

# 1 生殖細胞操作胚の受胎率向上に関する試験

## —— 性選別精液を用いた乳用牛雌受精卵生産技術の開発 ——

担当部署名：家畜生産技術部 家畜繁殖研究室

担当者名：○川野辺章夫、大島藤太、北條享、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

牛の雌雄産み分けは、受精卵（胚）の細胞を採取してPCR法やLAMP法により遺伝子検査をする方法で行われてきたが、生産現場で利用するには技術的に困難であった。一方、牛精子の性選別が可能となり、性選別精液の利用が拡大しつつあるが、性選別精液は封入精子数が少なく、性選別・凍結過程で精子活力が著しく低下するとされており、過剰排卵処理(SOV)による受精卵生産での利用は困難とされる。そこで、性選別精液を用いて効率的に雌受精卵生産方法の開発を目的に、SOVによる卵胞発育及び排卵時間を一定にするため、SOVの前処置として優勢卵胞を除去(DFR)し、GnRH投与後24時間後に人工授精を実施するSOVプログラム(DFR-SOV)について検討する。

### 2. 方法

DFR-SOVの方法は、発情周期の任意時期に留置型プロゲステロン製剤(CIDR)を膈内挿入し(Day0)、Day5にDFR、Day6から4日間で総量FSH30AUを漸減投与した。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(酢酸フェルグリンとして200 $\mu$ g)を投与し、Day11に1回のみ人工授精(以下AI)を行った。AIは、(一社)家畜改良事業団の採用用選別雌精液(Sort90、封入精子数600万)を左右子宮角浅部に1本ずつ2本を注入し、AI後6日目に常法により採卵を行った。

処理日	0日	～	5日	6日	7日	8日	9日	10日	11日	～	17日
午前	CIDR 挿入				FSH 6AU	FSH 4AU	FSH 3AU	FSH GnRH 2AU 4ml	AI		採卵
午後			DFR	FSH 6AU	FSH 4AU	FSH PG 3AU 3ml	FSH 2AU				

### 3. 結果の概要

(1) 通常精液を用いた従来法(対照区)と性選別精液を用いたDFR-SOV(試験区)の採卵成績は、正常卵数並びに正常卵率において対照区で高い値を示したが、全ての調査項目で有意な差は認められなかった。採卵1回あたりの推定雌卵数(対照区：雌率50%、試験区：雌率90%)は、対照区で3.4個に対し試験区では4.2個と高くなった。(表1)

また、得られた受精卵の発育ステージおよび正常卵のランク別割合にも、両区に有意な差はなかった。(図1、2)

(2) DFR-SOVにより通常精液と同等の採卵成績を得ることができたことから、性選別精液を用いた乳用牛の採卵プログラムとして有効であると考えられた。また、本方法で生産された雌受精卵を県内酪農家42頭の受卵牛に新鮮卵移植し、19頭が受胎(受胎率45.2%)したことから、効率的な雌子牛生産に有効であると考えられた。

### 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

次年度は、DFRに替わる生産現場で利用可能なホルモン処置の検討を実施予定。

[具体的データ]

表 1 採卵成績

区分	対照区	試験区
供試頭数	32頭	32頭
推定黄体数	14.8±12.3	15.5±12.9
遺残卵胞数	4.9±5.8	4.0±4.3
回収卵数	11.5±10.5	12.2±9.7
正常卵数	6.8±8.1	4.6±5.4
正常卵率	57.5%	47.4%
推定雌卵数 ※)	3.4±4.0	4.2±4.9
変性卵数	1.3±2.7	2.1±3.7
未受精卵数	3.3±5.8	5.4±8.5

(mean±SD)

※) 対照区は雌率50%、試験区は雌率90%で試算

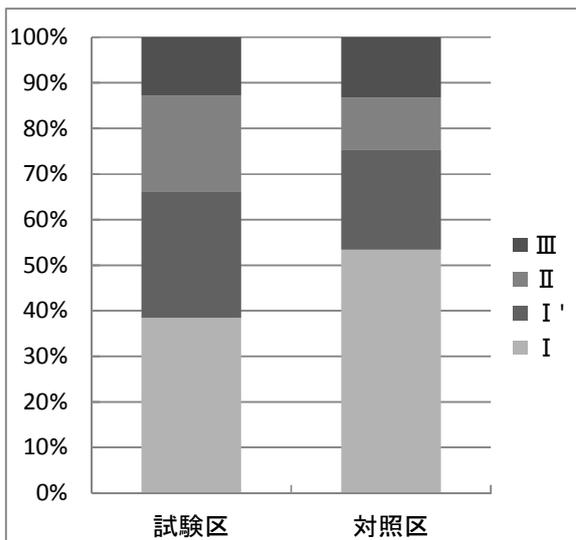


図 1 正常卵ランク別の割合

※ I : 優良卵、I' : I と II の中間  
II : 普通卵、III : 不良卵

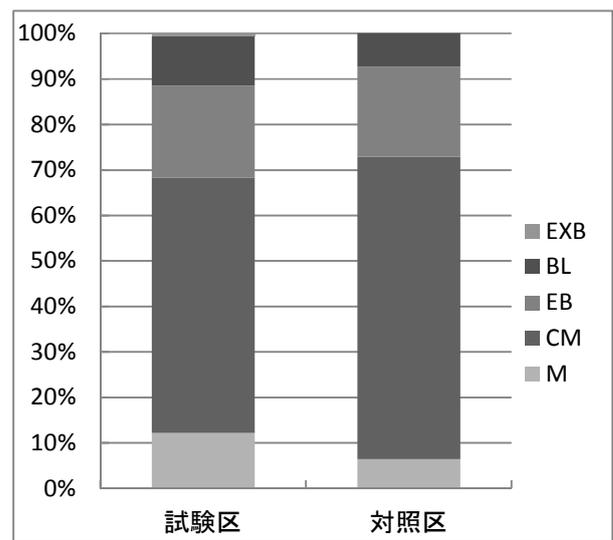


図 2 正常卵のステージ別の割合

※ EXB : 拡張胚盤胞 BL : 胚盤胞 EB : 早期胚盤胞  
CM : 収縮桑実胚 M : 桑実胚

## 2 卵巣機能診断手法による人工授精、受精卵移植の受胎率向上技術の開発

担当部署名：家畜生産技術部 家畜繁殖研究室

担当者名：○大島藤太、稲葉浩子、星一美、北條享、川野辺章夫 菊池草一

連絡先：電話番号 0287-36-0428

研究期間：平成24年度～26年度（完了） 予算区分：県単

### 1. 目的

乳用牛の泌乳能力は向上した反面、分娩間隔の延長やAI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巣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。本試験では、超音波画像診断や代謝プロファイルテスト等の卵巣機能診断手法を用い、人工授精、受精卵移植の受胎率を調査することで、受胎率の向上を図る技術を開発する。

### 2. 方法

(1) 調査期間：平成24年 月～平成26年3月に実施した。

(2) 供試牛：当センター繋養のホルスタイン種経産牛31頭（補正乳量平均11740kg、平均2.0産）

(3) 調査項目：以下について測定および調査した。

ア 血液性状；Ht、GLU、T-Chol、BUN、GOT、 $\gamma$ -GTP、ALB、TP、Ca、Mg、iP、NEFA

イ BCS 体重

ウ 牛群検定による合計乳量（kg/日）、平均乳脂率（%）、平均蛋白質率（%）

エ 超音波画像診断による卵巣の大きさ（長径と短径の積）及び卵胞数

オ 分娩難易度

なお、ア～ウは分娩前14日、分娩日および分娩後10、30、60、90、120、150、180日にエは分娩後30、60、90、120、150、180日に測定を行った。

(4) 繁殖成績との比較

ア～ウ 調査項目についてMPT診断図から範囲内の群と逸脱している群

エ 卵巣の大きさ（長径と短径の積）で1000 $\text{cm}^2$ 以上と以下の群、卵胞数（左右の卵胞の和）が15以上と以下の群

オ 自然分娩の群とそれ以外の群

それぞれを以上の2群に分けて各繁殖成績についてt検定を用いて比較した。

### 3. 結果の概要

(1) 31頭の繁殖成績は初回授精日 $128 \pm 39.2$ 日、受胎率は60.0%、2回目の授精日 $175.5 \pm 46.1$ 日、受胎率は41.6%で2回目の授精で27頭中14頭が受胎(51.8%)する結果となった。平均授精回数は2.6回で分娩間隔は $448.6 \pm 66.4$ 日であった(表1)。

(2) 血液性状と繁殖成績については分娩後15日のNEFA濃度が低い群で高い群に比べ初回発情日が有意に早かった( $P < 0.05$ ) (表2)。また、AST濃度が低い群で高い群に比べ初回排卵日が有意に早かった( $P < 0.03$ ) (表3)

(3) 分娩日を基準とした分娩後60日における体重の減少は、少ない群が、多い群に比べ初回発情日が有意に早かった( $P < 0.03$ ) (表4)。

(4) 卵胞数と繁殖成績においては卵胞数が15個以上の群で15個以下の群に比べ初回排卵日が有意に早かった( $P < 0.01$ ) (表5)。また、卵巣の大きい群で小さい群に比べ初回排卵日が有意に早かった( $P < 0.01$ ) (表6)。

### 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

本試験の結果から得られた周産期の各指標の活用により受胎率向上を図ることが可能となる

が、血液検査結果を利用した MPT 診断は組織的に採血検査を行う体制の確立が必要と思われた。

[具体的データ]

表 1 調査牛群の繁殖成績

調査項目	平均	最大	最小
初回排卵日	30.1±18.4	81	12
初回発情日	81.4±43.6	16	185
初回授精日	128.0±39.2	71	279
2 回目受精日	177.5±46.1	99	335
人工授精回数	2.6±1.6	1	7

表 2 分娩後 15 日における NEFA 値と繁殖成績

調査項目	NEFA (500 μEq/L) 未満群	NEFA (500 μEq/L) 以上群
初回排卵日	28.5±16.7	37.2±15.7
初回発情日	74.0±43.1 <sup>a</sup>	90.6±49.4 <sup>b</sup>
初回授精日	124.3±24.8	130.3±26.7
2 回目受精日	173.3±46.3	180.3±36.1

ab:P<0.05

表 3 分娩後 15 日における AST 値と繁殖成績

調査項目	AST (100IU/L) 未満群	AST (100IU/L) 以上群
初回排卵日	23.1±9.1 <sup>a</sup>	38.3±23.2 <sup>b</sup>
初回発情日	70.1±49.3	94.6±33.3
初回授精日	137.6±46.2	117.5±28.3
2 回目受精日	168.3±44.2	185.4±49.7

ab:P<0.03

表 4 分娩日を基準とした 60 日後の体重変化と繁殖成績

調査項目	体重減少低値群	体重減少高値群
初回排卵日	25.7±16.7	34.9±20.0
初回発情日	63.6±41.5 <sup>a</sup>	96.7±40.7 <sup>b</sup>
初回授精日	116.3±33.9	143.0±41.6
2 回目受精日	166.8±30.0	204.7±80.5

ab:P<0.05

表 5 左右の卵巢の卵胞数と繁殖成績

調査項目	卵胞数 (15 個) 以上群	卵胞数 (15 個) 以下群
初回排卵日	19.6±5.8 <sup>A</sup>	37.6±27.6 <sup>B</sup>
初回発情日	90.1±50.7	84.8±35.5
初回授精日	132.0±41.7	123.9±36.1
2 回目受精日	176.6±61.5	180.6±35.5

AB:P<0.01

表 6 左右の卵巢の大きさ (短径と長径の積) の平均と繁殖成績

調査項目	大きさ (1000 cm <sup>2</sup> ) 以上の群	大きさ (1000 cm <sup>2</sup> ) 以下の群
初回排卵日	21.5±8.9 <sup>A</sup>	41.6±21.9 <sup>B</sup>
初回発情日	63.5±43.1	88.1±33.6
初回授精日	121.9±43.0	134.8±42.3
2 回目受精日	165.0±44.0	207.6±90.9

AB:P<0.01

### 3 乳房炎に関する遺伝子の多型解析

担当部署名：家畜生産技術部 家畜繁殖研究室

担当者名：○北條享、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（継続）

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。

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する。

#### 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24年5月31日までに初産次の搾乳期間が終了した48頭（罹患歴有：16、罹患歴無：32）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。

また、受精卵移植技術により、乳房炎抵抗性に関する対立遺伝子を有する個体にデザインされた乳用牛の作出を試みた。

#### 3. 結果の概要

- (1) 遺伝子型解析結果より、15の遺伝子型が確認され、その出現率は0101/10011が32.7%(18/55)と最も高く、次いで10011/10011が20.0%(11/55)であった(表1)。
- (2) 対立遺伝子の出現率結果より、10011が46.4%と最も高く、次いで0101が27.3%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。
- (3) 対立遺伝子ごとに乳房炎罹患のオッズ比を算出したところ、対立遺伝子10012が3.46と最も高く、乳房炎感受性を示す対立遺伝子である可能性が示唆された。また、対立遺伝子1401はオッズ比が0.50と他に比べ低いことから、乳房炎抵抗性に関する対立遺伝子の可能性が示唆された(表2)。
- (4) 対立遺伝子1401を有する1頭を供卵牛として、受精卵移植技術により乳房炎抵抗性遺伝子にデザインされた乳用牛の作出を試みた結果、正常胚9個を取得し1個の胚を生移植したが、受胎には至らなかった。

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	罹患無(%)	罹患有(%)	計(%)
0101/0101	2(5.4)	2(11.1)	4(7.3)
0101/10011	14(37.8)	4(22.2)	18(32.7)
0101/10012	1(2.7)	2(11.1)	3(5.5)
0101/12011	1(2.7)	0(0)	1(1.8)
0103/0103	1(2.7)	0(0)	1(1.8)
0203/12011	1(2.7)	0(0)	1(1.8)
0301/10011	1(2.7)	0(0)	1(1.8)
10011/10011	8(21.6)	3(16.7)	11(20.0)
10011/10012	2(5.4)	2(11.1)	4(7.3)
10011/12011	1(2.7)	2(11.1)	3(5.5)
10011/12021	1(2.7)	0(0)	1(1.8)
10011/1401	1(2.7)	1(5.6)	2(3.6)
10012/1401	1(2.7)	0(0)	1(1.8)
10012/12011	0(0)	2(11.1)	2(3.6)
12011/1401	2(5.4)	0(0)	2(3.6)
計	37(100)	18(100)	55(100)

表2 乳房炎罹患の有無とBoLA-DQA1対立遺伝子分布の比較

対立遺伝子	罹患無(%)	罹患有(%)	計(%)	オッズ比
0101	20(27.0)	10(27.8)	30(27.3)	1.04
0103	2(2.7)	0(0)	2(1.8)	-
0203	1(1.4)	0(0)	1(0.9)	-
0301	1(1.4)	0(0)	1(0.9)	-
10011	36(48.6)	15(41.7)	51(46.4)	0.76
10012	4(5.4)	6(16.7)	10(9.1)	3.46
12011	5(6.8)	4(11.1)	9(8.2)	1.72
12021	1(1.4)	0(0)	1(0.9)	-
1401	4(5.4)	1(2.8)	5(4.5)	0.50
計	74(100)	36(100)	110(100)	

#### 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

今年度同様、乳房炎に関与する遺伝子の多型解析を行い、データの蓄積を図るとともに、BoLA-DQA1 遺伝子の解析結果について乳房炎治療歴及び体細胞数との関連を調査する。

## 4 遺伝子情報を活用した交配技術の検討

担当部署名：家畜生産技術部 家畜繁殖研究室

担当者名：○北條享、大島藤太、川野辺章夫、菊池草一

研究期間：平成25年度～27年度（継続）

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、経済形質関連遺伝子のマーカー遺伝子を探索するとともに、それら情報を活用した改良技術を開発する。

### 2. 方法

乳牛の乳量、乳質、繁殖性に関与すると報告されているGH、DGAT1及びGRIA1遺伝子について、当センターに繋養する経産牛32頭の遺伝子多型解析をし、牛群検定成績をもとに経済形質について比較検討した。

### 3. 結果の概要

- (1) 乳量に関連するとされるGH遺伝子型解析の結果は、LL型27頭、LV型4頭、VV型1頭で、305日補正乳量から換算した日乳量(kg/日)を比較すると、LL型(25.3) > LV型(20.5) > VV型(18.0)であった。
- (2) 乳脂肪率に関連するDGAT1遺伝子型は、AA型19頭、AK型5頭、KK型10頭で、乳脂肪率はKK型(4.8%)がAA型(4.0%)に比べて有意に高かった ( $p < 0.01$ ) (表1)。
- (3) ホルモン感受性に関与するGRIA1遺伝子型は、SS型1頭、SN型17頭、NN型16頭で、うち採卵実績のあるSN型15頭及びNN型8頭における平均回収胚数はSN型(14.9個)がNN型(9.8)より多い傾向にあった。

以上から、GH、DGAT1及びGRIA1遺伝子は、それぞれ乳量、乳脂肪率、採卵性のマーカー遺伝子として利用が可能であることが示唆された。

	DGAT1遺伝子型		
	AA (n=17)	AK (n=5)	KK (n=10)
乳量(kg/日)	25.4±6.2	27.4±6.9	21.5±4.9
乳脂肪率(%)	4.0±0.4 <sup>a</sup>	4.5±0.4	4.8±0.6 <sup>b</sup>
乳タンパク率(%)	3.2±0.2	3.4±0.1	3.4±0.3
無脂固分率(%)	8.7±0.2	8.9±0.2	8.9±0.3
a,b異符号間に有意差有り(P<0.01)			

### 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

経済形質に関与するマーカー遺伝子を検索するとともに優良な遺伝子情報を有する種牛及び雌牛の選抜をし、遺伝子型をデザインした能力に優れた乳用牛を生産する。