

# 遺伝的能力に優れた乳用牛の効率的増産技術の確立

三好勇紀、青木亜紀子<sup>1)</sup>、野口宗彦  
1)現 農業大学校

## 要 約

ホルスタイン種乳用牛の効率的な増産技術を確立するために、4つの検証を行った。

試験1では腔内留置型徐放性黄体ホルモン製剤による発情同期化(CIDR-Sync)を基本としたSOVプログラムにおいて、第一卵胞波時にFSH製剤の減数投与方法によるSOVを実施し、採胚成績に及ぼす影響を調査した。総採卵数・正常胚数・正常胚率のいずれにおいても有意な差は認められず、胚の品質や発育も同等で、卵胞も同様の動態を示した。

試験2では、腔内留置型徐放性黄体ホルモン製剤による(CIDR-Sync)を基本としたSOVプログラムにおいて、プログラム初日から採胚実施前日までの16日間アスタキサンチン含有飼料給与を実施し、採胚成績に及ぼす影響を調査した。試験区では対照区に比べ正常胚率が有意に高かった。

試験3では育成牛におけるゲノミック評価の活用のため、国内外のゲノミック評価を比較した。その活用法について検討し、早期選抜のための繁殖計画を作成した。

試験4では性選別精液における受胎率を黄体と第一卵胞波主席卵胞(1DF)の位置に着目して、受胎率に及ぼす要因を調査、分析し性選別精液の受胎率向上の可能性を検討した。検討の結果、黄体と1DFの位置関係と受胎率に傾向は認められなかった。

## 目 的

近年、乳用牛の繁殖成績の低下が問題となっている。繁殖成績が低下している要因の一つとして育種改良により牛個体の泌乳量が増加したためと考えられている<sup>1)</sup>。家畜改良事業団によると、1989年に62%であった初回受胎率が年々減少し、2013年には44%まで低下した報告もある<sup>2)</sup>。受胎率の低下は乳房炎と並み酪農経営における大きな損失となる。酪農経営維持には泌乳能力に優れていることはもちろんのこと、その他、繁殖形質、健康形質及び体型形質も優れている、言い換えると、遺伝的能力に優れている牛を選別し、それらの牛から効率的に後継牛を確保していく必要がある。

そこで遺伝的能力に優れた効率的増産技術を検討するため、試験1及び2ではSOVする際の頻回FSH投与の省力化とアスタキサンチンの給与の効果、試験3では、近年、実用化されてきたゲノミック評価の活用、試験4では人工授精前後の卵巣動態が受胎率に及ぼす影響に着目し、本研究に取り組んだ。

## 試験I 卵胞波調節を併用したFSH減数投与方法の開発

### 試験1-①

#### 材料及び方法

##### 1 供試牛

栃木県畜産酪農研究センター(以下、センター)で飼養するホルスタイン種経産牛延べ47頭を供試。各区と反転

処理を行った個体については、実施の順が偏らないよう、採胚と採胚の間隔は60日以上あけて反転試験を行った。採胚時の年齢は2~12歳、産次は1~5産、分娩後の経過日数は132~1,633日であった。

##### 2 SOVプログラム

いずれの区においても発情の直前直後を避けた任意の時期の夕方にCIDR(シダー1900、ファイザー株式会社、東京)を腔内に挿入し、同時にエストラジオール安息香酸エステル製剤(EB、あすかアニマルヘルス株式会社、東京)1mLを筋肉内に投与し、優性卵胞を退行させ、day0とした。

2ショット区ではday4の夕方にブタ由来精製卵胞刺激ホルモン製剤(FSH、アントリン・R10:共立製薬株式会社、東京)20AUを生理食塩水50mLに溶解し皮下投与、day5の夕方にさらにFSH10AUを生理食塩水20mLに溶解し皮下投与、day7の夕方にクロプロステノール製剤(PG、ダルマジン:共立製薬株式会社)3mL筋肉内投与して黄体の退行を促し、day8にCIDRを抜去して発情を誘起、day9にG酢酸フェルチレリン製剤(GnRH、スポルネン・注、共立製薬株式会社)4mLを筋肉内投与して排卵を促進、day10の午前中(GnRH投与後24時間)に人工授精(AI)を行い、day16の午前中に子宮灌流の定法により胚の回収を行った(図1)。

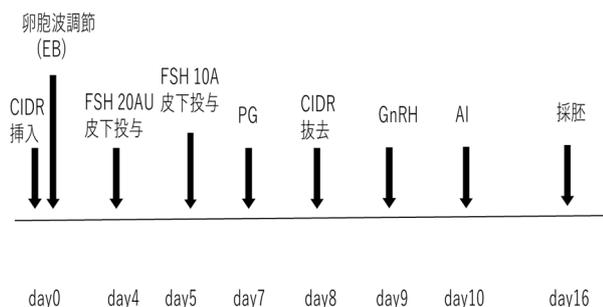


図1 2ショット区の卵胞波調節と過剰排卵プログラム

4 ショット区では day4 の夕方から 4 日間 4 回 (12, 8, 6, 4) に分けて FSH30AU を筋肉内に漸減投与した。その後のホルモン処理は 2 ショット区と同様に行った (図 2)。

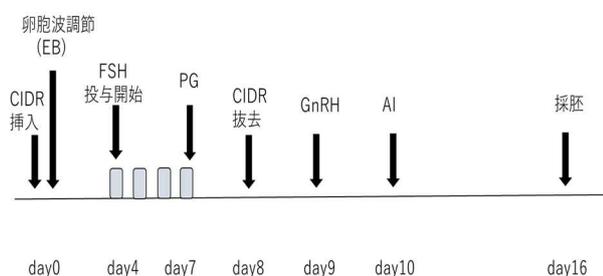


図2 4ショット区の卵胞波調節と過剰排卵プログラム

対照区では day4 の夕方から 4 日間 8 回 (6, 6, 4, 4, 3, 3, 2, 2) に分けて FSH30AU を漸減投与した。その後のホルモン処理は 2 ショット区および 4 ショット区と同様に行った (図 3)。

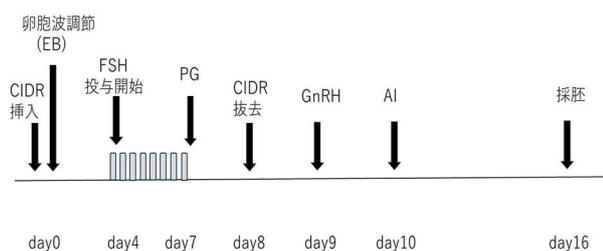


図3 対照区の卵胞波調節と過剰排卵プログラム

なお、いずれの区も AI には性選別精液を用い、左右の子宮角浅部に 1 本ずつ計 2 本を、0.25mL 用精液注入器 (A-2、富士平工業株式会社、東京) を用いて注入した。ストローの融解も注入ごとに 1 本ずつ行い、シースカバーで保護し注入の直前まで体温で保温した。

### 3 調査項目

#### (1) 採胚成績

16 日目の採胚時に超音波画像診断装置 (USG、HS-101V、本多電子、愛知) を用いて推定黄体数及び遺残卵胞数をカウントし、検卵時に採胚総数、正常胚数、変性胚数及び未受精卵数を測定した。

また、正常胚は、発育時期 (収縮桑実胚 CM; compacted morula、初期胚盤胞 EB; early blastocyst、胚盤胞 BL; blastocyst、拡張胚盤胞 EXB; expanded blasocyst) と品質 (国際胚移植学会 IETS マニュアル<sup>3)</sup> に基づきコード 1~4) について分類した。

#### (2) 卵巢動態

CIDR 挿入時、FSH 投与時、CIDR 抜去時、GnRH 投与時、AI 時 (GnRH 投与 24 時間後)、AI 翌日 (GnRH 投与 48 時間後) 及び採胚時に、超音波診断装置 (USG、HS-101V) による卵胞の大きさ及び数の推移について観察を行った。卵胞は径が 8mm 以上のものを大卵胞、5~7mm のものを中卵胞、2~4mm 以内のものを小卵胞とした。

また、採卵成績については採卵総数、正常胚数を記録、正常胚については胚の品質 (ランク) 及び発育の状態 (ステージ)、変性胚の個数及び状態、未受精卵の個数について観察を行った。なお、各区間の統計処理は t 検体により行い、有意水準 0.05 未満を有意差有りと判定した。

## 結果

#### 1 採胚成績

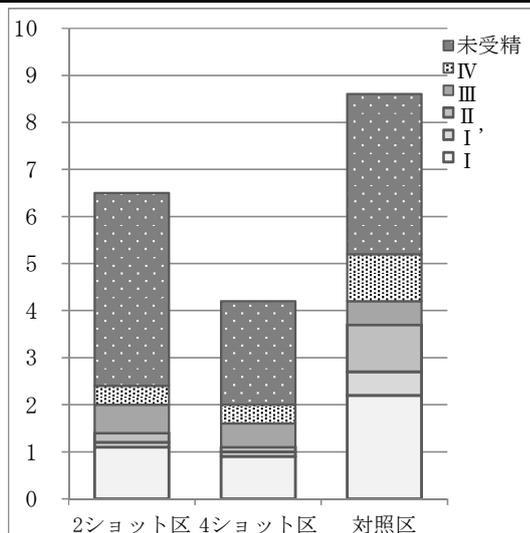
採卵総数・正常胚数・正常胚率・未受精卵率は、表 1 のとおりであり、両区に差は認められなかった。

回収胚におけるランクは図 4、正常胚におけるステージは図 5 のとおりであり、両区に差は認められなかった。

なお、胚盤胞より発育が進行した胚は回収されなかった。

表1 採卵成績 (試験1-①)

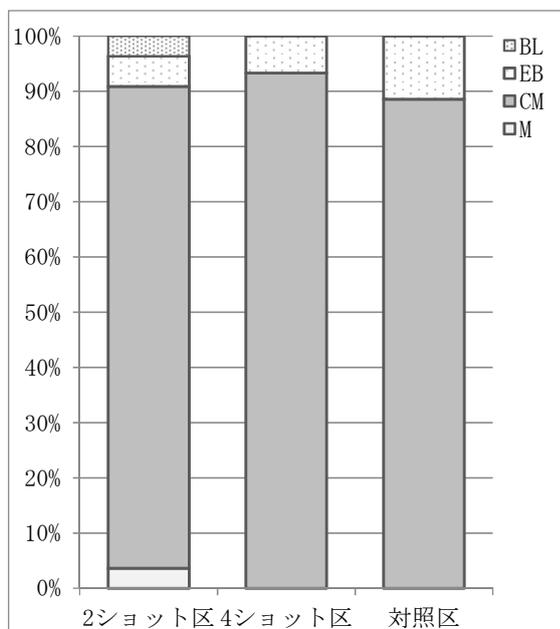
区分	供試頭数 (延べ)	採卵総数 (個)	正常胚数 (個)	正常胚率 (%)	変性胚数 (個)	未受精卵数 (個)	遺残卵胞数 (個)
2ショット区	14	9.0±10.2	1.8±2.4	31.7±35.2	4.3±10.3	1.1±1.8	1.5±2.3
4ショット区	12	8.6±3.3	1.3±1.9	15.6±23.2	4.1±3.3	3.2±3.5	6.0±5.7
対照区	21	12.0±7.3	3.4±4.5	28.5±34.8	4.0±5.4	3.7±5.2	5.1±3.9



※ I: 優良卵、I': I と II の中間

II: 普通卵、III: 不良卵、IV: 変性卵

図4 回収された胚の品質 (試験1-①)



※EB: 早期胚盤胞 CM: 収縮桑実胚 M: 桑実胚

図5 正常胚のステージ別の割合 (試験1-①)

## 2 卵巢動態

各区における処理開始時及びSOV 開始時には多数の小卵胞が認められたが、GnRH 投与時及びAI 時には著しく減少、大卵胞が増加し、GnRH 投与48 時間後には大卵胞が著しく減少していることから、その多くが排卵したと推定された。

また、2ショット区において採卵時の遺残卵胞数が少ない傾向にあった。

## 試験1-②

### 材料及び方法

#### 1 供試牛

センターで飼養するホルスタイン種経産牛延べ6 頭を供試牛とした。2 区反転処理で、実施の順が偏らないよう、採卵と採卵の間隔は60 日以上あけて計2 回採卵を実施した。なお、供試牛の概要は表2 のとおりで、採卵時の年齢は3~7 歳、産次は1~5 産、分娩後の経過日数は81~555 日であった。

表2 供試牛の概要 (試験1-②)

	年齢	産次	分娩後日数
4+1 ショット区	4.7±1.0	2.7±1.0	314.7±98.9
対照区	4.3±0.7	2.7±1.0	288.0±108.2
総平均	4.5±0.6	2.7±0.7	301.3±73.5

#### 2 SOV プログラム

4+1 ショット区では試験1-①に準じ、CIDR 挿入をday0 として同時にEB1mL を投与。day4 の夕方から3 日間4 回に分けてFSH20AU を筋肉内に漸減投与、4 回目の筋肉注射と同時にFSH10AU を皮下投与した。day7 の夕方にPG3mL により黄体の退行を促し、day8 の朝にCIDR を抜去、day9 の朝にGnRH4mL により排卵を促進、day10 の朝にAI、day16 に定法により胚の回収を行った (図6)。

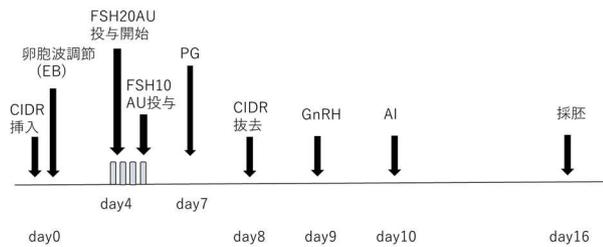


図6 4+1 ショット区の卵胞波調節と過剰排卵プログラム

また、対照区については試験1-①と同様のプログラムで行った。ホルモン剤等の銘柄、製造元は全て試験1-①と同じものを使用した。

なお、いずれの区もAIには性選別精液を用い、左右の子宮角浅部に1本ずつ計2本を、0.25mL用精液注入器を用いて注入した。ストローの融解も注入ごとに1本ずつ行い、シースカバーで保護し注入の直前まで人体温で保温した。

### 3 調査項目

#### (1) 採胚成績

16日目の採胚時に超音波画像診断装置(USG、P09VET)を用いて推定黄体数及び遺残卵胞数をカウントし、検卵時に採胚総数、正常胚数、変性胚数及び未受精卵数を測定した。

また、正常胚は、発育時期(収縮桑実胚 CM; compacted morula、初期胚盤胞 EB; early blastocyst、胚盤胞 BL; blastocyst、拡張胚盤胞 EXB; expanded blasocyst)と品質(国際胚移植学会 IETS マニュアルに基づきコード1~4)について分類した。

表3 採卵成績(試験1-②)

区分	供試頭数 (延べ)	採卵総数 (個)	正常胚数 (個)	正常胚率 (%)	変性胚数 (個)	未受精卵数 (個)	遺残卵胞数 (個)
4+1 ショット区	3	1.7±1.2	0	0	1.7±1.2	0	6.7±4.0
対照区	3	4.7±4.5	0.7±0.9	33.0±47.0	4.0±5.0	0	6.0±2.9

#### (2) 卵巢動態

CIDR 挿入時、FSH 投与期間中(day4~6)の夕方、PG 投与時、CIDR 抜去時、GnRH 投与時、AI 時(GnRH 投与 24 時間後)、AI 翌日(GnRH 投与 48 時間後)及び採卵時に、超音波診断装置による卵胞の大きさ及び数の推移について観察を行った。卵胞は径が 8mm 以上のものを大卵胞、5~7mm のものを中卵胞、2~4mm 以内のものを小卵胞とした。

また、採卵成績については採卵総数、正常胚数を記録、正常胚については胚の品質(ランク)及び発育の状態(ステージ)、変性胚の個数及び状態、未受精卵の個数について観察を行った。なお、各区間の統計処理は t 検体により行い、有意水準 0.05 未満を有意差有りとして判定した。

### 結果

#### 1 採卵成績

採卵総数・正常胚数・正常胚率・未受精卵率は、表3のとおりであり、採卵総数は対照区で多い傾向にあったが、有意な差は認められなかった。4+1 ショット区では正常胚は回収できなかった。

回収された胚のランクは図6のとおりであり、変性胚数に両区に差は認められなかった。また、対照区で回収できたステージはEBとCMであった(図7)。

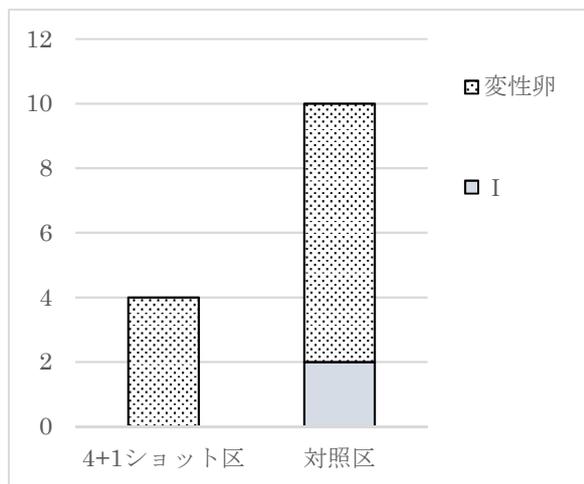


図6 回収された胚のランク別個数

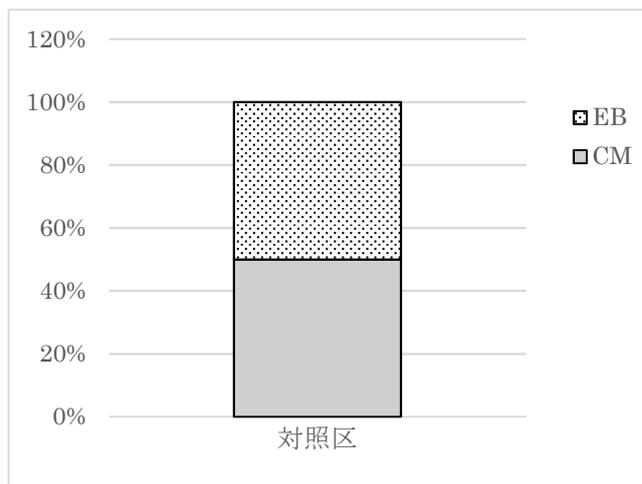


図7 正常胚のステージ別の割合 (試験1-②)

## 2 卵巣動態

試験1-①同様、各区における処理開始時及びSOV開始時には多数の小卵胞が認められたが、GnRH投与時及びAI時には著しく減少、大卵胞が増加し、GnRH投与48時間後には大卵胞が著しく減少していることから、その多くが排卵したと推定された。

## 考察

漸減投与方法である対照区と比較して、4ショット区、2ショット区では回収採卵数、正常胚数に有意な差が認められなかったことから、ホルモン処置に対する反応性に差はないことが示唆された。しかしながら、対照区において、採卵総数及び正常胚数が多い傾向であったことから、試験区では投与したFSHが血中に留まる時間が短く、それにより卵胞サイズが十分に育たなかったことが要因の1つと考えられた。牛の定時AIプロトコールにおいて、排卵誘起で用いられるGnRHは卵胞サイズが小さい時期に投与すると受胎率を低下させる<sup>3)</sup>。そのため、試験区の牛では卵胞サイズが小さい時期にGnRHを投与されたことにより、強制的な排卵を促し、採胚成績を低下させる要因になったと考えられた。卵胞は直径8mm以上に発育するとFSHから黄体形成ホルモン(LH)依存性に移行して排卵に至るが、卵胞の発育を促すLHのパルス分泌は血中の黄体ホルモン(P4)により制御されている<sup>5)6)</sup>。対照区では漸減投与期間中、PG投与以降の低P4環境下において、発育の速い卵胞はLH依存性へ移行し、発育の遅い卵胞にはFSHの作用により発育が促されたことによって、より多くの卵胞が発育され、それにより採卵総数及び正常胚数が多くなったと考えられた。

CIDRを活用した定時AIにおいて、PGおよびCIDR抜去の時期を調節することで受胎性を向上できる可能性がある<sup>7)</sup>そのため、CIDR抜去からGnRHまでの期間の短縮が採胚

成績に影響を及ぼす可能性を考え、P4レベル低下の時期とエストラジオール(E2)及びLH濃度の推移との関係を調査し、卵胞の成熟と排卵前の卵子の品質にどのような影響を及ぼしているのか、今後検討する必要がある。SOVは供卵牛によって反応性の差が大きいため、採胚成績に個体差が生じることが指摘されている。今回の試験でも試験区間で平均回収卵数にバラツキがあることから、例数を増やし、今回検討したSOV方法の有効性を継続して調査していく必要があると考えられる。

## 試験II 乳牛における添加剤利用による効率的採胚方法の検討

### 材料および方法

#### 1 供試牛

センターで飼養するホルスタイン種経産牛延べ22頭を供試した。

各区と反転処理を行った個体については、実施の順が偏らないよう、採胚と採胚の間隔は60日以上あけて反転試験を行った。供試牛の概要は表4のとおりで、採胚時の年齢は3~13歳、産次は2~5産、分娩後の経過日数は136~1698日であった。

表4 供試牛の概要

	年齢	産次	分娩後日数
試験区	8.9±1.2	3.3±0.3	1015.0±217.3
対照区	7.9±0.7	3.2±0.3	902.4±127.1
総平均	8.3±0.6	3.2±0.2	943.3±113.6

#### 2 SOVプログラム

いずれの区においても発情の直前直後を避けた任意の時期の夕方にCIDRを膈内に挿入し、同時にEB1mLを筋肉

内に投与し、優性卵胞を退行させ、day0 とした。

Day4 の夕方に FSH20AU を生理食塩水 50mL に溶解し皮下投与、day5 の夕方にさらに FSH10AU を生理食塩水 20mL に溶解し皮下投与、day7 の夕方に PG3mL 筋肉内投与して黄体の退行を促し、day8 に CIDR を抜去して発情を誘起、day9 に GnRH4ml を筋肉内投与して排卵を促進、day10 の午前中 (GnRH 投与後 24 時間) に AI を行い、day16 の午前中に子宮灌流の定法により胚の回収を行った。なお、いずれの区も AI には性選別精液を用い、左右の子宮角浅部に 1 本ずつ計 2 本を、0.25mL 用精液注入器(A-2: 富士平工業株式会社)を用いて注入した。ストローの融解も注入ごとに 1 本ずつ行い、シースカバーで保護し注入の直前まで人体温で保温した。

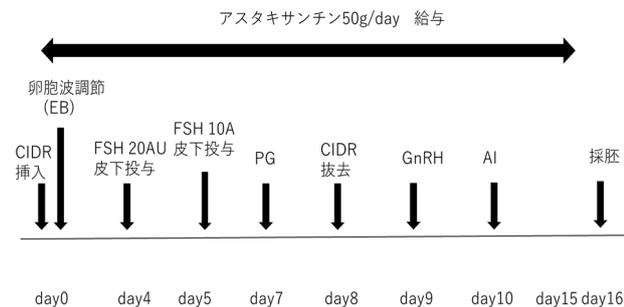


図8 試験区のSOVとアスタキサンチン給与プログラム

### 3 添加剤の投与方法

試験区ではカロテノイドの一種であるアスタキサンチンを day0~day15 の朝に 50g 添加した飼料を給与した。

なお、両区とも処置等に伴う呼び寄せ時に少量の配合飼料を給与しており、試験区においてはこの配合飼料にアスタキサンチン 50g を混合して給与した(図8)。

### 4 調査項目

#### (1) 採胚成績

16 日目の採胚時に超音波画像診断装置(USG, HS-101V)を用いて推定黄体数及び遺残卵胞数をカウントし、検卵時に採胚総数、正常胚数、変性胚数及び未受精卵数を測定した。

また、正常胚は、発育時期(収縮桑実胚 CM; compacted morula、初期胚盤胞 EB; early blastocyst、胚盤胞 BL; blastocyst、拡張胚盤胞 EXB; expanded blasocyst)と品質(国際胚移植学会 IETS マニュアル<sup>3</sup>に基づきコード1~4)について分類した。

#### (2) 卵巣動態

CIDR 挿入時、FSH 投与期間中(day4~6)の夕方、PG 投与時、CIDR 抜去時、GnRH 投与時、AI 時(GnRH 投与 24 時間後)、AI 翌日(GnRH 投与 48 時間後)及び採胚時に、超音波診断装置(USG、)による卵胞の大きさ及び数の推移について観察を行った。卵胞は径が 8mm 以上のものを大卵胞、5~7mm のものを中卵胞、2~4mm 以内のものを小卵胞とした。

また、採卵成績については採卵総数、正常胚数を記録、正常胚については胚の品質(ランク)及び発育の状態(ステージ)、変性胚の個数及び状態、未受精卵の個数について観察を行った。なお、各区間の統計処理は t 検体により行い、有意水準 0.05 未満を有意差有りと判定した。

### 結果

採卵総数・正常胚数・正常胚率・変性胚数・未受精卵数は、表5のとおりであり、採卵総数は対照区で多い傾向にあったが、有意差は認められなかった。正常数は試験区で多い傾向にあり、正常胚率は試験区において有意に高かった。

回収胚におけるランクは図9、正常胚におけるステージは図10のとおりであり、試験区で凍結可能な胚の割合が高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

表5 採胚成績

区分	供試頭数 (延べ)	採胚総数 (個)	正常胚数 (個)	正常胚率 (%)	変性胚数 (個)	未受精卵数 (個)
試験区	8	6.9±3.6	4.8±3.7	64.6±31.1	1.9±2.1	0.3±0.5
対照区	14	9.0±10.2	1.8±2.4	31.7±35.2	4.3±10.3	1.1±1.8

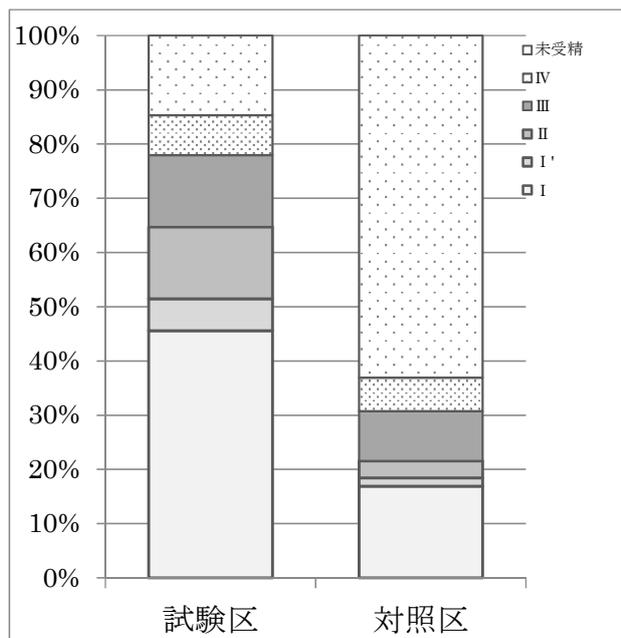


図9 回収された胚のランク別の割合

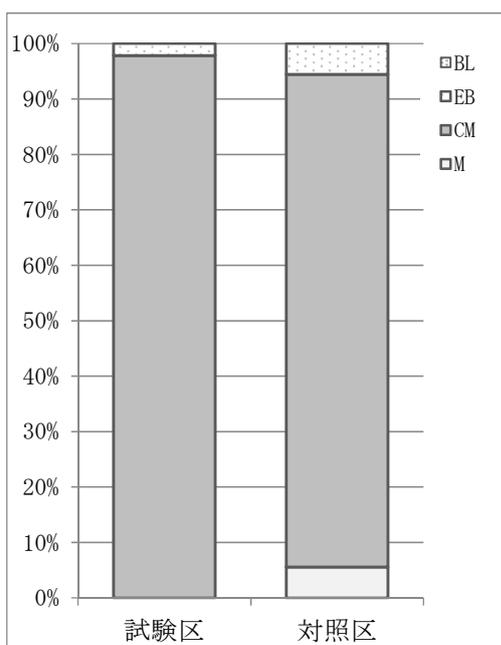


図10 正常胚のステージ別の割合

### 考察

本試験では SOV プログラム期間中に抗酸化物質であるアスタキサンチンを添加することにより、正常胚率が向上し、採胚成績が好転することを示した。

酸化ストレスは活性酸素による障害作用と生体の活性酸素除去作用との間で均衡が崩れることにより、前者に傾いた状態になった場合である。活性酸素は、酸素がより反応性の高い不安定な化合物に変化したものの総称で、自身が安定した物質になるために他の物質を酸化させ、変性させてしまう作用を持つ。活性酸素の発生を増加さ

せる外的要因として関連するものには紫外線、薬剤、金属の摂取、乳牛の分野においては泌乳能力の飛躍的な向上、濃厚飼料の多給、ルーメン発酵の異常によるエンドトキシン産生の増大、その他分娩なども強いストレス要因となり発生要因と考えられる。

酸化ストレスによる障害は卵巣や子宮などの器官にも現れ、繁殖成績低下の原因になると言われている<sup>8)</sup>。

生体には活性酸素による損傷から自身を保護するための抗酸化防御システムが備わっており、大きく2つに分類できる。すなわち、抗酸化物質と抗酸化酵素である。本試験で用いたアスタキサンチンもカルチノイドの一種でβカロテンやビタミンEに比べて強力な抗酸化力を有すると言われている<sup>9)</sup>。

初産牛においてアスタキサンチン給与により、分娩間隔の短縮、繁殖成績の改善効果が報告されている<sup>9)</sup>。

また、培養細胞でのアスタキサンチンの作用機序を黄体ホルモン分泌能の向上と報告されている<sup>9)</sup>。生体内においても同様の作用があるとする、アスタキサンチンを毎日給与することで、血漿中濃度が維持され、P4濃度が高く推移したことも今回の成績にプラスに働いたと考えられる。しかし、アスタキサンチンの作用機序については、まだ不明な点も多い。そのため、今後は酸化ストレスマーカーであるチオバルビツール酸反応物を測定するとともに、例数を増やし、コスト面からも給与量と給与時期について、今後詳細な検討が必要と考えられた。

### 試験3 SNP解析による高能力牛のゲノミック評価及び産子の能力評価

#### 材料および方法

#### 1 供試牛

センターで飼養するホルスタイン種経産牛8頭、未經産牛77頭、延べ85頭を供試した。

#### 2 ゲノミック評価

(一社)ホルスタイン登録協会が取りまとめる国内ゲノミック評価(以下、国内評価)にホルスタイン種経産牛6頭、未經産牛9頭、アルタジャパン株式会社または株式会社野澤組が取りまとめる海外ゲノミック評価(以下、海外評価)にホルスタイン種経産牛2頭、未經産牛68頭実施した。

#### 3 活用の検討

ゲノミック評価で得られる、能力を数値化した総合指数NTP(国内評価)とネットメリット値(以下、NM値)(海外評価)の産乳成分(乳量、乳脂量、乳蛋白)、耐久性成分(肢蹄、乳器)、疾病繁殖成分(体細胞スコア、泌乳持続性、空胎日数)それぞれの重み付けは70:18:12(国内評価)、

43:42:16(海外評価)であることから、国内評価では乳量が高い牛の評価値が高くなる傾向にある。一方、海外評価では健康形質も重視していることから、乳量だけでなく飼料効果、繁殖性が高い牛の評価値が高くなる。これらのことから、長命連産で長く農場に貢献できる牛群改良を目指す場合を想定し、その他、結果データの取扱いやすさ、申込み頻度、採材の簡便さ及び価格面も併せて考慮し、当センターではアルタジャパン株式会社が取りまとめる海外評価を採用した。

海外評価における、すべての牛群のNM値の平均値が85に対して、センターで検査した牛群の平均値も85であった(2021年6月23日時点)ことから、図11、表6のとおり、NM値を元に3つにグループ分けを行った。

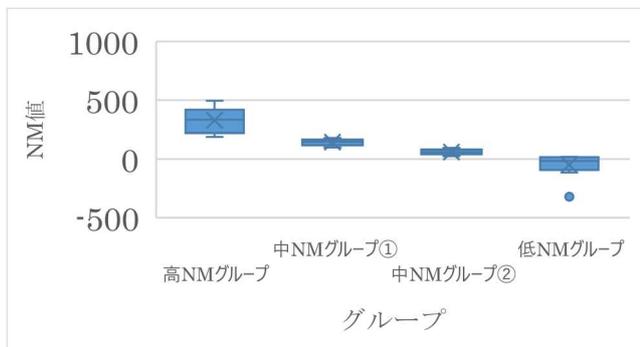


図11 NM値によるグループ分け

表6 グループ分類

検査牛分類	活用方法
① 高NM 積極的に遺伝子を残す必要があるグループ	受精卵移植用供卵牛
	OPU
	性選別精液を授精
② 中NM 将来の農場規模など見据え遺伝子を調整するグループ	平均値以上に含まれる場合は性選別精液を授精
	牛群平均値以下に含まれる場合は通常精液授精や受卵牛
③ 低NM 積極的に遺伝子を残す必要がないグループ	和牛精液の授精や販売にまわす

### 考察

ゲノム検査が始まって以来、種雄牛の育種改良が進んだ。ゲノム検査が活用される前の精液販売は、対象の種雄牛を誕生させるための交配からファーストクロープとして精液が市場で流通されるまでに、最短でも6年半かかっていた<sup>10)</sup>。ゲノム検査が利用できる現在では、実質的に約2年で市場に流通可能となり、従来の1/3以下の期

間で改良が進み、乳牛の改良に貢献している。

未経産雌牛の遺伝能力を予測する一般的な方法として Parent Average(以下、PA)がある。一般的にPAの信頼性は低く、同じ親から生まれた子牛はすべて同じ値になってしまう。これに遺伝子検査が加わると、信頼性も増加すると言われている<sup>11)</sup>。

ゲノミック評価で繁殖に関連する評価値に娘牛妊娠率(以下、DPR)がある。DPRが1ポイント増加すると空胎日数が4日短縮すると報告されている<sup>11)</sup>。また、DPRが高い牛では、PG投与後の発情発現率が高く、発情持続時間も長いことも報告されている<sup>12)</sup>。さらに、DPRとNM値には正の相関関係あることも報告されている<sup>13)</sup>。これらのことから、NM値を基準に改良していくことで、結果的に繁殖成績も向上し、健康的だけでなく、繁殖性にも優れた牛群形成につながると考えられた。

### 試験4 人工授精前後の卵巣動態と受胎性の解明及び受胎率の向上について

#### 1 供試牛

センターで飼養するホルスタイン種経産牛6頭を供試した。

供試牛の概要は表7のとおりで、採胚時の年齢は3~13歳、産次は2~5産、分娩後の経過日数は136~1698日であった。

表7 供試牛の概要

	年齢	産次	分娩後日数
供試牛	3.0±0.3	1.8±0.3	176.5±24.7

#### 2 排卵同期化・定時AIプログラム

発情の直前直後を避けた任意の時期の夕方にCIDRを膈内に挿入し、同時にEB1mLを筋肉内に投与し、優性卵胞を退行させ、day0とした。day8の夕方にPG3mL筋肉内投与して黄体の退行を促し、day9にCIDRを抜去して発情を誘起、day10にGnRH4mLを筋肉内投与して排卵を促進、day11の午前中(GnRH投与後24時間)にAIを行った(図12)。

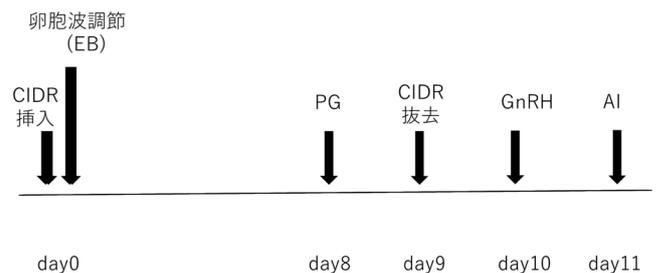


図12 排卵同期化・定時AIプログラム

### 3 調査項目

#### (1) 卵巣動態

超音波画像診断装置により、授精時、授精翌日(排卵確認)及び授精後5日(黄体形成及び第1卵胞波の確認)の卵巣の観察を実施した。

#### (2) 受胎成績

超音波画像診断装置により、授精30日及び60日後に妊娠診断を実施した。

### 結果

授精時、授精翌日の左右卵巣での排卵卵胞の出現数を比較すると、すべての牛で右卵巣に排卵卵胞が発育していた(表8)。

授精5日後の卵巣動態の観察では6頭中4頭の第一卵胞波主席卵胞は黄体と同側に、1頭は反対側に形成された。また、1頭で排卵が認められなかった(表9)。

また、妊娠診断では、同側の2頭で受胎が確認された(表10)。

表8 AI時の卵巣動態

牛 No.	AI時の卵巣所見 (直径8mm以上を対象)	
	卵胞	黄体
A	右18mm	なし
B	右20mm	なし
C	右16mm	なし
D	右14mm	なし
E	右15mm	なし
F	右12mm、左15mm	なし

表9 AI5日後の卵巣動態

牛 No.	左記検査時の卵巣所見 (直径8mm以上を対象)		第一卵胞波主席卵胞と黄体の位置関係	妊娠鑑定
	卵胞	黄体		
A	左11mm 右11mm	右21mm	同側	—
B	右20mm	なし	—	—
C	右10mm	右20mm	同側	—
D	右15mm	右15mm	同側	+
E	左13mm	右22mm	対側	—
F	左10mm	左20mm	同側	+

表10 第一卵胞波主席卵胞と黄体の位置と受胎率

1DFと黄体の位置関係	受精頭数	受胎率(%)
同側	4	50
反対側	1	0

※1頭については排卵が確認されず

### 考察

牛では人工授精の受胎率に影響を与える影響としては、授精時期<sup>11)</sup>、分娩後日数<sup>11)</sup>、季節<sup>11)</sup>、乳量<sup>12)</sup>、産次<sup>12)</sup>、卵巣ホルモンの血中濃度<sup>13)14)</sup>、BCSなど様々な要因が明らかとなっている。

ホルスタイン種経産牛において、排卵卵胞の左右の位置関係と授精後の受胎率を評価した報告によると、受胎率は左卵巣で排卵した牛で高くなる可能性がある<sup>18)</sup>。ただ、排卵卵胞が右卵巣で圧倒的に多い事はよく知られている。今回の試験でも6頭中5頭で右卵巣から排卵が確認された。また、受胎率については、1DFと黄体が同一卵巣内に存在する場合(共存)の受胎率が50%、反対側に存在する場合(非共存)0%となった。これは既報<sup>19)</sup>とは異なる結果であるが、例数が少ないため傾向があると結論づけるまでには至らなかった。

排卵卵胞の左右の位置については、例数を増やし、産次、発情発見時の日乳量および発情時の分娩後日数から、乳量と分娩後日数の相互作用、日乳量と産次の相互作用、産次と分娩後日数の相互作用の要因について評価していく必要があると考えられた。仮に代謝が卵胞発育位置に影響を与えているのであれば、排卵卵胞が左右卵巣のどちらで発育するのかを牛群として評価していくことで、繁殖性と共に栄養状態の把握もできると考えられる。

1DFと黄体の位置関係から受胎率を調べた報告によると、共存する場合、1DFの直径は非共存の場合より大きく、また血中P4濃度も低い<sup>20)</sup>。今回の結果では既報とは異なるものとなったため、現時点では、通常の人工授精時において、受胎に明瞭な影響を及ぼす指標とは言えないが、例数を増やし、血中P4濃、血中E2および卵胞液中のE2濃度を調べる必要があると考えられた。また、更に飼養環境の異なる農場間での調査が必要と考えられた。

### まとめ

本研究では様々な観点から遺伝的能力に優れた乳用牛の効率的増産技術の確立を目的に検証してきた。

試験1ではn数とアニマルウェルフェアの観点から、10府県の共同試験にて取り組んだ課題であった。減数授与の効果を検証してきたが、2017年に共立製薬からアントリンR10・A1<sup>®</sup>という効果的な製剤が国内で販売開始されている。本剤は水酸化アルミニウムゲルを溶媒に用い、

単回投与可能というものである。黒毛和種よりもホルスタイン種ではその効果は劣るとも言われているが、当センターでも、かつてグランドチャンピオンを獲得した牛に使って採胚を試みた結果、code1の胚が3個回収でき、内2個をダイレクト法にて凍結、残り1個を育成牛に移植し、受胎を確認した。一方、こうした状況下において、尚4回、2回投与を検討する意義については、議論の余地があると思われる。しかしながら、こうした共同試験に取り組むことにより、各県における繁殖技術の継承とレベルの維持が図られるという面があり、繁殖関連試験の新たな展開にも寄与できると思われる。また、他の都道府県との情報交換や共有化を図ることでより高度な課題への対応も可能となることも考えられる。

単回投与可能な製剤についてはセンターでは乳牛に対しては使用実績がないため、今後は育成牛、搾乳牛及び乾乳牛で例数を重ね、乳牛(ホルスタイン種)に対しての有効性を検証する必要がある。効果が確認された段階で現場への普及も検討したい。

試験2では添加剤利用による効率的採胚方法の検討に取り組んだ課題であった。試験1のFSH2回投与の牛を使い、アスタキサンチン区と対照区を比較した結果、試験区で正常胚率が高くなり、添加剤の効果が示唆された。

結果から考えられることとしては、他の抗酸化作用のある食品の効果の可能性を検討する必要性である。そうした食品の代表的な存在として、カカオポリフェノールによる抗酸化作用が報告されているが、カカオポリフェノール含有量95%のものは、嗜好性という点ではやや難があると思われ、この点で給与する際の摂取しやすさは、抗酸化剤を選択する上では重要な要因と考えられた。

今後の方向性としては、今回の試験で行ったFSH2回皮下投与に拘ることなく、従来の漸減投与法の再検討や、抗酸化剤添加試験を他の抗酸化作用のある食品を添加剤として検討することが考えられる。また、結果の考察で触れたチオバルビツール酸反応物の測定も必須と思われる。

試験3ではSNP解析による高能力牛のゲノミック評価及び産子の能力評価に取り組んできた。

ゲノミック評価は国内でも海外でも出来る検査であるため、センターとしての今後の牛群改良の方向性を考慮し、海外のゲノミック評価を採用した。本研究結果は、センターでのゲノミック評価の活用事例として、セミナーを開催し、公表済みである。セミナーの発表の際には、日本と海外との飼養環境の差異とゲノミック評価との関連性等が討議されたが、本研究の結果は有効な評価手段として、国内と海外のゲノミック評価を比較検討したものであり、指摘された海外ゲノミック評価が対応可能であるかどうかは今後の課題である。

更に、遺伝改良にゲノム評価を活用するうえで、遺伝的要因と環境要因を分ける必要がある。このうち遺伝的要因は20~30%、環境要因が70~80%程度であり、遺伝的要因で乳牛のポテンシャルを上げ、飼養管理技術や飼養環境を整えることで生産性を向上させることができると言われている<sup>2)</sup>。今後は作成した交配プログラムに従い、確実にNM値の分布の山を右側(高い方向)に移動させ、健康的で生産性の高い、すなわち、ポテンシャルの高い牛群を形成させていく。そこで各々の年の疾病発生状況、平均種付け回数<sup>3)</sup>の改善性を検討することで、本研究成果の活用の有効性を検証することができると考えられる。

試験4では人工授精前後の卵巣動態と受胎性の解明及び受胎率の向上について検証をしてきた。

この技術については基礎的な取組であり実用技術への検討は今後の課題と考えられる。また、試験については十分な例数が集まらず、当センター単独の取組では、結論を得ることは困難であった。本試験を継続課題として取組む場合には、例数の更なる確保と血中及び卵胞液中のホルモン濃度の測定の検証も必要と思われる。ただし、本試験は共同試験での取組でもあり、最終的な結論は共同試験としての成果を考慮すべきと考える。

なお、最後に筆者の所感であるが、本研究はやや先端技術を追い求めた感があり、研究としては必要ではあるものの、県の機関としては生産現場で農家を取り入れやすい技術ことが重要と改めて考えるに至り、それを踏まえて本研究成果の活用や今後の試験研究を進めていきたい。

## 参考文献

- 1) 西寒水将(2020)、高泌乳牛の繁殖成績の現状と受胎率向上について、酪農 PLUS+
- 2) 今井敬(2016)、乳牛の繁殖性低下の現状と繁殖技術による受胎性向上、日本胚移植学雑誌、38号:161-168
- 3) 胚の衛生的取り扱いマニュアル(国際胚移植学会 IETS マニュアル)、第3版.2001.(社)畜産技術協会
- 4) Perry ら(2005)、Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success、Proc Natl ACad Scu USA、102(14):5268-5273
- 5) Ginther ら(1997)、Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle、Theriogenology、48(1):75-87
- 6) Kojima ら(2003)、Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding protein、Anim Reprod Sci、77(3-4):187-211

- 7) Ambrose ら (2008)、Pregnancy rates to timed artificial insemination in Holstein heifers given prostaglandin F<sub>2</sub>α twenty-four hours before or concurrent with removal of an intravaginal progesterone-releasing insert、J Dairy Sci、91(7):2678-2683
- 8) 林登 (2012)、抗酸化機能性物質の給与と乳用初産牛の繁殖、DAIRYMAN、10月号:49
- 9) 鎌田八郎 (2012)、タイトル不明、第153回日本獣医学会学術集会獣医繁殖分科会発表要旨、ページ数不明
- 10) 奥啓輔 (2019)、ゲノムで牛や酪農はどうか変わる?、DairyJapan、1月号:77
- 11) 中村聡志 (2020)、遺伝子検査の活用で繁殖成績の向上が期待できる、DAIRYMAN、9月号:34
- 12) Veronesa (2019) ら、Genomic merit for reproductive traits. II: physiological responses of Holstein heifers、J Dairy Sci、102(7):6639-6648
- 13) Santos (2010) ら、Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle、Soc Reprod Fertil Suppl、67、387-403
- 14) Dransfield ら (1998)、Timing of Insemination for Dairy Cows Identified in Estrus by a Radiotelemetric Estrus Detection System、J Dairy Sci、81(7):1874-1882
- 15) Lopez-Gatius ら (2006)、Screening for high fertility in high-producing dairy cows、Theriogenology、65(8): 1678-1689
- 16) Lopes ら (2007)、Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows、Anim Reprod Sci、99(5)、34-43
- 17) Bello ら (2006)、Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows、J Dairy Sci、89(9)、3413-3424
- 18) Townson ら (2002)、Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows、J Dairy Sci、85(4)、1053-1058
- 19) 三浦亮太郎 (2020)、発情時の排卵卵胞の左または右卵巢での発育に影響を与える要因とそのことが受胎性に与える影響、家畜人工授精、307(10)、1-7
- 20) 三浦亮太郎 (2013)、黄体と同側の卵巢に位置する第1卵胞波主卵胞の存在はウシの受胎率を低下させる、日本繁殖生物学会 講演要旨集 106(0)、35
- 21) 山岸黄太 (2020)、ゲノム解析の経営戦略の利用、DairyJapan、11月号:90-91

Establishment of efficient technology for increasing production of dairy cows with excellent genetic ability