

黒毛和種におけるロバートソン型転座による
染色体多型に関する研究

花 田 博 文

黒毛和種におけるロバートソン型転座による
染色体多型に関する研究

目次

序章	-----	1
第1章 末梢リンパ球培養法による染色体研究手法の開発	-----	6
緒言		
第1節 末梢リンパ球の分裂動態の解析		7
第2節 G-バンド法による標準核型の作成		24
第2章 繁殖牛集団におけるロバートソン型転座の分布状況	-----	37
緒言		
第1節 転座染色体の同定とその起源		40
第2節 転座染色体の遺伝様式と出現頻度		62
第3章 7/21ロバートソン型転座と繁殖性との関連性	-----	78
緒言		
第1節 7/21転座雄個体の精子形成過程における 染色体分析		80
第2節 7/21転座由来の初期胚の染色体分析		96
第3節 7/21転座保有個体の繁殖成績と体尺 測定値の分析		106
総合考察	-----	125
総括	-----	129
引用文献	-----	134
英文要約	-----	142

序 章

染色体研究は、19世紀末より遺伝と進化との関連性から行われてきたが、初期の研究は主に精巢を材料にしてパラフィン切片法によって行っていたために、染色体の観察精度には限界が認められてきた。しかし、1950年代後半に入り、組織培養法、低張処理法、空気乾燥法などの新しい研究手法が次々に開発され、研究材料面からの制約は解消した。さらに、オートラジオグラフィや1970年代のQ-バンド、G-バンドなどの分染法の開発によって個々の染色体の同定や微小な構造異常の解析が可能となった。これらの研究手法は直ちにヒトや実験動物の染色体研究に導入され、それらの細胞遺伝学は飛躍的な発展を遂げた。特に、ヒトにおいては、染色体研究はダウン症の発生機構の解明など医学の基礎研究の発展に大きく貢献し、その成果は遺伝性疾患の診断など臨床分野にも広く応用されている。

一方、家畜の場合には、一般的な研究の対象になりにくいこともあって、染色体研究が著しく遅れている現状にあった。しかし、近年、分染法などが導入され、近縁種の類縁関係や染色体異常を伴った症例などについて幅広い研究が進められている。最近では、染色体の研究技術が染色体地図の作成にまで応用されてきており、細胞遺伝学的研究の重要性は一段と高まってきている。

ウシの染色体については、1927年 Krallinger により染色体数が60本と報告されて以来研究が進められ、1959年には Melander によって性染色体の形態学的特徴が明らかにされている。しかし、ウシの染色体に関する畜産的応用面からの研究は、1964年に Gustavsson と Rockborn がロバートソン型転座を発見した事から始まる。この報告が出されて以来、各国で先天性異常の症例を中心に細胞遺伝学的調査が開始され、染色体異常と繁殖性など生産

性との関係について研究が進められてきた。ウシの場合、胚の10～15%は染色体異常によって出生前に失われ (Shelton, 1981)、染色体異常を保有する個体は出生後も繁殖障害など様々な遺伝的障害を伴っている。従って、染色体異常が子供に受け継がれ、それらが胚死亡や不妊の遺伝的要因になっている場合には生産性に多大の影響を及ぼすことになる。染色体異常の発生機構や生産性との関係を細胞遺伝学的に解明し、それらの研究成果を畜産の現場に応用していく意義は大きい。スウェーデンやノルウェーにおいては、1970年代から種雄牛の染色体検査が実施され、染色体転座保有個体の除去が行われているが (Swensson, 1973; Pollock, 1974)、家畜の場合には染色体異常についての基礎的知見が乏しく十分にその効果を上げるに至っていない。

本研究で取り上げたロバートソン型転座は、1916年に Robertson によりバツタで見い出されたもので、次世代に遺伝する代表的な染色体異常である。これは、非相同な端部着糸型染色体が動原体部で融合した染色体の構造的変異であり、形態学的特徴から動原体融合 (centric fusion) とも呼ばれている。この転座の場合、染色体の基本腕数 (Number of chromosome arms) には変化がないことから、遺伝情報の過不足はないと考えられており、主に核型進化や類縁関係との係わりから研究が進められてきた。

このようなロバートソン型転座は、家畜ではウシの他にヒツジ (Bruère et al., 1972; Bruère & Ellis, 1979)、ブタ (耕田ら、1976; Schwerin et al., 1986)、ヤギ (Ricordeau, 1972) などで報告されている。ウシからは17種類のロバートソン型転座が報告されている。それらの中で、最大と最小の常染色体による1/29転座はヨーロッパ系 (Bos taurus系) とインド系 (Bos indicus系) の約40品種で見られており、1/29転座保有個体の頻度が50%以上と極端に高かった例も報告されている (Eldridge, 1975; Pinheiro

et al., 1981; Rangel-Figueiredo & Iannuzzi, 1991)。

畜産分野においては、これらのロバートソン型転座が生産性に影響を及ぼすか否かが最大の関心事である。この転座の場合、転座保有個体の表現型は正常で、一般に致死障害は認められない。しかし、転座ヘテロ個体では、第一減数分裂の太糸期に三価染色体が形成され、その後の染色体の分離のしかたによっては不均衡型の配偶子を生じる。これらの配偶子は受精しても遺伝的に不均衡な胚を形成し、それらは死亡するためにマウスのT₄転座やキツネの23/24転座個体などでは繁殖性の低下が認められている (Gropp, 1973; Christensen & Pedersen, 1982; Mäkinen & Lohi, 1987)。一方、ヒツジのM1転座 (5/26転座) の場合には、不均衡型細胞は形成されているが (Chapman & Bruère, 1975)、転座ヘテロ雄個体と正常な核型を示す雌個体の交配においては遺伝的に不均衡な胚は観察されていない (Long, 1977)。また、産子数の減少も認められておらず (Bruère, 1974; Bruère & Chapman, 1974; Bruère et al., 1981)、この転座の場合には不均衡型の細胞は精子形成過程で選択的に淘汰されるものと考えられている (Scott & Bruère, 1987)。ウシの1/29転座では、精子形成過程で不均衡型細胞が通常より高い頻度で観察されており (Logue & Harvey, 1978; Popescu, 1978)、胚の染色体分析ではモノソミーやトリソミーの胚が観察されている (King et al., 1980, 1981; Popescu, 1980; Schmutz et al., 1991; Wilson, 1991)。また、この転座を保有する個体の繁殖記録の分析からも転座の影響が確認されている (Gustavsson, 1971a; Refsdal, 1976; Dyrendahl & Gustavsson, 1979; Maurer & Vogt, 1988)。しかし、1/29転座以外の転座の場合には、1/29転座のように世界的な分布を示していないこともあって、生産性との関連性についてはほとんど研究されていない。

黒毛和種 (Japanese Black) は、在来種をもとに外国種の血液も入れて改良が加えられ、1944年に品種として認定された我が国の代表的な肉用牛である。1960年代前半までは主に役肉用牛として利用されてきたが、その後、農作業の機械化に伴って肉用牛への変換が図られてきた。近年、人工授精技術の普及や凍結精液の利用によって優良種雄牛の広域的な利用が可能となり、黒毛和種の産肉能力は著しく向上してきている。現在、黒毛和種はほぼ全国一円にわたる幅広い地域で飼養され、その頭数は我が国の肉用牛の約85%に当る120万頭に及んでいる。黒毛和種に関する今後の課題は、産肉能力の改良とともに肥育素牛の生産コストの低減である。この問題解決には、体外受精や受精卵移植などを利用した安定的な双子生産技術の確立が急務であり、同時に染色体異常などによって起こる子牛の損耗を軽減していくことが重要である。我が国では、このような観点からの体系的研究は行われておらず、ウシの細胞遺伝学的研究としては、ホルスタイン種のフリーマーチン症や先天性異常についての研究に限られている (Muramoto et al., 1965; Kanagawa et al., 1965; Mori et al., 1969)。近年、黒毛和種の集団について細胞遺伝学的調査が進められた結果、1/29転座と7/21転座の2種類のロバートソン型転座が存在することが明らかになったが (柘田ら、1978, 1980; 花田ら、1979; 新里ら、1980; 岡本ら、1981)、これらの転座の分布状況や7/21転座と生産性との関連性については解明されていない。

家畜の染色体分析は、一般の臨床検査を目的として開発された末梢リンパ球培養法 (Moorhead et al., 1960) によって行われている。しかし、家畜においては、末梢リンパ球の分裂動態やその変動要因に関する基礎的な問題が十分に検討されておらず、ウシの染色体分析を行うための最適培養法も確立されていない。また、染色体分析の基本となる標準核型についても、研究者間で国際

的統一が必要であるが、G-バンド法による暫定的な核型が提示されているに過ぎない (Ford et al., 1980)。今後、畜産の現場に染色体分析を応用していくためには、さらに研究手法について改善を加えていくことが必要である。

本論文は、ウシの染色体分析手法、および黒毛和種で観察されたロバートソン型転座と生産性との関連性について検討したものである。その内容は、序章と総合考察以外に3章から構成されている。第1章では、ウシの染色体分析のための末梢リンパ球培養法の確立と標準核型の作成を目的として研究を行った。第2章では、これらの研究手法を用いて、黒毛和種におけるロバートソン型転座の分布状況とその起源について調査した。第3章では、黒毛和種で新たに見い出された7/21転座個体の精子形成過程や胚の染色体分析、繁殖記録の分析を行い、生産性との関連性について検討した。

なお、本研究の細胞遺伝学的調査の実施時期は昭和54年から平成3年で、主に中国地方のN県の畜産関係機関および一般農家で飼育管理されていた黒毛和種についての分析結果を中心に取りまとめたものである。

緒 言

末梢リンパ球培養法による染色体分析は、実験操作が比較的簡単で再現性が高いことから、家畜の染色体研究に広く応用されている。しかし、この技術を畜産の現場に活用していくためには、末梢リンパ球の培養法や染色体の同定技術などについてさらに改善を加えていく必要がある。

染色体研究においては、通常、多数の分裂中期像を分析するのでそれらを効率良く集める必要がある。また、試験によっては培養開始後特定の分裂回数を示す細胞を選択的に分析しなければならない場合がある。これらの点を解決していくためには、末梢リンパ球の分裂動態を十分に把握し、高い増殖率を得るための培養法を確立しておくことが重要である。しかし、家畜の場合には、臨床検査を目的に開発された研究手法がそのまま応用されており、ウシ末梢リンパ球の分裂動態やその変動要因については十分に明らかにされていない。

また、染色体分析を正確に、しかも効率良く進めていくためには、標準核型の設定が緊急の課題である。ウシにおいても、G-バンドやQ-バンド分析による標準核型が複数の研究者によって報告されており、国際的な統一が重要となっている。このようなことから、家畜の標準核型の設定に関する国際会議が開催され、G-バンド染色による標準核型については国際命名規約に準じた核型が勧告されている (Ford et al., 1980)。しかし、これらは暫定的なものであり、各染色体の詳細なバンドの特徴までは示されていない。

本章では、今後のウシの染色体調査を効率良く進めていくために、末梢リンパ球の培養法とG-バンド法による標準核型について検討を行った。

第1節 末梢リンパ球の分裂動態の解析

前述のような理由から、以後の研究を効率良く進めていくためには、ウシ末梢リンパ球の分裂動態を予め把握しておくことが重要である。本節では、ウシの染色体研究において一般に使用されている5種類の培養液を基本培養液とした場合の末梢リンパ球の分裂動態について調査した。また、培養液中の血清の添加割合、および培養温度と分裂動態との関連性について検討した。最後に、これらの結果をもとに核型分析ならびに変異原性検査のための培養条件について考察した。

材料および方法

1. 試験材料および末梢リンパ球培養法

ヘパリン入りの10ml真空採血管を用いて、健康な黒毛和種(表1-1)の頸静脈より無菌的に採取した新鮮血を材料とした。

培養液の組成は、次のとおりであった。

基本培養液	}	5.8 ml
牛胎児血清 (G I B C O)		
抗生物質混液 (明治製菓)		
(ペニシリン500IUおよびストレプト マイシン375 μ g添加)		0.1 ml
フィトフェマグルチニン (P H A)		
(H A - 1 5、W e l l c o m e)		0.05 ml

培養は、培養瓶に入れた上記の培養液に全血0.5 mlと5-ブロモデオキシウリジン (BUdR, Sigma) を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加え、37°Cと39°Cの5%CO₂条件下で24~78時間行った。細胞は、BUdR処理中は遮光し暗黒下に置いた。牛胎児血清は、予め58°Cの湯浴中に30分間浸して非動化した後、さらにミリポアフィルターによって濾過滅菌して使用した。防錘糸形成を阻害し、分裂中期像を蓄積するためのコルセミド処理 (GIBCO、0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) は、培養終了2時間前に行った。各実験における詳細な培養条件は、表1-1に示すとおりであった。

2. 染色体標本の作製

コルセミド処理後、培養瓶を炭酸ガス培養装置 (Forma社、Nafco社) から取り出し、培養瓶の内容を遠沈管に移し、直ちに1,500 rpmで10分間遠心分離した。細胞を含む沈査は予め加温しておいた0.8%塩化ナトリウム溶液で洗浄した後、0.5%塩化カリウム溶液で15~20分間低張処理を行った。その後、カルノア液 (メチルアルコール3量:氷酢酸1量) を加えて1時間固定した。細胞沈査が透明になるまで固定、遠心を繰り返した後、空気乾燥法によって標本を作製した。

3. 姉妹染色分体の分染

染色分体の染め分けは、Kato と Sandberg (1977) の33258ヘキストとギムザ染色によるFPG法によって行った。即ち、標本を5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の33258ヘキスト (和光純薬) で10分間染色後、磷酸緩衝液 (pH 6.8) で水洗、カバーグラスで包埋した。次に、高圧水銀ランプ (Osram、HBO、200W) で紫外線を15分間照射後、カバーグラスを取り、水洗、ギ

ムザ染色して鏡検した。

4. 細胞の分裂回数の決定

培養開始後の細胞の分裂回数は、BUdRのDNA鎖への取り込みによって生じる染色分体の染色性の差で識別した。BUdRの取り込みと分染パターンとの関係は、図1-1に示したとおりである。即ち、BUdRを取り込んで2回のDNA合成期(S期)を経過した第2回目の分裂細胞においては、片方の染色分体は、DNAの一本鎖がチミジンの代わりにBUdRを取り込んだTB-染色分体(BT-染色分体)となり、もう一方の染色分体は、2本鎖が共にBUdRを取り込んでBB-染色分体となる。これを螢光色素で染色すると、TB-染色分体やBT-染色分体に比べてBB-染色分体は薄く染まる。第3回目の分裂細胞の場合には、BB-染色分体が増加し、逆に分染される染色体は半減する。こうしたことから、60本のすべての染色体において両方の染色分体が共に濃染されている中期像は第1回目の分裂細胞(図1-2 a)、染色分体が濃淡に分染されているものは第2回目の分裂細胞(図1-2 b)と判定した。また、半数の30本の染色体で染色分体が分染されている場合には第3回目の分裂細胞(図1-2 c, d)、1/4の染色体では染色分体が分染されているが、残りの3/4の染色体では染色分体がいずれも薄く染まっている場合には第4回目の分裂細胞として区別した。

5. 染色体の分析

分裂指数は、それぞれの標本について1,000個の細胞を分析して算出した。また、培養開始後の細胞の分裂回数は、原則として100個の分裂中期像について分析した。

Table 1-1. Details of the animals used and culture conditions in five different experiments

Exp. number	No. of animals	Basic medium	Serum in medium (%)	Incubation temperature
I	3 (24~30) ¹⁾	RPMI-1640 (GIBCO) Ham's F10 (GIBCO) NCTC-109 (DIFCO) NCTC-199 (DIFCO) MaCoy's 5a (GIBCO)	12	37°C
II	3 (24~26)	RPMI-1640 (GIBCO)	0~40	37°C
III	3 (24~29)	RPMI-1640 (GIBCO) NCTC-109 (DIFCO)	15	37°C, 39°C
IV	26 (6~54)	RPMI-1640 (GIBCO) NCTC-109 (DIFCO)	15	37°C
V	2 (26,54)	RPMI-1640 (GIBCO)	15	37°C

1) The figures in parentheses indicate the range of age in month.

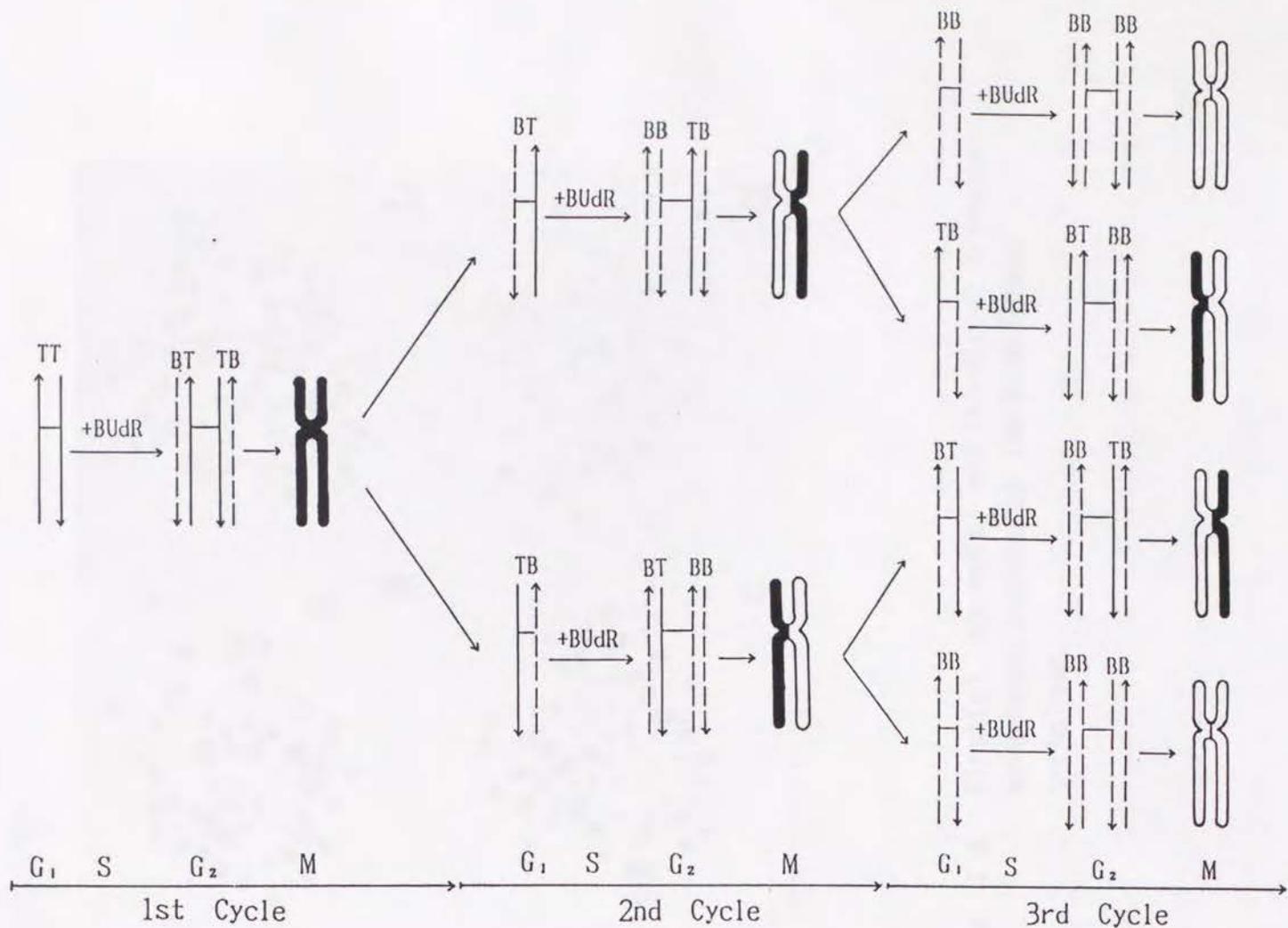


Fig. 1-1. Schematic illustration of a staining pattern for each cell division after BUdR treatment.

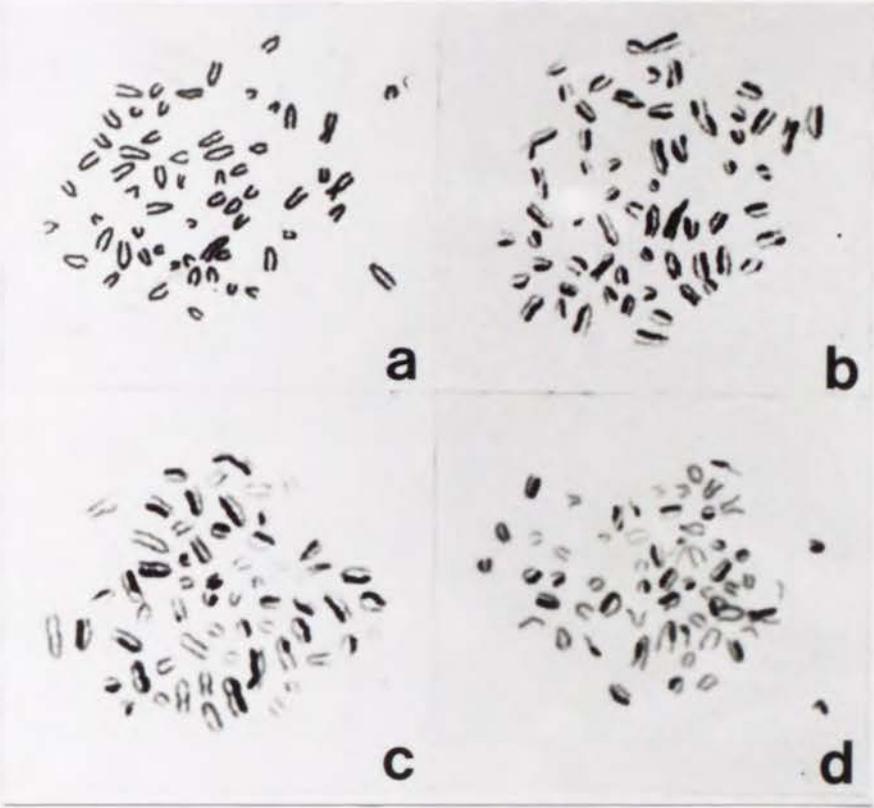


Fig. 1-2. First(a), second(b) and third(c,d) division metaphases stained by the BUdR-Giemsa technique.

結果と考察

1. 分裂動態の解明

培養液や培養温度などが異なる次のような条件下で、ウシ末梢リンパ球を培養し、その分裂動態を調査した。

(実験 I)

同一個体より得た末梢リンパ球を 5 種類の基本培養液を用いて培養し、その分裂動態を比較検討した。図 1-3 は、培養 24 ~ 72 時間目の分裂指数ならびに 36、48、60、72 時間目の細胞の分裂回数についての分析結果である。最も速い分裂パターンは、Ham' F10 液で培養した場合に得られた。第 1 回目および 2 回目の分裂指数のピークは、培養開始後それぞれ 45 時間目と 60 時間目に観察された。培養 36 時間目の細胞はほとんどが第 1 回目の分裂中期像であったが、既に 48 時間目には全体のほぼ半数の細胞が第 2 回目の分裂像であった。培養 60 時間目には、第 1 回目の分裂細胞の割合は 19% に減少し、第 3 回目の分裂中期像が第 2 回目の分裂像とほぼ同じ頻度で観察された。Ham' F10 液に次いで速い増殖を示したのは、MaCoy' 5a 液、RPMI-1640 液であった。これらの 3 種類の培養液に比べて NCTC109 液、NCTC199 液では分裂速度は遅く、最初の分裂指数のピークは培養 48 ~ 51 時間目に見られた。これらの場合には培養 48 時間目で全体の分裂像の約 80%、60 時間目でもほぼ半数の細胞が第 1 回目の分裂中期像であった。分裂指数は、RPMI-1640 液、NCTC109 液で高く、NCTC199 液で最も低かった。本試験で用いた 5 種類の培養液は、ヒト末梢リンパ球培養用に開発されたものであるが、いずれの培養液を選択しても通常の核型

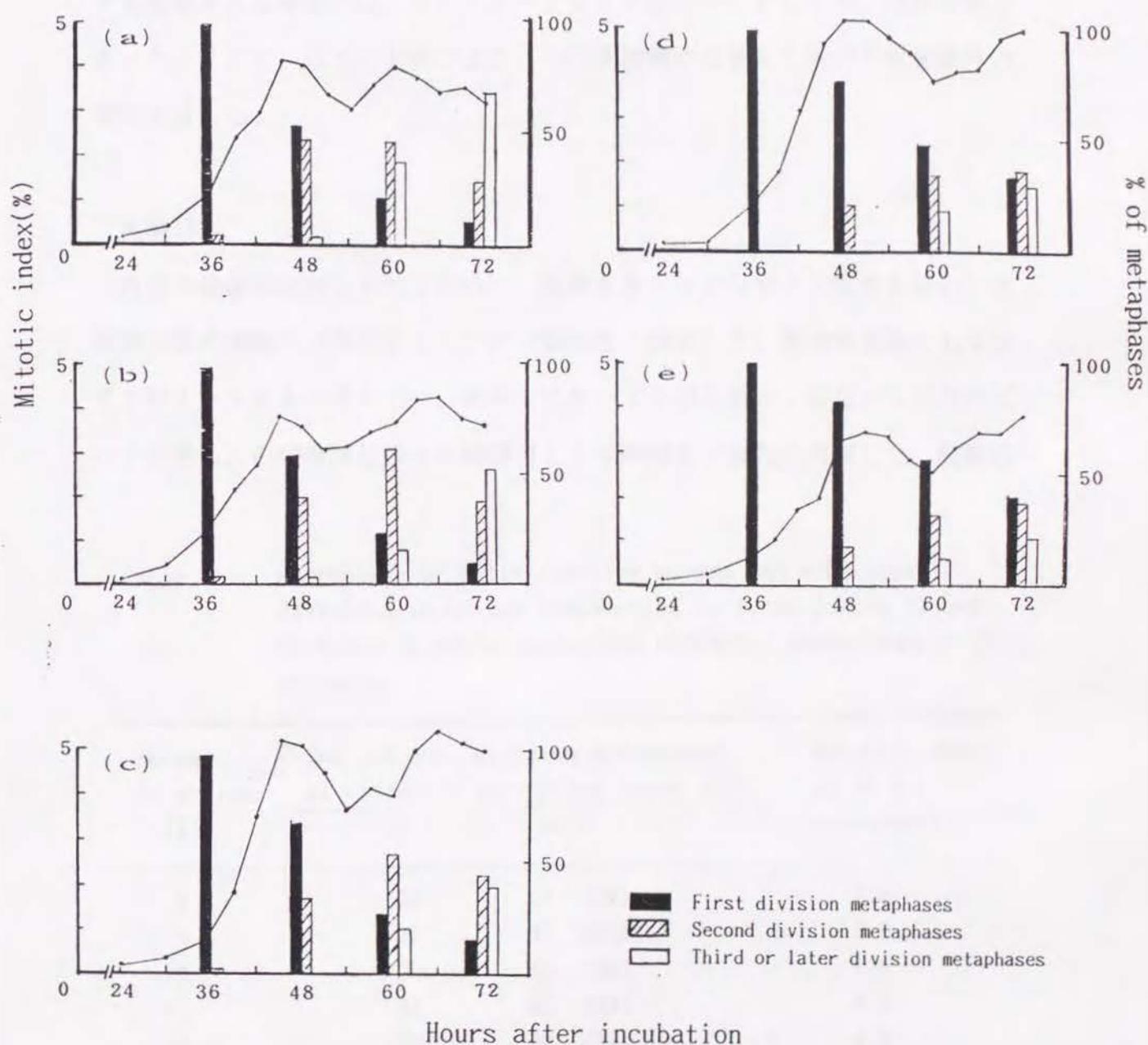


Fig. 1-3. Change of mitotic index and percentage of cells in the first, second and subsequent divisions of bovine lymphocytes cultured for different times in five synthetic media.

a:Ham's F10 medium; b:MaCoy's 5a medium;
 c:RPMI-1640 medium; d:NCTC-109 medium;
 e:NCTC-199 medium.

分析に必要な分裂中期像が得られた。しかし、一度に多数の分裂中期像を分析する必要がある場合には、RPMI-1640液やNCTC109液が有効であった。そこで、以下の実験ではこれらの2種類の培養液を用いて培養条件の検討を行った。

(実験II)

血清の最適添加割合を知るために、血清を0～40%加えて培養を行い、培養開始後の細胞の分裂回数ならびに分裂指数を調査した。基本培養液としてはRPMI-1640液を用い、実験Iにおいて分裂指数の1回目と2回目のピークが見られた培養開始後45時間目と66時間目に細胞を回収した。結果は

Table 1-2. Percentage of cells reaching second and subsequent divisions in bovine lymphocytes cultured during 45 and 66 hours in media containing different concentration of serum

Serum in medium (%)	2nd and sub. division metaphases at different harvesting times (%) ¹⁾		Mitotic index in 45 h cultures(%)
	45 h	66 h	
0	21	69 (25)	2.6
5	27	83 (33)	3.9
10	26	80 (36)	4.6
15	31	82 (32)	4.4
20	29	84 (31)	4.3
25	25	78 (26)	3.3
30	21	72 (23)	3.1
35	20	70 (20)	2.4
40	16	64 (21)	2.1

1) Figures in parentheses indicate the percentage of cells in the 3rd or later division.

、表1-2のとおりであった。血清を加えないで培養した場合、45時間目における第2回目の分裂細胞の割合は21%、分裂指数は2.6%であった。一方、血清を添加した場合には、無添加の場合に比べて第2回目の分裂中期像の割合、分裂指数は共に高かった。しかし、血清の添加割合を30%以上に高めると、第2回目の分裂細胞の割合は減少し、分裂指数は低くなる傾向にあった。また、培養66時間目までに3回のDNA合成期を経過した細胞の割合も低くなった。ブタの末梢リンパ球の培養実験においても、血清を過剰に添加した場合には細胞の分裂速度は遅延することが認められている (McFee & Sherrill, 1981)。本試験においても、血清は細胞の増殖を促進するが、その過剰な添加は細胞の分裂遅延や分裂機能の低下を招くことが確認された。

(実験III)

3頭のウシから採取した全血をそれぞれ37°Cと39°Cで培養し、培養温度と末梢リンパ球の分裂パターンとの関連性について検討した。培養は、NCTC109液とRPMI-1640液を基本培養液として72時間行い、前者の場合には、培養開始後48時間目と72時間目、後者の場合には、45時間目と66時間目の細胞の分裂回数ならびに分裂指数の経時的变化を分析した。結果は、表1-3に示した。NCTC109液を基本培養液にした場合には、培養48時間目の第2回目の分裂細胞の割合は39°C培養区のほうが29%と37°C培養区の16%に比べて高かった。また、培養72時間目における第2回目以降の分裂細胞の割合を見ても同様の傾向が見られた。分裂指数の経時的变化を見ると、第1回目のピークは37°C培養区で48~51時間目、39°C培養区では45~48時間目と幾分速い時期に観察された。これは、高い温度で培養を行った場合に、細胞が培養開始後第1回目のDNA合成期（

Table 1-3. Percentage of second and subsequent division cells in bovine lymphocytes incubated at 37 and 39°C

Culture medium	Incubation temperature	2nd and sub. division metaphases at different harvesting times(%) ¹⁾		Mitotic index in 45 or 48 h cultures(%)
		45 or 48 h	66 or 72 h	
NCTC-109	37°C	16	69 (21)	4.0
	39°C	29	80 (32)	3.7
RPMI-1640	37°C	32	83 (36)	3.9
	39°C	41	88 (42)	4.2

1) Figures in parentheses indicate the percentage of cells in the 3rd or later division.

S期)に早く到達し、S期の時間も短縮されるためと考えられている (Salaino & Johnson, 1974; Borodkin, 1979)。また、RPMI-1640液で培養した場合も、37°C培養区と39°C培養区の細胞の分裂回数には、NCTC109液での結果とほぼ同様の傾向が見られた。しかし、RPMI-1640液、NCTC109液のいずれを用いた場合も、分裂指数の第1回目と第2回目のピーク時の数値には、37°C培養区と39°C培養区で顕著な差は見られなかった。従って、以後の実験では、従来どおり37°Cで培養を行った。

(実験 IV)

次に、15頭のウシから得た新鮮血をRPMI-1640液とNCTC109液を用いて培養し、培養開始後40、48、72時間目の細胞の分裂回数と分裂指数を調査した。その結果は、表1-4と表1-5のとおりであった。RPMI-1640液で培養した場合、40時間目では89~96%の過半数の細胞は第1回目の分裂像であった。しかし、48時間目には、第1回目の分裂細胞の割合が47~82% (平均66%)に減少し、個体差が認められた。その差は培養72時間目にはさらに拡大し、第2回目の分裂細胞および第3回目以降の細胞の割合は、それぞれ29~72%と16~62%であった。一方、NCTC109液での培養では、48時間目での第2回目の分裂像の割合は平均19%と低く、72時間目でも39%の細胞が第1回目の分裂中期像であった。分裂パターンの個体による違いはNCTC109液で培養した場合にも見られたが、RPMI-1640液の場合に比べると小さかった。本試験の結果、ウシ末梢リンパ球の分裂動態には個体差があり、同一個体の末梢リンパ球も様々な分裂回数を示す不均一な細胞集団であることが確認された。ヒト末梢リンパ球の分析においても、同様の結果が得られている (Crossen & Morgan, 1977

Table 1-4. Percentage of cells in the first, second and subsequent divisions of bovine lymphocytes cultured in RPMI-1640 medium

Animals	Sex ¹⁾	Age (Months)	Divisions at different harvesting times (%)							Mitotic index ³⁾ (%)
			40 h		48 h		72 h			
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	Sub. ²⁾	
1	M	27	92	8	47	53	9	29	62	3.0
2	F	6	89	11	62	38	6	36	58	4.2
3	F	49	91	9	60	40	9	36	55	2.1
4	M	25	95	5	61	39	8	38	54	3.6
5	F	20	94	6	64	36	4	46	50	3.8
6	M	26	89	11	57	43	10	49	41	4.8
7	F	54	92	8	59	41	11	48	41	5.2
8	M	26	94	6	52	48	25	41	35	3.7
9	F	37	93	7	66	34	22	44	33	2.9
10	F	24	91	9	75	25	14	50	36	3.6
11	F	6	95	5	70	30	16	53	31	4.5
12	M	25	87	13	74	26	13	56	31	3.1
13	M	26	96	4	81	19	21	52	27	2.3
14	M	28	93	7	79	21	19	57	24	3.4
15	F	26	90	10	82	18	12	72	16	4.3
Mean			92	8	66	34	13	47	40	3.6

1) M:Male, F:Female.

2) Figures indicate the percentage of cells in the 3rd or later divisions.

3) Figures indicate mitotic index in 40 h cultures.

Table 1-5. Percentage of cells in the first, second and subsequent divisions of bovine lymphocytes cultured in NCTC-109 medium

Animals	Sex ¹⁾	Age (Months)	Divisions at different harvesting times (%)							Mitotic index ³⁾ (%)
			40 h		48 h		72 h			
			1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	Sub. ²⁾	
1	F	21	100	0	82	18	43	36	21	3.0
2	F	32	97	3	74	26	44	40	16	4.2
3	M	44	100	0	86	14	31	46	23	2.1
4	M	28	100	0	85	15	34	47	19	3.6
5	F	23	100	0	84	16	31	45	24	3.8
6	M	45	100	0	81	19	36	44	20	4.8
7	F	26	100	0	78	22	39	39	22	5.2
8	M	29	98	2	76	24	46	36	18	3.7
9	F	31	100	0	83	17	36	38	26	2.9
10	F	44	96	4	81	19	41	40	19	3.8
11	F	47	95	5	83	17	44	35	21	3.9
Mean			99	1	81	19	39	41	21	3.6

1) M:Male, F:Female.

2) Figures indicate the percentage of cells in the 3rd or later divisions.

3) Figures indicate mitotic index in 40 h cultures.

)。これは、末梢リンパ球の分裂周期、特にリンパ球がPHAに反応してS期に到達するまでの時間が細胞によって異なるためと考えられている (Crossen & Morgan, 1979; Morimoto & Wolff, 1980)。

(実験 V)

最後に、実験 IV において標準的な分裂速度を示した2個体 (表1-4のNO 7,8) の新鮮血をRPMI-1640液で最長78時間培養し、24時間目以降3時間毎に細胞を回収して分裂動態を調査した。培養開始後第1回目と2回目の分裂指数のピークは45時間目と66~69時間目に見られ、実験Iの場合とほぼ同様の結果が得られた。培養開始後の細胞の分裂回数は図1-4のと

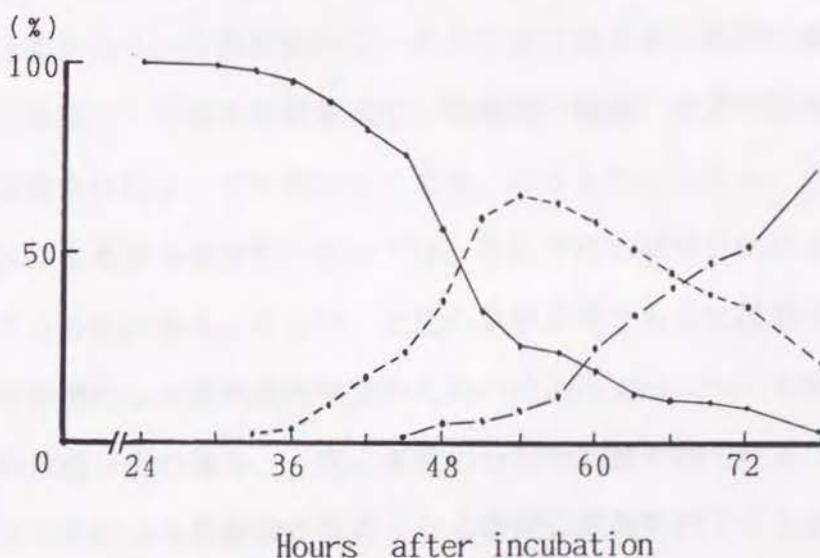


Fig. 1-4. Distribution of first, second and subsequent division cells in PHA-stimulated bovine lymphocyte cultures.
 (—•—: First division; - - -•-: Second division; - · - • - : Third or later division).

おりで、培養39時間目までは90%以上の細胞が第1回目の分裂細胞であった。その割合は45時間目で76%、48時間目には56%に減少した。第2回目の分裂を示す細胞は培養開始後33時間目から観察され、54~57時間目に64~66%とピークに達した後、徐々に減少し、72時間目には38%であった。また、第3回目以降の分裂細胞は45時間目より観察され、その割合は57時間目以降急速に増加し、72時間目には52%であった。

2. 核型分析および変異原性検査のための培養条件の設定

現在、ウシ末梢リンパ球培養法による染色体分析には、ヒト末梢リンパ球の培養法がそのまま応用されている。しかし、ウシとヒトの末梢リンパ球の分裂周期には差があり、分裂指数のピークがウシで幾分速い時期に観察されている。また、末梢リンパ球の分裂動態は、培養液の種類、血清の添加割合や培養温度など培養条件によっても異なってくる。こうしたことから、ウシ末梢リンパ球培養法による染色体分析においては、それぞれの試験目的によって培養条件を設定する必要がある。そこで、上記の試験結果をもとに核型分析および染色体異常を指標にした変異原性検査のための最適培養法について検討した。

通常の場合、一度に多数の分裂中期像が得られることが条件であり、このためには分裂指数が最高となる時期に培養を終了する必要がある。ウシの核型分析のための末梢リンパ球の培養法としては、RPMI-1640液を基本培養液とし、それに熱処理した後、濾過滅菌した血清を10~15%加えて、37°Cで45時間あるいは66時間培養するのが適当と考えられる。NCTC109液を用いても、高い分裂指数は得られるが、この場合には培養時間を48時間もしくは72時間に延長する必要がある。

末梢リンパ球培養法による染色体分析は、個体の核型分析のためだけでなく、飼料や飼料添加物、さらには家畜に対する種々の環境変異原の遺伝的影響を調査する場合にも用いられている。しかし、これらの試験において、被検物質の影響を正確に知るためには、培養開始後第1回目の分裂中期像を選択的に分析していく必要がある。派生的染色体型異常と呼ばれる染色分体型由来の異常 'derived chromosome aberration' は、第2回目の分裂細胞では消失してしまうために確認することができない (Evans, 1970)。現在、ウシの末梢リンパ球培養による変異原性試験は、ヒト末梢リンパ球の場合と同様に48時間培養によって行われているが (Léonard et al., 1974, 1976; Hanada & Muramatsu, 1981)、RPMI-1640液で培養した48時間目の細胞集団には第2回目の分裂中期像が30%以上も含まれているので、第1回目の細胞だけを回収するにはより早い時期に培養を終了する必要がある。培養時間はRPMI-1640液の場合で38~40時間、NCTC109液の場合には45時間前後が適当と考えられる。

第2節 G-バンド法による標準核型の作成

ウシの染色体数は60本と多く、常染色体はすべて端部着糸型染色体であるので、通常のギムザ染色では個々の染色体を形態学的に識別することは困難である。染色体分析を正確に効率良く進めていくためには、先ず標準核型を設定しておくことが重要がある。そこで本節では、最も実用的なG-バンド法による標準核型の作成を試みた。

材料および方法

1. 染色体標本の作製

3頭の健康な黒毛和種の雄子牛より得た新鮮血を前述の方法 (Hanada et al., 1981) で45時間培養した後、空気乾燥法によって標本を作製した。G-バンド分析用の標本については、培養終了3時間前に分裂中期および前中期の細胞を効率良く集めるために臭化エチジウム処理 ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) を行った (Ikeuchi & Sasaki, 1979)。

2. G-バンド染色法

染色体のG-バンド染色は、Seabright (1971) のトリプシン処理法 (GBG法) によって行った。室温で数日間保存しておいた染色体標本を0.025%トリプシン溶液 (和光純薬) 中で30~120秒間処理、水洗後、70%エタノールに浸した。数分後に標本を取り出し、リン酸緩衝液 (ヤトロン、pH 7.0) で約20倍に希釈したギムザ液で5~10分間染色し顕微鏡標本とした。

3. G-バンド法による標準核型およびイデオグラムの作成

染色体数が60本で、染色体が十分に伸展している分裂中期の核板を選び、これらを顕微鏡写真(1,500倍)にした後、分染パターンをもとに染色体を識別し、標準核型を作成した。この場合、G-バンドによる染色体番号の表示は、国際会議で勧告されている命名規約(Ford et al., 1980)に従って行った。

イデオグラムの作成にあたっては、最初に染色体の境界標 'Chromosome landmark' となる特徴的なバンドをもとに染色体をいくつかの領域 'Region' に分割した。バンドはギムザで染色されるプラスのバンドとそうでないマイナスのバンドに区分し、プラスのバンドについては染色の程度によって2種類に分けて示した。染色体腕の表示、領域番号およびバンドの番号表示は、ヒトの染色体の国際規約(ISCN, 1981)に準拠して行った。即ち、X染色体とY染色体の腕については、短腕をp, 長腕をqとして示した。領域番号および各領域におけるバンドの番号は、動原体からそれぞれ腕の末端方向に向かって順に付した。各々の染色体におけるバンド表示は、これらの番号の組み合わせによって行った。動原体に最も近い第1領域に見られた第1番目のバンドをバンド(11)、第2番目のバンドをバンド(12)として表した。なお、境界標となっているバンドは、腕の末端方向の領域のバンドとして分類した。染色体の長さの測定は、各個体3個ずつの合計9個の分裂中期像の相同染色体の片方について行った。

結果と考察

1. ウシの染色体の形態学的分類

図1-5と図1-6は、黒毛和種のそれぞれ分裂中期像と正常核型である。このように、ヨーロッパ系 (*Bos taurus* 系) 品種の体細胞の染色体数は60本で、29対の常染色体 (Autosome) と1対の性染色体 (Sex chromosome) で構成されている。その核型は、雄が $2n = 60, XY$ 、雌が $2n = 60, XX$ である。染色体は、一般に短腕 (p) と長腕 (q) の比率によって、図1-7のように形態学的に分類されるが (Levan et al., 1964)、ウシの常染色体はすべて端部着糸型染色体 (Telocentric chromosome) であり、個々の染色体を形態学的に同定することは困難であった。一方、X染色体とY染色体はそれぞれ次

Chromosome type	Arm ratio(q/p)	
Metacentric (中部着糸型)	1.0 ~ 1.7	
Submetacentric (次中部着糸型)	1.7 ~ 3.0	
Subtelocentric (次端部着糸型)	3.0 ~ 7.0	
Telocentric (端部着糸型)	7.0 ~	

Fig. 1-7. Morphological classification of the mitotic chromosome based on the centromeric position (from Levan et al., 1964).

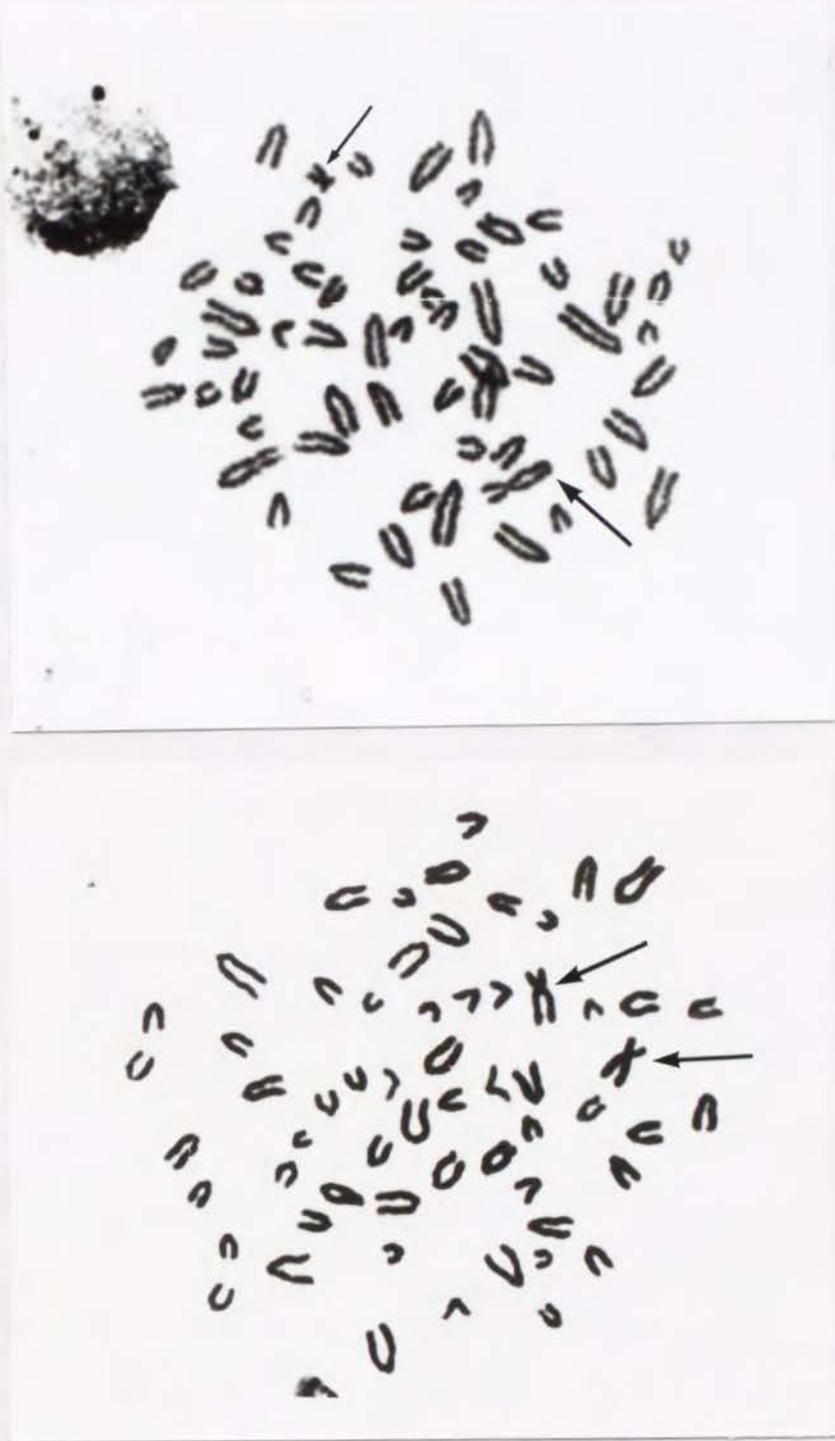


Fig. 1-5. Metaphase of the normal cattle (*Bos taurus* L.).
Bold arrow and light arrow show the X and the Y
chromosomes, respectively. a: male; b: female.

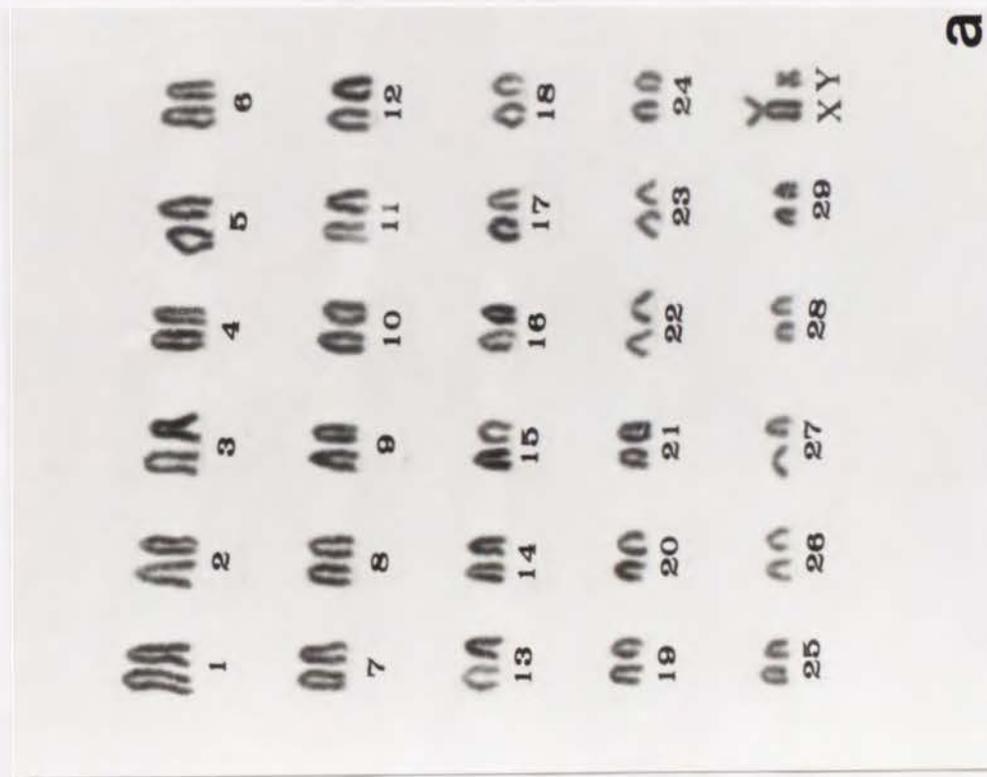
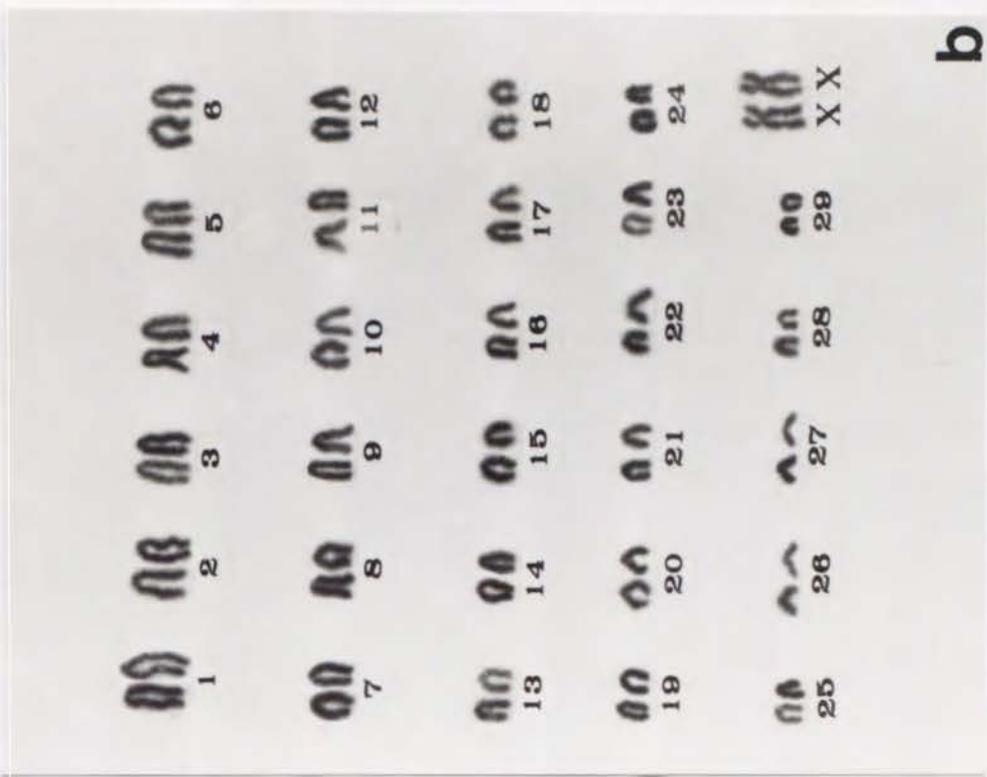


Fig. 1-6. Karyotype of the normal cattle. a: male; b: female.

中部着糸型 (Submetacentric chromosome) と小型の中部着糸型染色体 (Metacentric chromosome) であり、それらは容易に区別することができた。表 1-6 は、黒毛和種の各染色体の相対的長さであるが、X染色体は常染色体の第 1 染色体、Y染色体は第 26 染色体とほぼ同じ大きさであった。

Table 1-6. The relative length of each chromosome pair obtained from G-banded karyotype in Japanese Black Cattle

Chromo. No.	Mean	Chromo. No.	Mean	Chromo. No.	Mean (Arm ratio)
1	5.74	11	3.79	21	2.76
2	5.23	12	3.66	22	2.69
3	4.78	13	3.43	23	2.63
4	4.59	14	3.39	24	2.61
5	4.38	15	3.20	25	2.50
6	4.41	16	3.22	26	2.38
7	4.40	17	2.95	27	2.15
8	4.13	18	2.96	28	2.04
9	4.17	19	2.94	29	1.86
10	4.08	20	2.97	X	5.62(1.73)
				Y	2.38(1.31)

1) The relative length in per cent of the total autosome length of the haploid set.

2) Arm ratio = q / p .

2. G-バンド法によるウシの標準核型

図 1-8 は、G-バンド法によって分析した雄個体の核型である。この分裂中期 (3 1 3 バンド期) における個々の染色体の分染パターンは次のとおりであった。

第1染色体：ひとつの特徴は、中央部の第2領域に見られる第1番目の薄いバンド（21）である。染色体は3つに分けられ、基部から中央部にかけての第1領域には4本のバンドが見られ、2本目が最も濃く染まる。第3領域にも4本のバンドがあり、末端部には薄いバンドが認められる。

第2染色体：染色体の長さは、第1染色体に比べるとやや短い。分染パターンは、第1染色体のそれに似ており、中央部の薄く染まったバンド（21）によって3つに分かれる。第1領域では、動原体に近い最初のバンドが最も濃く染まる。第3領域には、3本のバンドが間隔を置いて分布しており、第1染色体のバンドに比べるとはっきりしている。また、末端部がマイナスのバンドであることも第1染色体との相違点である。

第3染色体：第1領域に非常に薄いバンド（14）が見られ、このバンドの両側の2本の濃いバンド（12，21）がこの染色体の分染パターンの特徴である。

第4染色体：基部から中央部には4本のバンドがほぼ均等に分布しており、そのすぐ下には薄いバンドが見られる。端部には2本のバンドが間隔を置いて見られる。

第5染色体：非染色部分（13，26）が非常に明確で、それによって染色体は3つに分かれる。中央部の3本、端部の2本のバンドの間隔は狭く、境界は明確でない。ただ、全体的には分染パターンは濃淡がはっきりしており、染色体は比較的容易に識別できる。

第6染色体：濃いバンドが4本ほぼ均等に分布しており、3本目と4本目の間に薄いバンド（21）が見られる。第4染色体の分染パターンと似ているが、第6染色体では端部の2本のバンドがいずれも薄く、1本は末端部にある。

一方、第4染色体の場合、2本のバンドはいずれも濃く、末端部は非染色域である。

第7染色体：基部には広くて薄いバンド（12）が見られ、中央部の少し上にも非常に濃い特徴的なバンド（21）がある。バンドは合計6本あるが、端部の2本（41，43）は間隔が狭く、普通は5本に見える。

第8染色体：中央よりやや端部よりの薄いバンド（21）がひとつの特徴である。染色体はこのバンドでもって3つに分かれる。第1領域では3本、第3領域では2本のバンドが見られる。通常、基部のほうが端部よりも幾分濃く染まる。

第9染色体：特徴的なバンドがなく、分染パターンはいまひとつ明確でない。一般的には基部のバンドは濃く、端部は薄い傾向にある。

第10染色体：染色体は4つの領域に分かれる。第1と第4領域にはバンドが1本ずつあり、第2、第3領域にはそれぞれ2本ずつバンドがくっついて見られる。これらの合計6本のバンドの配列と末端部の濃いバンド（41）が第10染色体の特徴である。

第11染色体：同じ幅の濃いバンドが4本ほぼ等しい間隔でもって分布している。それらの中では3本目のバンド（31）が幾分濃く染まる傾向にある。

第12染色体：基部に非常に濃いバンド（12）があり、そのすぐ下には特徴的な薄いバンド（21）が見られる。中央部から端部においては、濃いバンドと薄いバンドがそれぞれ2本ずつ見られるが、最後の2本は間隔が狭く明確でない。

第13染色体：基部の幅の広くて濃いバンドに続いて同じように濃染されたバンドが2本見られる。また、末端部には2本の薄いバンドがある。

第14染色体：指標となるバンドがなく、分染パターンにも特徴がない。ただ、中央部が基部、端部に比べて濃く染まる傾向にある。

第15染色体：基部に非常に濃い特徴的なバンド(12)を持っている。その下の非染色部分に続いて3本のバンドが見られる。その中では中央のバンド(23)が幾分濃く染まる。

第16染色体：中央部より端部寄りの幅の広いマイナスバンド(22)が最大の特徴である。基部には非常に濃いバンド(12)があり、その真下と端部にもそれぞれ1本ずつバンド(21, 31)が見られる。

第17染色体：中央部に非常に濃い特徴的なバンド(14)が見られる。また、その両側にも1本ずつバンドが見られるが、末端部にはプラスのバンドは認められない。

第18染色体：第17染色体と同様に基部と中央部にそれぞれ1本ずつ特徴的なバンド(12, 22)を持っている。ただ、これらのバンドは第17染色体の場合よりも幾分間隔をおいて見られ、最初のバンド(12)ははっきりしている。また、もうひとつの特徴として末端部にも薄いバンドが認められる。

第19染色体：濃いバンド(12)は唯一基部において見られ、中央部、端部のバンドはかすかに確認できる程度でいずれもはっきりしない。

第20染色体：主な特徴は端部の非常にはっきりした濃いバンド(21)である。その上の第1領域には3本バンドがあるが、基部の2本は境界が明確でなく通常は1本に見える。

第21染色体：基部と端部にそれぞれ非常に濃いバンド(12, 21)を1本ずつ持ち、その間に薄いバンド(14)が見られる。分染パターンは非常に

特徴的で、染色体の識別は比較的容易である。

第22染色体：基部に濃いバンド（12）が1本、さらに中央部から端部のところには2本のよく似たバンド（21，23）が隣接して見られる。

第23染色体：第22染色体と同じく3本の濃いバンド（12，21，23）を持っている。ただ、それらはほぼ等間隔で分布しており、非染色部分は狭い。また、3本のバンドの中では最初のバンド（12）が幾分濃く染まる。

第24染色体：第1領域の基部と中央部に2本の濃いバンド（12，14）が見られる。両者の間隔（13）は狭く、最初のバンド（12）のほうが幾分濃く染まる。末端部には1本薄いバンドが認められる。

第25染色体：第1領域に2本の濃いバンド（12，14）があり、両者の間隔は非常に狭く、通常は1本のバンドに見える。また、末端部には薄いバンド（21）が認められる。分染パターンは第24染色体の場合と似ているが、第25染色体のほうが幾分小さく、最初の2本のバンドがほぼ同じように濃染される点が異なる。

第26染色体：バンドは基部と中央部に1本ずつ見られるだけで、末端部にはバンドは認められない。分染パターンは簡潔で、染色体の識別も比較的容易である。

第27染色体：第25染色体の分染パターンと似ており、基部から中央部においては2本のバンド（12，14）が見られる。ただ、それらは第27染色体の場合には幾分動原体に近いほうにある。また、端部の薄いバンド（21）も中央部寄りにあり、末端部にはわずかながら非染色域が見られる。

第28染色体：中央部に濃い特徴的なバンド（14）があり、そのすぐ上と末端部に1本ずつ薄いバンド（12，21）が見られる。

第29染色体：最小の染色体で、基部に濃いバンド（12）が見られる。また、その真下にも細くて薄いバンド（14）があるが、あまりはっきり確認できない。

X染色体：大型の次中部着糸型染色体で、動原体部は濃染される。

短腕部：中央部と末端部に濃いバンド（15, 17）が1本ずつ見られる。

長腕部：中央部に幅の広いバンド（13）を持っている。また、端部にも濃いバンドが2本（31, 33）、その上にはやや薄いバンド（21）が見られる。

Y染色体：小型の中部着糸型染色体で、X染色体と同様に動原体部は濃く染まる。

短腕部：唯一末端部に細くて薄いバンド（13）が見られる。

長腕部：通常は1本の濃いバンドに見えるが、中央部にマイナスのバンドが認められることもある。基部は濃く、端部は幾分薄く見える。

上記の分染パターンをもとにイデオグラムを作成し、その結果を図1-9に示した。この場合のX染色体、Y染色体を含むハプロイド当りのバンド数は313本で、その内訳はプラスのバンドが151本（48.2%）、マイナスのバンドが162本（51.8%）であった。第3、5、7、10、12、15～18、20、21、26の12本の染色体については分染パターンに特徴があり、同定は比較的容易であった。一方、第4染色体と第6染色体、および第24、25、27染色体は類似した分染パターンを示した。



Fig. 1-8. G-banded karyotype of the normal bull.

第2章 繁殖牛集団におけるロバートソン型転座の分布状況

緒 言

ロバートソン型転座は、非相同な端部着糸型染色体が動原体部で融合した構造的変異である。ウシでは、1964年にスウェーデン赤白斑牛(Swedish Red and White)において1/29転座が発見されて以来(Gustavsson & Rockborn, 1964)、これまでに17種類のロバートソン型転座が報告されている(表2-1)。この転座は一般にメンデル式遺伝によって遺伝することが知られており、1/29転座は世界の約40品種で報告されている。これらの中には、1/29転座を保有していた種雄牛を連続して人工授精に供用したために、ブリティッシュホワイト種(British White)のように転座保有個体の頻度が78.8%に達していた例も報告されている(Eldridge, 1975)。転座染色体の融合部位の形態学的特徴を見ると、これまでに分析された1/29転座はいずれも長腕部にのみ動原体を持つ一動原体性の転座であることが明らかにされている(Popescu, 1973a; Gustavsson et al., 1976)。その他には25/27転座と12/15転座が一動原体性の転座で(De Giovanni et al., 1979; Roldan et al., 1984)、残りはすべて二動原体性の転座であることが報告されている。前者は、後者に比べて一般に起源が古く、遺伝的に安定した転座と考えられている(Niebuhr, 1972; Evans et al., 1973)。1/29転座の場合、融合部位の特徴や転座保有個体の分布状況などから見て、同一祖先に起こった転座が他の品種に拡がったものと考えられている(Harvey, 1972; Popescu, 1975a; Eldridge & Balakrishnan, 1977)。我が国では、黒毛和種において1/29転座と7/21転座の2種類のロバートソン型転座が確認されているが(耕田

ら、1978, 1980; 花田ら、1979; 新里ら、1980; 岡本ら、1981)、これらの転座染色体の分布状況や起源については明らかにされていない。

本章では、最初に、G-バンド分析によって黒毛和種で観察された2種類のロバートソン型転座の同定を試みた。次に、転座染色体の融合部位の形態学的特徴について分析し、その結果と黒毛和種の成立過程で交雑された外国種についての報告をもとに、1/29転座と7/21転座の遺伝的経緯や起源を推察した。最後に、N県の黒毛和種の育種、繁殖集団を対象に細胞遺伝学的調査を実施し、転座保有個体の分布状況について調査した。

Table 2-1. Robertsonian translocations identified by banding methods

Chromosomes involved	Banding performed ¹⁾	Breed	Geographical area	References
1/29	G,R,Q	Different breeds	Many countries	Many authors
1/25	G	Piebald	West Germany	Stranzinger & Förster(1976)
2/4	G	Holstein-Friesian	Great Britain	Pollock & Bowman(1974)
3/4	R	Limousine	France	Popescu(1977b)
4/8	R	Chianina	Italy	De Giovanni et al.(1988)
5-6/15-16	G	Dexter	Great Britain	Eldridge(1974)
5/18	R,Q	Simmental	Hungary	Papp & Kovács(1980)
5/21(7/21)	G	Japanese Black	Japan	Masuda et al.(1978)
9/23	G,R	Aquitaine Blond	France	Cribiu et al.(1989)
12/15	G	Holstein-Friesian	Argentina	Roldan et al.(1984)
13/21	G	Swiss Simmental	Great Britain	Harvey & Logue(1975)
14/20	G	Simmental	Great Britain	Logue & Harvey(1978)
14/24	R	Podolian	Italy	Di Berardino et al.(1979)
14/28	G	Holstein	USA	Ellsworth et al.(1979)
21/27	G,R	Aquitaine Blond	France	Berland et al.(1988)
25/27	R	Alpine Grey	Italy	De Giovanni et al.(1979)
27/29	G	Guernsey	Canada	Bongso & Basrur(1976)

1) G:G-band, R:R-band, Q:Q-band.

第1節 転座染色体の同定とその起源

N県の黒毛和種の細胞遺伝学的調査において、ロバートソン型転座の存在が確認された。そこで本節では、G-バンド分析によって転座染色体の同定を行った。また、C-バンド分析を行って、転座染色体の融合部位の形態学的特徴を明らかにするとともに、転座染色体が黒毛和種の集団に持ち込まれた遺伝的経緯について考察した。同時に、見島牛や褐毛和種、日本短角種、ホルスタイン種の細胞遺伝学的調査結果について報告した。

材料および方法

1. 供試牛

本研究に用いた黒毛和種は、N県内の一般農家で飼養されていた繁殖用雌牛394頭であった。見島牛 (Mishima Cattle) は、昭和54年の調査時に山口県で天然記念物として保存されていた28頭であった。日本短角種 (Japanese Shorthorn) は、農林水産省東北農業試験場および岩手県内で飼養されていた126頭、褐毛和種 (Japanese Brown) は熊本県畜産試験場で繋養されていた種雄牛13頭を含む67頭、ホルスタイン種 (Holstein) は農林水産省畜産試験場、宮崎県の農家で飼養されていた156頭であった。

2. G-バンド分析による転座染色体の同定

染色体の観察は、Seabright (1971) のトリプシン処理によるG-バンド法によって行った。染色体の形態学的分類および記載は、家畜の標準核型に関する

る国際会議での命名規約に準じて行った (Ford et al., 1980)。個体の核型は、原則として20～30個の適度に伸展している分裂中期の核板を分析して決定した。

3. C-バンド分析による転座染色体の融合部位の観察

分析のための染色体標本は、7/21転座もしくは1/29転座を保有していた黒毛和種雄牛の娘牛で、父親と同様の転座を保有することが確認された次の12頭より得た。

S102 (7/21転座ヘテロ種雄牛) の娘牛、	3頭
S120 (7/21転座ヘテロ種雄牛) の娘牛、	3頭
S104 (7/21転座ホモ種雄牛) の娘牛、	3頭
S132 (1/29転座ヘテロ種雄牛) の娘牛、	3頭

構成性ヘテロクロマチン (C-バンド) の染色は、Sumner (1972) のBSG法によって行った。常法によって作製した染色体標本を、0.2Nの塩酸に1時間浸した後、蒸留水で洗浄、50°Cの5%水酸化バリウム水溶液で10～15分間熱処理した。再び、蒸留水で洗浄後、60°Cに加温した2×SSC (0.3M塩化ナトリウム+0.03Mクエン酸ナトリウム) の中で1時間処理、流水で洗浄後、1時間半ギムザ染色を行い、顕微鏡標本とした。なお、転座染色体の融合部位の観察は、いずれの個体の場合にもC-バンド処理をした複数の標本について行った。

結果と考察

1. 転座染色体の同定

黒毛和種の飼養集団において観察された2種類のロバートソン型転座は、図2-1から図2-6に示した。それらは、2本の端部着糸型常染色体が着糸点部位で融合することによって形成された大型の次中部着糸型染色体であった。それらはX染色体よりも大型で、一方は最大と最小の端部着糸型の常染色体の転座（図2-1）、他方は大型と中型の端部着糸型常染色体の転座であった（図2-2、図2-3）。その詳細を調べるためにG-バンド分析を行った結果、前者はGustavssonとRockborn（1964）によって発見された転座と同型のもので、ヨーロッパ系の品種を中心に世界的に分布している1/29ロバートソン型転座であった（図2-4）。後者は、耕田ら（1978）が5/21転座として黒毛和種の1家系において見出したものと同一の転座であった。この5/21転座として記載された転座は、国際会議での命名規約に従うと、第7と第21染色体の融合による7/21転座であることが明らかになった（図2-5）。核型を調査した個体群の中には、1/29転座あるいは7/21転座をヘテロに保有する個体、ヘテロではあるが両者を保有する個体、7/21転座をホモに保有する個体が含まれていた（図2-6）。これらはいずれも表現型からは全く識別できなかった。

一方、見島牛や褐毛和種、日本短角種、ホルスタイン種では、1/29転座および7/21転座個体は認められなかった（表2-2）。

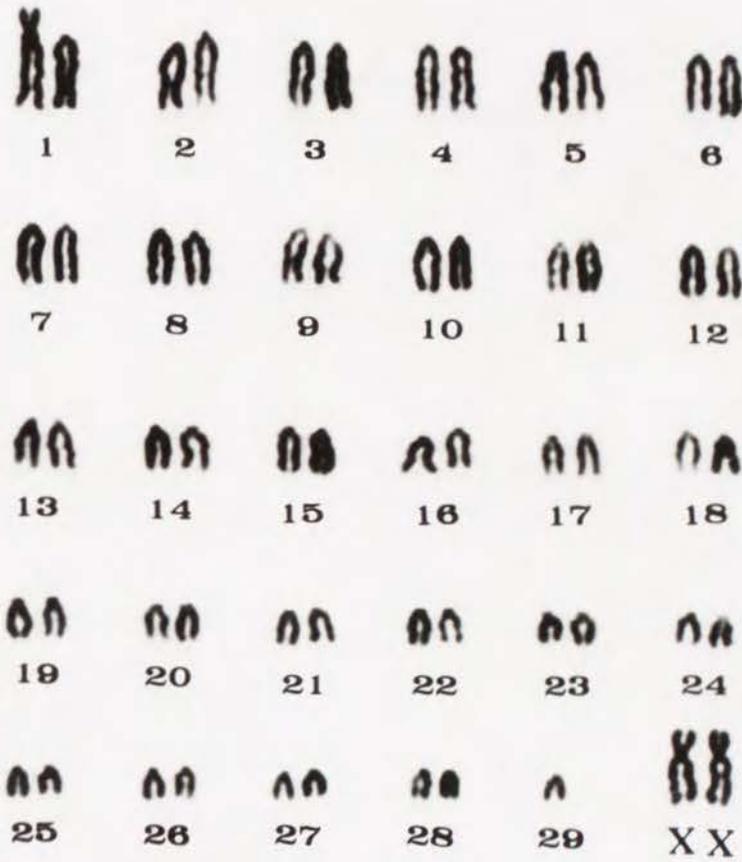


Fig. 2-1. Karyotype of cattle heterozygous for the 1/29 translocation.

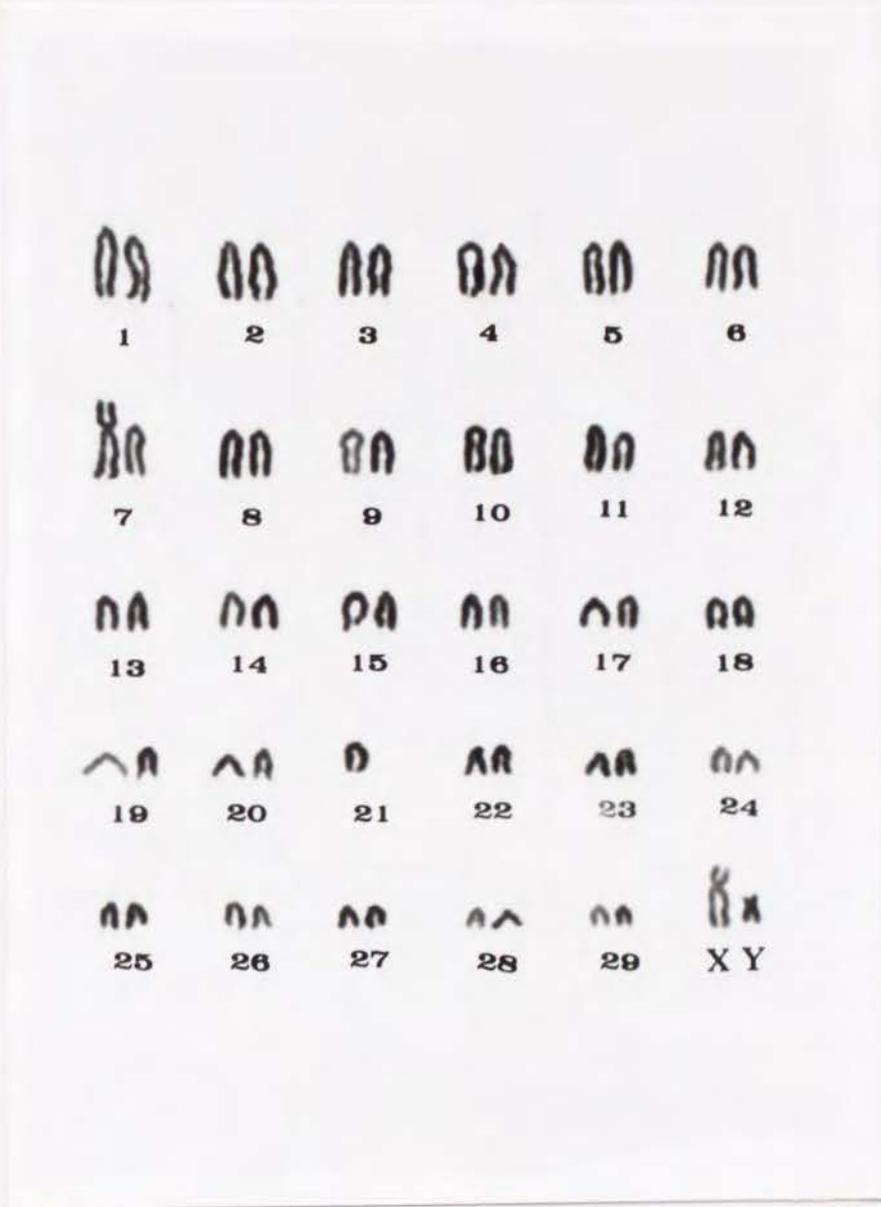


Fig. 2-2. Karyotype of cattle heterozygous for the 7/21 translocation.

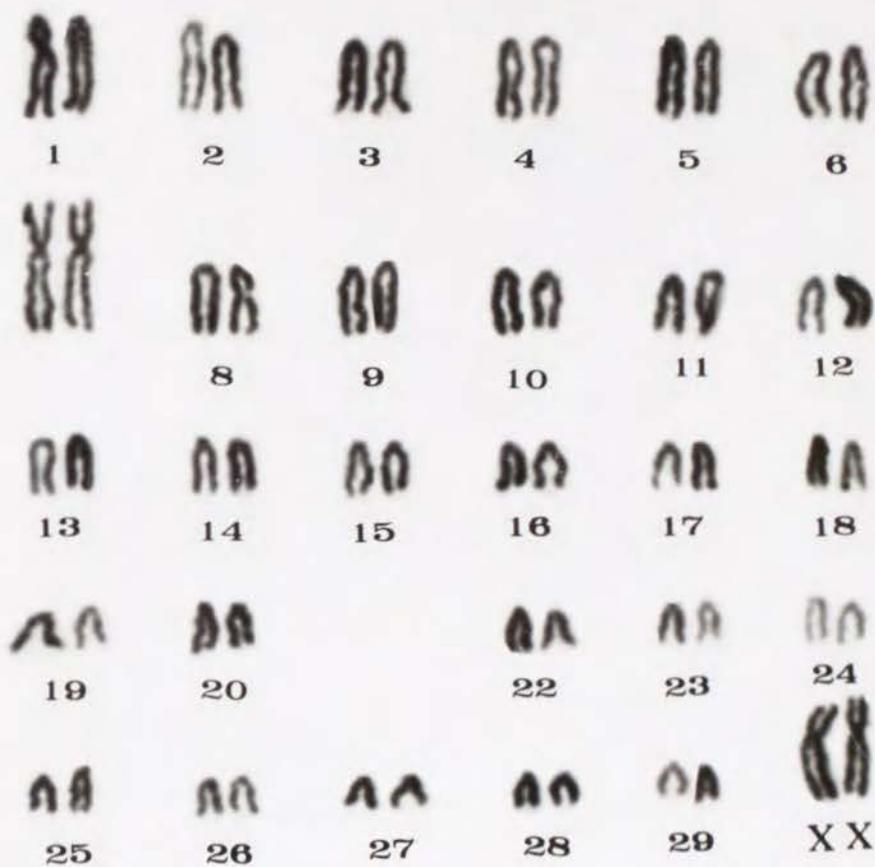


Fig. 2-3. Karyotype of cattle homozygous for the 7/21 translocation.



Fig. 2-4. G-banded metaphase of a cell carrying the 1/29 translocation (arrow) and the fused chromosomes from three different carriers A, B and C.

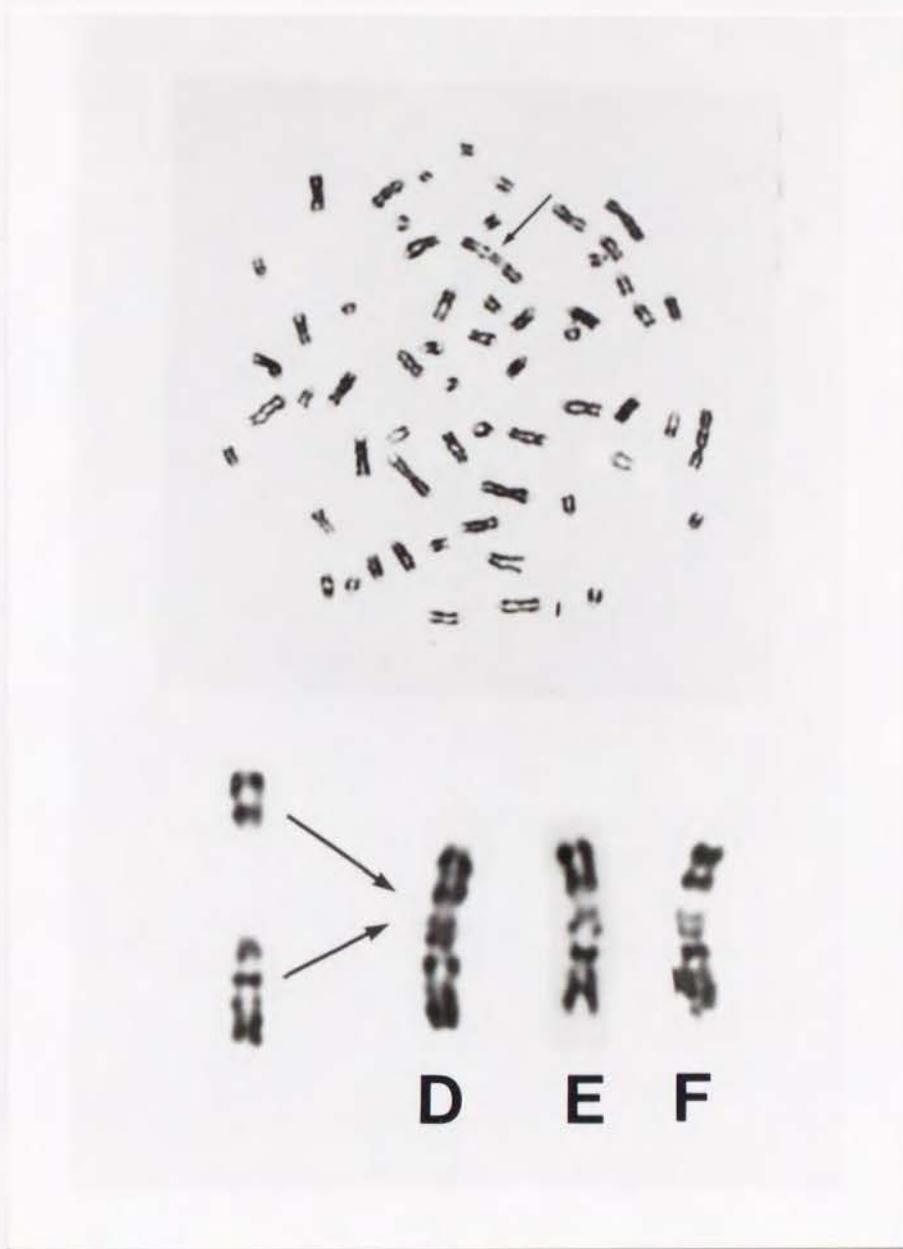


Fig. 2-5. G-banded metaphase of a cell carrying the 7/21 translocation (arrow) and the fused chromosomes from three different carriers D, E and F.

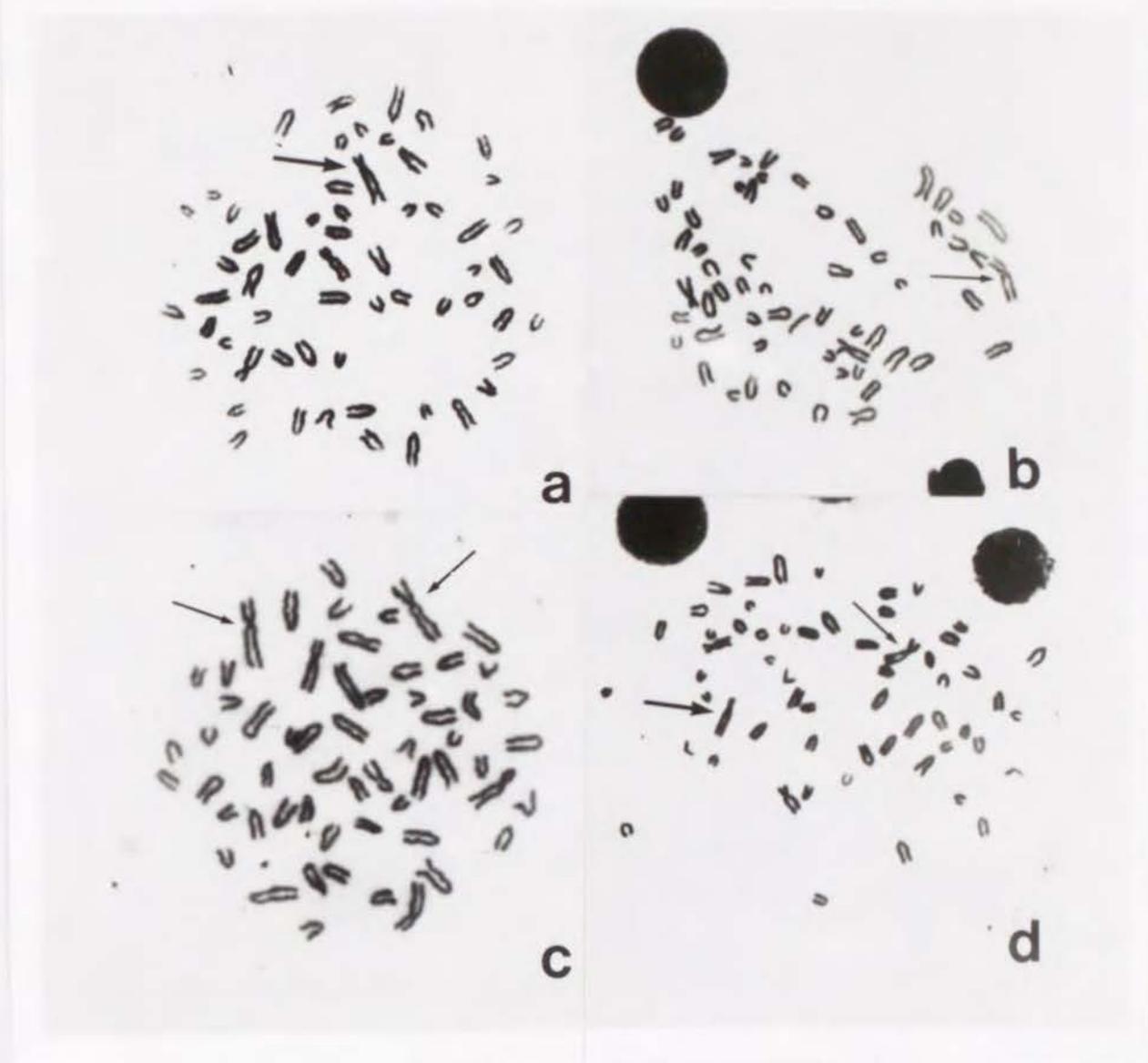


Fig. 2-6. Metaphases of cells from four different carriers. Bold arrow and light arrow show the 1/29 and the 7/21 translocation chromosomes, respectively.

a: $2n=59, XX, t(1q\ 29q)$; b: $2n=59, XX, t(7q\ 21q)$;
c: $2n=58, XX, t(7q\ 21q)\ t(7q\ 21q)$;
d: $2n=58, XX, t(1q\ 29q)\ t(7q\ 21q)$.

Table 2-2. Frequency of Robertsonian translocations in cattle breeds raised in Japan

Breed	No. of animals	No. of carriers ¹⁾	
		1/29	7/21
Japanese Black	394	10 (2.5)	43 (10.9)
Japanese Brown	67	0	0
Japanese Shorthorn	126	0	0
Mishima Cattle	28	0	0
Holstein	156	0	0

1) Figures in parentheses indicate the percentage of the carriers.

2. 転座染色体の融合部位の形態学的特徴とその起源

正常雄個体のC-バンドパターンは、図2-7のとおりであった。C-バンドは常染色体では動原体部、Y染色体では短腕の中央部に観察された。また、X染色体では短腕の基部に非常にかすかなバンドが認められた。

1/29転座と7/21転座を保有する個体のC-バンド分析の結果は、それぞれ図2-8と図2-9に示した。また、図2-10には、2種類の転座染色体の融合部位を拡大して示した。1/29転座は融合部位の長腕（第1染色体）側に動原体を持つ一動原体性（monocentric）の転座染色体であった。一方、7/21転座は第7染色体と第21染色体がそれぞれ動原体を失わずに融合した、いわゆる二動原体性（dicentric）の転座であり、1/29転座とは異なるC-バンドパターンを示した。これらは、調査したすべての1/29転座および7/21転座染色体に共通した細胞遺伝学的特徴であった。

ウシのロバートソン型転座の融合形態は、表2-3に示した15種類の転座について明らかにされている。1/29転座の融合形態はシャロレー種（Cha-

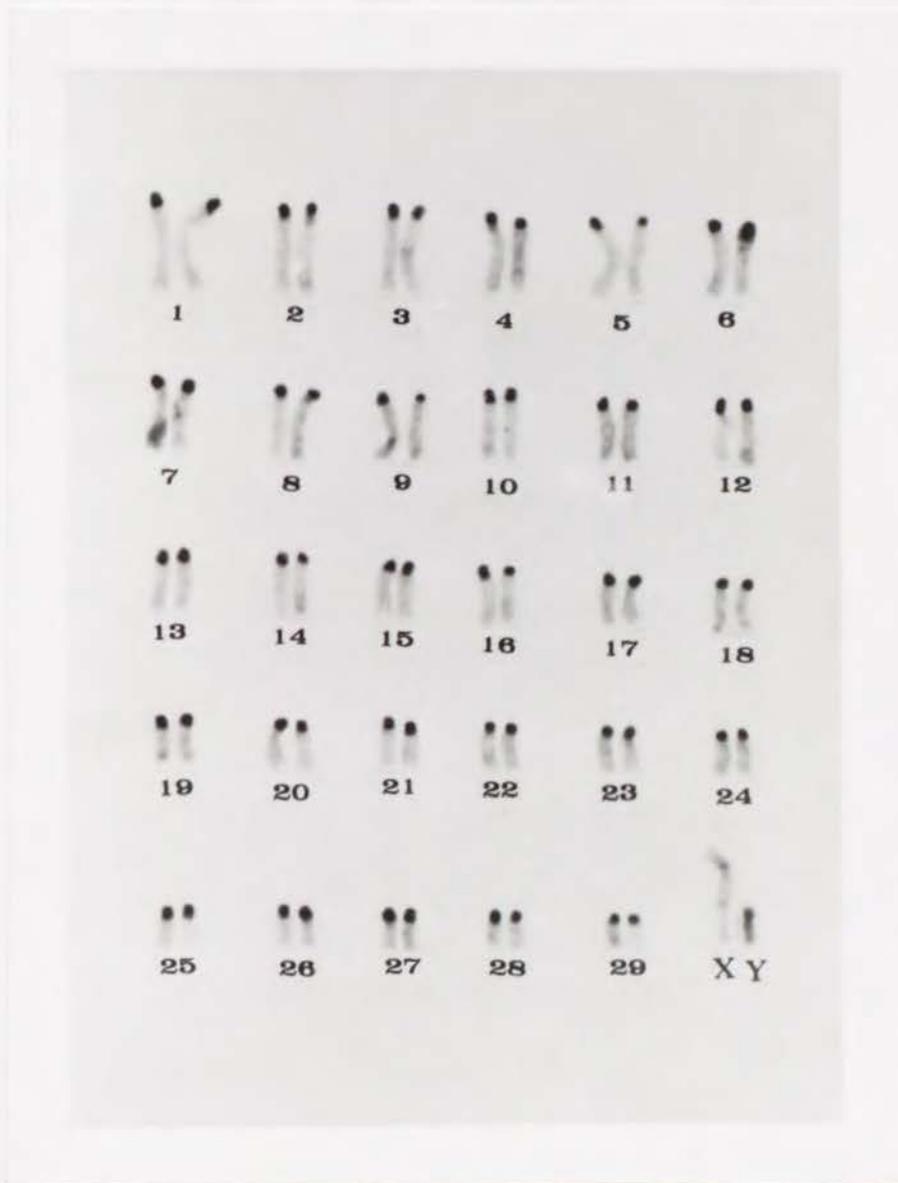


Fig. 2-7. C-banding pattern in the mitotic chromosomes of the normal bull.



Fig. 2-8. Metaphase of C-band treated cell carrying the 1/29 translocation. Arrow shows the translocation chromosome.



Fig. 2-9. Metaphase of C-band treated cell carrying the 7/21 translocation. Arrow shows the translocation chromosome.



Fig. 2-10. C-band patterns of the fused chromosomes from four different carriers. Arrow shows the translocation chromosome. a,b: $2n=59, XX, t(1q\ 29q)$; c,d: $2n=59, XX, t(7q\ 21q)$.

Table 2-3. C-band pattern in different Robertsonian translocations in cattle

Chromosomes involved	Breed	C-band pattern	References
1/29	Many breeds	Monocentric	Many authors
3/4	Limousine	Dicentric	Popescu(1977b)
4/8	Chianina	Dicentric	De Giovanni et al.(1988)
5-6/15-16	Dexter	Dicentric	Eldridge(1974)
5/18	Simmental	Dicentric	Papp & Kovács(1980)
7/21	Japanese Black	Dicentric	Hanada et al.(1981)
9/23	Aquitaine Blond	Dicentric	Cribu et al.(1989)
12/15	Holstein	Monocentric	Roldan et al.(1984)
13/21	Swiss Simmental	Dicentric	Harvey & Logue(1975)
14/20	Swiss Simmental	Dicentric	Logue & Harvey(1978)
14/24	Podolian	Dicentric	Di Berardino et al.(1979)
14/28	Holstein	Dicentric	Ellsworth et al.(1979)
21/27	Aquitaine Blond	Dicentric	Berland et al.(1988)
25/27	Alpine Grey	Monocentric	De Giovanni et al.(1979)
27/29	Guernsey	Dicentric	Bongso & Basrur(1976)

rolais)、スウェーデン赤白斑牛、ブラウンスイス種 (Brown Swiss) などのヨーロッパ系の外国種、南アフリカ東部で飼養されているングイ種 (Nguni) やレッドボロ種 (Red Bororo) のインド系の品種でも調べられているが、いずれの品種の $1/29$ 転座染色体も第29染色体側の動原体が失われて第1染色体の動原体に融合した、いわゆる一動原体性の転座であることが明らかにされている (Popescu, 1973a; Gustavsson et al., 1976; Blazak & Eldridge, 1977; Potter et al., 1979; Moraes et al., 1980; Nel et al., 1985; Pathiraja et al., 1985)。黒毛和種における $1/29$ 転座の融合部位の形態学的特徴は、これらの外国種についての分析結果と全く同一であった。一動原体性の転座としては、 $1/29$ 転座以外に $25/27$ 転座と $12/15$ 転座が報告されており、 $25/27$ 転座の場合には、動原体は長腕部である第25染色体側に観察されている (De Giovanni et al., 1979; Roldan et al., 1984)。一方、 $3/4$ 転座、 $13/21$ 転座など残りの12種類は、すべて二動原体性のロバートソン型転座である。これらの転座の多くは、頭数が比較的少ない地方の品種で報告されており、 $1/29$ 転座の場合と違ってごく限られた地域において観察されている。 $7/21$ 転座もこれまでのところ黒毛和種以外の品種では報告されていない。

ウシでは、これらの一動原体性と二動原体性の転座以外にシンメンタール種 (Simmental) において、通常より幾分大きなC-バンドパターンを示す一動原体性の転座が報告されている (Logue, 1976)。しかし、その後、この転座についての報告はなく、 $1/29$ 転座や $25/27$ 転座の場合との融合部位の形態学的な違いなどその詳細については明らかにされていない。

これらのロバートソン型転座は、相互転座の一種であり、いずれも染色体の切断と融合の結果生じたものである。この場合、切断は2本の非相同な染色体

のそれぞれで起き、切断部位の違いによって1/29転座や7/21転座などの異なるC-バンドパターンを示すロバートソン型転座が形成されるものと考えられる。そこで、C-バンドパターンの異なる3種類のロバートソン型転座について、それらの転座の発生機構と融合形態を次のように整理した(図2-11)。

(Type I) : 切断は2本の非相同な染色体のいずれにおいても長腕部の反対側で起きる。その結果、転座染色体は二動原体性の染色体となる。

(Type II) : 切断は一方の染色体の長腕部に、もう一方の染色体では長腕部の反対側に起きる。従って、転座染色体は一動原体性の染色体を形成する。

(Type III) : 切断は2本の非相同な染色体の動原体部分で起こる。その結果、転座染色体は一動原体性の染色体となる。但し、動原体は通常の一動原体性の染色体の場合より幾分大きくなる。

ヒトやマウスにおける細胞遺伝学的研究によると、一動原体性と二動原体性の転座では、前者のほうが後者よりも古い時期に形成された安定した転座であると考えられている(Niebuhr, 1972; Evans et al., 1973)。ウシのロバートソン型転座は、前述のように1/29転座などの3種類を除いてすべて二動原体性の転座であり、それらはいずれも特定の品種で見られている。これに対して、1/29転座は本研究結果からも明らかなように一動原体性の転座であり、現在までに約30か国、40品種で報告されている(表2-4、図2-12)

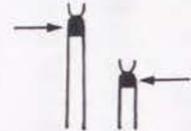
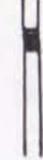
Type	Chromosomes involved	Translocation chromosomes	C-band pattern	Case in cattle
I			Dicentric	t(3q 4q) t(5q 18q) t(7q 21q)
II			Monocentric	t(1q 29q) t(25q 27q)
III			Monocentric	—

Fig. 2-11. C-band variations in Robertsonian translocations in cattle.
(↑:Break point)

）。しかも、ヨーロッパ系とインド系の両方の品種でその存在が報告されている。この転座の分布状況やC-バンドパターンから見て、1/29転座の起源は非常に古く、同一祖先に起こったものが世界のいろいろな品種に拡がったと考えられている (Harvey, 1972; Popescu, 1975a; Eldridge & Balakrishnan, 1977; Gustavsson, 1979)。1/29転座の分布の特徴は、この転座が非常に多くの品種で観察されているにもかかわらず、ドイツ原産で世界の代表的な乳用種であるホルスタイン種や、肉用種でもイギリス原産のヘレフォード種 (Hereford)、アバーディーンアンガス種 (Aberdeen Angus)、ショートホーン種 (Shorthorn) ではほとんど認められていないことである (表2-4、表2-5)。1/29転座の起源は明確でないが、その分布状況や転座を保有していた品種の成立経緯などから見て、ヨーロッパ大陸原産の乳肉兼用種ではないかと考えられている (Harvey, 1972; Pollock, 1974; Gustavsson, 1979)。この点については、さらに検討が必要であるが、これまでの調査結果から見ると、1/29転座の伝搬にはブラウンスイス種やシンメンタール種が深く関与しているのではないかと考えられる。これらの品種は成立時期が古く、1860~70年代には既に登録が開始され、1/29転座の存在が報告されているレッドステップ種 (Red Steppe) など数多くの品種に交雑されている (Nosach & Avakova, 1985)。また、ブラウンスイス種では原産地のスイスを初めアメリカやイタリアなどの集団、シンメンタール種の場合もスイスやカナダ、ドイツなどの世界の複数の集団で1/29転座が報告されており、これらの品種には1/29転座がかなり古い時期から存在していたものと考えられる (表2-4)。

黒毛和種は、役用種であった在来牛を基礎にして成立した品種であるが、その改良過程において役肉兼用種として体格や早熟性について能力の向上を図っ

ていくために外国種との交雑が行われた経緯がある。1900年以降、国がシンメンタール種、ブラウンスイス種、エアシャー種 (Airshire) などを導入し、民間でも中国地方を中心に島根県がデボン種 (Devon)、広島県がショートホーン種を導入している。また、兵庫県と鳥取県では、体格とともに泌乳性についても改良を進めていくために、スイスやアメリカからブラウンスイス種を輸入している。これらの品種の中で、シンメンタール種とアメリカのブラウンスイス種は1/29転座を保有していることが明らかにされている (Herzog & Höhn, 1971; Harvey, 1976; Popescu et al., 1975; Eldridge & Blazak, 1975; Tschudi et al., 1977)。一方、外国種との交雑が行われていない在来牛で、純粋な和牛の特徴を保持していると言われる見島牛 (昭和54年の調査時点での全飼養頭数、雄4頭、雌24頭) の調査では、1/29転座は認められなかった (花田・富田、1979)。このような事実から、黒毛和種で観察された1/29転座は品種改良の目的で導入されたブラウンスイス種、シンメンタール種などの外国種によって黒毛和種の集団に持ち込まれた可能性が高いものと考えられる。

一方、7/21転座はこれまでのところ外国種では報告されておらず、我が国の肉用牛である見島牛や褐毛和種、日本短角種においても観察されなかった。これらのことから、7/21転座は黒毛和種において自然発生的に生じた転座ではないかと推察される。また、C-バンドパターンから見て、7/21転座の発生時期は1/29転座の場合よりは新しいものと考えられる。

Table 2-4. Distribution of the 1/29 translocation according to geographical area and cattle breed.

Geographical area	Breed	Reference
Australia	Red Poll	Halnan et al. (1980)
Austria	Austrian Simmental	Mayr & Schleger (1978)
Brazil	Charolais	Moraes (1978)
	Pitangueiras	Pinheiro et al. (1981)
Canada	Charolais	Hare (1978)
	Guernsey	Bongso & Basrur (1976)
	Simmental	Lin et al. (1977)
Chad	Kuri	Quéinnec et al. (1974)
Cuba	Holstein-Friesian × Criollo	Betancourt et al. (1974)
	Santa Gertrudis	Betancourt (1982)
Czechoslovakia	Czechoslovakian Red Pied	Lojda (1974)
Denmark	Aquitaine Blond	Hansen K.M. & E.M. Hansen (1990)
France	Aquitaine Blond	Popescu & Boscher (1974)
		Quéinnec et al. (1974)
	Charolais	Popescu (1973b)
	Gascony	Quéinnec et al. (1974)
	Limousin	Darré et al. (1972)
	Montbeliard	Popescu (1971)
	Vosges	Popescu (1976)
Great Britain	British White	Eldridge (1975)
	Charolais	Harvey (1971)
	Limousin	Harvey (1972)
	Red Poll	Harvey (1976)
	Simmental	Harvey (1972)
Hungary	Hungarian Grey	Kovács (1978)
	Hungarian Simmental	Kovács (1977)
	Swedish Red and White	Gustavsson & Kovács (1977)
Italy	Chianina	Molteni et al. (1977)
		Silvestrelli et al. (1981)
	Marche	Molteni et al. (1977)
	Modica	Molteni et al. (1977)
	Pisa	Salerno (1977)
		Cited in Popescu (1979a)
	Portuguese	Rangel-Figueiredo (1991)
	Romagna	Succi et al. (1976)
	Swiss Brown	Guanti & Minoia (1978)
Ivory Coast	Baoulé	Popescu (1977a)
	Zebu × N'Dama	Popescu (1978b)
Japan	Japanese Black	Masuda et al. (1978)

Table 2-4. Cont.

Geographical area	Breed	Reference
Morocco	Brown Atlas	Fischer(1975)
New Zealand	Aquitaine Blond	Bruère & Chapman(1973)
Nigeria	Red Bororo	Pathiraja et al.(1985)
Norway	Norwegian Red	Amrud(1969)
Poland	Charolais	Sysa(1977)
	Polish Red	Sysa(1977)
Portugal	Barrosa	Rangel-Figueiredo(1991)
Romania	Charolais	Livescu(1977)
	Simmental	Ciupercescu(1982)
Southern Africa	Brahman	Nel et al.(1988)
	Nguni	Nel et al.(1985)
Sweden	Swedish Red and White	Gustavsson & Rockborn(1964)
Switzerland	Simmental	Popescu et al.(1975)
	Swiss Brown	Tschudi et al.(1977)
	Siamese	Fischer(1971)
USA	American Brown Swiss	Eldridge & Blazak(1975)
	Holstein-Friesian	Herschler(1966)
	Simmental	Maurer & Vogt(1988)
USSR	Red Steppe	Nosach & Avakova(1985)
Germany	Brown Mountain	Stranzinger(1976)
	German Red Pied	Rieck et al.(1968)
	Simmental	Herzog & Höhn(1971)
Yugoslavia	Simmental	Suldatović et al.(1977)

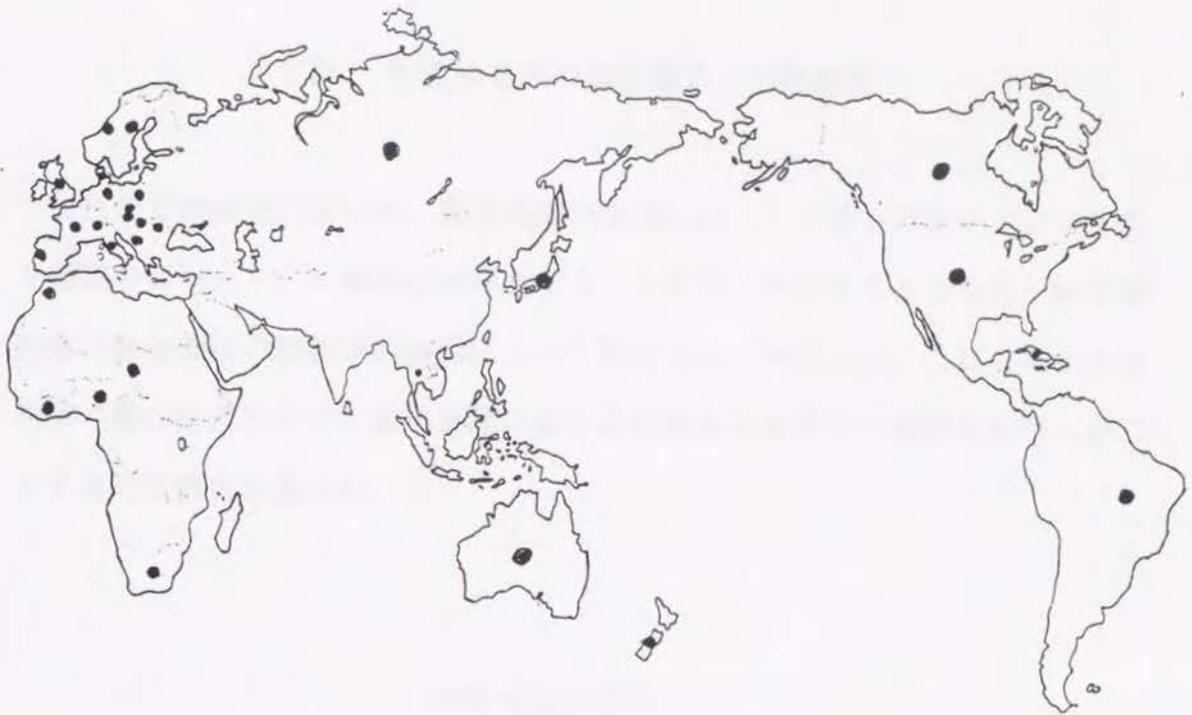


Fig. 2-12. Geographical distribution of the 1/29 translocation. The black points show the findings of the translocation reported in the literature.

Table 2-5. Summary of the frequency of the 1/29 Robertsonian translocation according to geographical area and breed type

Breed group	No. of animals	No. of carriers	Frequency (%)
Holstein	3352	0	0.0
Other dairy breeds	2771	305	11.0
British beef breeds	852	4	0.5
Continental beef breeds	3071	159	5.0
Japanese Black	394	10	2.5

第2節 転座染色体の遺伝様式と出現頻度

これまでの研究において、黒毛和種の集団には、1/29および7/21の2種類のロバートソン型転座が存在することを明らかにするとともに、転座染色体の融合部位の形態学的特徴について報告した。本節では、これらの転座染色体の遺伝様式ならびに繁殖集団における転座保有個体の分布状況を明らかにする目的で研究を進めた。

材料および方法

染色体調査を行ったのは、N県の種雄牛センターに繋養されていた人工授精用種雄牛22頭、同県内の一般農家と肉用牛生産組合で飼養されていた繁殖雌牛504頭（第1節で材料とした394頭を含む）、去勢肥育牛43頭の計569頭であった。その他に、東北地方のM県および関東地方のK県、九州地方のY県で飼養されていた繁殖雌牛214頭も転座保有個体の分布状況の調査に供試した。核型分析は通常のギムザ染色法によって行い、必要に応じてG-バンド分析を試みた。

結果と考察

1. 人工授精用種雄牛の核型

転座染色体の遺伝様式やその由来を知るためには、我が国の肉用牛の繁殖構

造から見て、人工授精に供用されている種雄牛の核型を調査する必要がある。そこで、昭和54～58年度に、N県の種雄牛センターで繋養されていた人工授精用種雄牛22頭について核型分析を行った。その結果、表2-6に示すように22頭中17頭は正常な雄の核型を示したが、5頭は7/21転座保有個体であった。その内訳は、4頭が7/21転座ヘテロ個体、残りの1頭がこの転座をホモの状態に保有する個体であった。

家系調査を進めて行った結果、7/21転座を保有する種雄牛5頭中4頭(S102、S104、S106、S113)は、N県の人工授精用種雄牛の中核をなしているA系統とB系統に属する個体であることが分かった。それらの血縁関係は、図2-13のとおりであった。

2. 7/21転座染色体の遺伝様式

7/21転座染色体が次世代にどのような形で伝えられるかを知るために、この転座をヘテロの状態に保有していたS102、S106、S113、S120の4頭の種雄牛と正常核型の雌牛との交配から生まれた89頭の子牛の核型を調査した。その結果を、表2-7に示した。正常核型を示したのは48頭で、残りの41頭は7/21転座をヘテロに保有する個体であり、分離比1:1の帰無仮説を棄却することはできなかった($\chi^2 = 0.55$ 、 $0.50 > P > 0.25$ 、 $df = 1$)。このことは、均衡型配偶子(29, Y, t および 29, X, t)が正常型配偶子(30, Y および 30, X)と同様に形成されてそれが受精に関与し、その後の胚の発生過程においても選択的に淘汰されることなく個体発生を完了し、出生にまで至ることを示している。これらの結果から、7/21転座は、その他のロバートソン型転座と同様にメンデル式遺伝で次世代に受け継がれることが確認された。

Table 2-6. Karyotype of the Japanese Black bulls used for artificial insemination

Strain	Bull number	Karyotype ¹⁾	Year of birth
A	S101	60,XY	S45.12.10
	S102	59,XY,t	S46. 3 .1
	S103	60,XY	S49. 2. 7
	S104	58,XY,t,t	S51. 1.10
	S105	60,XY	S52. 5.12
	S106	59,XY,t	S52. 7.22
	S107	60,XY	S52. 9. 6
	S108	60,XY	S50. 2.16
	S109	60,XY	S53. 1.20
B	S110	60,XY	S48. 4.18
	S111	60,XY	S50. 5. 2
	S112	60,XY	S51. 8. 3
	S113	59,XY,t	S52. 8.12
C	S114	60,XY	S45.10.10
	S115	60,XY	S45.12.16
D	S116	60,XY	S43. 1.14
	S117	60,XY	S46. 9.25
E	S118	60,XY	S48.11.20
	S119	60,XY	S49. 1.12
F	S120	59,XY,t	S43. 6.22
G	S121	60,XY	S52.7.18
	S122	60,XY	S52.4.12

1) t:t(7q 21q).

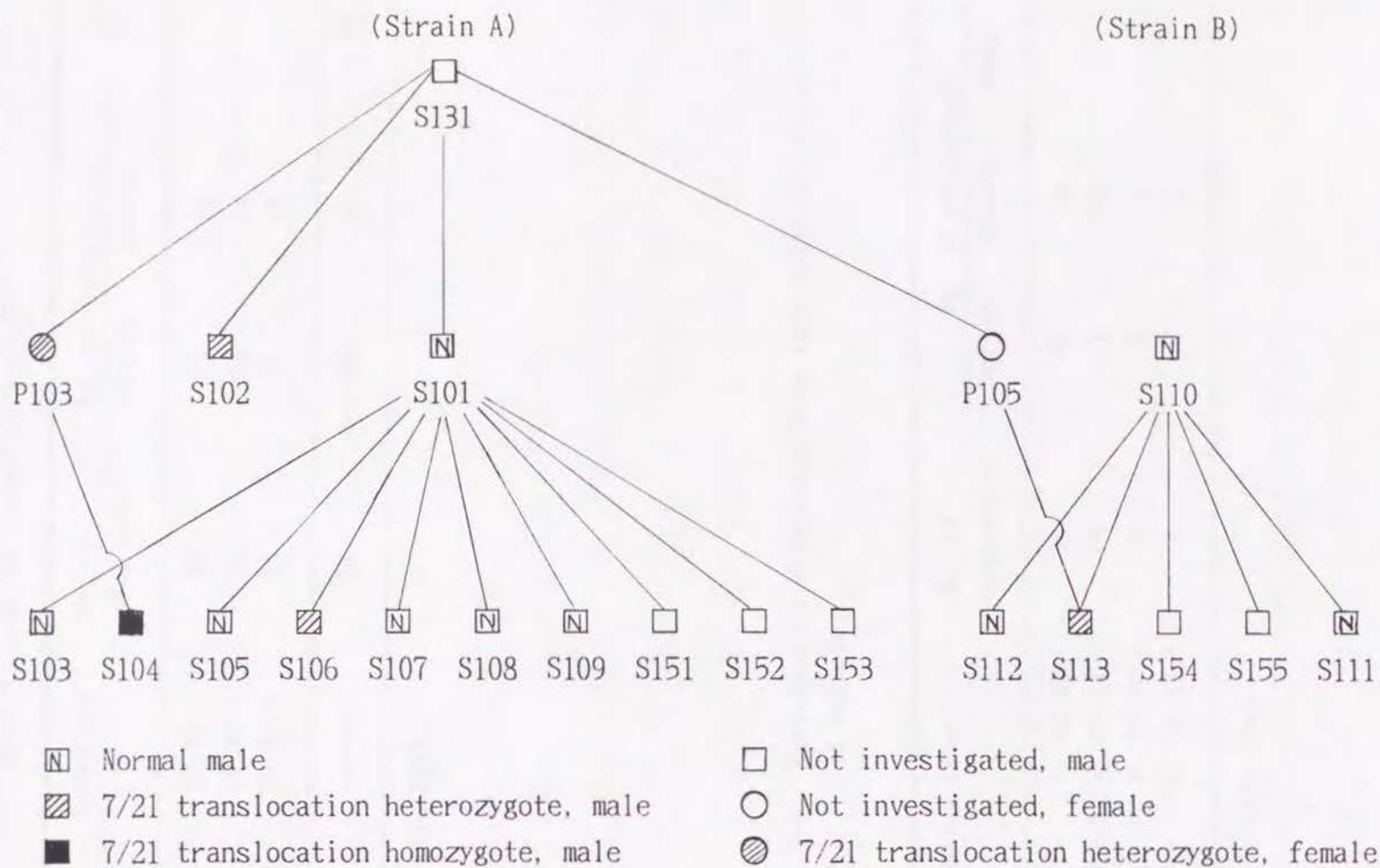


Fig.2-13. Relationship of the bulls belonging to strain A and B.

Table 2-7. Karyotype of offsprings of the 7/21 heterozygous bulls mated to cows of normal karyotype

Sire	Karyotype ¹⁾	No. of cows mated	No. of offsprings		χ^2
			Normal	Hetero.	
S102	59,XY,t	25	16	14	
S120	59,XY,t	22	18	14	
Others	59,XY,t	14	14	13	
Total	—	61	48	41	0.55

1) t:t(7q 21q).

Table 2-8. Karyotype of offsprings from four different types of matings

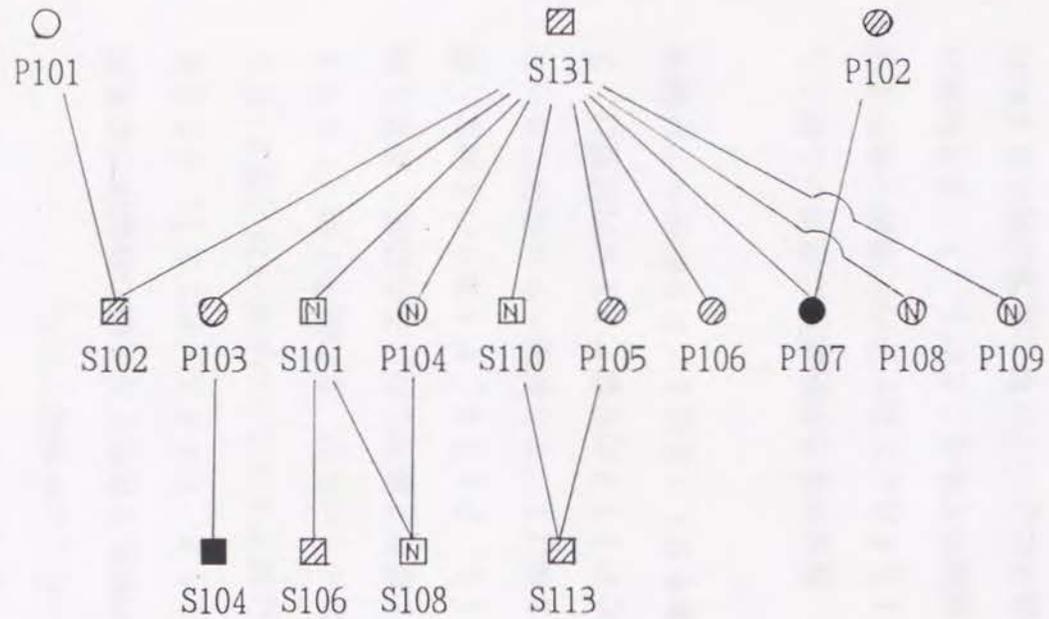
Mating type ¹⁾	No. of cows mated	No. of offsprings		
		Normal	Hetero.	Homo.
60,XY × 60,XX	31	56	1	
58,XY,t,t × 60,XX	19	1	24	
60,XY × 59,XX,t	6	5	2	
59,XY,t × 59,XX,t	5	2	2	1

1) t:t(7q 21q).

7/21 転座種雄牛と正常核型の雌牛との交配以外の4通りの組み合わせについての調査結果は、表2-8に示した7/21 転座染色体の次世代への伝達は、2頭の例外的な個体を除いてすべてメンデル式遺伝により説明された。2例の例外は転座を保有していない正常核型の個体どうしの組み合わせ、および7/21 転座をホモの状態に保有する雄個体と正常核型の雌個体の組み合わせにおいて、それぞれ1頭ずつ見いだされた。前者は7/21 転座ヘテロ個体、後者は正常個体であった。これらは、人工授精時の記録など何らかの誤りによるものではないかと考えられるが、その原因については明確にすることはできなかった。

3. 1/29 転座および7/21 転座染色体の由来

次に、1/29 および7/21 の2種類の転座染色体が、N県の集団に持ち込まれた経緯について遺伝学的な見地から調査した。種雄牛の核型分析の結果から明らかのように、7/21 転座はAおよびB系統の種雄牛ではS102、S104、S106、S113の4頭が保有しており、その後の家系調査からこれらの種雄牛はS131を共通祖先に持っていることが明らかになった(図2-14)。この種雄牛S131は、約5年間N県で人工授精に供用された後、昭和47年に廃用になっていたため、その核型は調査することができなかった。しかし、その娘牛7頭(P103~109)について材料が得られたので核型を調査した結果、P103、P105、P106、P107の4頭が7/21 転座を保有しており、しかもそれらの中の1頭P107は転座をホモに保有する個体であった(図2-14)。これらのことから、種雄牛S131は、7/21 転座をヘテロに保有する個体であったことが明らかになった。また、7/21 転座を保有していたF系統の種雄牛S120については、家系調査の



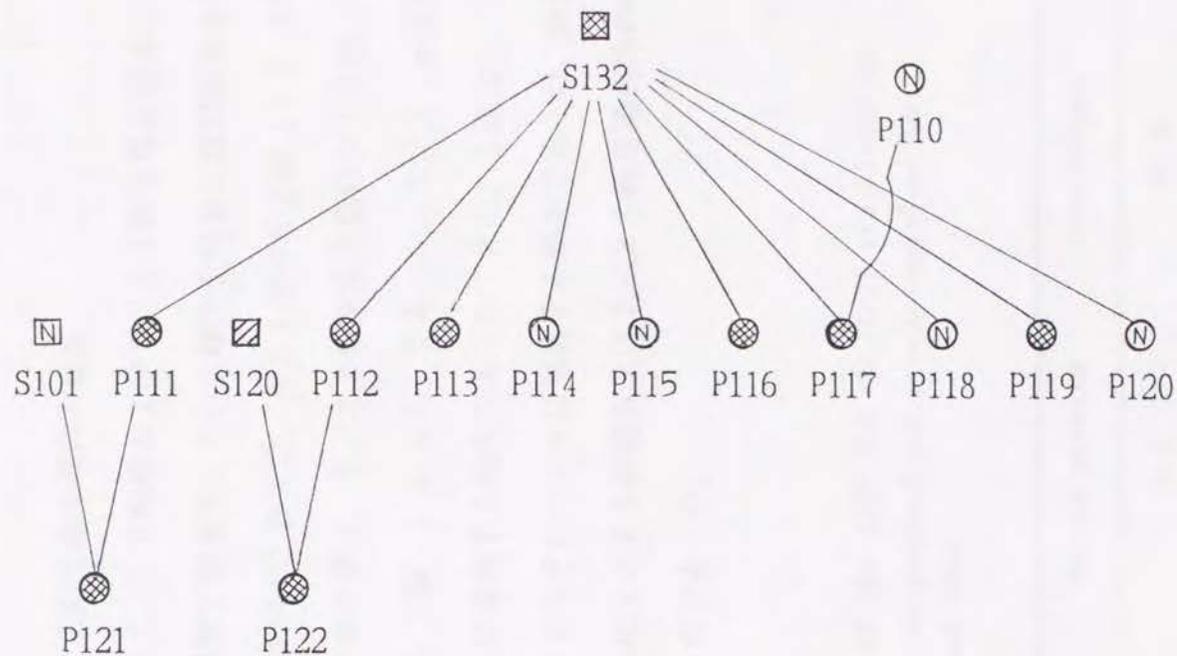
- Normal male
- Normal female
- ▨ 7/21 translocation heterozygote, male
- ◐ 7/21 translocation heterozygote, female
- 7/21 translocation homozygote, male
- 7/21 translocation homozygote, female
- Not investigated, female

Fig.2-14. Pedigree of the bulls with the 7/21 translocation S102, S104, S106 and S113.

結果、その祖父S 1 3 3がこの転座についてヘテロ個体であったことが確認できた。しかし、種雄牛S 1 2 0で見られた7/21転座が祖父由来のものであるのかどうかという点については十分な情報が得られず、その関係は明らかにすることができなかった。また、同じF系統の種雄牛S 1 3 4も、家系調査の結果から7/21転座ヘテロ個体であったことが確認できた。

一方、1/29転座については、この転座を保有する6頭の雌個体の家系調査を行った。その結果、P 1 1 1、P 1 1 2、P 1 1 3、P 1 2 1、P 1 2 2の5頭は種雄牛S 1 3 2の子供あるいは孫であることが分かった(図2-15)。この種雄牛S 1 3 2も既に廃用になっていたが、その娘牛7頭(P 1 1 4~1 2 0)について材料が得られたので核型を調査した。その結果、正常な雌の核型を示した個体はP 1 1 4、P 1 1 5、P 1 1 8、P 1 2 0の4頭で、残りのP 1 1 6、P 1 1 7、P 1 1 9の3頭は1/29転座ヘテロ個体であった。しかも、1/29転座を保有していたP 1 1 7の母親P 1 1 0の核型は、 $2n = 60, XX$ であったことから、種雄牛S 1 3 2は1/29転座ヘテロ個体であったことが明らかになった。

N県では、昭和40年代前半までは、種雄牛を比較的頻繁に他県から導入してきた経緯がある。S 1 3 2とS 1 3 1もそれぞれ我が国の代表的な種牛生産県である鳥取県と岡山県から導入した種雄牛であることから、1/29転座および7/21転座がこれらの2頭の種雄牛によってN県の集団に持ち込まれた可能性が大きい。しかし、N県では、明治時代に1/29転座の存在が報告されているブラウンスイス種やシンメンタール種を導入し、黒毛和種と交雑していることから、1/29転座はこれらの外国種によって直接N県の黒毛和種の集団に持ち込まれた可能性も考えられる。また、7/21転座を保有していたF系統の種雄牛S 1 3 3 (S 3 6.3.19生)、S 1 3 4 (S 3 9.1.7生)



- Normal male
- Normal female
- ⊠ 1/29 translocation heterozygote, male
- ⊗ 1/29 translocation heterozygote, female
- ▨ 7/21 translocation heterozygote, male

Fig.2-15. Pedigree of the bull with the 1/29 translocation S132.

は、昭和30年代後半にN県で生産された種雄牛であったことから、7/21転座はN県の集団にはS131が導入された昭和40年以前に既に存在していたものと考えられる。

4. 1/29転座および7/21転座保有個体の頻度

一般農家の飼養集団における1/29転座および7/21転座保有個体の分布状況を知るために、N県の農家で飼養されている雌牛を対象に核型調査を実施した。その結果は、表2-9に示すとおりで、394頭中52頭(13.2%)が転座保有個体であった。その内訳は、1/29転座保有個体が10頭(2.5%)、7/21転座個体が43頭(10.9%)であった。7/21転座個体の中、6頭はこの転座をホモに保有する雌牛であった。また、1頭は1/29転座と7/21転座の両者をそれぞれヘテロに保有する雌牛であった。転座保有個体の頻度をもとに推定した1/29転座および7/21転座染色体の頻度は、それぞれ1.3%と6.2%であった。

Table 2-9. Frequencies of the 1/29 and the 7/21 translocation carriers in the prefectural population N of the Japanese Black cows

Karyotype	No. of animals	Percentage
60,XX,Normal	342	86.8
59,XX,t(1q 29q)	9	2.3
59,XX,t(7q 21q)	36	9.1
58,XX,t(7q 21q) t(7q 21q)	6	1.5
58,XX,t(1q 29q) t(7q 21q)	1	0.3
Total	394	100.0

次に、7/21転座および1/29転座個体の出現状況と出生時期との関係について調査した。その結果を、図2-16に示した。7/21転座個体の頻度は、出生年次が昭和55年以前の雌牛の場合には13.0%（301頭中39頭）、これに対して昭和56年以降の雌牛では4.3%（93頭中4頭）であった。N県には、昭和40年代初めより7/21転座を保有する種雄牛が常時2~3頭おり、それらが人工授精に供用されてきた。7/21転座を保有していた雌牛の中の35頭（81.4%）は、7/21転座種雄牛S131、S133、S134、S102、S104、S120の娘牛であった。これらの6頭と残りのS106、S113の2頭の転座種雄牛は、昭和58年までに全頭が廃用になっている。現在、N県で人工授精に供用されている種雄牛については、核型を調査していないが、家系調査の結果では、7/21転座種雄牛を父もしくは祖父に持つ個体は、わずかに1頭繫養されているだけである。一方、1/29転座個体は、10頭中7頭がS132の子供で、昭和40年代半ばに生まれた雌牛であった。1/29転座を保有していた種雄牛S132は、昭和48年に廃用になっている。昭和54~58年に行った種雄牛の核型調査においては、1/29転座種雄牛は1頭も見られなかった。また、現在人工授精に供用中の種雄牛の中には、S132の血統を引き継ぐ個体はいない。このようなことから、N県の黒毛和種の集団においては、7/21転座および1/29転座保有個体の頻度は昭和56年（1981年）以降いずれも減少傾向にあるものと考えられる。

一方、1/29転座および7/21転座保有個体はM県やK県、Y県の集団においても認められた（表2-10）。また、これらの転座は、わずかな頭数ではあるが別の集団の調査においても観察されている（柘田ら、1978、1980；新里ら、1980；岡本ら、1981）。1/29転座や7/21転

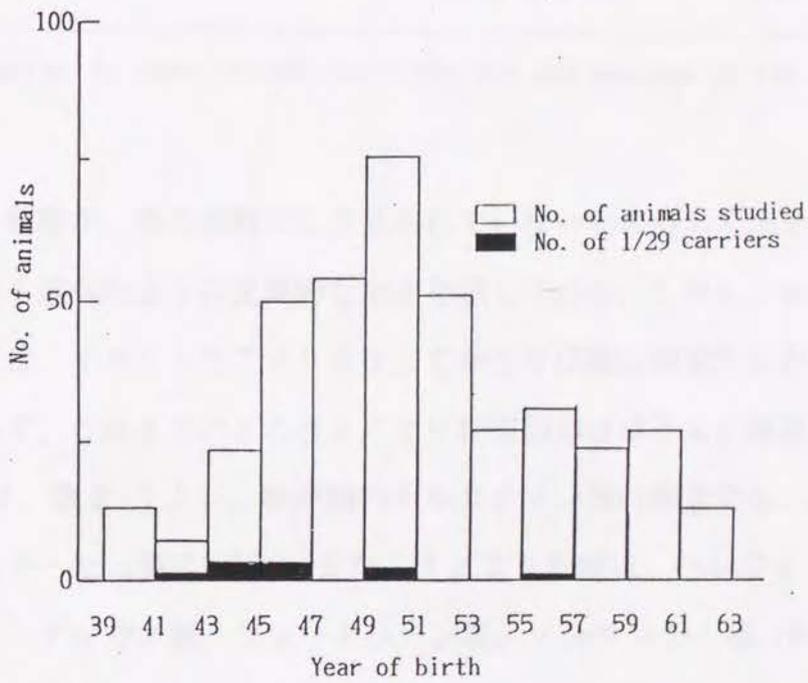
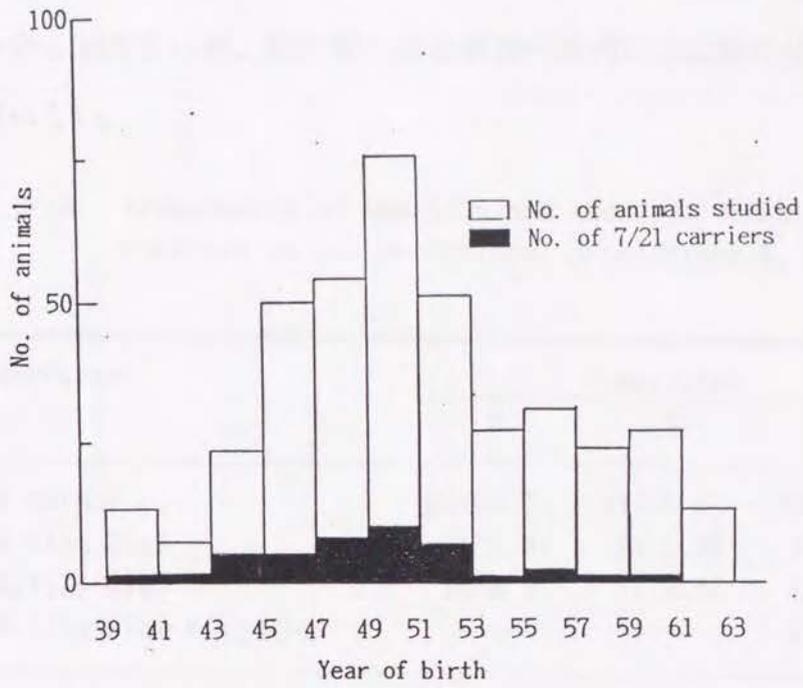


Fig. 2-16. Karyotype distribution according to year of birth.

座がN県の集団に持ち込まれた経緯を見ても、これらの2種類の転座は高い頻度ではないかも知れないが、我が国の黒毛和種の集団には広範に分布していることは間違いない。

Table 2-10. Frequencies of the 1/29 and the 7/21 translocation carriers in the prefectural populations M, K and Y

Karyotype	Population		
	M	K	Y
60, XX, Normal	54 (94.7)	41 (85.4)	99 (90.8)
59, XX, t(1q 29q)	1 (1.8)	3 (6.3)	2 (1.8)
59, XX, t(7q 21q)	2 (3.5)	4 (8.3)	7 (6.4)
58, XX, t(7q 21q) t(7q 21q)	—	—	1 (0.9)
Total	57	48	109

1) Figures in parentheses indicate the percentage of the carriers.

7/21転座が、黒毛和種でしか見られていないのに対して、1/29転座は、前節でも述べたように世界的な分布を示している。しかし、ホルスタイン種については、イギリスやアメリカなどでかなり広範な調査が行われているにもかかわらず、これまでのところ1/29転座個体はほとんど確認されていない(表2-4、表2-11)。我が国のホルスタイン種の調査でも、この転座は観察されなかった(表2-2)。また、1/29転座は、ヘレフォード種やアーディーンアンガス種、ショートホーン種、ノルマンダー種(Normandy)、ジャージー種(Jersey)でも認められていない。1/29転座保有個体の頻度は、一般の飼養集団において200頭以上の個体を対象に行った細胞遺伝学的調査結果では、0.2~20.6%、全平均で5.1%となっている(表2-11)

Table 2-11. Frequencies of the 1/29 translocation in breeds extensively studied (over 200 cattle sampled at random) in different geographical areas

Geographical area	Breed	No. of animals	No. of carriers	Frequency (%)	Reference
Australia	Hereford	602	0	0.0	Halnan (1976)
France	Limousin	231	13	5.6	Quéinnec et al. (1974)
	Aquitaine Blond	228	47	20.6	Quéinnec et al. (1974)
	Normandy	249	0	0.0	Popescu (1975b)
	Charolais	314	12	3.8	Popescu (1975b)
	F.F.P.N.	215	0	0.0	Popescu (1975b)
Germany	Holstein-Friesian	300	0	0.0	Bosma et al. (1987)
Great Britain	Holstein-Friesian	916	0	0.0	Harvey (1976)
Norway	Norwegian Red	430	18	4.2	Amrud (1969)
Sweden	Swedish Red & White	2117	284	13.4	Gustavsson (1969, 1971c)
Switzerland	Simmental	654	21	3.2	Tschudi et al. (1977)
	Swiss Brown	430	1	0.2	Tschudi et al. (1977)
USA	Holstein-Friesian	743	0	0.0	Fechheimer (1973)
	American Brown Swiss	224	3	1.3	Eldridge & Blazak (1975)
Japan	Japanese Black	394	10	2.5	Hanada et al. (1981, 1991)
Pool		8047	409	5.1	

)。今回調査を行ったN県の黒毛和種の集団における1/29転座保有個体の頻度は、多くの外国種についての調査結果と比較して著しく高い数値ではないし、最近は減少する傾向にある。

しかし、1/29転座について極端に高い頻度を示す例が Eldridge (1975) によって報告されている。それは、イギリスのブリティッシュホワイト種での成績で、任意に調査した52頭中41頭が1/29転座(原著では、1/27転座と記載されているが、原著者自身が他品種で報告されている1/29転座と同じであろうと述べているので、1/29転座として扱うことにする)を保有しており、それらの中の21頭はこの転座をホモに保有する個体であった。1/29転座をヘテロあるいはホモに保有する個体は、全体の78.8%にも達し、転座染色体の頻度は60%と非常に高率であった。このブリティッシュホワイト種は、イギリスで飼養されている家畜牛の中では、1973年の調査時点の全飼養頭数が495頭の小さな牛群であった。1/29転座が短期間にブリティッシュホワイト種の集団に拡がったのは、飼養頭数が極端に少なかったことに加えて、この転座をヘテロに保有する2頭の種雄牛を長期間連続して人工授精に使用したことが原因であった。また最近、ポルトガルのバロッサ種(Barrosa)でも染色体調査した195頭中127頭(67.1%)が1/29転座を保有していたことが報告されている(Rangel-Figueiredo & Iannuzzi, 1991)。今回調査を行ったN県やY県などの黒毛和種の集団の場合には、1/29転座だけでなく、7/21転座保有個体の頻度もこれまでのところ特に高くない。しかし、黒毛和種の育種改良は一般に都道府県単位の比較的小さな集団で進められており、しかも人工授精の普及率が非常に高いことから、今後これらの転座がブリティッシュホワイト種で見られたように短期間に黒毛和種の集団に拡がる可能性がないとも言えない。

このようなロバートソン型転座は、家畜ではウシの他にヒツジで広く分布していることが知られている。Bruèreらは、ニュージーランドの集団で3種類のロバートソン型転座を発見し、その分布状況や起源について研究している。その結果、ニュージーランドロムニー種 (New Zealand Romney) のMI転座は、1900年代初めに、MII転座 (8/11転座) はそれ以前に、それぞれイギリスから導入したロムニーマーシュ種 (Romney Marsh) によって持ち込まれたことが明らかにされており、その中には、MI転座やMII転座個体の頻度が20%以上の集団も見られている (Bruère et al., 1976, 1978)。また、ニュージーランドロムニー種をもとに改良されたニュージーランドドライスデール種 (New Zealand Drysdale) の調査では、MIII転座 (7/25転座) が327頭中82頭で観察されており、その頻度は26.3%と報告されている (Bruère et al., 1972)。これらの3種類の転座はいずれも繁殖性には関係ないことから、これまで長期間ニュージーランドの集団に保持されてきたものと考えられる。

一方、ウシにおける1/29転座の場合には、繁殖性の低下を引き起こすが (Gustavsson, 1971a; Dyrendahl & Gustavsson, 1979; Maurer & Vogt, 1988)、個体レベルでの影響は比較的小さく、転座保有個体の表現型は正常であるために、ヒツジの転座と同様にこれまで改良の過程で淘汰されずに世界の多くの品種に残存してきたものと考えられる。

緒 言

これまでの研究の結果、黒毛和種には1/29転座と7/21転座の2種類のロバートソン型転座が広く存在することが明らかになった。このようなロバートソン型転座は、マウスやヒトを初め家畜ではブタ、ヤギなどからも報告されている。この転座の場合、転座保有個体の表現型は正常で、一般に致死障害は認められない。しかし、転座ヘテロ個体では、減数分裂時に三価染色体が形成され、その後の分離のしかたによっては遺伝的に不均衡な配偶子を生じるために繁殖性への影響が問題になる。

ロバートソン型転座と繁殖性との関係については、マウスとヒツジで、多くの有用な情報が得られている。Gropp (1973) や Ford と Evans (1973a) は、タバコマウスと普通のマウスとの交配によって、T₄転座やT₆転座個体を作成し、それらの繁殖性について調査している。それらの報告によると、転座保有個体では、染色体の不分離の結果、モノソミーやトリソミーの胚が形成され、それらは出生前に死亡するために産子数の減少が認められている。また、ノルウェーで発見された青ギツネの23/24転座の場合も、同様の結果が得られている (Christensen & Pedersen, 1982; Mäkinen & Lohi, 1987)。一方、ヒツジのM I、M II、M III転座 (7/25転座) の場合、減数分裂時に不均衡型細胞は観察されているが (Chapman & Bruère, 1975)、産子数の減少など繁殖性への影響は認められていない (Bruère, 1974; Bruère & Chapman, 1974; Bruère et al., 1981)。これらの転座の場合、転座ヘテロ雄個体と正常核型の雌個体の交配によって得られた胚の染色体分析でも遺伝的に不均衡な胚は観

察されていないことから (Long, 1977)、不均衡型細胞は精子形成の過程で選択的に淘汰されるものと考えられている (Scott & Bruère, 1987)。

ウシにおいては、ロバートソン型転座は人工授精によって簡単に集団に拡散するので、繁殖性との関係の解明が非常に重要であるが、これまでのところ $1/29$ 転座で明らかにされているに過ぎない。 $1/29$ 転座の場合、精子形成過程で 10% 前後であるが高一倍体細胞が形成されており (Logue & Harvey, 1978; Popescu, 1978a)、胚の染色体分析においてモノソミーやトリソミー胚が観察されている (King et al., 1980, 1981; Popescu, 1980; Schmutz et al., 1991; Wilson, 1991)。これらの遺伝的に不均衡な胚は、受精後 90 日目頃までには死亡するので、転座保有個体では受胎率の低下が認められている (Gustavsson, 1971a; Refsdal, 1976; Dyrendahl & Gustavsson, 1979; Maurer & Vogt, 1988)。しかし、 $1/29$ 転座以外の転座の場合、転座保有個体の胚の染色体分析や繁殖記録の分析などは行われておらず、繁殖性との関連性についてはほとんど解明されていない。

本章では、黒毛和種における $7/21$ 転座と繁殖性との関係を明らかにするために、最初に $7/21$ 転座種雄牛の精子形成時の染色体分析を行い、転座染色体の分離様式について検討した。その結果、 $7/21$ 転座ヘテロ雄個体では、低率ではあるが染色体の不分離によって不均衡型細胞が形成されることが明らかになった。そこで、これらの細胞が受精し、遺伝的に不均衡な胚を形成するのか否かを知るために、正常核型の繁殖雌牛の卵子に転座ヘテロ種雄牛の精液を体外受精して得た胚の染色体分析を実施した。最後に、 $7/21$ 転座保有個体の精液性状や繁殖記録を分析し、これらの結果をもとに $7/21$ 転座と繁殖性との関連性について考察した。

第1節 7/21転座雄個体の精子形成過程における 染色体分析

第2章の研究で、N県の黒毛和種の集団には、7/21転座保有個体が10.9%と比較的高い頻度でもって見られることが分かった。本節では、7/21転座と繁殖性との関係についての基礎資料を得ることを目的として、この転座を保有する人工授精用種雄牛の精子形成過程における細胞遺伝学的分析を実施した。

材料および方法

1. 供試牛

N県の種雄牛センターに繋養されていた種雄牛S102、S104、S109、S120、S124、S125の6頭と農林水産省畜産試験場で人工授精に供用されていたS141、S142の2頭の計8頭を使用した(表3-1)。

2. 染色体標本の作製および染色体分析

精巣は、表3-1に示した8頭から屠殺時に採取し、重量を測定した後、染色体および組織標本用の材料とした。染色体標本の作製は、Evansら(1964)の方法に準じて行った。精巣の一部を2.2%クエン酸ナトリウム溶液中で細切、精細管内の細胞を押し出して得られた細胞浮遊液を遠沈管に移して1,000rpmで5分間遠心分離した。次に、上澄みを捨て、1.1%クエン酸ナトリウム溶液5mlを加えて室温で10~15分間低張処理した後、カルノア

液を 3 ml 加えて固定した。固定操作を 4 ~ 5 回繰り返した後、常法によって標本作製した。

精子形成過程の細胞遺伝学的分析は、精原細胞および第一、第二精母細胞の分裂中期像について行った。

Table 3-1. Age, body weight and testis weight of the normal bulls and the 7/21 translocation carrier bulls

Bull number	Karyotype ¹⁾	Age (Months)	Body weight (kg)	Testis weight (g)	
				Right	Left
S109	60,XY	51	884	331	320
S124	60,XY	93	894	318	280
S125	60,XY	138	870	410	401
S141	60,XY	107	—	—	290
S142	60,XY	123	921	296	292
S102	59,XY,t	117	—	320	335
S120	59,XY,t	156	848	318	341
S104	58,XY,t,t	75	1000	418	405

1)t:t(7q 21q).

3. 染色体の不分離率の推定

染色体の不分離率 (N. D.) を推定する場合、精母細胞の第二減数分裂中期細胞における不均衡型細胞、即ち高一倍体細胞 ($n + 1$) と低一倍体細胞 ($n - 1$) の両方の出現頻度から求める方法が一般に用いられている。しかし、高一倍体細胞と低一倍体細胞の出現頻度を見ると、低一倍体細胞のほうが数多く観察される傾向がある。高一倍体細胞と低一倍体細胞の出現頻度は本来等しいはずであり、低一倍体細胞の観察値の中には、染色体の不分離が原因ではなくて標本作製時の染色体の流失によって生じた細胞が含まれていると考えられる。低一倍体細胞の頻度をもとに、染色体の不分離率を推定した場合、それは過

大推定値となる可能性がある。従って、このような標本作製時に介在する誤差を考慮すると、染色体の不分離率は高一倍体細胞の頻度をもとに推定するのが適当と考えられる。そこで、本研究においては、染色体の不分離率は高一倍体細胞の出現頻度をもとに、Cattanach and Moseley (1973) が提示している次式によって推定した。

$$\text{N. D. (\%)} = \frac{2 \times \Sigma(n+1)}{\Sigma(n-1) + \Sigma n + \Sigma(n+1)} \times 100\%$$

結果と考察

精子形成過程における細胞遺伝学的分析の結果は、表3-2から表3-4、および図3-1から図3-4に示した。

正常核型の雄個体では、精原細胞の染色体数は体細胞の場合と同様で60本であった。第一減数分裂中期にある精母細胞では、相同染色体の対合によって30本の二価染色体が形成されていた(図3-1)。第二減数分裂の精母細胞の染色体構成は30, Yおよび30, Xで、染色体の数的、形態的異常は認められなかった。

一方、7/21転座をヘテロに保有する個体においては、精原細胞の染色体数は59本で、正常核型の雄個体では通常見られない大型の次中部着糸型染色体が認められた(表3-2、図3-2a)。第一減数分裂中期の精母細胞では、第7および第21染色体と7/21転座染色体の3本が対合して形成された鎖状などを呈する数種類の三価染色体が観察された(図3-2b, c, d)。第二減数

分裂中期の精母細胞の染色体数は29本と30本にモードが見られ(表3-3)、染色体数が29本の細胞では、7/21転座染色体が観察された(図3-3a)。第二減数分裂中期の精母細胞は253細胞中10細胞が不均衡型の高一倍体細胞であった(表3-4、図3-3b)。

7/21転座をホモに保有する個体においては、精原細胞の染色体数が58本であった(表3-2、図3-4a)。第一減数分裂では29本の相同染色体対が見られ、その中の1本は7/21転座染色体どうしの対合によって形成された大型の二価染色体であった(図3-4b)。第二減数分裂中期の精母細胞の染色体数は29本にモードがあり、これらの大部分の細胞では、7/21転座染色体が観察された(図3-4c)。第二減数分裂中期の39細胞中32細胞は、染色体構成が29,Y,tあるいは29,X,tの均衡型の精母細胞で、残りの7細胞はすべて低一倍体細胞であった(表3-3)。

なお、7/21転座ヘテロ個体やホモ個体と正常な核型の雄個体の精巣重量には、特に差は見られなかった(表3-1)。

Table 3-2. Cytogenetic analyses in spermatogonial cells and primary spermatocytes

Karyotype ¹⁾	No. of bulls	Spermatogonia					Diakinesis and first metaphase				
		No. of chromosomes					No. of chromosomes				
		57	58	59	60	61	27	28	29	30	31
60,XY	5			8	36	2		3	15	141	6
59,XY,t	2	1	3	18	1		1	10	81	3	
58,XY,t,t	1	2	8	1				7	29	2	

1) t:t(7q 21q).

Table 3-3. Cytogenetic analyses in secondary spermatocytes

Karyotype ¹⁾	No. of bulls	No. of chromosomes at second metaphase							
		Translocation identified				No translocation			
		27	28	29	30	28	29	30	31
60,XY	5					12	36	219	3
59,XY,t	2	3	15	96	4	6	17	115	6
58,XY,t,t	1		7	32					

1) t:t(7q 21q).

Table 3-4. Distribution of euploid and aneuploid cells, and the rate of non-disjunction

Karyotype ¹⁾	No. of bulls	NF/2			N.D. (%)
		29	30	31	
60,XY	5	36	219	3	2.3
59,XY,t	2	32	211	10	7.9
58,XY,t,t.	1	7	32		0

1) t:t(7q 21q).

2) NF(Nombre fondamental):No. of chromosome arms.

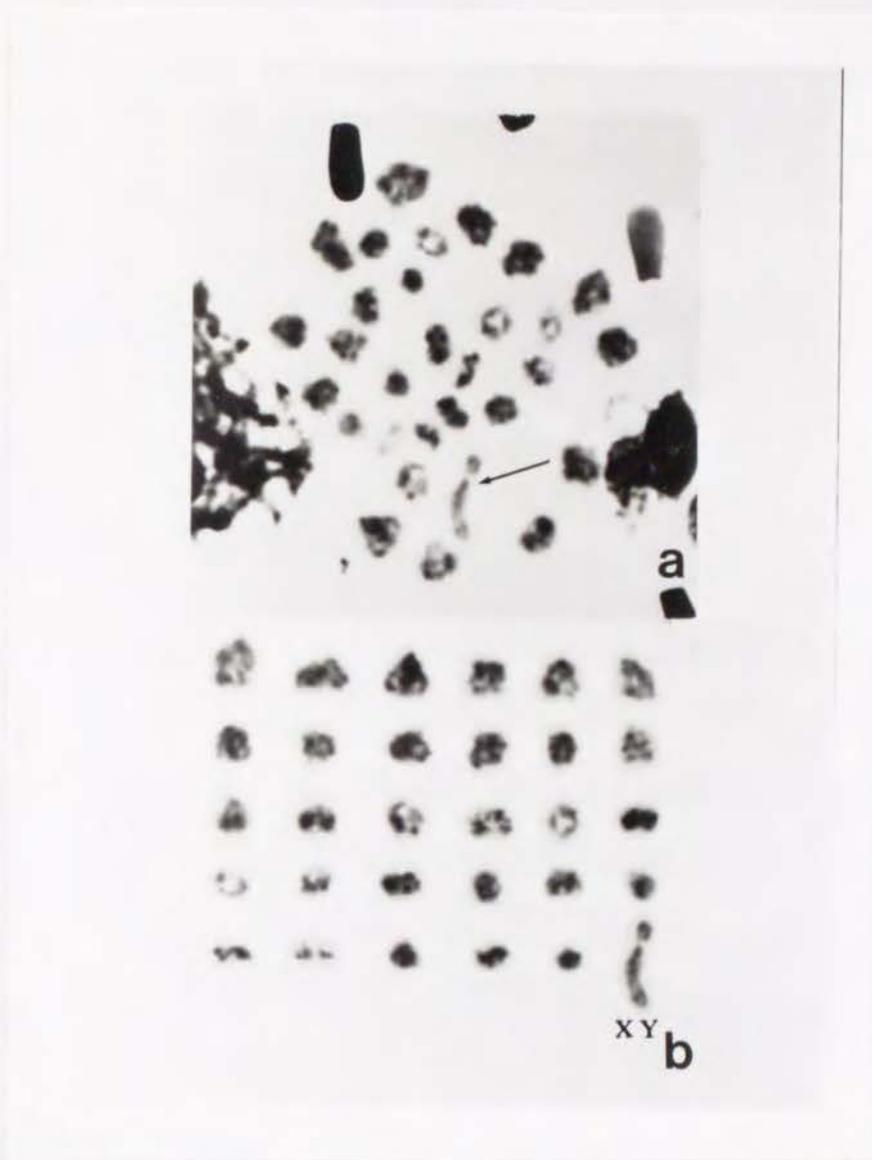


Fig. 3-1. Meiotic chromosomes of the normal bull. Arrow shows the sex bivalent. a: First metaphase. b: Karyotype.

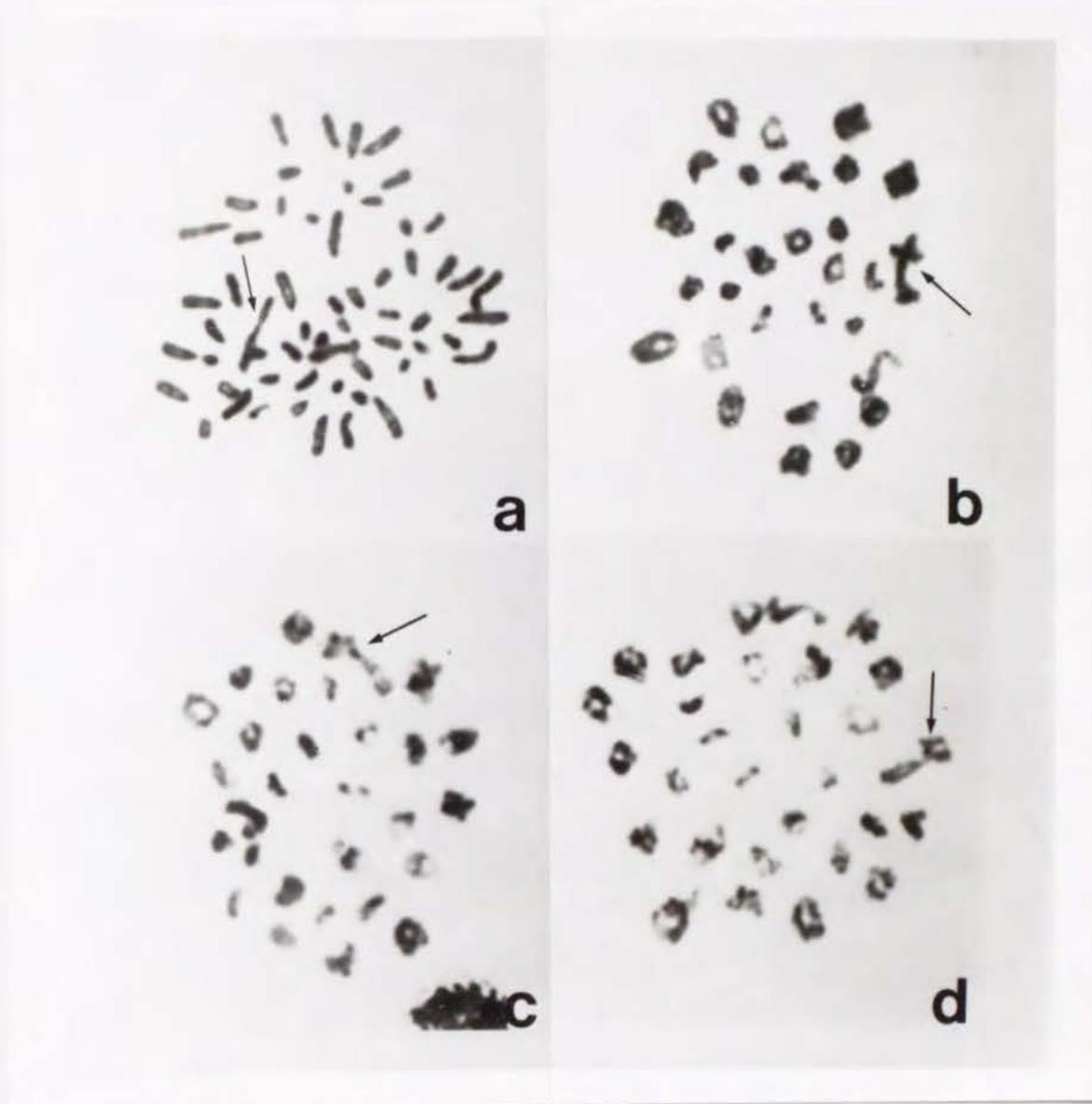


Fig. 3-2. Different stages in meiosis of the 7/21 translocation heterozygous bull. Arrow shows the 7/21 translocation or the trivalent configuration. a: Metaphase of a spermatogonial cell. b~d: Cells at diakinesis.

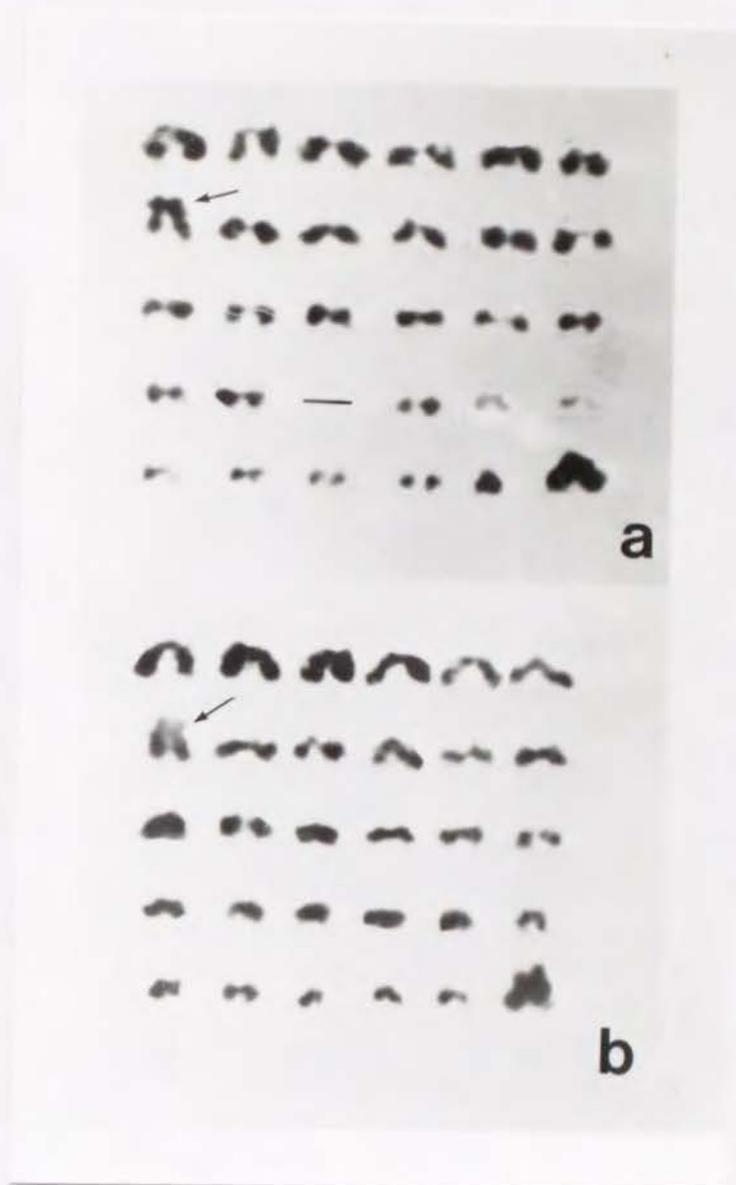


Fig. 3-3. Karyotypes of second metaphase in meiosis of the 7/21 translocation heterozygous bull. Arrow shows the translocation chromosome. a: Karyotype of balanced metaphase showing 29,X,t(7q 21q). b: Karyotype of unbalanced metaphase showing 30,X,t(7q 21q).

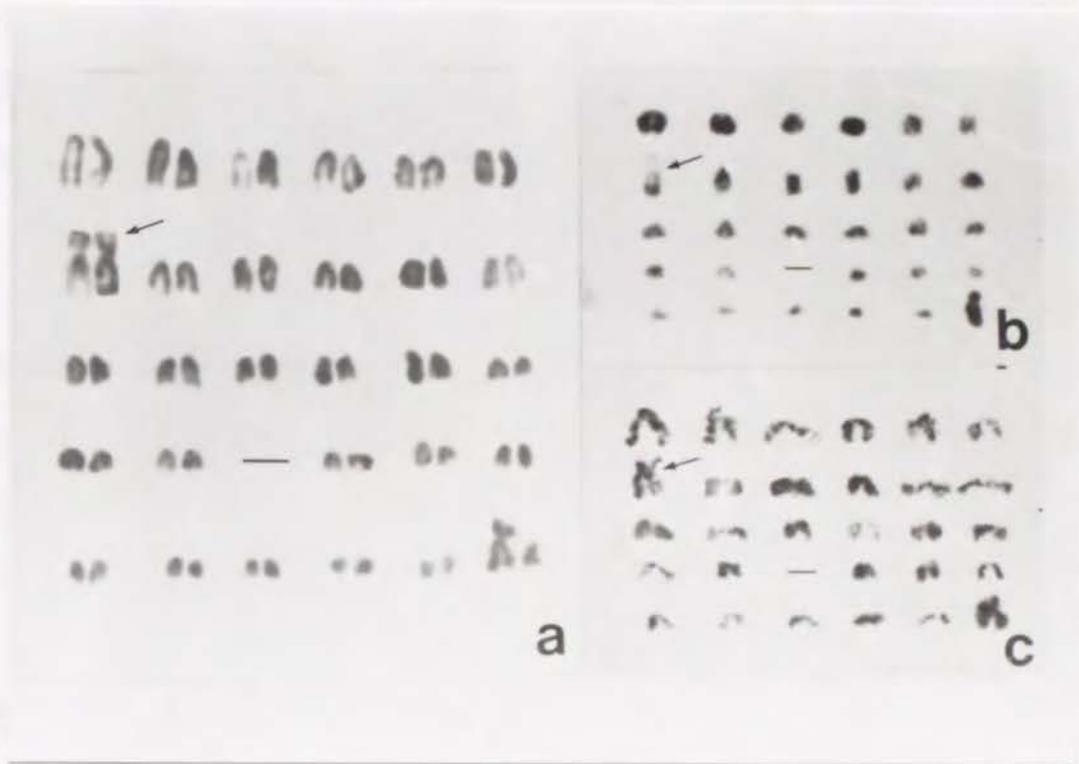
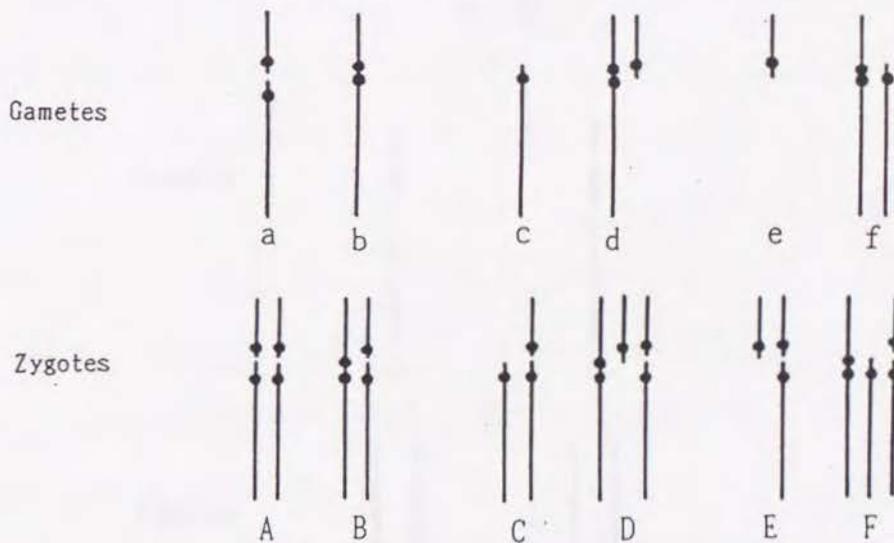
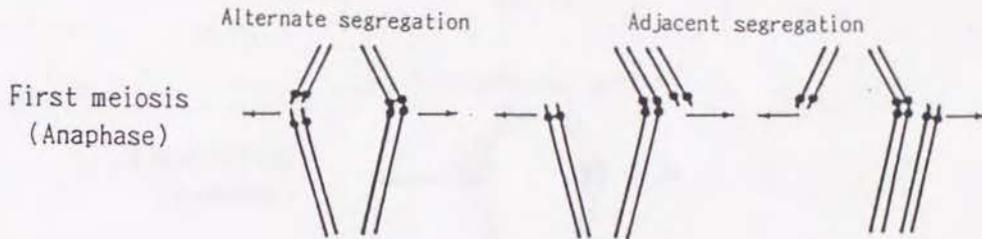
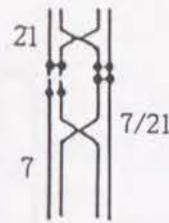


Fig. 3-4. Different stages in meiosis of the 7/21 translocation homozygous bull. Arrow shows the 7/21 translocation or the 7/21 bivalent. a: Karyotype of a spermatogonial cell. b: Karyotype of a cell at diakinesis. c: Karyotype of second metaphase showing 29, X, t(7q 21q).

7/21 転座ヘテロ個体の減数分裂時における第7ならびに第21染色体と7/21 転座染色体の対合と分離様式は、図3-5に模式的に示した。ロバートソン型転座の場合、転座ヘテロ個体においては、第一減数分裂の太糸期に転座していない2本の正常染色体と転座染色体が対合して三価染色体を形成するために、分裂後期の分離の過程で不均衡型細胞を生じる場合がある。第一減数分裂後期の動原体の極移動において、2本の染色体が一方の極に移動し、転座染色体が反対の極に移動するいわゆる交互分離によって配偶子が形成された場合、それらは全く遺伝子の過不足を伴わない正常型か均衡型の細胞になる。しかし、動原体の極移動において、染色体の不分離（隣接分離）現象が起こり、片方の相同染色体が転座染色体とともに同一極に移動した場合には不均衡型細胞となる。7/21 転座ヘテロ個体の場合、大部分が交互分離によって生じた均衡型の細胞であった。しかし、不均衡型細胞の中の高一倍体細胞が、正常個体に比較して高い頻度で観察されていることから、7/21 転座ヘテロ個体では、染色体の不分離現象が起きているものと考えられる。高一倍体細胞の頻度をもとに推定した染色体の不分離率（N. D.）は、正常雄個体で2.3%、7/21 転座ヘテロ雄個体で7.9%であった（表3-4）。この両者の差が、7/21 転座に起因するものと考えられ、転座ヘテロ個体では染色体の不分離によって形成された不均衡型細胞が受精に関与する場合には繁殖性への影響が問題になる。

一方、7/21 転座ホモ個体の分析では、高一倍体細胞は全く認められず、29, Y, t と 29, X, t の染色体構成を示す均衡型の細胞だけが図3-6のごとく形成されることが明らかになった。このようなことから、親が転座ホモ個体である場合には、転座染色体は必ず次世代に伝達される。しかし、遺伝的に不均衡な細胞は形成されないため、転座ホモ個体においては、繁殖性の低下は

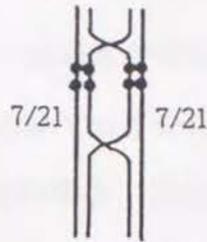
First meiosis
(Pachytene stage)



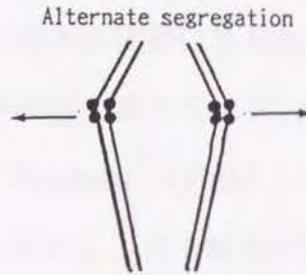
- | | |
|----------------------|--------------------------------------------|
| a: Normal gamete | A: Normal karyotype |
| b: Balanced gamete | B: Balanced karyotype (7/21 translocation) |
| c: Unbalanced gamete | C: Unbalanced karyotype (21 monosomy) |
| d: " | D: " (21 trisomy) |
| e: " | E: " (7 monosomy) |
| f: " | F: " (7 trisomy) |

Fig. 3-5. Different types of segregation of the trivalent in the 7/21 heterozygous bull, and the zygotic products after fertilization with a normal gamete. Arrow shows movement to the poleward direction of the centromere.

First meiosis
(Pachytene stage)



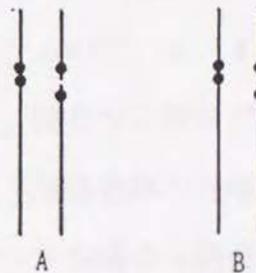
First meiosis
(Anaphase)



Gametes



Zygotes



a,b: Balanced gamete

A,B: Balanced karyotype
(7/21translocation)

Fig. 3-6. Segregation of the 7/21 bivalent in the homozygous bull, and the zygotic products after fertilization with a normal gamete. Arrow shows movement to the poleward direction of the centromere.

起きないことが分かった。

ウシでは、17種類のロバートソン型転座が報告されているが、転座ヘテロ雄個体の減数分裂は7/21転座を含めてわずかに4種類で調べられているだけである(表3-5)。7/21転座の場合、染色体の不分離は起こっているが、その頻度は、正常個体に比較して幾分高い程度であった。1/29転座の場合、研究者によって分析結果に若干の変動は見られるが、染色体の不分離率は7/21転座の場合と同様でそれほど高くなく6.4~11.2%と推定されている(Logue & Harvey, 1978; Popescu, 1978b)。一方、アルペングレイ種(Alpine Grey)で報告されている25/27転座の場合には、不分離率が46.7%と極端に高く、染色体の不分離が頻繁に起こっていることが明らかにされている(De Giovanni et al., 1980)。また、分析頭数が1頭で、わずか33個の細胞についての調査結果ではあるが、2/4転座の場合には不均衡型細胞は観察されていない(Pollock & Bowman, 1974)。相互転座(reciprocal translocation)の場合には、正常な分離が行われても半数は不均衡型細胞となるが、ロバートソン型転座の場合には、交互分離が行われれば正常型と均衡型の細胞だけが形成されることになるので、2/4転座のように不均衡型細胞が観察されない場合も考えられる。同じウシのロバートソン型転座であっても、その種類によって減数分裂時の三価染色体の分離様式や不分離率には明らかな違いが見られている。タバコマウスの場合も同様に、不分離率について4~28%という結果が得られている(Cattanach & Moseley, 1973)。これらの不分離率の差異は、トウモロコシなどの植物の場合には転座に関与する染色体の長さ、組換え(交さ)の位置や数などの違いによって生じるのではないかと考えられているが、このことがマウスやウシなどの高等動物の場合にも言えるのかどうかについては明らかでない。

Table 3-5. Comparison of non-disjunction rate in the 7/21 heterozygous bulls and the bulls carrying the other types of translocations

Trans- location	Breed	No. of animals	NF/2			N.D. ¹⁾ (%)	Reference
			29	30	31		
1/29	Charolais	3	48	313	12	6.4 (2.8)	Logue & Harvey(1978)
1/29	Limousin, Charolais	3	25	76	6	11.2	Popescu(1978a)
2/4	British Friesian	1	1	32	0	0	Pollock & Bowman(1974)
7/21	Japanese Black	2	32	211	10	7.9 (2.3)	Hanada & Muramatsu(1989)
25/27	Alpine Grey	1	27	55	25	46.7	De Giovanni et al.(1980)

1) Figures in parentheses indicate the rate of non-disjunction in normal bulls.

2) NF(Nombre fondamental): No. of chromosome arms.

ヒトの転座保因者の家系調査の結果では、遺伝的に不均衡な個体は父親よりも母親が保因者である場合に多く生まれている。ロバートソン型転座の保因者である母親が、不均衡型の子供を出産する確率は10～15%、父親が保因者の場合には3～5%と推定されている。相互転座の場合にも、母親で10～20%、これに対して父親では5～10%という結果が得られている (Hamerton et al., 1975; Jacobs et al., 1974)。また、第21トリソミーのダウン症児についても過剰染色体の由来が染色体の異型バンドを使って調査されているが、母親の染色体の不分離率は父親の約3倍であったことが明らかにされている (Hassold & Matsuyama, 1979)。マウスのT₄転座やT₆転座の場合にも、同様の結果が報告されている (Gropp, 1973)。ウシでは、Schmutzら (1991) が、1/29転座種雄牛と正常雌個体、正常核型を保有する種雄牛と1/29転座雌個体の交配から得た胚の染色体分析を行っている。その結果では、不均衡型の染色体構成を持つ核型の頻度は、前者で20%、後者で30%となっており、雌が1/29転座を保有している場合には不分離率は高く、繁殖性への影響も大きいことが示されている。このように染色体の不分離率には性差が見られているが、これは雄では精原細胞の分裂が常時繰り返され、第一減数分裂と第二減数分裂が連続して行われているので、不均衡型細胞が雌に比べて形成されにくいのではないかと考えられている。7/21転座ヘテロ雌個体の卵子形成時の染色体の不分離率については調査していないが、これまでのヒトやマウスにおける研究結果から見て、精子形成時の5～10%よりは高いものと考えられる。

1/29転座やマウスのT₄転座においては、転座染色体の不分離の結果生じた不均衡型細胞は受精して胚を形成するが (Gropp, 1973; King et al., 1980, 1981; Popescu, 1980; Maurer & Vogt, 1988)、遺伝的に不均衡な胚は発

生の過程で死亡するので、繁殖性の低下が起こることが明らかにされている (Gustavsson, 1969, 1971a; Refsdal, 1976; Dyrendahl & Gustavsson, 1979)。
一方、ヒツジのMI、MII、MIII転座では不均衡型の細胞は形成されるが (Chapman & Bruère, 1975)、繁殖性への影響は認められていない (Bruère, 1974; Bruère & Chapman, 1974; Bruère et al., 1981)。転座ヘテロ雄個体と正常な核型を示す雌個体の交配において遺伝的に不均衡な胚は観察されていないことから (Long, 1977)、これらの転座の場合には、不均衡型細胞は精子形成過程で選択的に淘汰されるものと考えられている (Scott & Bruère, 1987)。
7/21転座ヘテロ個体において、染色体の不分離の結果生じた細胞が、1/29転座の場合と同様に受精して不均衡型の胚を形成し、繁殖性の低下を招くかどうかについてさらに詳しく調べていくために次節で胚の染色体分析を試みた。

第2節 7/21 転座由来の初期胚の染色体分析

7/21 転座種雄牛の精子形成過程における染色体分析の結果、転座ヘテロ雄個体では、第一減数分裂において三価染色体が形成され、染色体の不分離によって遺伝的に不均衡な細胞が低率であるが生じることが明らかになった。しかし、それらが受精に関与し、繁殖性の低下を招くかどうかについては結論が得られていない。本節では、7/21 転座と繁殖性との関係について直接的な証拠を得るために、正常な核型の雌牛の卵子に転座ヘテロ種雄牛の精液を体外受精して得られた4～8細胞期の初期胚の染色体分析を試みた。

材料および方法

1. 未成熟卵子の採取

卵巣は、屠場で繁殖雌牛から屠殺時に採取し、37°Cに保温した滅菌生理食塩水の中に保存して実験室に持ち帰った。これらの卵巣は、生理食塩水で数回洗浄した後、卵巣表面の直径5mm以下の卵胞に18ゲージの注射針を刺して、卵胞液とともに注射器で未成熟卵子を吸引採取した。採取した未成熟卵子は、ダルベッコ修正リン酸緩衝液で洗浄した後、実体顕微鏡下で卵丘細胞層に包まれた卵子を選び、その後の実験に供した。なお、これらの雌牛については、屠殺前に採血し、核型分析も併せて行った。

2. 卵子の成熟培養

直径35mmのプラスチックシャーレに、滅菌パラフィンオイルで覆った体

体外成熟培地の小滴 ($100\mu\text{l}$) を作り、それぞれの小滴に4~5個の卵子を配置し、 39°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下の炭酸ガス培養装置中で24時間成熟培養を行った。体外成熟培地としては、 10% 非動化牛胎児血清、ペニシリン $100\text{IU}/\text{ml}$ 、ストレプトマイシン $0.1\text{mg}/\text{ml}$ 、それに卵胞刺激ホルモン $0.2\text{AU}/\text{ml}$ を含む 25mM ヘペス緩衝TCM199アール塩培地を用いた。

3. 精子の処理

体外受精には、正常核型を有する種雄牛S501と7/21転座ヘテロ個体であった種雄牛S120の精液を用いた。これらの個体の 0.5ml ストロー凍結精液2本を 37°C 湯浴中で融解し、 10mM カフェインを含む Brackett and Oliphant 液 (BO液) で2回洗浄した後、 $25\times 10^6/\text{ml}$ 濃度に調整した。これを $20\text{mg}/\text{ml}$ 牛血清アルブミン、 $10\text{IU}/\text{ml}$ ヘパリンを含むBO液で等倍に希釈した後、プラスチックシャーレ内のパラフィンオイル下の $100\mu\text{l}$ 小滴とし、30分間前培養を行った。

4. 媒精および体外受精卵の初期発生

媒精は、前培養後の精子懸濁小滴中に体外成熟した卵子を加え6時間行った。媒精が終了した卵子は、 10% 非動化牛胎児血清、 0.5mM ピルビン酸ナトリウム、 $3.5\mu\text{l}/\text{ml}$ 乳酸ナトリウムを含む 25mM ヘペス緩衝TCM199アール塩培地 $100\mu\text{l}$ 小滴中に移し、 39°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下でさらに30時間継続培養した後、4~8細胞期の胚を染色体分析した。

5. 胚の染色体分析

胚の染色体標本の作製は、図3-7に示すような手順で行った。染色体分析に用いる媒精30時間後の4~8細胞期の胚を、 $0.06 \mu\text{g}/\text{ml}$ ビンブラスチン・ポドフィロトキシンを添加した培養液に移し、さらに14時間培養した。得られた胚は、プロムナーゼで透明帯を脆弱化した後、1%クエン酸ナトリウム溶液に移し、室温で1時間低張処理を行った。固定は順次氷酢酸濃度を高めながら第3次固定まで行い、空気乾燥法によって標本を作製した後、2%ギムザ液で染色し、顕微鏡標本とした。

結果と考察

初期胚の染色体分析は、正常な核型を有する種雄牛と7/21転座ヘテロ種雄牛の精液を体外受精して得られたそれぞれ53個と87個について行った。その結果、それぞれ21個と37個の胚で核型分析のできる分裂像が得られた。これらの胚の核型分析の結果は、表3-6に示すとおりである。正常な核型を有する種雄牛の精液を体外受精して得られた胚の染色体構成は、いずれも正常で、60,XYもしくは60,XXであった。7/21転座ヘテロ個体の精液を体外受精した場合も、核型分析が可能であった37個の初期胚のうち35個は、正常な核型もしくは7/21転座をヘテロに持つ均衡型の胚であった。しかし、残りの2個は染色体数が60本で、その中の1本が7/21転座染色体と見られる遺伝的に不均衡な胚であった。これらは異なる雌牛由来の胚であり、核型は60,XY,tと60,XX,tであった(図3-8)。

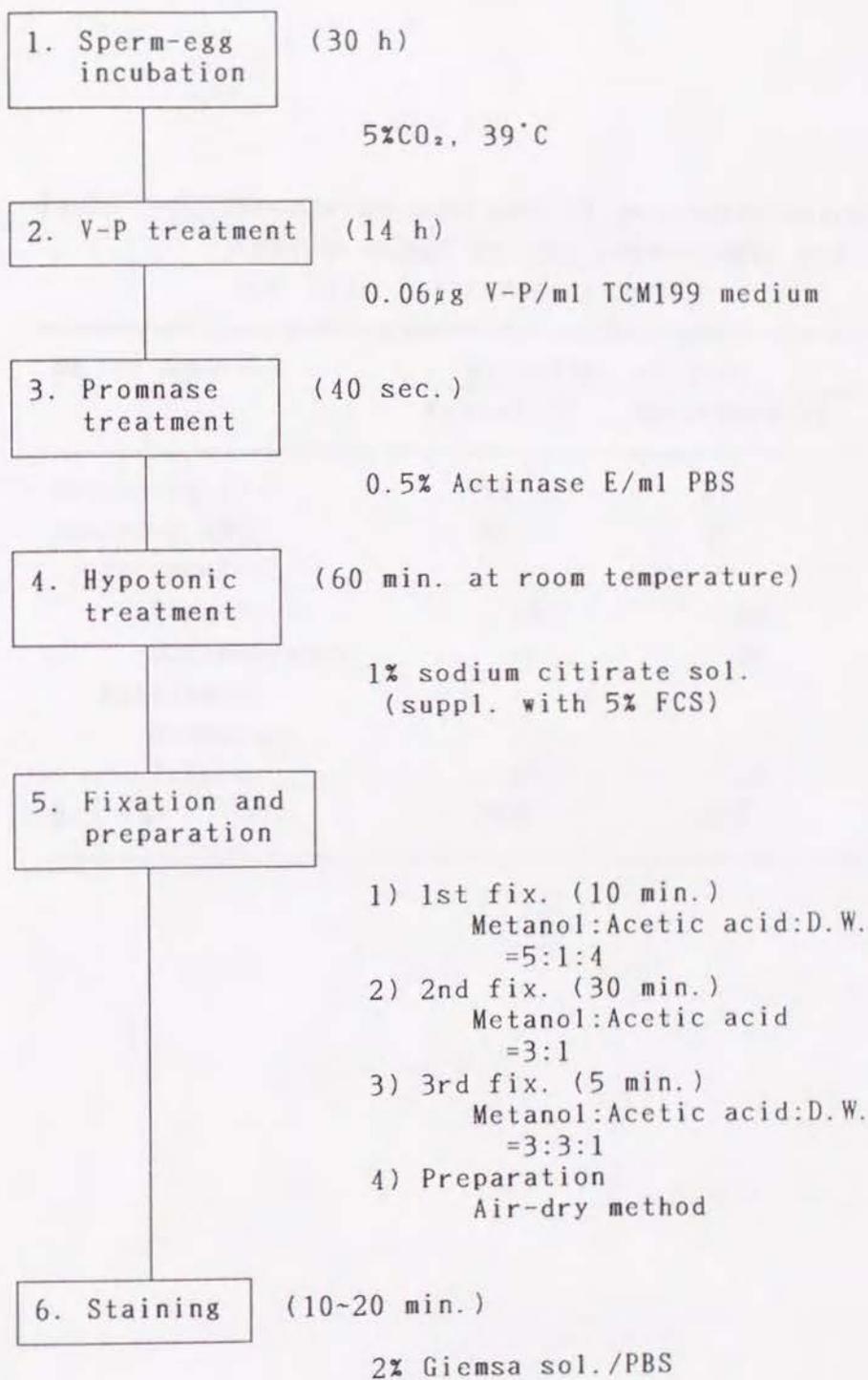


Fig. 3-7. Method for chromosome preparation from 4~8 cell bovine embryos.

Table 3-6. Chromosome analyses of preimplantation embryos sired by the normal bull and the 7/21 heterozygous bull

No. of embryos	Karyotype of sire	
	Normal	Heterozygote
Proceeded (A)	53	87
Analyzed (B)	21	37
Balanced		
Normal	21	19
Heterozygous	—	16
Unbalanced		
Monosomy	—	—
Trisomy	—	2
B/A (%)	39.6	42.5

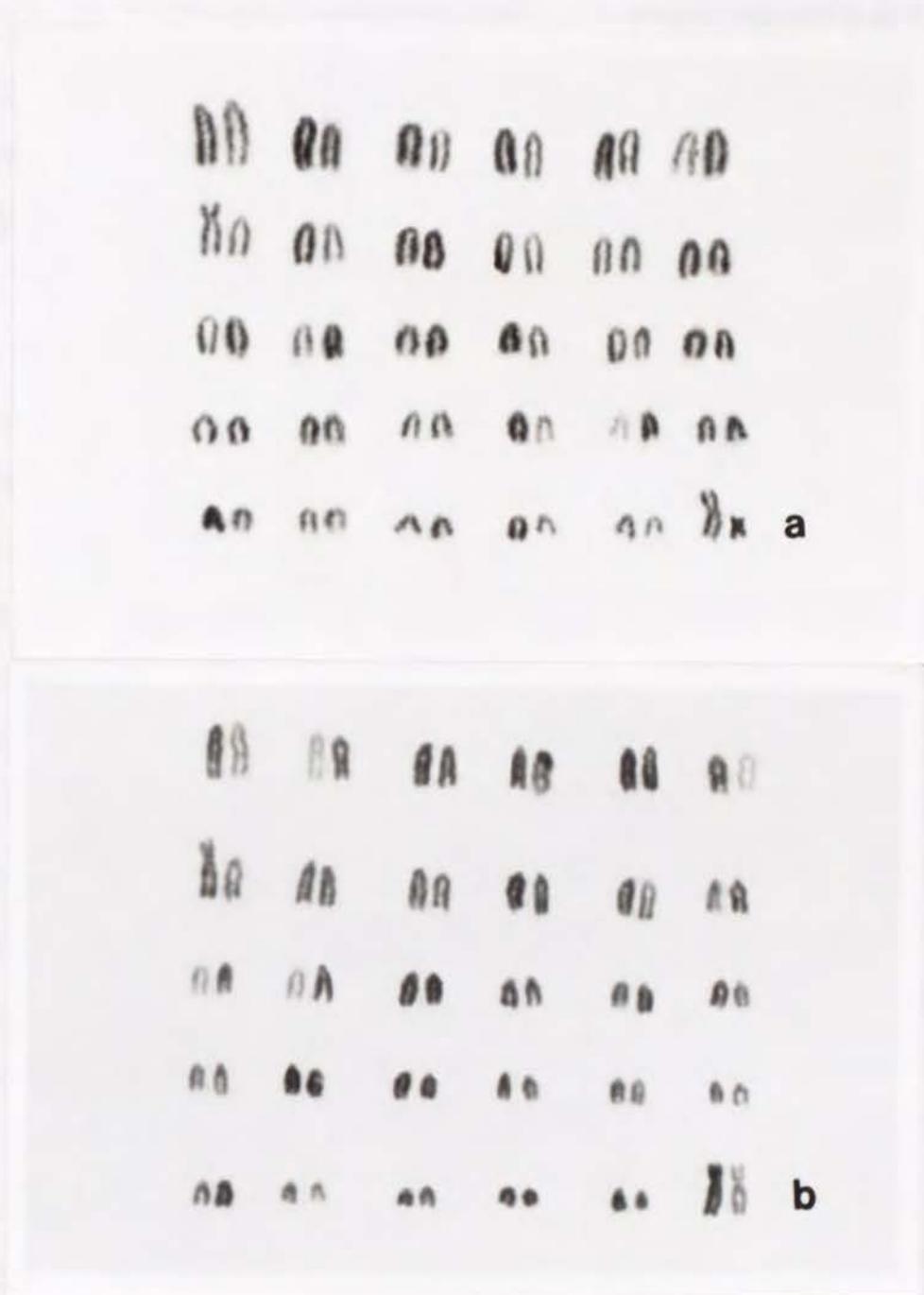


Fig. 3-8. Karyotype of embryos sired by the bulls heterozygous for the 7/21 translocation. a: $2n=60, XY, t$; b: $2n=60, XX, t$.

ウシでは、1/29 転座保有個体由来の胚について染色体分析が行われており、表3-7のような結果が得られている。Kingら (1980, 1981) は、正常核型の雌牛に1/29 転座ヘテロ種雄牛の精液を人工授精した後、屠殺ならびに非外科的手法によって採取した1~7日目の88個の初期胚について染色体分析を行っている。その結果、38個の胚で分裂像が得られ、その中の2個(5.3%)は第1染色体トリソミーの不均衡型の胚であったことを明らかにしている。また、Popescu (1980) は、人工授精後、過排卵処理によって得た13日目の胚について染色体分析を行ったところ、52個中2個(3.8%)が染色体数59本の第1染色体モノソミーであったことを報告している。Schmutzら (1991) は、1/29 転座雌個体と正常雌個体に過排卵処理を行った後、前者には正常雄個体、後者には1/29 転座雄個体を交配して得た7日目の胚の核型を調査している。それによると、雄が1/29 転座個体の場合には分析可能であった25個の胚の5個(20%)、雌が1/29 転座個体の場合には10個の胚の3個(30%)が $2n=60, t$ や $2n=59$ などの染色体構成を持つ遺伝的に不均衡な胚で、その頻度は正常個体どうしの交配に比べて高くなっている。また、1回の過排卵処理によって得られた平均採卵数も正常雌個体の7.4個に比べて、1/29 転座雌個体では4.4個と有意に少なくなっている。しかし、これは前者が雑種、後者が純粋種であるシャロレー種の成績であったことから、排卵数の減少を1/29 転座によるものと結論することには問題があるようである。一方、ヒツジのM1転座の場合、減数分裂時に不均衡型細胞は形成されるが (Chapman & Bruère, 1975)、初期胚の染色体分析では遺伝的に不均衡な胚は認められていない (Long, 1977)。この転座の場合には、染色体分析によって生じた不均衡型細胞は精子形成過程で選択的に淘汰されるものと考えられている (Scott & Bruère, 1987)。

Table 3-7. Occurrence of aneuploid preimplantation embryos sired by Robertsonian translocation heterozygous bulls

Karyotype of sire	Age of embryos (Days)	Number of embryos							A/B (%)	Reference		
		Proceeded (A)	Analyzed (B)	Balanced		Unbalanced						
				Normal	Hetero.	Monosomy	Trisomy	Others				
7/21	3	87	37	19	16			2	42.5	Present data		
1/29	13	123	52	50				2	42.2	Popescu(1980)		
1/29	1~15	88	38	21	15			2	43.2	King et al.(1981)		
1/29	7	221	25	11	9			2	1	2	11.3	Schmutz et al.(1991)
1/29	6~8	163	42	39				2	1		41.1 ¹⁾	Wilson(1991)
Normal	3	53	21	21							39.6	Present data
Normal	13	24	11	11							45.8	Popescu(1980)
Normal	1~15	28	17	17							60.7	King et al.(1981)
Normal	7	31	4	4							12.9	Schmutz et al.(1991)
Normal	6~8	—	25	25							— ¹⁾	Wilson(1991)

1) Results on embryos sired by the 1/29 translocation bulls and bulls with a normal karyotype.

本試験においては、2個であったが遺伝的に不均衡な胚が確認された。正常個体の卵子形成過程における染色体の不分離率は、一般に非常に低いことから (Popescu, 1980; King et al., 1981)、これらの胚は正常な染色体構成を持つ卵子に転座種雄牛由来の高一倍体の雄性配偶子が受精して形成されたものと考えられる。黒毛和種の一般飼養集団の細胞遺伝学的調査においては、第7染色体と第21染色体のモノソミーやトリソミーは観察されていないことから、これらの7/21転座染色体由来の不均衡型の胚は出生前に消失するものと考えられる。

ウシのロバートソン型転座の場合、染色体の不分離によって生じた遺伝的に不均衡な胚が、受精後のどの時期に死亡するのかについては明確な結論は得られていない。ただ、Linares ら (1980a) は、正常核型の種雄牛と1/29転座ヘテロ種雄牛の精液を人工授精して得た胚の発育状況を調査した結果、後者のほうが発育の遅い胚の割合が有意に高かったことを報告している。1/29転座由来の胚では、後期桑実胚の時期で胚の発育が悪くなり、胚盤胞になる前に退化が始まり死亡するのではないかと考えられる (Linares et al., 1980b)。一方、Gustavsson (1969, 1979) や Refsdal (1976) は、正常な核型を持った種雄牛と1/29転座ヘテロ種雄牛の娘牛の繁殖記録を分析した結果、両者の発情再帰率の差は人工授精後90日目まで有意に増加しており、後者のほうが5~7%高かったことを報告している。これらの結果は、1/29転座による胚の死亡が、着床前から着床後かなり日齢を経過した段階においても起こっていることを示している。このような胚の死亡時期の差は、染色体構成の違いによって生じるものと考えられている。Gropp (1973) や Ford と Evans (1973a) は、7対のロバートソン型転座を持ったタバコマウス ($2n=26$) と普通のマウス ($2n=40$) とのF₁を普通のマウスに戻し交配して得た胚の

染色体分析を試みている。それによると、トリソミーは15日目までは見られたが、モノソミーは7日目にはほとんど観察されていない。また、Epstein と Travis (1979) は、転座雄個体と正常雌個体の交配から得られた胚の染色体分析を行ったところ、3日目までは第19染色体モノソミーとトリソミーがほぼ同じ割合で見られたが、4日目には前者が後者の半数以下であったことを報告している。ヒトの自然流産児の染色体分析においても、トリソミーは0.01%前後の頻度で持って見られるのに対して、モノソミーはほとんど確認されていない (Boué J. & A. Boué, 1973; Kajii et al., 1978)。これらの結果は、モノソミーとトリソミーとでは一般に前者のほうがかなり早い時期に死亡することを示唆している。ウシのロバートソン型転座の場合も、モノソミーは大部分が着床前の11~13日目までに死亡するものと考えられる。一方、トリソミーは着床後も生存し続けるが、1/29転座保有個体の繁殖記録の分析結果から見て、受精後90日目頃までにはほとんどが失われるものと考えられる。7/21転座と胚死亡との関係について、さらに詳しい情報を得るために反復実験を行い、引き続き7/21転座由来の胚の発育状況や染色体異常の発生状況などを調査中である。

第3節 7/21転座保有個体の繁殖成績と体尺

測定値の分析

前節までの研究において、7/21転座ヘテロ個体では、減数分裂時に不均衡型の生殖細胞が形成されることが明らかになった。1/29転座の場合、それらの細胞は遺伝的に不均衡な胚を形成し、受精後90日目頃までに死亡するために繁殖性の低下が見られる。また、タバコマウスと普通のマウスとのF₁においては、精液量の減少など造精機能への影響も認められている(Cattanach & Moseley, 1973)。本節では、7/21転座保有雄個体の精液性状や転座雌個体の繁殖記録を分析し、7/21転座と繁殖性との関連性について検討した。また、7/21転座保有個体の登録時の体尺測定値やこの転座を保有する種雄牛の娘牛の体型審査得点についても調査した。

材料および方法

1. 精液性状の検査

供試牛は、N県の種雄牛センターに繋養されていた種雄牛19頭であった。その内訳は、正常な雄の核型を示す個体が14頭、7/21転座をヘテロおよびホモに保有する個体がそれぞれ4頭と1頭であった。これらの種雄牛は、産肉能力検定（直接法および間接法）で増体能力、飼料効率、ならびに肉質について選抜された個体であった。

精液は、熟練した技術者が人工腔法（横取法）によって原則として週2回の頻度で採取した。精液の検査は、射精量および精子濃度、水素イオン濃度、奇

形率、採取直後と凍結1日目の精子生存率について行った。精液性状は、個体の年齢、栄養条件など遺伝以外の要因によっても影響を受けるので、正常核型の個体と7/21転座を保有する個体の精液性状を比較する場合には種雄牛を生年月日によって第I群(調査時の平均年齢4歳7カ月)、第II群(平均5歳9カ月)、第III群(平均2歳7カ月)に分け、それぞれの群内において成績の比較を行った。今回分析に用いたのは、第I群が昭和50年度、第II群と第III群が昭和56年度の3~8月の成績であった。

2. 精巢の組織標本の作製

精巢の組織学的検査は、正常な核型を保有していた種雄牛S109、7/21転座ヘテロ個体S120およびホモ個体S104の3頭について行った。精巢は、すべて屠殺時に採取し、重量を測定した後、その一部を厚さ2~3mmに細切し、Bouin氏液(飽和ピクリン酸水溶液15量:ホルマリン5量:氷酢酸1量)に固定、組織検査材料とした。その後、常法に従って水洗、アルコールによる脱水を行った後、パラフィンに包埋し、組織切片を作製した。染色はヘマトキシリン・エオシン二重染色法(HE染色法)によって行い、バルサムで封入した後、顕微鏡組織標本とした。

3. 雌牛の繁殖記録の分析

繁殖成績の調査には、正常雌個体202頭と7/21転座ヘテロ雌個体61頭、および正常核型を保有していた種雄牛の娘牛396頭と7/21転座種雄牛の娘牛344頭、1/29転座ヘテロ種雄牛の娘牛82頭の合計1,085頭の繁殖記録を用いた。分析は、1~5産目の日齢、分娩間隔、産次数について行った。正常雌個体89頭と7/21転座ヘテロ雌個体34頭については、

分娩後の発情再帰日数と受胎当りの授精回数も分析した。なお、4産目までの平均分娩間隔が730日を越えていた個体は、予め分析から除外した。平均値の比較はステューデントのt-検定によって行った (Snedecar & Cochran, 1976)。

4. 体尺測定値と体型審査得点の分析

体尺測定値と体型審査得点の分析には、正常雌個体178頭と7/21転座雌個体51頭の基本登録もしくは本原登録時の記録を用いた。分析に用いた体尺測定値は、体高、胸囲、胸深、臍幅の4形質であった。また、正常核型と7/21転座種雄牛の娘牛の審査得点の分析には、合計1,136頭の娘牛の記録を用いた。

結果と考察

1. 精液性状および精巢の組織学的検査成績

精液性状についての分析結果は、表3-8に示すとおりであった。正常な核型を示した種雄牛の成績は、第I群と第II群の場合、精液量が約6ml、精子数が12.5億/ml以上、射精当りの精子数も約80億で良好な精液性状を呈していた。また、奇形率も8.3~8.8%と低く、活力も正常であった。第III群の場合には、種雄牛の平均年齢が2歳7カ月と若齢であったために、精液量や精子数が他の2群の結果に比較すると幾分少なかった。これらは、3~8月の成績であり、一般に黒毛和種で報告されている分析値と同等もしくはそれ以上であった。

Table 3-8. Semen characteristics of the normal and the 7/21 translocation carrier bulls

Semen characteristic	Group I			Group II	
	Normal bulls	Carriers		Normal bulls	Carrier
	Mean(n=5)	S102	S120	Mean(n=5)	S104
Age (Year-Month)	4-7	6-1	4-3	5-9	4-3
Vol. of ejaculates (ml)	6.0	6.1	6.9	6.4	6.3
Concentration (millions/ml)	1,311	1,421	1,266	1,251	1,293
No. of spermat./ejac. (millions)	7,866	8,668	8,735	8,006	8,146
pH of semen	6.45	6.47	6.45	6.47	6.55
Abnormal sperm (%)	8.3	7.9	7.5	8.8	9.1
Mortality before freezing (%)	83.3	84.7	82.8	79.4	69.3
Mortality after freezing (%)	43.9	44.1	41.8	42.1	37.4

1) The period of studies on semen characteristics. (Group I: 1975.3-8., Group II and Group III: 1981.3-8.).

Table 3-8. cont.

Semen characteristic	Group III		
	Normal bulls	Carriers	
	Mean(n=4)	S106	S113
Age (Year-month)	2-7	2-9	2-8
Vol. of ejaculates (ml)	5.6	4.9	5.1
Concentration (millions/ml)	1,211	1,263	1,239
No. of spermat./ejac. (millions)	6,782	6,189	6,319
pH of semen	6.51	6.47	6.50
Abnormal sperm (%)	7.5	11.1	8.4
Mortality before freezing (%)	77.7	81.8	78.9
Mortality after freezing (%)	41.1	41.9	40.6

7/21 転座をヘテロあるいはホモに保有する種雄牛の精液量および精子数、射精当りの精子数、水素イオン濃度は、正常核型を示す種雄牛の成績と特に変わらなかった。ただ、種雄牛 S106 では、精子奇形率が 11.1% と正常核型の種雄牛の頻度 7.5% の約 1.5 倍であった。しかし、この値は黒毛和種における平均値 10.7% に比べるとわずかに高い程度であった。ウシでは、一般に奇形率が 15~20% になると受胎率に影響が出始めると言われているが、S106 における 11% 前後の成績であれば特に問題にはならないものと考えられる。また、7/21 転座をホモに保有していた S104 においては、精子生存率が液状精液で 69.3% と幾分低かった。しかし、この種雄牛の前年および翌年の同じ時期の生存率はそれぞれ 85.4% と 79.8% であったことから、ここで見られた生存率の低下は 7/21 転座とは関係なく別の原因によるものと推察される。

次に、正常核型の種雄牛、および 7/21 転座をヘテロあるいはホモに保有する種雄牛の精巢の組織学的検査結果を、それぞれ図 3-9 から図 3-11 に示した。いずれの転座個体の精細管にも、精祖細胞から精子に至るまでの精子形成過程におけるすべての細胞が観察され、組織像は正常な核型を示す種雄牛のものと変わらなかった。また、7/21 転座を保有する個体の性欲は、正常な核型の種雄牛と全く変わらなく活発なもので、性行動にも特に異常は認められなかった。

1/29 転座の場合、それを保有する種雄牛の精巢の組織像は正常であり (Gustavsson, 1969)、性行動や精液性状、凍結後の精子生存率にも特に異常は認められておらず (Logue & Harvey, 1978; Dyrendahl & Gustavsson, 1979)、受精率についても正常個体と変わらない成績が得られている (Schmutz et al., 1991)。また、ヒツジの M I、M II、M III 転座の場合にも、精液性状や

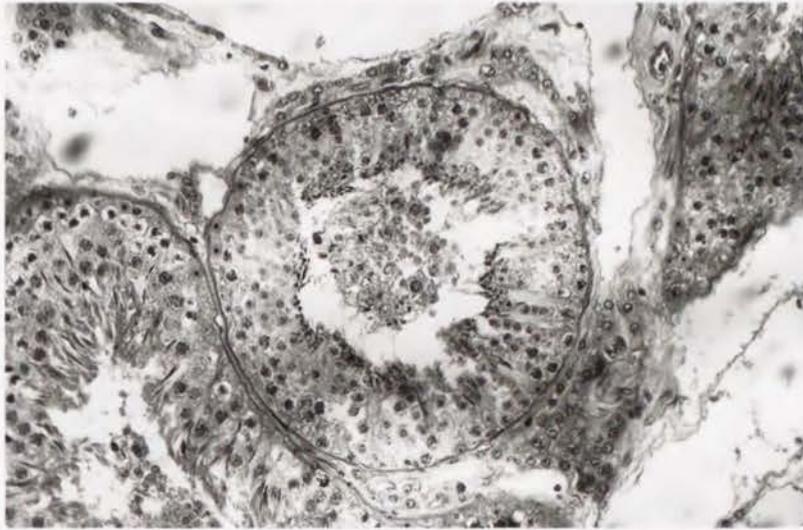


Fig. 3-9. Testicular histology of the normal bull.

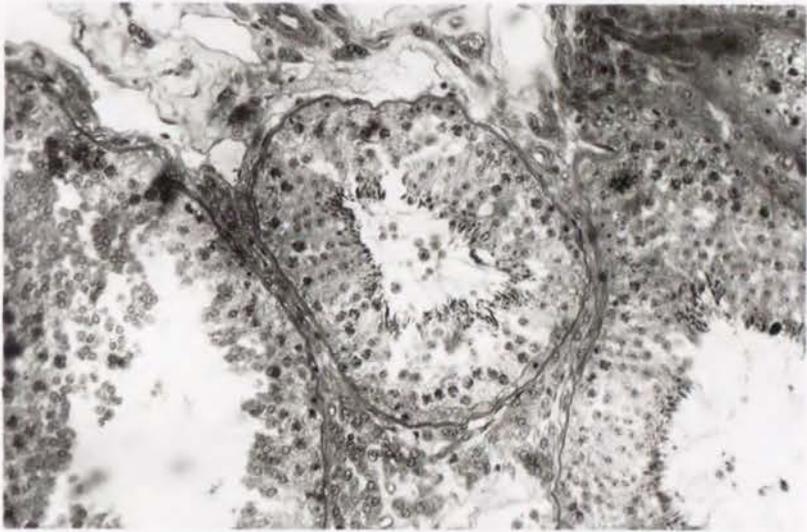


Fig. 3-10. Testicular histology of the 7/21 translocation heterozygous bull.

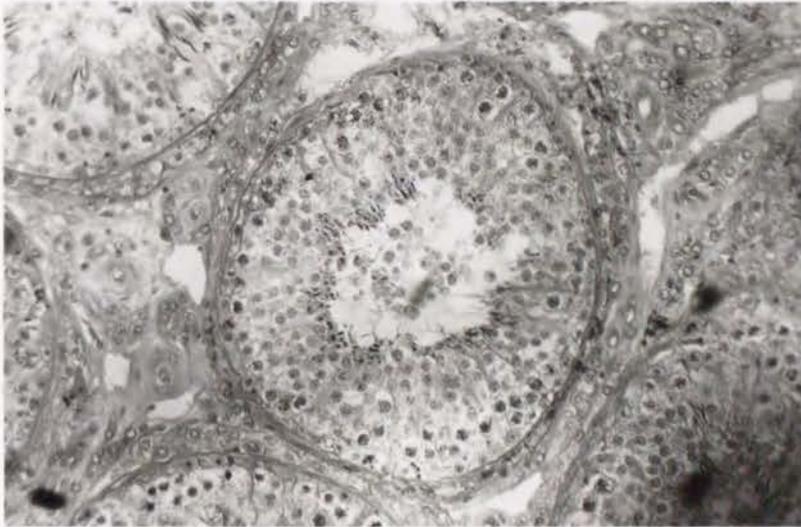
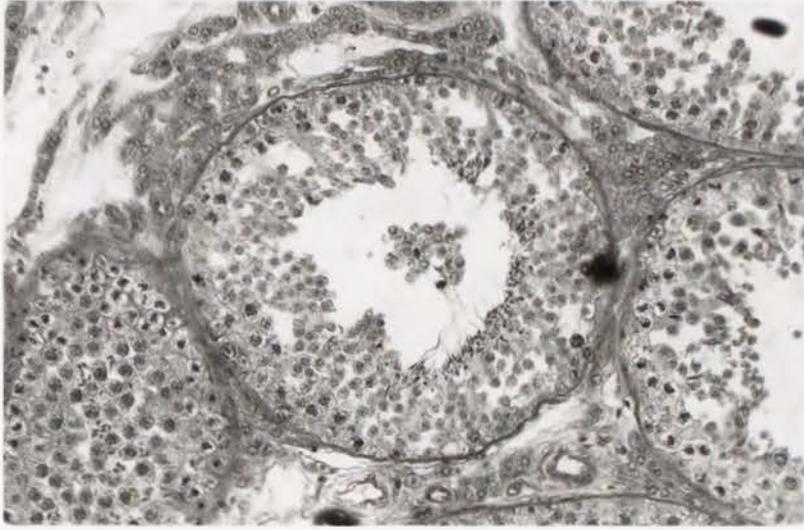


Fig. 3-11. Testicular histology of the 7/21 translocation homozygous bull.

性行動については同様な結果が得られている (Bruère & Chapman, 1974)。一方、ヤギの症例では、精子数や産子数の減少が見られている (Ricordeau, 1972)。また、タバコマウスにおいても、精巣重量の低下や精液量の減少など造精機能への影響が認められている (Cattanach & Moseley, 1973)。これらの造精機能の障害を伴った症例では、第一減数分裂の中期で精子形成が停止し、精巣の組織学的研究において退行変性を示す精母細胞の分裂像が認められている。しかし、7/21 転座ヘテロ個体においては、精巣重量や精液性状の低下は認められず、精巣の組織標本や染色体標本の分析においても退行変性した分裂像は観察されなかった。これらの結果から、7/21 転座個体では受胎率に直接影響を及ぼすような配偶子 (精子) 形成の障害は起こっていないものと推察される。

2. 繁殖成績の分析

7/21 転座ヘテロ雌個体の繁殖成績は、正常雌個体の成績とともに、表3-9と表3-10に示した。初産日齢は、正常個体で827日、7/21 転座個体で819日で、両者に有意差は認められなかった。分娩後の発情再帰日数は、正常核型の雌牛で平均68.3日、転座を保有していた雌牛で71.4日、初回授精受胎率は、それぞれ46.8%と45.3%であった。受胎当りの平均授精回数は、転座保有雌個体のほうが2.22回と正常雌個体の2.08回に比べるとわずかであるが多かった。分娩間隔も正常雌個体に比べて転座保有雌個体のほうが約11日長く、418日であった。平均産次数は、正常個体の7.2産に対して転座個体で6.7産と少なかったが、これらの形質における差はいずれも統計的に有意ではなかった。

Table 3-9. Days to each calving and calving intervals in the normal and the 7/21 heterozygous cows

Trait	2n=60, XX		2n=59, XX, t	
	n	$\bar{X} \pm S.D.$	n	$\bar{X} \pm S.D.$
Days to 1st calving	202	826.8 \pm 79.4	61	818.7 \pm 71.6
Days to 2nd calving	194	1250.6 \pm 123.1	59	1265.9 \pm 96.7
Days to 3rd calving	186	1642.8 \pm 133.8	56	1653.6 \pm 101.6
Days to 4th calving	167	2027.1 \pm 152.7	48	2036.8 \pm 124.9
Days to 5th calving	151	2418.9 \pm 179.9	46	2429.1 \pm 104.3
Calving interval(days)	202	407.1 \pm 44.8	61	417.9 \pm 43.0
No. of calvings	202	7.16 \pm 2.89	61	6.66 \pm 2.61

1) t:t(7q 21q).

2) n: Number of cows. $\bar{X} \pm S.D.$: Mean \pm Standard deviation.

Table 3-10. The interval to first postpartum estrus, the number of services per conception and the conception rate at the first service in the normal and the 7/21 heterozygous cows

Karyotype of cow ¹⁾	No. of cows	Interval to estrus		No. of services		Conception rate(%)
		n	$\bar{X} \pm S.D.$	n	$\bar{X} \pm S.D.$	
60, XX	89	509	68.3 \pm 15.1	457	2.08 \pm 1.01	46.8
59, XX, t	34	178	71.4 \pm 16.4	158	2.22 \pm 1.09	45.3

1) t:t(7q 21q).

2) $\bar{X} \pm S.D.$: Mean \pm Standard deviation.

また、低受胎のために廃用になった37頭の繁殖雌牛について核型分析を行った結果、32頭は60, XXの正常雌個体であったが、残りの4頭(12.5%)は7/21転座ヘテロ個体、1頭は60, XY/60, XX個体であった。一方、通常の繁殖成績を示していた雌牛137頭についての調査では、11頭(8.0%)が7/21転座ヘテロ個体、2頭(1.5%)が1/29転座ヘテロ個体であった。低受胎牛と通常の繁殖成績を示していた雌牛における転座個体の出現頻度に顕著な差は見られなかった。

表3-11は、7/21転座および1/29転座をヘテロに保有していた種雄牛の娘牛の繁殖成績についての調査結果である。7/21転座ヘテロ種雄牛S102とS120の娘牛の初産日齢はいずれも820日前後、分娩間隔はそれぞれ425日と416日であった。平均産歴は、前者が5.9産、後者が6.4産であった。また、7/21転座種雄牛S104の娘牛の分娩間隔、平均産歴はそれぞれ422日と5.6産であった。これらの結果をほぼ同じ時期にN県で人工授精に供用されていた正常核型の3頭の種雄牛S101、S110、S116の娘牛についての調査結果と比較したところ、両者には有意差は認められなかった。また、子牛の核型分析の結果、1/29転座ヘテロ個体と判定された種雄牛S132の娘牛の成績についても同様の調査を行った。その結果、娘牛の初産日齢は856日、分娩間隔は449日であった。これらは正常核型の種雄牛の娘牛の調査結果に比べると長かったが、統計的には有意な差ではなかった。

ロバートソン型転座と繁殖性との関連性については、1/29転座で研究されており、この転座の場合にはわずかであるが繁殖性の低下を招くことが明らかにされている。Gustavssonら(1969, 1979)は、スウェーデン赤白斑牛において正常な核型を持った種雄牛と1/29転座ヘテロ種雄牛の娘牛の授精後

Table 3-11. Days to first calving and calving intervals in daughters of the normal and the translocation sires

Karyotype ¹⁾	Bull number	Year of birth	No. of cows studied	No. of calves	Days to first calf ²⁾	Calving interval ²⁾ (days)	Period of employment for A. I. (yr-month)
60,XY	S101	S45. 12	131	839	829.1 ± 66.1	413.1 ± 55.1	10-4
	S110	S48. 4	123	686	818.3 ± 65.3	427.4 ± 62.6	6-11
	S116	S43. 1	142	891	824.7 ± 69.4	412.1 ± 51.3	14-9
59,XY,t ₁	S102	S46. 3	125	733	826.3 ± 71.8	424.7 ± 57.3	8-1
	S120	S43. 6	118	757	818.4 ± 66.3	416.3 ± 56.1	10-11
58,XY,t ₁ t ₁	S104	S51. 1	101	561	821.0 ± 65.1	421.8 ± 51.8	4-8
59,XY,t ₂	S132	S41. 2	82	459	856.1 ± 69.4	449.1 ± 68.9	5-7

1) t₁:t(7q 21q), t₂:t(1q 29q).

2) Mean ± Standard deviation.

56日目の発情再帰率を調べた結果、後者のほうが3~5%有意に高かったことを報告している。また、ノルウェー赤牛やシンメンタール種の調査でも同様の繁殖性の低下が認められている (Refsdal, 1976; Maurer & Vogt, 1988)。これは、1/29転座ヘテロ個体では染色体の不分離の結果 (Logue & Harvey, 1978; Popescu, 1978a)、不均衡型の胚が形成され (King et al., 1980, 1981; Popescu, 1980; Schmutz et al., 1991; Wilson, 1991)、それが受精後30~90日目頃に死亡するためと考えられている (Refsdal, 1976)。

1/29転座と繁殖性との関連性については、リピートブリーダーの細胞遺伝学的調査や転座種雄牛の娘牛群の淘汰状況の分析からも両者の有意な関係を示唆する結果が得られている。Gustavsson (1971b) は、4回以上人工授精しても受胎しなかった263頭の低受胎牛について核型分析を行った結果、30.8%の81頭が1/29転座個体であり、その頻度は通常の繁殖雌牛集団の調査結果よりも有意に高かったことを報告している。また、正常な核型を保有していた種雄牛と1/29転座種雄牛の娘牛の1~5産後の淘汰率を見ると、後者のほうが1~3産後の淘汰率が5%前後高くなっている。特に、1/29転座ヘテロ種雄牛よりもこの転座をホモに保有していた種雄牛の娘牛で淘汰率が高くなっており、この集団においては、1/29転座については淘汰が行われていたことが示されている (Gustavsson, 1971a)。

このようなロバートソン型転座による繁殖性の低下は、青ギツネにおいても認められている。デンマークやノルウェーの集団では、約半数の個体が21/24転座ヘテロ個体、残りが正常個体と転座ホモ個体で両者がほぼ同じ割合で認められており、産子数は転座保有個体のほうがわずかであるが少なくなっている (Christensen & Pedersen, 1982; Moller et al., 1985)。また、フィンランドの集団では、1981年から1984年までの4年間に転座ホモ個体

の頻度が高くなる傾向にあり、それに伴って産子数が減少している (Mäkinen & Lohi, 1987)。ヤギでもザーネン種 (Saanen) で、繁殖性の低下を示す例が報告されている。この転座ヘテロ個体では精子数が正常個体に比べて14%低く、一腹産子数も正常雌個体と転座ヘテロ雌個体ではそれぞれ8頭の平均が1.75頭と1.37頭であり、雄、雌とも転座保有個体で繁殖性の低下が認められている (Ricordeau, 1972)。これらの転座保有個体の繁殖性の低下は、1/29転座の場合と同様に不均衡型細胞由来の胚の死亡によるものと考えられるが、この点については胚の細胞遺伝学的調査が行われていないので十分に明らかではない。

ヒツジのMI、MII、MIII転座の場合も、転座ヘテロ雄個体の減数分裂時の染色体分析においては不均衡型細胞が認められており、高一倍体細胞の頻度をもとに推定した染色体の不分離率は、それぞれ11.2%、9.0%、18.2%と正常個体に比べて高くなっている (Chapman & Bruère, 1975)。また、Long (1978a) の調査でも、不分離率は正常個体で2.0%、MI転座個体で6.3%と推定されており、転座ヘテロ雄個体において不均衡型細胞の高い発生が認められている。しかし、転座ヘテロ雄個体を正常雌個体に交配して得られた13~18日目の胚の染色体分析では、正常個体と転座ヘテロ個体だけが認められており、不均衡型の配偶子由来のモノソミー胚やトリソミー胚は観察されていない (Long, 1977)。MI、MII、MIII転座をヘテロに保有する個体と正常個体の交配においても、正常個体と転座個体、雄個体と雌個体が同じ割合で生まれており、核型や性による偏りは認められていない。産子数についても、正常個体どうしの交配と変わらない成績が得られている (Bruère, 1974; Bruère & Chapman, 1974; Long, 1978b)。これらの結果から、MI、MII、MIII転座においては不均衡型細胞は形成されるが、それらは精子まで分化で

きずに配偶子形成の過程で淘汰され、受精には正常型と均衡型の染色体構成を持った配偶子だけが関与していて繁殖性の低下は起こっていないものと考えられている (Scott & Bruère, 1987)。

7/21 転座の場合、遺伝的に不均衡な細胞や胚が精子形成過程や胚の染色体分析において認められた。一方、黒毛和種の飼養集団の細胞遺伝学的調査において、モノソミーやトリソミー個体は観察されないで、不均衡型の胚は出生前に失われてしまうものと推察される。しかし、分娩間隔や授精回数などの繁殖記録の分析からは、7/21 転座が繁殖性の低下を惹起していることを裏付ける結果は得られなかった。7/21 転座ヘテロ個体の場合には、染色体の不分離率が正常個体に比べて数%しか高くなかった。また、繁殖成績が農家の雌牛の成績であったことから、個体間の変動が大きかった。このために、今回の繁殖記録の分析では、転座の影響は確認されなかったのではないかと考えられる。1/29 転座の場合も、繁殖成績の分析においては転座の影響が確認されなかったという報告も見られる (Blazak & Eldridge, 1977; Gary et al, 1991)。繁殖成績には、遺伝以外の様々な要因による影響が包含されているので、1/29 転座や7/21 転座のように染色体の不分離率が極端に高くない場合には、我が国の小規模な農家の繁殖成績から直接それらの影響を検出することは難しいのかも知れない。

3. 登録時の体尺測定値と体型審査得点

7/21 転座雌個体と正常雌個体の基本登録、あるいは本原登録時の体尺測定値と体型審査得点について調査し、その結果を表3-12に示した。供試牛の大部分は、昭和40年代後半に生産された個体であり、登録時の月齢は17～34カ月齢、平均25.2カ月齢であった。体高、胸囲、胸深、腹幅などの

Table 3-12. Judging score and body measurements of the normal and the 7/21 heterozygous cows

Trait	Karyotype	
	Normal	Hetero.
No. of cows	178	51
Age at regist.(month)	25.2 ± 3.1 ¹⁾	25.2 ± 3.6 ¹⁾
Judging score	78.7 ± 0.8	78.6 ± 1.0
Withers height(cm)	123.3 ± 2.8	123.1 ± 2.7
Chest girth(cm)	181.8 ± 7.1	180.9 ± 7.3
Chest depth(cm)	65.1 ± 2.5	65.2 ± 2.8
Thurl width(cm)	44.8 ± 1.8	44.7 ± 1.7

1) Mean ± Standard deviation.

体尺測定値には、正常雌個体と7/21転座雌個体で差が見られなかった。審査得点も、正常雌個体で78.7、7/21転座雌個体では78.6ではほぼ等しかった。7/21転座をヘテロあるいはホモに保有する種雄牛の娘牛の審査得点についての分析結果を、表3-13に示した。7/21転座をヘテロに保有する種雄牛の後代は半数が、ホモに保有する種雄牛の後代は全頭が7/21転座個体になるが、正常核型の種雄牛と7/21転座ヘテロ種雄牛、転座ホモ種雄牛の娘牛の審査得点はそれぞれ79.1、78.6、78.9で、群間に差は認められなかった。供用期間は正常核型の種雄牛のほうが長く、子牛の生産頭数は多かったが、7/21転座種雄牛の場合も昭和40年から50年代前半にN県内で人工授精に供用されていた他の種雄牛の成績と比較して特に低くはなかった。正常核型と7/21転座を保有する種雄牛における差は、正常核型の種雄牛の調査にあたってN県内の代表的な優良種雄牛を対象牛にしたことが原

因と考えられる。審査得点もわずかに正常核型の種雄牛の娘牛のほうが高かったが、これも同様の理由によるものと推察される。今回の調査では、7/21 転座雌個体やこの転座を保有する種雄牛が繁殖能力や体型上の理由から選択的に淘汰されているという事実は見られなかった。

ロバートソン型転座と繁殖形質以外の生産形質との関係については、数例の報告が見られるだけである。Gustavsson (1969) や Gustavsson と Rendel (1971) は、1/29 転座個体の乳量や乳脂率、さらには赤血球型や血清トランスフェリン型、炭酸脱水素酵素型について研究しているが、それらの形質と転座との間には有意な関係は認められていない。これに対して、Darré (1972) は、1/29 転座個体のほうが正常個体に比べて泌乳成績や産肉成績が高かったことから、これが転座による効果であるという結論を引き出している。しかし、その後、これは1/29 転座個体について有利な選抜が行われていたことによるものであったことが共同研究者によって明らかにされている (Quéinnec et al., 1974)。Zahner (1977) も、1/29 転座個体において高い泌乳成績を得ているが、転座との関連性については再検討の必要性が指摘されている (Gustavsson, 1979)。ロバートソン型転座個体が正常個体に比較して、生産性の面で優れているという明確な研究結果はこれまでのところ得られていない。

Table 3-13. Comparison of judging score between the normal and the 7/21 translocation carrier bulls

Karyotype ¹⁾	Bull number	Year of birth	No. of offsprings	Judging score ²⁾	Percentage of off. registered	Period of employment for A. I. (yr-month)
60, XY	S116	43. 1.14	20,938	78.5 ± 1.1	32.5	14 - 9
	S101	45.12.10	32,640	79.1 ± 1.2	35.4	10 - 4
	S117	46. 9.25	20,613	79.3 ± 1.0	31.1	14 - 6
	S110	48. 4.18	6,361	79.1 ± 0.9	32.2	6 -11
	S119	49. 1.12	3,678	79.4 ± 1.0	27.4	8 - 9
	S108	50. 2.16	11,564	79.3 ± 1.0	36.6	7 -10
59, XY, t	S131	40. 1.16	4,778	77.9 ± 1.0	35.9	4 - 8
	S120	43. 6.22	7,838	78.2 ± 1.0	23.2	10 -11
	S102	46. 3. 1	1,862	78.4 ± 1.1	23.5	8 - 1
	S106	52. 7.22	461	79.1 ± 1.1	23.4	4 -10
	S113	52. 8.12	358	79.3 ± 0.9	17.6	4 - 4
58, XY, t, t	S104	51. 1.10	1,099	78.9 ± 1.1	28.6	4 - 8

1) t:t(7q 21q).

2) Mean ± Standard deviation.

総 合 考 察

本研究の結果、黒毛和種の繁殖牛集団には、1/29転座と7/21転座の2種類のロバートソン型転座が広く存在していることが明らかになった。総合考察では、本研究の試験結果とこれまでの報告をもとに、これらの転座の遺伝学的特徴を整理するとともに、畜産における問題点と対策について考察した。

今日、黒毛和種の繁殖には、人工授精技術が広範に取り入れられており、その普及率は97%に達している。しかも、その育種改良は、通常、都道府県単位の小集団で進められている。一方、1/29転座や7/21転座などのロバートソン型転座の場合、遺伝情報の過不足はなく、転座保有個体の表現型は正常である。また、これらの転座は、メンデル式遺伝で次世代に受け継がれるので、人工授精を通じて簡単に集団に拡散されてしまう。今回調査を行ったN県の黒毛和種の集団においては、1/29転座や7/21転座の頻度は特に高くなかったが、育種、繁殖集団が比較的小さいことから、これらの転座が非常に短期間に黒毛和種の集団に拡散していく危険性がないとは言えないであろう。

畜産において、最も重要な問題は生産性との関係であるが、1/29転座の場合、精子形成過程の染色体分析や繁殖記録の統計遺伝学的分析の結果、数%であるが繁殖性の低下を惹起することが示されている。7/21転座の場合、繁殖記録の分析からその影響は検出できなかったが、転座ヘテロ雄個体の精子形成過程や転座ヘテロ雄個体と正常雌個体の交配において、遺伝的に不均衡な細胞や胚が観察された。このようなことから、7/21転座が繁殖性の低下を引き起こしている可能性は否定できない。反面、現時点で、これらのロバートソン型転座を保有する個体が正常核型の個体よりも繁殖性や産肉性などの生産性の面で優れているという研究結果は得られていない。産業上からは、今後、

1/29 転座や7/21 転座を保有する種雄牛を人工授精に供用していくことは差し控えたほうが望ましいであろう。

1/29 転座や7/21 転座などのロバートソン型転座個体と正常核型を示す個体の外観的な特徴には差異が認められないので、細胞遺伝学的検査による以外に両者の識別は困難である。このようなことから、スウェーデンではスウェーデン赤白斑牛の集団から1/29 転座個体を除去するために、1969年から種雄牛の染色体検査を実施している。その結果では、染色体検査を導入する前の繁殖成績は3年間に1%ほど低下していたが、検査導入後は3年間で逆に0.5%の成績の向上が認められている(Swensson, 1973)。ノルウェーでも、1968年にノルウェー赤牛で1/29 転座個体が確認されて以来(Amrud, 1969)、種雄候補牛の染色体分析を開始し、転座保有個体は選抜から除外している。その結果、1/29 転座保有個体の頻度は、1970年には9.2%であったが、1985年には0.5%に減少している(Syed et al., 1987)。現在では、登録協会や国の指導の下に、イギリス(Pollock, 1974; Harvey, 1976)、フランス(Popescu, 1975b; Foulley & Frebling, 1985)、ハンガリー(Kovács & Papp, 1977; Papp & Kovács, 1978)、ドイツ(Stranzinger & Förster, 1976)において種雄牛の染色体検査が実施されている。また、オーストラリアでは、精液を輸入する場合にも種雄牛について染色体検査を義務付け、1/29 転座の種牛集団への移入防止に努めている(Gustavsson, 1979)。

黒毛和種においても、子牛の生産性向上を図っていくには、種雄候補牛を対象として染色体分析を実施することが必要であろう。種雄牛とその候補牛が対象であれば、染色体分析のための経費、労力面の負担は小さく、比較的短期間に集団内の転座保有個体の頻度を低下させることが可能である。また、一般の染色体検査は、都道府県の試験研究機関において簡単に実施できるので、今後

、黒毛和種の改良過程に種雄候補牛の染色体分析を導入し、その結果を産肉成績とともに登録証明書に付記していくことが重要である。

1/29転座や7/21転座は、産業面に対して経済的損失をもたらすので、これらを集団内に保有しておく必要性は低い。しかし、これらの染色体変異は、系統の進化や類縁関係などの研究においては有用な研究材料と考えられる。また、転座染色体は新たな遺伝子群を形成しているので染色体地図の作成に際しては利用価値の高いものであり、今後、貴重な遺伝子資源となる可能性が大きい。従って、それらの精子や受精卵を積極的に収集し、凍結保存することも検討していく必要がある。

一方、染色体分析においては、再度材料を採取する必要性が生じてくることが少なくない。通常の染色体分析の結果、培養中に特殊な処理を施す必要がある高精度分析法でもってさらに詳細な分析を行わなければならなくなったり、非常にまれではあるが初回の培養が不成功に終わったりする場合も生じてくる。一般的には染色体異常を伴った症例は虚弱で、生後早期に斃死したり、その他の様々な理由によって再度材料を採取することが困難となる場合も多い。また、一度に処理できる個体数にも限度がある。このために、最近、ヒトでは培養中の検体や採取直後の全血を凍結保存する方法が検討されているが (Kondo & Sasaki, 1981; Nakagome et al., 1982)、家畜では染色体分析を目的としたこの種の研究は行われておらず、検体の保存法の開発は重要な課題である。また、染色体の同定だけでなく、染色体内の微細な構造異常を分析していくためには、より細かなバンドの特徴についても明らかにしておくことが重要である。本論文では転座によって生じる染色体異常についての分析結果だけを示したが、胚の染色体分析においては染色体構成が3nの胚も観察された。これらは多精子受精などによるものと考えられるが、その原因については明確にでき

なかった。染色体分析の成功率からも明らかなように、胚の染色体分析手法には数多くの改善点が残されている。今後、胚における染色体異常の出現頻度やその発生機構などについて研究を進めていくためには、紡錘糸形成阻害剤の種類や濃度、処理時間など分析手法についてさらに検討を加え、その精度を高めていく必要がある。

本研究では、ウシの染色体分析のための末梢リンパ球の最適培養条件を明らかにするとともに、黒毛和種で見られた1/29転座と7/21転座の分布状況や繁殖性との関係について解明した。これらの研究成果は、黒毛和種を初めとする我が国のウシの染色体研究を進めていく上で貴重な遺伝情報となり、子牛の生産性の向上に寄与するものと考えられる。現在、畜産の現場において染色体分析をより容易なものにするために、凍害防止物質としてDMSOを使用した簡易的な検体の長期保存法、高精度分析法における染色体のイデオグラムについて検討中である。

総 括

本研究では、最初に畜産の現場において、ウシの染色体分析を効率的に進めていくために必要な末梢リンパ球培養法、標準核型などの研究手法について検討した。次に、これらの研究手法を用いて、黒毛和種の育種、繁殖集団を対象に細胞遺伝学的調査を実施し、その過程で見い出された1/29転座と7/21転座の細胞遺伝学的特徴や分布状況、これらの2種類のロバートソン型転座が黒毛和種に導入された遺伝的経緯などについて検討した。さらに、7/21転座保有個体の精子形成過程や胚の染色体分析、繁殖記録の分析を行い、この転座と繁殖性との関連性について検討した。本研究で得られた成果の概要は、以下のとおりである。

1. 末梢リンパ球培養法による染色体研究手法の開発

1) 染色体分析のために必要な末梢リンパ球の最適培養法の確立を目的として、ウシ末梢リンパ球の分裂動態およびその変動要因について検討した。その結果、リンパ球の分裂動態は、使用する培養液や血清の添加割合、培養温度によって影響を受けることが明らかになった。また、分裂動態には個体差があり、同一個体のリンパ球でもPHAに対する反応性が異なる不均一な細胞集団であることが分かった。RPMI-1640液を基本培養液とし、37°Cで培養を行った場合、分裂指数のピークは培養開始後45時間目と66時間目に観察された。但し、44時間目の細胞は、82%が第1回目の分裂細胞で、残りはDNA合成を2回経過した細胞集団であった。これらの結果から、核型分析では45時間目あるいは66時間目に培養を終了した場合に、分裂中期細胞を最も効率良く回収できることが分かった。しかし、変異原性試験において、第

1回目の細胞分裂を選択的に分析する場合には、40時間目で培養を終了させる必要があることも明らかになった。

2) G-バンド法による標準核型作成のために、分裂中期(313バンド期)における個々の染色体の分染パターンを明らかにし、イデオグラムを提示した。

2. 黒毛和種の繁殖牛集団におけるロバートソン型転座の分布状況

1) 黒毛和種の細胞遺伝学的調査において、2種類のロバートソン型転座染色体が見い出された。G-バンド法によって分析した結果、これらの転座染色体の一方は世界の数多くの品種で報告されている1/29転座、もう一方は第7と第21染色体が関与した7/21転座であった。

2) 2種類の転座染色体の融合形態をC-バンド法によって分析した結果、1/29転座染色体は、融合部位の長腕(第1染色体)側に動原体を持つ一動原体性の転座であり、7/21転座染色体は、第7染色体と第21染色体の両方に動原体を持つ二動原体性の転座であることが明らかになった。これらの転座の分布状況やC-バンドパターンから見て、1/29転座は、非常に古い時期にヨーロッパ原産の乳肉兼用種で起こり、それが黒毛和種の改良過程で交雑された外国種によって持ち込まれたものと推察された。一方、7/21転座は、1/29転座より発生時期が新しく、黒毛和種の成立後に起きた新しい染色体異常であると考えられた。

3) 7/21転座をヘテロに保有する種雄牛と正常核型を示す雌牛の組み合わせからは、この転座をヘテロに保有する個体と正常核型を示す個体がほぼ半数ずつ生産されており、7/21転座は他のロバートソン型転座と同様にメンデル式遺伝により次世代に受け継がれることが確認された。

4) 転座の分布状況を知るために、無作為に選んだ394頭の繁殖雌牛について核型を調査したところ、42頭が7/21転座個体、10頭が1/29転座個体であった。これらの中の1頭は、7/21転座と1/29転座の両者をヘテロに保有する個体であった。1/29転座および7/21転座保有個体の頻度は、それぞれ2.5%と10.9%であった。1/29転座および7/21転座種雄牛は、全頭が既に廃用になっており、転座保有個体の頻度は1981年以降は減少傾向にあった。

3. 7/21ロバートソン型転座と繁殖性との関連性

1) 7/21転座種雄牛の精子形成過程における染色体分析を行った結果、この転座をヘテロに保有する雄個体では、第一減数分裂の太糸期に第7、第21、7/21転座染色体が対合して三価染色体を形成しており、その後の分裂で染色体の不分離が起きて不均衡型の精母細胞を生じていた。高一倍体細胞の頻度をもとに推定した7/21転座ヘテロ雄個体の染色体不分離率は7.9%で、それは正常雄個体の2.3%に比較して高かった。一方、7/21転座をホモに保有する個体では、第一減数分裂時に2本の7/21転座染色体が対合して大型の二価染色体を形成し、その後は交互分離によって均衡型の染色体構成を示す第二精母細胞を生じていた。

2) 正常な核型の雌牛の卵子に7/21転座をヘテロに保有する種雄牛の精液を体外受精して得た4~8細胞期の胚の染色体分析を試みた結果、転座種雄牛由来の高一倍体の雄性配偶子が受精して形成されたと考えられる遺伝的に不均衡なトリソミー胚が認められた。

3) 7/21転座種雄牛の精液性状や精巣の組織像について調査した。その結果、精液量や精子濃度、精子奇形率などの精液性状、精巣の発達状況や組織

像は、正常な核型を示す種雄牛のものと変わらず、7/21転座雄個体においては受胎率に直接影響を及ぼすような配偶子形成の障害は認められなかった。また、7/21転座種雄牛の性欲は活発で、性行動にも特に異常は見られなかった。

4) 7/21転座を保有する雌牛の繁殖成績を調査した結果、初回授精における受胎率は、転座雌個体で45.3%、正常雌個体で46.8%であった。分娩後の発情再帰日数は、それぞれ68.3日と71.4日でいずれの形質においても核型の違いによる差は認められなかった。受胎当りの平均授精回数は、7/21転座雌個体のほうが2.22回と正常核型の雌牛の2.08回に比べてわずかに多かった。分娩間隔も、転座雌個体のほうが10.8日長かったが、これらの差は統計的に有意ではなく、繁殖記録の分析からは7/21転座の影響は確認されなかった。

5) 7/21転座雌個体と正常雌個体の登録時の体尺測定値と体型審査得点について分析した結果、両者に有意差は認められなかった。また、正常核型の種雄牛と7/21転座種雄牛の娘牛の審査得点にも差はなかった。

以上、本研究の結果、黒毛和種の集団には1/29転座と7/21転座が広く存在することが明らかになった。また、7/21転座保有個体の精子形成過程や胚の染色体分析の結果、7/21転座はわずかであるが繁殖性の低下を招くものと推察された。今後、1/29転座や7/21転座を保有する種雄牛を人工授精に積極的に供用することは差し控えるとともに、種雄牛の選定にあたっては細胞遺伝学的検査を実施することが重要であるという結論に達した。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、御指導の労をとられた京都大学教授佐々木義之博士、同大学教授常脇恒一郎博士、本研究を命ぜられ懇篤なる御指導を賜った農林水産省畜産試験場育種部長（現、宇都宮大学教授）村松 晋博士に深厚なる謝意を表す。また、本研究を遂行するにあたり多大の御指導と御助言を賜った神戸大学名誉教授福島豊一博士、全国和牛登録協会専務理事並河 澄博士、京都大学名誉教授故上坂章次博士に深く感謝の意を表す。さらに、見島牛の細胞遺伝学的分析にあたり御指導を賜った名古屋大学教授富田 武博士、供試牛の血統や繁殖成績の分析にあたり貴重な資料を提供頂いた全国和牛登録協会元事務局長小崎正氏に心から拝謝する。最後に、本研究に際し、数々の試験材料を提供頂いた全国の畜産関係機関の各位に感謝の意を表す。

引用文献

- 1) Amrud, J., *Hereditas*, 62: 293-302. 1969.
- 2) Berland, H.M., Sharma, A., Cribiu, E.P., Darré, R., Boscher, J. and C.P.Popescu, *J.Hered.*, 79: 33-36. 1988.
- 3) Betancourt, A.C., Gutiérrez, C. and A.Sanchez, 1st World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod., Madrid, p.213-218. 1974.
- 4) Betancourt, A.C., Gutiérrez, C. and A.Sanchez, *Revista de Salud Animal*, 4: 127-132. 1982.
- 5) Blazak, W.F. and F.E.Eldridge, *J. Dairy Sci.*, 60: 1133-1142. 1977.
- 6) Bongso, A. and P.K.Basrur, *Cornell Vet.*, 66: 476-488. 1976.
- 7) Borodkin, P.A., *Radiobiology*, 19: 150-156. 1979.
- 8) Bosma, A.A., Elgersma, A. and N.A.Haan, *Tijdschriftvoor Diergeneeskunde*, 112: 789-794. 1987.
- 9) Boué, J. and A.Boué, *Les Accidents Cromosomiques de la Reproduction* (Boué, A. and C.Thibault., eds.), p.29-31. Centre International de l'Enfance, Paris, 1973.
- 10) Bruère, A.N., Chapman, H.M. and D.R.Wyllie, *Cytogenetics*, 11: 233-246. 1972.
- 11) Bruère, A.N. and H.M.Chapman, *Vet. Rec.*, 92: 615-617. 1973.
- 12) Bruère, A.N., *J. Reprod. Fert.*, 41: 453-464. 1974.
- 13) Bruère, A.N. and H.M.Chapman, *Cytogenet. Cell Genet.*, 13: 342-351. 1974.
- 14) Bruère, A.N., Chapman, H.M., Jaïne, P.M. and R.M.Morris, *J. Hered.*, 67: 149-154. 1976.
- 15) Bruère, A.N., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. and B.B.Brown, *J. Hered.*, 69: 8-10. 1978.
- 16) Bruère, A.N. and P.M.Ellis, *J. Reprod. Fert.*, 57: 363-375. 1979.
- 17) Bruère, A.N., Scott, I.S. and L.M.Henderson, *J. Reprod. Fert.*, 63: 61-66. 1981.
- 18) Cattnach, B.M. and H.Moseley, *Cytogenet. Cell Genet.*, 12: 264-287. 1973.
- 19) Chapman, H.M. and A.N.Bruère, *J. Reprod. Fert.*, 45: 333-342. 1975.
- 20) Christensen, K. and H.Pedersen, *Hereditas*, 97: 211-215. 1982.

- 21) Ciupercescu, D.D., 2nd World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod., Madrid, p.135-141. 1982.
- 22) Cribiu, E.P., Matejka, M., Darré, R., Berland, H.M. and A.Bouvet, Génét. Sél. Evol., 21: 555-560. 1989.
- 23) Crossen, P.E. and W.F.Morgan, Exp. Cell Res., 104: 453-457. 1977.
- 24) Crossen, P.E. and W.F.Morgan, Exp. Cell Res., 118: 423-427. 1979.
- 25) Darré, R., Quéinnec, G. and H.M.Berland, Revue Méd. vét., 123: 477-494. 1972.
- 26) De Giovanni, A.M., Succi, G., Molteni, L. and M.Castiglioni, Ann. Génét. Sél. anim., 11: 115-120. 1979.
- 27) De Giovanni, A.M., Popescu, C.P., Succi, G. and L.Molteni, Proc. 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, p.158-163. 1980.
- 28) De Giovanni, A.M., Molteni, L., Succi, G., Galliani, G., Boscher, J. and C.P.Popescu, Proc. 8th Eur. Colloq. Cytogetet. Domest. Anim., Bristol, p.53-60. 1988.
- 29) Di Berardino, D., Iannuzzi, L., Ferrara, L. and D.Matassino, J. Hered., 70: 436-438. 1979.
- 30) Dyrendahl, I. and I.Gustavsson, Hereditas, 90: 281-289. 1979.
- 31) Eldridge, F.E., J.Hered., 65: 353-355. 1974.
- 32) Eldridge, F.E., Vet.Rec., 96: 71-73. 1975.
- 33) Eldridge, F.E. and W.F.Blazak, J. Dairy Sci., 58: 756. 1975.
- 34) Eldridge, F.E. and CR.Balakrishnan, The nucleus, 20: 28-30. 1977.
- 35) Ellsworth, S.M., Paul, S.R. and T.D.Bunch, Theriogenology, 11: 165-171. 1979.
- 36) Epstein, C.J. and B.Travis, Nature, 280: 144-145. 1979.
- 37) Evans, E.P. Breckon, G. and C.E.Ford, Cytogenetics, 3: 289-294. 1964.
- 38) Evans, H.J., Human population cytogenetics. (Jacobs, P.A., Price, W.H. and P.Law, eds.). p.191, Edinburgh University, Edinburgh, 1970.
- 39) Evans, H.J., Buckland, R.A. and A.T.Sumner, Chromosoma, 4: 383-402. 1973.
- 40) Fechheimer, N.S., Vet. Rec., 93: 535-536. 1973.
- 41) Fischer, H., Z. Tierzucht und Zuchtbiol., 88: 215-221. 1971.

- 42) Fischer, H., Höhn, H. and E.Scheurmann, *Gies. Bietr. Erbpath. Zuchthyg.* 6: 70-79. 1975.
- 43) Ford, C.E. and E.P.Evans, *Les Accidents Chromosomiques de la Reproduction* (Boué, A. and C.Thibault., eds.), p.32-41. Centre International de l'Enfance, Paris, 1973a.
- 44) Ford, C.E. and E.P.Evans, *In Chromosome Today* (Warhrman, J. and K.R.Lewis., eds.), Vol.4, p.387-397. Wiley and Sons, New York, 1973b.
- 45) Ford, C.E., Pollock, D.L. and I.Gustavsson, (eds.), *Hereditas*, 92: 145-162. 1980.
- 46) Foulley, J.L. and J.Frebling, *Bulletin Technique, Centre de Recherches Zootechniques et Vétérinaires de Theix.* 62: 93-102. 1985.
- 47) Gary, F., Concordet, D., Berland, H.M., Berthelot, X. and R.Darré, *Theriogenology*, 36: 419-425. 1991.
- 48) Gropp, A., *Les Accidents Chromosomiques de la Reproduction* (Boué, A. and C.Thibault., eds.), p.255-269. Centre International de l'Enfance, Paris, 1973.
- 49) Guanti, G. and P.Minoia, *Cornell Vet.*, 68: 94-97. 1978.
- 50) Gustavsson, I. and G.Rockborn, *Nature*, 203: 990. 1964.
- 51) Gustavsson, I., *Hereditas*, 63: 68-169. 1969.
- 52) Gustavsson, I. and J.Rendel, *Hereditas*, 67: 35-38. 1971.
- 53) Gustavsson, I., *Hereditas*, 67: 65-74. 1971a.
- 54) Gustavsson, I., *Hereditas*, 68: 331-332. 1971b.
- 55) Gustavsson, I., *Hereditas*, 69: 101-106. 1971c.
- 56) Gustavsson, I., Hageltorn, M. and L.Zech, *Hereditas*, 82: 260-262. 1976.
- 57) Gustavsson, I. and A.Kovács, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 9: 535 (Abstr.). 1977.
- 58) Gustavsson, I., *J. Dairy Sci.*, 62: 825-835. 1979.
- 59) Halnan, C.R.E., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 8: 131-139. 1976.
- 60) Halnan, C.R.E., Gallowa., D.B., Watson, J.I., Mckee, J.J. and J.Norman, *Vet. Rec.*, 107: 177-178. 1980.
- 61) Hamerton, J.L., Canning, N., Ray, M. and S.Smith, *Clin. Genet.*, 8: 223-243. 1975.

- 62) 花田博文・村松 晉・阿部恒夫・姫野健太郎、日畜学会、第70回大会要旨、p.64. 1979.
- 63) 花田博文・富田 武、1979. (未発表).
- 64) Hanada, H., Muramatsu, S., Abe, T. and T.Fukushima, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 13: 205-211. 1981.
- 65) Hanada, H. and S.Muramatsu, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 52: 619-621. 1981.
- 66) Hanada, H. and S.Muramatsu, *Jpn. J. Zootech.*, 60: 590-595. 1989.
- 67) 花田博文・長嶺慶隆・樋口幹人・村松 晉・福島豊一、日畜会報、62: 548-553. 1991.
- 68) Hansen, K.M. and E.M.Hansen, *Pro. 9th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim.*, Toulouse, p.9(Abstr.). 1990.
- 69) Hare, W.C.D., 1978. Cited in Gustavsson, I. (1979).
- 70) Harvey, M.J.A., *Vet. Rec.*, 89: 110-111. 1971.
- 71) Harvey, M.J.A., *Vet. Rec.*, 91: 630-631. 1972.
- 72) Harvey, M.J.A. and D.N.Logue, *2nd Europ. Kolloq. Zytogenet.*, Giessen, p.155-161. 1975.
- 73) Harvey, M.J.A., *Vet. Rec.*, 98: 479-481. 1976.
- 74) Hassold, T. and A.Matsuyama, *Hum. Genet.*, 46: 285-294. 1979.
- 75) Herschler, M.S. and N.S.Fechheimer, *Cytogenetics*, 5: 307-312. 1966.
- 76) Herzog, A. and H.Höhn, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 3: 225-234. 1971.
- 77) Ikeuchi, T. and M.Sasaki, *Proc. Jpn. Acad.*, 55: 15-18. 1979.
- 78) Jacobs, P.A., Melville, M. and S.Patcliffe, *Ann. Hum. Genet.*, 37: 359-376. 1974.
- 79) Kajii, T., Ohama, K. and K.Mikamo, *Human Genet.*, 43: 247-253. 1978.
- 80) Kanagawa, H., Kawata, K., Ishikawa, T., Muramoto, J. and H.Ono, *J. Vet. Res.*, 13: 121-126. 1965.
- 81) Kato, H. and A.A.Sandberg, *Exp. Cell Res.*, 109: 423-427. 1977.
- 82) King, W.A., Linares, T., Gustavsson, I. and A.Bane, *Hereditas*, 92: 167-169. 1980.
- 83) King, W.A., Linares, T. and I.Gustavsson, *Hereditas*, 94: 219-224. 1981.
- 84) Kondo, K. and M.Sasaki, *Jpn. J. Hum. Genet.*, 26: 255-259. 1981.

- 85) Kovács, A. and M.Papp, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 9: 528(Abstr.). 1977.
- 86) Kovács, A., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 10: 594(Abstr.). 1978.
- 87) Krallinger, H., *Verh. Anat. Anz.*, 63: 209-214. 1927.
- 88) Léonard, A., Deknudt, Gh. and M.Debackere, *Toxicology*, 2: 269-273. 1974.
- 89) Léonard, A., Gerber, G.B., Papworth, D.G., Decat, G., Léonard, E.D. and Gh.Deknudt, *Mutation Res.*, 36: 319-332. 1976.
- 90) Levan, A., Fredga, K. and A.A.Sandberg, *Hereditas*, 52: 201-220. 1964.
- 91) Lin, C.C., Newton, D.R. and R.B.Church, *Can. J. Genet. Cytol.*, 19: 271-282. 1977.
- 92) Linares, T., King, W.A. and I.Gustavsson, *Proc. 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim.*, Uppsala, p.188-192. 1980a.
- 93) Linares, T., King, W.A. and L.Plöen, *Nord. Vet. Med.*, 32: 433-443. 1980b.
- 94) Livescu, E.B., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 9: 529(Abstr.). 1977.
- 95) Logue, D.N., 1976. Cited in Eldridge, F.E. and CR.Balakrishnan (1977).
- 96) Logue, D.N. and M.J.A.Harvey, *J. Reprod. Fert.*, 54: 159-165. 1978.
- 97) Lojda, L., 1974. Cited in Gustavsson, I. (1979).
- 98) Long, S.E., *Cytogenet. Cell Genet.*, 18: 82-89. 1977.
- 99) Long, S.E., *J. Reprod. Fert.*, 53: 353-356. 1978a.
- 100) Long, S.E., *Vet. Rec.*, 102: 399-401. 1978b.
- 101) Mäkinen, A. and O.Lohi, *Hereditas*, 107: 15-119. 1987.
- 102) 栞田博司・岡本 昭・和出 靖、*日畜会報*、46: 671-676. 1976.
- 103) 栞田博司・高橋敏治・副島昭彦・和出 靖、*日畜会報*、49: 853-858. 1978.
- 104) 栞田博司、塩谷康生・福原利一、*日畜会報*、51: 26-32. 1980.
- 105) Maurer, R.R. and D.W.Vogt, *Theriogenology*, 30: 1149-1157. 1988.
- 106) Mayr, B. and W.Schleger, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 10: 593(Abstr.). 1978.
- 107) McFee, A.F. and M.N.Sherrill, *Experientia*, 37: 27-29. 1981.
- 108) Melander, Y., *Hereditas*, 45: 649-664. 1959.

- 109) Molteni, L., Succi, G. and A.M.De Giovanni, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 9: 534(Abstr.). 1977.
- 110) Møller, O.M., Nes, N.N., Syed, M., Fougner, J.A., Norheim, K. and A.J.Smith, *Hereditas*, 102: 159-164. 1985.
- 111) Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellmann, W.J., Battips, D.M. and D.A.Hungerford, *Exp. Cell Res.*, 20: 613-616. 1960.
- 112) Moraes, J.C.F., 1978. Cited in Gustavsson, I. (1979).
- 113) Moraes, J.C.F., Mattevi, M.S., Salzano, F.M., Poli, J.L.E.H. and B.Erdtnann, *J. Hered.*, 71: 146-148. 1980.
- 114) Mori, M., Sasaki, M., Makino, S., Ishikawa, T. and K.Kawata, *Proc. Jpn. Acad.*, 45: 955-959. 1969.
- 115) Morimoto, K. and S.Wolff, *Nature*, 288: 604-606. 1980.
- 116) Muramoto, J., Ishikawa, T. and H.Kanagawa, *Nucleus*, 8: 25-32. 1965.
- 117) Nakagome, Y., Yokochi, T., Matsubara, T. and F.Fukuda, *Cytogenet. Cell Genet.*, 33: 254-255. 1982.
- 118) Nel, N.D., Harris, E.J., Weiermans, J.E., Meyer, E.H.H. and K.Brix, *Génét. Sél. Evol.*, 17: 293-302. 1985.
- 119) Nel, N.D., Harris, E.J., Weiermans, J.E. and E.H.H.Meyer, *Génét. Sél. Evol.*, 20: 239-246. 1988.
- 120) Niebuhr, E., *Humangenetik*, 16: 217-226. 1972.
- 121) Nosach, V.K. and A.G.Avakova, *Zhivotnovodstvo*, 11: 44-46. 1985.
- 122) 岡本 昭・吉沢 緑・村松 隆、宇都宮大学農学部学術報告、11: 1-8. 1981.
- 123) Papp, M. and A.Kovács, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 10: 593. 1978.
- 124) Papp, M. and A.Kovács, *Proc. 4th Eur. Coll. Cytogenet. Domest. Anim.*, Uppsala, p.51-54. 1980.
- 125) Pathiraja, N., Oyedipe, E.O. and V.Buvanendran, *Theriogenology*, 24: 419-424. 1985.
- 126) Pinheiro, L.E.L., Ferrari, I., Ferraz, J.B.S. and R.B.Lobo, *Braz. J. Genet.*, 5: 657-665. 1981.
- 127) Pollock, D.L., *Vet. Rec.*, 95: 266-267. 1974.
- 128) Pollock, D.L. and J.C.Bowman, *J. Reprod. Fert.*, 40: 423-432. 1974.
- 129) Popescu, C.P., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 3: 521-526. 1971.

- 130) Popescu, C.P., *Ann. Génét.*, 16: 183-188. 1973a.
- 131) Popescu, C.P., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 5: 435-440. 1973b.
- 132) Popescu, C.P. and J.Boscher, 1st World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod., Madrid, p.165-168. 1974.
- 133) Popescu, C.P., *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 15: 751-756. 1975a.
- 134) Popescu, C.P., 2. Europäisches Kolloquium über Zytogenetik in Veterinärmedizin, Tierzucht und Säugetierkunde, Giessen, p.277-282. 1975b.
- 135) Popescu, C.P., Cribiu, E.P. and P.Tschudi, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 7: 317-319. 1975.
- 136) Popescu, C.P., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 8: 443-448. 1976.
- 137) Popescu, C.P., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 9: 463-470. 1977a.
- 138) Popescu, C.P., *J. Hered.*, 68: 139-142. 1977b.
- 139) Popescu, C.P., *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 18: 383-389. 1978a.
- 140) Popescu, C.P., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 10: 592(Abstr.), 1978b.
- 141) Popescu, C.P., Proc. 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Uppsala, p.182-186. 1980.
- 142) Potter, W.L., Upton, P.C. and A.W.Blackshaw, *Aust. Vet. J.*, 55: 209-213. 1979.
- 143) Quéinnec, G., Darré, R., Berland, H.M. and J.C.Raynaud, 1st World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod., Madrid, p.131-151. 1974.
- 144) Rangel-Figueiredo, T. and L.Iannuzzi, Proc. 9th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Toulouse, p.16(Abstr.). 1990.
- 145) Rangel-Figueiredo, T. and L.Iannuzzi, *Hereditas*, 115: 73-78. 1991.
- 146) Refsdal, A.O., *Acta Vet. Scand.*, 17: 190-195. 1976.
- 147) Ricordeau, G., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 4: 593-598. 1972.
- 148) Rieck, G.W., Höhn, H. and A.Herzog, *Zuchthyg.*, 3: 177-182. 1968.
- 149) Robertson, W.R.B., *J. Morphol.*, 27: 179-331. 1916.
- 150) Roldan, E.R.S., Meroni, M.S. and V.Lanzewitsch, *Génét. Sél. Evol.*, 16: 136-142. 1984.

- 151) Salanino, C.F. and H.A. Johnson, *Exp. Cell Res.*, 85: 248-254. 1974.
- 152) Salerno, A., 1977. Cited in Popescu, C.P. (1977a).
- 153) Schmutz, S.M., Moker, J.S., Barth, A.D. and R.J. Mapletoft, *Theriogenology*, 35: 705-714. 1991.
- 154) Schwerin, M., Golisch, D. and E. Ritter, *Génét. Sél. Evol.*, 18: 367-374. 1986.
- 155) Scott, I.S.A. and A.N. Bruère, *J. Hered.*, 78: 37-40. 1987.
- 156) Seabright, M., *Lancet*, II: 971-972. 1971.
- 157) Shelton, J.N., *Aust. Vet. J.*, 57: 124-126. 1981.
- 158) Silvestrelli, M., Casciotti, D., Valfré, F. and U. Chicchini, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 13: 429-434. 1981.
- 159) 新里玄德・新城明久・渡嘉敷綏宝、琉球大学農学部学術報告、27: 285-292. 1980.
- 160) Snedecar, G.W. and W.G. Cochran, 統計的手法(畑村又好・奥野忠一・津村善郎、共訳)、第6版、p.87-114. 岩波書店、東京、1976.
- 161) Stranzinger, G.F. and M. Förster, *Experientia*, 32: 24-27. 1976.
- 162) Succi, G., De Giovanni, A.M. and L. Molteni, *Ann. Génét. Sél. anim.*, 8: 37-40. 1976.
- 163) Suldatović, B., Prolić, Z. and M. Cvetković, *Veterinarski Glasnik*, 31: 33-35. 1977.
- 164) Sumner, A.T., *Exp. Cell Res.*, 75: 304-306. 1972.
- 165) Swensson, T., *Europ. Ass. Anim. Prod. 24th Annu. Meet.*, Vienna, p.23-26. 1973.
- 166) Syed, M., Nes, N. and K. Rønningen, *J. Anim. Breed. Genet.*, 104: 113-120. 1987.
- 167) Sysa, P., 1977. Cited in Gustavsson, I. (1979).
- 168) Tschudi, P., Zahner, B., Küpfer, U. and G. Stämpfli, *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 119: 329-336. 1977.
- 169) Wilson, T.D., *Theriogenology*, 36: 789-793. 1991.
- 170) Zahner, B., *Ann. Génét. Sél. anim.*, 9: 599(Abstr.). 1977.

Summary

Studies on the Chromosome Polymorphism of Robertsonian Translocation in the Japanese Black Cattle

Hirofumi HANADA

The present objectives are to study on the incidence of the Robertsonian translocation and on its effect on fertility in the Japanese Black Cattle. Experiments were done first to determine the most suitable conditions for bovine lymphocyte culture and the standard karyotype for the cytogenetic study. Then the extensive cytogenetic survey and the pedigree analyses were carried out to clarify the incidence and the origin of the 1/29 and the 7/21 translocation in the breed. Additionally, the studies on meiosis and spermatogenesis of the 7/21 translocation bull and the chromosome analyses of embryos sired by the carrier bull were performed to detect the effect of the translocation on fertility. The analyses of breeding data were also carried out on the 7/21 translocation females and on the daughters from the translocation bulls.

The results and conclusions are as follows:

1. Development of the procedure for chromosome analysis by peripheral lymphocyte culture.

1) To determine the most suitable conditions for chromosome analysis, the kinetics of bovine lymphocyte division were investigated using the BUdR-Giemsa technique. It was confirmed that the kinetics were influenced by media and concentration of calf serum, and incubation temperature. There was considerable variation in cell proliferation among individuals. Also, bovine lymphocyte cultures were mixtures of cells with different cell cycle times and/or response to PHA. The peak of mitotic index appeared at 45 and 65 h in cultures set up with

RPMI-1640 medium at 37° C. To obtain a large number of metaphases in karyotype analysis, the optimum culture time for PHA-stimulated bovine lymphocyte seems to be 45 or 65 h. However, the second division metaphase was contained with a frequency of 18% in the 45 h cultures. Therefore, a culture time of 40 h would be preferable for study of the first division metaphases for detecting the chromosome damage induced in bovine lymphocytes.

2) The detailed description of G-band patterns at the level of 313 bands and the idiograms were proposed for the nomenclature of the bovine chromosomes.

2. Distribution of a Robertsonian translocation in the breeding population.

1) Two kinds of translocations were identified by G-banding techniques. It was confirmed that one translocation was the 1/29 translocation which had been found in many breeds throughout the world. The other was the autosomal translocation between chromosomes 7 and 21, which has not yet been reported in the other breeds.

2) Based on the C-banding analysis, it was confirmed that the 1/29 translocation chromosome was a monocentric with the single centromere on the long arm side of the point of fusion. While the 7/21 translocation was a dicentric chromosome which had the double centromeres on the both long and short arm sides of the point of fusion.

Considering its geographical distribution and C-banding patterns, it is suggested that the 1/29 monocentric translocation took place much earlier in the other breed and was introduced to the Japanese Black breed through the European breeds imported for improvement. The 7/21 dicentric translocation seems to have occurred recently in the Japanese Black breed.

3) A half of offspring produced from mating of the 7/21 heterozygous male with the normal female were normal, while the other half were the heterozygous carriers. The 7/21 translocation appears to be inherited

in Mendelian fashion.

4) Out of 394 cows whose karyotypes were examined, 42 were the 7/21 translocation carriers and 10 were the 1/29 translocation carriers. One animal was a double heterozygote carrying the 7/21 and 1/29 translocations. The frequencies of the 1/29 and the 7/21 translocation carriers were 2.5% and 10.9%, respectively. All the bulls carrying the 7/21 or the 1/29 translocation have been already retired, and the frequencies of two kinds of translocations have a tendency to decrease since 1981.

3. Effect of the 7/21 Robertsonian translocation on fertility.

1) In the meiotic study of the 7/21 translocation heterozygous bulls, a trivalent configuration and unbalanced cells carrying an excess chromosome were observed in the primary and the secondary spermatocytes, respectively. The rate of non-disjunction calculated by the frequency of the hyperhaploid cells was 7.9% in the heterozygous state as compared with 2.3% in the normal bull. On the other hand, twenty-nine bivalents including the largest bivalent were observed in the primary spermatocyte of the homozygous bull, and the secondary spermatocytes with the balanced haploid chromosome complement were produced by the occurrence of alternate segregation.

2) The chromosome analyses were carried out on 4~8 cell embryos fertilized with the semen from the 7/21 heterozygous bull in vitro. Trisomic embryos with an unbalanced karyotype resulting from non-disjunction of the trivalent chromosomes were detected.

3) Five bulls carrying the 7/21 translocation were compared with 14 chromosomally normal bulls concerning semen characteristics and histological picture of testicular. Semen characteristics such as the volume of the ejaculate, the concentration of semen and motility in the 7/21 translocation bulls appeared normal. The testicles were found to be as well developed as those of the normal bulls. Also the seminiferous tubules seemed to be normally developed with a histolo-

gically normal spermatogenesis in the carrier bulls. Sexual functions such as libido and serving ability were found to be quite normal in bulls carrying the 7/21 chromosome translocation.

4) The 7/21 heterozygous cows were compared with the chromosomally normal cows with regards to pregnancy status such as the conception rate at first service and calving interval. The conception rate at first service of the carriers(45.3%) and the normal females(46.8%) did not differ. The intervals from calving to the following insemination were 68.3 and 71.4 days in the normal and the carrier females, respectively. The number of services per conception was 2.22 in the carrier females, compared with 2.08 in the normal females. Although the average calving interval was 10.8 days longer in the carrier females, the difference was not statistically significant. The analyses of breeding data failed to demonstrate any significant difference in fertility between the normal and the 7/21 translocation animals.

5) The body measurements and the judging score at the registration did not differ between the normal and the 7/21 translocation females. Also, no significant difference was found in the judging score for daughters from the normal and the 7/21 translocation carrier bulls.

It became clear from the present study that the 1/29 and the 7/21 translocation were widely distributed in the Japanese Black breed. The possibility of a slight reduction in fertility in the 7/21 heterozygous carriers was indicated by the presence of unbalanced cells carrying an excess chromosome and trisomic embryos. The conclusion is that widespread use of bulls heterozygous for the 7/21 translocation should not be encouraged. It is important to introduce an eradication programs for the 1/29 and the 7/21 translocation in the Japanese Black breed. The bulls used for artificial insemination should undergo routine cytogenetic investigations.