

1 性選別精液を利用した体内受精卵生産の高度化

担当部署名：乳牛研究室

担当者名：○青木亜紀子

研究期間：平成26年度～29年度

予算区分：県単

1. 目的

牛の生殖細胞操作技術は、体外受精、雌雄の産み分け（DNA検査、性選別精液）、双子生産、クローン牛生産等、受精卵移植技術を応用した先端的繁殖技術であり、遺伝的能力に優れた高能力牛を効率的に生産するために極めて重要な技術である。特にホルスタイン種の雌性選別精液（以下、選別精液）は後継牛の計画的生産に利用されており、選別精液を用いた受精卵生産の要望も増大している。

しかし、選別精液では1ストロー当たりの精子数が少なく、選別や凍結の過程で精子活力が低下することもあり、過剰排卵処理（以下、SOV）による受精卵生産成績は通常精液に比べ劣っている。そこで、選別精液を用いた効率的な雌受精卵の生産技術として、SOVの前処置として優勢卵胞を除去し（DFR）、卵胞発育及び排卵時間を一定にするSOVプログラムを開発した（平成25年度）。しかしDFRには卵子吸引（OPU）が可能な超音波画像診断装置が必要で、生産現場での実用性には乏しい。そこで、現場への普及を目的として、安価なホルモン剤（エストラジオール製剤、以下E剤）の投与により優勢卵胞を退行させる手法により、DFRと同等の効果が期待できる卵胞ウェーブの調整方法を検討した（平成26～27年度）。

平成28年度は通常精液と選別精液の精子数に着目し、同一回数の授精による採胎成績の比較を行った。

2. 方法

(1) 卵胞ウェーブの調整（優勢卵胞退行）及び過剰排卵処置

発情の直前及び直後を避けた任意の時期に留置型プロジェステロン製剤（CIDR）を膣内に挿入し、同時にE剤1ml（エストラジオールベンゾエイトとして2mg）を筋肉内に投与し、優勢卵胞を退行させた（Day0）。Day6の夕方から4日間で総量30AUの卵胞刺激ホルモンを漸減投与し、Day8にクロプロステノール製剤0.225mg（以下PG）を投与し、Day9にCIDRを除去して発情を誘起した。Day10にGnRH（酢酸フェルチレンリンとして200 μ g）を投与し、排卵を促進した。

(2) 人工授精及び採卵

Day11の朝9時に1回のみ人工授精（以下、AI）を行った。

対照区：通常精液1本を半量ずつ、左右の子宮角浅部に注入した。

試験区：選別精液（製造元及びロットは限定しない）を左右の子宮角浅部に2本または1本ずつ注入した。

両区とも、AI後6日目の午前に、常法により採卵を行った。

(3) 調査項目

採卵時の卵巣所見：超音波画像診断装置による推定黄体数及び遺残卵胞数の観察（3例）

採卵成績：回収卵数、正常卵数、変性卵数、未受精卵数、受精卵の品質（ランク及び発育ステージ）

3. 結果の概要

採卵時の卵巣所見及び採卵成績を表1に示した。

(1) 採卵時の卵巣所見では、推定黄体数に有意な差は認められなかった。

(2) 採卵成績において、回収卵数及び正常卵数ともに試験区で多い傾向にあり、正常卵数及び推定雌卵数で有意差が認められた（ $p<0.05$ ）。

(3) 正常卵の品質（ランク）について、試験区でCode I（良質な胚）の数が有意に多かったが（ $p<0.01$ ）、比率において両区に違いは認められなかった。また、発育ステージでも違いは認められなかった。（図1、2）

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

供胚牛の選定において泌乳ステージや年齢にバラつきがあったことから、同一牛での反復試験を含め、例数

を揃える必要がある。次年度は、選別精液を用いた受精卵生産において、授精の時期及び注入する精子数（使用するストローの本数）が受精卵の生産成績に及ぼす影響を調査し、適正な授精の時期及び注入精子数を検討する。

[具体的データ]

表 1 超音波画像診断による卵巣所見及び採卵成績

調査項目	試験区	対照区
供試頭数	3 頭	7 頭
推定黄体数	18.0±3.0 個	15.0±0.0 個
回収胚数	17.3±5.4 個	5.4±4.8 個
正常胚数 (推定雌胚数)	11.0±1.4 個 (9.9±1.3 個)	2.3±2.4 個 (1.1±1.2 個)
正常胚率	60.9%	84.6%
変性胚数	0.0±0.0 個	0.9±1.4 個
未受精卵数	3.0±4.2 個	2.3±3.7 個

(mean±sd)

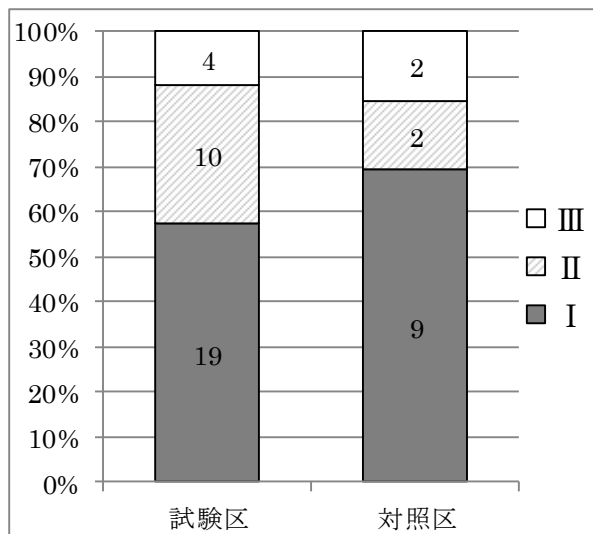


図1 正常卵ランク別の割合

※ Ⅰ：優良卵、Ⅱ：普通卵、Ⅲ：不良卵
(数字は個数)

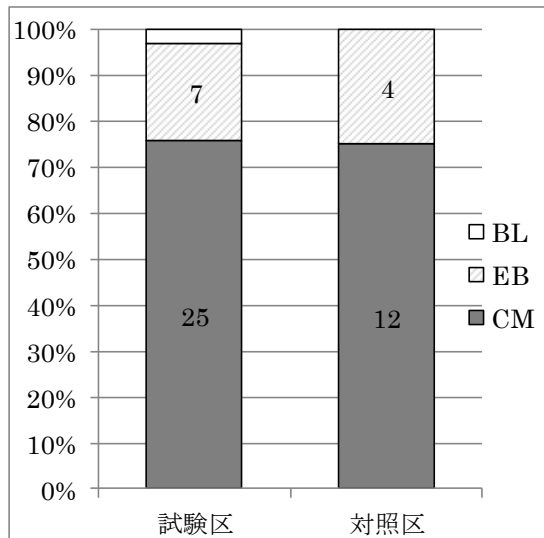


図2 正常卵のステージ別の割合

※ BL：胚盤胞 EB：早期胚盤胞 CM：収縮桑実胚
(数字は個数)

2 性選別精液に適した人工授精適期の検討

担当部署名：乳牛研究室

担当者名：○青木亜紀子

研究期間：平成27年度～29年度 予算区分：県単

1. 目的

牛の生殖細胞操作技術は、体外受精、雌雄の産み分け（DNA検査、性選別精液）、双子生産、クローン牛生産等、受精卵移植技術を応用した先端的繁殖技術であり、遺伝的能力に優れた高能力牛を効率的に生産するためには極めて重要である。特にホルスタイン種の雌性選別精液（以下、選別精液）は、後継牛の計画的生産に利用され、普及も進んでいる。

しかし、選別精液では1ストロー当たりの精子数が通常精液に比べて少なく、性選別処理の過程での精子活力の低下もあることから、受胎率は通常精液に比べ低くとどまっている。そこで、選別精液を用いた効率的な雌産子の生産技術として、発情同期化の技術を応用し、選別精液に適した人工授精（以下、AI）の時期を検討する。

卵胞ウェーブの調整方法については、同時に行っている「性選別精液を利用した体内胚生産の高度化試験」と同様、生産現場への普及を目的に、安価なホルモン剤（エストラジオール製剤、以下E剤）の投与により優勢卵胞を退行させる手法を用いる。

2. 方法

(1) 卵胞ウェーブの調整（優勢卵胞の退行）

発情の直前直後を避けた任意の時期に留置型プロジェステロン製剤（以下、CIDR）を膈内に挿入（Day0）、同時にE剤1ml（エストラジオールベンゾエイトとして2mg）を筋肉内に投与し、優勢卵胞を退行させる。

(2) 発情の同期化及び人工授精

Day8にクロプロステノール製剤0.225mg（以下PG）を投与、Day9にCIDRを除去し発情を誘起した。Day10にGnRH（酢酸フェルチレリンとして200 μ g）を投与して排卵を促進、翌日（Day11）に主席卵胞が存在する側の子宮角浅部に、性選別精液を1本注入した。

24h区：GnRH投与の24時間後にAIを行った。

30h区：GnRH投与の30時間後にAIを行った。

(3) 調査項目

超音波画像診断：GnRH投与時（Day10の9時）、AI当日（Day11）の午前9時から排卵が確認されるまで概ね3時間ごとに実施し、主席卵胞の動態を観察した。

受胎成績：発情が回帰しないものについて、AI後30日を経過した任意の時期に超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行った。

3. 結果の概要

(1) 24h区：7頭中2頭が受胎した。

30h区：3頭中3頭が受胎した。

(2) 平成27年度に本試験での性選別精液の授精（いずれも30h区）により受胎した2頭の産子は、いずれも雌であった。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

現時点では例数が少ないため、24h 区及び 30h 区それぞれについて例数を重ねる必要がある。

(8 県による共同試験)

3 代謝プロファイルテストを活用した受胎率向上技術の開発

担当部署名：乳牛研究室

担当者名：○豊田知紀、大輪真司、林美貴成

研究期間：平成27年度～平成28年度（完了） 予算区分：県単

1. 目的

乳用牛の泌乳能力は飛躍的に向上した反面、繁殖成績の低下や周産期疾病による生産性の低下が問題となっており、乳用牛の潜在的な代謝異常が関与していると考えられている。代謝プロファイルテスト（MPT）は、血液成分値等によって代謝の状況を評価する手法で、乳用牛の健康状態を把握する効果的な方法である。

これまで、当センターでは関係機関、団体及び診療獣医師と連携し県内酪農家の協力を得て、MPT及び飼養管理状況を調査・検討した。

2. 方法

県内酪農家において飼養されている乳用牛を泌乳ステージによって5期（初期、前期、中期、後期、乾乳期）に分け、各ステージから5頭を選定し、1戸あたり約25頭について一般血液成分の生化学検査、ボディコンディションスコア（BCS）、牛群検定情報（乳量、乳脂率、蛋白質率、分娩間隔、空胎日数、授精回数等）を調査した。

3. 結果の概要

- (1) 繁殖成績低下群では、乾乳期のBCSが高く、泌乳初期から最盛期にかけて、削瘦しており、血中遊離脂肪酸の推移からも同様の結果が示唆された。
- (2) 繁殖成績低下群は、分娩前の過肥により分娩後にアシドーシス、又は潜在性アシドーシスを発症していたものと考えられた。
- (3) 繁殖成績低下群の血糖値は、泌乳初期に良好群に比べ低く推移しており、栄養不足に陥っていたものと推察され、これらが受胎率に影響を及ぼしたものと推察した。
- (4) 発情回数理論値と検定成績値が近似していた農家（表2）では、発情回帰、性周期も良好であったものと推察され、結果、分娩間隔も短い傾向にあった。
- (5) MPTと牛群検定成績を有効活用することは、飼料設計メニューや各種疾病の予防と対策等の検討を行うため、多くの関係者が協力することが重要である。

表1 各泌乳期における血液成分値

区分	泌乳期	Glc	NEFA	T-Cho	BCS	Ht	BUN	Alb	TP	AST	GGT	Ca	iP	Mg
		mg/dL	μEq/L	mg/dL		%	mg/dL	g/dL	g/dL	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL
繁殖良好群	乾乳 (n=16)	59.7	114.4	125.7	3.0	34.2	13.8	3.6	7.4	60.8	21.8	9.1	6.6	2.3
	初期 (n=14)	56.4	151.4	168.9	2.9	30.7	15.1	3.5	7.6	87.6	21.4	9.4	5.9	2.6
	最盛期 (n=13)	58.8	107.3	234.2	2.9	31.2	15.0	3.6	7.4	85.8	29.9	9.4	6.3	2.5
	中期 (n=15)	59.3	89.3	225.3	2.9	31.9	14.1	3.6	7.9	83.6	26.1	9.2	5.6	2.5
	後期 (n=15)	58.4	85.3	228.9	3.1	33.4	13.3	3.6	7.7	82.4	25.1	9.4	5.9	2.5
繁殖成績低下群	乾乳 (n=10)	59.1	169.0	112.8	3.7	34.7	8.3	3.7	7.5	73.7	23.2	9.4	6.5	2.4
	初期 (n=7)	51.6	354.3	205.3	3.0	30.1	12.0	3.7	7.5	82.6	29.3	9.5	5.2	2.6
	最盛期 (n=10)	56.2	204.0	294.1	2.9	31.1	15.3	3.6	7.4	94.3	30.1	9.4	6.0	2.4
	中期 (n=11)	54.0	159.1	284.5	2.9	30.7	14.0	3.7	7.5	97.5	33.6	9.1	6.1	2.4
	後期 (n=14)	58.5	96.4	281.2	3.2	33.9	14.1	3.5	7.7	95.4	33.9	9.2	6.1	2.5

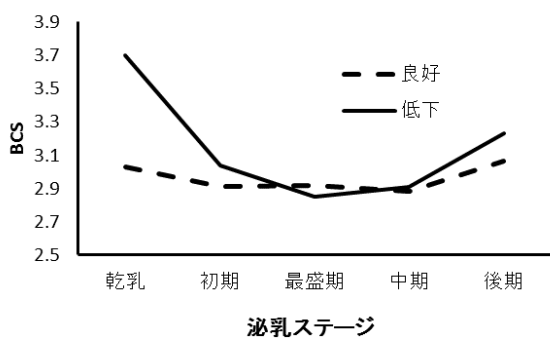


図1 ボディコンディションスコアの推移

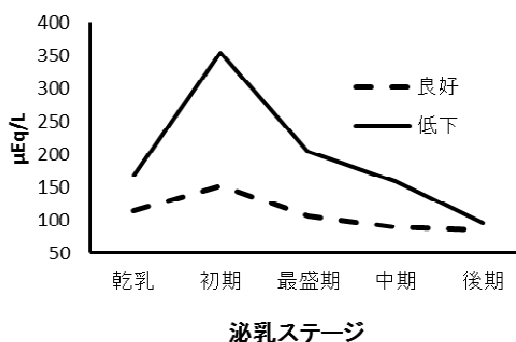


図2 血中遊離脂肪酸の推移

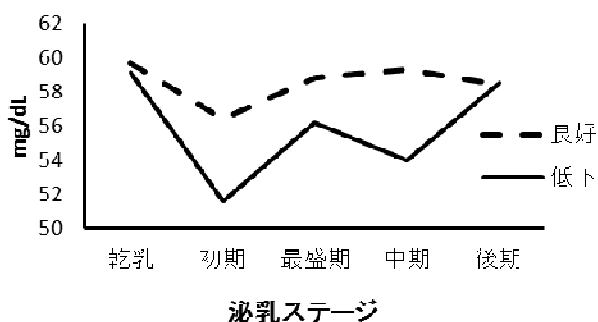


図3 血糖値の推移

表2 発情発見率の高い農家 (例示)

① 分娩間隔	414 日
③ 妊娠期間	283 日
⑤ 発情回帰日数	60 日
⑦ 次回受精猶予期間	71 日
⑨ 空胎日数 (③+④)	131 日
⑪ 性周期	21 日
⑬ 発情回数	4 回
⑮ 平均授精回数 (理論値)	3.4 回

牛群検定成績

平均授精回数	2.9 回
空胎日数	127 日
分娩後初回授精日数	69 日
発情発見率	77.1 %

表3 発情発見率の低い農家 (例示)

② 分娩間隔	475 日
④ 妊娠期間	280 日
⑥ 発情回帰日数	60 日
⑧ 次回受精猶予期間	135 日
⑩ 空胎日数 (③+④)	195 日
⑫ 性周期	21 日
⑭ 発情回数	7 回
⑯ 平均授精回数 (理論値)	2.2 回

牛群検定成績

平均授精回数	1.4 回
空胎日数	250 日
分娩後初回授精日数	171 日
発情発見率	29.4 %

4 飼料用粃米等の効率的な給与による低コスト生乳生産技術の開発と実証

担当部署名：乳牛研究室

担当者名：○室井章一、大輪真司、林美貴成

研究期間：平成 28 年度（完了） 予算区分：受託

1. 目的

飼料自給率向上が喫緊の課題となっている現状で、輸入穀類の代替として水田を活用して生産できる飼料用粃米の利用が注目されているが、乳牛への給与事例は極めて少ない。

そこで、泌乳中後期ホルスタイン種を供試し、破砕粃米サイレージを加えた飼料の給与試験を実施し、乳生産等に及ぼす影響を明らかにする。

2. 方法

(1) 供試動物 : 泌乳中後期ホルスタイン種 6 頭

(2) 試験実施方法 : 3 × 3 のラテン方格法

(3) 試験区 (表 1)

T20 区 : 破砕粃米サイレージを乾物中 20% 配合した飼料を TMR で給与する区

B20 区 : 破砕粃米サイレージを乾物中 20% 配合した飼料を分離給与方式で給与する区

T25 区 : 破砕粃米サイレージを乾物中 25% 配合した飼料を TMR で給与する区

(4) 調査項目 : 飼料摂取状況、体重、乳生産、第一胃内容液性状、血液性状

3. 結果の概要

(1) 乾物摂取量、日乳量、乳脂率、乳タンパク質率、無脂固形分率および乳中尿素窒素については、区間に有意差は認められなかった (表 2)。

(2) 第一胃内容液の総 VFA 濃度及び組成については、区間に有意差は認められなかった。また、第一胃内容液の pH について、T25 区と T20 区、T25 区と B20 区の間にそれぞれ有意差 (5% 水準) が認められた。(表 3)。しかし、第一胃内容液の pH はいずれの区においてもルーメンアシドーシスが疑われるほどの低値ではなく、T25 区で有意に高いという結果になったことから、粃米サイレージ給与による負の影響ではないと示唆された。

(3) 血液性状については、区間に有意差は認められなかった (表 3)。

以上のことから、泌乳中後期ホルスタイン種において、給与飼料乾物中 20% の破砕粃米サイレージの分離給与および給与飼料乾物中 25% の破砕粃米サイレージの TMR 給与は、給与飼料乾物中 20% の破砕粃米サイレージの分離給与に比べ、乳生産は同等であり、また、血液性状に及ぼす影響も認められず、第一胃内容液性状に及ぼす負の影響も認められなかった。

[具体的データ]

表1 供試飼料 (乾物中%)

項目 \ 試験区	T20区	B20区	T25区
配合割合			
トウモロコシサイレージ	20.0	20.0	20.0
粳米サイレージ	8.5	8.5	10.5
市販配合飼料(粗飼料入り)	10.0	10.0	8.0
エンバク乾草	6.0	6.0	6.0
大豆粕	1.5	1.5	1.5
リン酸カルシウム	0.1	0.1	0.1
炭酸カルシウム	0.2	0.2	0.2
ビタミン剤	0.1	0.1	0.1
計	100	100	100
成分含量等			
可消化養分総量	69.1	69.1	69.7
粗タンパク質	13.7	13.7	13.5
中性デタージェント繊維	34.4	34.4	33.9
粗脂肪	3.0	3.0	3.0

¹⁾設計値

表2 乳生産

項目 \ 試験区	T20区	B20区	T25区	
供試頭数				
体重	kg	758	741	763
乾物摂取量	kg	25.9	26.5	26.7
乳量	kg/日	34.7	35.6	34.4
乳脂率	%	4.24	3.92	3.89
乳タンパク質率	%	3.68	3.67	3.59
無脂固形分率	%	9.25	9.16	9.13
乳中尿素窒素	mg/dl	11.12	11.13	9.92

表3 第一胃内容液性状および血液性状

項目 \ 試験区	T20区	B20区	T25区	
第一胃内容液				
pH	6.68 a	6.57 a	7.35 b	
総VFA濃度	mmol/dl	8.94	8.38	9.29
酢酸	mmol/dl	5.41	5.21	5.62
プロピオン酸	mmol/dl	2.00	1.69	2.03
酢酸/プロピオン酸比		2.81	3.22	2.88
血液				
グルコース	mg/dl	56	54	55
総コレステロール	mg/dl	205	200	217
尿素窒素	mg/dl	9	10	8
γ-GTP	IU/L	55	54	55

同一行の異符号間に有意差有り($P < 0.05$)

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

粳米サイレージの加工形態や給与方法に応じた泌乳牛向け推奨給与メニューを研究センターでの長期給与試験において開発し、現地での飼料給与試験により成果を実証し技術確立する。

5 生乳中機能性成分を高める飼養管理による泌乳牛へのプラス効果

担当部署名：乳牛研究室

担当者名：○大輪真司、林美貴成、室井章一

研究期間：平成 28 年度～平成 29 年度（継続） 予算区分：県単

1. 目的

近年、牛乳消費量が低迷する一方、チーズや発酵乳等の乳加工品の需要が高まっている。このような中、酪農家から高品質で加工後も特徴が生かせる生乳の生産技術が求められている。そこで、乳中に含まれる機能性成分（ α トコフェロール等）を高める飼養管理技術を開発すると共に、乳牛へのプラス効果（暑熱時の酸化ストレス低減効果等）についても分析することで、酪農家の収益の増加に寄与する。

2. 方法

(1) 供試家畜：泌乳前期ホルスタイン種 7 頭

(2) 試験：イネ WCS の配合割合（乾物中）によって、3 区を設定した飼養試験。
試験期間は分娩後 1～9 週間とした。

(3) 試験区（表 1）

10%区：イネ WCS を乾物中 10%配合した TMR を給与する区（2 頭）

25%区：イネ WCS を乾物中 25%配合した TMR を給与する区（3 頭）

40%区：イネ WCS を乾物中 40%配合した TMR を給与する区（2 頭）

(4) 調査項目：飼料摂取量、乳量、乳成分、第一胃内容液性状、血液性状、生乳生産費、生乳及びその加工品（チーズ）中の脂溶性ビタミン等濃度

3. 結果の概要

(1) 乾物摂取量は 40%区で 10%区に比べて低い値を示した（表 2）。

(2) 日乳量は 10%区が他の 2 区に比べて低い値を示し、乳蛋白質率及び無脂固形分率は 40%区が他の 2 区に比べて低い値を示した。また、乳中尿素窒素は 40%区が最も高く、25、10%区の順に高い値であった。一方、乳脂率は区間で有意な差は認められなかった（表 2）。

(3) 血液性状について、GOT の値は 40%区が 10%区に比べて高く、 γ -GTP の値は 40%区が 25%区に比べて高い値を示した。また、血中尿素窒素は 40%区が最も高く、25%、10%区の順に高い値であった。その他の成分については、区間で有意な差は認められなかった（表 3）。

(4) 乳中ビタミンについて、 α トコフェロール及び β カロテンの値は 40%区で他の 2 区に比べて高い値を示した。一方、レチノールの値は区間に差は認められなかった。

以上のことから、泌乳前期ホルスタイン種にイネ WCS を乾物中 40%配合した TMR を給与したところ、乾物摂取量が減少する一方、日乳量が増加することが明らかとなった。また、乳中の α トコフェロール及び β カロテン濃度が上昇することが明らかとなった。ただし、供試頭数が少ないことから、個体差の影響が考えられるため、本年度と同条件下で飼養試験を実施する必要がある。

表1 飼料組成及び成分含量(乾物%)

項目\試験区	10%区	25%区	40%区
飼料組成			
イネWCS	10.6	24.9	39.6
トウモロコシサイレージ	22.2	24.1	10
オーツ乾草	11.8	0	0
市販配合飼料	42.3	36.3	38.4
市販配合飼料(高蛋白)	5.4	8.7	10
ビートパルプ	5.3	4.1	0
その他	2.4	1.9	2.0
成分含量			
乾物率	53.7	46.9	50.1
可消化養分総量	70.9	70.8	69.2
粗蛋白質	14.6	14.9	15.1
粗脂肪	6.4	6	6.2
中性デタージェント繊維	35.5	34.5	33.2

表2 飼料摂取量および乳生産

項目\試験区	10%区	25%区	40%区
乾物摂取量	kg/日 24.0 a	23.1 ab	22.8 b
日乳量	kg/日 40.7 Aa	44.3 ABb	45.8 Bb
乳脂率	% 3.15	3.30	3.48
乳蛋白質率	% 3.06 A	2.96 AB	2.74 C
無脂固形分率	% 8.58 A	8.48 AB	7.97 C
乳中尿素窒素	mg/dl 7.9 A	11.8 B	14.7 C

同一行の異符号間に有意差有り(大文字 $P < 0.01$ 、小文字 $P < 0.05$)

表3 血液性状

項目\区	10%区	25%区	40%区
グルコース	mg/dl 48.6	46.8	41.3
GOT	IU/L 49.1 a	65.6 ab	76.3 b
γ -GTP	IU/L 39.6 ab	33.1 a	42.5 b
総コレステロール	mg/dl 146.6	141.1	160.8
Ca	mg/dl 9.3	9.2	9.3
血中尿素窒素	mg/dl 7.4 A	13.8 B	19.0 C
血中遊離脂肪酸	μ Eq/L 135.0	133.0	250.0

同一行の異符号間に有意差有り(大文字 $P < 0.01$ 、小文字 $P < 0.05$)

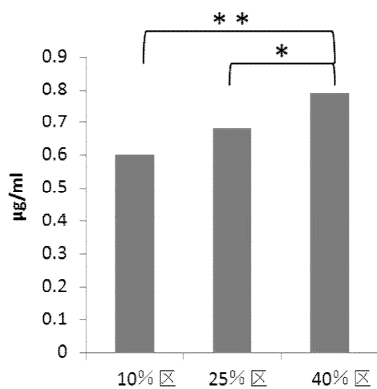


図1 乳中α-トコフェロール濃度

** : $P < 0.01$ 、* : $P < 0.05$

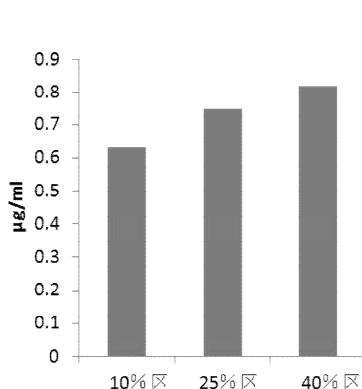


図2 乳中レチノール濃度

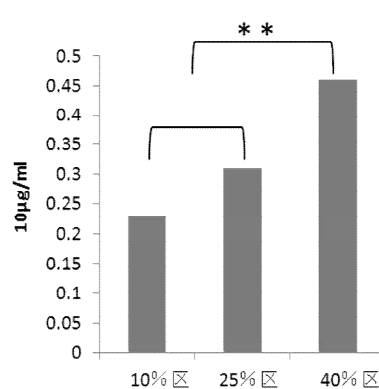


図3 乳中βカロテン濃度

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

供試頭数が少ないため、次年度も同様の試験区で飼養試験を実施する。