

# 胚移植技術の簡易安定化と双子生産

熊谷光洋、吉川恵郷、菅原好秋、佐藤利博、川村祥正、  
※ ※※  
菊地誉利子、沼尻洋一、谷地 仁、千葉健市、吉田吉明

(※現遠野家畜保健衛生所、※※現岩手県立農業短期大学校)

## 目 次

### I 緒 言

#### 第1章 多排卵誘起法の検討

#### 第2章 胚の凍結と融解方法の解明

#### 第3章 凍結胚移植による受胎率の向上

#### 第4章 2 胚移植法の検討

### II 摘 要

### III 引用文献

### I 緒 言

牛の胚(受精卵)移植は、供胚牛(供卵牛; Donor)の生殖器から着床前の胚を取り出し、受胚牛(受卵牛; recipient)の生殖器に移して着床・妊娠・分娩させる技術である。技術の内容は、

- ① 供胚牛における多排卵誘起処置と人工授精
- ② 供胚牛からの胚の回収・検卵
- ③ 供胚牛と受胚牛の性周期の同調
- ④ 胚の保存・培養
- ⑤ 胚の受胚牛への移植

に分類できる。

この技術を用いることにより、品種の枠を越えた繁殖、家畜の改良期間の短縮、双子生産による増殖、胚の凍結保存による資源保存が可能となる他、試験研究においても種々の応用が可能で、試験精度の向上にもつながる。

牛の胚移植の研究は1951年にWillettらが開腹手術によって成功した<sup>1)</sup>。1964年に国内では杉江ら、海外でMutterらが非手術的移植に成功した。このことにより、胚移植の技術開発が進むことになった。

一方、岩手県における畜産の粗生産額は、昭和62年以来、米を抜き全体の40%以上を占め、岩手県農業の基幹部門となっている。しかし、

農産物の輸入自由化対策として肉用牛については、子牛の生産コストを下げる必要に迫られ、これまでの生産・飼養・肥育技術の見直しとともに新技術を導入することとなり、牛の双子生産に向けた胚移植技術に取り組んだ。

当場では昭和59年度より受精卵移植技術利用促進事業および繁殖新技術の実用化と多胎子牛の育成技術開発としてこの技術に着手したが、これを農家段階で利用するにあたっては、技術者を養成するとともに、先に述べた各技術項目を確立し、さらに簡易化を図り、農家経営に取り込める状態にまでする必要があった。

そこで昭和61年度から5カ年に渡り、胚移植技術の簡易安定化技術の開発、胚移植技術による双子生産技術の開発、双子生産における産子の能力発現技術の開発について検討したので、以下4項目に大別し、報告する。

# 第1章 多排卵誘起法の検討

## 1. 目的

自然な牛の排卵数は通常1個であるために、子宮灌流による胚の回収効率を上げる目的でホルモン剤を投与し、卵胞の発育を誘起する方法が取られている。卵胞刺激ホルモンにはいくつかの種類があり、それぞれに合わせた投与プログラムが各地で検討されているが、正常胚の回収を多く、確実に、しかも簡易に行うのが理想である。

そこで、農家段階で多排卵誘起を行うために参考となる手法の確立に取り組んだ。

## 2. 材料と方法

供試牛には、県内各地よりDonorとして導入された黒毛和種雌牛を用いた。多排卵誘起には、豚の脳下垂体より抽出した卵胞刺激ホルモン(FSH)、発情誘起にはプロスタグランジン $F_2\alpha$  (PGF $_2\alpha$ ) 類縁物質 (Cloprostenol Na) を用いた。多排卵誘起は性周期の9~14日目に開始し、FSH初回投与の48時間後にPGF $_2\alpha$ を投与した。さらに発情発現を確認してから凍結精液による人工授精を行い、胚は処理開始時の発情後7日目に尾椎麻酔下でバルーンカテーテルを用い非手術的にダルベッコの修正リン酸緩衝液(m-PBS)を灌流液とし、子宮灌流を行い回収した。

### 1) FSH投与量が胚回収成績に及ぼす影響

FSHの減量投与において、4日間28A. U.、4日間26A. U.、3日間24A. U.の3区に区分(表-1)し、多排卵誘起に対する反応黄体数と胚の回収成績を回収胚数・正常胚数・正常胚率について比較検討した。発情誘起はいずれの区も3日目の朝にPGF $_2\alpha$ を投与した。

表-1 FSH減量投与法

投与区	1日目		2日目		3日目		4日目	
	朝	夕	朝	多	朝	夕	朝	夕
28A. U.	5	5	4	4	3	3	2	2
26A. U.	5	5	4	4	3	3	2	
24A. U.	5	5	4	4	3	3		

### 2) FSH投与回数が胚回収成績に及ぼす影響

FSH減量投与法を総投与量24A. U.とし、2回/日と1回/日投与(表-2)の2区に区分し、多排卵誘起に対する反応黄体数と胚の回収成績を回収胚数・正常胚数・正常胚率について比較検討した。

表-2 FSH減量投与法

投与区	1日目		2日目		3日目	
	朝	夕	朝	夕	朝	夕
2回/日	5	5	4	4	3	3
1回/日	10	-	8	-	6	-

### 3) 反応不良牛への黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)の投与

胚回収成績不良牛18頭に対し、次回の多排卵誘起時の初回人工授精時にLH-RH200 $\mu$ gを筋肉内注射し、胚回収成績への影響を検討した。

### 4) 多排卵処理の反復が胚回収成績に及ぼす影響

5年間の胚回収成績から供胚牛46頭について、胚回収回数別の胚回収成績比較を行った。

調査項目は多排卵誘起処置開始時の卵巣所見(黄体、卵胞)、回収胚数、正常胚数である。

### 5) 多排卵処理開始時~胚回収時の卵巣所見を超音波診断装置(アロカ社; 5MHzの直腸検査用プローブ)を用い、黄体・卵胞の状況について調査した。

## 3. 結果および考察

### 1) FSH投与量が胚回収成績に及ぼす影響

多排卵処理に対し形成される黄体数、回収胚数、正常胚数は、FSH28A. U.区(n=25)ではそれぞれ、10.0 $\pm$ 4.5、7.0 $\pm$ 4.7、2.5 $\pm$ 2.7、FSH26A. U.区(n=44)では10.2 $\pm$ 5.4、5.4 $\pm$ 4.9、2.7 $\pm$ 3.4、FSH24A. U.区(n=44)では11.2 $\pm$ 7.1、6.6 $\pm$ 6.6、4.6 $\pm$ 5.8であり、正常胚率はFSH 24A. U.区が最も多かった(表-3)。

表-3 FSH投与量と採卵成績

投与量	(n)	黄体数	回収胚数	正常胚数	正常胚率
28A. U.	25	10.7±4.5	7.0±4.7	2.5±2.7	35.7
26A. U.	44	10.2±5.4	5.4±4.9	2.7±3.4	50.0
24A. U.	44	11.2±7.1	6.6±6.6	4.6±5.8	69.7

多排卵を誘起する方法としてはFSHを利用する方法<sup>2,3,4,5,6,7</sup>)と妊馬血清 性腺刺激ホルモン (PMSG) を利用する方法<sup>3,8,9,10,11</sup>)に大別されるが、PMSGを用いた場合には正常胚数の低下や反復投与した際に卵巣反応の低下がみられる<sup>12,13</sup>)との報告もある。

この理由としてはPMSGの体内での分解がFSHに比較して遅い<sup>14</sup>)ために卵胞に対する作用が持続することや、PMSG抗体が産生される<sup>15</sup>)ことが挙げられている。このために、現在では主にFSHが多排卵誘起に用いられている。

FSHの投与方法は、投与量、投与期間、定量投与、減量投与と種々の検討が加えられてきたが、40mgの定量投与と28mgの減量投与では両者の間に有意差はなく、正常胚数は減量投与の区で高かった<sup>16</sup>)。ChupinらのFSH32mgの定量・減量投与の比較においても減量投与方法が有効とさ

れている<sup>16</sup>)。Garciaらは24mgの3日間減量投与、28mg 4日間の減量投与と32mg 5日間の減量投与について比較し、3~4日間の減量投与で回収胚、正常胚が多かったと報告した<sup>17</sup>)。これは著者らの試験結果においても同様の成績が得られており、黒毛和種に対する多排卵誘起のためのFSH投与量は24A. U. が効率的と思われる。

2) FSH投与回数が胚回収成績に及ぼす影響

FSH減量投与を1日2回投与で行い、発情の発現したものについての推定黄体数、回収胚数、正常胚数は9.3±5.4、6.7±5.5、4.5±3.8、また1日1回の場合には、10.3±5.1、5.8±2.8、3.4±1.7であり、それぞれの数字の間には差は認められなかった。しかし、発情の発現率は前者で88.2%であるのに対し、後者では66.7%と、低い値にとどまった(表-4)。

表-4 FSH投与回数が採卵成績に及ぼす影響

処理区分	(n)	発情発現(%)	黄体数	回収胚数	正常胚数(%)
1日2回	17	15(88.2)	9.3±5.4	6.7±5.5	4.5±3.8(67.9)
1日1回	12	8(66.7)	10.3±5.1	5.8±2.8	3.4±1.7(66.7)

FSHの多排卵誘起のための投与方法については野外、特に一般農家における多排卵誘起処理は(1)の方法を用いた場合煩雑でコストの高いものとなり、普及のためには簡易化を望む声が高い。Looneyらは1日1回と1日2回の投与について比較し、多排卵誘起処理に反応して生じた推定黄体数は同じであった<sup>18</sup>)が、著者らにおいては発情の発現率が低くなることから、技術の簡易化としてこの手法を用いるには発情を確実に誘起することが可能なのかどうか検討する必要がある。

3) 正常胚率の低い牛への黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) の投与

正常胚率の低い牛(推定黄体数、回収胚数、正常胚数はそれぞれ平均10.0、5.2、0.7)に、LH-RHを投与することで、その後の回収成績がそれぞれ(11.0、5.7、3.1)と特に正常胚の率に改善が見られた(表-5)。

表-5 正常胚率の低い牛へのLH-RH投与

区分	黄体	回収胚	正常胚(%)
無投与	10.0	5.2	0.7(13.5)
投与	11.0	5.7	3.1(54.4)

(n=18)

この事に関して、百目鬼らは多排卵誘起処理時の発情時血中LH濃度は自然発情時のそれよりもかなり低いと報告している<sup>19)</sup>ことなどから、適切な時期に排卵を生じさせることが胚の回収率を高め、その後の一連の内分泌の調和をもたらすことで、胚の外環境を適正にし、正常胚として回収されるものと考えられる。多排卵誘起処理過程でLH-RHを投与して卵胞の排卵を誘起し、正常胚の回収率を高める試みは、A. R. Pradoらの他多く行われている<sup>20,21,22,23)</sup>。著者らの試験においても胚回収成績は全体の平均においては改善されたが、供試した個体によってはまったく改善されないものもあり、多排卵誘起時にLH-RHを投与してもLH放出を促進できない状況にあったか、もしくは発情時のLH放出不足以外にも原因があったものとも思われる。

さらに、LH-RHは短時間にその作用を発現するが、多排卵誘起処理時では1回の投与では効果が認められず、90分間隔での2回投与が効果的<sup>24)</sup>であるという報告やLH-RHの4回投与

を行った結果も報告されている<sup>25)</sup>。田谷らはマウスではLH-RHを長時間高レベルに持続させる目的で溶液中にPolyvinylpyrrolidoneを50%濃度に添加して皮下接種し、排卵率・排卵数ともに増加したと報告している<sup>26)</sup>。以上のことから多排卵誘起後の低胚回収率、低正常胚率の一因として多排卵誘起時の発情時LH濃度の低いことがあり、その対策として発情時のLH-RH投与が有効であると思われる。また、一方ではLH-RHの効果を持続させて多排卵誘起によって生じた卵胞を簡易かつ適切に排卵させる研究が必要であろう。

#### 4) 多排卵誘起処理の反復が胚回収成績に及ぼす影響

処理回数と回収胚数、正常胚数の関係は図-1のように示された。およそ9回目までは回収胚数8個、正常胚数4個前後を維持するが、それ以降は多排卵誘起処理に反応するが正常胚が得られない傾向がみられる。

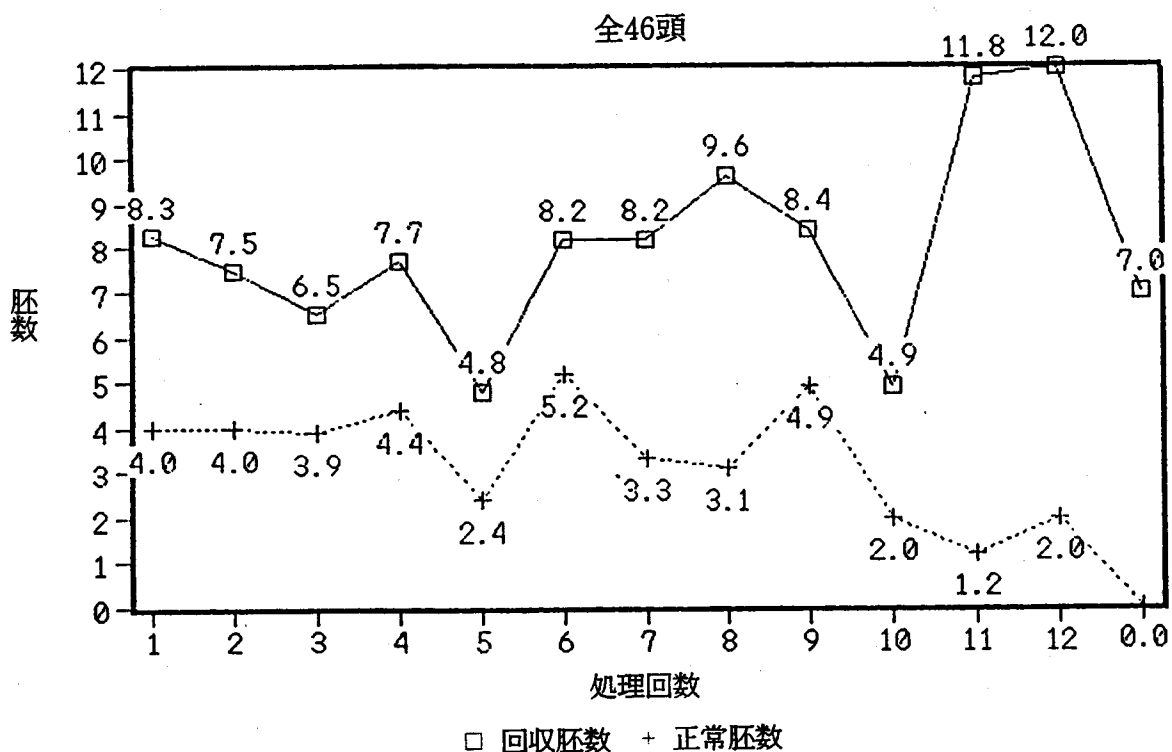


図-1 処理回数別胚回収成績

多排卵誘起処理の反復状況は、胚の回収後に発情を2～3回繰り返したものについて卵巢状況を確認して次回の処理に移るため、その間に3カ月前後の日数を要する。

牛の卵巢内には生時には約20万個もの原始卵胞が存在するが、生後1・2歳になると急激に減少し、卵胞数も減少の一途をたどる。

Donorとしての耐用年数についての報告は鹿児島畜試（平成2年度地域バイオテック研究推進会議資料）で7歳をピークに10歳以降は採卵成績が低下する傾向にあったとされている。

本試験に用いたDonorは、雌側の繁殖能力を明確にするために当初は3～4産を経たもので、導入時点で7歳の牛が最高齢となっており、試験終了時には10歳を越えたものも含まれている。このため多排卵誘起処理の回数が多いものは比較的高齢牛となっていること等を考慮する必要もあると思われる。

#### 5) 多排卵処理開始時～胚回収時の卵巢所見と胚回収成績との関係

多排卵誘起処理開始時の黄体の大きさと回収

表-6 黄体の大きさによる胚回収成績

黄体径 (mm)	(n)	回収胚数	正常胚数(%)
30～	2	6.0	2.5 (41.7)
25～29	13	12.9	3.2 (24.4)
20～24	24	9.9	4.8 (48.3)
～19	13	10.3	2.2 (21.6)

表-8 共存卵胞の大きさと胚回収成績

卵胞径 (mm)	(n)	回収胚数	正常胚数(%)
10～	17	8.0	2.3 (28.7)
5～9	14	10.0	3.6 (36.4)
～4	19	12.2	5.6 (45.9)

胚数、正常胚数の関係は表-6のとおりで黄体の大きさと胚回収成績に関係は認められなかった。

黄体内に腔を形成している場合と黄体組織が充実している場合の胚回収成績は、表-7のとおりで、腔形成の無い場合に正常胚数が若干多い傾向があるが、統計学的には有意差を認めなかった。

共存卵胞と胚回収成績は、表-8のとおりであり、卵胞径が小さいほど回収胚数、正常胚数ともに多い傾向がみられるが統計学的には有意差を認めなかった。

共存卵胞が黄体の同側、反対側にある場合の回収胚数は、それぞれ7.5、8.4と差はないが、正常胚数は3.0、1.7と前者で有意に多い(表-9)。

卵胞の発育と胚回収成績は表-10のとおりで、人工授精時の卵胞直径が10mm未満のものでは回収胚数2個以下、正常胚数0個であったのに対し、12mm以上のものでは正常胚が回収された。

表-7 黄体内の腔の有無と胚回収成績

黄体腔	(n)	回収胚数	正常胚数(%)
有	16	8.8	2.9 (32.9)
無	36	11.4	4.3 (37.4)

表-9 共存卵胞(10mm以上)の側別成績

共存側	(n)	回収胚数	正常胚数(%)
黄体側	8	7.5	3.0 (40.0)
反対側	9	8.4	1.7 (19.7)

表-10 卵胞発育と胚回収成績

牛 No.	卵 胞 数		人工授精時 卵胞直径(mm)	回 収 胚 数	正 常 胚 数
	処理開始時	人工授精時			
522	13	14	15	14	2
5	14	14	12	8	4
14	17	23<	10	38	4
17	1	16	6	0	0
10	8	16	12	14	4
103	7	20	8	2	0
16	12	19	12	12	4

黄体の状況と血中プロジェステロンの関係等については胚移植の受胎牛における多くの試験・報告があり、黄体の形状・大きさとプロジェステロン値に相関関係は認められず、黄体細胞の活性状況に依存する。本試験においても黄体の直径・腔の有無と胚の回収成績は無関係であり、黄体の細胞活性を測定することが必要であると思われる。

多排卵誘起処理時の卵巣状況と胚回収成績との関係については、鈴木らが発情時の発育卵胞数とFSH処置開始時の卵胞数(直径<6mm)数が多いほど多排卵誘起によく反応し、FSH処置開始時に大卵胞(直径>15mm)や囊腫様の黄体が存在する牛は小卵胞数が少なく反応が悪かったと報告している<sup>27)</sup>。本試験では卵胞の直径を5mm単位に区分して胚の回収成績と対比した結果、卵胞径が大きいほど正常胚の回収率が減少する傾向にあった。多排卵誘起に反応する卵胞の大きさは1.7mm以上であるとMoorらが報告している<sup>30)</sup>が、上限については不明である。多排卵誘

起処理時の卵胞数については、性周期の13日目に最も多く観察され<sup>28)</sup>、性周期8~11日目に処理開始したときに黄体数・回収胚数が多い<sup>(29,30,31)</sup>、といった報告がある。

処理開始時の黄体の状況や、共存する卵胞がホルモン処理に及ぼす影響についてはあまり報告がないが、大卵胞が存在した場合には卵胞中のエストロジェンの影響が卵胞発育・発情発現・排卵・卵管および子宮環境に及ぶことも考えられ、多排卵誘起処理開始の要件のひとつとして考慮が必要と思われる。

発育卵胞の処理中の経過は卵胞数・卵胞直径ともに増加した。しかし、Monniauxらの性腺刺激ホルモンの注射により腔形成前卵胞と極小卵胞数は増加するが、直径1.7mm以上の卵胞数は一定<sup>31)</sup>である。超音波画像からは2mm以上の卵胞が識別可能、FSH処置の経過に伴う卵胞数の変化は顕著なものでない<sup>26)</sup>。との報告と併せて考慮すると、卵胞数の増加の大きな例がいくつかあり、これらの報告とは異なった。

## 第2章 胚の凍結と融解方法の解明

### 1. 目的

胚の凍結保存は1973年にWillmutとRowsonが、凍結保存胚の移植により子牛を生産<sup>33)</sup>し、国内でも1979年、杉江らが成功例の報告をして以来<sup>34)</sup>多くの研究がなされてきたが、1976年にBiltonが耐凍剤としてグリセロールを用いて<sup>35)</sup>から急速凍結法が検討されてきた。本試験でも後述(IV. 凍結胚移植による受胎率の向上)のようにグリセロールを耐凍剤とした胚の凍結保存後の移植で、ほぼ他の試験成績と同様の成績を得ている。

しかし、野外での応用に際しては耐凍剤除去を施設内で行うことが普及上の制限要因となってきた。このため、耐凍剤の除去を簡易に行う方法についての検討を行った。

### 2. 材料と方法

黒毛和種雌牛を供胚牛としFSH24A, U.による多排卵誘起処置を施し、発情後7日目の胚の回収を行った。凍結融解法は(1)、(2)、(3)の3手法について検討した(図-2)。

(1) 3段階希釈法；20%血清加m-PBSを基に

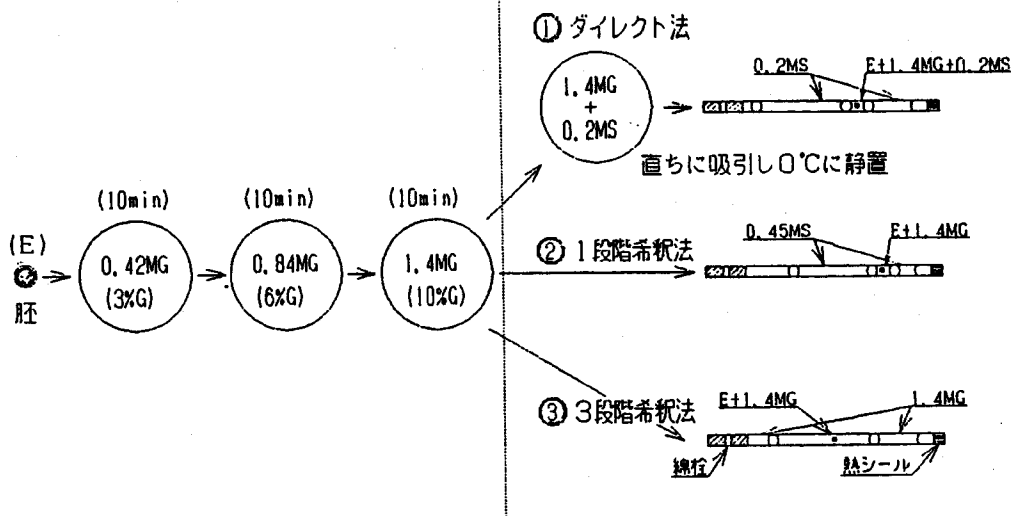
し、耐凍剤にグリセロールを使用。耐凍剤平衡はグリセロール濃度3,6,10%の3段階、平衡時間は各10分とした。凍結方法は、胚を0.25mlのストローに吸引し、室温から-5℃までは-1℃/分の勾配で冷却、-5℃に10分保持中に植氷、-30~-35℃まで-0.3℃/分の勾配で冷却し、液体窒素中に投入保管した。融解は30~38℃の温湯中で行い、耐凍剤除去は平衡と逆の操作で希釈を行った。

(2) 1段階希釈法；融解後の耐凍剤除去を0.45 Mol濃度シュクロース添加m-PBSを用いてストロー内で行う。

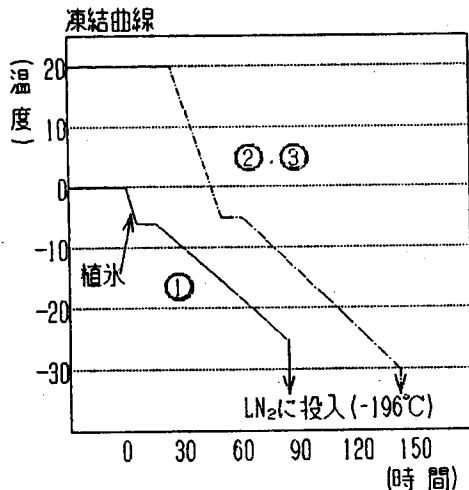
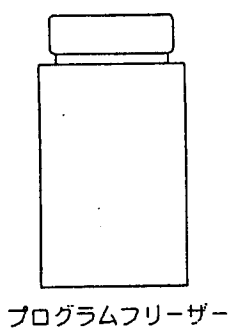
(3) ダイレクト法；3段階のグリセロール平衡後0.2Molシュクロース+1.4Molグリセロール加m-PBSに胚を移し直ちにストローに吸引し、0℃に冷却。-6℃までは-1℃/分の勾配で冷却、-3~-6℃の間にシュクロース層に植氷操作を加え、-25℃まで-0.3℃/分の勾配で冷却し、液体窒素中に投入保管した。融解は空気中で5~10秒保持後に30~38℃の温湯中で行った。

耐凍割平衡

ストローへの吸引・封入



凍結



融解～移植

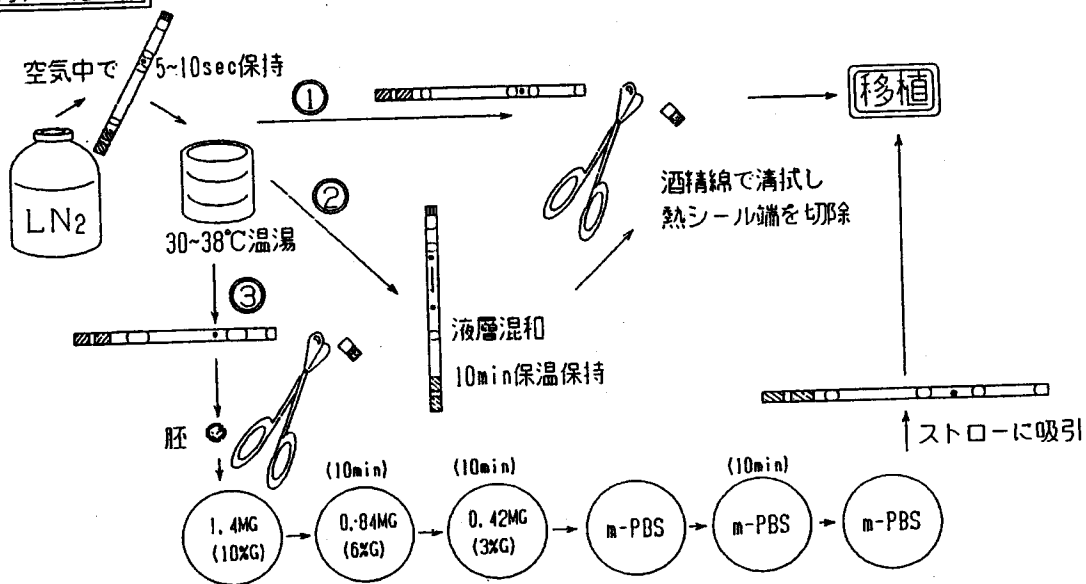


図-2. 凍結・融解法模式図



### 3. 結果および考察

耐凍剤としてグリセロールを用いた場合、その除去方法として3段階希釈法を用いて移植した時の受胎率は34.6%、シュークローズによる除去法を用いた場合は36.4%と、両者の間に差はなかった(表-11)。

次に耐凍剤除去を3段階希釈の場合とシュークローズにより0.25mlのプラスチックストロー内で行った場合の生存性の比較に於いても前者は71.4%、後者は66.7%と差は認められなかった(表-12)。

植氷操作の違いが胚に及ぼす影響を、胚に対する物理的障害として融解後の透明帯の破損率を調べたが自動植氷と手動植氷との間に差は認められなかった(表-13)。

表-11 グリセロール除去と受胎率

処理区分	移植	受胎(%)
3段階希釈	26	9 (34.6)
シュークローズ	22	8 (36.4)

表-13 植氷操作の違いによる透明帯破損 (3段階法)

凍結器	植氷操作	供試胚数	透明帯破損胚数(%)
横置2槽式	自動	12	3 (25.0)
横置単槽式	手動	21	5 (23.8)

融解時にストローを空中に5~10秒放置する操作を組み込んだ場合の透明帯の破損率は11.5%、対照区は13.4%と融解時に空中で放置する操作を加えた方が、やや透明帯の破損は少なかったが、有意差は認められなかった(表-14)。

耐凍剤の除去法ごとの融解時の胚の状況とその後胚の発育についての比較ではダイレクト法が融解時の状況、融解後の発育性ともに優れていた(表-15)。

ダイレクト法では凍結に要する時間および融解から移植に要する時間が大幅に短縮され、また、融解から移植の間に特別な施設・器具・機材を必要としない(表-16)。移植試験においても従来の段階希釈法のものと同等の受胎率を得た(表-17)。

表-12 グリセロール除去と生存性

処理区分	(n)	生存数	
		融解直後	培養後(%)
3段階希釈	7	7	5 (71.4)
ストロー内希釈	6	5	4 (66.7)

表-14 融解方法の違いによる透明帯破損

区分	供試胚数	透明帯破損胚数(%)
直後投入	67	9 (13.4)
5秒放置後	51	6 (11.5)

表-15 融解後の受精卵の生存性

	供試胚	融解時		発育胚数(%)
		透明帯破損	胚の変性	
3段階法	9	0	2	7 (77.8)
1段階法(ストロー内)	7	3	1	6 (85.7)
ダイレクト法	8	0	0	8 (100.0)

表-16 ダイレクト法と従来法との比較

比較項目	3段階法	1段階法	0段階法
(1) 耐凍剤平衡時間	30分	同左	同左
(2) 凍結時間	160分	〃	80分
(3) 融解~移植まで	40分	11分	1分
(4) 融解に要するもの	実体顕微鏡 倒立顕微鏡 脱グリセロール液 保存液 滅菌器具	液層の混和 (熟練を要す) 接眼レンズ	特に無し

表一七 ダイレクト法の移植成績

区 分	移植方法 (n)	受胎頭数
培養後移植	片側1胚 6	3
	片側1胚 4	3
直接移植	両側2胚 5	2

シュークロースを利用したストロー内での耐凍剤除去は1982年のNiemannら<sup>36)</sup>他により進められてきたが、融解後の胚の生存率は、36~74%<sup>36)</sup>、80%<sup>37)</sup>、野外での受胎率は61.1%<sup>39)</sup>であり、従来の段階式の除去法と同様の成績で、本試験においてもシャーレ内・ストロー内でのそれぞれの生存性確認試験で同じ結果が得られた。このことにより、耐凍剤除去にシュークロースが有効であることが確認されたが、実際の移植場面に於いてはストロー内液の混合操作が難しく、胚が確認されない例もあった。さらに、簡易な耐凍剤除去法として、Massipらは1987年、耐

凍剤にシュークロースを混和した液を用い、ストロー融解後に直接移植する手法で51.8%の受胎率を報告した<sup>40)</sup>。これと同様の手法により鈴木らは60%の受胎率をあげたが、岐阜畜試では融解後短時間に移植しなければ受胎率が低下すると報告している<sup>41)</sup>。このため、直接移植を目的とした凍結保存の手法は、耐凍剤にプロパンダイオールやプロピレングリコールを用いたものが検討されている<sup>42,43,44)</sup>。

本試験では培養試験は融解後10分間ストロー内にそのまま保持し、ストロー内容を0.5mlのPBS中に1時間培養し、さらにTCM-199中で培養を継続したが、供試胚全てにおいて発育を確認している。また、直接移植では融解後移植までに要した時間が8分の場合でも受胎している。シュークロースの胚への影響については、大谷らが報告している<sup>45)</sup>が、本試験のスタイルでの融解後移植までの時間の検討がさらに必要と考えられる。

## 第3章 凍結胚移植による受胎率の向上

### 1. 目的

胚移植を行う場合に大切なことの一つとして、胚の発育ステージ（供胚牛の発情周期）と受胚牛の発情周期が一致していなくてはならない。このため、多排卵誘起によって胚の回収を行った場合には、回収された移植可能な胚の数だけ受胚牛をそろえる必要がある。多数の雌牛群をかかえている場合には自然発情の牛で対応が可能かも知れないが、本県の飼養規模からするとそのような対応は不可能である。少ない雌牛に対し、PGF<sub>2</sub>α等を利用して、人工的に発情を誘起して数頭の受胚牛を揃える方法が妥当であろう。しかし、この場合にも、誘起発情の不確実性や、ホルモン剤や技術料のコスト、さらには移植可能な胚の回収の不確実性により揃えた受胚牛をムダにするといったことが問題となってくる。

この問題を解決するために、Ⅲ. 胚の凍結と融解方法の解明で述べたように胚の長期保存について研究がなされてきた。

本研究は野外での凍結融解胚の受胎率向上のための要因解明を目的に行った。

### 2. 材料と方法

多排卵誘起によって回収した黒毛和種の7日目の正常胚を10%濃度のグリセロールを耐凍剤として凍結保存後、3段階法で融解後に脱グリセロールを行い、生存性を確認した胚について、移植に供した。

調査は1987年から1990年までの4年間にわたり移植時の受胚牛記録表という形で移植者に記録を依頼した。調査項目は、受胚牛の繁殖歴、発情状況、移植時の生殖器状況、移植時間、凍結・融解前後の胚の発育ステージ・ランク等である。

また、畜産試験場外山分場繋養の日本短角種受胚牛10例については移植時の卵巢所見を直腸検査法と同時に、超音波診断装置を用いて記録した。また、移植終了後に頸静脈からの採血を

行い、血中プロジェステロン値の測定を行った。

### 3. 結果および考察

凍結胚の年度毎の受胎率は年々向上し40.0%から50.2%に達した（表-18）。

各種調査項目と受胎率の関係を比較するために凍結融解胚の1胚移植に限定したうえで、各項目と受胎率との関係を検討した。

移植に要した時間は3分以内が最も多く移植頭数全体の半分近くを占めていた。また、受胎率と移植時間の間に相関は認められないが、10分を越える移植では受胎率が35.0%と10分未満の受胎率48.9%より低下する傾向が見られた（表-19）。

黄体状況を直腸検査で+++：優良、++：良、+：不良、の3段階に区分したうち+++と++は受胎率が約44%であったのに対し+では27.8%と受胎率が低い傾向にあった（表-19）。また、+++と++のものについての直腸検査による黄体状況の所見と超音波画像による黄体長径の測定値はそれぞれ1.4 ± 0.2cm、1.3 ± 0.2cmと変わらず、血中プロジェステロン値も3.6 ± 2.6ng/ml、2.0 ± 0.5ng/mlの間にも有意差は認められなかった（表-20）。

受胚牛と供胚牛の発情日差において受胚牛の発情が1日早い場合（発情後8日目）の移植において受胎率は22.2%と、受胚牛の発情が1日遅い場合（発情後6日目）の47.6%、同じ場合（発情後7日目）の42.4%よりも受胎率が低い傾向にあった（表-19）。

受胚牛の発情の種類を自然発情と誘起発情とで比較すると受胎率はそれぞれ42.6%、31.6%と誘起発情でやや低い傾向にあった（表-19）。

受胚牛を未經産牛と経産牛とで比較した場合には、年度によっては受胎率に差がみられた年もあったが、全体を通じてみた場合には未經産牛の受胎率44.2%に対し、経産牛は39.6%と差は認められなかった（表-19）。

表-18 凍結・融解胚の受胎率

年度	移植方法	移植頭数(不明)	受胎頭数(%)
62	1 胚	30	9 ( 30.0)
	2 胚片側	29	13 ( 44.8)
	2 胚両側	7	2 ( 28.6)
	1 胚重ね	4	4 (100.0)
	計	70	28 ( 40.0)
63	1 胚	81	36 ( 44.4)
	2 胚片側	15	8 ( 53.3)
	2 胚両側	8	4 ( 50.0)
	1 胚重ね	2	1 ( 50.0)
	計	106	49 ( 46.2)
1	1 胚	68	32 ( 47.1)
	2 胚片側	2	0 ( 0.0)
	2 胚両側	6	2 ( 33.3)
	1 胚重ね	3	3 (100.0)
	計	79	37 ( 46.8)
2	1 胚	27 (8)	9 ( 47.4)
	2 胚片側	1	1 (100.0)
	2 胚両側	3	2 ( 66.7)
	1 胚重ね	0	
	計	31 (8)	12 ( 52.2)

表-19 凍結・融解胚の受胎に及ぼす要因

項目	移植頭数(不明)	受胎頭数(%)
移植時間 ~ 3 (分)	78 (5)	35 (47.9)
3 ~ 5	37 (1)	16 (44.7)
5 ~ 10	27 (1)	15 (57.7)
10 ~	20	7 (35.0)
黄体所見 +	36	10 (27.8)
++	92 (4)	39 (44.3)
+++	62 (3)	26 (44.1)
発情後 6 日	21	10 (47.6)
7 日	145 (6)	59 (42.4)
8 日	18	4 (22.2)
発情 自然	175 (6)	72 (42.6)
誘起	20 (1)	6 (31.6)
産歴 未経産	100 (5)	42 (44.2)
経産	50 (2)	19 (39.6)

表-20 直腸検査と超音波画像の黄体所見および血中プロジェステロン値の関係

直腸検査による黄体所見	例数	超音波画像黄体長径	血中 P 値
+++ (優良)	3	1.4±0.2 (cm)	3.0±2.6 (ng/ml)
++ (良)	7	1.3±0.2	2.0±0.5

受胎率に関しては、胚の発育ステージ、受胎牛の産歴、黄体の状況、プロジェステロン値、他といった項目について研究がなされている。

胚の発育ステージと、受胎牛の子宮内環境が一致しなければならないことについては、発情日差が全く無い場合に受胎率ももっとも高いと、Rowsonら<sup>45)</sup>他多くが報告している<sup>46,47)</sup>ことから、疑うことの無い事実である。これらの報告の他に、発育ステージの進んだ胚は、発情日差に関して許容範囲が広いとする報告もある<sup>48)</sup>。このようなことから、移植適期は発情日差前後1日までとするのが一般的となっている。

本試験に置いては発情日差のある例数が少ないものの、発情後6日目(発情日差+1日)の受胎牛の受胎率が高く、Sheaら<sup>49)</sup>と同様の結果を得た。

野外での移植を行う場合には、受胎牛の発情発見は、畜主に依存することが大部分を占め、移植に携わる技術者の確認を得ることは少ない。こういった状況においては、報告のあった発情時期が実際の受胎牛の発情時期よりも遅れ気味になる場合も考えられる。

また一方、生体から回収された胚は移植されて受胎牛の子宮環境に移されるまでに数時間を

体外で取り扱われる。その間の発育は数時間のうちに次の発育ステージに至るほどめまぐるしいものがあるが、生体内での発育はそれを上回り、凍結融解した胚の発育が若干遅れている可能性もある。

これらの可能性が、真実だと仮定するならば、野外での凍結融解胚移植の際の受胎牛の選定は、発情日差0～+1日とするべきとも思われる。

黄体の形状および血中プロゲステロン濃度と受胎率の関連性については、基準値 (eg. 3 ng/ml) 以下では受胎率が低い<sup>90,91,92)</sup>といった報告がなされているが、血中プロゲステロンのレベルは牛の品種によっても異なり、それぞれの受胎牛の状況を考慮して検討すべきところである。

Humblotらは、黄体の大きさとプロゲステロン値には関連はなかったが、黄体の大きさと受胎率には差異がみられたと報告している<sup>93)</sup>が、本試験においては黄体所見を+++：優良、++：良、+：不良の3段階に分類した場合、+では受胎率が他の2ランクのものよりも低い、++と+++の間には受胎率・プロゲステロン濃度ともに有意差はなかった。このことは黄体の大きさや硬さが受胎率と関連があると

考察するよりも、野外の技術者各個人の直腸検査による黄体所見は、黄体の機能状態を適切に捉えており、これを判断基準として移植の可否を決定することは有効であるとすべきであろう。

人為的に受胎を増強させる手法としては、プロゲステロンの機能強化の目的でヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを投与することが行われている例があるが、ネガティブフィードバックを生じる可能性がある。

また、着床しようとする胚の側からは黄体退行阻止因子や早期着床因子 (EPF) が分泌されるので胚の栄養膜細胞を凍結融解後の胚とともに移植する試みも行われているが、現在のところ受胎率を大きく改善した例はまだない。

確実な受胎牛の選定指標や受胎向上のための薬品といったものは得られていない以上、胚の側からの凍結胚移植による受胎率の向上の為に凍結保存に用いる胚の品質確保・凍結手技の精度向上による移植胚の高品質維持に努めるべきと思われる。そのためには融解後の胚の品質判定を確実に行う手法の開発や、凍結融解といった操作によって胚の品質を損なうことのない長期保存方法の開発が今後とも必要であると思われる。

## 第4章 2 胚移植法の検討

### 1. 目的

牛の双子生産は、優良肉用素牛の増殖と価格の低減を図る手法として大きな期待が寄せられており、生産率の向上によって農家の所得向上に寄与するところが大きい。2 胚移植技術を活用した双子生産手法として、黄体側子宮角への2 胚移植、両側子宮角へ1 胚ずつの移植が試みられている<sup>50)</sup>。黄体側2 胚移植は移植操作が容易で、受胎率と双子率が高い。しかし、分娩までの事故率も高いことが指摘されている<sup>54,56,57)</sup>。両側子宮角移植は<sup>58)</sup>受胎率は下がるが、事故率も低いために子牛生産率が高くなる傾向が見られ<sup>58,59)</sup>、最近では両側子宮角移植に関する技術的問題<sup>62)</sup>と器具の検討<sup>59,63)</sup>がなされている。

この報告は、現在行われている移植方法を検討して、受胎率向上技術を確立し、また凍結保存胚の両側子宮角移植を簡易にできるよう試作した2 胚移植器の検討成績である。

### 2. 試験方法

#### 1) 材料と方法

##### (1) 供試胚

移植用胚は黒毛和種にFSH製剤の3日間減量投与を行い、性周期7日目に子宮灌流法により回収した。胚の検査後に3段階濃度(3・6・10%に各々10分間浸漬)のグリセロール平衡を行い、プログラムフリーザーを用いて凍結し、液体窒素中に保存した。凍結胚は、37°C温湯で急速融解した後、3段階希釈によりグリセロールを除去し、ストローに充填して移植を行った。

##### (2) 供試牛

頸管外口部および同周囲の細菌検査のための採材牛は、性周期7日目の黒毛和種15頭と日本短角種3頭、また移植器の細菌汚染調査牛は、同性周期の日本短角種12頭を供試した。

常法としている移植器鞘の腔内破孔法による受胎牛(対照牛)は、農家に飼養されるホルスタイン種71頭とした。

一方、後述する二重鞘法による受胎牛は、日

本短角種10頭と交雑種3頭、および二連式移植器によるものは日本短角種7頭を用い、試験牛はいずれも経産牛を供試した。これら供試牛は性周期7日目の黄体期で、卵巣に開花期黄体を形成しており、サイズは種々であった。成績は、1987年4月～1991年2月に実施したものである。

#### (3) 採材方法および細菌検査

##### ア) 採材方法

細菌検査の採材は、牛を柵場内に保定して尾椎麻酔後に外陰部等の消毒を行い、腔鏡にて開腔、続いてタンポン(1g)に滅菌生食(3ml)を湿潤させ、頸管鉗子で固定後に紙鞘で被覆して、腔腔に挿入し粘液を採材した。また、この部位の細菌数の減少をはかるために、高橋ら<sup>62)</sup>の報告に従い、消毒用アルコールを湿潤した綿花による2回清拭後に、前述タンポンで同様に採材した。

一方、移植器の細菌汚染調査のための採材は、同様の手順で牛を保定・処置し、開腔後にビニール鞘で被覆した内芯付きのシース管(二重鞘)を頸管外口部で破孔し、そのまま二重鞘を頸管内に誘導、続いて内芯を索引してシース管内に吸引した粘液を滅菌生食5mlで洗い流し、材料とした。なお、採材に用いた器具はEOガスによる滅菌消毒を実施した。

##### イ) 細菌検査

タンポンに付着した粘液等とシース管内の洗浄材料は、滅菌生食で溶出した後に遠心分離器で7000rpm 30分処理を行い、その沈渣を好および嫌気培養した。好気培養は5%羊血液加寒天培地、嫌気培養はGAM寒天培地を用い、37°C48時間の分離培養を試みた。分離菌の同定は、COWAN&STEELの方法に従い実施した。

#### (4) 二重鞘法

経産牛の腔深部から高率に細菌が分離されることから、一般的な手技となっている鞘の腔内破孔法では、移植器の細菌汚染が避けられず、また移植器先端の横穴に粘液栓塞を伴うことか

ら、これらを防ぐために(写真1)に示す二重鞘を作成した。二重鞘は、内芯のステンレス棒(長さ55cm、直径4mm)とシース管(長さ40cm)およびビニール鞘(市販品)からなる。

操作手順は、開腔状態でアルコール綿花による外口部の消毒後に、二重鞘を外口部にセットする。つづいて直腸腔法で二重鞘を頸管皺襞2~3cmまで通過させ、ここでビニール鞘を索引して破孔する。次に助手は内芯を除去し、移植器を挿入する。術者は目的角に移植器を2回誘導して移植を終了する。

#### (5) 二連式移植器

移植操作の簡易化と凍結胚の現地融解・両側子宮角移植を行うために試作した二連式移植器(写真2)は、移植器本体(長さ×幅、550×5mm)と四フッ化エチレン樹脂チューブ(長さ×幅、530×6mm)鞘の先端に2本のストローが

セットできる頭部が固定され、さらにビニール鞘で覆われている。移植操作は二重鞘と同じであるが、最初の移植後に移植器を子宮体部まで戻して、反対側に移植を行う。

### 3. 結果および考察

1) 受胎牛の頸管外口部とその周囲の細菌検査  
腔深部の細菌検査を実施した18頭中11頭(61.1%)から種々の細菌が分離された。分離菌は数種類が同時に分離され、菌種も異なることから、同一性状を示すコロニー数5個以上のものの合計を菌数とし、成績を(表-21)に示した。また、この部位をアルコール綿花で2回清拭することにより、多数の常在菌は著しい減数がみられた。なお、アルコール綿花による外口部の過度の清拭は、粘膜の充血を伴うことから注意が必要であった。

表-21 頸管外口部と周囲生菌数

牛No.	品種	年齢	消毒	
			前	後
1	黒和	15	0	0
2	"	9	5	6
3	短角	10	<300	27
4	"	6	9	9
5	黒和	8	<300	25
6	短角	14	<300	0
7	"	8	<300	51
8	"	15	0	5
9	"	10	0	36
10	"	12	86	0
11	"	5	<300	5
12	"	5	<300	9
13	"	15	49	8
14	"	13	0	0
15	"	8	0	16
16	"	10	21	0
17	"	6	0	0
18	"	5	0	0

表-22 頸管部とその周囲粘液の細菌数と種類(日本短角種)

牛No.	年齢	分離菌	
		好気性菌	嫌気性菌
1	7	-	-
2	13	Staphylococcus sp.(++)	-
3	7	-	-
4	8	Staphylococcus sp.(+)	Staphylococcus sp.(++)
5	8	Streptococcus sp.(+)	-
6	5	Gram negative R(+++)	-
		Flabobacterium sp.(+)	
		Staphylococcus sp.(+)	
7	6	-	-
8	13	-	-
9	13	-	-
10	14	-	Streptococcus sanguis(+)
11	8	Bacillus sp. (+)	-
12	14	Streptococcus sp. (+)	-

(+) コロニー数10個以下 (++) 11~20 (+++) 21~40 (-) 陰性

## 2) 頸管外口部から頸管にかけての粘液中の細菌検査

調査した12頭中7頭(58.3%)の粘液から、(表-22)に示す細菌が分離された。菌の分離率は、受卵牛の頸管外口部とその周囲の分離率と類似の成績であった。

## 3) 移植成績

二重鞘による移植は13頭中10頭(76.9%)が受胎し、このうち黄体側2胚移植7頭、両側角移植5頭で、受胎頭数はそれぞれ5頭(71.4%)、5頭(83.3%)と良好な成績が得られ、双子は各々2組であった。

同時期の対照群の移植は、71頭に行われ、30頭(42.3%)が受胎した。このうち黄体側子宮角に2胚を移植した49頭中26頭(53.1%)が受胎、両側子宮角に各1胚を移植した21頭は、6頭(28.6%)の受胎に留まり、双子は各々6頭、2頭であった。

一方、二連式移植器による受胎牛は、経産牛を用いたことから、頸管と子宮内の誘導操作も比較的スムーズに行え、受胎率は71.4%(5/7頭)であった(表-23)。なお、中間成績であるために分娩例は得ていない。

表-23 移植方法別比較

方法	移植頭数	受胎頭数	分娩頭数	
			双子	単子
二重鞘	13	10 (76.9)	4	6
二連式	7	5 (71.4)	-	-
常法	71	30 (42.3)	8	22

- : 平成3年3月現在妊娠中

胚移植を推進するには、改善すべき事項が多く残されており、中でも、受胎率向上のための技術開発は、普及・拡大を図る上で重要な位置づけにある。受胎率向上には、優良な胚と受胎牛の活用、そして熟練した技術者による移植がポイントとなる。移植技術者は、移植器具の無菌的操作、子宮粘膜の損傷防止、胚の移植の位置等に細心の配慮を必要とするが、受胎成績には大きな差が生じている。

これまで、子宮頸管経由法による胚の移植には、腔内細菌汚染防止のための鞘を移植器に装着する方法がとられ、基本的手法<sup>56,61)</sup>となっているが、この手法によっても十分な受胎率が得られていないのが実態である。この要因として、鞘を腔内で破孔した後、移植器の頸管内誘導操作時に外口部で、移植器を汚染させる操作上の問題が推察される。腔内の細菌について、鈴木らは<sup>65)</sup>、未經産牛の腔前庭および黄体期頸管からの細菌分離率は、それぞれ22.7%、9.1%にすぎないことを報告しているが、今回検索した経産牛の腔深部からの分離率は61.1%と高く、さらに頸管内粘液中の細菌分離率は58.3%におよび、鞘の腔内破孔法では、移植器の汚染による低受胎が示唆された。しかし、2胚移植牛としての経産牛の活用は、妊娠維持・出産・泌乳性・移植操作上からも有用であるので、細菌汚染防止の技術改善は重要である。

通常両側子宮角への移植操作は、子宮頸管に移植器を2回通過させる必要があり、器具の汚染機会が増して受胎率の低下の要因となることが伺われた。高橋らは<sup>62)</sup>、腔深部での移植器具の細菌汚染を軽減するために子宮頸管外口部のアルコール綿花消毒法を報告している。この方法を細菌学的に検査し、移植成績を比較した結果、消毒は、外口部周囲の細菌数減少に効果があり有用な手技と考えられた。

さらに細菌汚染を軽減し、移植器の子宮頸管の通過操作を容易にするために内芯付きのシース管を作成し、頸管内をトンネル状とする二重鞘について検討した。前述した消毒法とビニール鞘の頸管内破孔を加えたこの操作は簡便、かつ器具の作成も容易・安価であった。この方法で13頭の経産牛に移植したところ10頭の受胎例(76.9%)と4組の双子(40.0%)が得られた。欠点は内心の除去や移植器のセット時に助手を必要とすることにあつた。

これまで両側子宮角移植の簡易化と受胎成績向上のための検討がされてきた。高見沢ら<sup>63)</sup>は、圧力式移植器による凍結受精卵の直接移植



の結果、軟質ストローによる子宮深部移植が可能となり、確実に受精卵が移植できたことから、受胎率と双子率がそれぞれ66.7%、75.0%に改善されたことを報告した。また鈴木ら<sup>50)</sup>は、凍結胚を2個封入したストローを二段式移植器にセット後、両側子宮角に移植して、受胎率と双子率がそれぞれ64.0%、56.0%となった成績を報告している。今後、凍結胚は現地融解、直接移植する簡易な方法に変わることが示唆され<sup>40)41)64)</sup>、これに対応できる簡易移植器が必要となる。そこで本試験では、両側子宮角移植が可能な二連式移植器を試作し、頸管外口部消毒法とビニール鞘の頸管内破孔を加えた移植の結果、中間成績ではあるが71.4%の受胎率が得られた。移植器鞘は6mmの太さであるが、経産牛では操作性、受胎成績に問題がないことが明らかになった。

## II 摘要

### 1. 多排卵誘起法の検討

黒毛和種に対する多排卵誘起法を検討した。

① 多排卵誘起処理はFSH 24A. U. の1日2回減量投与が正常胚回収のために効率が良いと思われた。1日1回投与では発情の発現率が低く不安定であった。

② 反応不良牛に対して初回の人工授精時にLH-RHを投与することで胚の回収成績が改善する場合があった。

③ 多排卵誘起処置開始時の卵巣内に黄体細胞の充実した黄体があり、直径10mmを越すような大卵胞が黄体と共存せず、小卵胞が多数存在する場合に良質胚が多数回収される傾向にあった。

### 2. 胚の凍結と融解方法の解明

胚の凍結保存方法の簡易化のために3段階希釈法・1段階希釈法・ダイレクト法について比較検討した。

① 3段階希釈法では融解後の胚の生存性は70~80%であった。

② 凍結融解法の比較試験に置いて1段階希

釈法では3段階希釈法と同等の生存性・受胎率を得たが、野外での移植には液層の混和と胚の確認に確実性を欠く恐れがあった。

③ 生存性が高く、3段階希釈法と同等の受胎率を得ているダイレクト法が野外での移植に適している可能性があるが、例数が少ないため、さらに検討を要する。

### 3. 凍結胚移植による受胎率の向上

野外での凍結融解胚移植の受胎率向上のための要因解明を行った。

① 凍結胚の受胎率の現状は約50%である。

② 移植時間が10分を越える場合に受胎率が低い傾向があった。

③ 移植時の受胎牛の直腸検査による黄体所見で3段階に分類した場合に+では受胎率が低い傾向にあった。++と+++は受胎率に差はなかった。

④ 誘起発情の受胎牛では受胎率がやや低い傾向があった。

⑤ 未経産牛と経産牛との間に受胎率に差は認められなかった。

### 4. 2胚移植法の検討

受精卵を両側子宮角に移植する手法は、最も安定した双子生産技術であるが、従来の移植方法では、十分な移植成績が得られていない。そこで経産牛を受胎牛として活用したときの技術的問題、および凍結胚の現地融解・直接移植が可能で直接法が開発されたことから、これに対応できる簡易移植器具を試作し、有効性について検討して次の成績を得た。

① 経産牛の膣深部からの細菌分離率は高く、移植器鞘の膣内破孔法では器具の汚染が避けられない。

② そこで子宮頸管外口部とその周囲の消毒を行い、加えて鞘を頸管内で破孔する方法に改善した。

③ 両側子宮角移植を容易にするために二重鞘を試作し、前述方法で凍結胚を経産牛に移植した結果、受胎率(76.9%)と双子率(40.0%)が向上した。

④ しかし、移植操作に助手を必要とすることが欠点である。

⑤ 今後普及すると考えられる凍結胚の現地融解法に対応でき、両側子宮角移植が可能な二連式移植器を試作し、前述の手順で凍結胚を移植して71.4%の受胎率を得た。

終りにあたり、細菌検査に関し、盛岡家畜保健衛生所病勢鑑定課、田中修一課長補佐、菊池善彦獣医師に御協力をいただいたことに対して、深甚の謝意を表する。

### Ⅲ 引用文献

- 1) Willet, F. L. et al. (1951) *Science* 113 : 247
- 2) Chupin, D. ; Procureur, R. (1982) *Theriogenology* 17:81
- 3) Elsdén, R. P. ; Nelson, L. D. ; Seidel, G. E. Jr. (1978) *Theriogenology* 9 : 17-26
- 4) Laster, D. B. (1973) *J. Reprod. Fertil.* 33 : 285-289
- 5) Reynolds, W. L. et al. (1970) *J. Anim. Sci.* 29 : 198
- 6) Warren, W. R. et al. (1975) *J. Anim. Sci.* 41 : 384 (abstr.)
- 7) 杉江 信 ; 西川義正 (1957) *家畜繁殖誌* 3 : 21
- 8) Booth, W. D. et al. (1975) *Vet. Rec.* 97 : 366-369
- 9) Elsdén, R. P. et al. (1974) *J. Reprod. Fertil.* 36 : 455-456
- 10) Gngenbach, D. R. et al. (1978) *J. Anim. Sci.* 46 : 1293-1299
- 11) Greve, T. (1976) *Theriogenology* 5 : 15-19
- 12) Willet, F. L. ; Buckner, P. J. ; McShan, W. H. (1953) *J. Daily Sci.* 36 : 1083-1089
- 13) Jainudeen, M. R. et al. (1966) *J. Reprod. Fertil.* 12 : 149-153
- 14) Lamond, D. R. (1974) *Theriogenology* 1 : 181-212
- 15) 鈴木達行ら (1985) *家畜人工授精講習会テキスト (家畜受精卵移植編)* : 126-128
- 16) Chupin, D. ; Procureur, R. (1982) *Theriogenology* 17 ; 81 (abstr.)
- 17) Garcia, G. JE. K. et al. (1982) *Theriogenology* 17 : 90 (abstr.)
- 18) Looney, C. R. et al. (1981) *Theriogenology* 15 : 13-22
- 19) 百目鬼郁男ら (1986) *農水省畜試年報 (昭和59年度)* : 38-41
- 20) A. R. prado Delgado ; Elsdén, R. P. ; Seidel, G. E. Jr. (1984) *Theriogenology* 21 : 254
- 21) Savage, N. C. ; Mapletoft, R. J. (1984) *Theriogenology* 21 : 259
- 22) 金川 弘 (1984) *牛の受精卵移植*。近代出版 : 30-31
- 23) 高橋芳幸 (1985) *ウシの過剰排卵処置法について*。臨床獣医 3 : 22-27
- 24) Foster, J. P. (1978) *J. Reprod. Fertil.* 54 : 119-121
- 25) 砂川政広, 笠原民夫, 須藤半次郎 (1985) *群馬農業研究 C畜産* 2 : 1-6
- 26) 田谷一善, 近藤昌広, 笹本修司 (1987) *家畜繁殖誌* 33 : (講演要旨)
- 27) 鈴木 修ら (1988) *中国農試研究報告* 2 : 21-31
- 28) Matton, P. et al. (1981) *J. Anim. Sci.* 52 : 813-820
- 29) Lerner, S. P. et al. (1986) *J. Anim. Sci.* 63 : 176-183
- 30) Lindsell, C. E. ; B. D. Murphy ; R. J. Mapletoft (1986) *Theriogenology* 26 : 209-219
- 31) Moor, R. M. ; Th. A. M. Kruip ; D. Green (1984) *Theriogenology* 21 : 103-116
- 32) Monniaux, D. ; D. Chupin ; J. Saumande (1983) *Theriogenology* 19 : 55-81

- 33) Wilmut, I. ; Rowson, L. E. A. (1973) Vet. Res. 92 : 686-690
- 34) 杉江 信、角田幸生、相馬 正 (1979) 家畜繁殖誌25 : 203-205
- 35) Bilton, R. J. ; Moore, N. W. (1976) J. Reprod. Fertil. 46 : 537-538 (abstr.)
- 36) Niemann, H. et al. (1982) Theriogenology 17 : 102 (abstr.)
- 37) Renard, J-P. ; Heyman, Y. ; Ozil, J-P. (1982) Ann. Med. Vet. 126 : 23
- 38) Leibo, SP. (1984) Theriogenology 21 : 767-790
- 39) 鈴木達行ら (1986) 家畜繁殖誌 32 : 118-120
- 40) A. Massip ; P. Van Der Zwalmen ; F. Ectors (1987) Theriogenology 27 : 69-79
- 41) 大谷 健ら (1989) 繁殖技術研誌11 : 14-19
- 42) 渡辺 孝ら (1989) 繁殖技術研誌11 : 17 (講演要旨)
- 43) 栗山伸人、足立憲隆、知 長彦 (1990) 茨城県畜試年報 : 57-60
- 44) 堂地 修ら (1991) 東日本ET研 : 76-78 (講演要旨)
- 45) Rowson, L. E. A. et al. (1972) J. Reprod. Fertil. 29 : 145 (abstr.)
- 46) Newcomb, R. ; Rowson, L. E. A. (1975) J. Rprod. Fertil. 43 : 539-541
- 47) Sreenan, J. M. et al. (1975) J. Reprod. Fertil. 44 : 77-85
- 48) Kunkel, R. N. ; Stricklin, W. R. (1978) Theriogenology 9 : 96 (abstr.)
- 49) Shea, B. F. et al. (1976) Theriogenology 15 : 31-42
- 50) Stubbings, R. B. ; Walton, J. S. (1986) Theriogenology 26 : 145
- 51) Northey, D. L. et al. (1985) Theriogenology 23 : 214
- 52) Niemann, H. et al. (1985) Theriogenology 23 : 631
- 53) Humblot, P. et al. (1987) Theriogenology 27 : 240
- 54) 金川弘司ら (1987) 食肉に関する助成研究調査成果報告書 6 : 9-12
- 55) 鈴木達行、高橋芳行、下平乙夫 (1982) 日獣会誌35 : 235-241
- 56) 鈴木達行、高橋芳行、下平乙夫 (1982) 日獣会誌 35 : 388-394
- 57) 鈴木達行、下平乙夫、酒井豊 (1986) 家畜繁殖誌32 : 44-47
- 58) 鈴木達行、石田隆志、酒井豊 (1988) 第74回家畜繁殖学会講演要旨83
- 59) 鈴木達行 (1988) ETニュースレター 4 : 23-27
- 60) 杉江浩 (1978) 家畜繁殖誌24 : xxxvixlii
- 61) 高橋芳行、鈴木達行 (1982) 家畜繁殖誌8 : 30-35
- 62) 高橋政義 (1989) 東北農業試験研究成績・計画概要 (畜産) 19
- 63) 高見沢稔ら (1989) 畜産の研究 43 : 1082-1086
- 64) 梶原豊、米谷尚子、小山恒太郎 (1988) 第74回家畜繁殖学会講演要旨29