

7 育成期における未利用の生菌剤を活用した育成牛用飼料の開発と飼養管理技術体系の作成

担当部署名：肉牛研究室

担当者名：○二瓶直浩、川田智弘

研究期間：平成 30（2018）～令和 2（2020）年度 予算区分：県単

1 目的

子牛において、牛コクシジウム症を含む下痢症は発育遅延を引き起こし、農家経営に損害を及ぼしている。本県を含む 1 道 10 県の農場を対象とした研究の報告によると、牛コクシジウム症の原因となる *Eimeria* 属原虫の浸潤率は 8 割を超えており、その対策、予防プログラムが様々な考えられている。駆虫剤のトルトラズリル製剤は、コクシジウムがどの形態でも駆虫の効果があり、投与回数も単回のため予防プログラムによく用いられるようになってきた。しかし、トルトラズリル製剤は用法上 3 カ月未満の子牛にしか使用できないことから、3 カ月齢以降の対策を講じる必要がある。そこで本試験では、ニワトリにおけるコクシジウム症に対して効果が見られる枯草菌入り飼料を用いて、黒毛和種子牛のコクシジウム症予防プログラムの作成と検証を目的とした。

2 方法

(1) 供試牛：当センターで飼養している 1～26 週齢の黒毛和種子牛 9 頭

全頭に予防として 2 週齢時にトルトラズリル製剤を経口投与
(トルトラズリル 15mg/BWkg)

(2) 試験区

ア 給与区…1 週齢から試験終了(6.5 カ月齢)まで 30g/日/頭の枯草菌(QST713 株)入り飼料
(グロービック BS、エランコジャパン(株)、日本)を給与。(5 頭)

イ 対照区…枯草菌入り飼料は無給与。(4 頭)

(3) 試験期間：令和 2（2020）年 2 月～12 月

(4) 調査項目

ア 発育値…体重、体高、胸囲、腹囲、胸腹差

イ 血液成分値…総コレステロール (T-Cho)、血中尿素窒素 (BUN)
インスリン様成長因子-1 (IGF-1)

ウ 糞便…糞便性状 (糞便スコア) 及び各種 *Eimeria* 属原虫オーシスト数 (OPG)

3 結果の概要

(1) 発育値 (体重、体高、胸囲、腹囲、胸腹差) は試験区間での有意な差は見られなかったが、2 週齢時の日増体量は給与区で高い傾向を示した ($p < 0.1$) (表 1)。

(2) T-Cho、BUN、血中 IGF-1 濃度は給与区、対照区間での有意な差は見られなかった (表 2)。

(3) 糞虫総 *Eimeria* 属原虫 OPG は試験区間で有意な差は認められず、各種類のオーシスト数も同様の結果であったが、糞便スコア (0:有形便～3:水様下痢便) は非給与牛で平均 1.15、給与牛で 0.47 となり、有意に給与区が低い値となった。また、有形便率は試験期間を通し、給与区が高い値であった (表 3)。

(4) 2 週齢時の T-Cho 及び IGF-1 は有意ではなかったが給与区で高い値を示した。これは有形便である割合が高く、飼料を効率よく消化、吸収したことが要因と考えられ、それにとりま

い2週齢時の日増体量が増加したことが示唆された。

4 今後の問題点と次年度以降の計画

今年度で試験終了。

[具体的データ]

表1 各区における供試牛の発育値

週齢		0W	2W	6W	10W	14W	18W	22W	26W
体重(kg)	対照区	32.7±5.1	39.5±5.1	65.1±5.5	92.3±5.5	124.7±5.5	152.4±5.5	179.5±5.5	208.2±5.5
	給与区	33.7±5.1	44.0±5.1	66.7±5.1	90.7±5.1	119.8±5.1	147.1±5.1	178.1±5.1	198.9±5.1
体高(cm)	対照区	—	75.2±1.1	82.0±1.2	88.2±1.2	94.2±1.2	99.0±1.2	102.6±1.2	107.5±1.2
	給与区	—	76.2±1.1	83.2±1.1	89.4±1.1	95.2±1.1	98.8±1.1	102.3±1.1	106.8±1.1
胸囲(cm)	対照区	—	77.1±1.6	91.5±1.7	101.5±1.7	111.3±1.7	117.8±1.7	125.0±1.7	133.0±1.7
	給与区	—	78.7±1.6	90.1±1.6	100.3±1.6	109.9±1.6	116.7±1.6	124.5±1.6	130.7±1.6
腹囲(cm)	対照区	—	80.3±2.9	98.6±3.2	114.9±3.2	134.6±3.2	148.6±3.2	158.9±3.2	166.9±3.2
	給与区	—	80.3±2.9	96.9±2.9	109.7±2.9	133.5±2.9	142.9±2.9	157.9±2.9	161.7±2.9
胸腹差(cm)	対照区	—	3.3±2.8	6.9±3.0	13.2±3.0	23.2±3.0	30.7±3.0	33.7±3.0	33.7±3.0
	給与区	—	1.7±2.8	6.9±2.8	9.5±2.8	23.7±2.75	26.3±2.8	33.5±2.8	31.1±2.8
DG(kg/日)	対照区	—	0.483±0.046 ^A	0.724±0.048	0.814±0.048	0.890±0.048	0.903±0.048	0.902±0.048	0.917±0.048
	給与区	—	0.728±0.046 ^B	0.739±0.046	0.760±0.046	0.813±0.046	0.833±0.046	0.863±0.046	0.835±0.046

LSMEAN±SE

^{AB}: 処理区間に差が見られたもの(P<0.1)

DG: 日増体

表2 各区における供試牛の血液成分値

週齢		2W	6W	10W	14W	18W	22W	26W
T-Cho (mg/dL)	対照区	61.8±10.0	154.2±11.2	156.7±11.2	63.4±11.2	55.7±11.2	64.7±11.2	77.4±11.2
	給与区	97.0±10.0	161.4±10.0	142.4±10.0	71.0±10.0	62.8±10.0	63.8±10.0	90.8±10.0
BUN (mg/dL)	対照区	17.5±1.4	11.8±1.6	11.2±1.6	14.3±1.6	10.2±1.6	13.8±1.6	12.4±1.6
	給与区	15.2±1.4	12.2±1.4	10.6±1.4	11.9±1.4	14.4±1.4	13.2±1.4	13.8±1.4
IGF-1 (ng/mL)	対照区	36.1±23.5	N.D.	N.D.	157.5±26.2	N.D.	N.D.	168.5±26.2
	給与区	96.1±23.5	N.D.	N.D.	124.1±23.5	N.D.	N.D.	133.5±23.5

LSMEAN±SE

N.D.: データ無し

T-Cho: 総コレステロール

BUN: 血中尿素窒素

IGF-1: インスリン様成長因子1

表3. 各区における供試牛の糞便性状値

週齢		2W	6W	10W	14W	18W	22W	26W	平均
OPG	対照区	695±13082	775±14624	3625±14624	325±14624	59650±14624	350±14624	475±14624	9167±5596
	給与区	695±13082	715±13082	4593±13082	3385±13082	1650±13082	835±13082	1095±13082	1829±5107
糞便スコア	対照区	2.20±0.30	0.24±0.34	0.74±0.34	1.74±0.34	0.74±0.34	0.99±0.34	0.99±0.34	1.15±0.20 ^a
	給与区	1.00±0.30	0.40±0.30	0.40±0.30	0.40±0.30	0.60±0.30	0.40±0.30	0.20±0.30	0.48±0.18 ^b
有形便率(%)	対照区	0 ^{aa}	75 ^A	25 ^{aa}	25 ^{aa}	25 ^A	0 ^{aa}	0 ^{aa}	21 ^{aa}
	給与区	40 ^{bb}	60 ^B	80 ^{bb}	60 ^{bb}	40 ^B	60 ^{bb}	80 ^{bb}	60 ^{bb}

LSMEAN±SE

OPG: 糞便1g中オーシスト数

糞便スコア: 0 有形便、1 軟便、2 下痢便、3 水様下痢便

^{aa}, ^{bb}: 群間で差が見られたもの(P<0.01)

^a, ^b: 群間で差が見られたもの(P<0.05)

^A, ^B: 群間で差が見られたもの(P<0.1)

8 OPU-IVF における経膈採卵時の効率的な採卵技術の開発

担当部署名：肉牛研究室

担当者名：○湯澤裕史、宍戸容子、川田智弘

研究期間：令和2（2020）～令和3（2021）年度 予算区分：県単

1 目的

優良子牛の効率的な増産技術として、超音波診断装置（エコー）を用いた経膈採卵（OPU）と体外受精（IVF）を組み合わせた OPU-IVF 法による受精卵作出技術が開発されており、生産現場での活用が期待されている。本法では、頸管を経由せずに採卵を行うため、生殖器が未発達で採卵が困難な未経産牛からでも卵子が回収でき、性周期に影響されずに連続的な採卵が可能である。本法の胚生産向上のため、OPU の前処置として FSH 製剤の投与が報告されているが、FSH 製剤投与から OPU 実施までの間隔についての検討は十分になされていない。そこで、本研究ではより良好な胚発生率を得るための、FSH 製剤投与後の OPU 実施時期について検討した。

2 方法

(1) 調査期間：令和2（2020）年6月～令和3（2021）年1月

(2) 供試牛：センターで飼養している黒毛和種繁殖雌牛3頭

(3) 調査方法

前処理として、膈内留置型プロゲステロン製剤挿入及び安息香酸エストラジオール 1mg を筋肉内投与し、4日後に FSH 製剤 20AU を生理食塩水 50mL で溶解し頸部皮下に単回投与した。

OPU を行う時期を FSH 製剤投与後 72 時間 (day7 区)、96 時間 (day8 区) 及び 144 時間 (day10 区) の3区設定し、3頭×3回のラテン方格法により試験を実施した。

(4) 調査項目

ア エコーによる卵巢所見

イ OPU 成績…回収卵子数、卵子のグレード (G1～G6)

ウ 培養成績…供試卵子数に対する IVF 後 48 時間で 2 卵割以上の卵子の割合 (分割率)、供試卵子数に対する IVF 後 8 日後で胚盤胞まで発育した卵子の割合 (発生率)

3 結果の概要

OPU 時の総卵胞数は day8 区が最も多かったが (表 1)、そのうちの小卵胞の割合は day7 区及び day8 区では 24.5%及び 19.6%であったのに対し、day10 区では 43.4%と高かった (図 1)。また、各区の卵子回収率 (回収卵子数/卵胞数) には統計的有意差は見られなかったものの、day10 区が他の2区に対し高い傾向が見られた (表 2)。なお、卵子の質においても各区間に統計的有意差は見られなかったが、G1 に評価した割合が day7 区、day8 区に対し day10 各区は低い傾向が見られた (表 2)。採卵数に対する G4 以上の割合は各区とも 85%以上確保でき、培養成績も分割胚率及び胚盤胞発生率に3区間で統計的有意差は見られなかったが、媒精後 8 日に得られた移植可能胚数は day7 区、day8 区よりも day10 区の方が多かった (表 3)。

4 今後の問題点と次年度以降の計画

他県の報告では、FSH 製剤投与後 72 時間より早い OPU の実施で、より生産効率が高くなる可能性が示唆されていることから、投与後 24 及び 48 時間で実施した OPU の成績を検証する。

[具体的データ]

表1 FSH投与時及びOPU時の卵胞数(個)

		総卵胞数	大卵胞	中卵胞	小卵胞
Day7区	FSH投与時	26.7	0.3±0.6	0.7±1.2	25.7±8.0
	OPU時	31.3	7.7±11.6	16.0±11.3	7.7±7.5
Day8区	FSH投与時	25.0	0.3±0.6	0.3±0.6	24.3±3.1
	OPU時	37.3	12.0±12.5	18.0±11.5	7.3±5.5
Day10区	FSH投与時	29.3	0.3±0.6	0.3±0.6	28.7±6.0
	OPU時	33.0	5.7±9.8	13.0±7.8	14.3±19.9

※ 区間毎の卵胞数、ステージ別卵胞割合に有意差は認められず。

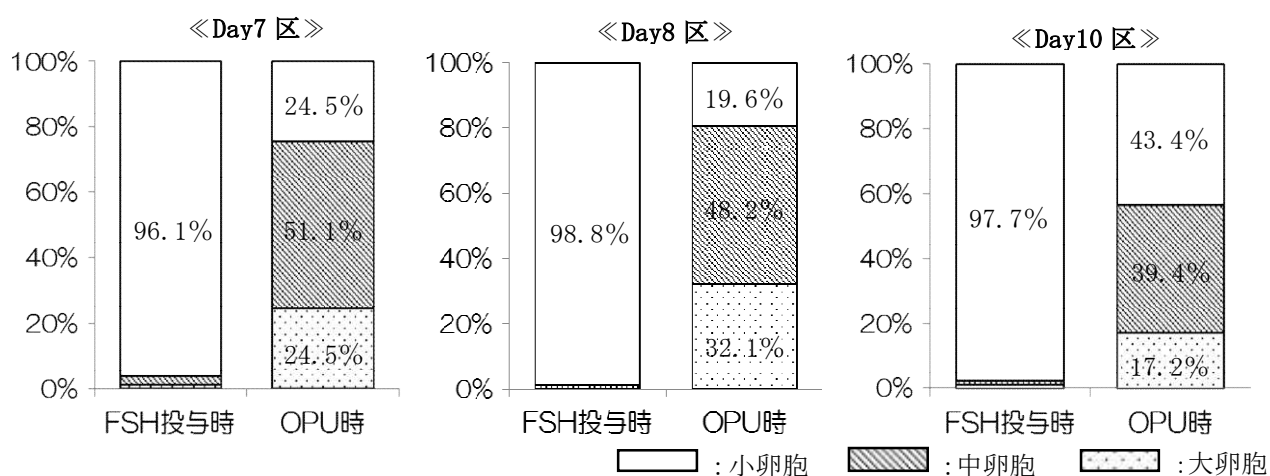


図1 FSH投与時及びOPU時の卵胞ステージの割合

表2 回数卵子数とグレード内訳

	OPU時の 総卵胞(個)	回収卵子数(個)		グレード(G)内訳					
		回収数(個)	回収率(%)	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Day7区	31.3	20.3±0.9	66.7±6.7	4.7	9.7	2.7	1.3	2.0	0.0
Day8区	37.3	18.0±1.7	49.4±7.8	5.3	9.0	0.7	0.7	2.3	0.0
Day10区	33.0	25.3±1.5	82.7±16.7	4.3	16.0	1.0	1.0	3.0	0.0

※ 区間毎の回収卵子数、回収率及びグレードに有意差は認められず

表3 分割卵子数及び胚盤胞数

試験区	供試卵子(個)	分割卵子数(個)		胚盤胞数(個)	
		分割数(個)	分割率(%)	発生数(個)	発生率(%)
Day7区	18.3±1.7	12.7±1.8	68.9±5.9	5.3±2.7	30.6±15.3
Day8区	15.7±1.3	12.0±1.7	76.0±6.1	5.0±2.5	34.2±18.1
Day10区	22.3±2.6	15.0±3.5	65.8±12.1	8.7±4.4	35.5±17.7

※ 区間毎の分割卵子数、分割率、胚盤胞数及び発生率に有意差は認められず

9 OPU-IVF における体外受精卵の受胎率向上に関する技術の開発

担当部署名：肉牛研究室

担当者名：○宍戸容子、湯澤裕史、川田智弘

研究期間：令和2（2020）～令和3（2021）年度

予算区分：県単

1 目的

優良子牛の効率的な増産技術として、超音波診断装置を用いた経膈採卵 (OPU) と体外受精 (IVF) を組み合わせた OPU-IVF 法による受精卵作出技術が開発されており、生産現場での活用が期待されている。OPU は未経産牛からの卵子回収や連続的な採卵が可能である一方、体外受精によって作出された受精卵は受胎性が低く、特に凍結受精卵移植の受胎率は安定しない。そこで、本研究では OPU-IVF 法による受精卵作出技術に加え、宇都宮大学で開発した培養技術を活用し、体外受精卵の効率的生産技術を検討した。

2 方法

(1) 調査期間：令和2（2020）年10月～令和3（2021）年2月

(2) 黒毛和種繁殖雌牛（延べ10頭）

(3) 調査方法

OPU 実施予定日時の48時間前にFSH処置を行い、OPUを実施した。回収した卵丘細胞卵子複合体を洗浄し、20時間成熟培養を行った。その後、凍結精液を希釈 ($1.0 \times 10^7 / \text{mL}$) し、5時間媒精した。媒精終了後、裸化した胚をウシ血清添加の m-SOF 基礎培地に移し、7～8日間発生培養を行った (図1)。発生培養6日目に、m-SOF 基礎培地に PEC (プロラクチン 20mIU/mL、EGF10ng/mL、4-ヒドロキシエストラジオール 10nM) を混合添加した培養液中で胚を24時間培養 (以下 PEC 処理区) し、無処理区 (対照区) と比較した。

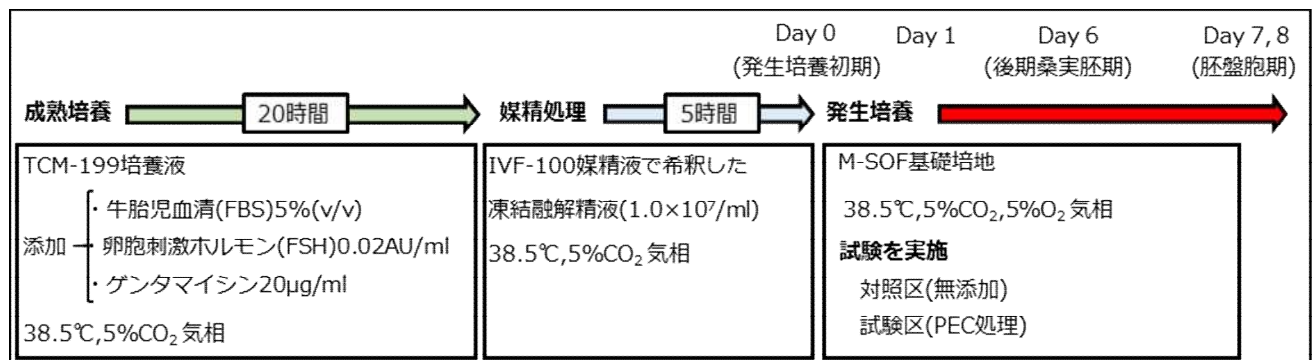


図1. 培養スケジュール

(4) 調査項目：回収卵子数、分割率、後期桑実胚数、胚盤胞発生率、胚の細胞数

ア 採胚成績として、遺残卵胞数、採胚総数、正常胚数、変性胚数及び未受精卵数を測定し、正常胚については、その発育時期と品質について分類した。

イ 胚の発育成績として、発生培養開始時の胚数、2日目の分割数、6日目の桑実胚期以上の胚数、7日目及び8日目の胚盤胞期胚数を調査した。

ウ 正常に発生した胚盤胞期胚は免疫蛍光染色法により細胞数等の計測を行った。

3 結果

(1) 体外受精の成績

10月以降5回のOPU-IVFを実施した。延べ10頭から197個の卵子を採取し、媒精後に分割した受精卵121個のうち46.3%である56個の胚盤胞を作出した。本試験の血清添加培地では、個体毎の数が少ない培養でも胚盤胞を得ることができた。しかし、胚盤胞が得られない個体もあり、発生率は個体や卵子吸引時の質による差が考えられた(表1、2)。

(2) PEC処理の効果

発生培養6日目に、桑実胚期以上の胚を2分しPEC試験を行ったところ、PEC処理区では胚盤胞発生率は高い傾向であったが、平均細胞数は差がみられなかった(表3)。

(3) 染色分け細胞数調査

高品質な胚が数多く作出できた第5回試験において、染色方法を分けたICMとTE染色を行ったところ、PEC処理区で細胞数が多い傾向であった(表4)。

4 今後の問題点と次年度以降の計画

無血清培地を用いて同様の試験を行い、作出した胚を生体移植して受胎率を調査する。

[具体的データ]

表1 採卵数と卵子のグレード

区分	卵子吸引時			採取卵子グレード					
	卵子数	培養数	供試率	G1	G2	G3	G4	G5	G6
延べ10頭	197	157	79.70%	44	94	12	7	14	26
胚盤胞が発生した6頭	128	110	85.9%	38	56	9	7	5	13
胚盤胞が発生しなかった4頭	69	47	68.1%	6	38	3	0	9	13

表2 分割率と胚盤胞発生率

区分	媒精後2日			媒精後7日	
	供試卵数	分割卵数	分割率	胚盤胞数	発生率
延べ10頭	157	121	77.07%	56	46.28%
胚盤胞が発生した6頭	110	88	80.0%	56	63.6%
胚盤胞が発生しなかった4頭	47	33	70.2%	0	0.0%

表3 PEC処理結果

	PEC試験			細胞数調査	
	供試数	胚盤胞数	胚盤胞発生率	供試数	平均細胞数
PEC処理区	24	23	95.8%	19	126.2±41.9
対照区	23	21	91.3%	20	128.4±41.1

表4 染色分け細胞数調査(第5回目)

	供試数	平均細胞数	ICM	TE	ICM%
PEC処理区	10	153.4±27.2	57.3	96.1	37.9%
対照区	10	145.1±21.3	49.2	95.9	34.0%