

1 生殖細胞操作胚の受胎率向上に関する試験

担当部署名：家畜生産技術部 家畜繁殖研究室

担当者名：○星一美、稲葉浩子、大島藤太、川野辺章夫、菊池草一

研究期間：平成22年度～25年度（継続）

予算区分：県単

1 目的

牛の生殖細胞操作技術は、双子生産（胚の分割）、雌雄の産み分け（胚の分割及びバイオプシーによるDNA判定、精子のXY選別）、クローン牛生産（ドナー細胞のインジェクション）、体外受精（顕微授精）等、試験研究レベルで幅広く活用されている。しかし、これら技術は高能力牛を効率的および安定的に生産するうえで重要であるが、生産効率は低い現状にある。その要因として、細胞操作胚の作出率や凍結保存後の生存率が低いことがあげられる。そこで、生殖細胞操作技術を活用した受精卵（体内及び体外受精胚）の作出効率の向上技術及びフィールドで利用可能な凍結保存法について開発する。

本年度は、体内性判別胚の凍結融解後の生存性の検討、および移植試験を実施した。

2 方法

(1) 体内性判別胚の作成

供試胚は、過剰排卵処置を行ったホルスタイン種経産牛から回収した7～8日齢のグレード1または2の桑実胚から拡張胚盤胞とした。バイオプシー方法は、供試胚の一部をマイクロブレードで切断し性判別用サンプルと移植胚に分けた。性判定は、LAMP法によりDNAを増幅後、濁度測定装置により判定した。移植胚は100 μ M-2メルカプトエタノール（ β ME）+20%牛胎児血清加修正TCM199を用い、5%CO₂、38.5 $^{\circ}$ Cの気相条件で3～5時間修復培養を行い、凍結保存した。

(2) 体内性判別胚の凍結保存法

修復培養後生存と判定した性判別胚は、1.36M-グリセリン+20%子牛血清加修正TCM199の平衡液で10分間保持した後、1.36M-グリセリン+0.25M-シュークロース+20%子牛血清加修正TCM199の凍結媒液に移し、0.25mlストローに充填した（図1）。凍結媒液胚が封入されたストローは、植氷温度（-6 $^{\circ}$ C）にキープしたプログラムフリーザー（富士平工業製：ET-1N）にセットし、1分後植氷を行った。最終到達温度-25 $^{\circ}$ Cまで-0.33 $^{\circ}$ C/分の冷却速度で凍結処理後、液体窒素内に投入した。

(3) 生存性確認

液体窒素タンクからストローを取り出し、エアソーイング6～10秒後、30 $^{\circ}$ Cの微温湯中に投入した。空のディッシュ内にストロー内容をすべて取り出して3分間静置後（室温）、100 μ M-2メルカプトエタノール（ β ME）+20%ウシ胎児血清加修正TCM199培地に胚を移した。1～5時間後に形態観察を行い、生存性を確認した。

(4) 移植

凍結融解後生存と判定した性判別胚は、20%子牛血清加修正TCM199培地に移した後ストローに詰め、発情後7～8日目の受胎牛の黄体側子宮角に移植し、受胎成績を検討した。

3 結果の概要

- (1) バイオプシー成績において、供試胚数44個、雌雄判定率75.0%、バイオプシー修復培養後の胚生存率 88.6%であった（表1）。
- (2) 性判別胚の凍結融解後の生存率において、生存率は 65.0%であった（表2）。
- (3) 移植成績において、融解後の生存胚を移植したが受胎は確認できなかった（表3）。

図1 ストローへの装てん

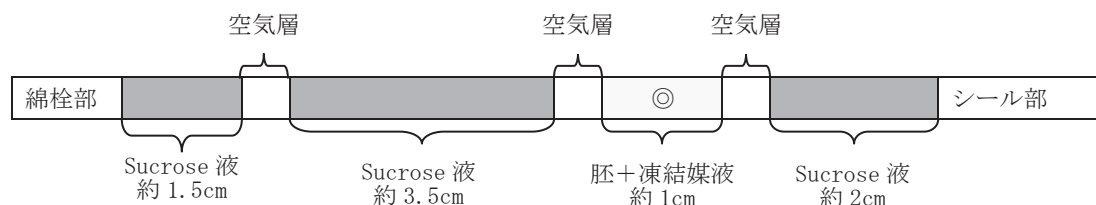


表1 バイオプシー成績

供試胚数	雌雄判定			判定率	修復培養後		生存率
	♀	♂	エラー		生存胚数	死滅胚数	
44	13	20	11	75.0%	39	5	88.6%

判定率 = $\frac{\text{♀} + \text{♂} \text{判定数}}{\text{バイオプシー胚数}} \times 100$

生存率 = $\frac{\text{修復培養後生存胚数}}{\text{バイオプシー胚数}} \times 100$

表2 凍結融解後の生存率

供試胚数	生存胚数	死滅胚数	生存率
20	13	7	65.0%

生存率 = $\frac{\text{生存胚数}}{\text{供試胚数}} \times 100$

表3 移植成績

移植胚数	受胎数	受胎率
2	0	0

4 今後の問題点と次年度以降の計画

今年度同様実施し、データの蓄積を図る。

2 超音波画像診断装置による卵巢所見と繁殖成績の関連調査

担当部署名：酪農技術部 繁殖技術研究室

担当者名：○新楽和孝、稲葉浩子、星一美、川野辺章夫

研究期間：平成22年度～24年度（継続） 予算区分：県単

1 目的

近年、乳用牛の泌乳能力が向上した反面、分娩間隔の延長や人工授精の受胎率の低下が課題となっている。こうした繁殖成績の低下は分娩後の卵巢機能の回復が遅延することが要因の一つと考えられるが、その原因は複雑で決定的な情報に乏しい状況である。一方、臨床の現場においては、直腸検査による卵巢や子宮の触診が卵巢機能の推定手法となっているが、こうした技術は熟練を要し、精度に限界がある。本試験では、早期に受胎する場合と長期不受胎になる場合の違いを明確にするため、超音波画像診断装置を用いて分娩から受胎までの卵巢の形体的な変化を調査する。

2 方法

- (1) 当センター飼養のホルスタイン成雌牛14頭（補正乳量平均11466kg、平均産次2.1産）を対象に、分娩後1カ月ごとに6か月まで超音波画像診断装置を用いて、卵胞数、卵巢の大きさ（長径と短径の積及び周囲長）を観察した。
- (2) 分娩後の卵巢機能の回復は分娩後30日における卵巢の状態を超音波画像診断法で確認し、黄体の有無より以下のように2群に分けた。各測定項目における2群の有意差はt検定で比較し、有意水準5%以下で有意を判定した。

- | | | |
|---|-----------------|---------------|
| { | I. 卵巢早期回復牛群 8頭 | （分娩後30日：黄体あり） |
| | II. 卵巢遅延回復牛群 6頭 | （分娩後30日：黄体なし） |

3 結果の概要

- (1) 分娩後1カ月ごとに6か月の間に観察した卵巢の大きさ（長径と短径の積）は平均 $823.0 \pm 61.8 \text{ m}^2$ 、卵巢の大きさ（周囲長）は $183.1 \pm 6.3 \text{ mm}$ 、卵胞数は 15.3 ± 2.8 であった。
- (2) 分娩後1カ月から6か月の間の全期間で卵巢機能早期回復群で卵巢の大きさ（左右の卵巢の短径と長径の積の平均及び卵巢周囲長の平均）が大きい傾向がみられ、分娩後4か月で有意に高い値となった（ $P > 0.05$ ）。また、卵胞数（左右の卵胞数の合計）については分娩後4か月以降で卵巢機能早期回復群で卵胞数が多い傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

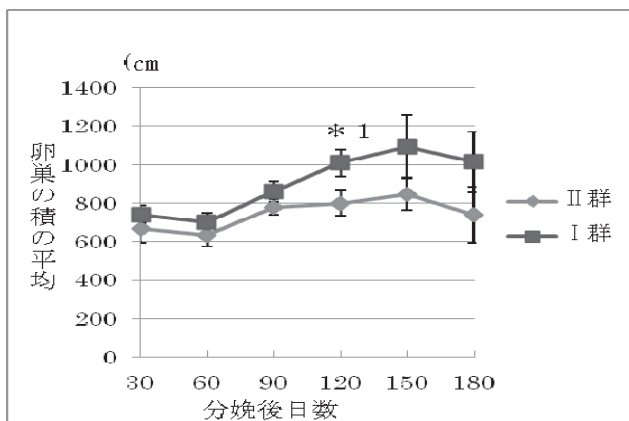


図 1 分娩後の卵巣の大きさ（卵巣の積の平均）の推移（平均±標準誤差）

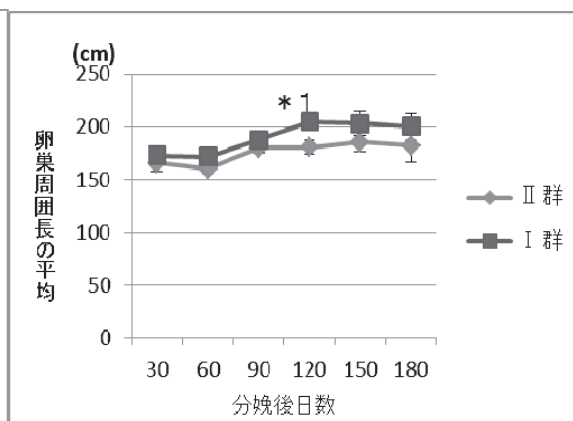


図 2 分娩後の卵巣の大きさ（卵巣周囲長の平均）の推移（平均±標準誤差）

* 1 : P<0.05で有意

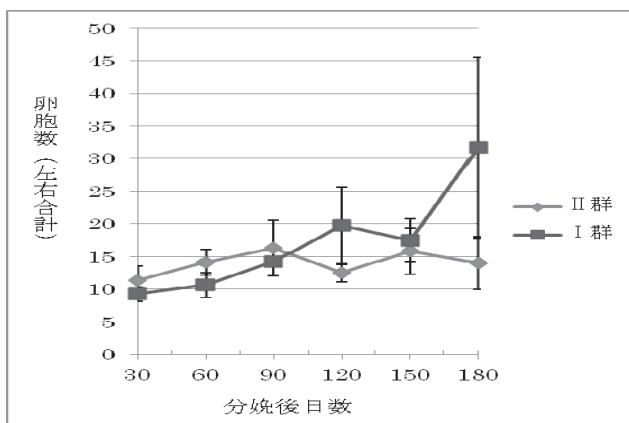


図 3 分娩後の卵胞数の推移（平均±標準誤差）

4 今後の問題点と次年度以降の計画

当センター供試牛における血液性状等の調査期間（6カ月）が終了していないため、サンプリング等を継続して行いデータ蓄積を図る。

3 血液性状と繁殖成績の関連調査

担当部署名：家畜生産技術部 家畜繁殖研究室

担当者名：○稲葉浩子 大島藤太 星一美 川野辺章夫 菊池草一

研究期間：平成22年度～24年度（継続） 予算区分：県単

1 目的

乳用牛において泌乳能力は飛躍的に向上した反面、分娩間隔の延長やAIにおける受胎率低下が課題となっている。こうした繁殖成績の低下は様々な要因の関与が考えられるが、分娩前後の栄養や代謝の状態と卵巣機能の関連が注目されている。

そこで本試験では分娩前後の栄養や代謝の状態をボディコンディションスコア(BCS)や体重および血液性状から評価し、卵巣機能との関連を調査する。

2 方法

当センターのフリーストール式牛舎繋養ホルスタイン種乳牛23頭（補正乳量平均11065kg、平均2.0産）を供した。

分娩前14日、分娩日および分娩後10、30、60、90、120、150、180日におけるアルブミン(ALB)、尿素窒素(BUN)、グルコース(GLU)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ(γ -GTP)、総コレステロール(T-Chol)、遊離脂肪酸(NEFA)、インスリン様成長因子(IGF-1)の血中濃度を測定した。

分娩前14日、分娩日および分娩後30、60、90、120、150、180日におけるボディコンディションスコア(BCS)と体重を測定した。

さらに、分娩日および分娩後10、30、60、90、120、150、180日における日乳量を測定した。

分娩後の卵巣機能の回復は分娩後30日における卵巣の状態を超音波画像診断法で確認し、黄体の有無より以下のように2群に分けた。各測定項目における2群の有意差はt検定で比較し、有意水準5%以下で有意を判定した。

- | | | |
|---|------------------|---------------|
| { | I. 卵巣早期回復牛群 8頭 | (分娩後30日：黄体あり) |
| | II. 卵巣遅延回復牛群 15頭 | (分娩後30日：黄体なし) |

3 結果の概要（平均値±標準誤差）

血液性状において、血中ALB、BUN、GLU、GOT、 γ -GTP、NEFA、IGF-1濃度は両群間で有意差は認められなかったが、分娩後90日と150日の血中T-Chol濃度は卵巣早期回復牛群が卵巣遅延回復牛群に比べ有意に高かった(表1)。

分娩前後のBCSにおいて両群間で有意差は認められなかった(図1)が、分娩日を基準とした分娩後60日における体重の減少は、卵巣早期回復牛群(-7.8±2.3kg)が卵巣遅延回復牛群(-29.9±9.9kg)に比べ有意に少なかった(図2)。

分娩後の日乳量において両群間で有意差は認められなかった(表2)。

表1 I. 卵巣早期回復牛群とII. 卵巣遅延回復牛群の血液検査結果

測定項目	群	分娩後日数								
		-14	0	10	30	60	90	120	150	180
ALB (g/dl)	I	3.6	3.7	3.5	3.6	3.9	3.8	3.8	3.8	3.8
	II	3.6	3.5	3.4	3.6	3.7	3.8	3.8	3.8	3.8
BUN (mg/dl)	I	8.1	8.6	8.8	7.5	10.3	9.6	13.1	11.4	10.9
	II	10.1	8.0	6.7	7.3	7.8	12.4	11.8	11.5	11.7
GLU (mg/dl)	I	65.0	76.5	57.1	59.4	65.0	64.3	70.8	67.3	67.9
	II	62.7	101.7	61.5	61.4	65.6	68.4	66.6	67.1	66.9
GOT (IU/L)	I	43.1	61.5	67.1	57.6	63.0	65.0	60.5	65.0	62.5
	II	48.9	64.9	95.2	49.7	55.7	59.9	64.4	64.3	64.1
γ-GTP (IU/L)	I	37.8	51.3	46.4	49.3	50.8	51.6	59.8	56.6	64.1
	II	33.0	39.2	35.3	35.7	38.9	43.0	46.3	47.5	49.5
T-Chol (mg/dl)	I	118.6	98.1	72.0	147.1	195.4	221.6 ^a	220.9	247.6 ^a	241.3
	II	93.5	67.2	82.5	127.7	164.1	172.9 ^b	192.8	190.9 ^b	197.6
NEFA (μEq/L)	I	253.7	745.4	459.4	348.2	155.6	122.7	166.3	122.1	153.7
	II	503.2	867.4	516.8	335.8	175.8	135.1	118.1	103.5	89.3
IGF-1 (ng/ml)	I	220.9	75.2	56.7	82.0	114.4	123.1	143.5	151.7	157.1
	II	165.2	78.1	67.2	95.2	117.9	127.0	137.1	141.1	154.2

平均値

ab : P<0.05

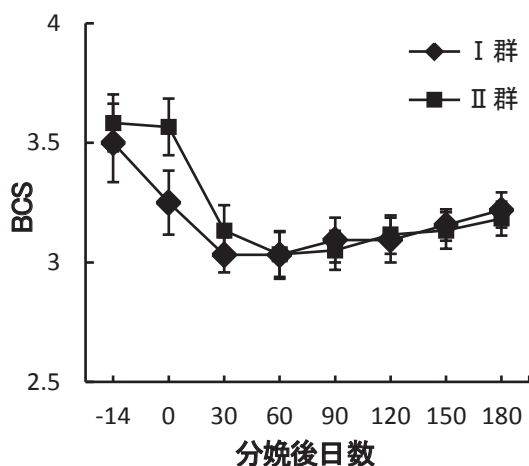


図1. I. 卵巣早期回復牛群とII. 卵巣遅延回復牛群のBCS (平均値±標準誤差)

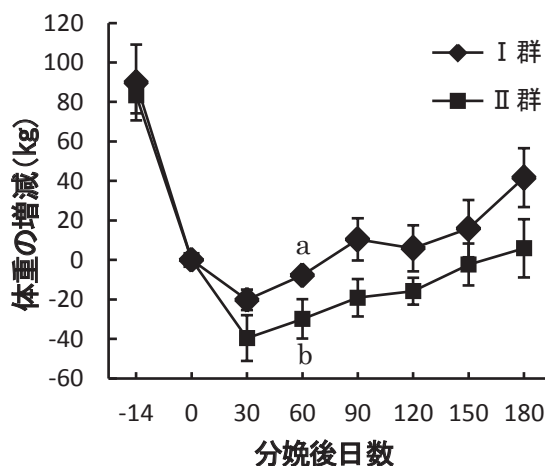


図2. 分娩日を基準としたI. 卵巣早期回復牛群II. 卵巣遅延回復牛群の体重増減の変化 (平均値±標準誤差) ab : P<0.05

表2 分娩後における日乳量 (kg)

群	分娩後日数								
	0	10	30	60	90	120	150	180	
I	33.0 ± 3.8	34.4 ± 2.4	32.7 ± 3.7	29.8 ± 3.3	40.5 ± 3.4	33.8 ± 2.5	32.4 ± 2.7	50.7 ± 1.8	
II	29.3 ± 1.4	35.1 ± 2.2	32.0 ± 2.0	26.0 ± 2.2	41.0 ± 1.8	29.5 ± 1.8	32.1 ± 1.6	47.9 ± 1.5	

平均値±標準誤差

4 今後の問題点と次年度以降の計画

前年度の結果と合わせ分娩前後の栄養状態が卵巣機能に影響することが示唆されたが、今後は血液性状および卵巣の超音波画像等と繁殖性について検討する。

4 遺伝的要因と生産能力及び繁殖成績の関連調査

担当部署名：家畜生産技術部 家畜繁殖研究室

担当者名：○大島藤太、稲葉浩子、星一美、川野辺章夫

研究期間：平成22年度～24年度（継続）

予算区分：県単

1 目的

近年、乳用牛の泌乳能力は向上した反面、分娩間隔の延長や人工授精の受胎率の低下が課題となっているが、その原因は複雑で決定的な情報に乏しい状況である。

本試験では、当场における血統管理の状況と繁殖成績を調査することで、近交係数と繁殖成績の関連を分析する。また、特定の血統で泌乳能力に一定の傾向があるかどうか、更に、それが繁殖成績にどのように影響するかを分析する。

2 方法

- (1) ホルスタイン成雌牛 135 頭を対象に近交係数を算出し、血統、生産能力と繁殖成績（初産月齢、授精回数、初回授精日数、空胎日数、補正乳量、補正乳脂量、リニアスコア、産次、生存日数）との相関関係を調査した。
- (2) 近交係数 6.25 未満と 6.25 以上の 2 群に分け、各測定項目における 2 群の有意差を t 検定で比較し、有意水準 5%以下で有意を判定した。

[I. 近交係数正常群 97 頭	(近交係数 6.25 未満)
	II. 近交係数異常群 38 頭	(近交係数 6.25 以上)
- (3) 当センターでは牛群での近交係数の上昇に対する対策として、平成 19 年から可能な限り近交係数 6.25 を超えない様な組み合わせで人工授精を実施している。そのため、誕生年別の近交係数の推移を算出し、全国平均と比較して対策の効果を検証した。

3 結果の概要

- (1) 近交係数は平均 5.46 ± 0.2 であり、2011 年の全国平均 5.54 とほぼ同様の結果となった。近交係数が 6.25 以上の牛は全体の 28.1%を占め、最大値は 16.33、最低値 2.09 であった。近交係数と各調査項目との間に有意な相関関係は認められなかった。
- (2) 近交係数 6.25 未満の群と 6.25 以上群の間で各調査項目について有意差は認められなかったが、近交係数 6.25 未満の群で 6.25 以上の群に比較して初回授精日の減少及び 305 日補正乳量の増加がみられたが、有意差は認められなかった。
- (3) 平成 19 年から対策を実施後、平成 20 年、21 年誕生の牛で近交係数が平均で 6.25 以下で横ばいとなった後、平成 22 年から 5.1 以下と全国平均を下回り、対策の効果がみられた。

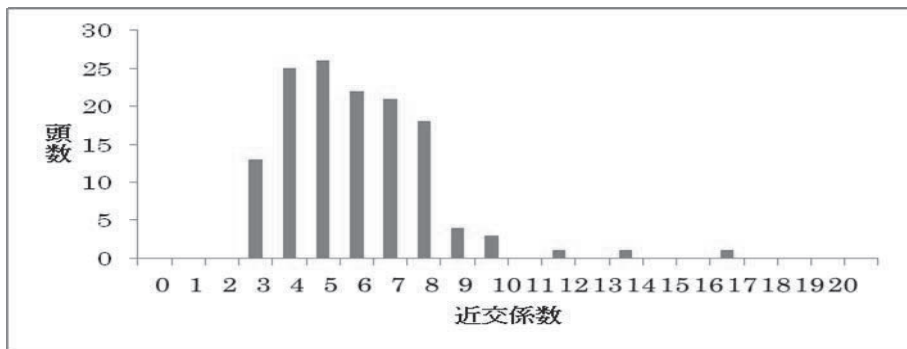


図1 畜産酪農研究センターの近交係数別頭数の分布 (平成23年)

表1 生産能力及び繁殖成績の比較

	近交係数 6.25 未満の群	近交係数 6.25 以上の群
初産月例	28.5±0.7	27.8±1.0
授精回数	2.6±0.9	1.8±0.2
初回授精日	195±12	212±24
空胎日数	237±14	240±26
305日補正乳量(kg)	10538±225	10336±437
305日補正乳脂量(kg)	437±9	414±14
リアスコア	2.86±0.14	2.68±0.22

平均値±標準誤差

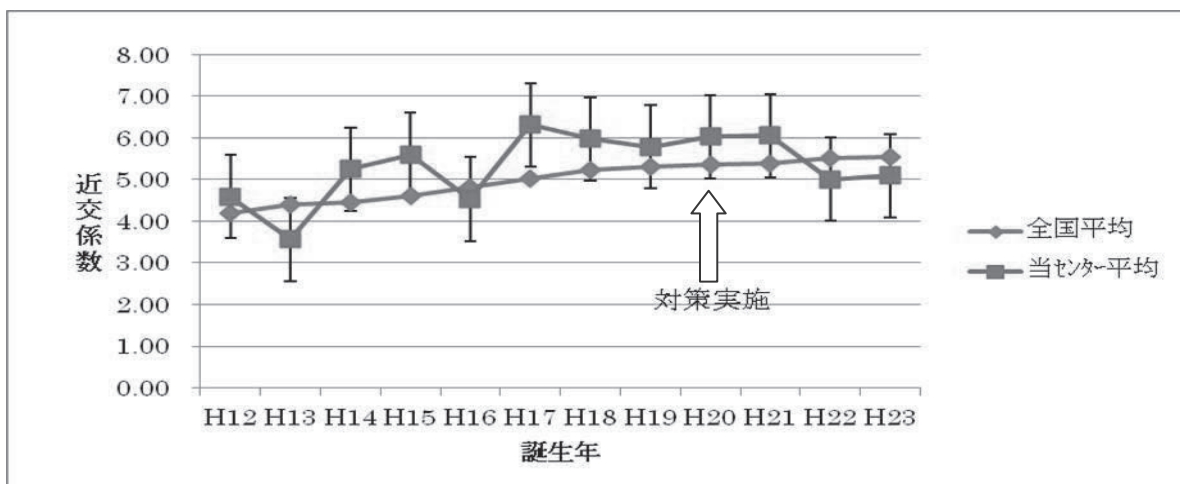


図2 誕生年別の近交係数の推移 (畜産酪農研究センター：平均±標準誤差)

4 今後の問題点と次年度以降の計画

県内の酪農家において全頭または一部血統登録を実施している酪農家は46.3%、交配の際に近交係数を計算している酪農家は9.5%にとどまっており、県内の酪農家において、近交係数の上昇に対する対策は十分とられていないことがアンケート調査からわかっている。そのため、今後は牛群検定に加入しており、個体の血統、生産能力、繁殖成績が把握できる県内酪農家の牛群を対象に、近交係数、血統、生産能力と繁殖成績との関連を調査する予定である。

5 乳用牛の遺伝子解析による生産性向上技術の開発

担当部署名：家畜生産技術部 家畜繁殖研究室

担当者名：○星一美、稲葉浩子、大島藤太、川野辺章夫、菊池草一

研究期間：平成23年度～27年度（新規）

予算区分：県単

1 目的

乳用牛の遺伝的能力は向上し、乳量が増加しているが、繁殖成績の低下や乳房炎など乳生産に関わる疾病の影響により、生産性は伸び悩んでいる。一方、遺伝子解析技術の向上により、各種経済形質に影響する遺伝子が報告され、それらを活用した改良技術が求められている。

そこで、抗病性に関与する遺伝子を検証するとともに、優良遺伝形質を有する家畜の選抜や計画交配に利用することで、生産性向上を図る。

今年度は、連鎖球菌および大腸菌に起因する乳房炎との関連が報告された BoLA-DQA1 遺伝子の多型解析を行い、初産次における乳房炎罹患の有無と比較検討した。

2 方法

供試牛には、栃木県畜産酪農研究センターで飼養しているホルスタイン雌牛のうち、平成20年4月1日以降に初産分娩し、平成23年3月31日までに初産次の搾乳期間が終了した32頭（罹患歴有：13、罹患歴無：19）を用いた。DNA サンプルは供試牛の血液を採取し、常法に従い抽出した。BoLA-DQA1 遺伝子の多型解析は、既報に準じて行った。なお、塩基配列は蛍光シーケンス法により決定した。塩基配列解析は GENETYX を使用し、既に登録されている BoLA-DQA1 遺伝子の塩基配列と比較し、型を判定した。BoLA-DQA1 遺伝子型と初産次の乳房炎罹患歴の有無との関連性について比較検討を行った。

3 結果の概要

(1) 遺伝子型解析結果より、13 遺伝子型が確認され、その出現率は 0101/10011 が 31.3% (10/32) と最も高く、次いで 10011/10011 が 15.6% (5/32) であった (表1)。

(2) 対立遺伝子の出現率結果より、10011 が 43.8% と最も高く、次いで 0101 が 28.1% であった。また、罹患歴無において、1401 の出現頻度が罹患歴有に比べ高い傾向を示した (表2)。

(3) 罹患歴無牛の検定成績において、1401 を有する牛の 305 日補正乳量は、それ以外の牛に比べ多い傾向を示し、体細胞数、リニアスコアは低い傾向を示した (表3)。

表1 乳房炎罹患の有無とBoLA-DQA1遺伝子型分布の比較

遺伝子型	罹患歴有(%)	罹患歴無(%)	計(%)
0101/0101	2(15.4)	1(5.3)	3(9.4)
0101/10011	4(30.8)	6(31.6)	10(31.3)
0101/10012	1(7.7)	0(0)	1(3.1)
0101/12011	0(0)	1(5.3)	1(3.1)
0203/12011	0(0)	1(5.3)	1(3.1)
0301/10011	0(0)	1(5.3)	1(3.1)
10011/10011	2(15.4)	3(15.8)	5(15.6)
10011/10012	0(0)	1(5.3)	1(3.1)
10011/12011	2(15.4)	0(0)	2(6.3)
10011/12021	0(0)	1(5.3)	1(3.1)
10011/1401	1(7.7)	2(10.5)	3(9.4)
10012/12011	1(7.7)	0(0)	1(3.1)
12011/1401	0(0)	2(10.5)	2(6.3)
計	13	19	32

表2 乳房炎罹患の有無とBoLA-DQA1対立遺伝子の出現率の比較

対立遺伝子	罹患歴有(%)	罹患歴無(%)	計
0101	34.6	23.7	28.1
0203	0	2.6	1.6
0301	0	2.6	1.6
10011	42.3	44.7	43.8
10012	7.7	2.6	4.7
12011	11.5	10.5	10.9
12021	0	2.6	1.6
1401	3.8	10.5	7.8

表3 罹患歴無牛の検定成績比較

頭数	1401を有する牛	それ以外の牛
	4頭	15頭
搾乳日数	369.8±93.8	357.0±47.0
305日補正乳量(kg)	11,024±1,804	10,708±1,741
体細胞数(千個/ml)	62.3±29.4	71.3±31.6
リニアスコア	1.65±0.40	2.26±0.65

平均値±標準偏差

4 今後の問題点と次年度以降の計画

今年度同様、BoLA-DQA1 遺伝子の多型解析を行い、データの蓄積を図る。