# 博士論文

胚移植による子牛の効率的生産と核移植胚の子牛生産に関する研究

平成24年3月

関澤 文夫 岡山大学大学院 自然科学研究科

## 胚移植による子牛の効率的生産と核移植胚の子牛生産に関する研究

第一章 緒論	
牛における胚移植および核移植に関する最近の進歩	1
第二章 牛における過排卵処置に関する研究	11
第一節 FSHおよびPGF2αの投与に関する検討	12
第二節 FSHおよびPGF2α投与による連続採卵に関する検討	20
第三節 過排卵処置時におけるGnRH-A の応用に関する検討	27
第四節 採胚成績と血漿ビタミン濃度に関する検討	34
第三章 牛胚の凍結保存方法および凍結胚の移植方法に関する研究	43
第一節 凍結胚の融解温度と透明帯の損傷に関する検討	44
第二節 凍結胚の形態的変化に関する検討	56
第三節 凍結胚移植時の血中プロジェステロン値と受胎率に関する検討	62
第四節 直接移植法(ダイレクト法)による牛胚移植の検討	72
第四章 胚移植後の妊娠異常に関する研究	83
第一節 牛凍結保存胚の流産に関する検討	84
第二節 牛凍結保存胚の胚子・胎子の早期死滅に関する検討	90
第五章 牛における核移植に関する研究	98
第一節 牛における核移植に関するクローン作出の検討	100
第二節 牛核移植胚の発生能に及ぼすドナー胚の発育ステージに	
関する検討	108
第三節 牛核移植胚のクローン応用試験、特に、繁殖能力、泌乳能力、	
および流産発現等に関する検討	118
第四節 牛核移植胚の直接移植法(ダイレクト法)による凍結保存に	
関する検討	128
第六章 総合考察	135
第七章 総括	144
	144
第八章 英文抄録	148
参考文献	152
謝辞	172
141日十	1/2

胚移植による子牛の効率的生産と核移植胚の子牛生産に関する研究

第一章 緒 論

牛における胚移植および核移植に関する最近の進歩

- I 胚移植の歴史
- 1. 胚移植の目的

出生前の雌牛の卵巣には、将来、子牛になる可能性のある原始卵胞(primordial follicle)が、最も多い時期には約200万個含まれ、出生直前には約5~7万個に減少し、性成熟後も逐次減少して、雌牛が10歳位まで、妊娠しないで正常に発情周期を営んでも、約140個の卵子を排卵するだけであると云われている。また、通常、繁殖に供用しても、一生を通じて約10頭の子牛を生産するのが限度である。この原始卵胞を人為的に増加させ、胚移植で優れた形質を持たせるのが胚移植の目的である。さらに、最近、雌の乳腺細胞(完全に分化を終えた普通の体細胞)を培養して、これをドナー細胞として得られたクローン胚子を移植してコピー動物作出を可能にしている[189]。

胚移植には2つの目的がある。1つは、優れた遺伝的資質を有する供胚家畜(donor)に、ホルモン剤を投与して過剰排卵を誘起し、これに優れた遺伝的資質を有する精液で人工授精を施して、得られた体内胚を、直接または間接に顕微操作を施して、これを、必ずしも遺伝的には優れない受胚家畜(recipient)の生殖器内に移植して、優れた子畜を同時に多数、生産する技術である。他の一つは、種々の遺伝形質を有する家畜の卵巣から未成熟の卵母細胞を採取して、体外で成熟培養して、これに体外受精を施して、発生させ、胚子を受胚家畜の生殖器内に移植して子畜を生産する技術である。この両技術は、単に家畜の改良・増産に役立つばかりでなく、受精卵、胚子などを利用した動物発生工学的研究の発展にも大いに役立っている。

#### 2. 胚移植の初期の研究

イギリスのHeape [63]は、約1世紀前に家兎の胚子を卵管内に移植して4匹の子兎を生産している。その後、家畜を対象とした胚移植の研究は、1930年以降1950年代にかけて、

WarickとBerry [173]がめん羊で、WarickとBerry [174]が山羊で、Kvansnickii [86]が豚で子畜を生産している。牛ではアメリカのコーネル大学のWillettら[175]が、屠殺牛から採取した胚子を用いて胚移植に初めて成功している。同じ頃、オーストラリアのAustin [8]とアメリカのChang [33]は、それぞれ別個に精子の受精能獲得について追求して、Chang [34]は、初めて家兎の体外受精に成功している。1960年代には、各種の哺乳動物において胚移植に関する研究が進歩して、胚子の発生、着床などの受精現象について多くの基礎研究がなされている。なかでも、ゴールデンハムスター[195]やマウス[176]などにおいて、体外受精に関する研究がなされた。また、Sugie [146]が、胚子の採取法や移植法に非外科的方法で実験を行って、子宮頸管迂回法で移植が可能なことを報告した。

通常、牛は性成熟に達すると、下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンの作用によって、卵巣に存在する卵母細胞のうち、1~数個が発育して成熟する。卵胞が成熟すると、発情を発現し、発情期の後半から、発情終了の直後に排卵する。1発情期に卵巣から排卵される卵子数は、牛など単胎動物では通常1個、めん羊、山羊などでは1~2個、豚および家兎などの多胎動物では10数個が限度である。排卵された卵子は卵管内で、精子を受け入れて受精卵になり、卵管内で分割すると胚子になる。この胚子は3~4日間は卵管内に留まって、発育し、排卵後4~5日には子宮内に下降する。子宮内に入った時点の胚子は、牛では受精後8~16細胞期まで発育する。

#### 3. 過剰排卵誘起処置

牛の過剰排卵は、優秀な能力を有する雌牛に人為的に性腺刺激ホルモン剤を投与して、多数の卵胞を発育させ、一時に多数の卵子を排卵させることである。この卵子を体内で胚子に育て上げ、家畜としては能力の乏しい牛や、他品種の牛に移植して子畜を生産すると、優秀な遺伝形質を受け継いだ子畜を増産することになる。

牛の過剰排卵を誘起するには、通常、馬、めん羊あるいは豚の下垂体前葉から抽出した卵胞刺激ホルモン剤(FSH)あるいは、卵胞発育促進作用の強い妊馬血清性性腺刺激ホルモン剤(PMSG)を使用する。これらのホルモン剤による卵巣の反応は、ホルモン剤の種類によって著

しく異なり、また、同一種類のホルモン剤を同一量投与しても、個体差が著しく、発育した 卵胞数や排卵数、また卵子の受精率は必ずしも一様ではない。また、これらのホルモン剤は、 発情周期の9~14日前後の黄体期に使用すると著効が現れると云う。

PMSG製剤であれば、3,000~4,000IU(経産牛)あるいは2,000~3,000IU(未経産牛)を1回筋肉内注射する。PMSG製剤の1回投与法は、作業としては容易であるために、現在でも広く使用されている。しかし、PMSG製剤は血中持続時間が長いために、臨床上の問題が残されている。これはPMSG投与により、排卵した後に新たに形成された卵胞から卵胞ホルモンが分泌され、子宮内膜に作用して、胚子に対して有害に働くからであるとされている。

FSH製剤は、全量28~40mgを、連日、3~4日間、朝夕、漸減的に筋肉内注射する。 FSH製剤は投与後、尿中に排泄され易いために、投与回数を増やさざるを得ない。最近、FSH製剤をPVP(polyvinylpyrrolidone)に溶解して1回投与すると、漸減投与法と比べて、ほぼ同等の成果が得られると云う。

PMSG製剤あるいはFSH製剤を投与後3日目に、黄体退行作用の強いプロスタグランジンF2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ )を1日2回、全量で15~25mgを筋肉内注射して、卵胞と共存する黄体を一時期に退行させると、発情が早期に現れる。このPGF2 $\alpha$ の類縁物質もPGF2 $\alpha$ と同様に応用されている。

#### 4. 胚子の回収・評価

牛における胚子の回収は、主として子宮頸管経由法で行われている。この方法はバルーンカテーテルを子宮頸管を通して、子宮腔内に挿入して、子宮灌流法によって胚子を回収する。この方法は少量の灌流液(1回当たり20~50ml)で数回以上灌流するもので、灌流液には修正リン酸緩衝液を用いることが多い。灌流液中に存在する胚子の回収は約1リットルのフラスコに液を置き、約70 μm のメッシュで胚子を濾過する。

回収された胚子は、発育段階、分割程度、割球密度、形態および色調などを基準にして判定する。また、胚子の異常は、変性細胞、形態異常、遊離割球、死滅細胞、水胞、透明帯の破損・欠損などの他、割球の配列に堅牢性がなく、発生の進んだ時期でも胚細胞質が暗色を呈するもの等を選んで決める。この胚子の評価基準は受胎率に大きく影響を与える。通常、

受精後5~9日目の正常胚は、形態により、桑実胚、後期桑実胚(収縮桑実胚)、初期胚盤 胞、胚盤胞、拡張胚盤胞、脱出胚盤胞などに区分される。

#### 5. 発情同期化

牛胚では、供胚牛と受胚牛が同一日に排卵した場合に最も受胎率が高く、この場合の許容範囲はほぼ0.5~1.0日であると云われる。排卵の許容範囲が2日になると受胎率が著しく低下し、さらに3日になると受胎は望めないと云う。牛の発情同期化には、黄体退行作用の強いPGF2aあるいはPGF2aの類縁物質が使用される。PGF2aを黄体期に筋肉内に投与すると、1~2日後にはほぼ完全に黄体は退行し、次の発情・排卵は3~4日後に発現すると云う。

#### 6. 胚子の移植

胚子は排卵直後の 1 細胞期から、14日目の胚盤胞期胚まで、いずれの細胞期でも、発育程度に応じた環境の卵管または子宮に移植すれば、受胎が可能であると云われるが、移植に適するのは 8 細胞期以降であると云われる。初期における、牛胚移植には、下腹部切開法と側腹部切開法がある。後者は主として局所麻酔だけで実施され、1975年頃まで行われていたが、現在では特殊な例を除いて実施されていない。前者は時間や経費がかかり、実用性に乏しい。1975年前後まではアメリカ、カナダ等の先進国の胚移植技術はこの外科的手法によって行われた。1965年、Sugie [146]は子宮頸管迂回法という特殊な技術を考案して、非外科的方法で胚子を移植する方法を開発した。この方法は、その後、Sreenan [140]およびBolandら [20]により、新たに開発された人工授精用の精液注入器を活用して、子宮の収縮運動が減弱した時期である、発情後7日前後に、子宮頸管から直接子宮内に胚子を注入するものである。胚移植が、わが国に導入されたのは、第2次世界大戦終了後数年を経過した1950年前後であるが、1980年代以降急速に牛の胚移植に関する研究は盛んに行われるようになった。最近のわが国の牛の胚移植の現状を表1および2に示した。

#### Ⅱ. 胚移植および関連技術の最近の進歩

## 1. 胚子の凍結保存

胚子の凍結保存技術は、1970年代にマウス [176,177] および牛胚 [188]で開発された。当

時の方法は『緩慢凍結法』と云い、耐凍剤としてDMSO(dimethyl sulfoxide)を基本液に加えて凍結する方法で、胚子を融解するまでに約7時間を要した [188]。その後、Bilton と Moore [17]は、耐凍剤をグリセリンに代えて、約2時間で凍結する「急速凍結法」に改良した。この凍結方法で使用した耐凍剤は、現在でも凍結剤の基本液として使用されている。さらに、この方法の代わりに開発されたのは、「一段階凍結法」である [89,153]。この方法は希釈液の中にショ糖を加えて希釈したり、また、耐凍剤のグリセリンの部分を、ストローカッターで切除するものである。最近、Massipら [93]およびDouchiら [46]は一段階凍結法をさらに改良した「直接移植法(ダイレクト法)」を考案している。この方法は、基本液に細胞内浸透圧の高い、エチレングリコールやプロパンジオールを使用したり、希釈液内にショ糖を加えたものを利用するもので、胚子の平衡は、ストロー内で行い、融解に当たっても、耐凍剤の希釈操作を行わないで、直接、牛に移植することが可能である。

#### 2. 体外受精

体外受精は、精子と卵子を人工的に体外で融合して受精卵を作出する手法である。ヒトでは、この方法は1978年にStepto とEdwards [141]により成功されている。家畜では、ヒトより若干時期が遅れて、アメリカのBrackettら [27]が、体外受精で1頭の子牛を生産している。その後、山羊、めん羊 [58]、豚 [35]などにおいて、体外受精で産子が得られている。しかし、これらの研究では、いずれも排卵直前の卵胞卵あるいは卵管内の排卵直後の成熟卵子を対象にしたもので、このような成熟卵を使用する操作は、産業的には、さほど価値が高くない。花田 [59]は屠場から採取した卵巣内に存在する小卵胞から採取した未成熟卵を、体外で培養、成熟、媒精(授精)した後、移植可能な状態まで培養して、受胚牛に移植して産子を得ている。この際の媒精(授精)には、牛精子の受精能獲得・先体反応誘起が使用され、その溶液には、修正BO液を基質としたイオノファA23187 [58]あるいはヘパリン[107]などが使用されている。この成熟卵子あるいは受精卵は、単に体外受精で子牛を生産するだけでなく、核移植におけるドナー胚あるいはレシピエント細胞質への応用、また胚子の性判別、顕微授精、凍結保存胚など基礎研究にも広く利用されている。

## 3. 胚性幹細胞(ES細胞:embryonic stem cells)

最近、胚性幹細胞(embryonic stem cells: ES細胞)と云う、分化が休止している状態で増殖を続ける胚盤胞期胚の内細胞塊(ICM)由来の細胞が分離されている [49]。この細胞は多能性を有し、マウスの皮下あるいは腎皮膜下に移植すると、種々の細胞に分化して、固形腫瘍を形成することが明らかになっている。また分化誘導条件で培養すると、胞状の胚様体(cystic embryoid body)を形成することから、ES細胞には、1種類の細胞が種々の細胞に分化する、本来の分化能力(多分化能性:pluripotency)を有することが明らかになった。このことから、胚性幹細胞は、分割期卵と集合させることができ、また、胚盤胞へ注入するとキメラ動物が作出できると云う。この過程でES細胞は生殖細胞にも分化するので、外来遺伝子を導入したES細胞を用いれば、遺伝子を子孫へ継代することが可能であると云う。

#### 4. 分離・切断胚の作出

胚子の分離・切断は、優れた遺伝形質を有する初期胚を、顕微操作によって2個以上に分離・切断して、それぞれ同一遺伝子を有する個体として発生させる方法である。発生した一組の胚子は、子宮内に移植され、生産された一組の産子は、一胚性多子あるいは一胚性双子で、クローン家畜とも呼ばれる。

胚子の分離法は、発育ステージの若い卵細胞質を、胚子が収縮を起こす前に供試する。イギリスのWilladsen [181]は、めん羊の2~8細胞期胚を培地中で2個に分離して、分離胚をそれぞれ別個に、同一のめん羊あるいは豚、家兎などの空の透明帯の中に容れて一組の分離胚を作出する。次に、これを1.0%前後の濃度の寒天で二重包埋して、排卵後3~5日のめん羊などの結紮卵管内で4~5日間体内培養して、胚盤胞まで発生させる。生体内培養後、寒天を除去して、家畜の子宮内に移植する。産子の生産率は通常の胚移植のそれと大差はないと云う。Willadsen ら[182]は、同一方法を用いて、牛でも胚子を分離し、一胚性双子を作出している。

切断法は、収縮度合いが強い胚子を、通常、予め透明帯を除去した後に切断する。透明帯 を除去しない場合は、胚子をホールディングピペットで固定して、垂直に切断するか、固定 せずに切断する。切断した胚子は、それぞれ空の透明帯の中に挿入するか、透明帯に挿入せずに、そのまま受胚家畜の子宮内に移植する。この際の生産率は100%を若干超えると云う。

#### 5. 核移植

核移植とは、発生の進んだ胚子の核を未受精卵の卵細胞質に移植して、発生プログラムを 初期化することにより、全能性(産子にまで発生する能力)を獲得させ、これを多数のクロ ーン個体として作出することである。クローン動物とは、同一遺伝子で構成する個体群を指 し、一胚性双子が最小単位となっている。先に示した胚子の分離・切断により作出された一 胚性双子も核移植と同じくクローン家畜と云うが、胚子の分離・切断により作出されたクロ ーン胚は3~4個以上に分離あるいは切断することは極めて難しく、通常、2分離に留まる のみでクローン個体が生産され難い面がある。

核移植により同一の優良遺伝子を有する家畜を大量に生産すれば、家畜の改良に極めて有益である。その他、各種家畜において、細胞核が発生のどの時期まで全能性を維持しているかを知る上でも重要である。

マウスにおいて2細胞期胚の1つの割球から、産子を生産することには成功した [67]が、4細胞期以降の胚割球は、産子になる能力を失っている [124]。一方、牛およびめん羊では4細胞および8細胞期胚の割球では産子を得られることが明らかにされた [186]。

従来、核移植は蛙などの両棲類で成功している [29]。未受精卵側の染色体は、マイクロピペットを用いて除去、あるいは紫外線の照射により不活化する。一方、ドナー胚の核は、分離してマイクロピペットで吸引し、未受精卵の細胞質に注入する。このようにして、核を除去したカエル卵の胞胚期の細胞質に移植し、そのうち約1%が生体に発生したと報告されている [29]。

分化した細胞の核を未受精卵に移植する実験は核の全能性(totipotency)や核と細胞質の相互作用を解析する手段として進められてきた。哺乳動物における核移植は、細胞が小さいこと、また核の除去や注入時に細胞膜が壊れやすいことなどから困難とされていた。しかし、1983年にMcGrath と Solter [95]は、マウスの未受精卵をマイクロフィラメントを可逆的に

阻害するサイトカラシンBで処理して、次にセンダイウイルスを用いて細胞融合を起こし、 前核期間で核を置換する前核置換法を開発し、初めて核移植卵由来の産子の生産に成功して いる。この方法は再現性に優れ、成功率が高く、核移植卵が高率に発生することが確認され ている[23, 151, 166]。

Willadsen [184]は、めん羊の卵子を用いて、第二成熟分裂中期(Metaphase II:MII期)の 染色体を取り除き、この除核未受精卵に8~16細胞期胚の割球を移植して、作出された再構 築卵をめん羊の卵管内に移植して、桑実胚~胚盤胞期胚まで発生させた後、偽妊娠動物に移 植して産子を得ている。これが家畜において初めて生産された核移植由来の産子である。こ れ以来、除核未受精卵への核移植を用いて、牛[114]、めん羊 [139]、マウス [82]で産子の 生産に成功している。

除核未受精卵への核移植の方法は、除核未受精卵に8~16細胞期胚の割球を移植して、交流電流を通電して、電流と卵細胞質の接触面を電極に対して平行になるように調節して、次いで短時間の直流電流を流すと、両方の細胞質に小さな孔が開き、電気融合が起こる。この核移植卵を寒天で二重包埋して、排卵後3~5日のめん羊の結紮卵管内で5~7日間、生体内培養して、胚盤胞まで発生させる。生体内培養後、寒天を除去して、受胚羊の子宮内に移植して、子羊を獲ている。この方法は、複雑な作業であるため、最近、体外受精の技術を応用して、卵丘細胞や卵管上皮細胞との共培養法に改良された。また、近年、核移植により、同一系統の子牛を2代、3代と継代して生産する継代核移植法が確立されている[24]。

これら核移植技術に関する研究は欧米を中心としてわが国においても盛んに行われているが、その技術を支える周辺技術については十分検討されているとは言い難い。そこで本研究では、その周辺技術であるドナー胚の生産のための牛の過排卵処理に関する研究、一度に多数生産される核移植胚の凍結保存のための牛胚の凍結保存に関する研究および核移植胚を移植後に多発すると云われている早期胚死滅や流産等の原因解明のための牛胚移植後の早期胚死滅および流産の発生に関する研究について検討した。

表 1 受精卵移植による産子数等の推移

(単位:頭数)

					(=	単位:與剱)
	体内:	受精卵移植		体外受制	青卵移植	
年度	供卵牛頭数	移植頭数	産子 数	移植頭数	産子数	総産子数
昭和 50 年	32	10	1	-	-	1
55 年	317	498	73	_	-	73
60 年	2,724	5,034	887	_	_	887
61 年	3,589	6,850	1,382	_	-	1,382
62 年	4,078	8,559	2,291	390	_	2,291
63 年	5,207	12,253	3,366	1,184	160	3,526
平成元年	6,899	15,788	4,884	1,920	475	5,359
2 年	7,704	19,865	5,912	3,916	621	6,533
3 年	9,099	26,613	7,163	4,229	1,147	8,310
4年	10,853	32,811	8,818	5,102	1,020	9,838
5 年	11,618	36,876	10,230	6,264	1,317	11,547
6 年	11,922	37,744	11,010	6,918	1,107	12,117
7 年	11,079	40,742	11,322	4,642	1,216	12,538
8 年	13,231	44,657	13,248	7,211	1,583	14,831
9 年	13,438	46,925	15,035	9,479	2,123	17,158
10 年	14,172	49,206	15,653	9,328	2,007	17,660
11 年	14,817	52,147	16,433	9,726	2,110	18,543
12 年	14,514	52,761	15,884	11,653	2,351	18,235
13 年	15,300	53,048	15,801	9,774	2,660	18,461
14 年	14,698	55,198	16,763	8,209	1,828	18,591
15 年	13,874	56,205	19,583	7,890	1,757	21,340
16 年	14,450	57,239	16,178	9,525	2,129	18,307
17 年	13,837	58,098	16,155	10,726	2,308	18,463
18 年	13,498	61,538	15,395	12,386	2,680	18,075
19 年	15,547	74,215	17,720	13,204	2,811	20,531

注 1: 都道府県を通じて各受精卵移植実施機関からの報告をまとめた

注2:産子数は当該年度に出生したことが確認された頭数

表 2 受精卵移植の状態別受胎率の推移

(単位:%)

	体内受精	<b>青卵移植</b>	体外受精	·平位· /0/ 引卵移植
年度	新鮮 1 卵	凍結 1 卵	新鮮1卵	凍結1卵
昭和 62 年	48	31	41	
63 年	51	35	37	7
平成元年	52	39	38	3
2 年	51	41	36	6
3 年	50	41	36	6
4 年	51	43	33	3
5 年	51	42	30	)
6 年	51	43	28	3
7 年	51	46	34	1
8 年	50	46	37	7
9 年	51	45	36	32
10 年	50	46	41	32
11 年	52	46	39	33
12 年	52	46	37	35
13 年	52	46	41	35
14 年	51	46	42	36
15 年	50	45	43	37
16 年	50	46	46	36
17 年	51	45	41	39
18 年	52	45	41	38
19 年	52	46	42	39

注 1: 都道府県を通じて各受精卵移植実施機関からの報告をまとめた

#### 第二章 牛における過排卵処置に関する研究

## 緒言

胚移植は、乳牛および肉牛に効率的に改良増殖を進める上で大きな利点を持っている。優れた遺伝的形質を持った牛から優秀胚を多数生産するための過排卵処置は、胚移植を構成する諸技術の中でも重要な技術である。

牛は単胎動物であり、通常は1発情期に1個の卵子を排卵する。胚移植技術のより有効な活用は、一度に多数の排卵を誘起し、多数の胚子を回収して移植し、一度に多数の産子を得ることである。このため、各種の性腺刺激ホルモンを牛に注射して、多数の卵子の発育と排卵を誘起する方法が考察されている。この処置を過剰排卵誘起あるいは過排卵誘起と呼ぶ。

過排卵処置の方法としては当初は、妊娠初期の馬血清から抽出された妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) および発情ホルモン (Estrogen: Estradiol-17  $\beta$ ) が使用されていた [147]。その後、家畜の下垂体前葉卵胞刺激ホルモン (FSH) を用いた方法が開発され、さらに Estrogenの代わりに、最近、子宮由来の黄体退行因子として知られるプロスタグランジン

 $F2\alpha$  (PGF $2\alpha$ ) あるいは、その類縁物質が開発され、この物質は牛の黄体機能の退行に著しく貢献した。なかでも、PMSGとPGF $2\alpha$  [2, 21, 106, 157]、あるいはFSHとPGF $2\alpha$ が過排卵処置に応用され[43, 56, 80, 91, 108, 150, 155, 172]、顕著な成績が得られている。また、最近、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) が製薬化されて、このホルモンをFSHあるいはPGF $2\alpha$ またはその類縁物質と共同で用いられている。

過排卵処置の目的は正常胚を多数生産することであるが、正常胚を安定的に確保することは難しく、その方法は未だ確立されているとは云い難い。そこで本章では、FSHあるいはPGF 2αまたはその類縁物質の投与量および投与方法、また連続して過排卵処置を誘起して採卵効率を高めること、および一回当たりの正常胚数を高めるための GnRHの投与等に関して試験を行った。

#### 第一節 FSHおよびPGF2αの投与方法に関する検討

過排卵処置法としてはFSHの3~5日間の減量投与法が多く用いられている。Garciaら [56]は、FSHを3日間あるいは4日間投与した際の採卵成績には有意差がないことを報告し、その後、Donaldson [43]も同様の報告をしている。国内において、鈴木ら [155]、小島ら [80]は黒毛和種(和牛)の過排卵処置にFSH24mgを3日間の減量投与法で行うことが可能であると報告して以来、この方法が一般的になってきた。Pawlyshynら [108]はFSH減量投与法のFSH総量を増量すると移植可能胚が減少すると報告し、Donaldson [43]はFSHの総投与量を増加させると採卵数0の個体が増加することを示している。また、Lernerら [90]と Breuelら [28]は老齢牛ではFSH総量を増加させると採卵数は増加するが、若い牛ではFSHの増量に伴い採卵数が減少すると報告している。一方、砂川ら[150]は和牛の未経産牛に対して、FSHを10mgと少量投与すると、良好な採卵成績が得られることを報告している。また、FSHの投与回数を減少させるためにFSHとpolyvinyl-pyrrolidone (PVP) を混合して、1回投与する方法 [138, 163, 193]および、Folltropin Vを1回投与 [19]することで、それぞれFSHの減量投与法と同等の採卵成績を得ている。

一方、Waltonと Stubbings [172]は、FSHを3日間よりも4日間の減量投与する方法が、正常胚率が高いことを報告し、Lovieら [91]は減量投与法がFolltropin Vの1回投与よりも正常胚数が多いと報告している。過排卵処置の目的は正常胚を多数生産することであるが、その方法(FSHの投与量や投与回数)は未だ確立されているとは云い難い。

本試験においては、野外において、和牛の経産牛に対する種々のFSHの投与量および投与方法により過排卵処置を実施し、その有効性を検討した。

## 【材料と方法】

供胚牛は県内の和牛繁殖農家で飼養されている経産牛139頭である。過排卵処置は次の4方

法で実施した。

- 1. C法(FSH 24 mgの3日間減量投与法):FSH(アントリン:デンカ製薬) 24 mgを鈴木ら [143]の方法に準じて、朝夕2回、3日間、漸次減量投与し、FSH投与から3日目にPGF2α 類縁物質であるクロプロステノール(エストラメイト:住友製薬、PG-A) 500 μgを1回投与 した。この方法により33頭を供試した。現在、conventionalな方法として用いられているのでC法とした(図1)。
- 2. M法(FSH 20 mgの 4 日間減量投与法): FSH 20 mgを漸次減量投与し、投与から 3 日目の朝に PG-A 500  $\mu$ g、夕方にPG-A 250  $\mu$ gをまたは、プロスタグランジンTHAM塩(プロナルゴンF: アップジョン社、PGF2 $\alpha$ )20 mgおよび15 mgをそれぞれ、朝夕投与した。この方法により72頭を供試した。松永が考案 した方法(未発表)なので、M法とした(図 2)。
- 3. S法(FSH 12 mgの3日間減量投与法): FSH 12 mgを、砂川ら [150]の方法に準じて、朝夕2回、3日間FSHを漸次減量投与し、FSH投与から3日目の朝にPG-A 500 μg、夕方にPG-A 250 μgをそれぞれ投与した。この方法により16頭を供試した。砂川ら [150]の方法に準じたので、S法とした(図3)。
- 4. P法 (FSH 30 mg、PVPの 1 回投与法): Yamamotoら [193]の方に準じて、FSH 30 mgを 3 mlの生理食塩液で溶解し、PVP30%水溶液10mlと充分混和して頚部の皮下に投与した。FSH投与から 3 日目にPG-A 500 μgを 1 回投与した。この方法により18頭を供試した。PVPを用いた 1 回投与法なので、P法とした(図 4 )。

各方法ともPG-AまたはPGF2α投与後に誘起された発情時期に、人工授精を施した。人工授精後、7~8日目に非外科的に0.8%子牛血清、ペニシリン50万単位およびストレプトマイシン0.5 gを含むリンゲル氏液1,000 mlで採卵し、採卵数、正常胚数、正常胚率を検討した。 統計処理はt-検定により実施した。

#### 【結果】

FSH投与方法別の採卵数、正常胚数および正常胚率は表3に示す通りである。採卵数は、P

法、M法、C法、およびS法の順序で多く、それぞれ平均15.3, 13.6,13.3および10.7個であった。P法、およびC法では頭数18頭および33頭において採卵数O個という個体が、それぞれ2頭ずつあったが、M法、およびS法では、採卵数O個という個体は認められなかった。

正常胚数は、M法、S法、P法およびC法の順序で多く、それぞれ平均8.3,6.5,6.2および 5.8 個であった。すべての方法において、正常胚が得られない個体があり、P法では特に多い傾向が認められた。

正常胚率は、S法、M法、C法およびP法の順序で高く、それぞれ平均60.8, 60.7, 43.7 および40.2%であった。

採卵数、正常胚数および正常胚率について、各方法間に有意差は認められなかった。

## 【考察】

鈴木ら[155]の方法であるC法を対照として各方法の採卵成績を比較すると、M法は、採卵数は同等であったが、正常胚数が8.3個と最も高く正常胚率も60.7%と高率であった。S法は、採卵数は少ないが、正常胚数は同等であり、正常胚率は最も高かった。P法は、採卵数は最も高かったが、正常胚数は同等であり、正常胚率は低かった。

鈴木ら[155]はFSH減量投与法の3日間および4日間投与法を比較した場合、同様の採卵成績が得られているが、3日間投与法であるC法と4日間投与法であるM法を比較すると採卵数はほぼ同等であったが、正常胚数および正常胚率はいずれもM法の方が高い傾向を示した。Walton と Stubbings [172]はホルスタイン種未経産牛を用いてFSHの等量投与による3日間および4日間投与法を比較し、4日間投与の方が正常胚率が高く、本回の結果とほぼ同様であることを示している。

M法およびS法のように通常の24 mgの減量投与法(C法)より少ないFSH量で処置した牛では、砂川ら[150]の報告と同様に正常胚率が高い傾向にあった。M法は4日間投与であり、S法は3日間投与であり、両方法とも正常胚率が高い傾向を認めたのは、Pawlyshynら [108]の低単位の FSH投与で良好な正常胚率を得たことと一致する。青柳ら [6]は発情後にE2値が

上昇すると正常胚率が低下すると述べており、FSH 24 mg投与に比較して、20 mgや12 mgを投与した場合には、発情後の卵胞の発育も軽度で、E₂値の上昇も少ないために正常胚率が向上したと推察している。また、P法において正常胚率が低下したのは、青柳ら [6]がPMSGで過排卵処置をした際、発情後にE₂値が上昇し正常胚率が低下したのと同様に、FSHとPVPを混合して投与したことにより、PMSGの様にFSHの作用時間が延長したためと考える。また、Boら [19]はFolltropin Vの1回のみの皮下注射で、200、400、600および800 mgの投与量を比較して、400 mgを投与した際の移植可能胚が最も多かったと述べている。このことからPVPと FSHを混合して投与する際にも、比較的低単位のFSH量を混合した方が正常胚が多く得られると考えられる。

過排卵処置を野外において応用する場合に、省力化は重要な要素の一つである。省力化に主眼をおけば、PVPとFSHを混合して投与するP法は、PGF2aの投与を含めても2回の投与で済むことから、技術者の負担も軽く、牛へのストレスも少なくて済むことから、有効な方法であると考えられる。今回、P法で実施した際、正常胚が得られなかった牛が、他の方法に比べて多い傾向にあったが、過去に減量投与法で採卵し、良好な成績を得た牛では、P法で実施しても正常胚が得られている。したがって、P法を野外で応用する場合には、減量投与法で採卵し、良好な成績が得られた牛に応用するか、あるいは、神経質で頻回の注射が困難な牛に応用することが望まれる。

M法はC法に比べて低単位のFSH量で済むが、4日間投与という煩雑さがある。しかし、過排卵処置の目的は、より多くの正常胚を得ることであるから、C法に比べて、2.5個も多くの正常胚が得られたM法は、最も有効な方法であると考えられた。

## 【小括】

農家で飼養している和牛の経産牛139頭を用いて、過排卵処置を次の4方法、すなわち、C 法 (FSH 24 mgの3日間減量投与法)、M法 (FSH 20 mgの4日間減量投与法)、S法 (FSH 12 mgの3日間減量投与法)、P法 (FSH 30 mgとPVPの1回投与法)について実施し、さらに 各方法ともFSH投与後3日目にPG-AまたはPGF2αを投与して誘起された発情時期に人工授精を 施し、その後、7~8日目に非外科的に採卵して、採卵数、正常胚数、正常胚率を検討し、 次の成績を得た。

- 1. C法を対照群として各方法の採卵成績を比較すると、M法はC法と採卵数が同等であったが、正常胚数が8.3個と最も多く正常胚率も60.7%と高率であった。
- 2. S法は、採卵数および正常胚数は少ないが正常胚率は最も高く、P法は、逆に採卵数および正常胚数が最も高く正常胚率が最も低かった。
- 3. 以上の成績より、M法は正常胚数がその他の方法に比べて著しく高く、また、正常胚率 も高いことから、過排卵処理法として最も有効であることが明らかになった。

図 1 C法(FSH 24 mg、3 日間減量投与法)

日		FSH(mg)	PG-A(μg)
1	朝	5	
	タ	5	
2	朝	4	
	タ	4	
3	朝	3	500
	タ	3	

PG-A: PGF2 α 類縁物質

図 2 M法(FSH 20 mg、4日間減量投与法)

日		FSH(mg)	PG-A( $\mu$ g)orPGF2 $\alpha$ (mg)
1	朝	4	
	タ	4	
2	朝	3	
	タ	3	
3	朝	2	500 (20)
	タ	2	250 (15)
4	朝	1	
	夕	1	

PG-A または PGF2αを投与した

図 3 S法(FSH 12 mg、3 日間減量投与法)

日		FSH(mg)	PG-A(μg)
1	朝	3	_
	タ	3	
2	朝	2	
	タ	2	
3	朝	1	500
	タ	1	250

PG-A: PGF2 α 類縁物質

図 4 P法(FSH 30 mg、PVP1 回投与法)

日		FSH(mg)+PVP	PG-A(μg)
1	朝	30	
	タ	_	
2	朝	_	
	タ	_	
3	朝	_	500
	タ	_	

PG-A: PGF2α類縁物質

FSH 30 mg を 3 ml の生理食塩水で溶解しPVP 30%水溶液 10ml と混和して投与した

表 3 FSH 投与方法別の採卵成績

投与 法	頭数 (頭)	採卵数(個)	採卵数 0 個 (頭)	正常胚数 (個)	正常胚 0 個 (頭)	正常胚率 (%)
C 法	33	13.3±10.3*	2	5.8±7.2*	10	43.7
M 法	72	13.6±8.2	0	8.3±7.4	9	60.7
S 法	16	10.7±8.1	0	6.5±5.0	1	60.8
P法	18	15.3±11.8	2	6.2±9.6	9	40.2

\*: 平均士標準偏差

近年、子宮由来の黄体退行因子であるプロスタグランジンF2α (PGF2α) あるいは、その類縁物質が各種動物で開発され、この物質は牛の黄体機能を短期間に著しく退行させることで知られている。当初PGF2αは妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) の1回注射と共同で過排卵処置が行われ、採卵後6週間以上経過してから、次の過排卵処置を開始することにより、連続採卵が検討された[42, 127]。その後、卵胞刺激ホルモン製剤 (FSH) とPGF2αを用いて、採卵後2回以上発情を確認してから、次の過排卵処置を行っている [12,60]。しかし、このように連続採卵をした場合に採卵数や正常胚数が減少するという報告が多い [12,14,127,148]。金川 [74]は連続採卵する場合、①採卵間隔を70日以上に延長する、②PMSGとFSHを交互に使用する、③ホルモン剤を増量する、などの処置を行うと採卵成績の低下を防止すると述べている。しかし、野外において採卵間隔を延長することは、供胚牛の分娩間隔が延びるため農家に対する経済的負担も増える。そこで、短期間に2から3回採卵できれば、分娩間隔も極端に延長することなく、多くの移植可能胚が得られ、経済的にメリットが高まると考えられる。

本試験は、牛において人為的にFSHを投与して過排卵処置を施し、採卵直後にPGF2αを投与して、卵巣中に卵胞と共存する黄体を早期に退行させて、発情間隔を短縮し、連続して過排卵処置を誘起して採卵効率を高め得るか否かを検討した。

#### 【材料と方法】

供胚牛は黒毛和種(和牛)34頭とホルスタイン種乳牛(乳牛)8頭の合計42頭である。

過排卵処理には、卵胞刺激ホルモン製剤(FSH:アントリン;デンカ製薬)を用い、3日または4日間の減量投与法により実施した(図5、6)。4日間の減量投与法は、朝夕2回、4日間投与(1日目:5 mg, 2日目:4 mg, 3日目:3 mg, 4日目:2 mg, 全量 28 mg)し、3日間の減量投与法は最後の日を除いて、全量 24 mgのFSHを投与した。さらに卵巣中に卵胞と共存する黄体を早期に退行させるために、PGF2α(プロナルゴンF;アップジョン社)をFSH

の投与開始から3日目の朝に15 mg、夕方に10 mgを筋肉内に注射した。またはプロスタグランジン類縁物質(PGF2 $\alpha$ -A:エストラメイト;住友製薬)500  $\mu$ gをFSHの投与開始から3日目の朝に1回筋肉内注射し、発情を誘起した。なお、過排卵処置により誘起された発情をさらに促進するために、性腺刺激ホルモン放出ホルモン類縁物質(GnRH-A:コンセラール;武田薬品)100  $\mu$ gを全頭に筋肉内注射して、人工授精処置を施した。採卵は発情後7日目に、非外科的方法(第2章第1節参照)で実施した。連続採卵は、主として2回行い、一部については3回行った。初回の採卵終了直後に第1回目のPGF2 $\alpha$  25 mgを投与して、次回の発情が早期に回帰するようにした。

初回の採卵後10日前後には、新たに発情が回帰するので、この発情から9~14日前後の黄体期に2回目の過排卵処置を前回同様の方法で施した。また、2回目および3回目の採卵直後にはそれぞれ第2回および第3回のPGF2α処置を実施した。

統計処理は、t-検定および  $\chi^2$  検定により実施した。

## 【結果】

FSHの減量投与法による2回連続採卵成績を表4に示した。試験は和牛34頭と乳牛8頭を用いて実施した。和牛の採卵数は1回目14.3個、2回目12.8個で、正常胚数は1回目7.9個、2回目7.0個であった。1回目に比較して2回目の採卵数も正常胚数もわずかに減少の傾向を示した。乳牛の採卵数は、1回目は 10.5個、2回目は9.3個で、正常胚数は1回目8.0個、2回目6.0個であった。和牛と同様に1回目に比較して2回目の採卵数も正常胚数もわずかに減少の傾向にあった。採卵間隔は、和牛が33.1日で、乳牛が34.0日であった。

3回連続採卵成績を表5に示した。1回目、2回目および3回目の採卵数は、和牛では、14.7個、18.3個および14.0個と次第に減少したが、乳牛では2回目に最も減少した。正常胚数については、和牛および乳牛とも採卵回数の増加とともに減少する傾向が認められた。1回目と2回目の採卵間隔は和牛で平均29.0日および乳牛は38.5日、2回目と3回目の採卵間隔は、和牛で平均32.3日および乳牛は41.0日であった。

## 【考察】

一般に、過排卵処置に対する採卵結果は個体の年齢や、栄養状態等により差異が大きいことが知られている [28,61,62]。また、1頭当たりの採卵数は7.8個、正常胚数は4.3個と少ない [197]。従来、連続して採卵する場合には過排卵間隔を2~3カ月に長くしたり、FSHとP MSGを交互に使ったり、あるいは性腺刺激ホルモンを増量したりしなければ採卵数が減少すると云われている[74]。一方、過排卵処置開始時の卵巣に小卵胞が多数存在する牛ほど、過排卵処置に対する反応が良好であると云われている[152]。 著者らは、採卵後にPGF2aを投与して、投与後3~7日で発情を誘起した場合、卵巣には3~4個の卵胞が存在することを認め、この発情周期には小卵胞が多数存在することを認めている(未発表)。そこで、この発情周期に過排卵処置を行えば卵巣反応が良好になり、従来法よりも短期間に連続採卵が可能であるうと推察された。

青柳ら[5]は5頭の牛に対して過排卵処置による採卵後、1~4日目からProgesterone releasing intravaginal device (PRID)を14日間挿入しておき、挿入後12日目から2回目の 過排卵処置を行い、24~28日間隔で2回連続採卵を行っている。彼らはFSHとPMSGを用いて、1回目と2回目で、性腺刺激ホルモン剤を換えている。その結果、初回の正常胚数/回収卵数 (未受精卵+変性卵+正常胚)は平均で3.8/5.8であり、2回目のそれは1.2/2.6であった。しかし、本試験の採卵結果は同一ホルモン剤を用いて、約34日間隔で採卵したが、和牛では 初回の正常胚数/回収卵数は平均で7.9/14.3であり、2回目のそれは7.0/12.8、また乳牛では初回の正常胚数/回収卵数は平均で7.9/14.3であり、2回目のそれは6.0/9.3であった。この結果は2回目の採卵結果は1回目の採卵結果に比較してわずかに減少した程度であり、青柳ら[5]の報告よりも良好な採卵結果を得ている。しかし、本試験で3回目の採卵結果では、正常胚数が2回目よりも、さらに減少する牛が多かった。

Donaldson とPerry [42]は、2ヶ月程度の採卵間隔で10回まで連続採卵しても、採卵数および正常胚数は変わらないと述べており、Haslerら [60]は、同様にして10回の連続採卵で採卵数はあまり変わらないが、受精率および正常胚数は減少すると述べている。また、

Lubbadehら [92]は、採卵後 6 日目から過排卵処置をして連続採卵すると、2~3 回目の正常 胚数は有意に低下すると述べている。本試験の結果はLubbadehら [92]の報告よりも採卵間隔 は長いが、採卵成績が良好であったことから、本方法は従来法よりも短期間に連続採卵が可能であり、正常胚の効率的生産に有効であることが示唆された。

PGF2αの投与により分娩後3回連続して採卵すると、正常胚数が減少することから、分娩後の採卵は2回までとして、その後、供胚牛に人工授精を実施して妊娠させるのが、分娩間隔もあまり延長することなく、良好な採卵成績を得られることから効率的であると考える。また、供胚牛を長期間採卵しなければならない場合には、3回連続して採卵を行うよりは、2回連続採卵を2カ月程度の間隔で繰り返し行った方が採卵効率が良いと思われた。

## 【小括】

過排卵処置により牛胚を短期間に多数取得するために、採卵後の供胚牛にPGF2αあるいは、 その類縁物質を投与して、存在する黄体を早期に退行させ、発情を誘起し、この発情周期に 再び過排卵処置を施して連続採卵を実施し、次の成績を得た。

- 1. FSHの減量投与法により採卵を実施し、初回の採卵終了直後にPGF2αを投与した結果、10日前後には、新たに発情が回帰した。この発情から9~14日前後の黄体期に2回目の過排卵処置を前回同様の方法で施した結果、2回目の採卵数(12.8個)および正常胚数(7.0個)は1回目(14.3個および 7.9個)に比較して僅かに減少することを認めた。従来よりも短期間で、しかも採卵数や正常胚数が減少する割合も小さく、短期間で2回採卵が可能であることが認められた。
- 2. FSHの減量投与法により3回連続採卵を実施した結果、3回目の採卵数および正常胚数は 1回目および2回目に比較して大きく減少することを認めた。
- 3. 以上の成績より、初回の採卵終了直後にPGF2αを投与して、初回の採卵後10日前後に発現した発情から9~14日前後の黄体期に、2回目の過排卵処置を前回同様の方法で施して、連続採卵することは、牛胚の効率的生産に有効であることが明らかになった。

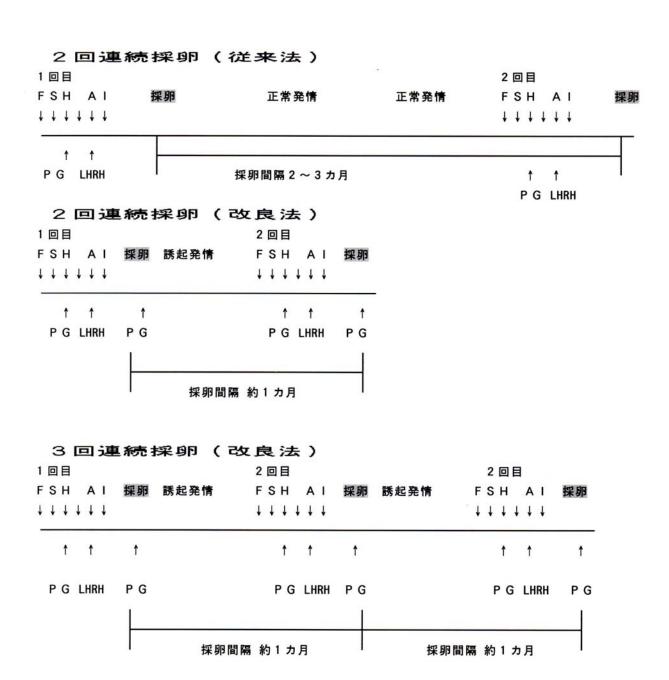


図5 連続採卵法の従来法と改良法の比較

時間	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
	FSH	FSH	FSH	FSH	
AM 9:00	5 mg	4 mg	3 mg	2 mg	
			$PGF2\alpha$		
			15 mg		
	FSH	FSH	FSH	FSH	GnRH-A
PM 4:30	5 mg	4 mg	3 mg	2 mg	100 μg
	0	0	PGF2α	5	人工授精
			10 mg		<b>71</b> -12-16
			0		

図6 FSHの減量投与法による過排卵処置方法

表 4 2 回連続採卵成績

品種	項 目	1 回目	2 回目
和牛	採卵数(個)	14.3	12.8
n=34	正常卵数(個)	7.9	7.0
	正常胚率(%)	55.2	54.7
	採卵間隔(日)	33.1	
乳牛	採卵数(個)	10.5	9.3
n=8	正常卵数(個)	8.0	6.0
	正常胚率(%)	76.2	64.5
	採卵間隔(日)*	34.0	

\*: 採卵日から次の採卵日までの日数

表 5 3 回連続採卵成績

品 種	項 目	1 回目	2 回目	3 回目
和牛	採卵数(個)	14.7	18.3	14.0
n=3	正常卵数(個)	5.3	3.7	1.0
	正常胚率(%)	36.1	20.2	7.1
	採卵間隔(日)	29.0	32.3	
乳牛	採卵数(個)	19.5	10.5	15.5
n=2	正常卵数(個)	13.0	8.0	6.5
	正常胚率(%)	66.7	76.2	41.9
	採卵間隔(日)*	38.5	41.0	

\*: 採卵日から次の採卵日までの日数

#### 第三節 過排卵処置時におけるGnRHの応用に関する検討

牛の正常発情周期において、血中エストラジール $17\beta$  ( $E_2$ )値は発情開始前 6 時間頃より急激に上昇し、発情開始 2 時間前より 4 時間後までの 6 時間の時間帯に最高値を示す。この発情前の $E_2$ 値の上昇に引き続き、発情 1 時間を経過するとLH値が劇的な急上昇を示し、発情開始から 4 ~ 5 時間の時間帯に最高値を保持した。このLHサージから排卵までの時間は約25時間であると云われている[41]。

牛において、プロスタグランジンF2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) およびその類縁物質 (PGF2 $\alpha$ -A) を投与して、発情同期化し人工授精を行う場合に、PGF2 $\alpha$ 投与後に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) およびその類縁物質 (GnRH-A) を投与することにより、受胎促進効果が高まることが知られている [37,64,75,85]。一般に、牛の過排卵処置における採卵成績には個体により大きな差異がある[22]が、その原因は、過排卵処置時の卵子と卵胞の成熟が不揃いであったり、排卵時期が不統一であったり、また排卵時の卵子の発育時期が不均一であることなどが挙げられている[39]。

従来より、採卵成績を改善するために、過排卵処置時にGnRHを投与する試みが数多くなされている[52,112,113,170,172,191,192]。しかし、その効果については、受精率が高まったという報告[52,191]や、採卵成績には差がなかったという報告[112,113170]、さらに未受精卵が増え、移植可能胚が減少したという報告[172]など、過排卵処置時にGnRHを投与した時のその効果については、研究者により様々である。

本試験では、黒毛和種(和牛)およびホルスタイン種乳牛(乳牛)において、卵胞刺激ホルモン(FSH)により過排卵処置を施した際のGnRH-Aの投与効果について、比較検討した。

## 【材料および方法】

供試牛は栃木県酪農試験場(酪試)または県内の和牛繁殖農家で飼養されている和牛83頭、

および酪試または県内酪農家で飼養されている乳牛100頭である。和牛の過排卵処置は第2章 第1項と同様に行い、FSHは3~4日間の減量投与法で投与量は20~28 mgとし、FSH投与開始 から3日目にクロプロステノール(PGF2 $\alpha$ -A; エストラメイト、住友製薬)500  $\mu$ gを1回、またはプロスタグランジンTHAM塩(PGF2 $\alpha$ ; プロナルゴンF、アップジョン社)15 mgおよび 10 mgを朝夕2回投与し、発情を誘起し、人工授精を2回行い、人工授精後7日目に採卵を行った。

乳牛の過排卵処置から採卵までの日程は和牛と同様に行ったが、体重や乳量を勘案して FSHの投与量は24~56 mgとし、PGF2 $\alpha$ -Aは500~750  $\mu$ g、およびPGF2 $\alpha$  は 25~40 mgとした。

供試牛の第1回目の人工授精時に、酢酸フェルチレリン(GnRH-A; コンセラール注射液、武田薬品)100  $\mu$ gを和牛16頭、乳牛 7頭に、200  $\mu$ gを和牛20頭、乳牛30頭に、それぞれ投与した。また、対照群とした和牛47頭、乳牛63頭には GnRH-Aは投与しなかった。

供試牛について、採卵数、正常胚数、および正常胚率(採卵数に占める正常胚数の占める 割合)について検査した。

## 【結果】

和牛のGnRH-AおよびFSHの投与量別の比較を表6に示した。GnRH-A無投与群の場合、FSH 20 mg区が24および28 mg区に比較して、採卵数および正常胚数ともに最も高かった。正常胚率においては各区間に差は認められなかった。

GnRH-A 100 μg投与群においては、FSH 24 mg区が採卵数および正常胚数はともに高く、また正常胚率も高い傾向にあったが、28 mg区では各区間に差は認められなかった。

GnRH-A 200  $\mu$ g投与群においては、FSH 24 mg区が28 mg区に比較して採卵数は高かったが、正常胚数ではほぼ同様であったので、正常胚率では、FSH 24 mg区が低かった。GnRH-A 0  $\mu$ g、

100  $\mu$ gおよび200  $\mu$ gともFSH 24または28 mgで過排卵処置を施した牛だけで比較した成績は表8に示した。GnRH-A 200  $\mu$ g投与群が採卵数が最も高かったが、各群において正常胚数はほぼ同様であり、正常胚率はGnRH-A 100  $\mu$ g投与群が高い傾向にあった。

乳牛のGnRH-AおよびFSHの投与量別の比較を表 7に示した。GnRH-A無投与群では、FSH 36 ~56 mgが採卵数および正常胚数とも高い傾向を示した。正常胚率ではFSH 36 mgが最も高かった。GnRH-Aを100  $\mu$ gおよび200  $\mu$ g投与群とも、正常胚数が高くなり正常胚率も高くなる傾向を示した。FSH28~56 mgで過排卵処置をした牛だけを比較した成績を表 9に示した。採卵数および正常胚数ともGnRH-Aを100  $\mu$ g投与した場合が高く、正常胚率も高い傾向を示した。

#### 【考察】

和牛のGnRH-A無投与群においては、FSH 20 mgが採卵数および正常胚数ともに最も高かった。 これは第2章第1節の成績とほぼ同様の結果であった。乳牛におけるFSHの投与量と採卵成績 の関係では、一定の傾向は認められなかった。元来、供胚牛である乳牛には高泌乳牛を使用 することが多いが、著者らが高泌乳牛に過排卵処置を施した場合、乳量に応じてFSHの投与量 を増量しているが、その効果は明瞭ではなかった。金川[74]が示すように乳量が採卵成績に どの程度影響を及ぼすかは今後の検討課題である。

和牛でGnRH-A無投与群においては、FSH20 mgで過排卵処置をした時場合、採卵数および正常胚数とも最も高かったが、表8に示すように、FSH24または28 mgで過排卵処置をした和牛だけで比較すると、採卵数ではGnRH-A 200 $\mu$ g投与群が、高い傾向にあった。

また、乳牛においても、GnRH-A投与群において、採卵数が増加する傾向が認められた。

本試験の成績は、PGF2α投与後54時間目にGnRH-Aを投与した方が、48時間目にGnRH-Aを投与するよりも、採卵数が多かったとするFooteら [49]の報告と一致する。GnRH-Aの投与時期について、Vossら [170]はPGF2α投与後36時間目と60時間目の2回投与と、PGF2α投与後60時間目の1回投与を比較して、有意差はないが、PGF2α投与後60時間目の1回投与が、2回投与や、対照群に比べて回収胚数が高いと述べている。また、Prado Delgadoら [113]は、発情発見時にGnRH 200 μgを投与しても採卵成績には差が認められなかったと述べている。以上のことから、GnRH-Aの投与時期はPGF2α投与後54~60時間目が良いと考えられる。しかも、PGF2α投与後54時間目は、通常の過排卵処置を行った場合、1回目の人工授精の時間帯に当たり省力化

も図れることから、GnRH-Aの投与時期として、最も優れていると考えられる。

和牛のGnRH-A 100 μg投与群には、採卵数が増加する傾向が認められなかったが、この理由については次の2つが考えられる。1つは、Heuwieserら [64]が、分娩後の乳牛にGnRH-A 100 μgを投与した場合、その時の産歴や、ボデーコンデションスコアーによって、GnRH-A 投与の効果が認められないことである。すなわち、2産以上の牛や、ボディーコンデションスコアーが3以上の牛では、受胎率の向上が認められ、過排卵処置時においても供胚牛のボディーコンデションスコアーを3以上にすることにより、採卵成績が向上すると推察されている。2つ目として、GnRH-A投与時の優勢卵胞の状態によりGnRH-Aに対する卵巣の反応が異なることである[143]。また、過排卵処置開始時に優勢卵胞がなければ、採卵数および正常胚数が増加すると云われている[69]。 本試験では、過排卵処置開始時期が発情後9~14日と幅があり、この時期の優勢卵胞の有無については、今後検討する必要がある。

熊倉ら[85]は、乳牛にPGF2 $\alpha$ 投与後54時間目にGnRH-A 25~200  $\mu$ gを投与し、人工授精後の 受胎成績を比較して、25または50  $\mu$ gが効果的であると述べている。過排卵処置時においても、 Footeら[52]はGnRH-A 8  $\mu$ gで受精率が高くなり、Prado Delgadoら[113]は、GnRH-A 200  $\mu$ gを投与しても、採卵成績に影響なかったとしている。 本試験では、乳牛におけるGnRH-A の投与で100  $\mu$ gが採卵数、正常胚数および正常胚率とも最も高い傾向にあった。また、和牛では、正常胚数はGnRH-Aの投与量による差異は認められなかったが、正常胚率ではGnRH-A 100  $\mu$ gが高い傾向を示した。過排卵処置の目的はいかに多くの正常胚を得るかである。乳牛では正常胚数および正常胚率とも最も高かったGnRH-A 100  $\mu$ g投与が、和牛においても正常胚率が高い傾向にあったGnRH-A 100  $\mu$ g投与が、最も効果的であると考えられる。

#### 【小括】

和牛および乳牛において、FSHにより過排卵処置を施した時のGnRH-Aの投与効果について検討し、次の成績を得た。

1. 和牛のGnRH-A無投与群ではFSH 20 mg区が採卵数および正常胚数とも最も高かった。

- 2. 乳牛におけるFSHの投与量と採卵成績の関係では、一定の傾向は認められなかった。
- 3. 過排卵処置時におけるGnRH-Aの投与時期は、PGF2α投与後54~60時間が最適の投与時間帯であることが認められた。
- 4. 和牛および乳牛の過排卵処置におけるGnRH-Aの投与量は $100~\mu g$ が、最も効果的であることが認められた。

表 6 和牛の GnRH-A および FSH の投与量別の比較

GnRH	FSH	採卵頭数		採卵数	正常胚数	正常胚率
μg	mg	Ţ	頭	個	個	%
0	20		9	21.7	14.9	68.7
	24	2	21	10.8	7.1	65.7
	28	1	17	7.3	5.0	68.5
100	24		4	10.3	7.8	75.7
	28	1	12	7.8	5.3	67.9
200	24		11	14.5	6.1	42.1
	28		9	8.0	6.3	78.8
						,

表 7 乳牛の GnRH-A および FSH の投与量別の比較

GnRH	FSH	採卵頭数		採卵数	正常胚数	正常胚率
μg	mg	Ē	頭	個	個	%
0	24		9	3.7	2.1	56.8
	28	2	26	8.5	4.6	54.1
	30		3	4.3	2.0	46.5
	36		5	11.4	9.0	78.9
	44	1	17	7.9	5.9	74.7
	56		3	15.0	7.7	51.3
100	28		4	11.3	8.0	70.8
	40		3	10.0	9.7	97.0
200	24		6	6.7	3.8	56.7
	28	2	23	9.1	6.1	67.0
	56		1	13.0	12.0	92.3

表 8 和牛における GnRH-A の投与量別の比較

GnRH	採卵頭数	採卵数	正常胚数	正常胚率
μg	頭	個	個	%
0	38	9.2	6.2	67.4
100	16	8.4	5.9	70.2
200	20	11.6	6.2	53.4

注: 各群とも FSH の投与量が 24-28 mg のものだけを集計した

表 9 乳牛における GnRH-A の投与量別の比較

GnRH	採卵頭数	採卵数	正常胚数	正常胚率
μg	頭	個	個	%
0	63	8.0	5.0	62.5
100	7	10.7	8.8	82.2
200	30	8.7	5.8	66.7

注:各群とも FSH の投与量が 24-56 mg のものだけを集計した

牛の胚移植による効率的な産子生産のためには、移植に用いる胚の確保が重要である。そのために、過排卵処理を行った供胚牛から効率的に胚を得ることが必要であるが、過排卵処理を行った供胚牛の採胚成績は個体差が大きいことが知られている[7,60]。ホルスタイン種雌牛に過排卵処理を行った場合、4個以上の正常胚が得られた牛の割合は未経産牛においては血清総コレステロール値が90 mg/dl以上のものが、経産牛においては130 mg/dl以上のものが、それ以下の牛と比較して有意に高く[87]、さらに交雑種経産牛では血清総コレステロール値が140 mg/dl以上の牛において採胚数および移植可能胚数が有意に多くなることが報告されている[9]。これらのことは、採胚成績を向上させるためには、供胚牛の脂質代謝を改善する必要があることを示している[97]。しかしながら、一方では、交雑種未経産牛において、低栄養状態で過排卵処理を行った場合、採胚数に影響は認められず、さらに採胚後の胚培養において、胚盤胞発育率および胚盤胞期胚の総細胞数の増加が認められることが報告されている[103]。このように供胚牛の血液成分や栄養状態と採胚成績の関係にはさまざまな知見が存在し、未だ不明な点が多い。

閉鎖卵胞を有する牛では血漿中ビタミンA(VA)が低く、逆に発育中の卵胞を有する牛では高いことから、VAが優勢卵胞の発育調整因子の1つである可能性がある[130]。また、黄体組織中の $\beta$ -カロテン(BC)、ビタミンE(VE)およびVA濃度は黄体の発育ステージに伴い、増減することから黄体機能調節に関与すると考えられている[131]。また、卵巣のう腫を発症した牛では、非発症牛と比較して、血漿BC濃度が有意に低いことが報告されている[70]。上記したように、血中ビタミン濃度は雌牛の卵巣機能に影響を及ぼすことが明らかであるが、血中ビタミン濃度が過排卵処理後の採胚成績に及ぼす影響については明らかではない。

現在、供胚牛の過排卵処理を開始するか否かの判断は、直腸検査あるいは超音波診断による黄体の大きさや硬度、すなわち黄体の形態的特徴を基準に行われている場合が多い。しか

し、この方法は、判断基準が明瞭でなく、また、過排卵処理後の採胚成績にバラツキも多く 認められる。過排卵処理前の供胚牛の血漿ビタミン濃度を測定するにより、採胚成績が予測 できれば過排卵処理を行う牛の選定が可能となり、さらに血漿ビタミン濃度を指標とした供 胚牛の給与飼料の改善が可能となる。

そこで本研究は、血漿BC濃度と過排卵処理後の採胚成績の関係を明らかにすることを目的として黒毛和種供胚牛の血漿BC濃度と採胚成績、およびBC含有飼料給与による血漿BC濃度の変化と採胚成績について調べた。

## 【材料と方法】

実験1: 黒毛和種雌牛延べ118頭を供胚牛として用いた。過排卵処理は卵胞刺激ホルモン (FSH;アントリンR10,川崎三鷹製薬) 28mgを1日2回の頻度で4日間(5, 5, 4, 4, 3, 3, 2および2mg)の減量投与を行い、FSH投与開始後3日目にプロスタグランディンF2α (PGF2α;プロナルゴンF、ファイザー製薬) 25mgを朝夕2回 (15mgおよび10mg) に分けて投与し、発情を誘起した。2回目のPGF2α投与から48時間目に人工授精した。胚の採取は人工授精後7日目に非外科的方法を用いて行った。回収した胚は実体顕微鏡下で形態的指標によりに正常胚、未受精卵および変性胚に分類した。また、正常胚はKanagawa[74]の分類に従って、AからCまでランク付けを行った。採胚直後にヘパリン添加真空採血管にて、尾静脈あるいは尾動脈から採血し、血漿を分離した。得られた血漿は測定まで-20℃で保存した。血漿の前処理は、褐色遠心管に血漿0.5 mlを入れ、蒸留水0.5 mlおよびジブチルヒドロキシトルエン加エタノール1 mlを加え混和後、ノルマルヘキサン5 mlを加えて激しく振とうし、遠心分離した。遠心分離後ノルマルヘキサン層4 mlを別の褐色遠心管に取り、エバポレーターにて溶媒を減圧留去し、速やかに室温まで冷却した。得られた成分をメタノール:クロロホルム (7:3) 3 00 μlにて溶解し、20 μlを高速液体クロマトグラフィー (HPLC、日本分光LC-800システム) に注入し、VA、VEおよびBCを測定した。

実験2:黒毛和種初産牛延べ20頭および同経産牛延べ22頭を用いて、VA(5万IU/50g),VE(1000mg/50g)およびBC(300mg/50g)を含有する混合飼料(BBSP,ベータブリードSP,日本全薬工業)の給与の採胚成績におよぼす影響について検討した。BBSPを無給与で飼養した初産牛を、分娩後1回採胚した。採胚翌日からBBSPを50または100g/日給与し、再度採胚した。初産牛におけるBBSP 50g給与区の採胚間隔は平均60.8日、100g給与区の採胚間隔は平均62.3日であり、この期間がBBSPの給与期間である。経産牛ではBBSPを50g/日の割合で約1ヶ月間給与し、採胚した。その後さらに継続して50g/日または100g/日の割合でBBSPを給与し、2回目の採胚を実施した。1度目の採胚から2度目の採胚を行った間隔は50g給与区で平均56.0日、100g給与区で平均62.3日である。採胚後にヘパリン添加真空採血管で採血し全血0.4 mlをi-EXチューブ(DSM ニュートリションジャパック)に注入し約10秒間、振とう混和し、上清が分離するまで静置し、BC簡易測定キット、i-check(DSM ニュートリションジャパック)を用いて、血漿BC濃度を測定した。全血0.4 mlを抽出液である、する。下後i-checkにて血漿BC濃度を測定した。i-EXチューブに全血を注入してから血漿BC濃度測定終了までの所要時間は5~10分である。

実験1および2で得られたデータの統計処理はピアソンの相関係数の検定を用いて行った。

#### 【結果】

実験1: 延べ118頭の採胚数は11.4±10.2個(平均±標準偏差)で、そのうち正常胚数は5.6±6.4個、正常胚率は39.3±36.5%であった。供胚牛の血漿VA、VE,およびBC濃度はそれぞれ77.8±18.1 IU/dI、166.6±93.4 μg/dI および88.6±68.7 μg/dI であった。表10に示したように、血漿BC濃度と正常胚数(r=0.193)および正常胚率(r=0.202) の間にそれぞれ有意 (P<0.05) な相関が認められた。さらに、血漿BC濃度と血漿VA(r=0.238)および血漿VE(r=0.506) の間にそれぞれ有意 (P<0.01) な相関が認められた(表11)。

実験2:初産牛においてはBBSPの50 g/日および100 g/日給与により血漿BC濃度を有意(P<0.0

5)に上昇させることができたものの、採胚数および正常胚数に給与前後における差は認められなかった(図 7)。経産牛においては1度目の採胚以降にも、BBSPを50 g/日および100 g /日の割合で継続給与することにより、1度目の採胚後結晶BC濃度と比較して2度目の採胚時の血漿BC濃度が高くなる傾向にあった。また、有意な差は認められないものの、50 g/日および100 g/日給与区ともに2度目の採胚時において採取された正常胚のうちAランクと判定された胚の割合が1度目の採胚時と比較して高くなる傾向にあった(図 8)。

### 【考察】

本研究では、黒毛和種供胚牛の採胚時血漿BC濃度と正常胚数および正常胚率に有意な相関が認められた。Sales ら[126]はホルスタイン種の経産牛過排卵処理による採胚成績は、供胚牛にプロゲステロン製剤を留置した日および留置から5日目(過排卵処理開始日)にBC (800または1200 mg) とVE (500または750 mg) を2回注射することにより、採胚数が増加する傾向を示し、さらに正常胚数も有意に増加すると報告している。その理由として、Sales ら[126]はBCとVEの抗酸化作用による胚の品質改善を示唆しており、本試験においても、血漿BC濃度と血中VE濃度は正の相関を示したことから、両者が抗酸化に作用し、正常胚数が増加したことが考えられる。

Shaw ら[135]は過排卵処理の1日目に100万単位のVAを注射することにより正常胚数が増加すると報告している。また、卵胞の発育にともない、卵胞液中VA濃度が増加することから、卵胞液中のVAと卵胞発育には重要な相関があると考えられている[129]。一方、BCはVAの前駆物質として卵胞発育に寄与していると考えられており[129]、本研究においても血漿BC濃度と回収した正常胚数の正の相関が認められたことから、BCが卵胞発育や卵子の質的向上に寄与している可能性が考えられる。

本研究により供胚牛の血漿BC濃度と採胚成績の関係が明らかとなり、過排卵処理を利用した採胚において、これまで供胚牛の選別の際に用いられてきた黄体の形態的な指標に加えて、供胚牛の血液成分値という新たな指標が導入できる可能性が示された。しかしながら、今回

の研究は採胚時における血液成分の解析を行っているため、今後の課題として過排卵処理開始時の血液成分との比較解析や採胚成績との関連を調べることが必要であろう。今回用いたBC簡易測定キット(i-check)は採血してから5~10分の短時間に、全血のまま処理して血漿BC濃度が測定でき、臨床現場における血液成分解析に有用であり、本研究結果から血漿BC濃度と血漿VAおよびVE濃度の間に有意な相関が認められたことから、血漿BC濃度を測定することにより、これらのビタミンの充足状況を簡易的にある程度を推測することも可能であると思われた。

上記したように、ホルスタイン種供胚牛にBCとVEを給与すると、経産牛では正常胚数が有意に増加するが、逆に未経産牛では有意に減少することが報告されている[126]。本研究においても初産牛ではBBSPの給与により血漿BC濃度は有意に上昇したが、正常胚数は増加しなかった。一方、経産牛ではBBSPの継続給与により血漿BC濃度が高くなる傾向がありAランク胚の割合が向上した。未経産牛において、血漿BC濃度上昇と採胚成績に関連が認められなかった原因として、未経産牛などの若い牛は血漿BC濃度と卵胞の発育性の関係が経産牛と異なる可能性や、未経産牛は経産牛よりも血漿BC濃度が低いレベルでも卵胞を発育に作用する可能性が考えられる。

BC低含有飼料をホルスタイン種乳牛に給与し、卵巣のう腫を誘起させた場合、血漿BC濃度は有意に低下するが、VAには有意な差が認められないことが報告されている[70]。一方分娩前の乳牛に過剰なBCを給与し、血漿のBC濃度が3.9mg/L~6.5mg/Lと高い水準に維持したところ受胎率が低下することが明らかになっている[51]。本研究においても、黒毛和種供胚牛の血漿BC濃度と採胚数および正常胚率が正の相関を示したことから、黒毛和種牛においてもBCが繁殖性に関与することは明らかである。過排卵処理を利用した採胚において供胚牛の最適な血漿BC濃度については不明であり、さらに検討を要するものの、BCをはじめとしたビタミン類の至適給与など供胚牛への給与飼料の改善により、採胚成績の向上が可能となると思われる。

# 【小括】

過排卵処理を行った黒毛和種雌牛の採胚時における血漿β - カロテン(BC)濃度と採胚成績の関係を調べ、さらに、黒毛和種初産牛および経産牛を用いて、VA、VEおよびBCを含有する混合飼料(BBSP)を給与した場合の血漿成分と採胚成績を検討し、次の成績を得た。

- 1. 血漿BC濃度と正常胚数 (r=0.193) および正常胚率 (r=0.202) の間にそれぞれ有意 (P<0.05) な相関が認められた。
- 2. 血漿BC濃度と血漿VA(r=0.238)および血漿VE(r=0.506) の間にそれぞれ有意(P<0.01)な相関が認められた
- 3. 初産牛においてはBBSPの50 g/日および100 g/日給与により血漿BC濃度を有意(P<0.05) に上昇させることができたものの、採胚数および正常胚数に給与前後における差は認められなかった
- 4. 経産牛においては、BBSP給与により血漿BC濃度が高くなるとともに、正常胚およびAランク胚率が高くなる傾向を示した。

表10 血漿BC濃度と採胚成績の関係

項目	相関係数( r )	P値
採胚数	0. 143	ns
正常胚数	0. 193	0. 05
正常胚率	0. 202	0. 05

表11 血漿BC濃度とビタミンの関係

項目	相関係数(r)	P値
ビタミンA	0. 238	0. 01
ビタミンE	0. 506	0. 01

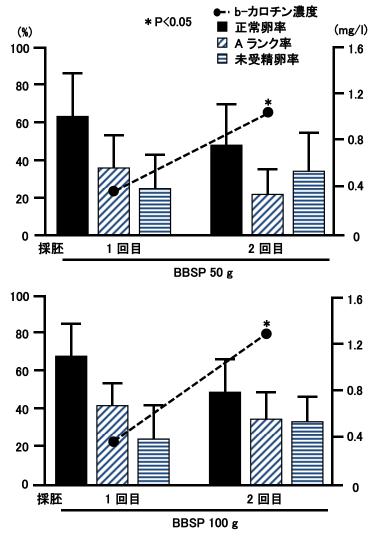


図7 初産牛の採胚成績

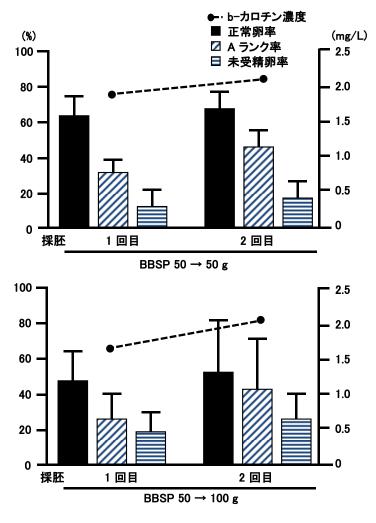


図8 経産牛の採胚成績

## 第三章 牛における凍結保存に関する研究

## 緒言

家畜の凍結保存は、初期胚を超低温下(-196℃)の液体窒素(LN2)中で凍結し、発生を停止することで、長期間に亘り生命を維持した後に、融解して元の状態に復することである。この技術はイギリスのWhittinghamら[177]がマウス胚を対象として、また、Wilmutと Rowson [188]が牛胚を対象として初めて成功した。当初この方法は「緩慢凍結法」と呼ばれ、胚子の基本液にDMSO(Dimethyl sulfoxide)を耐凍剤として加え、胚子をこれに平衡してLN2中に投入した。この方法は数時間を要するため、その後、Bilton[18]は耐凍剤としてグリセリンを加え、室温から植氷までを-1.0℃/分にして、植氷後、 -30~36℃までを-0.3℃/分で冷却した後、LN2中に投入する方法に改良した。この方法は「急速凍結法」と呼ばれ、現在でも、凍結保存法の基本をなしている。

この方法は、さらに酪農家の需要に応えて、「1段階凍結法」[88,152]に改良された。また、最近、凍結保存技術は一段と進歩して、「直接移植法」がMassipら[93]およびDouchiら [46]により改良された。現在、牛[188]、馬[194]、めん羊[179]、山羊[16]などの家畜を始め、ウサギ[10]、ラット[178]、マウス[177]などの実験動物およびヒト[162]、ヒヒ[111]などの 霊長類において凍結保存が可能になっている。

わが国における凍結胚による受胎率は、胚移植においては45%前後と云われ、さらに核移植においては15%前後と云われている(第四章および第五章)。新鮮胚移植における受胎率と比べて、凍結胚移植は約10%、核移植胚移植においては約30%減少することを意味する。近年、牛の凍結保存胚の需要は著しく拡大しているが、今後は胚移植だけでなく核移植においても凍結胚が増加することが望まれている。

## 第一節 凍結胚の融解温度と透明帯の損傷に関する検討

凍結胚移植における受胎率低下の原因を追求することは、胚移植のみならず、核移植においても重要である。なかでも凍結融解過程に発現する胚子の透明帯の損傷は、細胞質への障害を誘起する重要な要因である。従来、変性卵および胚子の透明帯の損傷については幾つかの報告[15,54,96,111,161,162]があるが、透明帯の損傷に基づく受胎率低下の実態を調べた報告は数少ない[79,180]。

本試験では、凍結および融解温度の違いと透明帯損傷の関係、さらに透明帯の損傷の有無と受胎率の関係について検討した。

#### 【材料と方法】

### 1. 供試胚の作出

供試牛は黄体期の9~14日目に卵胞刺激ホルモン(FSH:アントリン、デンカ製薬)を朝夕2回、3~4日間、漸減的に投与し、総計24~36 mgを投与した。プロスタグランジンF2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ :プロナルゴンF、アップジョン社)をFSH投与開始から3日目の朝夕にそれぞれ15 mgおよび10 mgを投与し、発情を誘起した。発情時に人工授精を施し、その後7日目に非外科的に胚子の回収を行った。ホルスタイン種5頭および黒毛和種10頭から回収した胚子のうち金川[74]の方法に従い、優秀胚(A)、優良胚(B)および普通胚(C)と判定した正常胚8 9個を供試胚とした。

## 2. 凍結機器

胚子の凍結に用いた機器は2種類で、その内1種類はLN2を冷媒とするプログラムフリーザー、R204(プラナー社)で、この機器はストローを垂直に保持した(図9)。他の1種類はメタノールを冷媒とするプログラムフリーザー、ET-1(富士平工業)で、この機器はストローを水平に保持した(図10)。

## 3. 凍結曲線

耐凍剤として20%子牛血清(CS)加修正PBS(以下、PBS、図11参照)に1.36 Mグリセリンを添加した。この液に胚子をNiemann [101]の方法に準じて、1 段階で投入して、10分以上平衡した後、0.25 mlのストロー(富士平工業)に吸引後凍結を開始した。胚子の凍結 Bilton [18]の変法の凍結曲線に準じて行った。室温から-6°Cまでを-1°C/分とし、-6°Cで10分間保持(この間に植氷)し、-6°Cから-32°Cまでを-0.5°C/分とし、-32°Cで10分間保持して、-32°CからLN2に投入した(図 4)。

### 4. 融解温度の違いと透明帯の損傷

正常胚89個をプログラムフリーザーで凍結した。融解方法は0.25 mlのストローを空気中で 10秒間保持した後、25°C(25°C区)、あるいは37°C(37°C区)の温水に投入した(図12)。耐凍剤の除去はTakedaら[161]の方法に準じて、ショ糖を用いた3段階法(Stepwise法)により 行った(図13)。①~③の液に各5分間ずつ浸漬した後、④液で3回洗浄した。

### 5. 凍結胚の観察

凍結胚の観察は400倍の倒立顕微鏡下で、凍結前後の透明帯の亀裂や一部の欠損などの透明帯の損傷の有無を調べた。なお、これら凍結に供したすべての胚子は、凍結前には、透明帯の亀裂や一部欠損などは全く認められず正常であった。

# 6. 胚子の移植

凍結融解後も金川[74]の方法に従い、優秀胚(A)、優良胚(B)および普通胚(C)と判定し、正常胚83個をPBSとともに0.25 mlストローに1個または2個ずつ吸引し、横穴式移植器(富士平工業)を用いて、ホルスタイン種の受胚牛73頭に子宮頸管経由法により移植した。移植後50日頃に直腸検査法により妊娠診断した。なお、6個は融解後不良胚(D)と判定し、移植には供試しなかった。

# 7. 統計処理

統計処理は $\chi^2$ 検定法により実施した。

### 【結果】

融解後の透明帯の損傷率は、ストローを垂直保持で凍結した場合、融解温度25℃区で10.0%

(2/20)、37℃区で31.8% (7/22)であった。ストローを水平保持で凍結した場合、融解温度 25℃区で13.0% (3/23)、37℃区で33.3% (8/24)であった。融解温度別に比較すると、透明帯の損傷率は25℃区と37℃区で、それぞれ11.6% (5/43)および32.6% (15/46)で、両者の間には 5%水準で有意差が認められた。ストローの垂直保持(21.4%)および水平保持(23.4%)の間では、融解後の透明帯の損傷率には有意差は認められなかった(表12)。

ストローを垂直保持で凍結した場合、融解温度25°C区の受胎率は35.3% (6/17)、37°C区は15.8% (3/19)で、25°C区が高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。ストローを水平保持で凍結した場合、融解温度25°C区の受胎率は57.9% (11/19)、37°C区は44.4% (8/18)で、25°C区が高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。両者を含めると、25°C区と37°C区で、それぞれ47.2% (17/36)と29.7% (11/37)で、融解温度25°C区で約 20%高い受胎率であったが、両者の間には有意差は認められなかった。ストローの垂直保持および水平保持の間の受胎率を比較すると、25.0% (9/36)と51.4% (19/37)であり、水平保持の方が有意に高い受胎率であった (P<0.05.表13)。

融解温度と透明帯の損傷の違いによる移植後の受胎率を比較した(表14)。透明帯の損傷がある場合、融解温度25℃区の受胎率は75.0%(3/4)、37℃区は40.0%(4/10)で、25℃区が高い傾向にあった。透明帯の損傷がない場合、融解温度25 ℃区の受胎率は43.8%(14/32)、37℃区は25.9%(7/27)で、同様に25℃区が高い傾向にあった。透明帯の損傷の有無にかかわらず25℃で融解した方が受胎率は高い傾向が認められた。

## 【考察】

ストローの垂直保持と水平保持の間では、融解後の透明帯の損傷の割合には有意差は認められなかった。武田 [162]は胚子がストロー内で空気層に接触すると、ストローの垂直保持では透明帯の損傷が多いと述べている。 Bielanskiら[15]は、胚子が空気層に接触しないよう胚子が液相の中央部に存在するようにして凍結した場合、ストローの垂直保持と水平保持の間で透明帯の損傷率に有意差を認めていない。本試験ではBielanskiら[15]と同様の操作を

行わなかったにもかかわらず、ストローの保持状態の違いによる融解後の透明帯の損傷の割合には有意差は認められなかった。また、中原ら[96]も同様の結果を得ている。透明帯の損傷の割合を融解温度別に比較すると、25℃区と37℃区で、それぞれ11.6%(5/43)と 33.3%(15/46)で、両者の間には5%水準で有意差を認めている。RallとMeyer[118]の報告および Takedaら[161]のグリセリンを耐凍剤とした場合の成績と同様に、低い温度で融解した方が透明帯の損傷が少ない結果となった。ストローの垂直保持と水平保持による受胎率を比較すると、それぞれ25.0%(9/36)と51.4%(19/37)であり、水平の方が有意に高い受胎率であった (P<0.05)。

ストローの垂直保持と水平保持において透明帯の損傷には差が認められないのに、受胎率には有意差が認められた。これは胚子が空気層に接すると、凍結の際に、胚子が耐凍剤に充分包まれていないために脱水が行われ難く、透明帯には損傷をあまり与えないが、細胞自体には損傷を与えたためと推察された。

融解温度別に受胎率を比較すると、透明帯の損傷の有無にかかわらず25℃で融解した方が 受胎率は高い傾向が認められた。透明帯の損傷など外見的な変化以外にも、凍結融解後の胚 は損傷を受けていると推察される。その損傷が25℃で融解した場合には、軽度であるために 受胎率も高かったと推察される。これに関連して、凍結胚を空気中(室温)ですべて融解し た方が、透明帯の損傷が少ないという報告[118, 161]がある。これは、凍結胚を融解する時の 上昇温度の速度の違いによると推察されるが、この融解胚を移植した成績は報告されていな いので、詳細は不明である。

武田[162]は、LN2に投入するまでの冷却中に、約3%の卵子に透明帯の損傷が発生すると述べている。また、Franksら[54]は、凍結融解直後と耐凍剤除去後では、透明帯の損傷に有意差は生じないという。さらに、Hrunska[68]は凍結期間の長さは凍結融解後の生存率や受胎率に影響しないという。従って、ストローの垂直保持と水平保持を比較すると、水平の方が有意に高い受胎率であったことから、LN2に投入されるまでの凍結過程および透明帯の損傷の割合は $25^{\circ}$ C区が有意に低く、透明帯の損傷の有無にかかわらず、 $25^{\circ}$ Cで融解した方が受胎率

は高い結果が得られたことから、融解過程の温度変化が、透明帯の損傷および受胎率にも影響しているこが明らかになった。

透明帯が損傷を受けていない完全な状態であれば、殆どのウイルスや細菌感染を防ぐことが可能であると報告されている[1,30,137]ことから、透明帯が完全であれば、胚移植による細菌等の伝播を防止することができ、防疫上も有益であり、移植後の胚子の早期死滅や流産の発生の減少にも有益であると考えられる。

以上のことから、ストローを水平に保持して凍結し、融解は空気中(室温)で10秒間保持後、25°Cの温水に投入する方法が、透明帯の損傷も少なく、受胎率も高いことが明らかになった。

## 【小括】

凍結および融解温度の違いと透明帯損傷の関係、さらに透明帯の損傷の有無と受胎率の関係について検討し、次の成績を得た。

- 1. 融解温度別に比較すると、透明帯の損傷率は25°C区と37°C区で、それぞれ11.6%(5/43) および32.6%(15/46)で、両者の間には5%水準で有意差が認められた。
- 2. ストローの垂直保持(21.4%)および水平保持(23.4%)の間では、融解後の透明帯の損傷率には有意差は認められなかった。
- 3. 25°C区と37°C区で、それぞれ47. 2% (17/36)と29. 7% (11/37)で、融解温度25°C区で約20% 高い受胎率であったが、両者の間では有意差は認められなかった。
- 4. ストローの垂直保持および水平保持の間の受胎率を比較すると、25.0% (9/36)と51.4% (19/37)であり、水平保持の方が有意に高い受胎率であった(P<0.05)。
- 5. 以上のことから、ストローを水平に保持して凍結し、融解は空気中(室温)で10秒間保持後、25°Cの温水に投入する方法が、透明帯の損傷も少なく、受胎率も高いことが明らかとなった。

表1 プログラムフリーザー内でのストロー保持方法と 融解温度の違いによる透明帯の損傷率の比較

融解温度	ストロー保持方法 言		計
	垂直	水平	
25°C	2/201)	3/23	5/43
	(10.0)2)	(13.0)	(11.6)a
37°C	7/22	8/24	15/46
	(31.8)	(33.3)	(32.6)b
計	9/42	11/47	20/89
	(21.4)	(23.4)	(22.5)

1) : 透明帯が損傷した胚数/融解した胚数

2) : 透明帯が損傷した割合(%) a,b: 異符号間に有意差あり(P<0.05)

表 2 プログラムフリーザー内でのストロー保持方法と 融解温度の違いによる牛胚の移植成績

融解温度	ストロー保持方法		ストロー保持方法		計	
	垂直	水平				
25°C	6/171)	11/19	17/36			
	(35.3)2)	(57.9)	(47.2)			
37°C	3/19	8/18	11/37			
	(15.8)	(44.4)	(29.7)			
計	9/36	19/37	28/73			
	(25.0)a	(51.4)b	(38.4)			

1) : 受胎頭数/移植頭数

2) : 受胎率(%)

a,b: 異符号間に有意差あり(P<0.05)

表 3 融解温度と透明帯の損傷の違いによる 牛胚の移植成績

透明帯の	融解温度	受胎率		計
損傷		1胚移植	2胚移植	
有	25°C	1/21)	2/2	3/4
		$(50.0)^{2}$	(100)	(75.0)
有	37°C	4/10	-	4/10
		(40.0)	-	(40.0)
無	25°C	12/28	2/4	14/32
		(42.9)	(50.0)	(43.8)
<del>無</del>	37°C	5/23	2/4	7/27
		(21.7)	(50.0)	(25.9)

1) : 受胎頭数/移植頭数

2) : 受胎率(%)

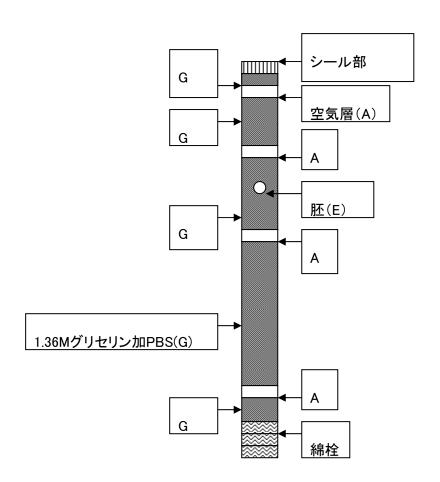


図9 プログラムフリーザー内でのストローの垂直保持

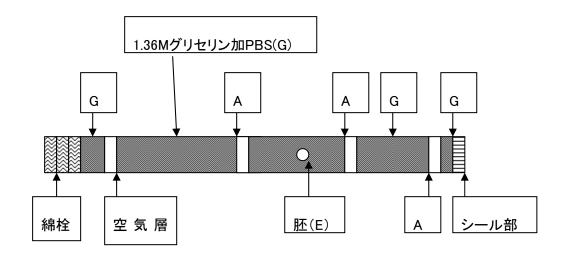


図10 プログラムフリーザー内でのストローの水平保持

ダルベッコPBS	NaCl	0.800g/ml
	KCI	0. 020
	CaCl2	0. 010
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0. 020
	MgCl2 • 6H2O	0. 010
	Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	0. 115
ピルビン酸ナトリ	ウム	0. 0036g
グルコース		0. 1g
蒸留水		100m I
牛血清アルブミン	•	0. 4g
ペニシリン		1001U
ストレプトマイシ	シン	0. 1mg
非働化子牛血清を	·20%V/V添加	

図11 修正リン酸緩衝液 (PBS) の組成

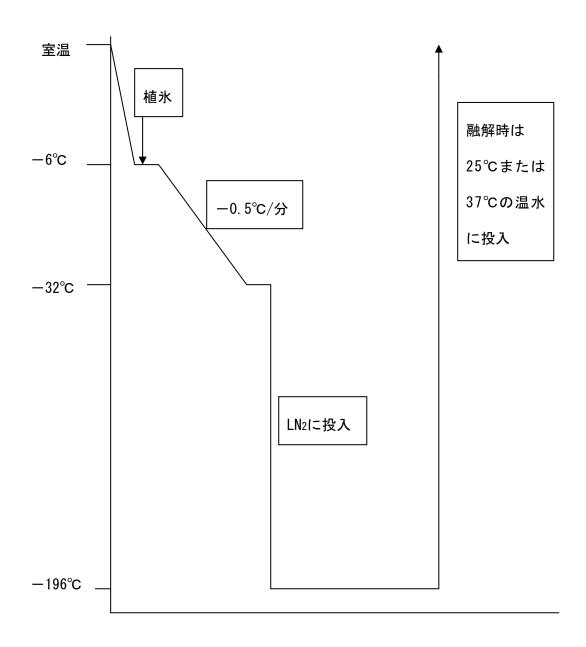


図12 凍結および融解の温度曲線

	10%グリセリ	ン(G)	1Mショ糖(	Suc)	PBS
	を含むPBS		を含むPBS		
① 6.6%G + 0.3M Suc	2. Om I	+	0. 9ml	+	0. 1ml
↓ 5分間静置					
② 3.3%G + 0.3M Suc	1. Om I	+	0. 9ml	+	1. 1ml
↓ 5分間静置					
③ 0%G + 0.3M Suc	Om I	+	0. 9ml	+	2. 1ml
↓ 5分間静置					
4 PBS	Om I	+	Om I	+	3. Om I
↓ 3回洗浄					
ストローに詰め直し、移植					

図13 Stepwise法による耐凍剤除去方法

## 第二節 凍結胚の形態的変化に関する検討

牛胚の凍結保存技術は、野外における胚移植の普及に、大きな貢献を果たしている。しかし、凍結胚は新鮮胚に比べて受胎率が低いという問題がある[198]。凍結胚の移植では、凍結胚の胚細胞の形態的品質が高いものほど、受胎率が高いとされている[77,190]。しかし、凍結融解前後の胚子の形態的変化と、受胎率の関係について調べた成績は数少ない[115]。

本試験は、牛胚におけるステップワイズ法による凍結融解前後の胚細胞の品質の変化および透明帯の形態学的変化が、受胎率に及ぼす影響を検討した。

#### 【材料および方法】

供試した胚子は、ホルスタイン種および黒毛和種から回収されたものである。これらは、卵胞刺激ホルモン(FSH:アントリン;デンカ製薬)およびプロスタグランジン $F2\alpha$ (PGF $2\alpha$ :プロナルゴンF;アップジョン社)を用いて筋肉内注射を施し、人工授精後 $7\sim8$ 日目に回収したものである(第2章・第1節参照)。胚子はステップワイズ法で凍結融解[18,160]し第3章・第1節と同様に行った。

胚子は細胞質の形態学的に優秀胚(A)、優良胚(B)、普通胚(C)の3段階に区分した(金川([70])。優秀胚(A)は輪郭明瞭で、細胞密度は良好、突出した細胞および水泡がほとんど見当たらないものである。優良胚(B)は輪郭明瞭で、細胞密度は良好、一部に突出した細胞および水泡が認められるもので、細胞の変性は10~20%程度のものである。普通胚(C)は輪郭不明瞭で、色調が黒ずみ、細胞の密度、細胞数が少なく、突出した細胞および水泡が多くを占めるもので、変性割合は30~50%のものである。透明帯の形態はA、B、Cの3段階に区分した。Aは正円に近いもの、Bはやや楕円形のもの、Cは著しく歪むものである。正常胚550個を凍結前と融解後に400倍の倒立顕微鏡下で、写真撮影して、胚子の品質を評価し、移植に供試した。

### 【結果】

牛胚の凍結前および融解後の細胞質のランクと受胎率の関係は、表15および16に示した。 凍結前の胚子の細胞質のランク別の受胎率は、優秀胚(A)では58/154(37.7%), 優良胚(B) では111/344(32.2%)、普通胚(C)では8/52(15.4%)であり、普通胚(C)の受胎率は、優秀 胚(A)および優良胚(B)のそれに比べて有意に低かった(P<0.05)。

凍結融解後の胚子の細胞質のランク別の受胎率は、優秀胚(A)では15/39(38.5%)、優良胚(B)では130/357(36.4%)、普通胚(C)では32/154(20.8%)であり、普通胚(C)の受胎率は、優秀胚(A)および優良胚(B)のそれに比べて有意に低かった(P<0.05)。

凍結融解前後の細胞質のランクの変化と受胎率の関係は、表17に示すとおりである。

各細胞質のランクの変化別の受胎率は $A \rightarrow A$  の胚子では15/39 (38.5%)、 $A \rightarrow B$  では40/105 (38.1%)、 $A \rightarrow C$  では3/10 (30.0%)、 $B \rightarrow B$  では90/252 (35.7%)、 $B \rightarrow C$  では21/92 (22.8%)、 $C \rightarrow C$  では8/52 (15.4%) であり、凍結融解前後の細胞質のランクの変化が $B \rightarrow C$  および $C \rightarrow C$  の胚子は、他に比べて有意に低い受胎率であった (P < 0.05)。

凍結前における透明帯の形態と受胎率の関係は、表18に示すとおりである。A (正円に近いもの) は166/505(32.9%)、B (やや楕円形のもの) は11/41(26.8%)、C (著しく歪むもの) は0/4(0%)であり、有意差は認められなかった。

凍結融解後の透明帯の損傷の有無と受胎率の関係は、表19に示すとおりであるが、両者に は有意差は認められなかった。

## 【考察】

牛胚の凍結融解後の生存性は、凍結前の品質が高いほど高いとされている[77,190]。本試験でも、凍結前のランクが優秀胚(A)および優良胚(B)の受胎率は普通胚(C)のそれ(15.4%)に比べて有意に高いことが示された(P<0.05)。また融解後に細胞質の品質を判定した場合、優秀胚(A)および優良胚(B)の受胎率はそれぞれ、38.5%および36.4%で、普通胚

(C) のそれに(20.8%)比べて有意に高いことが示された(P<0.05)。

本試験では、凍結融解法として、従来から行われているステップワイズ法[160]を用いた。この方法は、最近、実用化され始めているダイレクト法(直接移植法)[46,93,156]に比べて、耐凍剤の除去操作が必要であり、簡便さでは若干劣る。しかし、融解後の胚子の状態を確認することができるため、融解後の損傷による移植不能な胚子の検出には、利点がある。

凍結融解前後の胚子の細胞質の変化と、受胎率の関係は、融解前に優秀胚(A)と判定された胚子で融解後に優秀胚(A)、優良胚(B)、普通胚(C)と判定された胚子の受胎率はそれぞれ38.5%、38.1%、30.0%であったことから融解後のランクが低下しても、受胎率には影響が認められなかった。しかし、融解前に優良胚(B)と判定され、融解後に優良秀胚(B)と判定された胚子の受胎率が35.7%であり、融解後に普通胚(C)と判定された胚子の受胎率が22.8%と著しい開きがあった。すなわち、凍結前に優秀胚(A)と判定された胚子は、融解後にランクの低下が起こっても、受胎率に影響はないが、凍結前に優良胚(B)と判定された胚子は、融解後にランクの低下が起こると、受胎率が低下することが明らかになった。これらの結果は凍結融解後の生存率に影響するのは凍結前の胚子のランクであると云う報告[77,115,190]と一致する。また、Hrunska[68]は凍結期間の長さは凍結融解後の生存率や受胎率に影響しないと述べている。従って、今後、ダイレクト法を実施する場合に、優秀胚(A)および優良胚(B)の胚子を凍結すれば、融解後の胚子の形態が観察されなくても高い受胎率が得られるものと推察された。

牛胚の凍結前における、透明帯の形態と受胎率について、A(正円に近いもの)では166/505(32.9%)、B(やや楕円形のもの)では11/41(26.8%)、C(著しく歪むもの)では0/4(0%)と、透明帯の変形度合いが大きいものほど、受胎率が低下する傾向が認められた。しかし、これらの間に有意差は認められなかった。また、凍結融解後の透明帯の損傷の有無と受胎率の関係については、損傷を有するものが33.8%、損傷を有しないものが32.1%で、両者は同一程度であった。Kojimaら[79]は家兎において、Niemann[101]は牛において、それぞれ透明帯の損傷があっても、受胎率には影響しないと述べている。さらに、Niemann[101]は透明帯の

損傷があっても、細胞質がしっかりしたものを移植すれば受胎率は高いと報告している。本 試験においても、透明帯の損傷がある胚子を移植しても受胎率が低下しなかった理由は、細 胞質が形態学的に良好な胚子だけを移植したためと考えられる。

凍結胚移植の受胎率を向上させるためには、凍結前に普通胚と判定された胚子を凍結せずに新鮮胚移植を行うのが最善であるが、新鮮胚移植は予め発情を同期化した受胚牛を用意しなければならず、実際には普通胚でも凍結せざるを得ないことが多い。今後は、凍結胚の受胎率を向上させるために、低ランク胚に適した凍結方法、あるいは胚子を一定時間培養してから凍結するなどの方法の検討が必要である。

## 【小括】

生体から回収した牛胚を用いて、ステップワイズ法により凍結融解前後の細胞質および透明帯の形態学的変化と受胎率の関係について比較検討して、次の成績が得られた。

- 1. 凍結前の細胞質が普通胚(C)と判定された胚子の受胎率(15.4%)は、優秀胚(A:37.7%) および優良胚(B:32.2%)に比べて有意に低かった(P<0.05)。
- 2. 凍結融解後の細胞質が普通胚 (C) と判定された胚子の受胎率(20.8%)は、優秀胚 (A: 38.5%) および優良胚 (B:36.4%) に比べて有意に低かった(P<0.05)。
- 3. 凍結融解前後の細胞質のランク変化と受胎率の関係について、凍結前の優秀胚は融解後のランクが低下しても受胎率は変化しなかった(A:30.0%)。優良胚は、融解後のランクの低下により受胎率が低下した(B:22.8%)(P<0.05)。
- 4. 凍結前の胚子における、透明帯の形態の違いにより、受胎率には変化が認められなかった。
- 5. 融解後における、透明帯の損傷と受胎率の間には、損傷の有無による差異は認められなかった。

表15 牛胚の凍結前の細胞質のランクと移植成績

凍結前ランク	受胎頭数/移植頭数	受胎率(%)
А	58/154	37.7a
В	111/344	32.3a
С	8/52	15.4b

a,b:異符号間に有意差あり(P<0.05)

表16 牛胚の凍結後の細胞質のランクと移植成績

凍結後ランク	受胎頭数/移植頭数	受胎率(%)
А	15/39	38. 5a
В	130/357	36. 4a
С	32/154	20. 8b

a,b:異符号間に有意差あり(P<0.05)

表17 牛胚の凍結融解前後の細胞質のランク変化と移植成績

ランクの変化	受胎頭数/移植頭数	受胎率(%)
$A \rightarrow A$	15/39	38. 5ab
$A \rightarrow B$	40/105	38. 1a
$A \rightarrow C$	3/10	30. 0
$A \rightarrow A$	90/252	35. 7a
$A \rightarrow B$	21/92	22. 8ab
$A \rightarrow C$	8/52	15. 4b

a,b:異符号間に有意差あり(P<0.05)

表18 牛胚の凍結前の透明帯の形態と移植成績

透明帯の形態	受胎頭数/移植頭数	受胎率(%)
A (正円に近いもの)	166/505	32. 9
B(やや楕円を呈するもの)	11/41	26. 8
C(著しく歪んだもの)	0/4	0.0

表19 牛胚の融解後の透明帯の損傷と移植成績

透明帯の損傷	受胎頭数/移植頭数	受胎率(%)
有	16/48	33. 3
無	161/502	32. 1

# 第三節 凍結胚移植時の血中プロジェステロン値と受胎率に関する検討

近年、牛胚の凍結保存技術の普及に伴い、胚の移植頭数が急激に増加している。しかし、 凍結保存胚の受胎率は新鮮胚移植に比べて、5~10 %程度低いとされている。 Remsen と Roussel[121] 、Niemann[91]およびHaslerら[61]は黄体の形態的品質と受胎率の間には関係 はないことを報告し、また砂川ら[149]はこれとは逆の関係を示している。

牛の繁殖機能の指標として血中および乳汁中プロジェステロン(以下、Pと略)値の利用について多数報告されている[31,48,53,140,196]。本試験では、胚移植時の黄体の機能を反映する血中P値を酵素免疫測定法(Enzyme Immunoassay:EIA)で測定し、その際の黄体の形状および移植後の受胎率との関係を検討した。

## 【材料および方法】

供試胚は栃木県酪農試験場で飼養されているホルスタイン種(乳牛)および黒毛和種(和牛)から回収した新鮮胚および凍結胚69個である。供試胚は卵胞刺激ホルモン製剤(FSH)およびプロスタグランジン $F2\alpha$ (PGF $2\alpha$ )を用いた(第2章第1節参照)。胚子の凍結は、Bilton [18]の変法の凍結曲線に準じて行った。耐凍剤の除去はTakeda [161]の方法に準じて、ショ糖を用いた3段階法により行った(第3章第1節参照)。 また、受胚牛は酪農家で飼養されている乳牛69頭である。

血中P値測定のための採血は、胚移植前日あるいは胚移植当日に、尾静脈ないし尾動脈から、岡田ら[105]の方法に準じて、50 mgのアジ化ナトリウムを添加した真空採血管で行い、血清分離後はP値測定まで-20 ℃に保存した。血清中P値の測定は、帝国臓器製薬株式会社によって開発されたEIA (プレグテスト)により実施した [104]。

### 1. P測定の原理

酵素で標識された抗原は、抗体との対応で抗原抗体反応を起こす。血液や牛乳から処理さ

れた検体中のPと酵素を標識した抗原( $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識Progesterone)は、抗体 感作ビーズ(第 1 抗体固相法: EIA)下で競合反応が可能である。抗体感作ビーズは、検体中 のPの量に応じて酵素標識抗原が結合する。

液相中に残る酵素標識抗原を除き、抗体感作ビーズに付着した酵素標識抗原の酵素と基質 (0-ニトロフェニールβ-D-ガラクトピラノシド)を反応させると、酵素反応により基質から 0-ニトロフェノールが遊離して黄色を呈する。この色調を波長420 nmで比色定量する。

### 2. キットの特長

キットの特長は、次に挙げる通りである。

- 1) 酵素免疫測定法は放射性同位元素を使用しないので、特殊な設備を必要としない。
- 2) 非相同の酵素免疫定量系を使用しているために、検出感度(0.2 ng/ml)が鋭敏である。
- 3) 固相にポリスチレンビーズを用いているので、F/B分離が容易でありRIA法と同程度の良好な再現性が得られる。
- 4) RIA法および二抗体EIA法との相関は良好である。
- 5) 検体として、脱脂乳、血清および血漿の測定が可能である。

### 3. キットの内容

1キットは50検体分であるが、標準P液および試料とも重複測定のため、実際に測定できたのは20検体である。

#### 1) 抗体結合ビーズ:

 $11\,\alpha$  -hydroxy progesterone hemisuccinate-BSA ( $11\,\alpha$  -OH-P-HS-BSA) を抗原とし、抗P抗体を結合させたポリスチレンビーズを50個準備する。このビーズはリン酸緩衝液中に保存する。

## 2)酵素標識 P 液:

 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼで標識したP溶液5.5 mlを準備する。

#### 3) 酵素基質剤:

0-ニトロフェニールβ-D-ガラクトピラノシドを凍結乾燥して、5アンプル準備する。1アンプル当たり、蒸留水5.5 mlを加え、基質溶液を作成する。

# 4) 標準 P 液:

0.1,0.3,1.0,3.0および9.0 ng/mlの5段階のP標準液を500 川ずつ作成する。

### 5) 洗浄液:

塩化ナトリウム濃縮液を20 ml準備し、使用時に10倍希釈し、0.15 Mの溶液として使用する。

### 6) 停止液:

炭酸ナトリウム濃縮液を10 ml準備し、使用時に10倍希釈し、0.1 Mの溶液として使用する。

## 7) リン酸緩衝液:

pH7.0のものを12 ml準備し、血清中P測定時のみに使用する。

### 4. 測定操作

### 1)標準曲線の作成法:

小試験管10本を準備し、試験管2本を1組にして、標準液9,3,1,0.3および0.1 ngを100』 ずつ正確にとり、5濃度の標準液を2本ずつ準備する。

### 2) 血清の調整:

処理血清をよく混ぜてから、マイクロピッペトで、50 川を正確に2本の10 ml用試験管に移す。これに石油エーテル約2 mlを加えて、ミキサーで1~2分間抽出する。抽出した石油エーテルは40~50℃の水浴中で蒸発乾固し、乾固後、N₂ガスまたはCO₂ガスを弱く吹き込んで、試験管に残存する石油エーテルを完全に除去する。乾固した試験管にリン酸緩衝液100 川を正確に加え、よく混和して溶解する。この静置の間に、基礎溶液を調整しておく。

### 3) 洗浄液:

反応時間終了後、直ちにビーズを洗浄する。すなわち、0.15 Mの塩化ナトリウム溶液を2 ml/tube加え、攪拌し、アスピレーターにて反応液を吸引除去し、さらに1回繰り返す。使用直前に、0.7%になるようにメルカプトエタノールを添加した基質溶液を500 μl/tube分注する。

## 4) 反応停止液:

軽く攪拌後、37℃で30分間静置し、反応終了後、0.1 M炭酸ナトリウムを2 ml/tube加え、

十分に攪拌混和して、反応を停止させる。

### 5) Pの測定:

反応停止後、1時間以内に波長420 nmにて吸光度を測定する。この間、各種濃度の標準液 100 川を入れた試験管と血清(P)より調整した100 川の希釈検体の入った試験管を用意する。

また、血中 P 値の採血時には、直腸検査により黄体の状態を検査し、黄体の形状的な大きさおよび柔軟度により次のように分類した。黄体の形状的な大きさは、[大(2 cm以上)]、[中(1~2 cm)]および[小(1 cm未満)]の3段階に区分し、黄体の柔軟度は[硬い]、[柔らかい]およびこれらの中間の[中等度]の3段階とした。受胚牛の妊娠診断は移植後50~60日頃に直腸検査により実施した。

#### 【結果】

胚子の種類別(新鮮胚および凍結胚)の受胎率と血中P値の関係を表20に示した。新鮮胚では、13頭に移植して、8頭が受胎して、受胎率61.5%を得ている。この内、血中P値が1 ng/ml未満のものでは受胎率が33.3%(1/3頭)で、1 ng/ml以上のものでは受胎率が70.0%(7/10頭)で、血中P値が高いほど、受胎率が高いことが明らかになった。凍結胚では、56頭に移植して、20頭が受胎して、受胎率35.7%を得ている。この内で、血中P値が1 ng/ml未満のものでは受胎率が12.5%(1/8頭)で、1 ng/ml以上のもでは受胎率が39.6%(19/48頭)で、新鮮胚と同様で血中P値が高いほど、受胎率が高いことが明らかになった。

黄体の形状的な大きさおよび柔軟度と血中P値の関係を表21に示した。硬い黄体では、大きさが2 cm以上から1 cm未満で、血中P値は低濃度から高濃度を示し、[大]では1.23 ng/ml、[中]では2.09 ng/ml、[小]では2.4 ng/mlとなることを示している。[硬い]黄体で大きさの縮小に伴い、P値が高まる原因については明らかではない。黄体が[柔らかい]および[中等度]グループではほぼ3.0 ng/ml以上の血中P値を示しており、このことは黄体が柔軟になるに伴い、黄体組織中に含まれる血中P値が増大し、血中あるいは子宮内膜に移行されることを示している。

胚移植時の血中 P値と移植胚の受胎率の関係を図14に示した。血中 P値が1 ng/ml未満のものでは11頭中 2 頭が受胎し、血中 P値が7.9 ng/mlと高くても移植胚の受胎しないものが認められた。そこで、59例について、移植時の胚子のランクと P値および移植胚の受胎率の関係を図15に示した。血中 P値が1 ng/ml未満のものでは、A ランク(優秀胚)およびB ランク(優良胚)の胚子を移植した結果、不受胎のものが多かった。血中 P値が1 ng/ml以上のものでは、C ランク(普通胚)を移植したものでは不受胎のものが多かった。

### 【考察】

Haslerら[61]およびNiemannら[102]は黄体の形態的品質と受胎率の関係は認められないと報告しているが、本試験においても、黄体の大きさ別ではP値に有意な違いは認められなかった。しかし、黄体の柔軟度別に比較すると、黄体が[柔らかい]および[中等度]グループではほぼ3.0 ng/ml以上の血中P値を示しており、このことは黄体が柔軟になるに伴い、黄体組織中に含まれるP値が増大し、血中あるいは子宮内膜に移行することを示している。砂川ら[149]の、母指頭大~薬指頭大で、卵胞の共存がなく、軟肉様の黄体では、血中P値が高いという報告とほぼ一致する。従って、直腸検査により黄体の良否を判定する際には、柔軟度に重点を置くことが重要であることが示された。Remsenと Roussel[121]は移植時の血中P値と受胎率の関係について、2.0-5.0 ng/mlの血中P値を示した牛が、これ以外の血中P値の牛より、有意に高い受胎率であると報告している。

Niemannら[102]は、凍結胚を移植した際の血中P値と移植胚の受胎率の関係を調べ、血中P値が1.99 ng/ml未満の時、受胎率は35.3%、2.0-4.99 ng/mlの時は51.1%、5.0 ng/ml以上の時は28.6%であり、血中P値と移植胚の受胎率の関係の間に相関関係はないが、1 ng/ml未満のものでは受胚牛として不適であり、2.0-5.0 ng/mlのものが最適であると思われると述べている。本試験でも、同様に血中P値と受胎率の関係の間に相関関係は認められなかったが、1 ng/ml未満のものでは受胎率が低い傾向が認められた。

Donaldson[44]は胚子の発育ステージよりもランクが問題であり、ランクの高い胚子の方が

受胎率は高いと述べている。本試験でも、血中P値が高いにもかかわらず、受胎しなかったものの中には胚子のランクの低いCランク(普通胚)のものを移植した例が多かったことから、胚子のランクが受胎率に影響していることが考えられる。Heymanら[65]は凍結胚とともに栄養膜細胞を移植することにより受胎率が向上したと報告し、その原因は、栄養膜細胞が胚子から子宮へのシグナルを増強したことにより、黄体の機能維持に貢献したためであると推察している。従って、Cランク胚子などランクの低い胚子を移植する場合には、栄養膜細胞も一緒に移植することにより、受胎率を向上させることができると期待できる。

砂川ら[137]は、母指頭大~薬指頭大で、卵胞の共存がなく、軟肉様の黄体では、これ以外の黄体に比べて、血中 P 値が高く、受胎率も高いので、直腸検査により受胚牛の選定が可能であると報告している。本試験では、69頭中、血中 P 値が1 ng/ml未満であった11頭(15.9%)は、直腸検査により受胚牛として適すると判定し、胚子を移植したが、Niemannら[102]が示したように、受胚牛として不適当である血中 P 値 1 ng/ml未満を示したことから、直腸検査だけでは正確に受胚牛を選定することは難しいと考えられた。

従って、移植時の血中 P 値を測定し、受胚牛選定の精度を高めることにより、凍結胚の受胎率向上につながると考えられた。

## 【小括】

牛胚移植時の黄体の機能を反映する血中P値を測定し、その際の黄体の形状および移植後の受胎率との関係を検討し、次の結果が得られた。

- 1. 受胚牛を選定する場合には、黄体組織が柔軟なものを選定することが重要であり、これは黄体組織中に含まれる血中P値が増大し、血中あるいは子宮内膜に移行することが示唆された。
- 2. 血中 P 値が 1 ng/ml未満のものでは不受胎牛が多発したことに反して、1 ng/ml以上のものでは受胎牛が多発したことから血中 P 値が受胚牛の黄体機能に重要な役割を果たすことが明らかになった。

3. 以上の成績から、直腸検査により受胚牛を選定する場合には、黄体組織が柔軟であり、 直腸検査だけで判断が困難な場合には、血中P値を測定して、1 ng/ml以上のものを選定する こと、また移植する胚子はできるだけランクの高いものを選定し、受胎率向上を図ることが 重要であることが明らかになった。

表20 血中プロジェステロン (P) 値と移植胚の受胎率の関係

移植胚	移植頭数	受胎頭数	受胎率
新鮮胚	13頭	8頭	61.5%
P値 1 ng/ml>	3	1	33. 3
P値 1 ng/ml≦	10	7	70. 0
凍結胚	56頭	20頭	35. 7%
P値 1 ng/ml>	8	1	12. 5
P値 1 ng/ml≦	48	19	39. 6

表21 黄体の形状的な大きさと柔軟度および血中P値との関係

黄体の柔軟度	黄体の大きさ			
	大	中	小	
	2cm≦	2-1cm	1cm>	
硬い(n=13)	1.23ng/ml	2.09ng/ml	2.40ng/ml	
中等度 (n=13)	3. 45	3. 06	-	
柔らかい(n=3)	3. 90	1. 46	-	

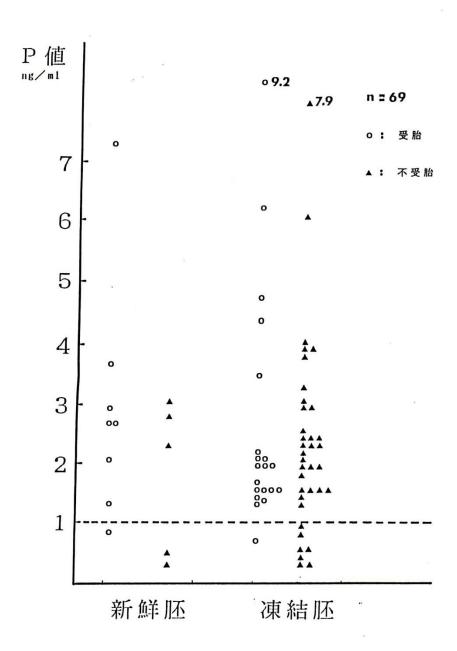
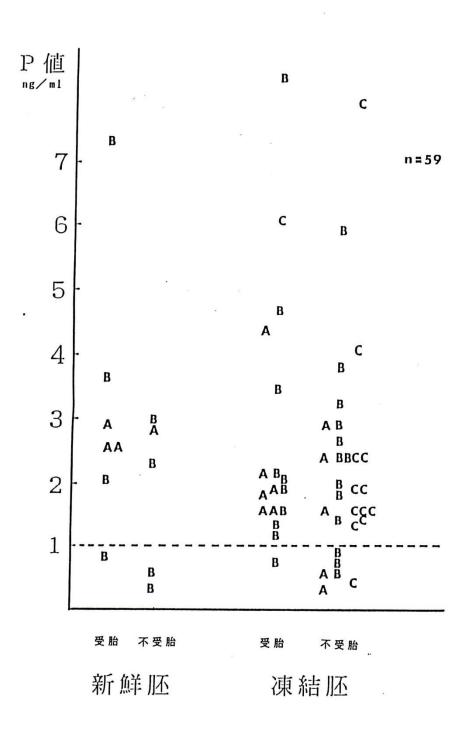


図14 血中 P 値と移植胚の受胎率の関係



### 第四節 直接移植法(ダイレクト法)による牛胚移植の検討

胚子の凍結保存には、十数年前よりステップワイズ法が使用されてきた[100]が、同法は、融解後の耐凍剤の除去に時間的制約が多く、また、顕微鏡などの煩雑な機器が必要であった。その後、移植時の融解操作を簡易化するために、ストロー内で耐凍剤除去操作をする1段階ストロー法が Leiboら[88]、Renardら[122]および鈴木ら[153]により開発されたが、操作は、なお煩雑であり、受胎率の向上も認められなかった。近年、直接移植法(ダイレクト法)をMassipら[93]、Suzukiら[156]およびDouchiら[46]が考案し、融解後の耐凍剤除去操作を著しく簡易化した。

本試験では、2種類の直接移植法[46,93]を実施し、これを従来から応用されているステップワイズ法と比較検討した。また、直接移植法の受胎率向上を目的として、凍結前の胚子の形態と移植成績の関係も検討した。

### 【材料と方法】

# 試験 1

黒毛和種(和牛)とホルスタイン種(乳牛)に対する過剰排卵処置は第2章第1項と同様の方法で行った。FSH(アントリン;デンカ製薬)は3~4日間の減量投与法で行い、投与量は20~28 mgとした。FSH投与開始から3日目にプロスタグランジンTHAM塩(PGF2α;プロナルゴンF、アップジョン社)を15 mgおよび10 mgを投与し、発情誘起後、人工授精を2回行い、人工授精後7日目に採卵した胚子を金川[74]の方法により、正常胚をA~Cランク(A:優秀胚、B:優良胚、C:普通胚)に分類し、AおよびBランクの胚377個(乳牛の胚 97個、和牛の胚277個、乳牛と和牛の交雑種の胚3個)を供試胚とした。

胚の凍結は、Massipら[93]に準じた方法(M法)と、Douchiら[46]に準じた方法(D法)の2つの直接移植法、およびステップワイズ法(S法)で行った。

M法は、凍結媒液に1.36 Mグリセリンと0.25 Mショ糖を用いた。添加法は、胚子を1.36 Mグリセリンに10分間浸漬し、その後、凍結媒液に移し直ちにストローに吸引した。ストローへの吸引は、胚子の入ったグリセリン・ショ糖混合液のカラムをPBSのカラムで挟むようにし、吸引後できる限り早く冷却を開始した。融解は30~37℃の温水で行った後、直接移植した(図16)。

D法は、凍結媒液として1.8 Mエチレングリコールを用いた。添加法は、胚子をエチレングリコール溶液中で10分以上平衡後、ストローに吸引し、冷却を開始した。30~37℃の温水で融解した後、直接移植した(図17)。

S法は、凍結媒液として1.36 Mグリセリンを用いた。添加法は、胚子をグリセリン溶液中で10分間平衡後、ストローに吸引し、冷却を開始した。25℃の温水で融解した後、ショ糖を用いた3ステップ法[160]により耐凍剤を除去し、PBSとともにストローに再吸引し移植した(図18)。

受胚牛の合計は377頭で、方法別の移植頭数は、M法は35頭、D法は77頭、対照のS法は265 頭であった。移植には、横穴式移植器(富士平工業:東京)を用いて、子宮頸管経由法により り黄体側子宮角に1胚移植した。妊娠診断は、移植後 50日前後に直腸検査法により実施した。

## 試験2

試験1の図16(M法)および図17(D法)に準じて正常胚287個を凍結融解して、受胚牛に移植し、凍結前に判定した胚子のステージおよびランクと移植成績の関係について検討した。

## 【結果】

#### 試験 1

#### 1. 移植成績

直接移植法(M法およびD法)およびステップワイズ法(S法)による移植成績を表22に示した。 M法による移植成績は、移植頭数が35頭で、このうち19頭が受胎し、受胎率は54.3%であった。 D法による移植成績は、移植頭数が77頭で、このうち38頭が受胎し、受胎率は49.4%であった。 S法における移植成績は、移植頭数が265頭で、このうち100頭が受胎し、受胎率は37.7%であった。M法とD法では、ほぼ同程度の受胎率であったが、直接移植法の受胎率をステップワイズ法(S法)の受胎率と比較すると、M法およびD法ともに、S法より高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

# 2. 凍結時の胚操作

M法は耐凍剤の平衡に用いる溶液 (1.36 Mグリセリン) と、ストローに吸引する溶液 (1.36 Mグリセリン+0.25 Mショ糖) が異なるため、凍結する胚子の数が多い場合には、凍結前の耐凍剤の平衡からストローに吸引するまでの処理に時間を要することがあった。一方、D法は凍結時の耐凍剤の平衡に用いる溶液と、ストローに吸引する溶液が同一であるため、凍結前の処理は容易であった。

#### 試験2

## 1. 胚子のステージ別の受胎率

直接移植法 (M法およびD法) の凍結前の胚子のステージ別の受胎率を表23に示した。M法の凍結前の胚子のステージ別の受胎率は後期桑実胚で4/17(23.5%)、初期胚盤胞で10/28(35.7%)、胚盤胞で1/1(100%)および拡張胚盤胞で0/1(0%)であり、D法の凍結前の胚子のステージ別の受胎率は後期桑実胚で48/89(53.9%)、初期胚盤胞で59/128(46.1%)、胚盤胞で11/20(55.0%)および拡張胚盤胞で0/3(0%)であった。M法およびD法の合計の凍結前の胚のステージ別受胎率は後期桑実胚で52/106(49.1%)、初期胚盤胞で69/156(44.2%)、胚盤胞で12/21(57.1%)および拡張胚盤胞で0/4(0%)であり、拡張胚盤胞と後期桑実胚および初期胚盤胞の間(P<0.05)で、さらに、拡張胚盤胞と胚盤胞の間(P<0.01)で、それぞれ有意差が認められた。

## 2. 胚子のランク別の受胎率

直接移植法(M法およびD法)の凍結前の胚子のランク別の受胎率を表24に示した。M法の

凍結前の胚子のランク別の受胎率はAランクで5/11 (45.5%)、Bランクで8/25 (32.0%) およびCランクで2/11 (18.2%) であった。D法の凍結前の胚子のランク別の受胎率はAランクで20/41 (48.8%)、Bランクで86/167 (51.5%) およびCランクで12/32 (37.5%) であった。M法およびD法の合計の凍結前の胚子のランク別受胎率はAランクで25/52 (48.1%)、Bランクで94/192 (49.0%) およびCランクで14/43 (32.6%) であった。CランクではA (P<0.01) およびBランク (P<0.05) に比べ受胎率が有意に低いことが認められた。

#### 【考察】

牛の胚移植に、直接移植法を用いる場合の利点は、移植の現場で人工授精と同様の操作が可能なことである。従来行われてきたステップワイズ法では、時間的制約が多いため、広く応用することは困難であった。一方、直接移植法では、凍結胚を凍結精液と同様の方法で操作することが可能であるために、受胚牛の状態確認から移植までの操作が容易である。

試験1において、凍結媒液にグリセリンとショ糖を用いる直接移植法(M法)では、Massipら[93]は50.0%(5/10)の胚移植に成功し、また、エチレングリコールのみを用いる直接移植法 (D法)では、Douchiら[46]は69.0%(20/29)、Voelkelら[170]は38.4%(10/26)の受胎率を得ている。本試験で実施した直接移植法の受胎率は、グリセリンとショ糖を用いるM法が54.3%(19/35)で、Massipら[93]の報告よりも高い受胎率であり、エチレングリコールを用いるD法では49.4%(38/77)と、Douchiら[46]の成績には及ばないが、かなり高い成績を得ている。また、M法、D法ともに、対照のステップワイズ法のS法より受胎率が高い傾向が認められた。試験2においては、M法の受胎率は31.9%(15/47)で、D法の受胎率は49.2%(118/24の)であった。D法では、試験1および2において、同様の受胎率が得られたが、M法においては、試験1に比べて、試験2の方が低い傾向が認められた。Renardら[122]は、ショ糖を含む液内に胚子を2時間置くとショ糖濃度が高くなるに従って胚子の生存性が低下すると報告している。そのため、ショ糖を含む液に胚子が入っている時の操作を短時間にすることが望ましいと考えられる。また、Wright [190]は採卵から凍結までに4時間以上経過すると、受胎

率が低下すると述べている。本試験のM法は凍結時の耐凍剤の平衡に用いる溶液(1.36 Mグリセリン)と、ストローに吸引する溶液(1.36 Mグリセリン+0.25 Mショ糖)が異なるため、凍結する胚の数が多い場合は、凍結前の処理に要する時間が長くなり、このことが受胎率の低下に影響したものと考えられる。

一方、D法は凍結時の耐凍剤の平衡に用いる溶液と、ストローに吸引する溶液が同一であるため、凍結前の処理は簡単であった。胚の凍結に当たっては、凍結溶液の種類、ストロー内への吸引の仕易さなどの点で、D法が簡易であり、しかも、例数を重ねても受胎率が安定していることから、凍結操作が簡単なD法が、実際の普及に適していることが認められた。

胚のステージ別の受胎率は後期桑実胚で52/106(49.1%)、初期胚盤胞で69/156(44.2%)および胚盤胞で12/21(57.1%)であり、それぞれ50%前後の受胎率が得られたのでこれらの各ステージは凍結可能な胚子であると考えられる。Wright[194]は、優秀胚において優良胚および普通胚よりも有意に高い受胎率を得ており、また、優秀胚を移植した時の受胎率は発育ステージが違っても37.7%-45.7%で有り、ほぼ同様であると報告している。しかし、本試験では拡張胚盤胞における受胎率は0/4(0%)と、受胎例を得ることはできなかった。拡張胚盤胞は通常、人工授精後8日から9日目に回収された胚子に見られるステージである。このため7日目に胚回収を行った本試験で受胎率が低いのは、例数が少な過ぎたことによると考えられる。

胚子のランク別の受胎率は、新鮮胚を移植した場合、品質の高いものほど受胎率が高く、品質の低いものは受胎率が低いことが報告されている[44,61]。凍結融解後の受胎率も新鮮胚の場合と同様に凍結前の品質が高いほど受胎率が高いことが報告されている[77,190]。本試験でもこれらと同様にAランクで25/52(48.1%)、Bランクで94/192(49.0%)およびCランクで14/43(32.6%)となり、Cランクは受胎率が有意に低いことが認められたので、Cランク胚はそのまま凍結するには向かないと考えられた。Cランク胚を移植する場合には新鮮胚移植を行うか、短期培養後凍結を行うなどの対応が必要であろう。本試験におけるAおよびBランクの胚子では、直接移植法により、高い受胎率119/244(48.8%)が得られ、また移植する際の手技も簡潔であるため普及には有効であると考えられた。

一般に、移植頭数に占める凍結胚の割合は70 %台と高いことから、胚移植が普及するためには、直接移植法の受胎率が高いレベルを維持することが必要である。従って、また、凍結前の胚のステージおよびランク付けに十分習熟し、AおよびBランクの胚子は凍結し、Cランクの胚子は新鮮胚移植または培養後に移植や凍結に供するなど、それぞれの胚子に適した処理方法を取る必要がある。

## 【小括】

グリセリンとショ糖を耐凍剤として用いるM法と、エチレングリコールを耐凍剤として用いるD法の2種類の直接移植法と、対照としたステップワイズ法(S法)について、移植試験を実施し、次の成績を得た。

- 1. 胚子の凍結保存技術は、M法が54.3%(19/35)、D法が49.4%(38/77)であり、対照としたS 法は37.7%(100/265)で、3者間に有意差はないが、直接移植法(M法およびD法)において 受胎率が高い傾向が確認された。
- 2. 採卵から胚子の凍結までの操作性では、D法が優れ、安定して高い受胎率が得られることから、D法が実用性に優れていることが確認された。
- 3. 胚子の品質別の受胎率を比較すると、優秀胚[A:25/52(48.1 %)]および優良胚[B:94/192(49.0 %)]の胚子は普通胚[C:14/43(32.6 %)]の胚子に比較して、有意に(P<0.05およびP<0.01)受胎率が高いことが確認された。
- 4. 胚のステージ別の受胎率を比較すると、拡張胚盤胞(0/4:0%)が後期桑実胚(52/106:49.1%)、初期胚盤胞(69/156):44.2 %)および胚盤胞(12/21:57.1%)よりも有意に(P<0.05およびP<0.01)低いことが確認された。

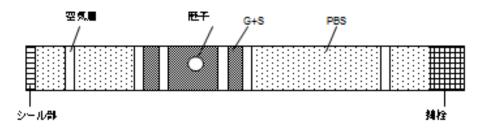


図16 M法の連結、融解法

```
基本級 20%子年血清加修正PBS(PBS)

凍結解液 1.8Mエチレングリコール in PBS(EG)

添加法 PBS

1.8Mエチレングリコール in PBS(EG) 10分

1.8Mエチレングリコール in PBS(EG) 10分

1.7hロー吸引

-7.0°C

1.2分を過後、植氷

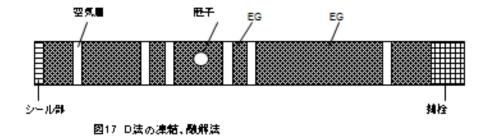
-7.0°C 8分

1.77分(-0.3°G/分)

-30°C

1.196°C(LN2)

歌解は30~37°Cの温水で行った後、直接移植した
```



職解け25°Cの温水で行った後、3ステップ族で軽減船を除去し、PBSとともにストローに再吸引して移植した

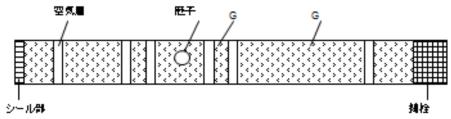


図18 S法の連結、融解法

表22 直接移植法およびステップワイズ法による移植成績

_ 凍結方法	移植頭数(頭)	受胎頭数(頭)	受胎率(%)
M法	35	19	54. 3
D法	77	38	49. 4
S法	265	100	37. 7

表23 直接移植法による胚のステージ別受胎率

凍結方法	後期桑実胚	初期胚盤胞	胚盤胞	拡張胚盤胞
M法	23. 5%	35. 7%	100%	0%
	(4/17) 1)	(10/28)	(1/1)	(0/1)
D法	53. 9	46. 1	55. 0	0
	(48/89)	(59/128)	(11/20)	(0/3)
合計	49. 1 <sup>b</sup>	44. 2 <sup>b</sup>	57. 1∘	<b>0</b> a
	(52/106)	(69/156)	(12/21)	(0/4)

# 1) 受胎頭数/移植頭数

a vs b : P<0.05

a vs c : P<0.01

表24 直接移植法による胚のランク別受胎率

凍結方法	Α	В	С	合計
M法	45. 5%	32. 0%	18. 2%	31. 9%
	(5/11) 1)	(8/25)	(2/11)	(15/47)
D法	48. 8	51.5	37. 5	49. 2
	(20/41)	(86/167)	(12/32)	(118/240)
合計	48. 1 <sup>b</sup>	49. 0∘	32. 6ª	46. 3
	(25/52)	(94/192)	(14/43)	(133/287)

# 1) 受胎頭数/移植頭数

a vs b : P < 0.05

a vs c: P<0.01

第四章 牛における凍結保存胚の異常に関する研究

緒言

最近、わが国においては牛胚の移植頭数は逐次増加し、平成19年度における年間の移植頭数は74,215頭、子牛生産頭数は17,720頭に達し、受胎率も50%程度に向上してきている(農林水産省畜産局家畜生産課[196])。胚移植の最終目的は、優秀な子牛を効率的に生産することにあるので、妊娠中の胚子の早期死滅や流産の発生は、胚移植技術の普及・発展を大きく阻害し、酪農家あるいは肉畜生産農家にとっては、大きな損失を招くことになる。

流産には細菌やウイルスによる伝染性流産と、感染症に起因しない散発性流産がある。散発性流産の原因を大別すると、胚子および胎子における異常、母体における異常、外的感作などの諸要因がある。流産の確認は、流産胎子の発見によりなされるが、妊娠初期には、胎子が微細であるために、その徴候は軽微となり、見逃され易い。最近、超音波診断装置を用いて、妊娠早期から胎子の有無や胎子の発育状況が観察可能になってきた[109,164]。超音波診断法は医学および獣医学における臨床領域で広範囲に応用されている。この診断法は、一定の周期で断続的に探触子から出るパルス超音波を利用し、二次元の断層画像として描写するものである。獣医繁殖領域では、交配後2~3週から胎嚢が確認され、3~4週から胚子が確認されることから、早期妊娠診断に応用されている。また、単胎動物における双子診断、多胎動物における子数診断等に利用される。さらに、胎子の生死鑑別診断を行うことが可能である。また、胎子の組織、臓器、頭部や四肢の各部位の発生過程などについても、発生学的あるいは奇形学的に診断することが可能である。牛などでは、直腸検査での、判別が不明瞭な場合における卵胞や黄体の確認、卵胞嚢種と黄体嚢種の判別、卵胞嚢種の治療後における黄体化の判定、子宮疾患の診断などに応用される。また、犬や猫の子宮蓄膿症の診断にも応用される[57,76,110,117]。

本章では、胚移植後の流産発生状況を調査し、さらに、妊娠早期の胚子・胎子の早期死滅 の発生状況を超音波診断装置を用いて検討した。

# 第一節 牛凍結保存胚の流産に関する検討

従来、牛胚移植後の流産発生状況は、双子生産に関しては比較的報告が多い[3,40,99,154] が、単子生産に関して例数を集めた報告は数少なく[60]、一般農家の飼育する牛を受胚牛として用いた場合の流産発生状況はほとんど知られていない。

本研究では、胚移植後に妊娠と診断された受胚牛について、その後の流産発生状況を検討した。

# 【材料と方法】

#### 1. 調査対象牛

調査対象牛は栃木県下の酪農家に飼養されているホルスタイン種乳牛(乳牛)である。19 87年4月から1991年3月までの間に、胚移植を実施した乳牛1,148頭のうち受胎の確認された 399頭を調査対象牛として選定した。なお、栃木県内では調査期間中に細菌学的あるいはウイ ルス学的な疾病に起因する牛流産の発生は報告されていない。

### 2. 移植胚の作出

供胚牛として乳牛および黒毛和種牛(和牛)を用い、Haslerら[60]の方法に準じて、卵胞刺激ホルモン(FSH)製剤を3~4日間減量投与し、一方、プロスタグランジンF2α(PGF2α)製剤をFSH製剤投与開始から3日目に朝夕2回に分割投与して、過剰排卵を誘起した。人工授精後7日目に非外科的に胚子を回収した。回収胚は、金川[74]の方法に従い、正常胚をA~Cランクの3段階に分類し、Aランク(優秀胚)およびBランク(優良胚)の胚子を新鮮胚移植あるいは凍結に供した。

#### 3. 胚子の凍結

耐凍剤として20%子牛血清(CS) 加PBS(修正PBS)に 1.36 Mグリセリンを添加した。この液に胚子をNiemann[76]の方法に準じて、1段階で投入して、10分以上平衡した後、0.25 mlのストロー(富士平工業)に吸引後、プログラムフリーザー(ET-1:富士平工業)を用い

て凍結を開始した。胚子の凍結は、 Bilton[18]の変法の凍結曲線に準じて行った。室温から-6°Cまでを-1°C/分とし、-6°Cで20分間保持(この間に植氷)し、-6°Cから-32°Cまでを-0.5°C/分とし、-32°Cで10分間保持して、-32°Cから $LN_2$ に投入した。凍結胚の融解は、ストローを25~35°Cの温湯に浸漬して行い、耐凍剤はショ糖を用いた3段階希釈法で除去した[160]。

### 4. 胚子の移植

新鮮胚および凍結融解胚は、修正PBSとともに0.25 mlストローに封入し、2胚移植、1胚移植および追い移植(人工授精後7日目に反対側子宮角に1胚を移植する)に供した。移植に当たって、受胚牛には2%塩酸プロカイン(プロカイン注:フジタ製薬)5 mlを用いて、尾椎硬膜外麻酔を行い、横穴式移植器(富士平工業)を用いて非外科的に移植した。

#### 5. 妊娠診断法および流産確認法

妊娠診断は胚移植後35~53日に直腸検査により実施した。妊娠と診断された後、畜主により発情の回帰、外陰部からの出血や流産胎子が確認された場合あるいは再度の直腸検査で妊娠子宮角および妊娠黄体の縮小、あるいは胎子の消失が確認さえた場合には流産と判定した。

# 6. 統計学的処理法

 $\chi^2$ 検定により行った。

#### 【結果】

流産発生率は表25に示した通り、新鮮胚移植では合計9.0%、凍結胚移植では合計8.6%でほぼ同率であった。

新鮮胚における移植方法別の流産発生率は1胚移植(9.2%) および2胚移植(10.7%) ともに、比較的高い値を示した。一方、追い移植の9頭では流産の発生は認められなかった。凍結胚における移植方法別の流産発生率は、新鮮胚移植とほぼ同様で、追い移植(4.5%)において最も低く、次いで1胚移植(8.1%)、2胚移植(16.7%)で、2胚移植が追い移植および1胚移植に比較して、高い傾向にあったが、3種類の移植方法の間に有意差は認められなかった。

胚移植後の流産発生時期は表26に示した。新鮮胚移植では移植後80日以内の流産発生率が全体の46.7%であり、81-120日および241日以上の期間に比べて著しく高かった(P<0.05)。凍結胚移植でも移植後80日以内の流産発生率は全体の60.0%となり、他の時期に比べて有意に高かった(P<0.05)。

2胚移植後に流産した7例のうち、3例は移植後161日以降の流産であり、いずれも双子妊娠であった。また、移植後161日以降の流産のうち1例は1胚移植であったにも関わらず双子を流産し、双胎妊娠の場合には、妊娠の後期に流産が多い傾向が認められた。

#### 【考察】

本研究における、凍結胚および新鮮胚移植後の流産発生率(8.6%およびと9.0%)は、堂地ら[43]の示した凍結胚および新鮮胚移植後における流産発生率(5.1%および4.5%)と比較して若干高かった。今回調査した1胚移植後の流産発生率(8.5%)は人工授精後の流産発生率(2~5%)に比べて若干高い傾向にあった[45,154]。また、堂地ら[45]の種畜牧場における1胚移植後の流産発生率(4.5~5.1%)は、今回の成績よりわずかに低い傾向を示した。一般農家における受胚牛の飼養管理は、種畜牧場と比べると充分とは云い難く、飼養失宜による流産の発生も考えられる。また、種畜牧場では、健康な牛だけを確実に選択して受胚牛として供用できるのに対して、一般農家を対象にした胚移植では、潜在的に障害を有する牛を受胚牛として供用してしまう場合も考えられる。これらの点が、今回の流産率がやや高かった原因と推察される。

今回の調査における流産の発生は、胚移植後80日以内に多発していた。Izaikeら[72]は両側子宮角に1胚ずつ新鮮胚を移植して、超音波診断装置により、10日間隔で子宮を観察し、妊娠38~57日に胎子の損耗が多いことを報告している。Kingら[78]は乳牛および肉牛に外科的および非外科的に胚子を移植して、妊娠60~90日に流産が多発(3.15%)することを認めている。

Roberts [123]が、母体の激しいストレス反応を引き起こす要因も流産の原因となると云って

いるように、妊娠初期の胎盤形成が不十分な時期には、母体に対する各種のストレスが胎子に大きく影響し、流産を引き起こすと考えられる。

本調査では、移植後161日以降に流産が確認された11例のうち4例は双子妊娠であった。 Roberts [123] は双子の流産発生は妊娠後期に多いことを示しており、Andersonら [3] は両側子 宮角に1胚ずつ移植した牛において166~248日に双子の流産を多く認めている。Dobsonら [40] は双子妊娠の場合、単子妊娠に比べて、妊娠後期に流産等の危険性が高いと述べている。このように妊娠の後期に双子の流産が多くなる理由として、2頭の胎子の大きさが、その母牛の子宮の容積に対して負担となり過ぎる物理的要因およびこれに伴う胎子の栄養不足等が要因として推察される。流産の原因は、物理的原因、遺伝的原因、栄養的原因、化学的または薬物的原因、内分泌的原因および感染性原因など多様であり、流産原因を究明してもその20-25%が明らかになるに過ぎないと云われる [123]。本試験でも流産の原因について特定することは困難であった。

以上の結果から、牛胚移植後の流産発生率は新鮮胚移植によるものは9.0%、凍結胚による ものは8.6%であり、流産発生は新鮮胚および凍結胚ともに胚移植後80日以内に多発すること が明らかになった。

## 【小括】

- 一般農家で飼養されている牛を受胚牛として、胚移植後の流産の発生状況を検討し、次の 結果を得た。
- 1. 新鮮胚および凍結胚を乳牛(未経産および経産)に非外科的に移植したところ、全体の流産発生率は8.8%(35/399)で、新鮮胚(9.0%)および凍結胚移植後の流産発生率(8.6%)に有意差は認められなかった。
- 2. 1 胚移植、2 胚移植および人工授精後非黄体側子宮角内への1 胚の追い移植における流産発生率は、それぞれ8.5、13.5 および3.2%で3者の間に有意差は認められなかった。
- 3. 胚移植後の日数別の流産発生率は、新鮮胚および凍結胚とも80日以内で有意に高く(P<0.

- 05)、それぞれ総流産頭数の46.7%および60.0%がこの期間に含まれていた。
- 4. 以上の結果から、新鮮胚および凍結胚移植後の流産発生率には有意差がなく、流産発生時期は新鮮胚および凍結胚ともに胚移植後80日以内に有意に多発することが明らかになった。

表25 牛胚移植方法別の流産発生率

移植方法	新鮮胚	凍結胚	合計
1 胚移植	12/130 (9. 2%)	15/186 (8. 1%)	27/316 (8. 5%)
2 胚移植	3/28 (10. 7)	4/24 (16. 7)	7/52 (13. 5)
追い移植	0/9(0)	1/22 (4. 5)	1/31 (3. 2)
合計	15/167 (9. 0)	20/232 (8. 6)	35/399 (8.8)

表26 牛胚移植後の日数別流産発生状況

移植後の日数	新鮮胚	凍結胚
	頭数(発生率)1)	頭数(発生率)
〈 81日	7頭(46.7%)。	12① (60. 0%) a
81 <b>~</b> 120	0 (0)°	3 (15.0)°
121~160	2 (13.3)	1 (5. 0) <sup>b</sup>
161~200	3 (20.0)	2② (10.0) <sup>b</sup>
201~240	2① (13.3)	2① (10.0) <sup>b</sup>
241 <	1① (6.7)。	0 (0) b
合計	15 (100%)	20 (100%)

1) (各時期の流産頭数/合計の流産頭数)×100

注:〇の中の数字は流産頭数のうち双子の流産頭数を示す

a, b : P<0.01, a , c : P<0.05

# 第二節 牛凍結保存胚の胚子・胎子の早期死滅に関する検討

牛の胚移植における流産の発生率は、一般に人工授精におけるそれに比べて高く、流産の発生時期は胚移植後比較的早期であると云われている[45,78,134]。一方、最近、超音波診断装置が臨床繁殖学の領域で応用され、多くの利点が上げられている[55,78,114,119,121]。

胚移植における胚子・胎子の早期死滅の発生率は、複数の胚子を移植した場合には高いことが知られている[72]が、この装置を用いて1胚を移植した場合については明確でない。

本試験では、1胚移植後の早期に超音波診断装置により、妊娠と診断された受胚牛に対して、発情後60日前後に直腸検査により妊娠診断を行い、胚子・胎子の早期死滅の発生状況を調査し、人工授精後のそれと比較した。

### 【材料および方法】

### 1. 供試牛

供試牛は、1995年10月から1997年3月の間に、酪農家で飼養されたホルスタイン種乳牛である。これらは胚移植群および人工授精群に区分され、頭数はそれぞれ307頭および391頭である。1胚移植の胚移植群は、胚移植後18~33(平均25.1)日に超音波診断装置により妊娠診断を受け、妊娠と診断された後、胚移植後53日前後に直腸検査により、2回目の妊娠診断を行って、胚移植の妊否が判定された。人工授精群は、人工授精後27~40(平均32.4)日に超音波診断装置により妊娠診断を受け、授精後60日前後に直腸検査により、2回目の妊娠診断を行って、胚移植の妊否が判定された。

## 2. 胚子の移植

胚移植群の胚子は過剰排卵処置した黒毛和種またはホルスタイン種乳牛から人工授精後7日に非外科的に回収した移植可能な新鮮胚(93個)またはDouchiら[44]の方法によりダイレクト凍結法で凍結保存したもの(214個)である。なお、一部は全農飼料畜産中央研究所および家畜改良事業団で作成したダイレクト凍結法による体外受精(IVF)凍結胚(36個)を用い

た。胚子の移植は1頭に1胚とし、発情後7日前後に子宮頸管経由法により黄体形成卵巣側の子宮角内に移植した。

#### 3. 人工授精

人工授精群には、直腸検査により発情期であることを確認した後、凍結精液により人工授 精した。

## 4. 超音波診断装置および直腸検査による妊娠診断

超音波診断装置SSD-500 (アロカ株式会社)を用いて、電子リニア形探触子 (3.5 MHz) (アロカ株式会社)により行った。妊娠の判定は、胚移植側および人工授精側の卵巣に妊娠黄体が存在し、また子宮角内腔の胎水による拡張のみを確認したもの、あるいは子宮角内腔の胎水による拡張があるないは、あるいは子宮角内腔の胎水による拡張および胎子を確認したものとした。また、直腸検査による妊娠診断を行い、空胎を確認した場合あるいは、それ以前に発情の回帰または外陰部からの血液等の排出が認められた場合を、胚子・胎子の早期死滅とした。

#### 5. 統計処理

統計処理は $\chi^2$ 検定により行った。

## 【結果】

超音波診断装置により妊娠と判定した胚移植群307頭のうち19頭(6.2%)および人工授精群391頭のうち18頭(4.6%)において、胚子・胎子の早期死滅が認められたが、両者の間には有意差はなかった(表27)。

産歴別の胚子・胎子の早期死滅の発生状況を表28に示した。未経産牛では胚移植群62頭のうち3頭(4.8%)において、胚子・胎子の早期死滅が認められ、人工授精群26頭は、いずれも妊娠を継続していたが、両者の間には有意差はなかった。経産牛では胚移植群245頭のうち16頭(6.5%)、人工授精群365頭のうち18頭(4.9%)において、胚子・胎子の早期死滅が認められたが、両者の間には有意差は示されなかった。また、未経産牛に比べて経産牛では、胚子・胎子の早期死滅が多い傾向にあったが、両者の間には有意差はなかった。

移植に供試した胚子の種類別の胚子・胎子の早期死滅の発生状況を表29に示した。移植に供試した胚子が、生体由来の新鮮胚では93頭中7頭(7.5%)、生体由来の凍結胚では214頭中12頭(5.6%)に胚子・胎子の早期死滅が認められた。また、IVF由来の凍結胚では36頭中8頭(22.2%)に胚子・胎子の早期死滅が認められた。IVF由来の凍結胚と生体由来の新鮮胚および生体由来の凍結胚の間には有意差が認められた(P<0.01)。

胎子を確認できず子宮角内腔の胎水による拡張のみを確認したものと、子宮角内腔の胎水による拡張および胎子を確認したものとの間に胚子・胎子の早期死滅の発生率の差は認められなかった(表30)。

# 【考察】

生体由来胚を移植した群における胚子・胎子の早期死滅の発生率(6.2%)は、人工授精群(4.6%)とほぼ同様であった。Toteyら[164]は胚移植した牛において、18~20日目(胚移植直前の発情日をO日)に超音波診断装置により妊娠診断が可能であり、その後60日目までに7.1%(1/14頭)の胚子の死滅を認めている。また、Pawsheら[109]は人工授精後のバッファローにおいて18日目から超音波診断装置により妊娠診断し、30~39日の間に8.3%(1/12頭)の胚子の死滅を認めている。これらの報告は、例数が少ないが、胚移植と人工授精後の胚子・胎子の早期死滅を超音波診断装置により調査し、ほぼ同様の発生率であり、本試験における発生率とほぼ一致する。人工授精後の流産発生率は2~5%と報告されている[54,154]が、これらは人工授精後60日以降の流産発生率であり本試験における、人工授精後60日以内の流産発生率においても、ほぼ同様の胚子・胎子の早期死滅の発生率であることが明らかになった。

また、胚子・胎子の早期死滅の発生率は、生体由来胚を移植した群および人工授精群のいずれにおいても、経産牛が未経産牛に比べて高い傾向が認められた。このことは、未経産牛は経産牛に比べて分娩等による細菌感染の機会が少なく、子宮内環境が良好であることを示している。

本試験における、生体由来の凍結胚および新鮮胚移植後の胚子・胎子の早期死滅の発生率

(6.2%およびと4.6%) は、堂地ら[45]の示した凍結胚および新鮮胚移植後における流産発生率(5.1%および4.5%)とほぼ同様であった。第4章第1節における、凍結胚および新鮮胚移植後の流産発生率(8.6%および9.0%)のうち60.0%および46.7%は胚移植後80日以内に発生していることから、酪農家における胚子・胎子の早期死滅も含めた流産発生率は第4章第1節における流産発生率とほぼ同様になると考えられる。一般の酪農家においては、飼養管理が不良であるために、栄養状態や健康状態が良好でない牛が存在し、堂地ら[45]の種畜牧場の流産発生率に比べて若干高い傾向にあったと思われる。

Izaikeら[72]は黒毛和種に2~3個の胚子を新鮮胚移植して、超音波診断装置により、妊娠37日から10日間隔で観察し、妊娠38~57日に胚子の損耗が46.0%(23/50胚)認められたと報告している。本試験においては、胚移植後約18日で超音波診断装置により妊娠診断してから、胚移植後約53日に直腸検査により確認した胚子・胎子の早期死滅の発生率は6.2%であり、妊娠の早期の胚子・胎子の早期死滅の発生率は複数胚移植に比較して、1胚移植では低い傾向にあった。

一般に、通常の胚移植においては、低ランクの胚子は凍結融解後の生存性が低いため、低ランクの胚子は新鮮胚として移植し、良質の胚子を凍結保存している。生体由来胚の新鮮胚移植群において、胚子・胎子の早期死滅の発生率が生体由来胚の凍結胚移植群に比較して、若干高かったことは、低ランクの胚子を新鮮胚として移植したことによると思われる。牛胚の凍結融解後の生存性は、凍結前の品質が高いほど、高いとされている[59,190]。第3章第2節の試験でも、凍結前のランクが優秀胚(A)および優良胚(B)の受胎率は普通胚(C)のそれ(20.8%)に比べて有意に高く(P<0.05)、また、融解後に細胞質の品質を判定した場合、優秀胚(A)および優良胚(B)の受胎率はそれぞれ、38.5%および36.4%で、普通胚(C)のそれに(20.8%)比べて有意に高いこと(P<0.05)が示された。これらの妊娠診断は胚移植後60日頃に実施されていることと、本試験において、低ランクの胚子を移植した生体由来胚の新鮮胚移植群において、胚子・胎子の早期死滅の発生率が生体由来胚の凍結胚移植群に比較して、若干高かった結果から、低ランクの胚子は胚子・胎子の早期死滅の発生率が高い傾向

があると推察される。

妊娠の早期に流産発生率が高い原因としては、一般に胚子側の要因、あるいは母体側の子宮環境が不良であったり、栄養状態の不良により、着床前の胚子および胎子への栄養補給が不十分なことなどが考えられるが、さらに、遺伝子要因の異常に基づく胚子の損耗も無視できないとされている[6]。

IVF由来の凍結胚の移植後の胚子・胎子の早期死滅の発生率と生体由来の新鮮胚および生体由来の凍結胚の移植後の胚子・胎子の早期死滅の発生率間に有意差が認められた(P<0.01)。これは福島ら[55]がIVF由来の凍結胚の融解後の生存性が低いと述べていることと一致する。超音波診断装置を用いて妊娠診断する場合には、胎子を確認したり、胎子の心拍を確認すると良いと云われる[109,164]。しかし、本試験において、妊娠黄体と子宮角内腔の胎水による拡張のみを確認したものと、妊娠黄体と子宮角内腔の胎水による拡張および胎子を確認したものとの間に胚子・胎子の早期死滅の発生率の差は認められなかった。Toteyら[164]は胚移植した牛において、18~20日目(胚移植直前の発情日を0日)に超音波診断装置により妊娠診断が可能であり、その時の胚子の大きさは約4.5 mmであり、心臓の拍動が確認できるのは約23日と述べている。また、Pawsheら[109]は、心臓の拍動が確認できるのは人工授精後約30日で、その時の胚子の大きさは約14.0 mmであると述べている。したがって、胎子を確認したり、胎子の心拍を確認することは、この時期の胎子は小さく、それを探索するには時間を要することから、野外においては、迅速に妊娠診断を行うためにも妊娠黄体と子宮角内腔の胎水による拡張のみを確認するだけで十分であると考えられた。

以上の結果から、超音波診断装置により妊娠と判定した胚移植群307頭のうち19頭(6.2%) および人工授精群391頭のうち18頭(4.6%)において、胚子・胎子の早期死滅が認められたが有意差はなく、IVF由来の凍結胚の移植後の胚子・胎子の早期死滅の発生率と生体由来の新鮮胚および生体由来の凍結胚の移植後の胚子・胎子の早期死滅の発生率間に有意差(P<0.01)が認められることが明らかになった。

# 【小括】

- 一般の酪農家で飼養されている受胚牛について、1胚移植後25日前後で超音波診断装置により、妊娠と診断した牛を、移植後53日前後に直腸検査により妊娠診断を行い、胚子・胎子の早期死滅の発生状況を調査し、人工授精後のそれと比較して、次の成績を得た。
- 1. 胚移植群307頭のうち19頭(6.2%) および人工授精群391頭のうち18頭(4.6%) において、胚子・胎子の早期死滅が発生したが、有意差は認められなかった。
- 2. 妊娠早期の胚子・胎子の死滅の発生率は複数胚移植に比較して、1 胚移植では低いことが明らかになった。
- 3. 未経産牛に比べて経産牛では、胚移植群および人工授精群とも胚子・胎子の早期死滅が多発する傾向にあったが、有意差は認められなかった。
- 4. IVF由来の凍結胚の移植後の胚子・胎子の早期死滅の発生率と、生体由来の新鮮胚および 凍結胚の移植後の胚子・胎子の早期死滅の発生率間に有意差が認められた(P<0.01)。

表27 胚子・胎子の早期死滅の発生状況

# (胚移植と人工授精の比較)

群	超音波診断装置で	直腸検査で	早期死滅の
	妊娠と判定(頭)	不受胎(頭)	発生率(%)
胚移植群⑴	307	19	6. 2
人工授精群	391	18	4. 6

1) 生体由来胚のみ移植した群

表28 胚子・胎子の早期死滅の発生状況

(産歴による比較)

群	未経産牛	経産牛
胚移植群⑴	3/62 (4. 8%) 2)	16/245 (6. 5%)
人工授精群	0/26(0)	18/365 (4. 9)

- 1) 生体由来胚のみ移植した群
- 2) 直腸検査で不受胎頭数/超音波診断による妊娠頭数
  - ( )内は胚子・胎子の早期死滅の発生率(%)

表29 胚子・胎子の早期死滅の発生状況

(胚子の種類による比較)

移植胚	超音波診断装置で	直腸検査で	早期死滅の
	妊娠と判定(頭)	不受胎(頭)	発生率(%)
新鮮胚(生体)	93	7	7. 5%ª
凍結胚(生体)	214	12	5. 6ª
凍結胚(IVF)	36	8	22. 2 <sup>b</sup>

a , b : P<0.01

表30 超音波診断装置による胚子・胎子の確認の有無と

胚子・胎子の早期死滅の発生状況

群	胚子・胎子を確認	内腔の拡張のみを確認
胚移植群♡	13/190 (6.8%) <sup>2</sup> )	14/153 (9.2%) 2)
人工授精群	12/189 (6.3%)	6/202 (3.0%)

- 1) 生体由来胚およびIVF由来胚を含む
- 2) 直腸検査で不受胎頭数/超音波診断による妊娠頭数
  - ( )内は胚子・胎子の早期死滅の発生率(%)

## 第五章 牛における核移植に関する研究

#### 緒言

核移植とは、発生の進んだ胚子の核を未受精卵の卵細胞質に移植して、発生プログラムを 初期化することにより、全能性(産子にまで発生する能力)を獲得させ、これを多数のクロ 一ン個体として作出することである。クローン動物とは、同一遺伝子で構成する個体群を指 し、一卵性双子が最小単位となっている。

Willadsen[181]は割球間の結合が柔らかで、収縮が生じる前の段階の胚子(分離胚)を、透明帯に容れたまま、2個の分離胚を作出している。この分離胚を1組の胚子に分離して、寒天内で生体内培養して、4~5日培養後、寒天を除去して、家畜の子宮に移植する。また、受精後6~7日以降の、収縮度合いの強い胚子、すなわち、桑実胚~胚盤胞を、通常、予め透明帯を除去した後に、内細胞塊を傷つけないように、一組の胚子に切断する。切断した胚子は、透明帯の中に挿入するか、挿入しないまま、受胚家畜の子宮内に移植する。これらの胚子は同一の遺伝形質を有するので、一卵性双子、すなわち、クローンと呼ばれる。このようにして作出されたクローン家畜は3~4個以上の個体に分離あるいは切断することは極めて難しく、通常、2分離に留まるのみである。

McGrathと Solter [95] は、2つの異なる系統のマウスより採取した、受精直後の前核期卵子で、前核の置換を行い、置換卵を受精マウスに移植して、効率に産子を得ている。当初、この方法を使用して胚細胞核を移植すればクローンが得られると期待されていたが、2細胞、4細胞あるいは8細胞期胚の核を移植してもクローンは発生しないことが明らかになった [81, 124, 151]。

その後、この方法は改良されて、核を受け容れる卵細胞質として、除核未受精卵を用いると、核移植卵は受精直後の卵と同様の経過で、分裂を続けることが明らかになった。

Willadsen[184]は、めん羊において、第2成熟分裂中期(Metaphase II:MII期)の染色体を取り除き、この除核未受精卵に8~16細胞期胚の割球を移植して、作出された再構築卵を卵管内に移植して、桑実胚~胚盤胞期胚まで発生させた後、偽妊娠動物に移植して産子を得

ている。これが家畜において初めて生産された核移植由来の産子である。同様の手法を用いて、Pratherら[114]およびWilladsen[185]は牛において、また、Konoら[82]はマウスにおいて核移植由来の産子の生産に成功している。

それ以来、核移植によるクローン牛の生産に関する研究は、アメリカおよびカナダを中心として活発に行われ、一卵性多子[24,186]や継代核移植[144]による子牛の生産に成功している。しかし、今後は産子への発生能低下に伴うドナー核およびレシピエント細胞質間の、細胞周期の問題などが重要な要因になっている[32,38,145]。

現在、最大11頭のクローン牛が生産されていると云う。また、最近では、胚性幹細胞様細胞をドナー核として用い、核移植からの子牛の生産に成功したことが報告されている[136]。わが国では1990年に最初の核移植胚由来の子牛の生産が報告された[169]が、核移植胚の発生能は低く、生産された子牛は1頭であった。その後、核移植によるクローン牛生産に関する研究がいくつかの研究機関で進められたが、核移植胚の発生能を向上させることができず、複数の子牛の生産には成功しなかった。また、核移植により作出された胚盤胞は、移植後の受胎率が低いばかりでなく、流産発生率が高いこと、あるいは過大子が生産され易いことなど[50,132,186]、核移植には多くの問題点が残っている。

## 第一節 牛における核移植に関するクローンの作出の検討

最近、著者らは、活性化未受精卵への核移植を開発し、核移植胚の発生能を向上させることに成功した[84]。この方法により作出した核移植由来胚盤胞の受胎試験を行い、一卵性双子を含む複数例の子牛の生産に成功した。

## 【材料および方法】

#### 1. 核移植胚の作出

受胎試験に供試した核移植胚は、Konoら[84]の方法に従い作出した。すなわち、ドナー胚は、ホルスタイン種に過排卵誘起後、人工授精を施し、授精後5~6日目に回収した生体由来の16~32細胞期胚、および体外受精[73]により作出した同ステージの交雑種F1(ホルスタイン種×黒毛和種)胚を媒精後5日目に使用した。また、レシピエント卵には活性化した牛未受精卵を用いた。以下、過排卵誘起によるドナー胚の作出、体外受精によるドナー胚の作出および牛未受精卵のレシピエント卵の活性化について簡略に述べるが、これらは第5章・第2節において詳細に記述した[5]。

# a. 過排卵誘起によるドナー胚の作出

生体由来のドナー胚の作出には、発情後9~14日間に、卵胞刺激ホルモン(FSH)を注射すると、未成熟卵は急激に発育して、成熟を開始する。核移植用のドナー胚には、このようにして発育した16~64細胞期胚を使用した(以下、第5章・第2節を参照)。

# b. 体外受精によるレシピエント卵およびドナー胚の作出

核移植に用いたレシピエント細胞質は、体外受精卵を用いた。牛卵巣から採取した未成熟卵(卵母細胞)を体外培養して、成熟させ、レシピエント卵とした。さらに、成熟した卵子に受精能獲得・先体反応を誘起した精子を媒精し、5日間体外培養して発育した16~64細胞期胚をドナー胚とした。牛の卵巣皮質には、多数の小卵胞が存在する。一次卵母細胞は減数分裂前期で発育を停止している。この未成熟卵をある条件下で培養すると、分裂は再開する。

屠殺後、採取した新鮮な卵巣を滅菌生理食塩液で適温に保ち、5時間以内に卵子を採取する (以下、第5章・第2節を参照)。

### c. 核移植操作

核移植操作は4段階で行い、①透明帯の切断、②核除去操作、③ドナー核の注入、④細胞融合および活性化よりなる。この詳細は第5章・第2節に列挙した。

### 2. 胚子の輸送

核移植により作出した胚盤胞は、0.25 mlのプラスチックストロー (IMV社;フランス) に、卵管上皮細胞を2日間培養して得られた条件付けTCM199培養液 (5%血清含む) を用いて封入し、39°Cに保温して東京農業大学から栃木県酪農試験場 (酪試) に輸送した。胚子は、移植前に再度検査を行い、形態学的に異常のない胚子を20%血清加修正PBSを入れた0.25 mlのプラスチックストロー (富士平工業・東京またはIMV社;フランス) に再封入し、受胎試験に供した。

#### 3. 受胚牛および胚の移植

受胎試験に用いた受胚牛は、酪試あるいは近郊の酪農家に繋養されている経産および未経産のホルスタイン種である。受胚牛は33頭で、このうち9頭には1胚、20頭には2胚を移植した。また、1頭は生体由来の黒毛和種の胚と核移植したF1胚を1胚ずつ移植した。残り3頭には追い移植を行った。追い移植とは発情時に予め人工授精を実施し、発情後7~8日目に胚を1胚、黄体と反対側の子宮角に移植する方法である。移植には、横穴式移植器(富士平工業・東京またはIMV社;フランス)を用い、2%塩酸プロカイン(プロカイン注・フジタ製薬)による尾椎硬膜外麻酔を施した受胚牛に子宮頚管経由法により移植した。移植に要した時間は、東京農業大学からの輸送時間を含め、4~6時間であった。

### 4. 妊娠診断

妊娠診断は、移植後40日以降に直腸検査法により実施した。また、一部は超音波診断装置 を用いて胎子の確認を行った。

# 5. 分娩誘起処置

分娩予定日あるいは分娩予定日の前日に到っても分娩兆候の弱い受胚牛に対しては、プロスタグランジン $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ; プロナルゴンF; アップジョン社) 25 mgを 1 回あるいは24時間間隔で 2 回 (計50 mg) 筋肉内投与した。また、陣痛が弱く、子宮頚管の弛緩が充分でない受胚牛に対しては、牽引による娩出を実施した。

### 【結果】

胚盤胞に発育した核移植胚を、受胚牛に移植した結果および流産発生状況をそれぞれ、表 31、および表32に示した。受胎率は1胚移植例に比較して、2胚移植例が高い傾向にあったが、同時に流産発生率も高く、前者は1頭(33.3%)であったのに対し、後者では5頭(55.6%)であった。

受胎した受胚牛のうちで分娩したものは、1胚移植区で2頭、2胚移植区で4頭、および生体由来和牛胚との2胚移植区の1頭の合計7頭であった。また、生産された子牛は、生体由来のホルスタイン種が3頭(雄1、雌2)および体外受精由来のF1が4頭(雄3、雌1)であった。

なお、本試験で、4頭の受胚牛にクローン胚をそれぞれ2胚ずつ移植し、そのうち3頭が受胎したが、2頭は流産して、残りの1頭が1頭の子牛を生産した。核移植胚由来の産子の分娩状況および分娩時の子牛体重を表3に示した。表の中でNo.1、2および4は、自然分娩であった。また、No.3、5、6および7は分娩兆候が弱く、分娩が遅延する恐れがあったために、妊娠の279日目あるいは280日目にPGF2αを1回あるいは2回投与した。No.3、5および6では、PGF2α投与後24~33時間目に、牽引により胎子を娩出させた。このうちNo.5は胎子の体重が56 Kgと大きく、娩出時間が延長し、生後10分程度で死亡した。No.7は、PGF2α投与から58時間目(2回目の投与から33時間目)に逆子の状態であったために牽引により娩出させた。しかし、本例は羊水を多量に誤嚥していたために、生後10分程度で死亡した。生後死亡した2頭は、外見上および剖検上異常は認められなかった。

なお、No. 6および7は体外受精由来のクローン胚を2胚ずつ、それぞれ2頭の受胚牛に移植

して生産された一卵性双子であった。

#### 【考察】

核移植胚由来の子牛では、分娩時体重が増大して過大子になる傾向があると指摘されている[132,186]。本試験においても、在胎日数は正常(276~283日)であったにも関わらず、分娩時の子牛体重は若干重い傾向にあった。すなわち、分娩時の子牛体重は、追い移植で双子分娩となったNo.4(31 Kg)を除き、やや重く、ドナー胚の由来がホルスタイン種では雌42.5 Kg、56 Kg、雄52 Kg、F1では雌49.5 Kg、雄49 Kg、52 Kgであった。このような現象は、体外培養された体外受精胚由来の産子でもみられると云われている[94]が、この原因については明らかではない。

核移植に使用したドナー胚が、生体由来の場合と、体外受精由来の場合とでは、受胎率には明らかな差異は認められなかった。しかし、生体由来のドナー胚から作出した核移植胚の受胎例では、全く流産の発生が認められなかったのに対して、体外受精由来のドナー胚を使用した核移植胚では、受胎牛9頭中6頭(66.6%)に胎子の早期死滅ないし流産が発生した。この流産は、移植後45~60日の間に3頭、61~90日の間に3頭、計6頭に認められたが、早期死滅した胎子、流産胎子あるいは胎盤は確認できなかった。しかし、これらのうち超音波診断を実施した3頭においては、いずれも胎子の存在が確認されていた。

一般に核移植胚の発生能は、体外培養された胚ではヒツジ卵管内で体内培養された胚に比べて低いと指摘されている[167]。Bondioliら[24]およびBarnesら[11]はヒツジ卵管内で体内培養して得られた核移植胚盤胞の受胎試験の結果、産子生産率は、それぞれ22.0%(102/463)および21.6%(27/125)であり、また流産発生率はそれぞれ2%および18%と低いことを報告している。

以上の成績から、活性化未受精卵をレシピエント卵として用いる核移植法が、クローン牛作出に有効であることが示された。さらに、クローン牛の生産を効率的に行うためには、より発生能の高い核移植胚を作出する実験系の開発とともに、受胎試験による産子への発生能

を正確に判定し、また、核移植胚の早期死滅、流産等の発生機構を解明して、胎子の損耗防止に努めることが重要であると考えられた。

## 【小括】

クローン牛の生産を目的とし、活性化未受精卵への核移植法により作出した核移植胚の産 子への発生能を検討して、次の結果を得た。

- 1) 受胚牛33頭に4通りの手法により合計53個の核移植胚を移植した結果、13頭(39.4%)が受胎し、一卵性双子1組を含む7頭の子牛が、わが国で初めて誕生した。
- 2) ドナー胚が生体由来の場合と体外受精由来の場合とでは、受胎率に有意差は認められなかった。
- 3) 流産発生率はドナー胚として体外受精由来胚を用いた場合には66.7%(6/9)と高率であった。
- 4) PGF2α投与により分娩を誘起した場合、分娩時の子牛の体重は、双子胎子の1例を除き、42.5 Kg~56.0 Kgと、やや大きくなる傾向を認めた。
- 5)以上の結果から、活性化未受精卵を用いて作出した核移植胚は、産子への発生能を有していることが明らかになった。また、生体由来胚をドナー胚とした場合、核移植胚の産子への発生能が高いことが示唆された。

表31 核移植胚移植成績(移植方法別)

受胎率(%)	流産率(%)	生産率2)(%)
33. 3 (3/9)	33. 3 (1/3)	22. 2% (2/9)
45. 0 (9/20)	55. 6 (5/9)	20. 0 (4/20)
100 (1/1)	0 (0/1)	100 (1/1)
0 (0/3)	0 (0/0)	0 (0/3)
30 <i>A</i> (13/33)	46 2 (6/13)	21. 2 (7/33)
	33. 3 (3/9) 45. 0 (9/20) 100 (1/1)	33. 3 (3/9) 33. 3 (1/3) 45. 0 (9/20) 55. 6 (5/9) 100 (1/1) 0 (0/1) 0 (0/3) 0 (0/0)

<sup>1)</sup> 核移植胚 (F1) と生体由来和牛胚の2胚移植

表32 核移植胚移植成績(ドナー胚の種類別)

ドナー胚の	1胚		2,	2胚		合計	
種類	受胎率(%)	流産率(%)	受胎率(%)	流産率(%)	受胎率(%)	流産率(%)	
生体由来	66.7(2/3)	0 (0/2)	20. 0 (1/5)	0 (0/1)	37. 5 (3/8)	0 (0/3)	
体外受精	16.7(1/6)	100 (1/1)	53. 3 (8/15)	62. 5 (5/8)	42. 9 (9/21)	66.7(6/9)	
合計	33. 3 (3/9)	33. 3 (1/3)	45. 0 (9/20)	55. 6 (5/9)	41. 4 (12/29)	50.0(6/12)	

<sup>2)</sup> 核移植胚による生産率

表33 核移植による産子の生産状況

No	生年月日	性別	体重(Kg)	品種*	分娩誘起	在胎日数	備	考
1	92, 12, 20	雌	42. 5	ホル	_	276日		
2	92, 12, 20	雌	49. 5	F1	_	283		
3	92, 12, 26	雄	52. 0	ホル	$PGF2\alpha$	282	No.1と同-	-父母
4	93, 1, 12	雄	31. 0	F1	_	278	和牛(雌	; 29 Kg) と双子
5	93, 2, 26	雌	56. 0	ホル	$PGF2\alpha$	280	生直死	
6	93, 3, 16	雄	49. 0	F1	$PGF2\alpha$	280	No. 7とー!	卵性双子
7	93, 3, 17	雄	52. 0	F1	PGF $2\alpha$	281	逆子、生ī	直死

\* ホル:ドナー胚は生体由来のホルスタイン種

F1 : ドナー胚はIVF由来の交雑種(ホルスタイン種×黒毛和種)



写真1 核移植により生産された子牛5頭 左からNo. 2, 3, 1, 4, 6 (表33参照)

1個の胚から一卵性多子を作出する核移植技術は、家畜、特に単胎動物である牛においては、家畜改良面に大きく貢献する技術の一つである。McGrathとSolter[95]が、マウスにおいて、最初の前核置換例を報告している。それ以来、この技術は多くの動物種において追究されてきた[167]。

レシピエント卵には、体内で成熟した排卵卵子の代わりに、屠場卵巣由来の未成熟卵子を体外成熟させた卵子が使用されている[168]。また、卵子の成熟開始から、融合までの時間が、その後の発生能に影響を及ぼしている[136]。さらに、ドナー胚の発育ステージも核移植卵の発生能と密接な関連を持ち、一般に発生が進むにつれて、核の再プログラムは困難になるといわれている[50, 167]。

牛胚のドナー胚を生体内で受精すると、8~64細胞期胚が回収されるが、これらは再プログラムを可能にして、ドナー胚の発育ステージによって、核移植卵の発生能には差異がないと云う[175]。

クローンを、多数作出するには、移植可能な胚盤胞を多く作出することが必要である。そのためには、核移植におけるドナー胚とレシピエント卵の具備すべき条件を明確にする必要がある。著者らは、最近、融合に先立って除核後の卵細胞質に活性化処理を施すことで、核移植卵が比較的効率的に胚盤胞期へ発生することを報告している[84]。ドナー胚に関しては、発育ステージが進むほど細胞数が多くなり、得られた核移植卵の絶対数は多くなる。すなわち、ドナー胚の発育ステージは、核移植によって生産される胚子の絶対数に直接影響を与える因子である。

本研究では、活性化処理を施した未受精卵への核移植系において、ドナー胚の発育ステージが、核移植卵の体外における発生能に及ぼす影響を検討した。

## 【材料と方法】

# 1.ドナー胚の作出

ドナー胚は、梶原ら[73]の方法に準じて体外受精により作出した。すなわち、屠場で入手 したホルスタイン種の牛卵巣において直径2~5 mmの小卵胞から、18Gの注射針を付けた注 射筒で卵子を吸引採取する。卵丘細胞が緊密に付着した未成熟卵子のみを回収し、10%牛胎子 血清を含むTCM-199中で2~3回洗浄する。その後、直径35 mmのシャーレ(以下、35 mmシャ ーレと略)に同じ培地を3ml入れ、ミネラルオイルで被い、20時間培養する。培養は39℃、5% CO<sub>2</sub>、95%空気、湿度飽和の条件下で行った。受精には、黒毛和種牛(熱富士、Pクロ125、家畜 改良事業団)の凍結精液を用いた。融解は35°C微温湯で行い、これを10 mMカフェイン加B0 |液[26]で2回洗浄し、 5x10°/m|の精子濃度になるように調整した。ついで、5 units/m|の へパリンを含むBO液で等量希釈した。35 mmシャーレの中に、100 刈の精子懸濁液でドロップ を作成し、ミネラルオイルで被った。ついで、この媒精培地に成熟卵子を50個ずつ導入し、 6時間培養し、受精させた。6時間後に卵子を取り出し、5%牛胎子血清を含むTCM-199で2 ~3回洗浄後、同じ組成の培地3 mlを入れた35 mmシャーレの中で卵丘細胞と共培養した。培 養は39°C 5% CO2、95%空気下で、共培養の条件下で行った。媒精開始後48時間目に、ピペッテ ィング操作により卵丘細胞を除去し、分割状況を検査した。媒精開始後、68、92、116、および 140時間目の検査で、形態が良好と判断された胚子を、核移植のドナー胚として実験に供した。

## 2. レシピエント卵の作出

レシピエント卵は、ドナー胚の作出と同様の方法で卵巣から回収し、体外成熟させた卵子 を用いた。成熟培養22時間目に300 NFU/mlのヒアルロニダーゼおよび1%PVPを含むダルベッコ のPBSに2~3分浸漬した後、卵子を成熟培地に移し、ピペッティング操作により、卵丘細胞 および放線冠細胞を完全に除去した。次いで、実体顕微鏡下で観察し、第1極体が観察され、 かつ細胞質の色調が一様な卵子を用いた。顕微操作は、Willadsen[184]の方法に準じて行っ た。すなわち、第1極体付近の透明帯の円周の1/3に切り込みを入れ、この切り口から微小ピ ペットを挿入し、第1極体と共に卵子の細胞質を吸引除去することで除核した。次いで、吸 引した細胞質を10 µg/mlのヘキスト33342を含むダルベッコのPBS中に10分浸漬した後、落射 蛍光顕微鏡下で観察した。第2減数分裂中期核盤像が観察されたものを除核成功卵と判定し、レシピエント卵として使用するため、10%牛胎子血清を含むTCM-199中で、39℃ 5% CO<sub>2</sub>、95%空気、湿度飽和の条件下で培養した。

#### 3. 活性化処理

除核したレシピエント卵は、成熟培養開始後33時間目に相当する時間に、 $0.05 \text{ mM } \text{CaCl}_2$ および $0.1 \text{ mM } \text{MgSO}_4$ を含む $0.3 \text{ Mマンニトール液に移して}75 \text{ <math>\mu}\text{sec}$ , 1 kv/cmの直流パルスを 2 Point 回通電することで活性化処理を行った。活性化処理後、核移植に供するまで上記の方法で培養した。

## 4. 核移植および融合

ドナー胚は、透明帯を切開して、細胞塊を取り出し、0.25%トリプシンおよび0.4% EDTAを含み、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ を含まないM2液[116]中で、単一の割球に分離させた。次いで、個々に分離したドナー割球を、微小ピペットを用いてレシピエント卵の囲卵腔内に注入した後、5%牛胎子血清を含むTCM-199中で約30分培養し、融合に供した。

融合は、電気的細胞融合装置(島津製作所SSH-1)を用い、成熟培養開始後 42時間目に相当する時間に、1 MHZ, 20 Vの交流を流した後、75  $\mu$ sec, 1 kv/cmの直流パルスを2回通電することで行った。なお、融合用チャンバーには、1 mm幅のステンレスワイヤー電極を用い、融合にはCaCl<sub>2</sub>および0.1 mM MgSO<sub>4</sub>を含む0.3 Mマンニトール液を用いた。割球の分離から融合までの時間は2時間以内とした。

#### 5. 核移植卵の培養

核移植卵はパルス通電後、5 µg/mlのサイトカラシンBおよび5%牛胎子血清を含むTCM-199中で1時間培養した。ドナー割球とレシピエント卵細胞質が融合した胚子は、5%牛胎子血清を含むTCM-199で卵管上皮細胞との共培養により、10日間体外培養を行った。融合日を1日目として、3日目に2および4細胞期胚への分割状況を、4日目に8細胞期胚への分割状況を、8~10日目に桑実胚および胚盤胞への発生状況を調べた。また、培地は48時間ごとに半量ずつ新鮮培地と交換した。

# 6. 統計処理

統計処理は、 $\chi^2$ 検定を用いた。

## 【結果】

媒精後の時間とドナー胚の細胞数の関係を表34に示した。媒精後の時間別に見たドナー胚の細胞数は、68時間区および92時間区で細胞数の平均は同じであったが、その後、116時間区、140時間区と時間の経過に伴い、細胞数は増加した。

媒精後の時間別に見たドナー割球とレシピエント卵細胞質との融合率を、表35に示した。 ドナー胚の時間経過に伴い、融合率は高くなる傾向を示した。68時間区は、116時間区および 140時間区に比べて有意に低かった(P<0.01)。

媒精後の時間別(ドナー胚の発育ステージ別)に見た核移植卵の発生率を、表36に示した。ドナー胚の発育ステージ別に見た2細胞期への分割率は、いずれの区においても高く、73%(140時間区)から87%(116時間区)であった。8細胞期への分割率は、22%から53%であり、140時間区は他の区に比べて有意に低かった(P<0.01)。胚盤胞への発生率は、116時間区で35%と最も高く、他の区に比べて有意に高かった(P<0.01)。特に、92時間区では3%が胚盤胞へ発生したに過ぎず、他の区に比べて有意に低かった(P<0.05)。

#### 【考察】

活性化処理した未受精卵への核移植実験系[84]において、ドナー胚の発育ステージが、核移植卵の発生率に影響を及ぼすことが明らかになった。本試験では、媒精後68~140時間までの体外受精胚をドナー胚として用いたが、これらのドナー胚の細胞数は、8~54個であった。本実験系における核移植卵の胚盤胞への発生率は、116時間目のドナー胚を用いた場合35%と他の区に比べて有意に高い発生率を示した。

また、胚盤胞の一部を受胚牛に移植した結果、正常な産子が得られ、本実験系における核 移植卵が、産子への発生能力を有していることが明らかになった(第5章、第1節参照)。 Westhusinら[175]は、牛において加齢未受精卵子をレシピエント卵として用い、作出した核移植卵を一旦めん羊の卵管内で体内培養する核移植系において、体内受精胚をドナー胚に用い、その発育ステージが核移植卵の発生能に及ぼす影響を検討している。その結果、5および6日齢のドナー胚では、核移植卵の発生率には差がなかったと報告している。またTakanoら[158]は、本実験と同様に体外受精胚をドナー胚として用いた核移植系において、ドナー胚の発育ステージは、8~32細胞期の範囲では核移植卵の発生率に影響ないと報告している。このように両報告とも、ドナー胚の発育ステージによる核移植卵の発生能には、明らかな差異は認められず、ドナー胚の発育ステージの影響については必ずしも明らかではなかった。これは、体内受精由来胚では、受精時期が明らかでなく、正確な発育ステージが特定できないこと、また、本実験に用いた発育ステージより進んだ胚をドナー胚に用いたことも一因と考えられる。また、体外受精胚をドナー胚とした場合には、核移植卵の発生率が低いために、ドナー胚の発育ステージの影響を比較することが困難であると考えられる。さらに、本実験ではレシピエント卵細胞質に活性化刺激を与えた未受精卵を用いるなど、核移植の手法が異なることも原因の一つと考えられる。

本実験の他の一つの特徴は、媒精後68および92時間目におけるドナー胚の、細胞数がほぼ同じであるにかかわらず、92時間目胚を、ドナー胚として用いた場合の核移植卵の発生率が極めて低いことである。これはドナー胚の細胞周期が、核移植卵の発生能に影響を及ぼしたためと推察される。核移植卵の発生能に及ぼす、ドナー胚の細胞周期の影響については、従来、家兎およびマウスで検討されており、家兎ではG1期に同調されたドナー核を核移植に供することで、最も高い発生能が得られている[38]。マウスでは、家兎と同様に電気融合法用いた核移植において、ドナー核の細胞周期はG1期の場合に高いことが報告されている[36]。一方、不活化センダイウイルスを用い、ドナー核とレシピエント卵細胞質の融合後に活性化刺激を与え、極体様の小割球を放出させる核移植系では、G2期の核が適していることも報告されている[83]。

牛では、ドナー胚を細胞分裂阻害剤であるコルセミドあるいはノコタゾールで細胞周期同

期化処理を施し、これを核移植に用いることで発生率が向上することから、ドナー胚の細胞 周期が発生率に影響すると報告されている[145]。本実験においても、細胞周期が発生率に影響を及ぼすことが示唆された。

本実験では、媒精後116時間目の胚を、ドナー胚として用いて35%と高い発生率が得られた。これは、116時間目のドナー胚の割球が、本実験での核移植系に適した細胞周期である割合が高いことによると考えられる。この場合、ドナー胚の細胞周期は、おそらく、G1後期からS期が適していたものと推察されるが、さらに詳細な検討が必要である。今後、多数のクローン牛の作出を実現するためには、さらに優れた核移植と体外培養系の開発が望まれる。

# 【小括】

牛胚の核移植に用いるドナー胚の発育ステージが、核移植卵の体外における発生能に及ぼ す影響を検討し、次の結論を得た。

- 1. ドナー胚は、体外受精胚を用い、媒精後68、92、116および140時間目にレシピエント卵細胞質と融合させた。また、レシピエント卵は体外成熟卵子を除核後、活性化処理して用いた。融合した核移植卵は、体外で牛卵管上皮細胞と共培養した。
- 2. 核移植に供したドナー胚の細胞数の平均は、それぞれ13.6、13.5、23.2および40.5個で、 融合率は82~96%であった。
- 3. 融合した核移植卵を培養した結果、2細胞期への分割率は73~87%であり、116時間区で最も高かった。また、8細胞期への分割率は22~53%で、116時間区で最も高く、140時間区で最も低かった。
- 4. 胚盤胞への発生率は、それぞれ13%(13/102)、3%(2/71)、35%(33/95)および12%(12/99) と92時間区で低く、116時間区で有意に高かった(P<0.01)。
- 5. 本実験において、ドナー胚の発育ステージが核移植卵の発生能に影響を及ぼすことが明らかになり、これはドナー胚の割球の細胞周期の時期の違いによることが示唆された。

表34 ドナー胚の供試時期と細胞数

媒精後時間(h)	供試胚数	細胞数 平均±SD(範囲)	
68	10	13.6±2.9(8~16)	
92	6	13.5±1.5(11~16)	
116	6	23. 2±7. 5 (13~29)	
140	4	40.5±10.3(31~54)	

表35 ドナー胚の融合率

媒精後時間(h)	供試胚数	融合胚数(融合率%)
68	125	102 (82) a
92	79	71 (90)
116	101	95 (94) <sup>b</sup>
140	103	99 (96) <sup>b</sup>

a, b : P<0.01

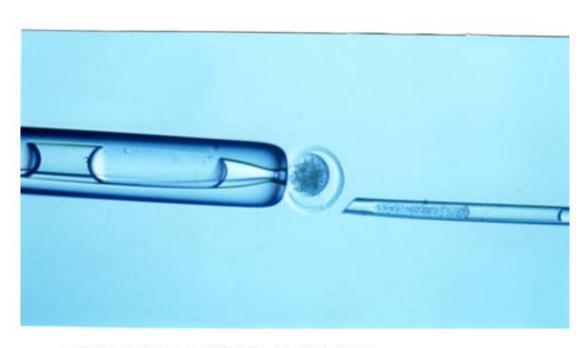
表36 ドナー胚ごとの核移植胚の発生率

媒精後時間(h)	培養数	2細胞期胚数(%)	8細胞期胚数(%)	胚盤胞期胚数(%)
68	102	80 (78)	41 (40) a	13 (13) a
92	71	55 (78)	32 (45) a	2 (3) b
116	95	83 (87) a	50 (53) a	33 (35) c
140	99	72 (73) ь	22 (22) с	12 (12) a

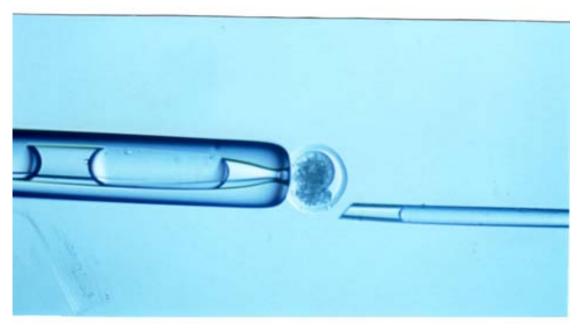
同列異符号間に有意差ありa,b: P<0.05, a,c, b,c:P<0.01



写真2 レシピエント卵子の透明帯の切除



・ 写真3 レシピエント卵子へのドナー細胞(核)注入前



・ 写真4 レシピエント卵子へのドナー細胞(核)注入後

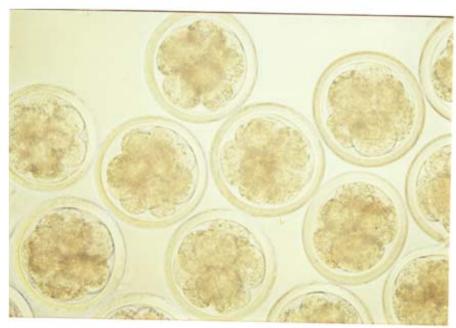


写真5 人工授精後5日で採取したドナー胚16細胞期胚)

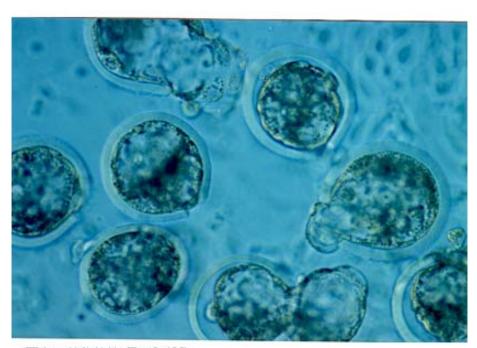


写真6 核移植後7日の胚盤胞

第三節 牛核移植胚のクローン応用試験、特に、繁殖能力、泌乳能力および流産発現等に 関する検討

1987年、Pratherら[114]が核移植胚から子牛の生産に成功して以来、核移植技術による牛生産に関する研究が世界各国で活発に行われている[24,136,144,186]。わが国では、1990年に最初の核移植胚由来の子牛1頭の生産が報告されたが、僅かに1頭であった[169]。著者らは先に核移植胚を作出し、これを主として栃木県酪農試験場(酪試)で飼養しているホルスタイン種乳牛(乳牛)に移植して、核移植胚由来の子牛7頭を生産し、その試験成績について報告した[133]。著者らの観察では、以前の報告にあるように、牛核移植胚を移植した受胚牛では、流産が多発し、また、分娩誘起処置を行って、正常な妊娠期間で分娩させても、過大子が発生することなどが注目された[25,66,132]。

本試験では、その後、継続して行った牛核移植胚の野外応用試験成績をまとめ、産子の生産状況について検討し、さらに、クローン牛の育成状況、産子の繁殖能力、および泌乳能力についても検討した。

## 【材料および方法】

#### 1. 核移植胚の作出

野外の移植試験に供した核移植胚は乳牛および黒毛和種(和牛)に過排卵処理後、人工授精を施し、授精後5~6日目に回収した生体由来の胚、または体外受精[73]により作出した媒精後5日目の交雑種F1(乳牛×和牛)胚をドナー胚として、青野ら[4]の方法により核移植胚の作出を行った。

#### 2. 胚の輸送および受胚牛への移植

胚の輸送および受胚牛への移植は既報[133]の通りに行った。すなわち、ドナー胚は酪試から、東京農業大学総合研究所(農大総研)に輸送し、核移植胚の作出を行った。核移植によ

り作出した胚盤胞は再び酪試に輸送し、酪試近郊の酪農家または酪試場内に飼養されている 経産乳牛および未経産乳牛に移植した。核移植胚の移植頭数の総計は、乳牛が53頭、和牛が2 0頭、体外受精によるF1は33頭、合計106頭である。移植方法は1胚移植が69頭、2胚移植が3 1頭および人工授精後7日目に移植する追い移植が6頭である。

#### 3. 妊娠診断

妊娠診断は、移植後40日以降に直腸検査により実施した。また一部は超音波診断装置を用いて胎子の確認を行った。妊娠診断により妊娠が確認された後、発情の回帰、外陰部からの出血や流産胎子を確認した場合、あるいは再度の直腸検査により胎子の消失を確認した場合には流産と判定した。

### 4. 分娩誘起処置

分娩誘起剤として、黄体退行因子であるプロスタグランジン $F2\alpha$ ( $PGF2\alpha$ : プロナルゴンF; アップジョン社)を使用した。この薬剤には強力な黄体退行作用があり、分娩誘起に使用される。受胚牛の大部分は自然分娩としたが、一部(5頭)は妊娠280日(移植前の発情日をO日とした)前後に $PGF2\alpha$ を1回量25 mgを1ないし2回筋肉内に投与した。

### 5. 産子の繁殖能力の検査

乳牛の核移植胚から生産された雌牛1頭およびF1の核移植胚から生産された雌牛1頭について人工授精を行い、繁殖能力の検査を行った。また、乳牛の核移植胚由来で1994年4月15日および20日に生まれたクローン牛(一卵性双子)の2頭を協同飼料(株)いわき中央牧場において、飼養して、育成状況を調査し、さらに、繁殖能力の検査も行った。

# 【結果】

核移植に用いたドナー胚の品種別の受胎成績は表37に示す通りである。乳牛の核移植胚を53頭に移植した結果、11頭が受胎し、3頭が流産したが、8頭(一卵性双子1組を含む)が生産した。和牛の核移植胚を20頭に移植したうち、8頭が受胎し、2頭が流産したが6頭(1卵性双子1組を含む)が生産した。体外受精によるF1の核移植胚を33頭に移植したうち、12頭

が受胎し、6頭が流産したが、6頭(一卵性双子1組を含む)が生産した。

核移植胚の移植方法別の受胎成績は表38に示す通りである。1 胚移植で69頭移植したうち17頭が受胎、5 頭が流産したが、12頭が生産した。2 胚移植では31頭に移植したうち13頭が受胎し、6 頭が流産したが、7 頭が生産した。追い移植で6 頭移植したうち1 頭が受胎し、流産はなく、1 頭が生産した。このようにして、20頭分娩して、核移植由来の産子は21頭得られたが、2 頭は生直死で、2 頭は死産、1 頭は早産であった(表39)。

牛核移植による妊娠期間と産子の生時体重は表40に示す通りである。PGF2αで分娩誘起を行った牛5頭も含め、乳牛で279.5日、F1で281.5日、和牛で286日で妊娠期間は正常範囲内であった。生時体重の平均は乳牛で46.8 Kg、F1で 45.1 Kg、和牛で37.5 Kgであったが、乳牛で52および56 Kgと過大子が2頭認められ、そのうち1頭は難産により生後1時間以内に死亡した。交雑種F1でも49.0、49.5および52 Kgと過大子が3頭認められた。そのうち1頭は逆子の難産により生後1時間以内に死亡した。

繁殖能力を雌牛2頭の核移植胚の産子について検討した。1頭は体重336 Kg(14カ月齢)の乳牛の雌牛で、1994年3月14日に和牛の凍結精液により人工授精し、1回の授精で受胎し、同年12月18日に25 KgのF1の雌子牛を分娩した。他の1頭は体重379 Kg(15カ月齢)の交雑種F1の雌牛で、1994年4月14日に和牛の凍結精液により人工授精し、同様に1回の授精で受胎し、翌年1月28日に28 KgのF2の雌子牛を分娩した。これら2頭の雌牛は泌乳能力は正常であった。

なお、1994年4月15日(A牛)および4月20日(B牛)に生まれた乳牛の核移植胚による1卵性双子のクローン牛は、生時体重は42.5 Kgおよび48 Kgで、育成中も同様の傾向で体重は推移した。これらのクローン牛は16カ月齢(体重447 Kg)および15カ月齢(体重440 Kg)で、それぞれ乳牛の凍結精液により人工授精を施して受胎した。A牛は妊娠期間282日で分娩し、雄の子牛を生産し、泌乳能力も正常であった。B牛は、妊娠3ヶ月前後に流産した。その後、人工授精により受胎し、正常に分娩した。

### 【考察】

Heymanら[66]は、核移植胚を未経産牛に移植して、35日で50%、90日では30%の受胎率を得ている。Barnsら[11]は、核移植胚を 260頭に移植して25%の受胎率を得ている。本試験の受胎率29.2%(31/106)はこれらの成績とほぼ同様である。

Barnsら[11]は、体外受精による核移植胚および 生体由来核移植胚を移植して、4~6%の流産率であることを示している。また、Heymanら[66]は、生体由来胚を移植して、20%の流産率を示している。本試験では流産率が29%認められ、特に、体外受精によるF1の核移植胚を移植したときに50%と高率であった。Barnsら[11]はめん羊の結紮卵管内で核移植胚を培養して、体外培養の時間の長さが、流産率に影響している可能性を示唆している。しかし、核移植胚において流産発生率が高い理由は体外培養系に起因するというよりも、むしろ、ドナー胚に起因すると考えられる。体外受精由来胚をドナー胚として使用した核移植胚で、胚子の早期死滅あるいは流産の発生率が高い理由は明らかではないが、体外受精由来のドナー胚が、染色体異常などの遺伝子障害を持つ可能性が考えられる。体外受精胚では、染色体異常、特に4倍体が高率に出現することが指摘されている[71]。

Bondioli[25]は核移植胚を移植した場合、過大子が多発することを指摘している。また、Seidel[132]は長期在胎とは無関係に20~30%が過大子であると述べている。本試験の子牛の平均体重は、乳牛で46.8 Kg、F1で45.1 Kg、和牛で37.5 Kgであり、それぞれ妊娠期間は品種別に有意差は認められなかったが、乳牛およびF1では50 Kgを越す過大子が生まれている。このように過大子が核移植において生産されることは注目すべきことであるが、Mayneら[94]や、Behboodiら[13]の報告では、体外受精胚を移植しても過大子が生まれている。一方、Reichenbachら[120]は体外受精胚を移植した受胚牛から帝王切開して生まれた子牛の平均体重は52土6 Kgで、単子で正常分娩で生まれた子牛の体重 46±6 Kgよりも大きいという。このことは、核移植の操作過程に原因があるのではなく、体外培養系に原因があるのではないかと推察される。今後効率良く核移植胚から子牛を生産するためには過大子の問題を解決する必要があ

る。

本試験では、核移植胚から生産された雌牛が2頭分娩し、さらに核移植胚から生産された雌牛2頭(一卵性双子)が人工授精により受胎したことから、核移植胚から生産された雌牛が正常な繁殖能力を持つことが、初めて確認された。また、今回の試験により生産された乳牛の雌牛が分娩後、1年間で約7,000 Kgの乳量を生産し、正常な泌乳能力も持つことが確認された。このことは、クローン牛の増殖・改良に資するところが大きく、今後に期待されるところが極めて大きい。Pratherら[114]や角田[167]は、核移植胚の場合、それぞれの細胞質には異なる卵子に由来するミトコンドリアを含むために真のクローンではない可能性も考えられると述べている。

以上のことから、核移植胚から生産された雌牛の繁殖能力は正常であり、泌乳能力も正常であることが確認された。しかし、同時に牛核移植胚を移植した受胚牛では、流産の頻度が高くなること、また、正常な妊娠期間で分娩させても、過大子が生まれる可能性があることが明らかにされた。

### 【小括】

牛核移植胚の産子への発生能を検定することを目的に、移植試験を実施して、次に示す結果が得られた。

- 1. 移植頭数106頭から一卵性双子3組を含む21頭の産子が生産され、29.2%(31/106)の受胎率が得られた。
- 2. この内、乳牛由来の核移植胚においては53頭に移植して、11頭(20.8%)が受胎し、8頭(15.1%)分娩し、和牛由来の核移植胚においては20頭に移植して、8頭(40.0%)が受胎し、6頭(30.0%)が分娩し、体外受精による交雑種F1由来の核移植胚においては33頭に移植して、12頭(36.4%)が受胎し、6頭(18.2%)が分娩した。
- 3. 流産率は35.5%(11/31)で乳牛および和牛の核移植胚を移植した場合の流産率は、体外受精によるF1の核移植胚に比べて、低い傾向にあった。

- 4. 妊娠期間は、すべて正常な範囲であったが、過大子が認められた。
- 5. 核移植胚由来の雌牛の繁殖能力は正常で人工授精により3頭が分娩し、泌乳能力も正常であった。

表37 牛核移植によるドナー胚の品種別の受胎成績(新鮮胚)

品種	移植頭数	受胎頭数	流産頭数	生産頭数
乳牛	53	11 (20. 8%) 1)	3 (27. 3%) 2)	8 (15. 1%) 3)
和牛	20	8 (40. 0)	2 (25. 0)	6 (30. 0)
F1 (IVF)	33	12 (36. 4)	6 (25. 0)	6 (18. 2)
合計	106	31 (29. 2)	11 (35. 5)	20 (18. 9)

1) 受胎率:(受胎頭数/移植頭数)×100

2) 流産率: (流産頭数/受胎頭数) ×100

3) 生產率: (生產頭数/移植頭数) ×100

表38 牛核移植による移植方法別の受胎成績

移植方法	移植頭数	受胎頭数	流産頭数	生産頭数
1 胚移植	69	17 (24. 6%)	5 (29. 4%)	12 (17. 4%)
2 胚移植	31	13 (41. 9)	6 (46. 2)	7 (22. 6)
追い移植	6	1 (16. 7)	0 (0)	1 (16. 7)
合計	106	31 (29. 2)	11 (35. 5)	20 (18. 9)

表39 牛核移植による産子の生産状況

産子の品種	分娩頭数	産子数			
		単子	双子	三子	合計
乳牛	8	5頭"		1組2	8頭
F1 (IVF)	6	51)	1組③		7
和牛	6	4	1		6
合計	20	14			21

- 1) うち1頭は生直死
- 2) うち1頭は早産
- 3) 双胎で2頭とも死産

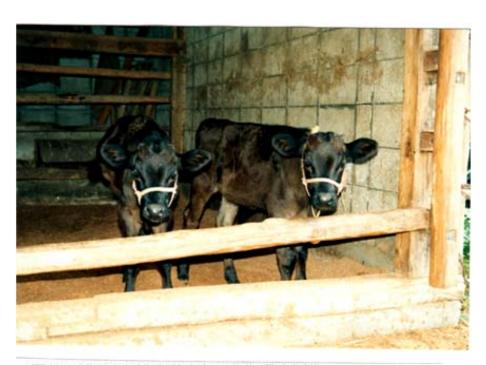
表40 牛核移植における妊娠期間と産子の生時体重

産子の品種	分娩頭数(頭)	妊娠期間(日)	生時体重(Kg)	備考
乳牛	6	279.5日	46. 8	1頭生直死
		(276–282)	(40-56)	
F1 (IVF)	4	281. 3	44. 3	1頭生直死
		(280-283)	(30-52)	
和牛	6	288. 0	38. 3	
		(285-300)	(36-45)	

注:単子分娩のみを集計した



・ 写真7 核移植により生産されたクローン牛(ホルスタイン種)



· 写真8 核移植により生産されたクローン牛(黒毛和種)



写真9 核移植により生産されたクローン牛(ホルスタイン種)とその牛から人工授精により生まれた子牛



写真10 核移植により生産されたクローン牛(交雑種)と その牛から人工授精により生まれた子牛

牛で核移植を実施する目的の一つは、発育の進んだ胚細胞核を初期の状態に戻し(初期化する)、個体を発生させ、同一の遺伝形質を持つ優れた牛(クローン牛)を多数作出することである。1987年、Pratherら[114])が核移植胚から子牛の生産に成功して以来、核移植技術による子牛生産に関する研究が諸外国を中心に、活発に行われている[25,136,186]。著者ら[133]も1992年に核移植胚による産子を得てから、牛核移植胚の野外応用試験を継続して実施し、多数の産子を得ている。また、Stice[144]は継代核移植により産子の生産が可能なことを述べ、このような核移植技術の進歩により、多数の核移植胚を生産することが可能になってきているが、核移植胚の凍結保存胚の作製については、未だ国際的にも困難な問題が多い。

本試験では、核移植胚を直接移植法(ダイレクト法)により、凍結保存後、受胚牛に移植して、その受胎性について検討した。

### 【材料および方法】

### 1. 核移植胚の作出

核移植胚の作出は、以下の方法で行った。

- (1)乳牛に過排卵処理後、人工授精を施し、授精後5~6日目に回収した生体由来の胚子、または体外受精[69]により作出した媒精後5日目の交雑種F1(乳牛×和牛)胚をドナー胚として、青野ら[4]の方法により核移植胚の作出を行った。
- (2)和牛の核移植胚はTakanoら[147]の方法により行った。すなわち、ドナー胚は、過排卵処理を施した和牛より授精後5.5日目に回収した生体由来の胚子を用いた。ついで、0.5 %プロナーゼで透明帯を溶解した後、ピペッティングにより単一割球としたものをドナー割球とした。レシピエント卵には、屠場卵巣由来の体外成熟卵子を用いて、体外成熟培養22~24時間目に除核した後、体外成熟培養開始後33時間目に活性化刺激を与えたものを用い、42時間目にドナー割球との融合を行った。活性化刺激ならびに融合には、反応液としてCa.Mgイオン

濃度を本来の1/10濃度に調整した修正Zimmerman cell fusion mediumを用いて、それぞれ $0.75 \text{ kv/cm} 50 \text{ } \mu \text{sec} 2$ 回、あるいは $1.0 \text{ kv/cm} 50 \text{ } \mu \text{sec} 3$ 回の直流パルスを通電することにより行った。融合された胚は卵丘細胞との共培養下で8日間体外培養を行った。

#### 2. 核移植胚の凍結

核移植により作出した初期胚盤胞~胚盤胞をDouchiら[46]の方法に準じて、1.5 Mエチレングリコールを含む20%子牛血清加PBSで凍結した。室温で10分間平衡した後、-7  $^{\circ}$ Cのプログラムフリーザーに投入し、植氷後、-0.3  $^{\circ}$ C/minで-30  $^{\circ}$ Cまで冷却する。その後液体窒素中で移植まで保存した。

#### 3. 受胚牛への移植

酪試近郊の酪農家または酪試場内に飼養されている経産乳牛および未経産乳牛にダイレクト法により凍結融解後、直接移植した。乳牛の核移植胚は7頭に、和牛の核移植胚は12頭に、体外受精によるF1の核移植胚は18頭にそれぞれ移植した。移植方法は1胚移植および2胚移植である。

### 4. 妊娠診断

妊娠診断は、移植後40日以降に直腸検査により実施した。

#### 【結果】

核移植に用いたドナー胚の品種別の受胎成績は表41に示す通りである。乳牛の核移植胚を7頭に移植したところ、1頭が受胎(受胎率14.3%)し、妊娠8ヶ月齢で双子を流産した。和牛の核移植胚は12頭に移植したところ、2頭が受胎(受胎率16.7%)し、2頭が分娩した(雌、26.7 kgおよび雌40.0 kg)。体外受精によるF1の核移植胚を18頭に移植したが、受胎例は得られなかった。核移植に用いたドナー胚の品種別の受胎成績は体外受精によるF1に比較して、乳牛および和牛の方が高い傾向を示したが、両者に有意差は認められなかった。

生体由来核移植胚の移植方法別の受胎成績は表42に示す通りである。 1 胚移植例では14頭移植したところ2頭が受胎(14.3%)し、2頭が分娩した。2 胚移植例では5頭に移植したとこ

ろ1頭が受胎(20.0%)し、妊娠8ヶ月齢で双子を流産した。生体由来核移植胚の移植方法別の 受胎率において1胚移植に比べて2胚移植の方が高い傾向にあったが、有意差は認められな かった。

体外受精由来の核移植胚の移植方法別の受胎成績では 1 胚移植で10頭および 2 胚移植で 8 頭、それぞれ移植したが、受胎例は得られなかった。

### 【考察】

核移植胚の新鮮胚移植において、Heymanら[66]は、核移植胚を未経産牛に移植して、35日で50%の受胎率であり、90日では30%の受胎率を示している。Barnsら[11]は、核移植胚を260頭に移植して25%の受胎率を得ている。著者らは、第3節の試験において受胎率29.2%(31/106)を得ている。

本試験では、核移植胚を凍結保存後に移植して、乳牛においては受胎率14.3%(1/7)、和牛においては受胎率16.7%(2/12) および体外受精によるF1においてはO(0/18) であった。この結果は、第3節における新鮮核移植胚の成績と比較して、乳牛および和牛では有意差は認められなかったが、体外受精によるF1の核移植胚では有意に低かった(P<0.05)。

VoelkelとHu[170]は核移植胚を、グリセリンを用いたステップワイズ法で凍結保存後に移植し24%(20/83)およびエチレングリコールを用いたダイレクト法で22%(19/85)の受胎率を得て、この成績は核移植胚の新鮮胚移植における、Bondioli[24]の受胎率22.5%とほぼ同様であり、Willadsenら[186]の37.7%(114/302)に比べるとやや低い傾向にあると述べている。本試験の生体由来胚の成績はVoelkelとHu[170]の成績に比較して、若干低い傾向にあった。

福島ら[52]は牛体外受精胚は、生体由来胚および家兎卵管内で培養された体外受精胚に比較して、胚の品質が異なり、耐凍性が低いと述べている。また、Takanoら[147]は生体由来の核移植胚の凍結融解後の生存率は、体外受精胚に比較して低い傾向にあると報告している。このように耐凍性が低い牛体外受精胚に核移植操作を加えたために、さらに耐凍性が低くなったと考えられる。体外受精による核移植胚に適した、耐凍剤および凍結方法については、

さらに検討する必要がある。

核移植胚の移植方法別の受胎率は、1 胚移植に比較して、2 胚移植が高い傾向にあったが、これは第3節の成績とほぼ同様である。核移植胚を2 胚移植する場合には、2 胚とも遺伝的には同一であることから、生まれてくる産子の性別は同一になり、フリーマーチンの心配はなくなるので、受胎率向上のために有効であると考えられた。

Seidel[132]は長期在胎とは無関係に20~30%が過大子であると述べている。一方、Reiche nbach[120]は体外受精胚を移植した受胚牛で帝王切開して生まれた子牛の平均体重は52±6 Kgで、単子で正常分娩で生まれた子牛の体重 46±6 Kgよりも大きいという。本試験の子牛の生時体重は、和牛で26.7 kgおよび40.0 kgであり、妊娠期間は2頭とも290日であった。これらの生時体重および妊娠期間等は和牛の新鮮核移植胚を移植した場合とほぼ同様であった。

Sticeら[145]およびTakanoら[159]は継代核移植により産子の生産が可能なことを認めている。クローン牛を多数作出するためには、継代核移植は有効な方法であるが、新鮮胚移植のままでは、受胚牛の確保が難しい。核移植により作出したクローン胚を凍結保存することは、受胚牛の確保を容易にする。また、数頭分のクローン胚を凍結保存しておき、新鮮胚移植により生産された、それぞれのクローン牛の能力検定を行った後に、能力の高い凍結クローン胚だけを移植することにより、改良の効率化を図ることが可能である。

以上のことから、本試験では野外で応用し易いダイレクト法により移植して、核移植胚から子牛が生産できることが明らかになったので、核移植技術の野外普及に大きく貢献すると考えられる。また、生体由来の核移植胚は体外受精由来の核移植胚よりも、凍結融解後の受胎率が高い傾向が認められた。さらに、核移植胚の移植方法別の受胎率は、1胚移植に比較して、2胚移植が高い傾向にあることが明らかになった。

#### 【小括】

核移植胚をダイレクト法により、凍結保存後、受胚牛に移植して、その受胎性について検 討し、次の結果を得た。

- 1. 核移植に用いたドナー胚の品種別の凍結融解後の受胎率は、体外受精によるF1(0%,0/18)に比較して、乳牛(14.3%,1/7)および和牛(16.7%,2/12)の方が高い傾向を示したが有意差は認められなかった。
- 2. 生体由来核移植胚の移植方法別の凍結融解後の受胎率は、1 胚移植(14.3%, 2/14)に比べて2 胚移植(20.0%, 1/5)の方が高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。
- 3. 核移植胚をダイレクト法により、凍結保存後、受胚牛に移植して、子牛を生産することが可能になり、本法は核移植技術の野外普及に大きく貢献することが明らかになった。

表41 牛核移植胚のダイレクト凍結法による品種別の受胎成績

品種	移植頭数	受胎頭数	流産頭数	分娩頭数
乳牛	7	1 (14. 3%) 1)	1 (100%) 2)	0 (0%) 3)
和牛	12	2 (16. 7)	0(0)	2 (16. 7)
F1 (IVF)	18	0 (0)	0 (0)	0 (0)
合計	37	3 (8. 1)	1 (12. 5)	2 (5. 4)

1) 受胎率:(受胎頭数/移植頭数)×100

2) 流産率:(流産頭数/受胎頭数)×100

3) 分娩率:(分娩頭数/移植頭数)×100

表42 牛生体由来核移植胚のダイレクト凍結法による移植方法別の受胎率

移植方法	移植頭数(頭)	受胎頭数(頭)	流産頭数(頭)	分娩頭数(頭)
1胚移植	14	2 (14. 3%) 1)	0 (0%) 2)	2 (14. 3%) 3)
2胚移植	5	1 (20. 0)	1 (100)	0 (0)
合計	19	3 (15. 8)	1 (33. 3)	2 (10. 5)

1) 受胎率:(受胎頭数/移植頭数)×100

2) 流産率: (流産頭数/受胎頭数)×100

3) 分娩率:(分娩頭数/移植頭数)×100



写真11 凍結核移植胚のダイレクト移植により生産された子牛(黒毛和種)

# 第六章 総合考察

核移植により同一の優良遺伝子を有する家畜を大量に生産すれば、家畜の改良に極めて有益であるばかりでなく、これらクローン家畜を利用することにより、少頭数でも試験研究の精度を高めることが可能になる。また、核移植は、各種家畜において、細胞核が発生のどの時期まで全能性を維持するかを知る上でも重要である。しかし、核移植によるクローン家畜の生産率は、未だ低率である。牛における胚移植に関する研究は1980年代から急速に行われるようになってきたが、その受胎率や子牛の生産率は未だ満足できるものではない。本研究では、胚移植による子牛の効率的な生産を目的として、牛における過排卵処置技術、牛胚の凍結保存技術、および凍結保存胚移植後の流産の発生に関する研究とともに、核移植胚にこれらの技術を応用するために研究を実施した。

従来、過排卵処置法としては卵胞刺激ホルモン剤(FSH)の3~5日間の減量投与法が多く用いられている。過排卵処置の目的は正常胚を多数生産することであるが、正常胚を安定的に確保することは難しく、その方法は未だ確立されているとは云い難い。本研究では、1回当たりの正常胚数を高めるために、FSH、PGF2αおよびGnRHの投与量および投与方法を検討し、さらに、分娩後短期間に多くの正常胚を生産するために、連続して過排卵処置を施して短期間に採胚する方法を検討した。また、栄養面、特にビタミンと採胚成績の関係を明らかにするために、採胚時の供胚牛のビタミン濃度と採胚数および正常胚数などの関係を検討し、さらに、正常胚数を増加させることを目的として、供胚牛にBC、VAおよびVEを含む混合飼料を給与して、VAの前駆物質であるBC濃度と採胚成績の関係を検討した。

和牛の経産牛を用いて、過排卵処置をFSH 20 mgの 4 日間減量投与法(M法)で行い、正常胚数がその他の方法に比べて著しく高く、また、正常胚率も高いことから、過排卵処理法としてはFSH 20 mgの 4 日間減量投与法(M法)が最も有効であることが明らかになった。鈴木ら[155]および小島ら[80]が、和牛の過排卵処置にFSH 24 mgを 3 日間の減量投与法で行うことが可能であると報告して以来、国内では、この方法が一般的に行われてきた。しかし、Donaldson[43]はFSHの総投与量を増加すると採胚数 0 の個体が増加することを示し、Walton

とStubbings[172]は、FSHを3日間よりも4日間の減量投与する方法が、正常胚率が高いことを報告し、Lovieら[91]は減量投与法がFolltropin Vの1回投与よりも正常胚数が多いと報告している。本研究においても、FSHを3日間よりも4日間の減量投与する方法が、正常胚率が高い結果となり、これらの報告と一致する結果が得られた。

従来、連続して採胚する場合には過排卵間隔を2~3カ月に延長し、またFSHとPMSGを交互に使用し、あるいは性腺刺激ホルモン剤の増量投与を行わなければ、採胚数が減少すると云われている[74]。青柳ら[5]はPRIDを用いて1回目と2回目で、性腺刺激ホルモン剤を換えて過排卵処置を行い、24~28日間隔で2回連続採胚を行った結果、2回目の正常胚数は1回目の1/3程度であることを認めている。本研究において、過排卵処置により正常胚を短期間に多数取得するために、採胚後の供胚牛にPGF2αあるいは、その類縁物質を投与して、存在する黄体を早期に退行させ、発情を誘起し、この発情周期に再び過排卵処置を施して、連続採胚を実施した結果、初回の採胚終了直後にPGF2αを投与して、採胚後10日前後に発現した発情から9~14日前後の黄体期に、2回目の過排卵処置を前回同様の方法で施して、連続採胚することは、正常胚の効率的生産に有効であることが明らかになった。

過排卵処置時にGnRHを投与した際の、その効果については、受精率が高まるという報告 [52,184] や、採胚成績には差がないという報告 [112,113,171] や、未受精卵が増え、移植可能 胚が減少するという報告 [172] など、その成果は研究者により様々である。本研究においては、 過排卵処置時におけるGnRHの投与時期は、PGF2α投与後54~60時間が最適の投与時間帯である ことが認められた。本研究の成果は、 PGF2α投与後54時間目にGnRHを投与した方が、48時間 目にGnRHを投与するよりも、採胚数が高いとするFooteら [52] の報告と一致する。しかも、 PGF2α投与後54時間目は、通常の過排卵処置を行った場合、1回目の人工授精の時間帯に当た り、GnRHの投与時期として、最も優れていると考えられる。過排卵処置の目的はいかに多く の正常胚を得るかである。したがって、GnRH 100 μg投与が乳牛では正常胚数および正常胚率 とも最も高く、和牛においても正常胚率が高い傾向にあったことから、過排卵処置時にGnRH を投与する際、100 μg投与が最も効果的であると考えられた。

本研究では、黒毛和種供胚牛の採胚時血漿BC濃度と正常胚数および正常胚率に有意な相関が認められた。Salesら[126]はホルスタイン種の経産牛過排卵処理による採胚成績は、供胚牛にプロゲステロン(P)製剤を留置した日および留置から5日目(過排卵処理開始日)にBC(800または1200 mg)とVE(500または750 mg)を投与することにより、採胚数が増加する傾向を示し、さらに正常胚数も有意に増加すると報告している。その理由として、Salesら[126]はBCとVEの抗酸化作用による胚の品質改善を示唆しており、本研究においても、血漿BC濃度と血漿VE濃度は正の相関を示したことから、両者が抗酸化に作用し、正常胚数が増加したことが考えられる。

Shawら[135]は過排卵処理の1日目に100万単位のVAを注射することにより正常胚数が増加すると報告している。また、卵胞の発育にともない、卵胞液中VA濃度が増加することから、卵胞液中のVAと卵胞発育には重要な相関があると考えられている[129]。一方、BCはVAの前駆物質として卵胞発育に寄与していると考えられており[129]、本研究においても血漿BC濃度と回収した正常胚数の正の相関が認められたことから、BCが卵胞発育や卵子の質的向上に寄与している可能性が考えられる。ホルスタイン種供胚牛にBCとVEを給与すると、経産牛では正常胚数が有意に増加するが、逆に未経産牛では有意に減少することが報告されている[126]。本研究においても、経産牛ではBBSPの継続給与により血漿BC濃度が高くなる傾向がありAランク胚の割合が向上した。一方、初産牛ではBBSPの給与により血漿BC濃度は有意に上昇したが、正常胚数は増加しなかった。未経産牛において、血漿BC濃度上昇と採胚成績に関連が認められなかった原因として、BCは未経産牛において、経産牛よりも低い濃度で卵胞発育作用を示す可能性が考えられる。

わが国において、近年、牛の凍結胚移植数が増加してきたが、凍結胚による受胎率は、45%前後であり、これは新鮮胚に比較して、10%程度減少している。本研究では、凍結胚移植における受胎率の向上を目的として、凍結融解方法の違いによる胚の透明帯の損傷率および形態的変化と受胎率の関係を検討した。また、受胚牛の卵巣の状態が受胎率に及ぼす影響を明らかにするため黄体の形態および血中P値と受胎率の関係について検討した。さらに、凍結胚

移植の野外普及を推進するために技術の簡易化が必要であることから、凍結融解後、顕微鏡下で耐凍剤の除去をするステップワイズ(S)法に比較して人工授精と同じように凍結融解後、すぐに移植できるダイレクト法が高い受胎率を得られるか検討した。

RallとMeyer [118] およびTakeda [161] のグリセリンを耐凍剤とした報告と同様に、凍結胚の融解に際して、透明帯の損傷率は融解温度25℃区が37℃区に比較して有意に低いことが認められた (P<0.05)。受胎率は、融解温度25℃区が37℃区に比較して、約20%高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。武田 [162] は凍結時に胚子がストロー内で空気層に接触するストローの垂直保持では透明帯の損傷率が高いと述べている。しかし、本研究では、ストローの保持方法の違いによる凍結融解胚の透明帯の損傷率に有意差は認められなかったが、凍結融解胚の受胎率は、水平保持の方が有意に高い受胎率であった (P<0.05)。以上のことから、ストローを水平に保持して凍結し、融解は空気中(室温)で10秒間保持後、25℃の温水に投入する方法が、透明帯の損傷も少なく、受胎率も高いことが明らかとなった。

ステップワイズ 法による凍結胚の形態変化と受胎率の関係を検討した結果、本研究でも、凍結前のランクが優秀胚(A:37.7%)および優良胚(B:32.3%)の受胎率は普通胚(C:15.4%)に比べて有意に高いことが明らかになった(P<0.05)。凍結前に優秀胚(A)と判定された胚子は、融解後にランクが低下しても、受胎率に影響は認められなかったが、凍結前に優良胚(B)と判定された胚子は、融解後のランクの低下とともに、受胎率が低下することが明らかになり(P<0.05)、牛胚の凍結融解後の生存性は、凍結前の品質が高いほど、高いと云う報告[61,190]と一致した。

新鮮胚および凍結胚移植時の血中P値および黄体所見と受胎率の関係について検討した結果、胚移植時の直腸検査により分類した、黄体組織が[柔らかい]および[中等度]グループでは、EIA法により測定した血漿P値は、ほぼ3.0 ng/ml以上を示しており、砂川ら[149]の報告と、ほぼ一致した。

Niemannら[102]は、胚移植時の血中P値と受胎率の間に相関関係は認められないが、血中P値が1 ng/ml未満では、受胚牛として不適であり、2.0~5.0 ng/mlが最適であると述べている。

本研究でも、この報告と同様に、新鮮胚および凍結胚移植においても、血中P値が、1 ng/ml 未満の受胚牛では受胎率が低い傾向が認められた。以上の成績から、直腸検査により受胚牛を選定する場合には、黄体組織の柔軟度を指標とし、直腸検査だけで判断が困難な場合には、血中P値を測定して、1 ng/ml以上の受胚牛を選定することにより、受胎率を向上させられることが明らかになった。

グリセリンとショ糖を耐凍剤として用いる Massipら[93]の方法 (M法)と、エチレングリコールを耐凍剤として用いるDouchiら[46]の方法 (D法)の2種類のダイレクト法と、対照としたグリセリンを耐凍剤として用いるS法で、移植試験を実施して検討した。その結果、S法に比較して、M法およびD法において受胎率が高い傾向が確認された。胚子の凍結時の操作性では、ストローに2種類の凍結溶液を充填するM法に比べて、1種類だけを充填するD法が優れ、高い受胎率が安定して得られ、D法が実用性に優れていることが明らかになった。胚子の品質別の受胎率は、S法と同様、ダイレクト法においても優秀胚[A]および優良胚[B]は普通胚[C]に比較して、有意に受胎率が高いことが明らかになった(P<0.05およびP<0.01)。胚子のステージ別の受胎率は、後期桑実胚、初期胚盤胞および胚盤胞が拡張胚盤胞よりも有意に高いことが明らかになった(P<0.05およびP<0.01)。以上のことから、後期桑実胚、初期胚盤胞および胚盤胞のAまたはBランクの胚子をD法で凍結し、移植することにより、胚子の凍結融解時の操作を簡易化でき、高い受胎率が安定して得られることが明らかになった。

胚移植および核移植の最終目的は、優秀な子牛を効率的に生産することにあるので、妊娠中の胚子の早期死滅や流産の発生は、これらの技術の普及・発展を大きく阻害するばかりでなく、農家にとっては、大きな損失となる。そこで、胚移植後の流産の発生時期および発生数を明らかにし、流産予防に役立てるために、妊娠診断後から分娩までの流産の発生を検討するとともに、超音波診断装置を用いて胚移植後の胎子の早期死滅の発生状況を検討した。

胚移植され、妊娠の40~60日に妊娠診断された受胚牛において、堂地ら [45]の種畜牧場における流産発生率に比較して、一般酪農家における流産発生率はわずかに高い傾向が認められた。新鮮胚あるいは凍結胚を移植された受胚牛はともに妊娠80日以内に流産が有意に

高く発生することが認められ(P<0.05)、Kingら[78]の乳用牛および肉用牛に胚子を移植して、 妊娠60~90日に流産が多発(3.15%)したという報告と一致した。以上の結果から、新鮮胚お よび凍結胚移植後の流産発生率には有意差がなく、流産発生時期は新鮮胚および凍結胚とも に妊娠80日以内に有意に多発することが明らかになった。

Toteyら[164]は胚移植した牛において、Pawsheら[109]は人工授精後のバッファロー牛において超音波診断装置により妊娠診断し、胚移植と人工授精後の胚子・胎子の早期死滅は、ほぼ同様の発生率であり、本研究における超音波診断装置により早期妊娠診断した牛の妊娠60日頃までの発生率とほぼ一致した。Izaikeら[72]の報告同様、妊娠の早期の胚子・胎子の早期死滅の発生率は複数胚移植に比較して、1胚移植では低いことが明らかになった。生体由来の新鮮胚および凍結胚の移植後の胚子・胎子の早期死滅の発生率は、IVF由来の凍結胚の移植後のそれに比較して有意に低いことが認められた(P<0.01)。これは福島ら[52]がIVF由来の凍結胚の融解後の生存性が低いと述べていることに一致した。

Willadsen[184]は、めん羊において家畜において初めて核移植由来の産子の生産に成功した。同様の手法を用いて、Pratherら[107]および Willadsen[185]は牛において、核移植由来の産子の生産に成功した。わが国では1990年に最初の核移植胚由来の子牛の生産が報告されたが[169]、核移植胚の発生能は低く、生産された子牛はわずか1頭であった。その後、核移植によるクローン牛生産に関する研究が幾つかの研究機関で進められたが、複数子牛の生産例は少なかった。また、核移植により作出された胚盤胞は、移植後の受胎率が低いばかりでなく、流産発生率が高いこと、あるいは過大子が生産され易いことなど、核移植には多くの問題点が残されている[50,132,186]。そこで、核移植によるクローン牛を効率的に生産するためにドナー胚の発育ステージに関する研究、核移植胚の新鮮胚移植および凍結胚移植に関する研究を行い、さらに核移植胚から生産された雌牛の繁殖能力および泌乳能力に関する研究を行った。

著者らは、Konoら[84]の活性化未受精卵をレシピエント卵として用いる核移植法を応用して、3ヶ月間の短期間に7頭(一卵生双子1組を含む)の核移植胚由来の子牛の生産に成功

した[133]。Simsら[136]は成熟培養開始後42時間目のレシピエント卵を核移植に用いると、 胚盤胞への発生率が高いと報告している。しかし、今回、成熟培養開始後33時間目のレシピ エント卵に直流パルスを2回通電することにより活性化処理を行い、この後、核移植を行い、 電気的刺激により融合させ、さらに卵管上皮細胞との共培養により、胚盤胞を作出し、これ らを受胚牛に移植することにより正常な産子を得ることに成功した。一方、ドナー胚の発育 ステージが核移植胚の発生能に及ぼす影響はないと報告している[158,175]が、今回、体外受 精胚をドナー胚として媒精後116時間目の胚子を用いて胚盤胞への高い発生率(35%)が得られ た。 Westhusinら[175]およびTakanoら[158]の報告は、体内由来胚をドナー胚として用いて いたが、本研究では体外受精胚をドナー胚として用いたために、発育ステージの確認が正確 に出来たこと、活性化未受精卵をレシピエント卵として用いる核移植法を応用したことによ り、胚盤胞への発生率が高かったことが、発育ステージにより核移植胚の発生能に違いが生 じたものと考えられる。さらに、体外受精胚をドナ一胚とした媒精後116時間目の胚子の割球 が、核移植系に適した細胞周期であることが思考された。これはドナー胚の細胞周期が核移 植胚の発生率に影響するとの報告[145]と一致して、この場合ドナー胚の細胞周期は、おそら く、G1後期からS期が適したものと推察された。活性化未受精卵をレシピエント卵として用い、 体外受精胚をドナー胚として媒精後116時間目の胚子を用いて、核移植を行い完全体外培養系 により、胚盤胞の発生率が高められたことから、この方法は核移植由来産子の効率的生産に 有効であると推察された。

核移植により作出された胚盤胞は、移植後の受胎率が低いと云われる[24,186]が、核移植胚の2胚移植が1胚移植に比較して、受胎率が高い傾向にあった。この方法は、核移植胚の有効利用に資するものと考えられる。核移植により作出された胚盤胞は、移植後の流産発生率が高いと云われている[50,186]が、体外受精胚をドナー胚として作出した核移植胚を移植した場合の流産発生率は、生体由来のドナー胚から作出した核移植胚に比べて、高い傾向にあった。体外受精胚由来の核移植胚を移植した際に流産が多い原因は、Iwasaki.とNakahara [71]が指摘しているように体外受精胚では染色体異常が関与していることが原因と考えられ

ている。核移植胚由来の子牛は、在胎日数は正常(276~283日)であったが、出生時の体重が若干重い傾向にあり、これはWilladsenら[186]およびSeidel[132]が指摘したように体重が増大して過大子になるものが存在することを示している。過大子は体外受精胚由来の産子でも認められている[13,94]ことから、核移植の操作過程で原因が生じるのではなく、体外培養系に由来すると推察される。核移植胚を移植した際に、過大子になるものが多いことから、分娩時には適切なる分娩介助等を行い、産子の効率的生産に努める必要があると示唆された。

牛核移植胚からクローン牛の生産に成功しても、産子の繁殖能力および泌乳能力等が正常でなければならない。本研究において、核移植胚由来の雌牛(乳牛およびF1)に人工授精を施し、その後、妊娠、分娩を経て、泌乳あるいは哺乳できることが明らかになり、これら雌牛の繁殖能力、泌乳能力は正常であることが、国内において初めて明らかにされ、今後、核移植胚由来産子(クローン牛)が、農家や試験研究機関において活用化されるための貴重な証明となった。

牛核移植胚の凍結保存は必要不可欠な技術であり、核移植胚をダイレクト凍結法により、簡易に移植する技術の開発が望まれている。本研究では核移植胚のダイレクト凍結胚を受胚牛に移植して、その受胎性について検討した。VoelkelとHu[170]は核移植胚を、グリセリンを用いたS法で凍結保存後に移植し24%(20/83)およびエチレングリコールを用いたD法で22%(19/85)の受胎率を得て、この成績は核移植胚の新鮮胚移植における、 Bondioliら[24]の受胎率22.5%とほぼ同様であり、Willadsenら[186]の37.7%(114/302)に比べ、やや低い傾向にあった。本研究の生体由来核移植胚の成績は VoelkelとHu[170]の成績に比較して、若干低い傾向にあった。核移植胚の新鮮胚移植の受胎率と同様に、核移植に用いたドナー胚の品種別の凍結融解後の受胎率は、体外受精によるF1(0%,0/18)に比較して、乳牛(14.3%,1/7)および和牛(16.7%,2/12)の方が高い傾向を示したが有意差は認められなかった。また、核移植胚の新鮮胚移植と同様、2胚移植により受胎率が向上することが認められた。

以上のことから、核移植胚を効率よく生産することが可能になり、これら核移植胚を移植 して、繁殖能力および泌乳能力の正常な産子が生産できることが明らかになった。また、核 移植胚をダイレクト凍結法により、凍結保存後、受胚牛に移植して、子牛を生産することが 可能になり、本法は核移植技術の野外普及に大きく貢献することが明らかになった。

# 第七章 総括

牛における胚移植に関する研究は1980年代から急速に行われるようになってきたが、その受胎率や子牛の生産率は未だ満足できるものではない。本研究では、胚移植による子牛の効率的な生産を目的として、牛における過排卵処置技術、牛胚の凍結保存技術、および凍結保存胚移植後の流産の発生に関する研究とともに、核移植胚にこれらの技術を応用するために研究を実施した。

### 1 牛における過排卵処置に関する研究

和牛の経産牛を用いて、過排卵処置を次の4方法、C法(FSH 24 mgの3日間減量投与法)、M法(FSH 20 mgの4日間減量投与法)、S法(FSH 12 mgの3日間減量投与法)、P法(FSH 30 mgとPVPの1回投与法)について実施し、さらに各方法ともFSH投与後3日目にPG-Aまたは PGF2αを投与して誘起された発情時期に人工授精を施し、その後、7~8日目に非外科的に採卵して、採卵数、正常胚数、正常胚率を検討した結果、M法は正常胚数が他の方法に比べて、著しく高く、正常胚率も高いことから過排卵処置法として最も有効であることが明らかになった。

採卵後の供胚牛(乳牛および和牛)にPGF2αあるいは、その類縁物質を投与して、存在する 黄体を早期に退行させ、発情を誘起し、この発情周期に再び過排卵処置を施して、連続採卵 を実施した結果、初回の採卵終了直後にPGF2αを投与して、初回の採卵後10日前後に発現した 発情から9~14日前後の黄体期に、2回目の過排卵処置を前回同様の方法で施して、連続採 卵することは、牛胚の効率的生産に有効であることが明らかになった。

過排卵処置 1 回当たりの正常胚数の向上を目的として、過排卵処置時におけるGnRHの応用について検討した結果、過排卵処置時におけるGnRHの投与時期は、 $PGF2\alpha$ 投与後 $54\sim60$ 時間が最適の投与時間帯であり、過排卵処置における GnRHの投与量は $100~\mu g$ が、最も効果的であることが明らかになった。

黒毛和種雌牛の採胚時における血漿 β - カロテン(BC) 濃度と採胚成績の関係を調べた結果、 血漿BC濃度と正常胚数および正常胚率の間に正の相関が認められた。次に、黒毛和種初産牛 および経産牛を用いて、VA、VEおよびBCを含有する混合飼料(BBSP)を給与した場合の血漿成分と採胚成績を検討し、経産牛においては、BBSP給与により血漿BC濃度が高くなるとともに、正常胚およびAランク胚率が高くなる傾向を示した。一方、初産牛においては、BBSPの給与により血漿BC濃度が有意に上昇したものの、採胚数および正常胚数に変化は認められなかった。以上のことから、経産牛において血漿BC濃度は採胚成績と正の相関関係があること、BBSPを給与することにより、正常胚数および正常胚率が向上する可能性が示唆された。

#### 2 牛における胚子の凍結保存に関する研究

胚子を耐凍剤とともに封入したストローをプログラムフリーザー内で水平に保持して凍結し、融解時はストローを空気中(室温)で10秒間保持後、25℃の温水に投入する方法が、ストローを垂直に保持して凍結し、37℃の温水で融解する方法より、透明帯の損傷も少なく、受胎率も高いことが明らかとなった。

凍結胚の凍結前後の形態変化について検討した結果、凍結前の優秀胚は融解後にランクが低下しても、受胎率は変化しないが、優良胚および普通胚は、ランクの低下により、受胎率が低下することが明らかになった。

直腸検査により受胚牛を選定する場合には、黄体組織が柔軟であるものを選定し、直腸検査だけで判断が困難な場合には、血中Progesterone (P) 値を測定して、1 ng/ml以上のものを選定すること、また移植する胚子はできるだけランクの高いものを選定することにより、受胎率向上が図れることが明らかになった。

ステップワイズ法と比較して、直接移植法(ダイレクト法)は室温に保持した凍結溶液に胚子を1段階で投入し、直ちにストローに吸引して、10分間平衡した後、凍結操作に移すことができ、融解後は、耐凍剤の除去を行わずに受胚牛に移植でき、融解から移植までの操作が簡易化できる。グリセリンとショ糖を耐凍剤として用いる Massipら[93]の方法(M法)と、エチレングリコールを耐凍剤として用いるDouchiら[46]の方法(D法)の2種類のダイレクト法とステップワイズ法を比較した結果、D法は採卵から胚子の凍結までの操作性にも優れ、安定して、高い受胎率が得られ、D法が実用性に優れていることが確認された。

# 3 牛における凍結保存胚の異常に関する研究

胚移植され、妊娠の40~60日に直腸検査により妊娠診断された受胚牛において、種畜牧場における流産発生率に比較して、一般酪農家における流産発生率はわずかに高い傾向が認められた。新鮮胚および凍結胚移植後の流産発生率には有意差がなく、流産発生時期は新鮮胚および凍結胚ともに妊娠80日以内に有意に(P<0.05)多発することが明らかになった。

超音波診断装置により早期妊娠診断した牛を妊娠60日頃に再度、直腸検査により妊娠診断した結果、胚移植群および人工授精群において、胚子・胎子の早期死滅の発生率に、有意差は認められず、それは複数胚移植に比較して、1胚移植では低いことが明らかになった。未経産牛に比べて経産牛では、胚移植群および人工授精群とも胚子・胎子の早期死滅が多発する傾向にあった。IVF由来の凍結胚の移植後の胚子・胎子の早期死滅の発生率は、生体由来の新鮮胚および生体由来の凍結胚の移植後のそれに比較して有意に高い(P<0.01)ことが明らかになった。

#### 4 牛における核移植に関する研究

活性化未受精卵をレシピエント卵として用いる核移植法により、3ヶ月間という短期間に7頭(一卵生双子1組を含む)の核移植胚由来の子牛を生産し、活性化未受精卵を用いて作出した核移植胚は、産子への発生能が高いことが明らかになった。妊娠期間は、すべて正常な範囲であったが、過大子が認められ、それに伴う難産の発生も認められたことから、過大子の発生のメカニズムの解明が必要であることが示唆された。また、生体由来胚をドナー胚とした場合、核移植胚の産子への発生能が高いことが示唆された。

さらに効率的に核移植胚を生産するために、牛核移植胚の発生能に及ぼすドナー胚の発育ステージに関する検討を体外受精胚を用いて行った結果、媒精後116時間目の胚を、ドナー胚として用いて35%と高い発生率が得られ、ドナー胚の割球の細胞周期の同期化が必要であることが示唆された。

牛核移植胚の移植後の流産発生率、核移植胚由来雌牛の、繁殖能力および泌乳能力に関する検討を行った結果、乳牛および和牛のドナー胚由来の核移植胚を移植した場合の流産率は、

IVFによるF1のドナー胚由来の核移植胚に比べて、低い傾向にあった。核移植胚由来の雌牛(乳牛およびF1)の繁殖能力は正常で、泌乳能力も正常であることが国内においては初めて明らかにされた。

核移植胚をダイレクト法により、簡易に移植する技術の開発が牛核移植技術の普及のために必要であることから、核移植胚のダイレクト凍結胚を受胚牛に移植して、その受胎性について検討した。その結果、核移植胚をダイレクト法により、凍結保存後、受胚牛に移植して、核移植に用いたドナー胚の品種別の凍結融解後の受胎率は、IVFによるF1と比較して、乳牛および和牛の方が高い傾向を示し、1胚移植に比べて2胚移植の方が高い傾向にあることを認めた。核移植胚をダイレクト法により、凍結融解後に簡易に受胚牛に移植して、子牛を生産することが可能であることが明らかになった。

本研究によって、エチレングリコールを耐凍剤として用いるダイレクト法を活用して、凍結胚移植により子牛を生産することが可能であることが明らかになった。また、核移植における流産発生率は胚移植の場合に比較して高いなどの問題もあるが、核移植によりクローン牛を生産し、その繁殖能力および泌乳能力が正常であることが確認された。以上の結果から、過排卵処置技術およびダイレクト凍結法などの胚移植技術の核移植への応用は可能であることが示された。さらに、これらの成果は子牛の効率的生産を目的とする牛胚移植技術の野外普及に貢献する可能性が示めされた。

以上の結果から、核移植胚を効率高く生産することが可能になり、エチレングリコールを耐凍剤として用いるダイレクト法を核移植胚に応用して、子牛を生産することが可能であることが明らかになった。また、生産された核移植胚由来雌牛の繁殖能力および泌乳能力の正常性も確認されたことから、これらの成果は牛核移植技術の野外普及に大きく貢献することが明らかになった。

# 第8章 英文抄録(Summary)

The first was reported 20 years back (Prather R. et al. 1987) to produce calves from nuclear transferred embryos. However, the production rate of calves from nuclear transferred embryos is very low. Thus objective of this study was to produce calves from nuclear transferred embryos efficiently. In this study, we investigated freeze preservation of nuclear transferred embryos and occurrence of abortion after transfer of frozen nuclear transferred embryos.

### 1 The study of superovulation in cattle

The superovulation were conducted in Japanese Black cattle using 4 methods, C method (FSH24 mg in a decreasing 3 days treatment schedule), M method (FSH20 mg in a decreasing 4 days treatment schedule), S method (FSH12 mg in a decreasing 3 days treatment schedule), P method (a single injection of FSH 30 mg dissolved in polyvinylpyrolidone). PG-A or PGF2 $\alpha$  was administered 48 hrs after FSH first injestion, cows were artificial inseminated at induced estrus, and then the flushing was done 7-8days later. It was suggested that M method was the superior schedule, because the number of viable embryos and the rate of viable embryos by M method was higher than that by the other methods.

Donor cows were superstimulated using FSH administered in a decreasing dose schedule. Embryos were recovered non-surgically on 7 days after Al. Immediately after the embryo collection, PGF2  $\alpha$  was administered to the donors in order to induce estrus. All of the donors responded to PGF2  $\alpha$  administration and exhibited estrus about 10 days later. Treatment for subsequent superovulation was started 9-14days after the estrus. It was suggested that donor cows were capable of producing satisfactory numbers of viable embryos under repeated superovulation in intervals as short as 33 days apart.

To evaluate the utilization of gonadotropin releasing hormone analogue (GnRH-A) as a superovulatory agent, the donor cows were injected with 100 or 200  $\mu$ g of GnRH-A at 54-60 hrs after PGF2  $\alpha$  injection. It was suggested that the injection with 100  $\mu$ g of GnRH-A at 54-60 hrs after PGF2  $\alpha$  injection was the most effective in a superovulatory schedule.

It was investigated that the relationship between the plasma  $\beta$  -carotene (BC)

concentrations of Japanese Black cows that had undergone superovulation treatment and the embryo collection results. It was suggested the possibility that the plasma BC concentrations are positively correlated with the embryo collection results, and it is possible that feeding with BBSP increases the number and ratio of normal embryos.

### 2 The study on freezing of bovine embryos

The freezing of embryos was done by holding a straws horizontally in alcohol bath exhibited lower rates of zona pellucidae damaged than that of the freezing of embryos in straws by holding a straws vertically. Warming the embryos in straws by holding in air for 10 sec and then in water at 25  $^{\circ}$ C was lower rates of zonae pellucidae damaged than that of the warming the embryos in straws by holding in air for 10 sec and then in water at 37  $^{\circ}$ C. Warming the embryos in straws by holding in air for 10 sec and then in water at 25  $^{\circ}$ C exhibited higher pregnancy rate.

We examined the incidence of fracture damage to the zonae pellucidae and blastomeres after the cryopreservation of bovine embryos. The pregnancy rate of grade A (excellent) embryos before freezing was 37.7 % in spite of the zonae pellucidae and blastomeres were damaged after the cryopreservation. Low pregnancy rate was obtained after transfer of embryos with damaged zonae pellucidae and blastomeres.

High pregnancy rate was obtained when recipients were selected by rectal palpation with soft corpus luteum. Higher pregnancy rate was obtained after transfer of embryos which were higher grade, and when the recipients were selected with high serum progesterone level (1 ng/ml<).

The direct transfer method was simple without dilution of cryoprotectant when compared with stepwise method. This study investigated the use of ethylene glycol (EG) and glycerol+sucrose(Gly+Suc) as a cryoprotectant in the direct transfer of frozen-thawed bovine embryos, and compared it with stepwise method. It was suggested that EG was effectively used for freezing and direct transfer of bovine embryos with out addition of sucrose because technique was simple for freezing and higher pregnancy rate was obtained.

3 The study of abnormality of transferred embryos after frozen-thawed in cattle

The abortion rate of recipients which identified after pregnancy diagnosed on day 40-60 by rectal palpation in the field condition was tend to be slightly higher than that of recipients in National Livestock Breeding Station. The abortion rate of recipients after transfer of embryos tended to be slightly higher than that of artificial insemination. There was no difference in abortion rate between recipients transferred of frozen-thawed embryos and recipients transferred of fresh embryos. The results were indicated that abortion rate of recipients transferred of frozen-thawed embryos and fresh embryos were significantly higher within first 80 days.

The occurrence of embryonic death following transfer of embryos in vivo was similar to that of artificial insemination. The occurrence of embryonic death in the early stage of gestation following transfer of one embryo was lower than that of transfer of multiple embryos. Both in ET group and AI group, the tendency of occurrence of embryonic death in cows was higher than that of heifers. The occurrence of embryonic death following directly transfer of frozen-thawed embryos from IVF was significantly higher than that of fresh embryos or frozen-thawed embryos.

#### 4 The study of nuclear transfer in cattle

It was suggested that activated ooplasts are suitable for in cloning of bovine embryos by nuclear transfer. 7 calves (including identical twin) were produced by nuclear transfer. The birth weight of some calves was above the average without prolonged gestation. It was suggested that the efficiency of producing clones were lower in in vitro produced donor embryos than in vivo produced donor embryos. It was suggested that the efficiency of producing cleaved embryos were higher when embryos recovered after 116h from artificial insemination, and it was necessary to synchronize of the cell cycle of donor embryo with recipient oocyte.

In Holstein cows and Japanese Black cattle, the abortion rate of cloned embryos derived from IVF was tend to be higher than that of cloned embryos derived from in vivo. It was indicated that the reproductive ability and lactational performance of the cows born by nuclear transfer were normal.

The pregnancy rates of in vivo derived cloned embryos tended to be higher than that of cloned embryos derived from IVF. The pregnancy rate of twin-embryo recipients tended

to be higher than that of single embryo recipients. The results of the present study indicate that direct transfer of frozen-thawed cloned embryos was beneficial to application of nuclear transfer.

To conclude, it was indicated that the repeated superovulation by M method (FSH20 mg in a decreasing 4 days treatment schedule) with 100  $\mu$ g of GnRH at54-60 hrs after PGF2 $\alpha$  injection was efficient to collect many donor embryos. It was indicated that direct transfer of frozen-thawed cloned embryos was beneficial to application of nuclear transfer. It was indicated that the reproductive ability and lactational performance of the cows by nuclear transfer were normal.

It was suggested that these results were beneficial to spread the nuclear transfer.

# 参考文献

- 1. Acree JA, Echternkamp SE, Kappes SM, Luedke AJ, Holbook FR, Pearson JE, and Ross GS. (1991) Failure of embryos from bluetongue infected cattle to transmit virus to susceptible recipients or their offspring. Theriogenology 36:689-697.
- 2. Almeida AP Fo. (1987) Superovulatory responses in dairy cows treated repeatedly with PMSG. Theriogenology 27:205 (Abstr.)
- 3. Anderson GB, Cupps PT, Drost M, Horton MB, and Wright RW. Jr. (1978) Induction of twinning in beef heifers by bilateral embryo transfer. J Anim Sci 46:449-452.
- 4. 青野文仁、河野友宏、外丸祐介、青野文仁、高橋知子、荻原 勲、関沢文夫、荒井 徹、中原達夫. (1994) 牛核移植卵の発生能に及ぼすドナー胚の発育ステージの影響. J Reprod Dev 40: j35-j40.
- 5. 青柳敬人. 岩住安晃. 和地秀一. 福井 豊. 小野 斉. 堀江功一. (1985) ホルスタイン 種乳牛に対するProgesterone releasing intravaginal deviceの応用. 日獣会誌 38: 641-645.
- 6. 青柳敬人、岩住安晃、和地秀一、権 五鏡、高橋芳幸、金川弘司、宮本明夫、梅津元昭、正木淳二. (1987) ウシの過剰排卵処置におけるPMSGとFSHの比較、特に血漿ステロイドホルモンの動態と胚回収成績について. 家畜繁殖誌 33:167-172.
- 7. Armstrong DT. (1993) Recent advances in superovulation of cattle. Theriogenology 39:7-24.
- 8. Austin CR. (1951) Observation on the penetration of the sperm into the mammarian egg. Aust J Sci Res, Ser B 4:581-596.
- 9. Balakrishnan M, Bhaskar BV, Chinnaiya GP, Arora VK, Ramu A, and Sarma PA.
  (1993) Total cholesterol concentration in relation to superovuratory responses
  in crossbred cows. Theriogenology 40:643-650.

- 10. Bank H, and Maurer RR. (1974) Survival of frozen rabbit embryos. Exp Cell Res 89:188-196.
- 11. Barns F, Endebrock M, Loony C, Powell R, Westhusin M, and Bondioli K. (1993)

  Embryo cloning in cattle :the use of in vitro matured oocytes. J Reprod Fertil 97:317-320.
- 12. Bastidas P, and Randel RD. (1987) Effects of repeated superovulation and flushing on repuroductive performance of Bos Indicus cows. Theriogenology 28:827-835.
- 13. Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Kreuscher BR, Medorano JF, and Murray JD. (1995) Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology 44:227-232.
- 14. Betteridge KJ, and Mitchell D. (1974) Embryo transfer in cattle: Experience of twenty-four completed cases. Theriogenology 1:69-82.
- 15. Bielanski A, Schneider U, Pawlyshyn VP, and Mapletoft RJ. (1986) Factors affect
  -ing survival of deep frozen bovine embryos in vitro: The effect of freezing
  container and method of removing cryo-protectant. Theriogenology 25:429-437.
- 16. Bilton RJ, and Moore NW. (1976) In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. Aust J Biol Sci 29:125-129.
- 17. Bilton RJ, and Moore NW. (1976) Storage of cattle embryos. J Reprod Fertil 46: 537-538 (Abstr.)
- 18. Bilton RJ. (1980) Preservation of embryos of the large domestic species. IXth Congr Anim Reprod and Al; Madrid, 245-253.
- 19. Bo GA, Hockley DK, Nasser LF, and Mapletoft RJ. (1994) Superovuratory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. Theriogenology 42:963-975.

- 20. Boland MP, Crosby TF, and Rowson LEA. (1975) Twin pregnacy in cattle established by non-surgical egg transfer. Brit Vet J 131:738-740.
- 21. Boland MP, McDonnell HF, Ahmed TS, and Reid JFS. (1986) Use of fenprostalene in superovulated beef heifers. Vet Rec 119:241-242.
- 22. Boland MP, Goulding D, and Roche JF. (1991) Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. Theriogenology 35:5-17.
- 23. Bolton VN, Oades PJ, and Johson MH. (1984) The relationship between cleavage,

  DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. J Embryol Exp

  Morph 79:139-163.
- 24. Bondioli KR, Westhusin ME, and Looney CR. (1990) Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology 33:165-174.
- 25. Bondioli KR. (1992) Commercial cloning of cattle by nuclear transfer.

  In: Proceding symposium on cloning mammals by nuclear transplantation;

  Fort collins, Colorado, 35-38.
- 26. Brackett BG, and Oliphant G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro.

  Biol Reprod 12:260-274.
- 27. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, and Dressel MA. (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol Reprod 27:147-158.
- 28. Breuel KF, Baker RD, Butcher RL, Townsend EC, Inskeep EK, Dailey RA, and Lerner SP. (1991) Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows.

  Theriogenology 36:241-255.
- 29. Briggs R, and King T. (1952) Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's egg. Proc Natl Acad Sci USA 38:455-463.

- 30. Britton AP, Miller RB, Ruhnke HL, and Johnson WH. (1988) The recovery of ureaplasmas from bovine embryos following in vitro exposure and ten washes.

  Theriogenology 30:997-1003.
- 31. Bulman DC, and Wood PD. (1980) Abnormal patterns of ovarian activity in dairy cows and their relationship with reproductive performance. Anim Prod 30:177-188.
- 32. Cambell KHS, Ritchie WA, and Wilmut I. (1993) Nuclear-cytoplasmic interaction during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implication for deoxyribonucleic acid replication and development. Biol Reprod 49:933-942.
- 33. Chang MC. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. Nature 168:697-698.
- 34. Chang MC. (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature 184:466-467.
- 35. Cheng WTK, Moor RM, and Polge C. (1986) In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. Theriogenology 25:146 (Abstr.)
- 36. Cheong HT, Takahashi Y, and Kanagawa H. (1993) Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. Biol Reprod 48:958-963.
- 37. 千葉 敦、及川 恒. (1990) 無発情の繁殖和牛におけるPGF2 α とLH-RH類縁物質併用投 与後定時授精による受胎成績. 日獣会誌 43:13-17.
- 38. Collas P, Pinto-Correia C, Ponce De Leon FA, and Robl JM. (1992)

  Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle

  morphology in nuclear transplant rabbit embyos. Biol Reprod 46:501-511.
- 39. de Loos FAM, Bevers MM, Dieleman SJ, and Kruip ThAM. (1991) Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. Theriogenology 35:537-

546.

- 40. Dobson H, Rowan TG, Kippax IS, and Humblot P. (1993) Assessment of fetal number, and fetal placental viability throughout pregnancy in cattle. Theriogenology 40:411-425.
- 41. 百目鬼郁男. (1980) ウシにおける排卵をめぐる性ステロイドの動態. 家畜繁殖誌 26: 29-35.
- 42. Donaldson LE. and Perry B. (1983) Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. Theriogenology 20:163-168.
- 43. Donaldson LE. (1984) Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. Theriogenology 22:205-212.
- 44. Donaldson LE. (1985) Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. Vet Rec 117: 489-491.
- 45. 堂地修、高倉宏輔、今井敬、橋谷田豊.(1990) 胚移植における流産. 北海道牛受精卵移植研究会会報 No9:25-28.
- 46. Douchi O, Imai K, and Takakura H. (1995) Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. Anim Reprod Sci 38: 179-185
- 47. Ectors FJ, Delval A, Smith LC, Touati K, Remy B, Beckers J-F, and Ectors F.

  (1995) Viability of cloned bovine embryos after one or two cycles of nuclear transfer and in vitro culture. Theriogenology 44:925-933.
- 48. Eddy RG, and Clark PJ. (1987) Oestrus prediction in dairy cows using an ELISA progesterone test. Vet Rec 120:31-34.
- 49. Evans MJ, and Kaufman MH. (1981) Establishment in culuture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292:154-156.
- 50. First NL, & Prather RS. (1991) Genomic potential in mammals.

- Differentiation 48:1-8.
- 51. Folman Y, Ascarelli I, Kraus D, and Barash H. (1987) Adverse effect of  $\beta$ -carotene in diet on fertility of dairy cows. J Dairy Sci 70:357-366.
- 52. Foote RH, Allen SE, and Henderson B. (1989) Buserelin in a superovulatory regimen for Holstein cows: II. Yield and quality of embryos in commercial herds. Theriogenology 31:385-392.
- 53. Foulkes JA, Cookson AD and Sauer MJ. (1982) Artificial insemination of cattle based on daily enzyme immunoassay of progesterone in milk. Vet Rec 111:302-303
- 54. Franks GC, Coley SL, Betterbed B, and Page D. (1986) The effect of freezer type, cryoprotectant, and processing methods on viability of frozen embryos.

  Theriogenology 26:135-144.
- 55. 福島護之, 冨永敬一郎, 秦谷 豊, 内海恭三. (1992) ウシ体外受精由来胚盤胞の凍結能についての特性. J Reprod Dev 38: j49-j54.
- 56. Garcia GJK, Seidel GE. Jr, and Elsden RP. (1982) Efficacy of shortened treatment for superovulating cattle. Theriogenology 17: 90 (Abstr).
- 57. Grasso F, Guilbault LA, Roy GL, and Lussier JG. (1989) Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. Theriogenology 31:1209-1220.
- 58. 花田 章、包旭日干(1985) イオノホアA23187で処理したヤギ射出精子の体外における 透明帯除去ハムスター卵子への侵入. 家畜繁殖誌31:115-121.
- 59. 花田 章、鈴木達行、塩谷康生(1986) 体外成熟卵子の体外受精により得られた牛胚の 非外科的移植による受胎出産例. 第78回日本畜産学会講演要旨 78:79(Abstr.)
- 60. Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, and Foote RH. (1983) Superovulatory responses of Holstein cows. Theriogenology 19:83-99.

- 61. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, and Foote RH. (1987) Effect of donor embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer progam. Theriogenology 27:139-168
- 62. Hasler JF. (1992) Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. J. Dairy Sci 75:2857-2879.
- 63. Heape W. (1890) Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. Proc R Soc Lond 48:457-458.
- 64. Heuwieser W, Ferguson JD, Guard CL, Foote RH, Warnick LD, and Breickner LC.

  (1994) Relationships between administration of GnRH, body condition score and fertility in Holstein dairy cattle. Theriogenology 42:703-714.
- 65. Heyman Y, Chesne P, Chupin D, and Menezo Y. (1987) Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with trophoblastic vesicles.

  Theriogenology 27:477-484.
- 66. Heyman Y, Chesne P, Lebourhis D, Peynot N, and Renard JP. (1994) Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source: in vivo versus in vitro. Theriogenology 42:695-702.
- 67. Hoppe PC, and Whitten WK. (1972) Does X chromosome inactivation occur during mitosis of first cleavage? Nature 239:520.
- 68. Hruska K. Jr. (1991) The effect of length of cryopreservation on the viability of bovine embryos in a commercial operation. Theriogenology 36:477-484.
- 69. Huhtinen M, Rainio V, Aalto J, Bredbacka P, and Maki-Tanila A. (1992) Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows.

  Theriogenology 37:457-463.
- 70. Inaba T, Mezan M, Shimizu R, Nakao Y, and Mori J (1986) Plasma concentrations of  $\beta$ -carotene and vitamin A in cows with ovarian cyst. Jpn J Vet Sci 48:1275-

- 71. Iwasaki S, and Nakahara T. (1990) Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastcysts fertilized in vitro followed by culuture in vitro or in vivo in rabit oviducts. Theriogenology 33:669-675.
- 72. Izaike Y, Suzuki O, Shimada K, Takenouchi N, and Takahashi M. (1991)

  Observation by ultrasonography of embrionic loss following the transfer of two or tree embryos in beef cows. Theriogenology 36:939-947.
- 73. 梶原 豊、後藤和文、小坂昭三、中西善彦、小川清彦. (1987) 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. 家畜繁殖誌 33:173-180.
- 74. 金川弘司 (1988) 牛の受精卵移植(第2版)近代出版(東京)
- 75. Kaneda Y. Domeki I. Kamomae H. and Nakahara T. (1978) Synchronization of estrus and ovulation with intramuscular injection of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  followed by additional synthetic LH-releasing hormone in the cow. Jpn J Anim Reprod 24:121 –128 (in Japanese).
- 76. Kastelic JP, Bergfelt DR, and Ginther OJ. (1991) Ultasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. Theriogenology 35:569-581.
- 77. Kennedy LG, Boland MP, and Gordon I. (1983) Effect of bovine quality on survival after rapid freezing and thawing. Theriogenology 19:135 (Abstr.)
- 78. King KK, Seidel GE Jr, and Elsden RP. (1985) Bovine embryo transfer pregnancies. 1. Abortion rates and characteristics of calves. J Anim Sci 61: 747-757.
- 79. Kojima T, Soma T, and Oguri N. (1987) Effect of Rapid addition and dilution of dimethyl sulfoxide and 37°C equilibration on viability of rabbit morulae thawed rapidly. Cryobiology 24:247-255.

- 80. 小島敏之、相馬 正、小栗紀彦. (1989) FSH-Pによる多排卵誘起処置および1回 授精が採卵成績に及ぼす影響. 日畜会報 60:721-727.
- 81. Kono T, Shioda Y, and Tsumnoda Y. (1988) Nuclear transplantation of rat embyos.

  J Exp Zool 248:303-305.
- 82. Kono T, Tsumnoda Y, and Nakahara T. (1991) Production of identical twin and triplet mice by nuclear transplantation. J Exp Zool 257:214-219.
- 83. Kono T, Kwon OY, Watanabe T, and Nakahara T. (1992) Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different cell stages of the second cell cycle. J Reprod Fertil 94:481-487.
- 84. Kono T, Sotomaru Y, Aono F, Takahashi T, Ogiwara I, Sekizawa F, Arai T, and Nakahara T. (1994) Effect of ooplast activation on the development of nuclear transferrd eggs in cattle. Theriogenology 41:1463-1471.
- 85. Kumakura T, Kaneda Y, Miyake Y, Goto T, and Kanematsu S. (1989) Ovarian function and fertility after timed insemination following the treatment with  $PGF_{2\alpha}$  and LH-RH analogue in the cow. Jpn J Anim Reprod 35:185-192 (in Japanese).
- 86. Kvansnickii AV. (1951) Interbreed ova transplantation. Sovetsk Zootec 1:36-42 (Anim Breed Prod 19:224)
- 87. Kweon OK, Kanagawa H, Takahashi Y, Ymashina H, Seike N, Iwazumi Y, Aoyagi Y, and Ono H. (1986) Factors affecting superovulation response in cattle. Jpn J Vet Sci 48:495-503.
- 88. Leibo SP, West AW, and Perry BA. (1982) A one-step method for direct non surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. I. Basic studies.

  Cryobiology 19:673-674 (Abstr.)
- 89. Leibo SP. (1984) A one-step method for direct non surgical transfer of frozen-

- thawed bovine embryos. Theriogenology 21:767-790.
- 90. Lerner SP. Thayne WV. Baker RD. Henschen T. Meredith S. Inskeep EK. Dailey RA. Lewis PE, and Butcher RL. (1986) Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. J Anim Sci 63:176-183
- 91. Lovie M, Garcia A, Hackett A, and Mapletoft RJ. (1994) The effect of dose schedule and route of administration on superovuratory response to Folltropin in Holstein cows. Theriogenology 41:241 (Abstr).
- 92. Lubbadeh WF, Graves CN, and Spahr SL. (1980) Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows. J Anim Sci 50:124-127.
- 93. Massip A, and Van Der Zwalmen P. (1984) Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. Vet Rec 115:327-328.
- 94. Mayne CS, McCaughey WJ, and McEvoy J. (1991) Practical implications of embryo transfer on dairy herd. In: Proceeding of summer meeting at reading university July 1991 on cattle fertility. 39-46.
- 95. McGrath J, and Solter D. (1983) Nuclear transplantation in the mouse embyo microsurgery and cell fusion. Science 239:463-464.
- 96. 中原高士、谷之木精悟、坊園正恒、岩崎英昭. (1990) 凍結融解過程におけるウシ卵子 のストロー内での封入位置と透明帯損傷との関係. 家畜繁殖誌 36:184-187.
- 97. Nakanishi Y, Kajisa O, Ezoe K, Goto K, Tasaki M, Ohta H, Inohae S, Tateyama S, Kawabata T, and Ogawa K. (1991) Relationship between blood constituents and embryo quality in donor cattle. Anim Sci Technol (Jpn) 62:546-551.
- 98. Nakao T. (1980) Practical Procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. Acta Endocrinol 93:223-227.
- 99. Newcomb R, Christie WB, and Rowson LEA. (1980) Fetal survival rate after the surgical transfer of two bovine embryos. J Reprod Fertil 59:31-36.

- 100. Niemann H, Sacher B, Schilling E, and Smidt D. (1982) Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method. Theriogenology 17:102(Abstr.)
- 101. Niemann H. (1985) Freezing of bovine embryos: Effects of a one-step addition of 1.4M glycerol. Theriogenology 23:369-379.
- 102. Niemann H, Sacher B, and Elsaesser F. (1985) Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen / thawed bovine embryos. Theriogenology 23:631-639.
- 103. Nolan R, OCallaghan D, Duby RT, Lonergan P, and Boland MP. (1998) The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following super ovulation in beef heifers. Theriogenology 50:1263-1274.
- 104. 及川 大、中尾敏彦、森好政晴、河田啓一郎. (1987) ポリスチレンビーズを固相とした脱脂乳中Progesterone濃度測定用EIAキットの基礎的ならびに臨床応用的検討. 家畜繁殖誌 33:64-72.
- 105. 岡田啓司、佐藤 繁、鈴木利行、金田義宏. (1990) 乳牛の血液の保存条件とプロジェステロン濃度の変化. 日獣会誌 43:115-117.
- 106. 大津昇三、角田龍司、笠原民夫、大野光男、佐々木捷彦、谷中 匡、湊 芳明(1983) 乳用種未経産牛の過剰排卵処置後の発情発現と受胎成績について. 家畜繁殖誌 29: 194-197.
- 107. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, and First NL. (1985) Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. Theriogenology 24:537-549.
- 108. Pawlyshyn, Lindsell CE, Braithwaite M, and Mapletoft RJ. (1986) Superovulation of beef cows with FSH-P: A dose-response trial. Theriogenology 25:179 (Abstr.)

- 109. Pawshe CH, Appa KBC, and Totey SM. (1994) Ultrasonographic imaging to monitor early pregnancy and embrionic development in the buffalo(<u>Bubalus bubalis</u>).

  Theriogenology 41:697-709.
- 110. Pierson RA, Kastelic JP, and Ginther OJ. (1988) Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses.

  Theriogenology 29:3-20.
- 111. Pope CE, Pope VZ, and Beck LR. (1984) Live birth following cryopreservation and transfer of a baboon embryo. Fertil Steril 42:143-145.
- 112. Posadas E, Valencia J, Zarco L, and Avila J. (1991) Evaluation of the incorporation of GnRH into a superovulatory regimen for Zebu cattle.

  Theriogenology 35:761-767.
- 113. Prado Delgado AR, Elsden RP, and Seidel GE Jr. (1989) Effects of GnRH on superovurated cattle. Theriogenology 31:317-321.
- 114. Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, and First NL. (1987)

  Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol Reprod 37:859-866.
- 115. Prather RS, Spure MF, and Schalles RR. (1987) Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos. Theriogenology 28:195-204.
- 116. Quinn P, Barros C, and Whittingham DG. (1982) Preservation of hamster oocytes
  to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. J Reprod Fertil 66:161
  -168.
- 117. Rajamahendran R, and Walton JS. (1990) Effect of treatment with estradiol valerate on endocrine changes and ovarian follicle populations in dairy cows.

  Theriogenology 33:441-452.
- 118. Rall WF, and Meyer TK. (1989) Zona fracture damage and its avoidance during

- the cryopreservation of mammalian embryos. Theriogenology 31:683-692.
- 119. Reeves JJ, Rantanen NW, and Hauser M. (1984) Transrectal real-time ultrasound scanning of the cow reproductive tract. Theriogenology 21:485-494.
- 120. Reichenbach HD, Liebrich J, Berg U, and Brem G. (1992) Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. J Reprod Fertil 95:363-370.
- 121. Remsen LG, and Roussel JD. (1982) Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfers. Theriogenology 18:365-372.
- 122. Renard J-P, Heyman Y, and Ozil J-P (1982) Congelation de lembryon bovine:

  Une nonvelle methode de decongelation poue le transfert cervical d'embryos conditionne's une seule bois en paillettes. Ann Med Vet 126:23-32.
- 123. Roberts SJ. (1986) 獣医産科・繁殖学一その診断と治療一(臼井和哉、河田啓一郎 監訳)東京:学窓社;68-89.
- 124. Robl JM, Prather RS, Barnes FL, Eyestone WH, Northy D, Gilligan B, and First

  NL. (1987) Nuclear transplantation in the bovine embryos. J Anim Sci 64:642-647.
- 125. Rossant J. (1976) Postimolantation development of blastomeres from 4-and 8-cell mouse eggs. J Embryol Exp Morp 36:283-290.
- 126. Sales JNS, Dias LMK, Viveiros ATM, Pereira MN, and souza JC. (2008) Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with  $\beta$ -carotene and tocopherol. Anim Reprod Sci 106:77-89.
- 127. Saumande J, and Chupin D. (1977) Superovulaition: A limit to egg transfer in cattle. Theriogenology 7:141-149.
- 128. Schiewe MC, Schmidt PM, Wildt DE, and Rall WF. (1990) Quality control measures

- in an embryo research program. Theriogenology 33:9-22.
- 129. Schweigert FJ, Lutterbach A, Rambeck WA, and Zucker H. (1986) Vitamin A and  $\beta$ -carotene concentrations in bovine follicular fliid in relationship to follicle size. J Vet Med A 33:360-364.
- 130. Schweigert FJ, and Zucker H. (1988) Concentrations Vitamin A,  $\beta$ -carotene and Vitamin E in individual bovine follicles of different quality. J Reprod Fertil 82:575-579
- 131. Schweigert FJ. (2003) Research note: changes in the concentration of  $\beta$ -carotene  $\alpha$ -tocofherol and retinol in the bovine corpus luteum during the ovarian cycle. Arch Anim Nurt 57:307-310.
- 132. Seidel GE Jr. (1992) Overview of cloning mammals by nuclear transplantation. In:

  Proceding symposium on cloning mammals by nuclear transplantation:

  Fortcollins, Colorado. 1-4.
- 133. 関沢文夫、荒井 徹、河野友宏、外丸祐介、青野文仁、高橋知子、荻原 勲、中原達夫. (1994) 牛における核移植胚の移植による一卵性双子の作出. J Reprod Develop 40: j31 j34.
- 134. 関沢文夫、斉藤光男、久利生正邦、飛田府宣、荒井 徹、中原達夫(1996) 牛胚移植後の流産発生状況. J Reprod Dev 42: j25-j27.
- 135. Shaw DW, Farin PW, Washburn SP, and Britt JH. (1995) Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle.

  Theriogenology 44:51-58.
- 136. Sims MM, and First NL. (1993) Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells. Theriogenology 39: 313. (abstr.)
- 137. Singh EL. (1987) The disease control potential of embryos. Theriogenology 27: 9-20.

- 138. Smith LE Jr, Sitton GD, and Vincent CK. (1973) Limited injections of follicle stimulating hormone for multiple births in beef cattle. J Anim Sci 37:523-537.
- 139. Smith L, and Wilmut I. (1989) Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. Biol Reprod 40:1027-1035.
- 140. Sreenan JM. (1975) Successful non-surgical transfer of fertilized cow eggs. Vet Rec 96:490-491.
- 129. Stanley CJ, Paris F, Webb AE, Heap RB, Ellis ST, Hamon M, Worsfold A, and Boath JM. (1986) Use of a new and rapid milk progesterone assay to monitor reproductive activity in the cow. Vet Rec 118:664-667.
- 142. Stepto PC, and Edwards RG. (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 2:366.
- 143. Stevens RD, Seguin BE, and Mommot HW. (1993) Simultaneous injection of PGF $_{2\alpha}$  and GnRH into diestrous dairy cows delays return to estrus. Theriogenology 39: 373-380.
- 144. Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurla M, and Phillips PE. (1991) Producing multiple generations of bovine nuclear transplant embryos. Theriogenology 35:273.

  (abstr.)
- 145. Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurla M, and Muttews L. (1993) Donor blastomere cell cycle stage affects developmental competence of bovine nuclear transfer embryos. Theriogenology 39:318. (abstr.)
- 146. Sugie T. (1965) Successful transfer of afertilized bovine egg by non-surgical techniques. J Reprod Fertil 10:197-201.
- 147. 杉江 佶. (1973) 牛の人工妊娠の技術化に関する研究. 農林水産技術会議事務局研究成果. 62:1-172

- 148. 杉江 佶 編著(1989) 家畜胚の移植 東京 養賢堂 234-291.
- 149. 砂川政広、須藤平次郎、笠原民夫、角田龍司、大津昇三. (1987) 牛受精移植における 受卵牛の黄体形状及び血中プロジェステロン値と移植成績. 群馬農業研究 C 畜産第 4 号 1-3.
- 150. 砂川政広、田中尚道、笠原民夫、斉田好之、堀沢 純、恩田正臣. (1991) 低単位の卵胞 刺激ホルモンによる黒毛和種未経産牛の過排卵処理. 畜産の研究 45:747-749.
- 151. Surani MAH, Barton SC, and Norris ML. (1986) Nuclear transplantation in the mouse: Heritable differences between paternal genomes after activation of the embryonic genome. Cell 45:127-136.
- 152. 鈴木 修、居在家義昭、島田和宏、荒木玄朗、小杉山基昭. (1988) 受精卵移植による 牛の双子生産技術の開発に関する研究 第1報 過剰排卵誘起牛における卵胞発育、排 卵、卵回収. 中国農研報 2:21-33.
- 153. 鈴木達行、下平乙夫、藤山雅照(1983) ウシ凍結受精卵の1段階ストロー法による移植 家畜繁殖誌 29:162-163.
- 154. 鈴木達行、下平乙夫、酒井豊、松田修一、三浦秀夫、伊藤一伸. (1986) 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 32:44-47.
- 155. 鈴木達行、松田修一、酒井 豊、石田隆志、三浦秀夫、伊藤一伸(1987) FSHの3日間投与によるウシの多排卵処理. 畜産の研究 41:88.
- 156. Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata A, and Matsuoka K. (1990) Comparison of one step sucrose dilution and direct transfer of frozen bovine embryos in glycerol and 1,2-propanediol. Theriogenology 33:334(Abstr.)
- 157. 高橋芳幸(1983) ホルスタイン種未経産牛におけるPMSG-PGF2αによる過剰排卵処理と 非手術的卵回収. 家畜繁殖誌 29:74-79.
- 158. Takano H, Koyama K, Kozai C, Kato T and Tsunoda Y. (1993) Effect of aging of recipient oocytes on the development of bovine nuclear transfer embryos in

- vitro. Theriogenology 39:909-917.
- 159. Takano H, Kozai C, Shimizu S, Kato Y, and Tsunoda Y. (1997) Cloning of bovine embryos by multiple nuclear transfer. Theriogenology 47:1365-1373.
- 160. Takeda T, Elsden RP, and Seidel GE Jr. (1985) Survival of cryopreserved bovine embryos cooled at 0.5 or 1°C/minute. Theriogenology 23:232(Abstr.)
- 161. Takeda T, Elsden RP, and Seidel GE Jr. (1987) Use of sucrose during removal of cryoprotectants after thawing eight-cell mouse embryos. Theriogenology 28:101 -108.
- 162. 武田哲男. (1990) 卵子・胚の凍結保存、特にウシにおける理論と実際. 産婦人科の世界 42:633-638.
- 163. Takedomi T, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Taya K, Watanabe G, and Sasamoto S. (1995) Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. Theriogenology 43:1259-1268.
- 164. Totey SM, Singh G, Taneja M, and Talwar GP. (1991) Ultrasonography for detection of early pregnancy following embryo transfer in unknown breed of Bos indicus cow. Theriogenology 35:487-497.
- 165. Trounson AO, and Mohr L. (1983) Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 305:707-709.
- 166. Tsunoda Y, Tokunaga T, Sugie T, and Katsumata M. (1985) Production of monozygotic twins foolowing the transfer of bisected embryos in the goats. Theriogenology 24:337-342.
- 167. 角田幸雄. (1992) ウシ胚の核移植. 日本畜産学会報 63:192-220.
- 168. 牛島 仁、角田幸雄、江頭哲雄、今井裕. (1991) 牛8-64細胞期胚割球ならびに胚盤胞内 細胞塊細胞核由来再構築胚の体外発生能. 家畜繁殖誌 37:15-19.
- 169. Ushijima H, and Eto T. (1992) Production of a calf from a nuclear transfer

- embryo using in vitro matured oocytes. J Reprod Dev 38:61-65.
- 170. Voekel SA, and Hu YX. (1992) Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos.

  Theriogenology 37:23-37.
- 171. Voss HJ, Allen SE, Foote RH, Im P. Kim C-K, and Aquadro P. (1989) Buserelin in a superovulatory regimen for Holstein cows: I. Pituitary and ovarian hormone response in an experimental herds. Theriogenology 31:371-384.
- 172. Walton JS, and Stubbings RB. (1986) Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-Friesian cows. Theriogenology 26:167-177.
- 173. Warwick BL, and Berry RO. (1934) Results of mating rams to Angora female goats.

  Proceeding American Society Animal Production 27th Annual Meeting. 225-227.
- 174. Warwick BL, and Berry RO. (1949) Inter-generic and interspecific embryo transfer. J Hered 40:297-303.
- 175. Westhusin NE, Pryor JH, and Bondioli KR. (1991) Nuclear transfer in the bovine embryo; a comparison of 5 day, 6 day, frozen-thawed and nuclear transfer donor embryos. Mol Reprod Dev 28:119-123.
- 176. Whitingham DG. (1971) Survival of mouse embryos after freezing and thawing.

  Nature 233:125-126.
- 177. Whittingham DG, Leibo SP, and Mazur P. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. Science 178:411-414.
- 178. Whittingham DG. (1975) Survival of rat embryos after freezing and thawing.

  J Reprod Fertil 43:575-578.
- 179. Willadsen S, Polge C, and Rowson LEA. (1974) Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. Cryobiology 11:560 (Abstr.).
- 180. Willadsen S, Polge C, and Rowson LEA. (1978) The viability of deep-frozen cow embryos. J Reprod Fertil 52:391-393.

- 181. Willadsen SM. (1979) A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature 277:298-300.
- 182. Willadsen SM. (1981) The developmental capacity of blastmeres from 4- and 8-cell sheep embryo. J Embryol Exp Morph. 65:165-172.
- 183. Willadsen SM, Lehn-Jensen H, Fehilly CB, and Newcomb R. (1981) The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of nonsurgically collected cow embryos. Theriogenology 15:23-29.
- 184. Willadsen SM. (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature 320:63-65.
- 185. Willadsen SM. (1989) Cloning of sheep and cow embryos. Genome 31:956-962.
- 186. Willadsen SM, Janzen RE, McAlister RJ, Shea BF, Hamilton G, and McDermand D.

  (1991) The viability of late morulae and blastcysts produced by nuclear

  transplantation in cattle. Theriogenology 35:161-170.
- 187. Willett FL. et al. (1951) Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. Science 113:247.
- 188. Wilmut I, and Rowson LEA. (1973) Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet Res 92:686-690.
- 189. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, and Campbell KHS. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385:810-813.
- 190. Wright JM. (1985) Commercial freezing of bovine embryos in straws.

  Theriogenology 23:17-29.
- 191. Wubishet A, Graves CN, Spahr SL, Kesler DJ, and Favero RJ. (1986) Effects of GnRH treatment on superovulatory responses of dairy cows. Theriogenology 25: 423-427.
- 192. Wubishet A, Kesler DJ, Graves CN, Spahr SL, and Favero RJ. (1991) Preovulatory

- LH profiles of superovulated cows and progesterone concentrations at embryo recovery. Theriogenology 35:451-457.
- 193. Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M, and Suzuki T. (1994) Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. Theriogenology 41:747-755.
- 194. Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, and Hachinohe Y. (1982) Experiments in the freezing and storage of equine embryos. J Reprod Fertil 32: (Suppl.) 399-403.
- 195. Yanagimachi R, and Chang MC. (1964) In vitro fertilization of golden hamster.

  J Exp Zool 156:361-376.
- 196. 谷中 匡、井田京子、佐々木捷彦、湊 芳明、吉田 敏. (1986) EIAキットによる牛乳中Progesterone濃度の測定ー試料採取条件の検討および早期妊娠診断への応用ー. 家畜繁殖誌 32:63-68.
- 197. 関東農政局 (1989) 第2回関東地域受精卵移植技術等連絡協議資料 .
- 198. 農林水産省 家畜生産課 (2010) ホームページ統計資料

# 謝辞

稿を終えるに臨み、終始、御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました岡山大学大学院自然科学研究科教授 奥田 潔博士に深甚なる謝意を表します。また、論文投稿に際して御指導を戴きました岩手大学農学部助教 澤井 健博士に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の実施に当たり、御指導と御鞭撻を賜りました故中原達夫博士、並びに、東京農業大学農学部教授 河野友宏博士に心より感謝いたします。

さらに、本研究の実施に当たり、多大なる御協力を戴きました、荒井 徹氏、上野 修氏、青野文仁氏および栃木県酪農試験場改良繁殖部の諸氏に対して感謝申し上げます。