卵割胚と比較して孵化率が低下した。したがって、異常卵割胚における孵化率の低下は着床能力の低下を示唆するものの、RC胚とDC胚ではそれぞれ異なるメカニズムによって孵化率が低下した可能性がある。卵割異常胚における孵化率低下の機序には不明な点が多いが、強い収縮を示さない胚を優先的に移植す

ることが推奨される。

### 【TLMによる染色体異数性の予測】

TLMによる初期発生胚の定量的および定性的評価によって染色体異数性を予測できる可能性が示唆されている。ヒト胚を用いたメタアナリシスにおいて、染色体異数性を示す胚では8細胞、9細胞、胚盤胞、および拡張胚盤胞までの到達時間が延長することが報告されている(55)。ウシにおいても同様に、第一卵割が遅い胚では、第一卵割が早い胚と比較して、胚盤胞期において染色体異常を示す細胞の割合が増加した(15)。定性的パラメーターにおいては、異常卵割に加えてフラグメント、収縮、および多核の有無が染色体異数性をスクリーニングする候補として提案されている。ヒト胚において、異常卵割のうちDCは染色体異数性と関連を示さなかったものの、RC胚では染色体の正常性が増加したという報告がある(55)。ウシ胚においては対照的に、発育初期にRCおよびDCを示した胚盤胞期胚では、染色体異常を示す細胞の割合が増加することが示されている(14, 37)。したがって、異常卵割と染色体異数性との関連については不明な点が多く、さらなる検証が必要である。興味深いことに、異常卵割は染色体異常を回避するための「自己修復」のプロセスにおいて潜在的な役割を有する可能性が示唆されている。ヒトおよびウシの研究において、“partial compaction”と呼ばれる桑実胚の部分的なコンパクションにおいて除外された割球は、コンパクションに含まれた割球よりも異常染色体率が高かった(39, 54, 59, 68)。さらに、全ての割球を含む完全なコンパクションを起こした胚よりも、partial compactionを起こした胚においてRCおよびDCの発生率が高かった。これらのことから、初期に異常卵割を起こした胚は“partial compaction”によって染色体異常をもつ割球を除外することで、正常な染色体をもつ胚盤胞に発育できる可能性が示唆されている。

近年、蛍光共焦点レーザー顕微鏡を用いたウシ胚のライブセルイメージングにより、染色体分離をはじめとする胚の染色体動態を長期間かつ非侵襲的に観察できることが示された(69, 70)。Yaoら(2018)は、染色体分離の異常が第一卵割の遅延と関連するとともに、胚盤胞期胚への発生率が正常胚よりも低下することを報告した。さらに、脂質に富む暗色の細胞質をもつウシ胚では観察が困難とされていた前核の動態もライブセルイメージングによって観察することができ、DCが多核と関連することが示された(69)。より実用的な手法

として、胚の遠心分離による脂質除去と明視野でのタイムラプス観察とを組み合わせることで、前核の数や動態を解析できることが報告されている(40)。これらの新しい技術は、ウシ体外受精卵の受胎性を予測するための新たなツールとして期待されている。

### 【受精卵の性選別への応用の可能性】

性選別精液を用いた雌雄の産み分けにより、後継牛の安定的な確保と育種改良の推進が可能となった。体外受精卵生産においても性選別精液の利用には経済的なメリットがあり、X精液を用いた雌胚の体外生産により、雌産子を得るためのコストが削減できると試算されている(71)。しかしながら、性選別精液の使用によって胚盤胞期胚の作出効率と移植後の受胎率が低下するという報告は多く、受胎性の高い雌性体外受精卵の作出技術の開発が急務である(38, 72-79)。我々が最近報告したウシ体外受精卵のTLM研究において、X精液由来胚では、非性選別精液由来胚と比較して第一卵割時間、休止期開始時間、桑実胚と胚盤胞への到達時間、および孵化時間のいずれにおいても延長したことから、発生期間を通して発育速度が低下することが明らかになった(38)。さらに、X精液由来胚では第一卵割におけるRCの発生率および胚盤胞期胚の染色体異常が増加しており、着床能力が低いことが予想された。これらの結果は、TLMによって発生初期の異常卵割を摘発・除外することで、体外受精により作出したX精液由来胚の受胎性を向上できる可能性を示唆している。ウシおよびヒトにおいて、多くの研究が胚の発育動態と性別との関連性を検証してきたが、統一的な見解は得られていない。頻回観察によってウシ体外受精卵の発育速度を推測した過去の研究において、雄胚は雌胚よりも発育が早いという報告がある一方で(80, 81)、雌雄で発生速度に違いはないとする研究もある(82-84)。TLMの導入によって胚の発育動態を詳細に検証することが可能となったが、胚の性別が発育速度に及ぼす影響については依然として明らかになっていない。Holmら(1998)およびSugimuraら(2012)の研究において、ウシ胚の発育動態と性別との関連性は認められなかった(15, 29)。一方Peippoら(2001)は、グルコースを含む培地では雄胚は雌胚よりも早く発育し、グルコース非添加培地では雌胚の発育が早かったと報告している(31)。ヒトおよびウシにおいて、雄胚と雌胚ではグルコースの代謝および利用効率が異なることが示唆されている(85、



図4 ウシ体外受精卵のタイムラプス観察による受精卵選抜のための指標

ウシ体外受精卵のタイムラプス観察により得られた、高い胚発生能もしくは受胎性に関与する可能性がある定量的および定性的指標。DC；直接卵割 (Direct cleavage)、RC；逆転卵割 (Reverse cleavage)。

86)。そのため、胚の性別が発育動態に及ぼす影響についての知見に相違が生じる原因の一つとして、培養条件の違いが考えられる。TLM による胚の性別選別の可否を判断するためには、さらなる検証が必要である。

【ウシ体外受精卵タイムラプス観察技術の展望】

本稿では、受胎性の高いウシ体外受精卵選抜のための TLM 技術活用の可能性について概説した。ヒトと同様にウシ体外受精卵においても、卵割のタイミングなどの定量的指標や、異常卵割や胚盤胞の収縮・再拡張といった定性的指標によって、胚盤胞期胚への発生能や受胎性を予測することは可能であろう (図4)。さらに、TLM を用いた発育動態解析によって染色体の正常性や胚の性別を予測できれば、育種改良の推進や畜産経営の効率化において実用的な価値は大きい。一方で、ウシ体外受精卵の TLM により得られた発育動態指標と受胎成績との関連性の解析は国内外を通してほとんど行われておらず、技術の有効性と安全性を検証する実証試験が不足しているため実用化にはほどおい状況である。また、胚の発育動態は培養条件によって大きく異なるため、様々な培養系に広く適用できるウシ胚独自の選抜アルゴリズムを確立しなければならない。さらに、TLM を活用した体外受精卵生産の実用化のためには、画像解析に膨大な時間を要するという課題も解決する必要がある。体外受精卵の受胎性予測のために有効な指標として、発育初期における卵割のタイミングや異常卵割の有無、あるいは胚盤胞期における胚の収縮・再膨張が寄与している可能性が考えられる。そのため、発育初期および胚盤胞期といった

重要な発育ポイントにおいて集中的に解析することで解決できるかもしれない。あるいは、人工知能による自動画像解析も魅力的な新技術であろう。ヒトの生殖補助医療では、EEVA™ などの受精卵自動解析ソフトウェアの有用性が検証されている (16, 87)。受精卵の品質評価のために機械学習を活用するには、データベースの精度向上や学習段階での臨床判断の難しさなどといった問題を解決する必要があるが、大規模な胚生産が望まれるウシ体外受精卵の TLM の商業的応用のために有望なアプローチであるといえる。世界の畜産生産が持続可能な発展を遂げるためには、革新的な技術の導入による繁殖効率の向上が不可欠である。ウシ体外受精卵生産における TLM 技術の活用による受胎性の向上は、増加し続ける世界人口を支えるための重要な技術革新の一つとなるだろう。そのためには、ウシ体外受精卵の TLM によって得られた定量的・定性的パラメーターに基づく、汎用性の高いウシ胚選抜アルゴリズムを確立し、その有効性を検証することが必須である。

【謝辞】

本総説は 2022 年 5 月 14 日に開催された日本繁殖生物学会主催の一般公開セミナー「牛を受胎させたい！問題解決にガンバル研究者」の講演内容をもとに、関連する知見を加えてまとめたものです。本稿の内容は日本繁殖生物学会の機関紙である Journal of Reproduction and Development にも掲載されています (88)。総説として発表する機会を与えてくださった日本繁殖生物学会に心より感謝いたします。

## 【参考文献】

1. **Hansen PJ.** Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. *Adv Exp Med Biol* 2014; 752:1-22. Doi: 10.1007/978-1-4614-8887-3\_1.
2. **Hasler JF.** Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 2014; 81:152-169. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.010.
3. **Blondin P.** Logistics of large scale commercial IVF embryo production. *Reprod Fertil Dev* 2017; 29:32-36. Doi: 10.1071/RD16317.
4. **Farin PW, Slenning BD, Britt JH.** Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* 1999; 52:659-670. Doi: 10.1016/S0093-691X(99)00160-0.
5. **Pontes J, Nonato-Junior I, Sanches B, Ereno-Junior J, Uvo S, Barreiros T, Oliveira J, Hasler J, Seneda M.** Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2009; 71:690-697. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.031.
6. **Siqueira LG, Torres CA, Souza ED, Monteiro PL, Jr., Arashiro EK, Camargo LS, Fernandes CA, Viana JH.** Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology* 2009; 72:949-958. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.06.013.
7. **IETS.** Manual of the international embryo transfer society. In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds.). The Society; 1998.
8. **Paternot G, Wetzels AM, Thonon F, Vansteenbrugge A, Willemen D, Devroe J, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C.** Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an IVF procedure: a multicentre study. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9:127. Doi: 10.1186/1477-7827-9-127.
9. **Ruiz de Assín R, Clavero A, Gonzalvo MC, Ramírez JP, Zamora S, Fernández A, Martínez L, Castilla JA.** Comparison of methods to determine the assigned value in an external quality control programme for embryo evaluation. *Reprod Biomed Online* 2009; 19:824-829. Doi: 10.1016/j.rbmo.2009.09.026.
10. **Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ.** Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2013; 28:2643-2651. Doi: 10.1093/humrep/det300.
11. **Liu Y, Chapple V, Roberts P, Matson P.** Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertil Steril* 2014; 102:1295-1300. e1292. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1235.
12. **Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE.** Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling: Towards a general characterisation of embryogenesis. *Anim Reprod Sci* 2016; 174:2-10. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.09.015.
13. **Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá M-J, Bellver J, Meseguer M.** Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012; 98:1458-1463. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1135.
14. **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. Doi: 10.1262/jrd.09-097a.
15. **Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K, Imai K.** Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS One* 2012;7: e36627. Doi: 10.1371/journal.pone.0036627.
16. **Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA.** Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010; 28:1115-1121. Doi: 10.1038/nbt.1686.
17. **Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S.** Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril* 2013; 99:1035-1043. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.143.
18. **Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J.** The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011; 26:2658-2671. Doi: 10.1093/humrep/der256.
19. **Kirkegaard K, Hindkjær JJ, Grøndahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ.** A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator.

- J Assist Reprod Genet* 2012; 29:565-572. Doi: 10.1007/s10815-012-9750-x.
20. **Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, Baker VL, Adamson GD, Abusief ME, Gvakharia M, Loewke KE, Shen S.** Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril* 2013; 100:412-419.e415. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.021.
  21. **Kaser DJ, Racowsky C.** Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014; 20:617-631. Doi: 10.1093/humupd/dmu023.
  22. **Gallego RD, Remohí J, Meseguer M.** Time-lapse imaging: the state of the art†. *Biol Reprod* 2019; 101:1146-1154. Doi: 10.1093/biolre/ioz035.
  23. **Sciorio R, Meseguer M.** Focus on time-lapse analysis: blastocyst collapse and morphometric assessment as new features of embryo viability. *Reprod Biomed Online* 2021; 43:821-832. Doi: 10.1016/j.rbmo.2021.08.008.
  24. **Bolton VN, Leary C, Harbottle S, Cutting R, Harper JC.** How should we choose the 'best' embryo? A commentary on behalf of the British Fertility Society and the Association of Clinical Embryologists. *Hum Fertil* 2015; 18:156-164. Doi: 10.3109/14647273.2015.1072646.
  25. **Lewis WH, Gregory PW.** Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science* 1929; 69:226-229. Doi: 10.1126/science.69.1782.226-a.
  26. **Massip A, Mulnard J.** Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J Reprod Fertil* 1980; 58:475-478. Doi: 10.1530/jrf.0.0580475.
  27. **Massip A, Mulnard J, Vanderzwalmen P, Hanzen C, Ectors F.** The behaviour of cow blastocyst in vitro: cinematographic and morphometric analysis. *J Anat* 1982; 134:399-405.
  28. **Grisart B, Massip A, Dessy F.** Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J Reprod Fertil* 1994; 101:257-264. Doi: 10.1530/jrf.0.1010257.
  29. **Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H.** Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology* 1998; 50:1285-1299. Doi: 10.1016/s0093-691x(98)00227-1.
  30. **Yoshioka K, Suzuki C, Iwamura S.** Effects of activin A and follistatin on developmental kinetics of bovine embryos: cinematographic analysis in a chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 2000; 118:119-125.
  31. **Peippo J, Kurkilahti M, Bredbacka P.** Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. *Zygote* 2001; 9:105-113. Doi: 10.1017/s0967199401001113.
  32. **Holm P, Booth PJ, Callesen H.** Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* 2002; 123:553-565.
  33. **Majerus V, Lequarré AS, Ferguson EM, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I.** Characterization of embryos derived from calf oocytes: kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism. *Mol Reprod Dev* 2000; 57:346-352. Doi: 10.1002/1098-2795(200012)57:4<346::AID-MRD6>3.0.CO;2-M.
  34. **Alomar M, Tasiaux H, Remacle S, George F, Paul D, Donnay I.** Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Anim Reprod Sci* 2008; 107:48-61. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.06.009.
  35. **Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A, Donnay I.** Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod* 2003; 69:1707-1713. Doi: 10.1095/biolreprod.103.017178.
  36. **Sugimura S, Akai T, Somfai T, Hirayama M, Aikawa Y, Ohtake M, Hattori H, Kobayashi S, Hashiyada Y, Konishi K, Imai K.** Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: a novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biol Reprod* 2010; 83:970-978. Doi: 10.1095/biolreprod.110.085522.
  37. **Magata F, Ideta A, Okubo H, Matsuda F, Urakawa M, Oono Y.** Growth potential of bovine embryos presenting abnormal cleavage observed through time lapse cinematography. *Theriogenology* 2019; 133:119-124. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.04.031.
  38. **Magata F, Urakawa M, Matsuda F, Oono Y.** Developmental kinetics and viability of bovine embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Theriogenology* 2021; 161:243-251. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.12.001.
  39. **Nagai H, Okada M, Nagai Y, Sakuraba Y, Okae H, Suzuki R, Sugimura S.** Abnormal cleavage is involved in the self-correction of bovine preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res*



- Commun* 2021; 562:76-82. Doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.028.
40. **Suzuki R, Okada M, Nagai H, Kobayashi J, Sugimura S.** Morphokinetic analysis of pronuclei using time-lapse cinematography in bovine zygotes. *Theriogenology* 2021; 166:55-63. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.02.021.
  41. **Lechniak D, Sell-Kubiak E, Warzych E.** The metabolic profile of bovine blastocysts is affected by in vitro culture system and the pattern of first zygotic cleavage. *Theriogenology* 2022; 188:43-51. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.05.021.
  42. **Yaacobi-Artzi S, Kalo D, Roth Z.** Association between the morphokinetics of in-vitro-derived bovine embryos and the transcriptomic profile of the derived blastocysts. *PLoS One* 2022; 17:e0276642. Doi: 10.1371/journal.pone.0276642.
  43. **Liu Y, Qi F, Matson P, Morbeck DE, Mol BW, Zhao S, Afnan M.** Between-laboratory reproducibility of time-lapse embryo selection using qualitative and quantitative parameters: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2020; 37:1295-1302. Doi: 10.1007/s10815-020-01789-4.
  44. **Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, Crescenzo C, Guglielmino A.** The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30:703-710. Doi: 10.1007/s10815-013-9992-2.
  45. **Milewski R, Kuć P, Kuczyńska A, Stankiewicz B, Łukaszuk K, Kuczyński W.** A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32:571-579. Doi: 10.1007/s10815-015-0440-3.
  46. **Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N.** Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2016; 105:275-285.e210. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.10.013.
  47. **Silva T, Santos EC, Annes K, Soares CA, Leite RF, Lima CB, Milazzotto MP.** Morphokinetic-related response to stress in individually cultured bovine embryos. *Theriogenology* 2016; 86:1308-1317. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.072.
  48. **VerMilyea MD, Tan L, Anthony JT, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Boostanfar R, Baker VL, Suraj V, Chen AA, Mainigi M, Coutifaris C, Shen S.** Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multi-centre study. *Reprod Biomed Online* 2014; 29:729-736. Doi: 10.1016/j.rbmo.2014.09.005.
  49. **Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P.** Time-lapse deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. *Fertil Steril* 2016; 105:656-662.e651. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.11.003.
  50. **Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, Meseguer M.** The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod* 2015; 30:276-283. Doi: 10.1093/humrep/deu331.
  51. **Motato Y, de los Santos MJ, Escriba MJ, Ruiz BA, Remohí J, Meseguer M.** Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertil Steril* 2016; 105:376-384.e379. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.11.001.
  52. **Sugimura S, Akai T, Imai K.** Selection of viable in vitro-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *J Reprod Dev* 2017; 63:353-357. Doi: 10.1262/jrd.2017-041.
  53. **Barrie A, Homburg R, McDowell G, Brown J, Kingsland C, Troup S.** Preliminary investigation of the prevalence and implantation potential of abnormal embryonic phenotypes assessed using time-lapse imaging. *Reprod Biomed Online* 2017; 34:455-462. Doi: 10.1016/j.rbmo.2017.02.011.
  54. **Coticchio G, Barrie A, Lagalla C, Borini A, Fishel S, Griffin D, Campbell A.** Plasticity of the human preimplantation embryo: developmental dogmas, variations on themes and self-correction. *Hum Reprod Update* 2021; 27:848-865. Doi: 10.1093/humupd/dmab016.
  55. **Bamford T, Barrie A, Montgomery S, Dhillon-Smith R, Campbell A, Easter C, Coomarasamy A.** Morphological and morphokinetic associations with aneuploidy: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2022; 28:656-686. Doi: 10.1093/humupd/dmac022.
  56. **Kalatova B, Jesenska R, Hlinka D, Dudas M.** Tripolar mitosis in human cells and embryos: occurrence, pathophysiology and medical implications. *Acta Histochem* 2015; 117:111-125. Doi: 10.1016/j.acthis.2014.11.009.
  57. **Ozbek IY, Mumusoglu S, Polat M, Bozdog G, Sokmensuer LK, Yarali H.** Comparison of single euploid blastocyst transfer cycle outcome derived from embryos with normal or abnormal cleavage patterns. *Reprod Biomed Online* 2021; 42:892-900. Doi: 10.1016/j.rbmo.2021.02.005.
  58. **Desai N, Goldberg JM, Austin C, Falcone T.** Are

- cleavage anomalies, multinucleation, or specific cell cycle kinetics observed with time-lapse imaging predictive of embryo developmental capacity or ploidy? *Fertil Steril* 2018; 109:665-674. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.12.025.
59. **Lagalla C, Tarozzi N, Sciajno R, Wells D, Di Santo M, Nadalini M, Distratis V, Borini A.** Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2017; 34:137-146. Doi: 10.1016/j.rbmo.2016.11.008.
  60. **Zhan Q, Ye Z, Clarke R, Rosenwaks Z, Zaninovic N.** Direct unequal cleavages: embryo developmental competence, genetic constitution and clinical outcome. *PLoS One* 2016; 11:e0166398. Doi: 10.1371/journal.pone.0166398.
  61. **Wirka KA, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, Suraj V, Tan L, Shen S.** Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril* 2014; 101:1637-1648. e1635. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.050.
  62. **Azzarello A, Hoest T, Hay-Schmidt A, Mikkelsen AL.** Live birth potential of good morphology and vitrified blastocysts presenting abnormal cell divisions. *Reprod Biol* 2017; 17:144-150. Doi: 10.1016/j.repbio.2017.03.004.
  63. **Marcos J, Pérez-Albalá S, Mifsud A, Molla M, Landeras J, Meseguer M.** Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2015; 30:2501-2508. Doi: 10.1093/humrep/dev216.
  64. **Baltz JM, Smith SS, Biggers JD, Lechene C.** Intracellular ion concentrations and their maintenance by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase in preimplantation mouse embryos. *Zygote* 1997; 5:1-9.
  65. **Niimura S.** Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J Reprod Dev* 2003; 49:413-423. Doi: 10.1262/jrd.49.413.
  66. **Sciorio R, Saura RH, Thong KJ, Algam ME, Pickering SJ, Meseguer M.** Blastocyst collapse as an embryo marker of low implantation potential: a time-lapse multicentre study. *Zygote* 2020; 28:139-147. Doi: 10.1017/S0967199419000819.
  67. **Togashi K, Kumagai J, Sato E, Shirasawa H, Shimoda Y, Makino K, Sato W, Kumazawa Y, Omori Y, Terada Y.** Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32:969-976. Doi: 10.1007/s10815-015-0479-1.
  68. **Lagalla C, Coticchio G, Sciajno R, Tarozzi N, Zacà C, Borini A.** Alternative patterns of partial embryo compaction: prevalence, morphokinetic history and possible implications. *Reprod Biomed Online* 2020; 40:347-354. Doi: 10.1016/j.rbmo.2019.11.011.
  69. **Yao T, Suzuki R, Furuta N, Suzuki Y, Kabe K, Tokoro M, Sugawara A, Yajima A, Nagasawa T, Matoba S, Yamagata K, Sugimura S.** Live-cell imaging of nuclear-chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos. *Sci Rep* 2018; 8:7460. Doi: 10.1038/s41598-018-25698-w.
  70. **Yao T, Ueda A, Khurchabilig A, Mashiko D, Tokoro M, Nagai H, Sho T, Matoba S, Yamagata K, Sugimura S.** Micronucleus formation during early cleavage division is a potential hallmark of preimplantation embryonic loss in cattle. *Biochem Biophys Res Commun* 2022; 617:25-32. Doi: 10.1016/j.bbrc.2022.05.075.
  71. **Kaniyamattam K, Block J, Hansen PJ, De Vries A.** Economic and genetic performance of various combinations of in vitro-produced embryo transfers and artificial insemination in a dairy herd. *J Dairy Sci* 2018; 101:1540-1553. Doi: 10.3168/jds.2017-13475.
  72. **Palma GA, Olivier NS, Neumüller C, Sinowatz F.** Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. *Anat Histol Embryol* 2008; 37:67-73. Doi: 10.1111/j.1439-0264.2007.00795.x.
  73. **Bermejo-Álvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A.** Can bovine in vitro-matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? *Biol Reprod* 2008; 79:594-597. Doi: 10.1095/biolreprod.108.070169.
  74. **Lu KH, Cran DG, Seidel GE.** In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 1999; 52:1393-1405. Doi: 10.1016/s0093-691x(99)00225-3.
  75. **Morton KM, Herrmann D, Sieg B, Struckmann C, Maxwell WMC, Rath D, Evans G, Lucas-Hahn A, Niemann H, Wrenzycki C.** Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Mol Reprod Dev* 2007; 74:931-940. Doi: 10.1002/mrd.20573.
  76. **Bermejo-Álvarez P, Lonergan P, Rath D, Gutiérrez-Adán A, Rizos D.** Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22:426-436. Doi: 10.1071/RD09142.

77. **Mikkola M, Andersson M, Taponen J.** Transfer of cattle embryos produced with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality. *Theriogenology* 2015; 84:1118-1122. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.012.
78. **Wilson RD, Fricke PM, Leibfried-Rutledge ML, Rutledge JJ, Penfield CMS, Weigel KA.** In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2006; 65:1007-1015. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.07.007.
79. **Trigal B, Gómez E, Caamaño JN, Muñoz M, Moreno J, Carrocera S, Martín D, Diez C.** In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2012; 78:1465-1475. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.06.018.
80. **Yadav BR, King WA, Betteridge KJ.** Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated in vitro. *Mol Reprod Dev* 1993; 36:434-439. Doi: 10.1002/mrd.1080360405.
81. **Avery B, Madison V, Greve T.** Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. *Theriogenology* 1991; 35:953-963. Doi: 10.1016/0093-691x(91)90306-x.
82. **Grisart B, Massip A, Collette L, Dessy F.** The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered. *Theriogenology* 1995; 43:1097-1106. Doi: 10.1016/0093-691x(95)00073-h.
83. **King WA, Yadav BR, Xu KP, Picard L, Sirard MA, Verini Supplizi A, Betteridge KJ.** The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology* 1991; 36:779-788. Doi: 10.1016/0093-691x(91)90343-c.
84. **Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP.** Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1999; 117:159-167. Doi: 10.1530/jrf.0.1170159.
85. **Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA.** Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J Reprod Fertil* 1991; 93:125-132. Doi: 10.1530/jrf.0.0930125.
86. **Ray PF, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH.** Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 1995; 104:165-171. Doi: 10.1530/jrf.0.1040165.
87. **Aparicio-Ruiz B, Basile N, Pérez Albalá S, Bronet F, Remohí J, Meseguer M.** Automatic time-lapse instrument is superior to single-point morphology observation for selecting viable embryos: retrospective study in oocyte donation. *Fertil Steril* 2016; 106:1379-1385.e1310. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1117.
88. **Magata F.** Time-lapse monitoring technologies for the selection of bovine in vitro fertilized embryos with high implantation potential. *J Reprod Dev* 2023; 69: 57-64. Doi: 10.1262/jrd.2022-131.