

氏名（本籍）	高橋正弘（岩手県）		
学位の種類	博士（獣医）		
学位記番号	獣医博乙第86号		
学位授与年月日	平成20年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当		
学位論文題目	超音波診断装置を用いた妊娠末期におけるホルスタイン種クローン胚由来産子の体重モニタリング法に関する研究		
審査委員	主査	帯広畜産大学	教授 三宅陽一
	副査	帯広畜産大学	教授 佐藤基佳
	副査	岩手大学	教授 居在家義昭
	副査	東京農工大学	教授 加茂前秀夫
	副査	岐阜大学	教授 宮澤清志

論文の内容の要旨

本論文においてはホルスタイン種クローン胚由来産子出産時に事故多発に注目し、事故軽減を図るための出生前体重モニタリングに関する一連の研究を進めてきた。その結果、以下の成績を得た。

- ① ホルスタイン種受精卵クローン胚由来産子の特徴と分娩状況をAIおよびETにより得られた産子と比較検討した。同一胚由来のクローン産子には生時体重にばらつきが認められた。クローン胚由来産子の生時体重は、AIおよびET産子と比較して有意に大きく ($p < 0.05$; $51.9 \pm 7.4\text{kg}$ vs. 45.2 ± 5.5 , $45.3 \pm 5.6\text{kg}$)、在胎日数はAI産子と比較して有意に長かった ($p < 0.05$; 283.4 ± 5.4 日 vs. 280.8 ± 5.8 日)。また、クローン胚由来産子の難産率はいずれも対照群に比較して高く ($p < 0.05$; 30.0% vs. 11.8%)、尾位、死産、過大子および突球などが多発した。以上の成績から、クローン胚由来産子は過大子の発生率が高く、そのため難産および死産の発生率が増加し、さらに出生後の生存率が低下することが示唆された。受胎牛の周産期疾病の発生率は、受精卵クローン胚由来産子の受胎牛が 66.7% ($20/30$) であり、ホルスタイン種 ET 産子の受胎牛の発生率 30.6% ($11/36$) より 2 倍以上有意に ($p < 0.01$) 高いことが認められた。
- ② ホルスタイン種産子の生時体重や難産を妊娠末期に推測する目的で、分娩直後のホルスタイン種産子の中手幅もしくは中足幅を測定し、生時体重や難産との関係を調査した。ホルスタイン種産子 ($n=187$) の中手幅と生時体重の関係は、 $y=2.152x-15.015$, $r=0.780$ ($p < 0.05$)、そのうち、ホルスタイン種クローン胚由来産子 ($n=30$) については、 $y=1.662x+0.907$, $r=0.740$ ($p < 0.05$)、ホルスタイン種 AI および ET 産子 ($n=157$) では、 $y=2.232x-17.527$, $r=0.780$ ($p < 0.05$) であった。ホルスタイン種産子の中足幅と生時体重の関係では、

$y=2.169x^2-7.204$, $r=0.684$ ($p<0.05$), そのうち、ホルスタイン種クローン胚由来産子は、 $y=1.360x^2+15.878$, $r=0.487$ ($p<0.05$), ホルスタイン種AIおよびET産子は、 $y=2.268x^2-10.087$, $r=0.711$ ($p<0.05$)であった。また、中手幅もしくは中足幅が大きくなるほど、難産の発生は増加し、難産の発生率は、中手幅が30 mm未満の場合は6.7% (7/105)であるのに比べ、中手幅が30 mm以上の場合は32.9% (27/82)であった。また、中足幅が26 mm未満の場合は9.8% (11/112)であるのに比べ、中手幅が26 mm以上の場合は30.7% (23/75)で、それぞれ両群の間に有意な差が認められた($p<0.01$)。このことから、中手幅もしくは中足幅の測定により生時体重や難産の推測が可能であると示唆された。

③ ホルスタイン種クローン胚由来産子は、過大子による難産や死産の発生率が高い。そこで、妊娠末期においてその胎子体重をモニタリングし、生時体重を推測することが必要不可欠である。本試験では、ホルスタイン種クローン胚のETにより単子で妊娠しているホルスタイン種経産牛14頭を対象に、分娩予定日のおよそ1か月前より1週間おきに胎子中手幅を超音波診断装置により測定し、その値から胎子体重を推測した。その結果、ホルスタイン種経産牛13頭において、分娩前1週間内の胎子中手幅および推定胎子体重 (30.2 ± 2.2 mm, 50.0 ± 4.7 kg) は、産子の中手幅および生時体重 (30.0 ± 2.1 mm, 51.2 ± 5.5 kg) と近似していて、分娩1週間前では超音波診断法により生時体重を推定できると思われた。胎子中手幅が30 mm以上で分娩誘起を実施したA群は、胎子の中手幅が30 mm以上で分娩誘起を実施しなかったB群と比較して、在胎日数で2.2日短いにもかかわらず、生時体重で1.9 kg大きかった。A群では、1頭で難産が発生し4頭は正常分娩であり、死産の発生はなく、もし分娩誘起を実施していなければ、さらに在胎日数が延長して生時体重が増加し、過大子症候群で難産になった可能性は高いと考えられた。B群では、胎子中手幅が30 mm以上であったが分娩誘起を実施せず、2頭とも正常分娩であり、死産の発生はなかった。胎子中手幅が30 mm未満で分娩誘起を実施しなかったC群は、A群より生時体重で9.8 kg小さく、5頭とも正常分娩で死産の発生はなかった。これらより、超音波診断装置により過大子が予測される場合には、分娩誘起などの処置をすることで、難産およびそれに起因する死産および生後直死を最小限に防止することが可能であると示唆された。

以上の結果から、妊娠期末期の胎子の中手幅の測定は、受精卵クローン胚由来産子の出生後の損耗を防止する上で極めて有用であることが認められた。

審 査 結 果 の 要 旨

家畜とくに牛の繁殖技術は凍結精液による人工授精、胚移植、体外受精および培養などを経て、クローン技術へと発展してきた。クローン技術に期待されていることとして、乳牛および肉牛の育種改良および増殖、遺伝的資源の保存、有用物質生産のための遺伝子組換え家畜の生産などである。しかし、一方で、乳牛のクローン胚由来産子では過大子、難産、死産および虚弱子などが多発することが指摘されていて、このクローン技術のフィールドでの実用化を目指すためには、分娩時においてクローン胚由来の乳牛産子の生存性を高めることが必

要不可欠である。そこで学位申請者である高橋正弘氏は、それらの問題点を解決するために、超音波診断装置を用いた妊娠末期におけるホルスタイン種クローン胚由来産子の体重モニタリング法に関する一連の研究を実施した。その結果、以下の成績を得た。

①ホルスタイン種受精卵クローン胚由来産子の特徴と分娩状況を AI および ET により得られた産子と比較検討したところ、クローン胚由来産子の生時体重は、AI および ET 産子と比較して有意に大きく、在胎日数は AI 産子と比較して有意に長く、クローン胚由来産子の難産率はいずれも対照群に比較して高く、尾位、死産、過大子および突球などが多発した。以上の成績から、クローン胚由来産子は過大子の発生率が高く、そのため難産および死産の発生率が増加し、さらに出生後の生存率が低下することが示唆された。

②ホルスタイン種産子の生時体重や難産を妊娠末期に推測する目的で、分娩直後のホルスタイン種産子の中手幅および中足幅を測定し、生時体重や難産との関係を調査した。ホルスタイン種 AI, ET およびクローン胚由来産子の中手幅および中足幅と生時体重には有意な相関関係が得られた。また、中手幅もしくは中足幅が大きくなるほど、難産の発生は増加し、このことから、中手幅もしくは中足幅の測定により生時体重や難産の推測が可能であると示唆された。

③ホルスタイン種クローン胚の ET により単子で妊娠しているホルスタイン種経産牛を対象に、分娩予定日のおよそ 1 か月前より 1 週間おきに胎子中手幅を超音波診断装置により測定し、その値から胎子体重を推測した。その結果、分娩 1 週間前では超音波診断法により生時体重を推定できることを認めた。胎子中手幅が 30 mm 以上で分娩誘起を実施した群では、他の群と比較して、在胎日数で 2.2 日短いにもかかわらず、生時体重で 1.9 kg 大きかったが、分娩誘起により、死産の発生はなく、過大子症候群で難産になる可能性を排除できた。

これらの結果から、妊娠期末期の胎子の中手幅の測定は、受精卵クローン胚由来産子の出生後の損耗を防止する上で極めて有用であることが認められた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として充分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 名：ホルスタイン種核移植胚による産子の特徴および分娩状況

著 者 名：高橋正弘，植木淳史，川畑享子，後藤太一

学術雑誌名：日本獣医師会雑誌

巻・号・頁・発行年月：53 (6) : 387-390, 2000

2) 題 名：Relationships between the width of metacarpus or metatarsus and the birth weight in Holstein calves

著 者 名：Takahashi, M., Ueki, A., Kawahata, K. and Goto, T.

学術雑誌名：The Journal of Reproduction and Development

号・頁・発行年月：47 (2) : 105-108, 2001

3) 題 名 : Ultrasonographic monitoring of nuclear transferred fetal weight during the final stage of gestation in Holstein cows
著 者 名 : Takahashi, M., Goto, T., Tsuchiya, H., Ueki, A. and Kawahata, K.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
号・頁・発行年月 : 67 (8) : 807-811, 2005

既発表学術論文

1) 題 名 : 低受胎牛群における天然型プロジェステロン放出腔内留置型製剤とエストラジオール製剤を用いた発情同期化および受胎効果
著 者 名 : 照井友美, 三宅陽一, 高橋正弘
学術雑誌名 : 日本家畜臨床学会誌
巻・号・頁・発行年月 : 26 (1) : 15-20, 2003

2) 題 名 : Postnatal developmental changes in immunohistochemical localization of α -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in bovine testes
著 者 名 : Devkota, B., Sasaki, M., Takahashi, K-I., Matsuzaki, S., Matsui, M., Haneda, S., Takahashi, M., Osawa, T. and Miyake, Y-I.
学術雑誌名 : The Journal of Reproduction and Development
巻・号・頁・発行年月 : 52 (1) : 43-49, 2006

3) 題 名 : 繁殖性と産乳性が低いホルスタイン種体細胞クローン牛の臨床所見ならびに病理所見
著 者 名 : 高橋正弘, 土屋秀樹, 植木淳史, 三田能理子, 久保正法, 御領政信, 橋爪 力, 大澤健司
学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌
巻・号・頁・発行年月 : 59 (8) : 540-543, 2006

4) 題 名 : 血中プロジェステロン (P4) 濃度からみた牛の卵胞囊腫および卵巣静止における診断精度の評価
著 者 名 : 三宅陽一, 大澤健司, 大津信一, 鈴木一教, 園中 篤, 田高 恵, 森田 靖, 太田大作, 高橋正弘
学術雑誌名 : 日本家畜臨床学会誌
巻・号・頁・発行年月 : 29 (2) : 43-46, 2006