

# アメリカに於ける家畜受精卵 移植技術の現況と将来の展望

講 師

アメリカ・コロラド州立大学家畜受精卵移植研究所長

教 授      ジョージ・E・サイデル博士

1986年 2月

家畜改良事業団

## 講師の紹介

講師 ジョージ・E・サイデル博士のプロフィール



ジョージ・イー・サイデル・ジュニア (George E. Seidel Jr) 博士はペンシルベニア州の酪農家の御出身であります。

長じてペンシルベニア州立大学酪農学科に学ばれ学士号を取得(1965)次いでコーネル大学農学部畜産学科に於いて生理学を専攻され、牛の精液、人工授精、受精卵移植に関する研究によって修士、博士号を取得されました。その後ハーバード大学医学部に於いてウサギ卵の電子顕微鏡観察に関する研究に従事された後、

1970年にコロラド州立大学の家畜繁殖学研究陣のスタッフとして迎えられ、今日に及んでおられますが、この間1978年にはエール大学生物学部にてほ乳動物の受精卵に於ける顕微手術 (Microsurgery) の応用について研究されました。研究分野は精液生産に影響する諸要因、体外授精と卵の培養、過排卵と受精卵移植、受精卵の顕微手術研究、ほ乳動物データの統計処理の応用等であります。学生に対しては細胞生物学、内分泌学及び繁殖生理学の講義をされています。

現在はコロラド州立大学受精卵移植研究所所長、教授の要職にあり、国際受精卵移植学会の設立に尽され、会長理事を兼任されるなど同学会の発展に大きく貢献されており、この分野での著書・論文も多く国際的な第一人者であります。

**COLORADO AGRICULTURE SERVICES**

11928 Williams Way  
Denver, Colorado 80233

Phone (303) 457-3606  
FAX (303) 457-9944

**Heidi Yamamoto, Ph.D.**



コロラド・アグリカル  
チャー・サービス社長。

北海道の酪農家の長男  
で酪農学園大学卒業であ  
ります。

アメリカには先ず農業  
研修生として渡米、肉牛  
牧場で2年間実習されま  
した。

その後、再渡米、ネブラスカ州立大学畜産学部を卒業、次いでコロラド州立大学  
で修士、博士号取得（畜産）。

1979年、コロラド・アグリカルチャー・サービス社を設立、今日に至ってい  
ます。

現在、農産物、農機具の輸出、農業情報の取扱い、日米農業関係者交流の促進、  
受精卵移植業界での事業と広汎な活動をしておられます。

なお、アメリカではHeidi Yamamoto Ph.D（ハイジ・ヤマモト博士）  
と呼ばれています。

## 家畜受精卵移植技術研修セミナー開催場所

1. 日時場所      1986年2月18日   午後1時～4時  
福島県白河市中田   白河文化センター  
受講対象      農林水産省福島種畜牧場が家畜受精卵移植技術研修会既受講者を対象に一年後再度行う事後検討会に参加した技術者をはじめ東北各県の関係者
  
2. 日時場所      1986年2月20日   午前10時～12時  
東京都中央区銀座   紙パルプ会館  
受講対象      家畜改良事業団が開催する受精卵移植問題懇談会出席の学識経験者及び在京関係技術者
  
3. 日時場所      1986年2月21日   午後3時～5時  
東京都千代田区有楽町   日比谷三井ビル  
受講対象      日本家畜人工授精師協会が開催する第14回家畜人工授精師全国研修大会出席者



## 目 次 (Contents)

I	受精卵移植産業 ( Embryo Transfer Industry ) .....	1
II	受精卵移植の利用法 ( How to make best use of Embryo Transfer ) .....	5
III	過排卵処置の方法 ( How Cows are superovulated ) .....	8
IV	外科的か非外科的が良いか ( Surgical or non surgical? ) .....	11
V	受精卵の顕微手術 ( Microsurgery to Embryos ) .....	12
VI	受精卵の凍結法 ( Protocol for freezing bovine Embryos ) .....	18
VII	世界の受精卵移植概況 ( 参考 ) ( The present status of Embryo Transfer in the world (1984) ) .....	19
VIII	受精卵移植によって生れた子牛の正常性 ( 参考 ) ( Normality of calves resulting from Embryo Transfer ) .....	26



# I 受精卵移植産業

( Embryo Transfer Industry )

## 1. 産業への挑戦

### 1) 発展

Heape 博士が アンゴラウサギの生殖器から受精卵を回収し、代理の雌ウサギに移植して最初の受胎成功例を報告した 1891 年から 1971 年にかけては、受精卵移植技術は繁殖の方法を研究するための実験的手段にとどまっていた（ベートリッジ，1981）。しかしながらヨーロッパ産外来種であるリムジンやシンメンタールの導入が北米やオーストラリア、ニュージーランドで大流行したために、受精卵移植は繁殖の手段として発展することとなり、獣医師や動物学者にとって大きな経済的刺戟となった（ミカール，1980；シャルツ，1980）。彼等はこれらの純粋な外来種の雌を急速に増やしたいと考えていた。というのは、これらの雌牛の導入上、国際的な検疫と商業ベースでの制限があるため、頭数が極めて不足していたからである。彼等の最初の行動は稀少で流行的な子牛を販売することから利益を得たのであって、遺伝子の導入は二次的な問題であった。

このように家畜の受精卵移植技術は、政府からの基礎的な調査研究としてではなく、生産者や投資家の金で商業ベース上の生産手段として発展してきた。これは躊躇している牧場や大農場の中からの広がりによって動かされたのではなく、むしろ消費者からのサービスとして要求されたものであった。技術の精巧さや成熟度、供卵牛の遺伝的価値、あるいは子牛の育成効果を高める期待などは問題外であった。

データによると商業ベース上の受精卵移植は 90% 以上が牛対象であった。したがって論文の題材の大部分が牛に関連していた。のみならずこの技術は牛以外の家畜と絶滅の危機に陥った種の保存に対する情熱と印象づけが潜在していた。

1977 年には牛市場は不景気で外来遺伝子がだぶついた。ところが進んだ受精卵移植技術は牛生産の活用のために再評価されるところとなった。そして商業ベース上での発展は切りつめられてはきたが経済的な足がかりではあった。この時期までの商業ベースでの受精卵移植では、依頼主から巨大な利益を得た者や、供卵牛からの受精卵の生産がだぶついたり、本来必要な受精卵が不足したりしてきびしい経済的損失を被った者などがあった。

受精卵移植の歴史的背景は、この最も新しい家畜生産技術がこれまでその発展のために寄与してきた科学者や教育者によるよりも商業ベース上の利用者により導入されてきた。この技術の発展は広い舞台で行われ、生産者のみならず投資家、道楽者、ジャーナリストなどに及んだ。また多くの例でみるように、経済的に有益な家畜生産の手段になった。そして商業ベース上での受精卵移植は堅実に成長した。

1979 年には 17,000 頭の受精卵移植による妊娠例が北米で記録された。生産者はこのサービスのために 20,000,000 ドルを支払っている。また 1986 年には 200,000 頭に受精卵移植が行われ、100,000 頭の産子が得られると予想される。今後受精卵移植は出生前の性別別のような技術開発のような多くの発展の鍵を持っており、産業としての発展は継続して保障されているように思われ



る。

## 2) 利益を得たグループ

家畜の生産にすばらしい可能性を持っている受精卵移植技術の利用により、もっと簡易に有益で高品質な生産物を作出することができるであろう。新しい家畜生産技術の中でも、受精卵移植は同じ品質の家畜を、少ない飼料とエネルギーと土地を利用して有効に増産することができる。

遺伝的改良と増殖面では人工授精よりは劣るけれども受精卵移植ではドラマチックに時間の短縮が図られる。通常の繁殖プログラムを達成するために、これまで多大な時間が必要であったが、これを単一世代で可能にした。例えば牛群の上位10%を供卵牛として選択していけば、3~4代のあいだに70%が置きかわる。人工授精のプログラムでは雄側からだけで雌側からの改良が含まれていない。雌側を3倍にしぼって選択してもせいぜい10~15%改良速度が早まるだけである。このように動物の繁殖家と消費者は、動物を生産したり資源を保護する両面から受精卵移植の利用で利益を受けた大きなグループである。

受精卵移植は収入の大部分を家畜の繁殖においているグループと、趣味、調査、投機或は税金対策においているグループの2つのグループによって利用されている。受精卵移植は高価につき財政的危機をはらんでいる。このために当初の利用は多額の流動資本を持った人達によって、遅れている遺伝資源の増進と市場での売買のために繁殖群が生産されてきた。これが技術の増進を図り、コストの低下に結びつき、小規模の生産者数を増やし、更には途上国では欲しい品種と系統の受精卵を輸入することにより国産種の急速なグレードアップを計るまでになった。もちろん、この技術から利益を受けている人達の多くは受精卵移植技術の補助的な産業に従事している。このグループに含まれるのは、衛生、薬品、特殊器材の製造、家畜の代理、販売、市場の専門家などである。

最後になるけれども、各種研究のための受精卵移植の利益は大きい。例えば受精や移植前の段階にある受精卵の代謝や、繁殖上の年齢の影響、奇形、ウイルスの垂直感染、ガンなどのような多様な問題を研究するために役立っている。その上技術の発展は商業ベース上での利用と同じように様々なデータの集積から排卵のメカニズムや過剰排卵の現象、初期胚死、内分泌応答のパターン、不完全な生命の発生を最小限におさえている自然制御装置のメカニズムなどの繁殖のプロセスを理解させるために大いに役立っている。

## 3) サービスの提供

商業ベースでの受精卵移植企業では、クリニックや農場で過剰排卵処理や、非手術的卵回収、移植、凍結、移植前の性判別などのサービスを行っている。

一般に言われているものには2つのタイプの受精卵移植企業がある。1つはクリニックで、供卵牛を過剰排卵処理と卵回収のために会社のクリニックへ導入している。また通常会社は受卵牛群を持っていて、受精卵移植に係るすべての手続きを引きうけている。2つ目は移動診療で供卵牛のいる牧場や大農場へ出向き、受精卵移植に関連して施設上のことも含めてオーナーやそのスタッフを補助してやる。クリニックはオーナーから所有地の利用期限、主要な器材、薬品、スタッフと動物について大部分の委託を受ける。受精卵移植の処理価格は非常に高く、安定した仕事量が必要となる。すなわち

財政的ロスのリスクはクリニック操作では大きいために常に多頭数の生産ができるように家畜の収容施設や受精卵移植に係るすべてのサービスを備えている。また農場で受精卵を回収する場合は乳牛の場合で付帯サービスとして行われている。これに対して移動診療では一般に手術的受精卵の回収、移植、凍結、性判別などは施設に制限があるため行わない。更に移動操作では過剰排卵処理の不正確さ、発情発見の不正確さ、精液量の不十分さ、人工授精の失宣のような失敗等にさらされる。というのはこれらの方法がたまたま未経験者によって行われるからである。移動診療では、一般に牛と馬（非手術的回収、移植法を発展させてきた）と豚を対象に行う。大部分の受精卵移植企業は牛対象のサービスが主体となっている。

受精卵の回収は通常非手術的に行われ、多くの会社が非手術法による移植を行っている。非手術法は急速な広がりを見せており、まもなく、この手法が基本的技術となっていくと思われる。会社の多くはサービスの一環として受精卵の凍結を行っている。数は少ないが性判別を行っている会社がある。1983年次には14社がカリオタイピングにより性判別を行っている。しかしその実用性は低い。桑実胚又はエロンゲートした胚盤胞の細胞の一部をパイオブシーにより採取して調べる。受精卵はパイオブシー後も受胎率はやゝ低下するが発育を続ける。性染色体は容易に区別できるが、手法が複雑で手間がかかる。

#### 4) コストと成功率

最近では300ドル（6万円）と2,000ドル（40万円）のあいだが、牛の受精卵移植により妊娠させた直接費用である。馬の場合はコストが高く、メン羊、山羊、豚では比較的低い。加えて登録、血液検査費、宣伝、処理中の供卵牛からの乳量の損失などの多くの間接費用がある。これらの費用は受卵牛の産後に加算調整される。米国においては、生産者にとって受精卵移植により得られた子牛（雌、雄とも含めて）の6カ月齢で平均1頭当たり2,500ドル（50万円）が得られれば経済的に正当である。残念ながら性別によって価格に大きな相違がある。受精卵移植による直接費と間接費を計算する場合、投資費の10%と健康で繁殖の良好な供卵牛の価格の10,000ドル（200万円）を基本にして行う。同じような分析はEller（1981）、Brem（1979）氏らが行っている。受精卵移植により生まれた産子の何頭かは非常に高い価格になる。例えば、最近のナショナルホルスタインコンベンションセールではトップが131,000ドル（2千6百万円）で売られたし、1980 ABS アメリカのトップ販売の娘牛は22,000ドル（440万円）で売られた。

受精卵移植による成功率は種と個体により多様である。この多様性は過剰排卵に用いるホルモンの性腺への反応の範囲が個体によって異なるからである。過剰排卵処理で1頭当たり0～30個程度の受精卵が得られ、平均、6～7個の正常卵が得られ、そして、移植した $\frac{1}{2}$ （50%）の受胎が期待されるので、供卵牛からみると $\frac{1}{4}$ （25%）が受胎することになる（サイデル、1980）。

サイデル（1980）は64頭の供卵牛のうち22%は受胎が0（受精卵が回収されなかった）25%は1～2頭の受胎、25%は3～4頭の受胎、18%は5～12頭の受胎であり、供卵牛の約10%は過剰排卵処理で発情がみられなかったと述べている。受精卵移植による成功は受精卵の回収と移植技術の熟練度、供卵牛と受卵牛の性周期の一致、供卵牛の受精能、精子と受精卵の質、栄養と飼養管理、などの要因が多様にかかわっている。

形態的に正常な受精卵が熟練された技術者によって性周期の同調された受卵牛に手術的に移植された場合、常時50～70%の受胎率が得られている。自然発情牛から受精卵の1個採りを試みる場合（年間の発情発現回数の15回×60～70%回収率×80%受精率、正常卵）年平均5頭の産子が得られる。これに対して供卵牛に3回過剰排卵処理をしたとき（1回当たり平均6～7個の正常卵が得られ、3～4頭の妊娠例が得られる）この平均産子は9～12頭である。各性周期の1個採卵では労働料金が高くつく。馬の場合は過剰排卵が満足に行えないので、繁殖の増進を図るため各性周期で受精卵を集めて移植しなければならない（年10～12性周期×75%回収率×55%受胎率＝4頭の産子、年平均0.8頭の産子が4倍に増加する）。

特定の個体においては受精卵移植によって生産される子孫の数は驚くほどの数になる。例えば牛において過剰排卵での受胎頭数は、0～20頭以上が得られる。しかし個体によっては年間50頭以上の産子が得られている（サイデル，1981）。いっぽう牛によっては受精卵の回収、移植のくり返しが完全に失敗する例があり、このような例では通常の人工授精などの繁殖においてよりも子牛の生産頭数が低い結果となっている。

受精卵移植による性の比率、流産事故、産子の正常性は正確に記載されていないが、この技術の商業ベースで得られたデータでは通常の繁殖方法によって生れた産子にみられる現象と大きな差異はない。さらに牛における調査では、①受精卵移植によって生産された子牛の性比は正常である（51%は雄）、②流産は通常に発生する数よりも高くない（1/174）、③受胎数と離乳頭数の比率（160/178；90%）は通常に繁殖された牛群と等しい。④90日後の流産率は増加しない。しかし⑤90日以前の流産は非手術的移植の場合、通常のものよりも高い傾向がある。

非手術的に移植する前の24時間にわたってインビトロで培養した胚盤胞では移植後21～60日以内に46.3%の早期胚死があったが、回収後直接移植した胚盤胞ではこれが29.3%であった（エルステンら，1980；レナードら，1980；サイデル，1981）。手術的移植では25～60日のあいだに9%が失われた（マーケッティら，1980）人工授精の場合にはカマーフィールドら（1978）は24～75日のあいだに7%が失われ、バルマンとラミング（1979）は12%が早期胚死であったと報告している。

## MEMO

## Ⅱ 受精卵移植の利用法

### ( How to make best use of Embryo Transfer )

受精卵移植は人工授精と同じく遺伝的改良の道具です。これらの道具の二つの重要な貢献は遺伝的に優れた個体の鑑定と、それらの子を自然の繁殖よりも多く生ませ得る事です。

受精卵移植を使い、人工授精で若い種雄牛の後代検定をするのと同じく雌牛の乳量について後代検定する事が出来ます。これに依って得た情報は、もしも子牛が特別扱いされず、子牛達が多数の牛群に散らばっていれば更に正確な遺伝評価となるでしょう。しかし乍らこの情報を得るには莫大な費用がかかります。それは“時間”です。多くの研究は受精卵移植に依って産乳量の遺伝子価の正確度を増す事に依る利益よりも時間と云うコストの方が大きいと結論しています。この結論には二つの大きな理由があります。第一は、雌牛の遺伝子価は後代検定無しでも、自分の乳量記録と血統からある程度正確に予想出来ます。第二は、牛の乳量について後代検定の情報を得るには4～5年かかります。もし経営が良い繁殖プログラムを持っていて牛群の平均遺伝子価の改良が毎年あれば、4～5年前に遺伝的に最も価値ある牛達は後代検定の情報がようやく入手出来る頃には平均値となっているでしょう。仮に受精卵移植の経費が非常に安くても、後代検定で雌牛の乳量を改良する様なプロジェクトはしない方が良いでしょう。多くの場合“時間”コストが莫大で、この様な方法は産乳能力の遺伝的改良を遅らせます。

一方で受精卵移植はある雌牛の望ましくない劣性遺伝による形質、たとえば“単蹄”等の後代検定には向いています。たとえば、非常に優秀な若雌牛で単蹄のキャリアである雄牛の子であれば、この雌牛は50%の確率で欠陥遺伝子を持たない訳です。

もし、この牛が過剰排卵処置され、単蹄の雄牛に交配され、受精卵移植されれば、この形質についての後代検定の情報は速かに入手出来ます。と云うのは受卵牛達から取り出した2ヶ月令の胎児を見る事に依ってわかるのです。もし一頭だけでも単蹄の胎児が出れば供卵牛はキャリアです。しかしもし、7頭以上の胎児が全て正常であれば99%以上供卵牛はキャリアではなく繁殖用に供して安全と云う事です。受精卵移植がこの形質の後代検定に向いている一つの理由は、乳量の形質には4～5年かかるのに比べ、数ヶ月で済むからです。

二番目の受精卵移植が適している利用は優秀な雌牛から種牡牛候補を得る事です。授精所は、普通100頭の雄を確保する為に300頭の雌牛と契約が必要です。全部の雌牛が妊娠しませんし、半分は雌の子が生まれ、又、生後すぐ死んだり、適当でなかったりと云う理由からです。しかし過排卵と受精卵移植で100頭の優秀な牛から最低一頭の適した雄を得るのに150頭の雌牛があれば足りません。

大事なポイントは、更に効率の高い産乳力に依る遺伝的利益の方がコストよりも大きく、この場合、受精卵移植は良い投資と云えるでしょう。実際にはエリート雌牛の多くで種牡牛の母としての資格のある牛達はすでに受精卵移植を行っていますから、授精所はほとんどその為の余分な費用はかかりません。その上、この様な供卵牛から生まれた雌の子牛を売る事により受精卵移植の費用は捻出できますし、ある意味では雄子牛は副産物です。

往々にして一腹から違う種牛の子牛を得たいと云う問題が起ります。時々、過排卵処置された供卵牛に二頭の種牛の精子を混ぜて人工授精され、生れ出た子牛は血液型によって分けられ雄子牛が全兄弟で無い様にします。

ほとんどの場合、一腹の受精卵移植で生れた雄の1～2頭が種牡牛候補として検定に参加しますが、しかし非常に優秀な供卵牛の雄子牛は10頭以上もこれに参加する事があります。

受精卵移植の目的で一番多く上げられるのは、良い更新牛を得ると云う事です。残念乍ら乳量上がるだけの遺伝改良では、現在の受精卵移植のコストは支払えません。このアプローチについての研究は、受精卵移植のコストが一头当たり100ドル以下でなければ採算に合わないと計算しています。現在の受精卵移植のコストは子牛一头当たり500～1,500ドルです。

私達が考えているのは、受精卵移植で酪農経営の商品である牛乳の生産効率を上げようとしている事を銘記すべきです。しかし一方で商品が高い値で売れる繁殖用の個体であれば、往々にして非常に利益の高いものになります。受精卵移植を繁殖用個体の生産に使い、利益を生むのとそうでない利用の違いがわからずに破産した例は一つだけではありません。

A1は乳量を増すのにより有効でしょうか？ この考えは、受精卵移植を人工授精と比較するとわかります。もし妊娠当りのコストが同じであっても、良く管理された牛群で乳の生産効率を上げる為には受精卵移植に依る遺伝的な力は人工授精のそれに較べて1/5以下でしょう。人工授精の二つの大きな利点は 1) 検定済みの人工授精に使われる種牛の遺伝子価は雌牛のよりも正確に知られている事、2) 雌に較べて雄の方が強い選抜出来る事です。

これ等のポイントは簡単に説明出来ます。第一に何百頭もの娘牛が何百もの牛群で評価される正確度の方が、受精卵移植に依り、仮にその牛が1ダース位の子牛をいくつかの牛群に持っていたとしても、はるかにすぐれています。

第二には、全ての更新牛を上位10%の能力の供卵牛から受精卵移植に依り、得る事が出来たとしても、人工授精では上位1～2%の能力の母牛から生れた雄から検定が終ると更にその10～15%が授精所に残り、更にその中から選べる訳ですから、母集団の中から千頭に一头の高能力を使えるのです。

この結果、私達は乳の販売代金からこれ等の費用を支払うとすれば、妊娠当りにつき受精卵移植よりも人工授精に高い代金を支払えるでしょう。十分な市場があった場合には受精卵移植による繁殖用の個体販売で利益を上げる可能性はあるでしょう。

もう一つの受精卵移植の遺伝応用は大量の遺伝子移動です。例としては、1つの品種から別の品種に変わったり、雑種から純粋な牛に変わったり感染した供卵牛から、病気のない子牛を得たり、あるいは輸出、輸入したりと云う事です。雑種の牛群を純粋種の受精卵を買い、受卵牛として利用して純粋種の牛群を作る方が、雑種を売り払って純粋種を買うよりは安いでしょう。

あるいは数頭の純粋種を買い供卵牛としても使えるでしょう。良い牛群を作る為にはどの種牛を選ぶか、どの供卵牛を選ぶかよりも大事で、それは乳量の改良に受精卵移植よりも人工授精の方がより強力な遺伝改良の道具であるという理由からです。

最後に二つの特別なケースについて考えてみましょう。第一は、ある種の遺伝的情報は母方からだけ遺伝します。つまり卵子を通してだけ遺伝し、精子は無関係です。第二の特別なケースは受精卵移

植を一つか二つの大きな国の牛群に使う場合です。乳房炎に対する抵抗性、飼料効率、繁殖効率、其他の形質についてデータを集めるとしましょう。多形質の遺伝改良は人工授精だけよりも、受精卵移植を組み合わせる事に依り一層早くなります。更に又、普通の酪農家の採算ベース以上の速度で世代交代をする交配方法が出来るかも知れません。これは非常に金のかゝる計画ですが、この様な牛群は種牡牛候補の提供源になるでしょうし、費用はこれ等の種牛から上る精液代で母集団全体から割り出す事が出来ます。この様な方法は何百万ドルと云う費用がかゝり、税金で支持され、何千人もの種牛利用者が組合を作って行うか、あるいは民間の資本で行うかです。しかしこれは長期的には良い投資でしょう。非常に面白いアイデアです。

## MEMO



### Ⅲ 過排卵処置の方法

(How Cows are superovulated)

過排卵とは、雌牛が自然排卵よりも沢山の卵を排卵できるようにホルモンで処置される方法、として定義されています。牛の場合、10個を排卵したとすると、そのうち約6個が正常な受精卵として回収されます。しかしながら様々なケースがあり、1回に0から50個以上排卵をするものまであります。以下は、繁殖生理学に関連した原理と、牛の過排卵がどのようなものかを説明するものであります。

雌牛が生まれる時、その牛の卵巣は100万近くの卵母細胞で形成されており、それらの細胞はその雌牛が胎児だった時に、すでに作られたものです。誕生後は卵母細胞は作られません。事実、誕生時には沢山の卵母細胞が表われますが、思春期発動期に退化して、多くは消えてしまうものです。この退化する課程を閉鎖と呼びます。

閉鎖は雌牛の一生を通して続くものであり、時には年を取った牛の卵巣には卵子が無くなっていることもあります。明らかにこれは浪費的システムです。たとえその雌牛が1生のうちに25回の排卵をしても生まれながらに持っていた卵母細胞の $\frac{1}{30,000}$ 以下しか使わないことになります。過排卵と受精卵移植は、これらの繁殖潜在力を助ける方法と言えます。

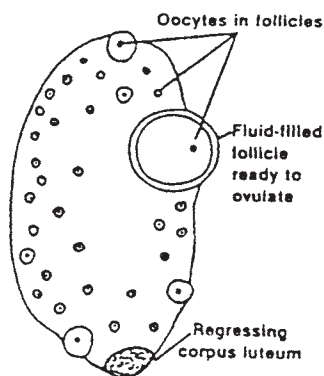
卵巣の中の1つ1つの卵母細胞は卵胞と呼ばれる球形の構造をした栄養細胞にとり囲まれています。これら多数の卵胞のほとんどは小さくて、不活性です。しかし毎日10~20個の卵胞が成長を始めます。ほとんどは閉鎖しますが、少数のものは生き残り成熟して排卵されます。

ほぼ排卵の時期に成熟した卵胞は液体でいっぱいになり、直径が1インチ近くになります。これは卵巣の表面が突き出ている、直腸の壁を通して触診することができます。卵胞の成長のはじめから排卵までの過程は、約4~5ヶ月かかります。

排卵の4~5日前には成熟途上の卵胞は、特別な条件が必要となります。黄体が退化することによって血中のプロジェストロンの濃度が急激に落ちてゆく状態を含むこれらの条件は、性周期の最後の部分、発情の直前にのみおこります。プロジェストロンの濃度が急激に下がっていない時に成熟に達した卵母細胞は閉鎖します。一方で、プロジェストロンの濃度が下がっている時に成熟するものは、最終的に成熟して、排卵されます。

このシステムは、2つのホルモンの相互作用によって調和しています。最初のは卵胞刺激ホルモン(FSH)で、下垂体腺によって分泌され、脳の基部に位置しています。このホルモンは、排卵の前4~5日に卵胞を著しく成長させます。

第2のホルモンはインヒビンで、急激に成長している卵胞によって血液中に分泌されるものです。このホルモンの機能は、下垂体腺から分泌されるFSHを遮断する役目をします。従って最も発達した卵胞がインヒビンを分泌する時にこのホルモンがFSHの分泌を遮断するため他の卵胞は成熟し排



卵できません。そして発達した卵胞はF SHの刺激は必要でなくなります。

このように自然は1回の発情で、1個だけ（時には2個）の卵胞が排卵されることを約束しています。豚の場合、卵胞あたりのインヒビンが少ないのでF SHの分泌を抑制して、卵胞のそれ以上の発達をふせぐために充分なインヒビンが作られるまでには約1ダースの卵胞が最終段階に残っています。

過排卵は余分なF SHを注射することによって自然の調和を迂回することで行なわれます。牛の場合、プロゲステロンの濃度が自然に落ち性周期の16～19日目の間にこの方法が用いられます。成長が誘発された卵胞は、多量のインヒビンの生産をうながして下垂体腺から出されるF SHの分泌を抑えます。しかしながら、注射されたF SHは引き続き効力を持っています。

実際には、牛は2つの理由で今述べたものよりも、多少違った方法で過排卵されます。第1は性周期の長さが一定でないので、F SHの注射の適切なタイミングがむづかしいことです。例えば、牛が19日周期の場合F SHの注射は約15日には始めるべきです。ところが、その牛の周期が23日の場合、注射は19日になります。残念なことに、注射をはじめる時、牛の性周期の長さが誰にもわからないのです。

第2の問題は、もし自然な発情周期にあわせて注射の時期をあわせるとすると、受精卵移植のためのスケジュール調整がうまく行かない場合が多いと言うことです。これら2つの問題は、人工的に性周期を短くすることによって解決できます。これは黄体を退化させるプロスタグランジンF<sub>2</sub>α（又は同じ効力のある薬品）の注射でプロゲステロンの濃度が早期に減退することによって得られます。F SHをプロスタグランジンF<sub>2</sub>αの前後両方で注射することにより、卵胞の成長を正しい時期に保ちます。典型的な注射の処方は、表に示してあります。F SHの注射は性周期の9～14日目の間であれば、いつでもはじめられ、このことによって供卵牛群をまとめたり、週末や休日が入ってもスケジュール調整に柔軟性があります。

典型的過排卵処置<sup>a</sup>

処置日				
1日目	午前	5 mg	F SH	
	午後	5 mg	F SH	
2日目	午前	5 mg	F SH	
	午後	5 mg	F SH	
3日目	午前	5 mg	F SH	
	午後	5 mg	F SH + PG <sup>b</sup>	
4日目	午前	5 mg	F SH + PG	
	午後	5 mg	F SH	

最良の結果を得るには、処置の第1日目を性周期の9～14日目にはじめるべきである。

ほとんどの供卵牛は、最初のプロスタグランジンF<sub>2</sub>αの注射の1日半～2日半後に発情する。

牛の品種やサイズ、入手可能な薬品、そして受精卵移植をする人間の個人的な好みにより、過排卵処置には様々な方法があります。例えばF SHの減量などはよく使われます。時にはプロスタグランジンF<sub>2</sub>αの注射が普通より半日早いか、又は遅く行なわれる事もあります。ある人達はプロスタグランジンF<sub>2</sub>αの注射を1回しかしません。

北米以外では過排卵のために大変違った方法が用いられています。F SHの8回分の注射を1回のPMSG（妊馬血清性性腺刺激ホルモン）の注射で済ませます。これは妊娠している馬の血液から得られるホルモンでF SHのような性質を持っています。このホルモンは牛の中で非常にゆっくり分解するので、1回の注射でも充分です。多くの人は、PMSGよりもF SHを使用した結果の方がわず



かながら良いと考えています。

供卵牛はたいてい最初の発情徴候から約1日後に排卵します。ある意味で、過排卵処置と言うのは適切な名前ではありません。実際にはより多くの卵胞成長と、その卵母細胞の成熟を促すからです。排卵を促すホルモンの働きは複雑ですが、過排卵するも、しないも、同じことが言えます。

過排卵は繁殖生命を短くはしません。なぜなら余分な卵はさもなくば閉鎖される運命にあるからです。しかしながら、過排卵の処置の方法は、表面的な事だけしか理解されていません。なぜならば、反応が一律でないからです。もっと研究を続けることでこの弱点をまちがいなく強化し、一層の成功と安価な受精卵移植の方法が得られるでしょう。

## MEMO

## Ⅳ 外科的か非外科的が良いか

( Surgical or non surgical ? )

牛の受精卵はほとんどの場合、非外科的に採卵されます。同様に一部の受精卵移植会社をのぞけばほとんどは非外科的に移植されています。他の会社では場合に依り外科的に、場合に依っては非外科的に行っています。ここでそれぞれの方法の利点を考えてみたいと思います。

1970年代の中頃迄、ほとんどの移植は外科的方法で行われ、受卵牛は全身麻酔をかけられました。受卵牛は仰むけに寝せられ乳房と臍の間を切り開き生殖洞を露出しました。この方法は非常に高い妊娠率を上げましたが、非常に労力がかかり、特別な施設が必要であり、時には全身麻酔と手術に依る問題を併発しました。この方法は今ではほとんど使われません。現在の外科的方法では受卵牛は局所麻酔をかけられ、わき腹切開により子宮を露出し、子宮壁を通して細いピペット、鈍い針、0.25 cc ストローか細い管等を使って移植されます。その後、切開された部分が閉ざされます。この間受卵牛は意識下にありスタンションか保定枠の中に立っています。

非外科的な方法は20年前に初めてケンタッキーで成功し、人工授精と似ていますが、いくつかの大きな違いがあります。第一はタイミングが違います。受精卵は発情が終って一週間過ぎ、子宮頸管が閉じてから移植されるのが普通です。この時期に器具を子宮頸管を通す事は成牛、未経産牛が発情していない時期に較べて難しく、更に、子宮感染の原因にもなります。第二は精子は子宮体に入れますが、受精卵は排卵の起った側の子宮角に入れます。ですからもし触診に依って黄体が右の卵巢にあれば受精卵は右の子宮角に入れます。非外科的方法で使われる器具は人工授精のストローガンと非常に良く似ていて、ストローに受精卵が入っています。

今迄の情報で非外科的方法が良い事がわかるでしょう。簡単で、数分で出来、局所麻酔や手術器具は不要です。同時に又、人工授精以上に侵略的でもありませんから、ほとんどの州では獣医の監督下でなくても出来ます。

外科的方法の利点は、ほとんどの人が高い妊娠率を得る事が出来ます。又、非外科的方法によると相当に技術者の変異が出ます。非外科的方法で受精卵を移植する技術者の妊娠率は30%に満たないものから60%を越えるものまであります。人工授精では技術者間の変異の原因は精液注入の不適当にあります。これに較べ非外科的な受精卵移植に於て、何如なる技術者が高い妊娠率を得るのかわかりません。私達は妊娠率が経験を積む程高くなるのを知っています。

非外科的に受精卵を移植する技術者のトップの妊娠率は外科的方法での妊娠率と同じですが(品質の良い受精卵で適正な受卵牛管理が行われている場合で60~70%位。)、多くの人達は外科的方法が5~10%優れていると云々します。この様な可能性がある為と、多くの技術者の平均をとると間違いなく安定した良い結果が外科的方法に依り得られる事から、ある移植会社は今でもわき腹切開で移植しています。非外科的移植の妊娠率が技術者間で何如に違うかについての研究が進むにつれて外科的移植は数年以内に使われなくなりそうです。今後の研究で非外科的移植の方が高い妊娠率を導く様にさえなりそうです。いまのところ、施設の有無、技術者の好みや経験が、どちらの方法を選ぶか決める事でしよう。一番良い成功の尺度は、その方法が自分の立場に適しているかどうかにかかっています。

## V 受精卵の顕微手術

### ( Microsurgery to Embryos )

私の講演は、スライド、フィルム、そして又、スライドに依って成り立っています。最初のスライドを御願い致します。これは授精して1週間後に採卵された牛の受精卵で約100細胞あります。これからお見せる様に、この様な受精卵を半分に切ったり、低温保存したり、性判別したり、あるいは他の動物の生殖器に入れたりする事が可能であります。

通常私達は過排卵処置をされた牛から、非外科的方法で受精卵をとります。私達の研究室の Dr. Elsdén は 受精卵の採卵を容易にする為のフィルターを開発しました。これが採卵用フィルターのクローズアップです。

受精卵移植に依り、時にはこのスライドの様に一度に多くの子が生れる事があります。左の10頭の受卵牛が右上の牛より受精卵を受けてこれら10頭の子牛が出来ました。

さて主題である受精卵のマイクロサージャリーに入りたいと思います。次のスライドはねずみの2細胞受精卵で、非細胞の膜、透明帯によってつままれています。何年も前の事です、ねずみかうさぎの2細胞受精卵のうちの1つの細胞を破壊しても、残る細胞から完全に正常な動物に发育していく事がわかりました。数年前、私達はねずみの2細胞受精卵から透明帯を取り、細胞1個ずつを別のメデュームの中で培養する実験をしました。透明帯を除去すると細胞は簡単に分れます。これは8細胞受精卵の半分で、あと半分は別の容器に入っています。これは半分の受精卵から发育した胚盤胞です。右側の細胞は内細胞塊から胎児になり、左の細胞は栄養外胚葉になります。半分の受精卵の多くはこの様に試験管の中では发育するにもかかわらず、これを偽妊娠のねずみの生殖器に入れても妊娠率は低く、半分ずつの受精卵が同時に妊娠して分娩に至った事は一度もありません。私達は一番の問題は、生体外培養方法の不適正にあったと思います。換言すれば、受精卵はねずみの生殖器に移植された様には生体外で发育出来なかった訳です。

次のスライドは麻酔をかけられたうさぎが麻酔をかけられた牛の上に乗っているものです。牛の受精卵は6日間位迄はうさぎの卵管に入れておき、それを外の牛の生殖器に移し変える事が可能です。他の動物の卵管、たとえば羊を使う事も出来ます。この様な方法の利点は生体外培養にかわって生体内培養が出来ると云う事です。

英国のケンブリッジでDr. Willardsen は うさぎ又は羊の卵管で受精卵を培養する技術を開発しました。Dr. Willardsen は 2～4細胞の受精卵から透明帯を取り除き、細胞一個ずつを空の透明帯に入れ、 $\frac{1}{2}$ 又は $\frac{1}{4}$ の受精卵を寒天の中に入れ、それを羊かうさぎの結紮された卵管に5日間移植しました。5日後に寒天を取り出し、受精卵を回収して、もとの種の生殖器に入れ妊娠期間を全うしました。この方法に依りWillardsen は羊の1卵性4つ子、牛の1卵性3つ子、馬と豚の1卵性双子を得る事が出来ました。

1卵性8つ子は出来るでしょうか？ この方法に依って $\frac{1}{8}$ の受精卵から1卵性8つ子を作ろうとすると妊娠率がほとんど0に近い事がわかりました。問題は、 $\frac{1}{8}$ の受精卵には正常な胎児を作るだけの材料が無いらしいからです。しかしこの問題を迂回していくトリックがあります。このトリック

について説明したいと思います。まず基本原理について話しましょう。これは6つの親を持ったねずみで、3系統のねずみの受精卵を集めて偽妊娠の借り腹に移植して作られたものです。3つのそれぞれの受精卵は両親を持っているので、6つの親を持ったねずみと云う訳です。2つの親はオレンジ色、別の2つの親が白い部分、更に別の両親が灰色の部分を作るのに貢献しました。この様なキメラねずみは発生生物学と1卵性8つ子を作る上でのトリックの基本として非常に重要であります。

もう1つの基本原理が次のスライドに示されています。2細胞の受精卵が4細胞に分裂する時、2つの分裂は全く同時に起らない事です。1つの細胞が他よりも早く分裂します。最初に分裂する細胞が内細胞塊で胎児になる部分を作る傾向があり、2番目に分裂する細胞は栄養外胚葉、品種によっては胎盤を形成する傾向があります。

4細胞受精卵が分裂して8細胞に成る時、最初の分裂からは内細胞塊、後程の分裂は胎盤を形成する傾向があります。ケンブリッジのWillardsenとCarol Fehillyは今私が話した2つの基本、キメラと発育の早い細胞が内細胞塊を作る傾向がある事を利用して $\frac{3}{8}$ の受精卵を作りました。彼等は1個の8細胞受精卵と2個の4細胞受精卵からそれぞれ割球を作り8つの別々の空の透明帯の中に対で入れました。この様にして8つの受精卵が出来ました。これ等の受精卵では8細胞受精卵から出来た割球が胎児を形成し、4細胞受精卵からの割球は胎盤を形成する事になります。と云う訳で助ける細胞は4細胞受精卵から得られ、理論的には1卵性8つ子を得る事が可能になる訳です。大事な点は若い受精卵のほとんどは胎児の前駆体になり得ない事です。100細胞の段階ではほんのわずかの細胞が胎児を形成し、90%以上の細胞は3~4個の細胞が胎児になるのを助ける役目をします。

たとえばこれ等の補助細胞は胎盤を形成したり、子宮に侵入する細胞、卵黄のう等の一時的な組織、等々を形成します。FehillyとWillardsenはこの方法に依り、すでに1卵性5つ子を作りました。今迄のところ私達は同じ品種間内のキメラについて考えてきました。

次に、私は異品種間のキメラについて話したいと思います。もし受精卵が羊から山羊、山羊から羊に移植されると受精卵は死んでしまいます。しかし先ほど話した方法に依り、羊の胎児を山羊の胎盤に入れる事は可能です。この様な受精卵は山羊の子宮の中に移植されれば妊娠を全うする事が出来ます。これは免疫が異品種間の妊娠で問題になるのは胎盤——子宮内膜間であり、胎児——胎盤間ではないと云う事です。

FehillyとWillardsenは更に一步進めて羊と山羊の8細胞受精卵を混ぜて胎児を作り、山羊の4細胞受精卵から胎盤を作りました。これに依り羊と山羊の合いの子が出来たのです。体の一部にwool、又はhairが生えています。これ等の動物のあるものは繁殖能力があり、羊か山羊の性細胞を作り出すと思います。似た様な研究はドイツとカリフォルニアでも行われました。

次に牛の受精卵を使った私達のコロラドの研究に入りましょう。これはマイクロマニピュレーターで、手の大きな動きを顕微鏡下の小さな動きに変えます。私達はマイクロマニピュレーター用の道具をいくつか作ります。これはマイクロサージャリー刃とサイズの異なる2つのピペットです。これ等のピペットはマイクロマニピュレーターに取り付けられ、チューブで注射器につながれます。このスライドは1卵性双子を作るのにどうやって道具を使うかを示します。透明帯を破り受精卵をマイクロサージャリー刃で2つのグループに分けます。受精卵は保定ピペットで透明帯を吸いつける事に依り保定され、半分の受精卵は別のピペットで空の透明帯へ移されます。

これはWillardsen達の技術と違い、牛、馬から非外科的に採卵した発育の進んだ受精卵です。又、この技術はWillardsenの数日かゝるのに比べ10~15分で済みます。

これは受精して8時間後のねずみの1細胞受精卵です。これは雌性前核。これは雌性前核で精子からの遺伝情報を持っています。それぞれの前核の中に、核小体（仁）があり、極体は卵囲腔の中にあります。このピペットは雄性前核の中にあり前核に何かを注入したり、あるいは吸い取る事が出来ます。たとえば成長ホルモンの為の遺伝子を注入出来ます。この研究はフィラデルフィアのDr. Brinsterに依って行われ、成長が早い大型ねずみを得ました。次にマイクロサージャリーの技術をフィルムで見せたいと思います。

フィルムの初めの方は、ねずみの1細胞受精卵でマイクロマニピュレーターに依る卵の扱いを示します。受精卵を吸いつけて保定したり、注入したり、別の受精卵を押さえてそれに注入したり出来ます。多くのマイクロサージャリーでCytocholasin Bと云う薬を使って受精卵を処理します。右の受精卵はCytocholasin Bに反応を示しています。細胞膜が非常に不規則になり15分位してもとの形にもどります。この薬は細胞質のマイクロフィラメントを破壊します。次の場面はねずみの1細胞受精卵から如何にして雄性前核を取り出すかを見せます。

再び受精卵の操作を示します。見てわかる様に吸いつけて保定し、好位置へ動かす事が出来ます。雄性前核がはっきり見えます。こゝでピペットを吸い雄性前核を取り出します。これで受精卵は死にませんでした。私はこゝでマイクロピペットから少量のOilを出します。このOilに前核が付着しているのが見えるでしょう。

これは雄性前核を取り除くもう一つの方法で、このフィルムにはNomarski Optical Systemが使われました。再び非常に伸張性のある核膜が取り除かれています。この受精卵では雄性前核、雌性前核、第一極体、第二極体がはっきり見えます。又、核膜を吸っていますが、今回は核膜が破れ、核小体が細胞質に残されるでしょう。核小体は短時間でこわれます。

最後の場面は時々起こる問題です。焦点を上下させて受精卵の保定具合を見せています。ピペットにわずかの汚物があり、後で見る様にこれが問題になります。又、抽出用ピペットを受精卵に入れますが、汚物が入っている為に核膜をうまくつかむ事が出来ません。しかし繰り返しているうちに前核を取り除く事が出来ます。こゝで受精卵は保定ピペットから離れ、前核は保定ピペットを動かす事に依り取り除かれます。これ等の摘出された受精卵は半数体で、数回の細胞分裂後に死にます。

これは前核除去の少し変った方法です。膜をつかむ代りに前核全体がピペットに吸い込まれます。次に前核が排出され、核小体がはっきり見えます。

次は牛の受精卵で1卵性双子を作る場面です。まず受精して1週間後の正常な卵と未受精卵を使います。第一に未受精卵の透明帯をマイクロサージャリー刃で破ります。この細胞は死んでいます。こちらの未受精卵は屠殺場の卵巣か過排卵処置された牛から非外科的方法で集めます。次に死んだ細胞を透明帯から除去し、マイクロサージャリー刃で正常な受精卵の透明帯を破り細胞を2つのグループに分けます。これは第2の受精卵と同じ方法です。この段階で多分10%位の受精卵は死ぬでしょう。受精卵をきれいに2つに分けるのは大事な事です。次に半分の細胞がピペットで除去されます。残りの半分がもとの透明帯に残っている事を確認して下さい。

時には半分の受精卵から1卵性双子が出来て、結果として1卵性3つ子出来ます。これは半分の



受精卵を空の透明帯に入れているところです。これで1個の受精卵と1個の未受精卵から2個の正常な受精卵を作りました。これ等の半分の受精卵は非外科的方法に依り、牛の生殖器に入れる用意が出来たのです。

最近の研究は、空の透明帯が妊娠に必要な事を示しています。

次の場面はキメラねずみを作る違った方法についてです。1個の細胞を受精卵から取り、別の受精卵の胞胚腔の中に注入します。この胎児は2つの両親の混った細胞を持つ事が出来ます。フィルムの最後は精子の注入についてです。私達は音波に依り精子の頭と尾を分け、頭を吸い取り卵子の中に直接注入します。

何如、精子を卵子に注入するのでしょうか？ 普通、1回AIに使う精液には1千万以上の精子が入っています。もし精子を1個ずつ注入したら1回分の用量で何千頭もの子が生れる事になります。これは又、ある種の研究にも役立ちます。強張りたいのは、未だかつて精子の注入に依って子を生ました人は誰も居りませんが、私達はこの技術の開発をしています。もう一つ皆さんが持つかも知れない疑問は何如、雄の遺伝情報を受精卵からとり除くかと云う事です。これはうさぎの受精卵で2個の精子に依り受精され、従って3倍体になっています。この受精卵は、発達途上のごく初期に死にます。雄性前核、2つ目の雌性前核、雌性前核が見えるでしょう。普通は2個の精子が同時に卵に侵入する事はありません。それは受精が起ると精子侵入拒否が起るからです。しかし時には2個の精子が同時に受精し、この機構の効果がなくなります。この問題は雄性前核の1つを除去する事で解決します。2精子又は、多精子侵入は体外授精でかなり起り、人間の体外受精でも2精子侵入が起るとこの技術を利用して1つの雄性前核を除去するのです。

私達の研究室では、この技術を更に別な用途として研究しています。わざと2個の精子と1個の卵子を受精させ、雌の遺伝情報を除去しました。これに依り受精卵は遺伝的に2つの父親を持ち、母親を持たない事になります。この方法では雄が自分自身と交配されたり、他と雄と交配されたりします。この様な交配に依る性比は、1雌対2雄対1Y Yとなり致命的なものです。それで雌を自分自身と交配して雌を得る。あるいは雄を他の雄と交配して雌を得ます。これは遺伝的な実験上、大変貴重な技術ですが、同時に又、酪農業界の様に雄の遺伝子価が正確に知られているところでは役に立ちます。しかし実際にはこの技術は成功しておりませんし、その理由もわかりません。

次に人工的に作られた牛の一卵性双子について考えてみましょう。これは分割に依り生れた子牛です。全く正常です。ある人達は斑紋も全く同じであるべきと考えますが、そうではありません。分割を行う際に、次の4つの結果を生む可能性があります。1) 分割受精卵が両方とも子牛に発育した場合、2) 半分の受精卵のうち、もとの透明帯に残ったのが発育し、空の透明帯に入れられた方が死んだ場合、3) もとの透明帯に残った方が死に、空の透明帯に入った方が発育した場合、4) 両方共死んだ場合。これ等の4つの結果は、1/4ずつの可能性がありますが。普通、私達は半分の受精卵を別々の借り腹に入れます。もっとも同じ牛に2個共入れる事も可能ですが。

ここに私達の少し古い実験ですが、72個の受精卵を分割して144頭の受卵牛に移植したデータがあります。この結果、72頭が妊娠し、半分の受精卵の妊娠率は50%ですが、もとの72個の受精卵からみると100%になります。ある条件下では半分の受精卵で60%、分割前の受精卵数で計算すると120%となります。分割の主な利点は多くの子牛が生れると云う事です。50%多く子牛

がとれる計算です。この技術は合衆国では商業ベースで使われ何千もの受精卵が分割されました。

分割の技術は実験にも使えます。1卵性双子を使う事に依り、仮説をテストするには少頭数で済みます。多くの実験は遺伝的に同じ動物がなければ出来ないものです。これは遺伝的に同じ4組の雄牛で性成熟の実験の為に私達が作ったものです。実はこの実験の為に9組の1卵性双子を作りました。双子同志の斑紋は相当似ていますが、全く同じでない事がわかるでしょう。しかしこれ等の双子は遺伝的に全く同じである事が血液型によってもはっきりしています。

1卵性双子は農家の人達にとっても有益で、たとえば双子の一方を売り、残りを自分の繁殖用に供したり、双子の一方を屠殺して枝肉データを取り、結果が良ければ残る一方を繁殖用に供したり、又一方が死んでも遺伝情報は繁殖用に残されています。もう一つの面白い利用は牛の過排卵処置に於ける反応の変異を解決する事です。1卵性双子の一方から6個採卵し、もう一方の同じ種牛と交配された双子から10個採卵する事は、遺伝的に同一の受精卵を1頭の牛から16個採卵するのに相当します。又、分割受精卵の一方を凍結し、もう一方を移植し、もしその子牛が良い牛になれば、そのコピーが液体窒素の中に保存されている事になります。又、凍結と分割の組み合わせで1卵性双子の一方を春に生まれ、もう一方を秋に生ませる事が出来ます。これはある種の研究に役立ちます。もう1つのトリックは半分の受精卵を移植し、残る一方を凍結して、移植により生れた子牛が成熟した時点で凍結してあった半分を融解して移植してやる事により、万事うまくいけば牛は1卵性双子の妹を自分で生む事になります。

もう一つのマイクロサージャリーの受精卵への応用は性判別に於てです。性を選ぶには3つの方法があります。1つはXとY精子の分離ですが、家畜に応用出来る迄にはなっていない技術です。受精卵の性判別には2つの方法があります。細胞の生検に依り性判別すると免疫学的方法で抗体とH-Y抗原を利用する方法です。分割の技術と似た方法で細胞の一部を取り核型により性判別が出来ます。この子牛は1週令の受精卵の時に正しい性判別をされました。

最後のトピックとしてクローニングを考えたいと思います。ある定義によると受精卵を2、3、4と分割して1卵性双子、3つ子、4つ子を作る事はクローニングです。8つ子を作る事も考えてみました。1卵性8つ子以上を作るのはどうでしょうか？ まず遺伝的に同じ動物を得るにはクローニングに依らなくても良いと云う事です。自然に生れた1卵性双子、3つ子も先程説明した様な方法で作られた動物も遺伝的には同じです。極度の近交系やそのF<sub>1</sub>同志も遺伝的に似ています。しかし人気のある技術は核移植に依るクローニングです。理論的にはこの方法に依り何千もの遺伝的に同一な動物を作る事が可能です。

これを考える前に1卵性双子とかクローンは1体どれほど似ているのか考えてみましょう。先程、1卵性双児の間で斑紋が違うのを見せましたがクローンに於ても同じです。しかしその外にもクローン同志で、差が出る理由がいくつかあります。たとえば私達はエネルギーを生産する細胞機能質であるミトコンドリアを母方から受けつぎます。ですから他の雌の卵に核を移植すると遺伝的なミトコンドリアの特徴は卵の方から得る訳です。もう1つの細胞機能質で母方の遺伝を受けるのは中心小体(centriole)です。

いくつかの環境要因もクローンがどれ位似ているかに少し影響を与えます。

私はクローンが似ていないと云うつもりではありませんが、しかし、完全に同じではないと云う事です。

哺乳動物の8細胞以上に発達した受精卵を使い、核移植に依ってクローンを作ったと発表した唯一の研究者は Illmensee と Hoppe です。彼等は受精卵の内細胞塊から2倍体の核を取り出し、1細胞受精卵に移植しました。同じピペットで2つの半数体の前核を除去しました。ですから2倍体の核と2個の半数体前核を交換した訳です。

もしこの様な方法で1個の受精卵から30~40個の核を得、それ等を30~40個の1細胞受精卵に移植出来れば、多くのクローンが出来るでしょう。残念ながらこの実験を繰り返す事が出来た人は1人も居らず、従ってこの方法が果して正しいかどうか分かりません。勿論、いつか将来にはこれらの方法で哺乳動物のクローンを作る事が出来るでしょう。

最後のスライドは牛の未受精卵です。驚くべき細胞です。実は胎児を作る為に工場設計されたのです。普通、工場では胎児を作る為の遺伝的指令を1部は精子から、1部は母方から受けます。今のところ二つの指令を父方か母方だけからもらって胎児を作るのはむずかしい事です。しかしこの様な実験が近いうちに可能になるのは確かです。受精後この細胞は2、4、8細胞となりますが、それを半分にしたリ、 $\frac{1}{4}$ にして1卵性双子や3つ子、4つ子を作る事が出来るのは驚くべき事です。

受精卵はマイクロサージャリーに依る攻撃、たとえば分割されたり、生検されたり、何かを注入されたり、あるいは吸い取られたりと云う事に対する驚くべき反発力を持っています。遺伝子を注入する新しい方法は発生の遺伝的コントロールの理解を更に深める為の非常に有効な実験を可能にしてくれるでしょう。

## MEMO



## Ⅵ 受精卵の凍結法

### ( Protocol for freezing bovine Embryos )

我々の学生とスタッフとくに武田博士の努力で、我々は凍結後、牛の受精卵の極めて高い生存性を得る方法を開発した。受胎率は新鮮卵と同じ条件下で少くとも75%近くにある。加えて、この方法は我々が前回に示したものよりも簡潔である。我々の最近の方法は次のとおりである。

1. 供卵牛の発情後6～8日目に良質、極めて良質の受精卵を回収する。
2. 受精卵を滅菌したダルベコ(PBS + 10%加熱処理血清(去勢牛血清、新生児血清、あるいは牛胎児血清のすべてが使える))で3回洗う。標準の抗生物質混合液が用いられる； ビルビン酸とグルコースが適量添加される。
3. 受精卵はPBS + 10%血清 + 5%グリセロール液に5分間置かれる； 次いでPBS + 10%血清 + 10%グリセロール液に10～20分置かれる。このステップのすべては室温で行われる。受精卵は多分5%ステップを経ずに直接10%グリセロールに浸漬することができる。しかし、最近我々は2段階で行っている。
4. 受精卵は前もってラベルした0.25又は0.5ccフレンチストローに入れられる。我々は最良の結果を得るためにガラス容器を用いていない。我々は、ストローの半分まで凍結用液(PBS + 10%血清 + 10%グリセロール)を満し、次いで空気を3～4mm入れたのちストローの90%を満たすように受精卵の入った凍結用液を入れる。その時綿栓はぬれている。次いで1.5～2mmのパラフィンオイルを入れて最後にシールする。我々は加熱シールをしているが他のシールも可能である。ストローは熱シール側を下にして冷却装置内に置く。受精卵は沈んでパラフィンオイルの上にとどまる。パラフィンオイルの量は2mmを超えるべきでない； PBSから膨張した熱の広がり異なるために多量のパラフィンオイルは受精卵に物理的なダメージを起こすかもしれない。パラフィンオイルはストローを水平に保つのであれば必要でないかもしれない。
5. ストローは-5～-6℃まで毎分2～4℃で冷却する。-5～-6℃までの急速な冷却は多分有害ではない。
6. -5～-6℃で5分置いたのち植永し、-5～-6℃で更に10分間置く。
7. -6℃から-30℃まで毎分0.5℃で冷却する。ストローが-30℃に到達した時、ただちに液体窒素中に浸漬する(2～3分以内)
8. ストローの融解は37℃のウォーターバスで行ない、20秒以上長く入れておかない。液体窒素からウォーターバスへは2秒或はそれ以下の早さで移す。液体窒素を含む中間容器を用いるときはこのステップを2秒以内で行なう。融解後の総てのステップは室温で行なう。
9. グリセロールは2つの方法で除去する。標準的方法は6段階除去である。： PBS + 10%血清 + 8.3%グリセロール、6.7%、5%、3.3%、1.7% それから0%グリセロール、各段階を6～7分間隔で行なう。4段階除去： 6%グリセロール + 10.3%(.3M)シュウクロース； 3%グリセロール + 10.3%シュウクロース(すべてがPBS + 10%血清)、それからシュウクロース又はグリセロールを含まないPBS + 10%血清。各ステップは6～7分間隔で行なう。各液の除去法は同じ結果が得られるが、4ステップ法は処理が早い。
10. 受精卵を観察し、利用できる限り移植する。できれば融解後30分以内に移植する。明らかに変性した受精卵は廃棄する(凍結の方法が適切に行われていれば5%以下である)。  
我々は現在の手法よりも更にすぐれた簡潔な凍結保存法の開発を進めている。

## Ⅶ 世界の受精卵移植概況（参考）

（The present status of Embryo Transfer in the world (1984)）

### （1）牛受精卵の凍結保存状況と外国に販売された凍結並びに新鮮卵数

1984年に国際ET協会が参加会員に配布したアンケート調査では、アメリカ、カナダ、メキシコの142箇所のET事業所のうち86箇所（アメリカ：67/112、カナダ：17/26、メキシコ：2/2）から回答が寄せられた。これによると次のような結果が得られている。

#### ① 試験的に凍結保存された牛の受精卵数

アメリカ：	5,081	}	6,512
カナダ：	1,120		
メキシコ：	311		

#### ② 商業ベースで凍結保存された牛の受精卵数

アメリカ：	12,746	}	17,666
カナダ：	4,920		
メキシコ：	—		

#### ③ 移植されないで凍結保存されたままの牛の受精卵数

アメリカ：	10,374	}	14,361
カナダ：	3,850		
メキシコ：	137		

#### ④ 外国市場に販売された牛の凍結受精卵数

アメリカ：	1,634	}	1,934
カナダ：	233		
メキシコ：	67		

#### ⑤ 外国市場に販売された牛の新鮮卵数

アメリカ：	500	}	592
カナダ：	0		
メキシコ：	92		

このようにアメリカ、カナダでは、それぞれ10,374、3,850個の牛の受精卵が凍結保存されており、1983年には1,634、233個がアメリカ、カナダ、西ヨーロッパ、南アメリカなどへ輸出されている。アメリカにおける新鮮卵の販売は多くの例がカナダ、メキシコなどへ輸出されたものである。

### （2）商業ベースでの牛の受精卵移植状況

移植卵数はアメリカ、カナダが圧倒的に多く、それぞれ121,855、21,233個となっている。回収された受精卵のうち凍結保存された受精卵の割合は、ヨーロッパ、カナダ、アメリカの順に24、23、18%となり、さほど高いものではない。また農場で受精卵の回収された割合は、アメリカが他国に比べて低く57%である。これは商業ベースでETに取り組んでいるアメリカでは、卵回収や

移植目的に供卵牛や受卵牛を会社の農場、もしくはクリニックに引きつけて集中管理し、より高い受胎成績を得ようとするためである。供卵牛のうち肉専用種の占める割合は、アメリカで最も高く68%であったのに対し、ヨーロッパでは11%の低いものであった。移植は非手術的手法が主体を占め

表 1. 牛の受精卵移植概況

国又は地域別	移植卵数	凍結 %	農場で回収された割合 (%)	肉用供卵牛(%)	非手術的移植 (%)
アジア／アフリカ	1,438	10	95	51	21
オーストラリア／ ニュージーランド	5,399	6	73	44	87
ヨーロッパ	6,293	24	63	11	67
ラテンアメリカ	5,626	1	76	53	52
カナダ	21,233	23	68	53	76
アメリカ	121,855	18	57	68	80

ており、アメリカ、オーストラリア／ニュージーランド、カナダの順にそれぞれ87、80、76%となった。ヨーロッパで低いのはイギリスが多くの場合手術法によっているためで、逆にフランスではほぼ全例が非手術的手法によっている。1981年の調査によると手術法に替って多くの国で頸管経由法が採用された。とくにアメリカ、カナダを中心に、西ヨーロッパの西ドイツ、フランスなどでは頸管経由法の割合が増えてきている。

表 2. 受精卵移植の術式

国 別	臍部開腹法	頸管経由法
アルゼンチン	○	○
※オーストラリア	○	○
ベルギー	○	○
カナダ	△一部	◎大部分
コロンビア	○	
エクアドル		◎
英国	◎90%	△10%
フランス	△10%	◎90%
ドイツ	△一部	◎大部分
グアテマラ	○	○
アイルランド	○	△研究目的のみ
メキシコ	○	
パラグアイ	○	
スイス		◎
米国	△一部	◎大部分

※ クインズランド州では臍部開腹法

(1981年調査)

Victoria州では頸管経由法多し

### (3) 移植頭数の規模と農場の占める割合

表 3. 移植頭数の規模と農場の占める割合

国または地域	≤ 25	26— 199	200— 499	500— 999	1000— 1999	2000— 2999	3000— 4999	5000+
アジア／アフリカ	1	3	—	—	1	—	—	—
オーストラリア／ ニュージーランド	—	1	1	4	2	—	—	—
ヨーロッパ	—	3	3	1	3	—	—	—
ラテンアメリカ	1	7	7	2	1	—	—	—
カナダ	1	8	6	8	7	—	1	—
アメリカ	11	56	37	29	20	8	2	4
計	14	78	54	44	34	8	3	4

(注) アジア／アフリカ = 日本、インド、南アフリカ

ヨーロッパ = 英国、スイス、オランダ、デンマーク、西ドイツ

ラテンアメリカ = アルゼンチン、ブラジル、チリ、コロンビア、グアテマラ、メキシコ、ウルグアイ

1983年にブラジルで移植された受精卵数はDR. Fabio Garcia Pedrialiによると年間約300個といわれている。

フランスでは9つのグループが受精卵移植を行っている。1983年にはフィールドで約3,000個が移植され、このうち80%はホルスタインフリージンの供卵牛から受精卵が回収され、頸管経由法で移植されたものである。なお、移植卵のうち80%は新鮮卵で20%が凍結卵である。また試験的には300個の受精卵が移植され、このうち1/3は24時間培養、2/3は凍結融解後移植された。いっぽう1,000個を超す凍結受精卵が輸出目的に保存されている(DR. Vre M. Thibier 調査)。

日本では1983年に約50カ所でETを行い、1,466個が移植され423頭(28.9%)が受胎した。また受精卵の455個は凍結融解後移植され、101頭(22.2%)が受胎したと報じられている(入谷博士の調査)。

アメリカにおけるETの規模は、26—199、200—499、500—999、1,000—1,999頭の順に、それぞれ56、37、29、20農場となり、2,000頭以上移植したものが14農場を占めている。カナダ、ヨーロッパ、オーストラリア／ニュージーランドでも1,000—1,999個を移植した農場がそれぞれ7、3、2箇所にみられ、規模の大きさがうかがわれる面である。

### (4) 業種別受精卵移植状況

受精卵移植を行っている業種を大別すると下記ようになる。

- ① 商業ベースで受精卵移植を主体に実施している会社：186
- ② 開業獣医師が受精卵移植を行っているところ：147
- ③ 大学：76

- ④ 政府機関：16
- ⑤ 人工授精、器具や薬品製造販売などの業務の一部門として：48
- ⑥ 繁殖農家：59
- ⑦ 学生：59
- ⑧ その他：24

最も多いのが専業としてETを行っているところであるが、開業獣医師が診療と併せてETを行う例も多くを占めている。しかし後者では1人で年間3,000頭を超える移植を行っている例もあり、このようなクリニックではETが主体で、助手がこれを補助するような形がとられている。

#### (5) 会社、大学並びに研究所で行われているET技術

- ① クリニックで受精卵の回収と移植を行っている：238
- ② 農場で受精卵を回収している：339
- ③ 農場で受精卵を移植している：331
- ④ 手術的移植を行っている：186
- ⑤ 非手術的移植を行っている：339
- ⑥ 受卵牛を持っている：164
- ⑦ 受精卵を凍結している：241
- ⑧ 受精卵を分割している：100
- ⑨ 受精卵の性別を判定している：13
- ⑩ 販売目的の受精卵を持っている：113
- ⑪ 受精卵の輸出入サービスができる：109
- ⑫ 外国に技術者を派遣している：74
- ⑬ ETの技術研修を行っている：81
- ⑭ 精液の採取、販売を行っている：79
- ⑮ 過剰排卵処理用薬品の製造、販売、培養液、器材、受精卵の移植、凍結などを行っているところ：43
- ⑯ その他：39

先にも述べたようにクリニックで受精卵を回収、移植することに力点を置いているのは、企業ベースでETを行っているアメリカで43%を占めている。これは供卵牛や受卵牛を会社の農場へ導入して集中管理することが受胎率の向上に結びつくからである。実際にETの依頼農場で選択された受卵牛よりも会社の農場へ導入され、受胎するまでの間集中管理された受卵牛の方が受胎率の高い成績が得られている。このように受卵牛は受胎が確認されるまでの約90日間会社の農場に置かれている例が多い。

受精卵を凍結しているところは241箇所もあり、すでに実用化された技術として定着している。また受精卵を人為的に分割している場所も全部で100箇所あり、本技術の実用化が進んでいることを示唆している。

受精卵を移植する前に細胞の一部を取り出して性別を判定しているところは13箇所もあり、注目に値するところである。しかし、H-Y抗体による性別の判定は未だ不確実な技術で応用の域に達し

ていない。

表 4. E Tの主な対象動物と取扱会社

E Tの対象動物	取扱会社数
牛	4 2 0
馬	9 2
緬 山 羊	7 3
豚	4 5
霊 長 類 動 物	1 3
食 肉 動 物	1 5
実 験 用 小 動 物	2 4
そ の 他	2 2

表 5. 企業におけるE Tの業種と対象動物の割合

業 種 別	アジア/アフリカ	オーストラリア/ ニュージーランド	ヨーロッパ	ラテンアメリカ	カ ナ ダ	ア メ リ カ
E T専門業	1	9	9	11	20	116
開業獣医師	2	4	3	12	18	101
他種会社の 補 助 業 務	1	0	6	2	4	29
繁 殖 業	1	3	0	9	4	41
返 答 な し	1	0	0	1	0	1

動物の種類	アジア/アフリカ	オーストラリア/ ニュージーランド	ヨーロッパ	ラテンアメリカ	カ ナ ダ	ア メ リ カ
牛	3	11	12	18	34	305
馬	0	3	1	4	6	41
緬 山 羊	2	7	1	1	2	19
豚	0	0	1	0	2	10
霊長類動物	0	0	0	0	0	2
実 験 動 物	0	0	1	0	0	3

受精卵移植の対象動物では牛が最も多く、次いで馬、緬山羊の順となっている。豚は無菌豚の作出など実験目的にも有効な技術として注目されている。国内では伊藤忠飼料㈱が積極的に本技術の開発に当たっている。

本調査は企業ベースでE Tに取り組んでいる民間会社を対象にしたものである。アメリカにおける受精卵の分割技術は55箇所の会社で行われており、次いでカナダの17箇所と徐々に定着化の傾向にある。

アメリカで受精卵の凍結保存を行っているところは、クリニックで受精卵を回収、移植を行っている147箇所とほぼ同数の148箇所で、実用技術として定着していることを示唆している。

実際に受精卵を凍結保存し、販売を行っているところは76箇所、輸出入を行っているところが55箇所あり、更にこのような会社では取引先の国へ技術者を派遣したり、相手国から技術者を受け

表6. 国別ET技術サービスの取組状況

サ ー ビ ス	アジア/アフリカ	オーストラリア/ ニュージーランド	ヨーロッパ	ラテンアメリカ	カナダ	アメリカ
クリニックで卵回収/移植	2	6	5	9	18	147
農 場 で 回 収	5	12	13	21	35	198
農 場 で 移 植	5	12	12	19	35	199
手 術 的 移 植	3	10	5	10	18	103
非 手 術 的 移 植	4	12	13	19	33	199
受精卵を持っている	2	5	6	8	20	113
凍 結	1	8	11	6	26	148
分 割	1	1	4	2	11	55
性 判 別	0	0	2	0	0	3
卵 の 販 売	0	4	4	3	17	76
卵 の 輸 出 入	2	4	7	5	16	55
技術者の外国派遣	0	2	4	2	4	41
ET技術の研修	0	6	2	2	4	33
精液の採取販売	2	5	5	12	9	35
ET器具器材薬品の 製造販売	0	2	4	2	2	25
返 答 な し	0	1	1	2	0	25

入れて技術訓練を行うなどの態勢を取っている。アメリカに比べれば、規模は小さいが、カナダ、ラテンアメリカ、ヨーロッパ、オーストラリアやニュージーランドでも企業化が進んでいる。

#### (6) 企業ベースでの凍結保存卵と新鮮卵による移植頭数

1983年に企業ベースで凍結保存した受精卵と新鮮卵で移植した頭数を国別に比較してみると表7のようになる。企業が凍結保存した受精卵はアメリカで最も多く、21,211個となり、次いでカナダの4,928個、イギリスの942個の順となっている。これに対して南アメリカでは凍結保存された受精卵数が極めて少ない。また、新鮮卵で移植した例はアメリカ、カナダ、オーストラリアの順に99,995、16,252、3,460個となっている。日本やインドでは企業ベースでの移植例数が少なく、この分野での積極的な取組みが期待される。

表7. 企業ベースでの凍結保存卵数と新鮮卵による移植

国 別	1983年に企業ベース で凍結した受精卵数	1983年に新鮮卵で 移植した数
アルゼンチン	0	2,757
オーストラリア	189	3,460
ブラジル	0	674
カナダ	4,928	16,252
チリ	25	356

コロンビア	45	1,075
デンマーク	20	149
フランス	600	2,400
ドイツ	167	1,388
グアテマラ	0	200
インド	30	80
日本	30	33
メキシコ	0	158
ニュージーランド	180	2,750
南アフリカ連邦	85	1,180
スイス	10	250
イギリス	942	1,467
米国	21,211	99,995
ウルグアイ	0	336
オランダ	350	1,600
計	28,812	136,560

# MEMO



## VIII 受精卵移植の結果生まれた子牛の正常性(参考)

### (Normality of calves resulting from Embryo Transfer)

1986年に合衆国とカナダで約20万個の受精卵が移植され、約10万頭の産子を得らると予想されている。この中には、凍結卵、未熟な技術者による非手術的な移植及び分割卵も含まれている。この論文の中に述べられている調査が企画される以前には、受精卵移植の結果生まれる産子(以下ET産子)の研究は為されていなかった。受精卵移植による生産の流産率、初生時の損耗、性比、生時体重、助産及び妊娠期間への影響については、予想はあったけれども、組織的な調査は、実施されていない。

#### 1. 方法

##### (1) データの収集

1974年から1980年までの間ET産子について調査しデータを得た。供卵牛の繁殖性の有無、受卵牛と供卵牛の性周期の同期性、移植時の受精卵の質、供卵牛に対する過排卵処置による受精卵かどうか、受精卵の保存時間、供卵牛と受卵牛の品種や年齢といった要因が性比、流産率、生時体重、助産、初生及び離乳前の損耗、先天異常、妊娠期間に与える影響について調査した。

コロラド州立大学の受精卵移植研究所において、約600頭の供卵牛に対してFSHあるいはPM SGを用い、発情誘起のためにPGF<sub>2α</sub>を使用したり、しなかったりして、過排卵処置を行った。一部の供卵牛については、過排卵処置を実施しないで、発情観察後12時間目に人工授精を行い、1個の受精卵を回収した。

発情日を0日として、3から11日の間に、供卵牛から採卵するため、2つの方法が使われた。1976年までは、正中切開法による手術的な手法が使われていた。1976年以降は、バルーンカテーテルを子宮頸管を通過させて子宮内に挿入する非手術的な手法が用いられた。両子宮角に注入され、回収された灌流液の量は、約1Lであった。

灌流液から検策した受精卵を洗浄し、1から6のランクに分けた(1は完全に生存、6は未受精卵と死滅卵)。そして、移植までの間の時間は、37℃あるいは、室温で保存された。99%の受精卵の保存時間は、1から10時間であった。

供卵牛との発情日差が±2日以内の健康な受卵牛を用意した。この研究に用いた受卵牛は、ほとんど、自然発情であった。ごく一部の受卵牛については、PGF<sub>2α</sub>を用いて同期化した。受精卵を非手術的あるいは、臍部や正中切開による手術的手法によって、移植した。

供卵牛の発情からはば55から65日目に、直腸検査によって、受卵牛の妊娠鑑定を行った。妊娠した受卵牛については、80から100日目に再び検査した。年齢、品種、過排卵処置、卵巢反応及び受精卵の個数を各供卵牛について、記録した。

受卵牛の記録は、年齢、品種、供卵牛との性周期の日差、移植の手法及び移植の難易を含んでいる。受精卵の記録用紙には、受精卵の日齢、採取卵数、いくつかの形態的特徴、保存液の種類及び卵のランクを記入した。本研究では、妊娠2か月に至った受精卵及び受卵牛のデータのみ、考慮した。

受卵牛は、妊娠90から100日で、供卵牛の所有者に売却したため、合衆国からカナダに亘る地域に、移動した。コロラド州立大学の受精卵研究所では、これ以降は、受卵牛について、観察することはできなかった。

## (2) 分娩時のデータの収集

分娩情報収集のため、数年間に亘り、調査用紙を売却した受卵牛の所有者あてに送付した。この用紙には、分娩日、産子の性、生時体重、新生時や1から6か月齢の生存性について、記入するようになっていた。また、流産及び死産の原因についても記入してもらった。回収した用紙は、記入ミスや疑問のあるデータがないかどうかチェックした。このチェックによって、役に立たないデータを有用なものとすることができた。郵便での返送のない所有者には、さらに、電話をかけた。調査を開始時には、既に、2年も前から、何頭かの産子が得られているが、その全体に占める割合は、小さかった。郵便より前に、電話によって古いデータの修復を行った。ある牛群から大量のデータが得られない時には、その牧場や大農場へ訪ねて行って調査した。稀な例ではあるが、育種協会から、データを回収できないこともあった。

1908頭の受精卵移植による受胎例からデータを得た。1974年の1月から1980年の12月の間に、コロラド州立大学受精卵移植研究所から移動していった妊娠牛の84%のデータが回収された。記録が紛失したため、シンメンタール種の妊娠例についての大量のデータが失われた。もし、このデータが残っていたなら、89%の回収率であった。この高い回収率は、データの正確度を高めている。

## (3) データの評価

統計学的分析の大部分は、5品種（ホルスタイン種、ヘレフォード種、アンガス種、リムジーン種、シンメンタール種）の供卵牛から得られたデータを用いて行われた。供卵牛の品種の効果を分析する際、他品種の寄与率は、極めて小さい。

受卵牛は、基本的には、年齢と品種で5群に分けた。5群とは、1) ヨーロッパ大陸系肉用品種の雑種の若齢牛、2) ヨーロッパ大陸系肉用品種の雑種の高齢牛、3) 英国系肉用品種あるいは、その雑種の若齢牛、4) 英国系肉用品種あるいは、その雑種の高齢牛、5) ホルスタイン種若齢牛である。正確な分娩記録が不明確な少数例を除いて、若齢牛には、4歳以下のものを分類した。この基準による受卵牛の分類間違いは、ごく僅かだと考えている。ヨーロッパ大陸系肉用品種に区分された牛の大部分は、シンメンタール種の血統が $\frac{1}{4}$ あるいは $\frac{3}{4}$ 入った牛（主として、ヘレフォード種または、アンガス種または、アンガス種との雑種）であった。英国系種には、主として、ヘレフォード種、アンガス種とその雑種が含まれている。

供卵牛の繁殖状況は、受精卵移植研究所の技術者によって、繁殖歴及び（あるいは）生体検査に基づいて、診断された。供卵牛は、5群に分けた。すなわち、1) 正常な繁殖能力を有する牛、2) リピートブリーダー、すなわち、6か月以上に亘って受胎していない牛、3) 卵巢のう腫の病歴を持つ牛、4) 子宮内膜炎、臨床的子宫感染歴のある牛、5) 老齢牛、すなわち、若齢時には、繁殖能力を有していたが、現在は、リピートブリーダーである10歳以上の牛である。この分析の主旨から、癒着による不受胎牛は正常牛群に含めた。

初生牛のうち、2.14%は、死産であった。これらの死は、受精卵移植時の異常な条件とは、まっ

たく無関係であった。受精卵の品種は、これらの損耗の有意な因子ではなかった。1日齢から6か月齢までに、発生した24の死亡例のいくつかと同様に、これらの診断のつかない損耗の大部分については、おそらく、飼養管理の失宜が重要なポイントである。24例のうち、10例は1週間以内に、さらに、10例は1週間から1か月以内に発生している。それ以降に死んだ牛についてみると、受精卵の条件や移植時の条件は、正常範囲であった。Bellows (1971)は、分娩時における産子の原因不明の事故について、剖検を実施した。71.9%は解剖学的に正常であった。それらの産子のうち、57%は低酸素症で死に至った。彼は、論文の中で、初生牛の4.45%を占める分娩時の事故は、管理の改善によって、減少させることができると述べている。

表 1. 受精卵移植によって生まれた産子の死亡

原 因	頭 数			死 亡 率 (%)	産子に占める割合 (n=1682)
	雄	雌	不 明		
先 天 異 常	5	4	0	5.9	0.54
早 産	1	1	1	2.0	0.18
原因不明(生時)	16	18	2	23.7	2.14
原因不明(生時から離乳まで)	15	9	0	15.8	1.43
難 産	24	14	2	26.3	2.38
子 牛 の 病 気	12	9	0	13.8	1.25
環 境	12	7	0	12.5	1.13
合 計	85	62	5	100	9.04
(%)	(55.9) <sup>a</sup>	(40.8)	(3.3)		

a 雄の方が多く死んでいる (  $P < 0.05$  ,  $\chi^2$  )

様々な子牛の病気によって、21頭の産子が死に、初生から6か月についてみると、寒冷感作、四肢骨折、偶然の力といった環境条件によって19頭が死に至っている。これら、40頭の産子は、正常な条件下で、受精卵移植が実施された。こういった死亡例のほとんどは、おそらく、未然に防ぐことが可能であった。

分娩時の難産による産子の死亡は、初生時の事故の最も大きな原因で、死亡数全体の26.3%、すなわち、産子の2.38%にもなる。難産によって死に至った受精卵の特徴を産子が生存している受精卵と比較した。受卵牛の品種や年齢は、これらの損耗と統計的に有意な関係はなかった (  $P > 0.1$  )。Anderson と Bellows (1967)は、The U.S. Range Livestock Experiment Stationにおける3049の分娩例のうち、分娩時の産子の死亡の最も一般的な原因は、難産、あるいは、娩出遅延の間に、受ける損傷であることを発見した。

305頭の受精卵移植によらない産子の牛群の初生時の損耗は、5% (  $n = 16$  ) であった。一方、受精卵移植による産子のその損耗は、7% (  $13/185$  ;  $P > 0.1$  ) であった。これらの数値は、一般的な数値よりも低い。対象群のデータは、比較的管理の良好な牛群から、正確に、収集したものである。

妊娠2ヶ月から離乳までのすべての損耗を累計すると14%であった(表2)。

表2. 妊娠2か月と確認された、1,776頭の流産やET産子の死亡による全損耗

項 目	頭 数	比 率 (%)
初生から離乳までの損耗	152	8.56
2から3か月の流産	56	3.15
3から7か月の流産	38	2.14
合 計	246	13.85
分娩までの受卵牛の死亡	5	0.28
産子が離乳に至らなかった頭数	251	14.13

著者たちは、受精卵による産子の初生から離乳までの死亡と受精卵移植とは、無関係だと結論付けている。その損耗は、種々の文献中に発表されている数値の範囲内に収まっている。しかし、管理が良好であれば、この損耗は、さらに、抑さえられていたであろう。例えば、ある群では、生まれた8頭の子牛が全頭死に至っている。その内訳は、出生時に4頭、1週齢で2頭、約1か月齢で2頭であった。たとえ、ひどい管理失宜がはっきりとしていても、それらの子牛のデータも分析の中に組み入れた。

#### (4) 生時体重

記録の得られた1,139頭の生時体重は、37.4kgであった(表2)。データの偏りを防ぐため、生時体重の明確な牛群については、すべてのデータを分析の中に含めた。乳用種の殆どの牛群は、生時体重を記録していなかった。供卵牛の品種、受卵牛の品種と年齢、産子の性別、受精卵の品種別の平均妊娠期間からの偏りを使って、生時体重を分析すると、妊娠期間の偏差は、生時体重の分散の大きな要因の1つであった。妊娠期間が1日伸びれば、生時体重は、直線的に0.29kg増加した。供卵牛の品種は、生時体重に極めて有意な関係があった( $P < 0.005$ )。供卵牛がアンガス種の場合、生時体重は、最も軽く(32.8kg)、一方、シンメンタール種の場合、最も重かった(41.2kg)(表3)。雄子牛は、雌子牛に比べて、2.19kg重かった( $P < 0.005$ )。

表3. 受精卵の性別及び品種別の平均生時体重

品 種	雄 (頭数)	雌 (頭数)	平 均
ホルスタイン種	40.7(76)	39.8(62)	40.3 <sup>a</sup>
ヘレフォード種	37.4(173)	35.1(148)	36.2 <sup>b</sup>
アンガス種	34.0(89)	31.6(72)	32.8 <sup>c</sup>
リムジーン種	38.0(118)	34.7(109)	36.4 <sup>b</sup>
シンメンタール種	42.3(146)	40.2(146)	41.2 <sup>a</sup>
	602	537	
平 均	38.5 <sup>d</sup>	36.2	37.4

a, b, c 列内の異なった添字間に差があった( $P < 0.01$ ; Tukey 検定)。分散分析による標準偏差は、4.53kgであった。

d 雄子牛は、雌子牛よりも、重かった( $P < 0.005$ )。

受卵牛の品種と年齢は、生時体重に関与していたが、性別及び供卵牛の品種に比べて、その差は、ごく小さいものであった（表 4）。

表 4. 受卵牛の品種及び年齢別の E T 産子の生時体重

受 卵 牛	頭 数	全平均からの偏り kg	平 均 kg
3.5 歳以下のホルスタイン種	170	-0.08	37.3 <sup>a</sup>
3.5 歳以下のヨーロッパ大陸系品種及びその雑種	443	-1.06	36.3 <sup>b</sup>
4 歳以上のヨーロッパ大陸系品種及びその雑種	131	1.26	38.6 <sup>c</sup>
3.5 歳以下の英国系品種及びその雑種	320	-1.14	36.3 <sup>b</sup>
4 歳以上の英国系品種及びその雑種	75	1.03	38.4 <sup>a c</sup>

a, b, c, 異なった添字の付いた数値には差があった（ $P < 0.05$  ; Tukey 検定）

## (5) 助産

助産の程度を点数化した。すなわち、1 は、助産なし、2 は、弱い牽引、3 は、強い牽引、または（あるいは）、胎位不正、4 は、帝王切開とした。助産に関しては、1,036 頭の E T 産子について、記録があった。すべての所有者が助産の記録を付けていたわけではない。しかし、記録しているところは、極めて正確に行っていた。平均助産スコアは、1.6 であった。供卵牛の品種は、受卵牛の品種と年齢と同様に、分散の有意な要因であった（ $P < 0.005$  ; 表 5, 6）。英国系品種及びその雑種の若齢牛が、最も助産を必要とし、ヨーロッパ大陸系品種及びその雑種の高齢牛は、最も助産を必要としなかった（ $P < 0.005$  ; 表 7）。供卵牛の品種と受卵牛の品種の間には、関係はなかった。大型品種（リムジーン種、シンメンタール種）の受精卵を、小型品種（特に、アンガス種）の若齢牛に移植した場合、平均助産スコアは、2.85 で、リムジーン種の受精卵をヨーロッパ大陸系の雑種に移植した場合のスコアは、1.18 であった。驚いたことに、産子の性別は、助産スコアに、有意な影響を与えていなかった。

対象及び受精卵移植の両方から成績の得られる農場からのデータについてみると、両群間には、助産あるいは生時体重について、有意な差はなかった。

表 5. 供卵牛の品種別の E T 産子の助産スコア

品 種	頭 数	平均スコア
ホルスタイン 種	138	1.37 <sup>a</sup>
ヘレフォード 種	308	1.33 <sup>b</sup>
ア ン ガ ス 種	161	1.15 <sup>b</sup>
リ ム ジ ー ン 種	216	1.82 <sup>c</sup>
シンメンタール 種	213	2.39 <sup>d</sup>
合 計	1,036	1.61

a, b, c, d, 異なった添字の数値間には、有意な差があった（ $P < 0.05$  ; Tukey 検定）

分散分析による標準偏差は 0.87 であった。

表 6. 受卵牛の品種及び年齢別のET産子の助産スコア

品 種	頭 数	平均スコア
4 歳未満のホルスタイン種	135	1.56 a
4 歳未満のヨーロッパ大陸系品種及びその雑種	437	1.51 a
4 歳以上のヨーロッパ大陸系品種及びその雑種	131	1.28 b
4 歳未満の英国系品種及びその雑種	261	2.11 c
4 歳以上の英国系品種及びその雑種	72	1.60 a

a, b, c, 異なった添字の数値は、有意な差があった ( $P < 0.05$ ; Tukey 検定)

## (6) 性比

この研究では、1751頭の産子の性別は、51.11%が雄であった。1卵性双子の2組は含まれているが、それぞれ1件として、取り扱った。いくつかのデータは、不完全であるため、あるいは、受精卵が記録と適合していない受卵牛であったために、報告から除外しなければならなかった。ET産子の情報はあっても、正確な受卵牛の記録が欠けているような場合、それぞれの品種毎に、記録を集計しようとする時、こういった問題が出てきた。

回収時の受精卵の日齢、質、回収から移植までの保存時間、受卵牛と供卵牛の性周期の同期性、供卵牛の年齢、ホルモン処理 (51%が雄、 $n=1,540$ ) と非処理 (53%が雄、 $n=126$ )、供卵牛の卵巢の黄体数、供卵牛の繁殖性といった要因が性比に与える影響について、出来る限り、調査した。受精卵の品種と受卵牛の品種についても、考慮に入れた。これらの要因は、性比と関係はなかった ( $P > 0.1$ )。

雄が生まれた受精卵の供卵牛の平均年齢は、雌が生まれた受精卵のそれよりも、有意に高かった ( $P < 0.1$ )。老齢牛、すなわち、11歳以上 (1頭は19.5歳であった) で、若齢時には、繁殖性を有していたが、リピーターブリーダーとなった牛 (70/113, 62%が雄;  $P < 0.5$ ) は、雄子牛を生産する割合が、繁殖障害歴のない供卵牛 (689/1,363, 52%が雄) よりも高かった。

対照群においては、対照の性比が56.4% ( $n=305$ ) で、ET産子の性比は55.7% ( $n=185$ ,  $P > 0.1$ ) であった。これらの性比の高いのは、比較的管理が良好なためであった。良い管理の牛群では、雄子牛の比率が高いことが、すでに、知られている (Skjervold and James, 1979)。

この研究では、ET産子の性比は、ETによらない産子の性比に、近かった (Johansson ら, 1974; Foote, 1977)。受精卵移植による生産は、その産子の性比とまったく関係がなかった。

## (7) 1卵性双子の発生率

1,751頭のET産子の群に、1卵性双子が、2組含まれた。これは、全体の0.114%であって、この結果は、Johansson ら (1974) が、多数のETによらない生産における双子の調査によって得た結果と合致する。双子の両組とも、雌同士であって、通常の条件下で、正常卵を移植した結果である。

## (8) 妊娠2か月以降の損耗



受精卵移植による受胎率は、人工授精のそれと似通っている。しかし、この研究で考慮した、いくつかの要因によって、おそらく、影響を受けていた。これらの研究では、妊娠2か月から、調査を開始しているので、受胎率そのものではないことを強調しておかなければならない。明らかに、移植から妊娠2か月までに、かなりの損耗がある（例えば、Markette ら、1985）。

## (9) 妊娠期間

受精卵移植によって得られた1,484例の妊娠について、妊娠期間のデータを比較した。受精卵の品種は、妊娠期間に最も強く影響した（表7）。この発見は、胎児は分娩開始に極めて強く関与しているという説によっても裏付けられる。受卵牛の年齢もまた、影響し、若齢牛の受卵牛は、高齢牛よりも2.7日早かった（ $P < .01$ ）雄子牛の平均在胎日数は285.0日で、雌子牛は、283.6日であった（ $P < .01$ ）。

表7. 供卵牛品種別のET産子の平均在胎日数

品 種	頭 数	平均値±標準偏差、日
ホルスタイン 種	351	278.7 ± 0.31 <sup>a</sup>
ヘレフォード 種	459	285.7 ± 0.27
ア ン ガ ス 種	166	281.0 ± 0.43
リ ム ジ ー ン 種	248	289.7 ± 0.35
シンメンタール種	260	287.6 ± 0.35

<sup>a</sup> 平均値は、他品種と有意な差があった（ $P < .01$ ；Tukey 検定）

回収時の受精卵の日齢、質、回収から移植までの保存時間、受卵牛と供卵牛の性周期の同期性、供卵牛の年齢、供卵牛のホルモン処理による卵巢反応といった要因が、妊娠期間に与える影響を調査した。これらのうち、供卵牛と受卵牛の性周期の差についてのみ、影響が認められ、1日のずれで、妊娠期間が、直線的に、0.78日伸びるという関係があった。したがって、供卵牛の前に発情のあった受卵牛は、供卵牛の後に発情のあった受卵牛よりも、早く分娩した。

同じ農場内で受精卵移植による妊娠とそれによらない妊娠とが、得られる例について、研究すると、両者の妊娠期間の長さには、差がなかった。著者らは、受精卵移植による生産は、受卵牛の妊娠期間に影響しないと結論付けた。

## 2. 結論

受精卵移植による生産は、流産率、初生から離乳までの死亡率、生時体重、助産、性比、妊娠期間には、影響しなかった。受精卵移植による産子とそれによらない同居産子には、統計的に有意な差はなかった。全特徴を研究した結果、受精卵移植による産子は、完全に、正常であった。

MEMO



MEMO