

# 広島県立総合技術研究所 畜産技術センター研究報告

Bulletin

Hiroshima Prefectural Technology Research Institute  
Livestock Technology Research Center

**第17号**

**平成30年12月**

**2018**

広島県立総合技術研究所  
畜産技術センター

広島県庄原市七塚町 584

Hiroshima Prefectural Technology Research Institute  
Livestock Technology Research Center

Nanatsuka,Shobara,Hirosima Pref.Japan

目 次

原著論文

- 高糖分飼料イネ「たちすずか」ホールクロップサイレージの発酵品質及び好気的変敗に対する  
乳酸菌添加の影響  
福馬敬紘, 河野幸雄, 神田則昭, 新出昭吾..... 1
- 桑実胚由来細胞をドナー細胞に用いた核移植胚を活用した胚DNA型判定および種雄牛造成  
日高健雅, 福本豊, 今井佳積, 山田博道, 尾形康弘..... 7

学位取得論文総括

- 大腸菌不活化ワクチンの接種がウシ乳腺の免疫機能に及ぼす影響に関する研究  
森本和秀..... 15
- 生殖工学技術によるウシの効率的生産に関する研究  
尾形康弘..... 17

他誌掲載論文要約

- 稲発酵粗飼料の乳牛への給与技術と混合飼料開発に関する研究  
Feeding of Rice Whole Crop Silage for Lactating Dairy Cow  
新出昭吾..... 19
- エストラジオール投与が発情同期化処置に与える影響について  
Effects of estradiol on estrus synchronization procedure  
日高健雅, 尾形康弘, 山本祐輔, 今井佳積, 吉上渉, 磯部直樹..... 19
- 牛白血病蔓延農家における感染状況の推移  
Changes in the infection status in farmers among which bovine leukemia is spread  
山本祐輔, 日高健雅, 今井佳積, 尾形康弘, 吉上渉..... 20
- BLV 感染牛の凍結初乳給与による新生子牛の感染状況について  
State of infection of newborn calves after feeding with frozen colostrum of BLV-infected cows  
山本祐輔, 日高健雅, 今井佳積, 尾形康弘, 吉上渉, 間陽子, 竹嶋伸之輔, 松本有生..... 20
- 和牛受精胚産子のほ育苗成技術の検討  
Evaluation of the technology to nurse calves of Japanese cattle developed from fertilized embryos  
松雪暁子, 日高健雅, 横田文彦, 吉上渉..... 21
- 経膈採卵・性判別技術を用いたホルスタイン種雌牛生産の実証  
Validation of production of female Holsteins using transvaginal egg collection and sex discrimination technologies  
日高健雅, 尾形康弘, 今井佳積, 松重忠美, 吉上渉..... 21
- Effect of enterotoxigenic Escherichia coli vaccine on innate immune function of bovine mammary gland infused with lipopolysaccharide  
K. Morimoto, N. Kanda, S. Shinde, N. Isobe..... 22

受精卵クローン作出技術を活用した種雄牛造成効率化のための胚DNA 型判定方法の検討 Development of an embryo-based genotyping system for efficient sire breeding 今井佳積, 尾形康弘, 松井茉由, 日高健雅, 平野貴, 松重忠美.....	23
黒毛和種牛の細胞質が枝肉形質に及ぼす影響 Effect of cytoplasm on carcass traits of Japanese Black cattle 日高健雅, 福馬敬紘, 井原紗弥香, 今井佳積, 尾形康弘, 吉上涉, 松重忠美.....	23
曲げセンサーを用いた放牧牛のそしゃく行動による転牧時期の判定 Judgment of Grazing Stop Timing by the Chewing Behavior in Cattle with Bending Sensor 新出昭吾, 森本和秀, 弓場憲生, 神田則昭, 長尾かおり.....	24
草地の刈り取り間隔の違いが総乾物収量に及ぼす影響 Effect of Cutting Interval on the Dry Matter Yield of Grass Field 森本和秀, 長尾かおり, 神田則昭, 福馬敬紘, 新出昭吾.....	24
広域連携周年放牧技術普及の可能性 Diffusion Potential of Year-Round Grazing System by Regional Cooperation 長尾かおり, 森本和秀, 新出昭吾.....	25
極短穂型飼料イネ品種「たちすずか」によるホールクroppサイレージの栄養価と第一胃内分解性 Nutrient value and ruminal degradability of whole crop silage prepared from Tachisuzuka as short panicle paddy rice cultivar 河野幸雄, 新出昭吾, 神田則昭, 城田圭子, 福馬敬紘, 塚崎由子.....	25
エストラジオール製剤投与が経膈採卵 体外受精成績に及ぼす影響 Effects of estradiol benzoate (EB) administration on transvaginal ovum pick up-in vitro fertilization results 日高健雅, 森本和秀, 今井昭, 栗原幸一, 福本豊, 山崎瑞穂.....	26
Comparison of Two Biopsy Methods in Bovine Embryos Yasuhiro Ogata, Takemasa Hidaka, Tadami Matzushige, Teruo Maeda.....	26
和牛のミオグロビン含量を指標とした肉色に関わるゲノム育種価の推定(2015) Prediction of genomic breeding values for meat color defined by myoglobin content in longissimus muscle of Japanese Black cattle 山崎瑞穂, 戸水一志, 河野幸雄, 渡邊敏夫, 杉本喜憲.....	27
下痢症予防ワクチンの接種が牛に及ぼす影響 森本和秀.....	27
Effective embryo production from Holstein cows treated with gonadotropin-releasing hormone during early lactation Yasuhiro Ogata, Guang-MinYu, Takemasa Hidaka, Tadami Matzushige, Teruo Maeda.....	28
和牛のミオグロビン含量を指標とした肉色に関わるゲノム育種価の推定(2016) Prediction of genomic breeding values for meat color defined by myoglobin content in longissimus muscle of Japanese Black cattle 山崎瑞穂, 戸水一志, 河野幸雄, 渡邊敏夫, 杉本喜憲.....	29

黒毛和種繁殖雌牛の枝肉6形質におけるゲノム育種価の実用化に向けた精度検証 柴田愛梨, 山崎瑞穂, 兵庫真理, 渡邊敏夫.....	29
Estradiol benzoate treatment before ovum pick-up increases the number of good quality oocytes retrieved and improves the production of transferable embryos in Japanese Black cattle T Hidaka, Y Fukumoto, Y Yamamoto, Y Ogata, T Horiuchi.....	30
Variations in bovine embryo production between individual donors for OPU-IVF are closely related to glutathione concentrations in oocytes during in vitro maturation T Hidaka, Y Fukumoto, S Yamamoto, Y Ogata, T Horiuchi.....	31

# 高糖分飼料イネ「たちすずか」ホールクroppサイレージの 発酵品質及び好気的変敗に対する乳酸菌添加の影響

福馬敬紘 河野幸雄 神田則昭 新出昭吾

## 要 約

高糖分飼料イネ「たちすずか」のホールクroppサイレージ(WCS)開封後の好気的変敗に及ぼす乳酸菌添加の影響を明らかにするため、乳酸菌添加処理3区(無添加区、ホモ発酵型乳酸菌添加区、ヘテロ発酵型乳酸菌添加区)のロールペールサイレージを調製し、それらの発酵品質及び開封後の品質変化について調査した。

無添加区のWCSは有機酸生成量が乳酸菌を添加した他の2処理区に比べて少なく、開封後ほぼすべてのロールで好気的変敗が発生した。ヘテロ型区では他の2処理に比べて酢酸生成量が多く、好気的変敗は発生しなかった。ホモ型区では調製後7か月目に開封したものは乳酸発酵が優勢であり、好気的変敗の発生が認められた。一方、調製後1年以上経過して開封したものは酢酸生成量が増加しており、好気的変敗の発生が抑制された。

以上のことから、高糖分飼料イネWCSの好気的変敗に対して乳酸菌製剤の添加が有効であり、特にヘテロ発酵型乳酸菌が優れた抑制効果を有することが明らかとなった。

## 緒言

わが国において、飼料イネの栽培面積は、近年の輸入飼料価格の高騰に対する自給粗飼料の需要の高まりや飼料自給率向上・耕作放棄地解消に向けた取り組み、さらには作付面積に応じた交付金が交付される行政的な支援制度を背景に大きく拡大してきた(H18 H24: 飼料用米 104ha 34,525ha, WCS用イネ 5,182ha 25,672ha)。本県においてはWCS用イネ、とりわけ2010年に品種登録された高糖分飼料イネ「たちすずか」<sup>6)</sup>の栽培面積が急速に拡大し、平成24年度には県内のWCS用稲の9割以上(200ha以上)を占めるまでになった。「たちすずか」の大きな特徴は子実割合が従来品種と比べて1/3程度と少ない茎葉多収タイプで、茎葉中の糖含量が従来品種に比べて高いことであり、乳酸発酵主体の良質なWCS調製に適した品種である。一方でWCS中の乳酸や残存糖は、WCSが開封されて空気にさらされると酵母のエネルギー源となり、好気的変敗が生じる原因となる。そのため、糖含量の高い「たちすずか」WCSは一般的な子実多収タイプの飼料イネ品種に比べて好気的変敗が起きやすくなることが懸念される。好気的変敗が生じると栄養分の消失により飼料価値が低下するだけでなく、カビの発生によって家畜やその生産物へ悪影響を及ぼす恐れもある。県内におけるイネWCS調製はロールペールサイレージ体系が主流である。そのため、イネWCSの利用者には小規模な黒毛和種繁殖経営体も多く、開封したロールを一度に

使い切るのが困難な場合も多いことから、好気的変敗に対する何らかの方策が必要である。

そこで本試験では、「たちすずか」WCSの好気的変敗を抑制する手法として他の飼料作物において効果が認められている乳酸菌利用に着目し、WCS調製時の乳酸菌添加(ホモ発酵型、ヘテロ発酵型)が「たちすずか」WCSの発酵品質と好気的変敗に及ぼす効果について調査を行った。

## 材料と方法

### 1 WCS調製

飼料イネWCSは、「たちすずか」を黄熟期に飼料イネ専用の細断型収穫機(株式会社タカキタ, WB1020)により切断長3cmで収穫成形後、ラッピングマシン(株式会社タカキタ, SW1110W)を用いてストレッチフィルムで8層巻きにしてロールペールサイレージを調製した。乳酸菌は収穫直前に立毛状態の稲に噴霧器を用いて添加した。

### 2 乳酸菌

乳酸菌はホモ発酵型乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (畜草1号: 雪印種苗株式会社)(ホモ型区)とヘテロ発酵型乳酸菌 *Lactobacillus buchneri*

(2)

(11A44:パイオニアハイブレッッドジャパン株式会社)  
(ヘテロ型区)の2種類を用いた。添加量は製剤の  
使用法に従い、畜草1号は5g/L, 11A44は1g/L  
となるよう水道水に懸濁し、飼料イネ新鮮物に対し  
0.1%の割合で添加した。また対照として無添加の  
WCSも調製した(無添加区)。

### 3 サンプリング

WCSは7か月以上貯蔵して発酵させた。サンプル  
はフィードサンプラー(株式会社藤原製作所)を用  
いてロールの上・中・下部の3か所からWCSを採取  
し、それらを混合したものをを用いた。採取したサン  
プルは発酵品質及び好気的変敗の調査に用いた。

### 4 発酵品質の調査

サンプル100gを採取後直ちに500mlの蒸留水に浸  
漬して4で24時間冷蔵抽出した後、抽出液をろ紙  
でろ過して、pH及び材料新鮮物中の各種成分(有機  
酸、糖類、エタノール、アンモニア態窒素)含有量  
を測定した。

### 5 好気的変敗の調査

Ashbell et al. (1991)<sup>1)</sup>の方法を参考にして行  
った。1L容ポリエチレンテレフタレート製ボトルの  
底面を除去してサンプルを250g詰め込み、除去した  
底面は中心部に直径約1cm程度の穴をあけて、ふた  
として用いた。ボトルは上下逆さまにしてボトルの  
口の部分を20%水酸化カリウム水溶液100mlに浸け  
て20℃恒温器内で7日間静置した(図1)。静置中の  
好气的活動によって発生した二酸化炭素は比重が空  
気より大きく下方に沈下するため、水酸化カリウム  
水溶液中に捕集される。その捕集された量を好气的  
変敗発生の指標の1つとした。7日目のサンプルは  
4と同様にして抽出液を調製し、分析に用いた。

### 6 分析方法

pHはガラス電極pHメーター(株式会社堀場製作所,  
F-16)で、有機酸・糖類・エタノールは高速液体ク  
ロマトグラフィ(Waters, Waters 616 LC System)  
で、アンモニア態窒素は藤井・奥田法変法(和光純  
薬工業株式会社, アンモニア-テストワコー)で測  
定した。好气的変敗に伴う二酸化炭素発生量は20%  
水酸化カリウム水溶液の一部を1規定塩酸で滴定し  
てpHが8.1から3.6まで低下するのに要した滴定量  
を基に次式により算出した。

$$\text{二酸化炭素発生量 (g/kgDM)} = 0.044 \times T \times V / (A \times FM \times DM)$$

T: 1 規定塩酸滴定量 (ml)

V: 20%水酸化カリウム水溶液総量 (ml)

A: 滴定に使用した20%水酸化カリウム水溶液量  
(ml)

FM: 調査に用いたWCSの新鮮物量 (kg)

DM: WCS乾物割合

### 7 統計解析

得られた結果は、分散分析法を用いて処理による  
統計的有意差の検定を行った後、有意差(p<0.05)  
が認められた項目について多重検定(Tukey-Kramer  
法)を行った。



図1 好气的変敗試験

## 結果および考察

### 1 サンプリング時期

WCSのサンプリングは、調製後7~8か月目(4~5月;春開封)及び14~18か月目(11~3月;秋冬開封)の2期間に段階的に実施した。各処理のロール数は、春開封がホモ型区2個、ヘテロ型区2個、無添加区3個、秋冬開封がホモ型区5個、ヘテロ型区4個、無添加区5個であった。

### 2 WCSの発酵品質(表1)

春開封の発酵品質について、無添加区のpHが4.61であり、乳酸菌添加の2処理(ホモ型区:4.17,ヘテロ型区:4.14)に比べて有意ではないものの、高い値であった。無添加区は乳酸含量が0.65%とホモ型区の1.01%に比べて少なく、酢酸含量が0.20%とヘテロ型区の0.63%に比べて少ないことから、有機酸の生成量に影響されたものと考えられた。ホモ型区は乳酸含量が有意ではないものの、他の2処理に比べて高く、ヘテロ型区は酢酸含量が他の2処理に比べて有意に高く( $P<0.05$ ),また1,2-プロパンジオールの含量も有意差はなかったものの高い傾向にあった。L.plantarumはグルコース1モルから2モルの乳酸のみを生成する乳酸菌であるのに対して、L.buchneriは乳酸の他にエタノールや二酸化炭素を生成し、さらに嫌気状態でかつpHが低い状況、言い換えればサイレージ発酵が進んだ状態では乳酸を分解して酢酸や1,2-プロパンジオールなどを生成する代謝経路を有している<sup>11)</sup>。これらのことを踏まえると、今回添加した2種類の乳酸菌製剤は「たちすずか」WCSにおいてそれぞれの持つ特有の生成能を発揮していたと考えられた。エタノール含量は3処理のいずれにおいても1.5%以上であり、発酵産物の中で最も多く含まれていた。Nishino et al. (2007)<sup>8)</sup>は、飼料イネWCS調製時のヘテロ発酵型乳酸菌L.buchneriの添加はアルコール発酵を抑制すると報告しているが、今回はそのような抑制効果は認められなかった。Nishino and Shinde (2007)<sup>9)</sup>によると、細断型またはフレール型の飼料イネ専用収穫機で収穫調製した飼料イネWCSにおいて、フレール型で調製したWCSでは乳酸発酵主体のものが多かったのに対して細断型ではエタノール発酵主体のものが多かったと報告している。細断型の場合、ディスクカッターによって茎を輪切りにするように切断するため、フレール型に比べて茎部分の物理的破壊が少なく中空の形状が保たれやすくなる。このため、WCS調製時にその中空部分に酸素が残存してしまうことで、発酵初期に

において酵母の活動が抑制されずエタノールが多く生成される。本試験では細断型収穫機を利用してWCSを調製しており、すべての処理区でエタノール発酵が優勢になった要因と考えられた。さらに今回用いた飼料イネ「たちすずか」は茎が剛健でより中空形状が維持されやすく、かつ茎葉中糖含量が高いことから、酵母の生存に有利となりその傾向が一層強められたと推察された。

秋冬開封のWCSについては、ヘテロ型区と無添加区の発酵品質は春開封のものと同様な傾向であったが、ホモ型区では大きな違いが認められた。春開封のWCSでは生成した有機酸の中で乳酸が最も多かったのに対し、秋冬開封のものでは乳酸よりも酢酸の方が多くなっており、ヘテロ型区と同程度の生成量であった。さらに、1,2-プロパンジオールの生成量についてもヘテロ型区と同程度であり、結果としてヘテロ型区と同様な発酵品質となっていた。このことからホモ型区では春開封から秋冬開封までの約6か月の貯蔵期間にWCSの発酵様相がホモ発酵型からヘテロ発酵型に変化したものと推察された。L.plantarumはホモ発酵型乳酸菌の中でも通性ヘテロ発酵型乳酸菌に分類されており、通常の嫌気的条件下ではグルコースから乳酸のみを生成するが、好気的条件下あるいはグルコースが著しく低い条件下では乳酸から酢酸を生成することが知られている<sup>13)</sup>。今回、ホモ型区のグルコースは秋冬開封のものでほとんど消失していた。また、河野ら(2013)<sup>5)</sup>によると、飼料イネロールベールサイレージにおいて保管期間が長くなるとロール内の窒素割合が増加することを報告しており、長期保管時のロール内への外気(酸素)侵入を示唆している。これらの条件から、ホモ型区において保管中にロール内の環境が変化したことに伴いL.plantarumが乳酸から酢酸を生成した可能性は十分に考えられる。一方、L.buchneriの乳酸代謝により生成される1,2-プロパンジオールも増加していたことから、今回のホモ型区における発酵様相の変化がL.plantarumの発酵様相の変化だけによるものではなく、発酵の経過に伴いWCS内の環境が変化した結果、元々「たちすずか」に付着していたL.buchneriの活動が活発になった可能性が示唆された。しかし、この仮説においては、無添加区でこのような変化は認められておらず、なぜホモ型区においてだけこのような変化が生じたのかは不明である。

(4)

表1. 乳酸菌添加と開封時期の違いによるWCSの発酵品質

	春開封 (調製後7~8ヶ月)			秋冬開封 (調製後14~18ヶ月)		
	無添加区	ホモ型区	ヘテロ型区	無添加区	ホモ型区	ヘテロ型区
n	3	2	2	5	5	4
pH	4.61	4.17	4.14	4.29	4.24	4.34
フルクトース (%FM)	0.29	0.34	0.20	0.37 <sup>a</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.17 <sup>b</sup>
グルコース (%FM)	0.21	0.14	0.02	0.41 <sup>a</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.01 <sup>b</sup>
スクロース (%FM)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
乳酸 (%FM)	0.65	1.01	0.68	1.06 <sup>a</sup>	0.70 <sup>ab</sup>	0.40 <sup>b</sup>
酢酸 (%FM)	0.20 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.63 <sup>b</sup>	0.27 <sup>a</sup>	1.02 <sup>b</sup>	1.12 <sup>b</sup>
プロピオン酸 (%FM)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
酪酸 (%FM)	0.09	0.04	0.10	0.08	0.06	0.08
エタノール (%FM)	1.77	1.65	2.10	2.14	1.92	1.95
1,2-プロパンジオール (%FM)	0.00	0.03	0.10	0.00 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>
アンモニア態窒素 (g/kgFM)	0.15	0.10	0.13	0.18	0.19	0.19

注. ab: 異符号間に有意差あり ( $p < 0.05$ ), %FM: 新鮮物あたり%, nd: no detect(ed)

### 3 好気的変敗の発生 (表2)

開封後7日目におけるWCSの品質は、無添加区では春開封・秋冬開封のいずれにおいても糖類・乳酸・酢酸含量が著しく低下し、pHの上昇や多量の二酸化炭素生成が確認された。さらに外見的に酵母の発生や変敗臭も確認され、好気的変敗の発生を認めた。一方ヘテロ型区では、乳酸含量の低下はあったもののpH変化や二酸化炭素発生量は小さく、好気的変敗が抑制されていた。開封時期によって発酵品質が大きく変わっていたホモ型区は、ヘテロ型区と同様な発酵品質であった秋冬開封において糖類・乳酸・酢酸含量やpHの変化はほとんど認められず、二酸化炭素発生量も少なく好気的変敗は抑制されていた。一方、春開封のホモ型区では2ロール中1ロールで好気的変敗が発生した。好気的変敗はサイレージが空気にさらされ、酵母が活動し始めて乳酸や糖類を代謝することでその進行が始まることから、好気的変敗を抑制するためには酵母の働きを抑えることが重要になる。L.buchneriが生成する酢酸は酵母やカビといった真菌類に対して抗菌作用を有する<sup>7)</sup>。今回の試験において、好気的変敗の抑制効果が春開封、秋冬開封ともに顕著であったヘテロ型区は

L.buchneriにより酢酸の生成量が多くなり、このことが好気的変敗の抑制に有効であったと考えられる。酢酸と同時に生成される1,2-プロパンジオールについては酢酸を上回る抗菌作用を有するプロピオン酸に分解される場合があるが、今回の試験ではプロピオン酸の生成は確認されなかった。一方L.plantarumなどのホモ発酵型乳酸菌は好気的変敗の抑制に対してほとんど効果がないことが報告されている<sup>3)</sup>。これはその発酵産物の主体である乳酸に真菌類に対する抗菌作用がほとんどないこと<sup>7)</sup>が要因として挙げられる。今回の試験でもホモ型区の春開封では、乳酸生成割合が高く、酢酸生成割合が低いL.plantarumに特徴的な発酵品質であり、好気的変敗の発生を十分に抑制することはできなかった。ところが秋冬開封のものはヘテロ型区と同様な発酵品質となり、酢酸の生成量が春開封のものに比べて大きく増加しており、このことが好気的変敗の抑制に有効であったと考えられた。ただ蔡ら(2003)<sup>2)</sup>の報告では「畜草1号」を添加して調製した飼料イネWCSの発酵様相は貯蔵期間が60日と370日のもので変化しておらず、この発酵様相の変化が必ずしも生じるとは言えず、L.plantarumが好気的変敗に有効であるとは一概には言えないであろう。



表2. 好気的変敗試験における乳酸菌添加と開封時期の違いによるWCS開封後7日目の発酵品質

	春開封 (調製後7~8ヶ月)			秋冬開封 (調製後14~18ヶ月)		
	無添加区	ホモ型区	ヘテロ型区	無添加区	ホモ型区	ヘテロ型区
n	3	2	2	5	5	4
pH	5.49	4.44	4.41	6.27 <sup>a</sup>	4.16 <sup>b</sup>	4.24 <sup>b</sup>
フルクトース (%FM)	nd	0.13	0.14	nd <sup>a</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>
グルコース (%FM)	0.02	0.04	0.02	0.00	0.01	0.01
スクロース (%FM)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
乳酸 (%FM)	0.53	1.01	0.38	0.22	0.63	0.29
酢酸 (%FM)	0.17	0.14	0.83	0.05	1.29	1.69
プロピオン酸 (%FM)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
酪酸 (%FM)	0.07	0.05	0.08	0.07	0.05	0.05
エタノール (%FM)	0.57	1.23	1.21	0.00 <sup>a</sup>	1.18 <sup>b</sup>	0.96 <sup>b</sup>
1,2-プロパンジオール (%FM)	0.00 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.28 <sup>b</sup>
アンモニア態窒素 (g/kgFM)	0.09	0.07	0.10	0.03 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.18 <sup>b</sup>
二酸化炭素発生量 (g/kgDM)	28.61	17.12	10.31	69.32 <sup>a</sup>	10.49 <sup>b</sup>	7.99 <sup>b</sup>

注. ab: 異符号間に有意差あり ( $p < 0.05$ ), %FM: 新鮮物あたり%, nd: no detect(ed)

#### 4 乳酸菌製剤の活用

飼料イネは、茎が中空状で WCS 調製時に空気が残存しやすく、他の飼料作物に比べて糖含量や付着乳酸菌数が少ないことから乳酸発酵が進みにくく品質の悪い WCS になりやすいことが知られている<sup>12)</sup>。これは、嫌気状態の確保や酸生成による pH の低下が進まず、WCS の劣化に関わる酪酸菌などの微生物を十分抑制することができないためとされている。こうしたことからイネ WCS の乳酸生成促進を目的とした飼料イネ専用の乳酸菌製剤「畜草 1 号」が開発・製品化され、その品質改善効果も明らかにされている<sup>2)</sup>。今回の試験においても、「畜草 1 号」を添加したホモ型区では乳酸生成量が増加しており、乳酸優勢の発酵品質であった。このように乳酸発酵を促進させることが WCS の品質を向上させるうえで重要であることは間違いないことであるが、逆に酵母などの真菌類をほとんど抑制できない乳酸が優勢の発酵品質となることは好気的変敗の起こるリスクを高めることにもつながる。好気的変敗の生じた WCS は栄養価の損失やカビ毒の生成が懸念されるため、牛への給与は避けるべきであり、結果として WCS の廃棄やその代替飼料の使用による飼料費の増大につながる。本試験の「たちすずか」WCS においても無添加区やホモ型区の一部で好気的変敗の発生が確認されており、小規模農家でのロール開封後の長期間利用、開封後に空気に暴露されやすいバンカーサイロ調製などの利用に対しては好気的変敗に対する方策を講じ

る必要性が示された。L.buchneri の好気的変敗に対する抑制効果はトウモロコシサイレージなどでは明らかとされていた<sup>4), 10)</sup>が、本試験の結果から「たちすずか」WCS の好気的変敗に対しても有効であることが明らかとなった。こうしたことから「たちすずか」WCS の調製においては、開封後直ちに使い切ることができるのであれば乳酸菌を使用しないか、あるいはホモ発酵型乳酸菌を使用して発酵品質を高める方向とし、逆に開封後すぐに使い切ることができない場合にはヘテロ発酵型乳酸菌を使用して好気的変敗を抑制するといった使い分けが必要と考えられる。

#### 摘要

高糖分飼料イネ「たちすずか」の WCS への乳酸菌添加において、ホモ発酵型乳酸菌では乳酸生成量が、ヘテロ発酵型乳酸菌では酢酸生成量が増加した。ただ、ホモ発酵型乳酸菌を添加して 1 年以上貯蔵していたものではヘテロ発酵型と同様な発酵品質となっており、長期貯蔵で発酵様相がヘテロ発酵型になったと考えられた。好気的変敗はヘテロ発酵型乳酸菌を添加することで、開封時期に関わらず抑制することが可能であった。「たちすずか」WCS に対する乳酸菌の利用は、WCS の調製や開封後の利用条件を考慮したうえで添加の有無やその種類を検討する必要がある。

(6)

## 参考文献

- 1) Ashbell G., Weinberg Z. G., Azrieli A., Hen Y. and Horev B.: A simple system to study the aerobic determination of silages. *Can. Agric. Eng.*, 33: 391 - 393P, 1991
- 2) 蔡義民, 藤田泰仁, 村井勝, 小川増弘, 吉田宣夫, 北村亨, 三浦俊治: 飼料イネサイレージ調製への乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* 畜草1号) の利用, *日草誌* 49, 477 - 485P, 2003
- 3) Danner H., Holzer M., Mayrhuber E. and Braun R.: Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 562 - 567P, 2003
- 4) Driehuis F., Oude Elferink S. J. W. H. and Spoelstra S. F.: Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 583 - 594P, 1999
- 5) 河野幸雄, 福馬敬紘, 城田圭子, 神田則昭, 新出昭吾: 飼料イネロールベールラップサイロ内ガス組成の推移, 関西畜産学会第63回大会講演要旨集: 10P, 2013
- 6) 松下景, 飯田修一, 出田収, 春原嘉弘, 前田英郎, 田村泰章: 茎葉多収で消化性に優れた高糖分含量の飼料用水稲品種「たちすずか」の育成, *近中四農研報* 11, 1 - 13P, 2012
- 7) 西野直樹: サイレージ発酵の原理(安宅一夫監修: 最新サイレージバイブル - サイレージとTMRの調製と給与 - ), 21 - 22P, 酪農学園大学エクステンションセンター, 北海道, 2012
- 8) Nishino N., Hattori H. and Kishida Y.: Alcoholic fermentation and its prevention by *Lactobacillus buchneri* in whole crop rice silage. *Lett. Appl. Microbiol.*, 44: 538 - 543P, 2007
- 9) Nishino N. and Shinde S.: Ethanol and 2,3-butanediol production in whole-crop rice silage. *Grassl. Sci.*, 53: 196 - 198P, 2007
- 10) Nishino N., Yoshida M., Shiota H. and Sakaguchi E.: Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 800 - 807P, 2003
- 11) Oude Elferink S. J. W. H., Krooneman J., Gottschal J. C., Spoelstra S. F., Faber F. and Driehuis F.: Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 125 - 132P, 2001
- 12) 社団法人日本草地畜産種子協会: 稲発酵粗飼料生産・給与技術マニュアル平成23年度版, 58P, 社団法人日本草地畜産種子協会, 東京, 2012
- 13) 内田仙二, 大島光昭監修: サイレージの生化学第2版, 118 - 119P, デーリィ・ジャパン社, 東京, 1995

## 桑実胚由来細胞をドナー細胞に用いた核移植胚を活用した 胚 DNA 型判定および種雄牛造成

日高健雅\*・福本豊・今井佳積\*\*・山田博道\*\*\*・尾形康弘

### 要 約

当センターで開発した「細胞剥離法」により桑実胚から採取した細胞をドナー細胞として核移植胚を生産する方法を確立した。核移植胚の DNA 型を判定することによる作出体外受精胚の DNA 型の判定成績と、この方法を活用した種雄牛検定法のクローン検定の効率を調査した。

細胞を採取、核移植した 27 個の桑実胚のうち、25 個(92.6%)で DNA 型判定用の核移植胚を確保した。その核移植胚を用いた DNA 型判定により、22 個(81.5%)の DNA 型判定済み胚を生産できた。DNA 型判定済み胚 22 個のうち 17 個を移植し、9 頭(52.9%)が受胎した。受胎した 9 頭のうち 6 頭が分娩し、産子の血液による DNA 型判定で全頭が胚診断結果と一致した。種雄牛候補牛生産効率の比較では、1 頭の種雄牛候補牛の生産に必要な処理胚は、2 分割区が 9.2 個、細胞剥離区は 4.4 個だった。また、生産した雄胚の受胎率は、2 分割区が 41.7%、細胞剥離区が 55.6%だった。処理胚の 80%以上が DNA 型判定済み胚として生産でき、受胎率も 50%を超えたことから、今回構築した方法により DNA 型判定済み胚の生産、普及が可能と考えられた。また、種雄牛造成において桑実胚から採取した剥離細胞を用いた核移植胚生産により、種雄牛候補牛生産の生産効率向上が可能と考えられた。

### 緒言

広島県では、ウシ受精胚の着床前遺伝子診断のために必要な細胞採取方法として、体外受精後 5 日目の桑実胚から 1~2 個の細胞を剥がし取る「細胞剥離法」を開発している<sup>14)15)</sup>。体外受精後 7 日目の胚盤胞の栄養膜をブレードにより切り取る従来法<sup>11)22)</sup>は、採取細胞数が多いうえ、ブレードにより胚細胞を傷つけてしまうことから胚の品質が低下するのに対し、細胞剥離法は胚を傷つけず採取細胞数も少ないことから、胚の品質が向上するメリットがある<sup>15)</sup>。細胞剥離法は、泌乳の影響により受精卵生産効率が低い乳用牛からの雌胚生産に有効であり、酪農家が後継雌牛を確保するために活用している。

近年、黒毛和種のゲノム解析が全国的に進められ、産肉形質や遺伝子疾患の原因となる遺伝子が同定され、子牛生産への活用が可能になってきている<sup>3)18)20)24)</sup>。Stearoyl-CoA Desaturase(SCD), Fatty Acid Synthase (FASN)および Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBP-1)で検出された塩基配列(DNA 型)は、牛肉のおいしさを判断する指標の一つである不飽和脂肪酸含有割合と相関することが示されている<sup>1)6)21)</sup>。また、クローディン 16 (CL16)欠損症のように、黒毛和種産子で腎機能障害を伴う発育不良として特徴づけられる疾患の原因遺伝子も同定されている<sup>3)10)17)</sup>。

このように黒毛和種の生産性に影響を及ぼす遺伝子の DNA 型が多数同定され、これらを生牛生産に活用し育種改良速度を向上させることが期待されている。

これらの遺伝子の DNA 型を胚の段階で診断するためには、細胞剥離法により採取した細胞を用いた DNA 型判定が有効であるが、細胞剥離法で採取可能な細胞数は 2-3 個であることから、診断に必要な DNA 量が確保できないため複数の DNA 型判定が困難である。そこで細胞剥離法により桑実胚から採取した細胞をドナー細胞として核移植を行い、核移植胚を生産する方法を開発し、2-3 個の細胞を 100 個/胚に増やすことを可能とした。今回、我々が開発した方法を活用して少数の剥離細胞から生産した核移植胚を用いて DNA 型判定することによる、DNA 型判定済み胚の生産効率および診断精度を調査したので、その概要を報告する。

また、広島県では、黒毛和種の種雄牛造成の効率化を目的として、平成 19 年度から受精卵クローン技術を活用した「クローン検定」を種雄牛造成方法として導入している。

クローン検定は、まず雌牛から経膈採卵(OPU:Ovum Pick Up)によって得られた卵子と精液により体外受精を実施する。2 細胞期の胚を 2 つに

(8)

分割し、片方はそのまま7日間の培養により胚盤胞まで発育させ、種雄牛候補用の胚とする。もう片方は、5日目の桑実胚まで発育させた後、核移植用のドナー細胞として核移植に用い生産した核移植胚から肥育検定用のクローン牛を生産する<sup>2)</sup>。これらの検定用クローン牛を27ヶ月齢まで肥育して得られた産肉成績から、候補種雄牛の能力を検定するのがクローン検定である。

この「クローン検定」において、従来の2細胞期に2分割する方法では、胚が半分になることにより発生率の低下や胚の品質の低下が認められることや、2分割した2つの胚のうち、片方しか桑実胚まで発育しない場合が認められるなど、生産効率が高くない課題があった。そこで、検定用クローン牛生産に桑実胚からの剥離細胞を用いた核移植胚を使う方法を取り入れ、従来の2細胞期に2分割する方法と生産効率を比較したので、その概要を報告する。

## 材料および方法

### 1 体外受精卵の作出

体外受精卵および核移植胚の作出における経膈採卵、発生培養、細胞剥離、核移植方法は全て尾形<sup>13)14)</sup>らの方法に従った。

供卵牛は、広島県立総合技術研究所畜産技術センターで飼養する黒毛和種経産牛8頭を用いた。

経膈採卵は、超音波画像診断装置(SSD-1200, アロカ, 東京)に経膈穿刺用コンベックス探触子(UHT-9106-7.5, アロカ, 東京)を装着し、ディスプレイ探卵針(ミサワ医科工業株式会社, 茨城)と卵子吸引システム(K-MAR-5115, Cook Medical, Australia)を用いて実施した。還流液には、0.3%ウシ胎児血清(FCS: Fetal Bovine Serum, Hyclone, Utah, U.S.A)および1.8IU/mlヘパリン添加乳酸加リンゲル液(ハルゼンV注射液: 日本全薬工業, 東京)を用いた。卵巣からの卵胞液吸引は卵巣表面から卵胞へ直接穿刺しながら吸引し、吸引圧100 mmHgで吸引した。回収液を0.3%FCS添加乳酸加リンゲル液で洗浄しながらセルコレクター(富士平工業, 東京)でろ過し卵丘細胞卵子複合体(Cumulus-Oocyte Complex: COC)を回収した。回収したCOCは10%FCS添加リン酸緩衝液で3回以上洗浄した後、TCM-199(Medium199:12340-030, Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A)を基礎培地とし10%FCS, 0.12AU/ml卵胞刺激ホルモン(アントリン10, 共立製薬, 東京)及び50ng/ml上皮成長因子(Epidermal Growth Factor: E9644, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

U.S.A)を添加した体外成熟培地に移し, 38.5 ± 5%CO<sub>2</sub>, 95%Airの気相条件下で22~24時間成熟培養を行った。

体外受精は、堀内ら<sup>7)</sup>に従い、凍結精液を用いて精子濃度を6~12×10<sup>6</sup>/mlに調整し、媒精を6時間行った。媒精後の体外発生培養は、媒精後72時間目まではmSOF(modified Synthetic Oviduct Fluid medium: 修正合成卵管液)を基礎培地とし、3 mg/ml牛血清アルブミン(Bovine Serum Albumin: A-4378, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A), 0.25 mg/ml リノール酸アルブミン(linoleic acid albumin: L-8384, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)を添加した発生培地で38.5 ± 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>の低酸素条件下で培養した。72時間以降はmSOFを基礎培地とし、10%FCSと10 μg/mlインスリン(Insulin: I-6634, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)を添加した発生培地で、38.5 ± 5%CO<sub>2</sub>, 95%Airの気相条件下でVero細胞(動物衛生研究所, 茨城県)と共培養した。

### 2 胚の2分割および桑実胚からの細胞剥離

胚の2分割は経膈採卵・体外受精後2日目の2細胞期胚を、細胞剥離は体外受精後5日目の桑実胚を用いた。胚を0.25%アクチナーゼE(Actinase E, 科研製薬, 東京)に約60秒静置し、透明帯を除去した後、20%FCS添加M2(M2: M-5910, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)液に移し酵素反応を停止した。2分割または細胞剥離は、0.125%トリプシン(Trypsin: 27250-042, GIBCO, Gaithersburg, MD, U.S.A.)添加PBS(-)に移し、ガラス製毛細管(MICRODISPENSER: 3-000-210-G, Drummond, Birmingham, U.S.A.)をガスバーナーで炙って細くピペット状に加工したものを、数回ピペッティングすることにより実施し、2細胞期胚は2分割した時点、桑実胚は胚表層の3~5個の細胞が剥離した時点で胚を20%FCS添加M2液に移し、酵素反応を停止させた。2分割した胚は、片方は7日目まで培養を継続し、胚盤胞まで発育させ、残りの片方は5日目の桑実胚まで培養を継続したのち、0.125%トリプシン液内でのピペッティングによりバラバラにし、ドナー細胞として核移植に供した。細胞剥離した桑実胚は発生培地(10%FCS, 10 μg/ml Ins添加mSOF培地)で培養したのち胚盤胞まで発育させ、剥離した細胞は剥離後2時間以内にドナー細胞として核移植に供した。

### 3 核移植胚の作出

核移植に用いるレシピエント卵子は、細胞剥離を行う前日に経膈採卵により採取した。COC を成熟培養後、0.1% コラゲナーゼ (Collagenase :C-9722, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) および 0.1% ヒアルロニダーゼ (Hyaluronidase :H-3506 Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 添加 M2 液中でピペティングし、卵丘細胞を除去し、囲卵腔内に第一極体の放出が認められた成熟卵子のみを除核しレシピエント卵子に用いた。除核はマイクロマニピュレーター (NT-88-V3, NARISHIGE, 東京) を用いて透明帯にスリットを形成し、極体を目印にした細胞質押し出し法により行った<sup>19)</sup>。

除核卵子はカルシウムイオノフォア (Calcium Ionophore A23187:C7522, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 10  $\mu$ M とイノシトール 3 リン酸 (InsP3, 株同仁化学研究所, 熊本) 25  $\mu$ g/ml で 5 分間処理した後、ピューロマイシン (Puromycin :P-7255, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 100  $\mu$ g/ml と BSA3 mg/ml を添加した CR1aa 培地で 6 時間培養する複合活性化処理を施した。除核卵子に、ドナー細胞をマイクロマニピュレーターにて挿入後、チンマーマン氏液中にて交流 8.5 V/mm 5 sec, 直流 75 V/mm 50  $\mu$ sec  $\times$  2 回の電気パルス印加することにより細胞融合を行った。

体外培養は、電気インパルス印加後 72 時間目までは 3 mg/ml BSA 添加 CR1aa 培地にて、5%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>, 38.5 の条件下で、72 時間目以降は 10%FCS 添加 CR1aa 培地にて Vero 細胞との共培養を行った。

### 4 核移植胚の DNA 抽出と DNA 型判定

胚からの DNA 抽出は、Hirayama ら<sup>4)5)</sup>の報告に基づくアルカリ処理法で実施した。胚サンプルは、1 mg /ml ポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone :P-0930, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 含有 PBS(-)液 (30  $\mu$ l) で 6 回洗浄後、滅菌水に移し、サンプル細胞を含む 2  $\mu$ l を採取し、0.05N-NaOH 液 2  $\mu$ l が入ったサンプルチューブに移して混和後、室温で 15 分放置した。その後 95 で 15 分加熱し、1M-Tris-HCl (pH8.0) を 1  $\mu$ l 加えて中和したものを胚 DNA 抽出液とした。

DNA 型判定に用いた対象遺伝子は SREBP-1 および CL-16 とした。SREBP-1, CL-16 とともに PCR 反応の酵素には増幅効率が高い KOD-FX (KFX, 東洋紡, 大阪) を

用いた。PCR 反応液の組成は、DNA 抽出液 1~4  $\mu$ l, KOD-FX (1.0U/  $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, 2  $\times$  PCR Buffer for KOD-FX 7.5  $\mu$ l, 2mM dNTPs 3  $\mu$ l, Primer (10pmol/  $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l とし、滅菌水で 15  $\mu$ l に調整した。SREBP-1 DNA 型判定用プライマーは、Forward: 5'-CCACAACGCCATCGAGAAACGATAC-3' と Reverse: 5'-GGCCTCCCTGACCACCCAATTAG-3' を用いた<sup>6)</sup>。CL-16 タイプ 1 欠損 DNA 型判定用プライマーは、Forward: 5'-ATTGTATTTTAGGAGTGACTC-3' と Reverse: 5'-CCCCCCCCACTCTATAC-3' を、正常アリル検出用は、Forward: 5'-TATGCTGTTGATGTTTATGTAG-3' と Reverse: 5'-CCCCCCCCGCTTTTTC-3' を用いた<sup>3)</sup>。

PCR サイクルは、94 で 2 分加熱後、SREBP-1 では 98 10 秒、60 30 秒、68 30 秒を 35 サイクル、CL-16 タイプ 1 では、98 10 秒、55 30 秒、68 1 分を 40 サイクルとした。PCR 反応液を、3% アガロースゲル (Agarose S, ニッポンジーン, 東京) で電気泳動し、出現バンドから DNA 型を判定した。

### 5 核移植胚を用いた DNA 型判定済み胚の生産効率調査

細胞剥離した桑実期胚の DNA 型判定用核移植胚の生産率、DNA 型判定率、診断済み胚の受胎率、出生産子と胚の DNA 型判定結果の一致性を調査した。

### 6 クローン検定における 2 分割法と細胞剥離法の比較

クローン検定における種雄牛候補牛生産効率を、2 細胞期に分離し片方を核移植に用いる方法 (2 分割区) と桑実期に剥離した細胞を核移植に用いる方法 (細胞剥離区) の両区で比較した。2 分割区では、体外受精翌日に 2 細胞期胚を 2 分割した後、5 日目まで培養し両方とも発育した胚のうち、片方を種雄牛候補胚、片方を核移植用ドナー胚とし核移植に供した。細胞剥離区では、1 胚から 5 個前後の細胞を剥離し、核移植用ドナー胚とし核移植に供した。両区とも、核移植 2 日後に発育が停止している核移植胚から DNA を抽出し性別に用い、雄と判定された種雄牛候補胚を移植に供した。

胚の性別判定は、市販の性別判定キット (Loopamp 牛胚性別判定キット, 栄研化学株式会社, 東京) を用い、キットのマニュアルに従って実施した。

(10)

## 成績

### 1 核移植胚を用いた DNA 型判定

経膈採卵，体外受精し 5 日目に正常に発育した桑実胚のうち，SREBP-1 の DNA 型判定用に 15 個，CL-16 の DNA 型判定用に 12 個，計 27 個の桑実胚を細胞剥離に供した。桑実胚から剥離した各胚の細胞数は，1～12 個平均 3.78 個/胚であり，このうち各胚 1～6 個平均 3.26 個/胚を核移植に供し，各胚 0～4 個平均 1.4 個の DNA 型判定用の核移植胚を作出

した(表 1)。細胞剥離した 27 個の桑実期胚のうち，25 個(92.6%)で DNA 型判定用の核移植胚を作出できた。この核移植胚を用いた DNA 型判定により，SREBP-1 で 11 個，CL-16 で 11 個，計 22 個(81.5%)の DNA 型判定済み胚を生産できた(表 2)。DNA 型判定済み胚 22 個のうち 17 個を移植し，9 頭(52.9%)が受胎した(表 3)。受胎した 9 頭のうち 6 頭が分娩し，産子の血液による DNA 型判定で全頭が胚における DNA 判定結果と一致した(表 4)。

表1 . DNA型判定用核移植胚生産状況及び細胞剥離した元の胚の移植状況

胚番号	採取細胞数	核移植細胞数	核移植胚生産数	DNA型判定可非	受精卵移植	受胎	分娩
SR-1	3	3	1				
SR-2	4	4	1				
SR-3	3	3	2				
SR-4	6	6	3				
SR-5	6	4	4				
SR-6	1	1	1				
SR-7	3	3	1				
SR-8	12	5	1				
SR-9	4	3	2				
SR-10	4	3	1				
SR-11	4	3	2				
SR-12	3	3	0	ND			
SR-13	3	3	2				
SR-14	3	3	1				
SR-15	5	5	0	ND			
CL-1	3	3	1				
CL-2	3	1	1				
CL-3	2	2	1				
CL-4	3	3	1				
CL-5	3	3	1				
CL-6	3	3	1				
CL-7	3	3	1				
CL-8	3	3	2				
CL-9	3	3	3				
CL-10	4	4	2				
CL-11	4	4	1				
CL-12	4	4	1				
average	3.78	3.26	1.41				

After Et, recipient cow transported other farm

表2 . DNA型判定用核移植胚を用いたDNA型判定成績

	細胞採取胚数	DNA型判定 実施胚数	DNA型 判定済胚数	判定率
SREBP	15	13	11	73.3%
CL-16	12	12	11	91.7%
計	27	25	22	81.5%

表3. DNA型判定済み胚の移植成績

移植可能胚数	移植数	受胎	受胎率
22	17	9	52.9%

表4 . 胚診断と出生子牛の血液からのDNA型検査結果

	産仔番号	胚診断結果	出生子牛 血液検査
SREBP		SS	SS
		LS	LS
		LS	LS
CL-16		SS	SS
		正常	正常
		正常	正常

## 2 クローン検定における2分割と細胞剥離の比較

種雄牛候補牛生産効率の比較では、2分割区46個、細胞剥離区22個の胚を種雄牛造成のための操作に供した。2分割した46組の操作胚中21組が両方の胚が桑実胚まで発育したため、片方を核移植できた。21組中18組で核移植胚の一部を用いて性別判定を実施し、13組が雄判定を得た。移植可能な種雄牛候補胚と核移植胚の両方が正常に発育した胚は11組だった(表5)。

一方、細胞剥離区では、22個の操作胚のうち16個で剥離した細胞をドナー細胞として核移植した。操作した胚16個で核移植胚の一部を用いた性別判定を行い、10個が雄判定を得た。生産した雄胚のうち、2分割区で11個、細胞剥離区で9個の胚を移植し、各5頭ずつ受胎し、受胎率は、2分割区が41.7%、細胞剥離区が55.6%だった(表6)。1頭の種雄牛候補牛の生産に必要な操作胚数は、2分割区が9.2個、細胞剥離区は4.4個だっ

た(表7)。

また、受胎した胚から作出した核移植胚を用いた肥育検定用のクローン牛生産を、2分割区では受胎5頭中3頭、細胞剥離区では受胎5頭中2頭で取組んだ結果、いずれも1頭以上のクローン牛を生産できた。

(12)

表5. 種雄牛候補の胚とそのクローン胚の生産成績

	操作胚数	生産胚数	核移植胚	性別別胚	移植可雄胚	雄胚とクローン胚の	
						セット確保数	セット確保率
2分割	46	21	21	18	13	11	23.9%
細胞剥離	22	22	16	16	10	10	45.5%

2分割した胚の両方が正常に発育したものを生産胚数とした。  
核移植した胚のうち、片方の胚が正常に発育したものを性別別に供した。

表6. 種雄牛候補胚の移植成績

	移植可雄胚	移植頭数	受胎頭数	受胎率
2分割	13	12	5	41.7%
細胞剥離	10	9	5	55.6%

表7. 種雄牛候補牛の生産効率の比較

	種雄牛候補牛生産に		
	操作胚数	受胎頭数	必要な操作胚数
2分割	46	5	9.2
細胞剥離	22	5	4.4

## 考 察

近年、黒毛和種の全国的なゲノム解析研究の結果、遺伝性疾患については、CL-16 タイプ 1 欠損症<sup>3)</sup>、ウシバンド3欠損症(band3<sup>9)</sup>、第X 因子欠損症(F13)<sup>16)</sup>、チェディアックヒガシ症候群(CHS)<sup>24)</sup>などが原因遺伝子の同定と診断法が確立されている。また、産肉性などの経済形質については、SCD、FASN 等の脂肪構成に関わる経済的遺伝子の診断法が確立されている<sup>1) 21)</sup>のにくわえ、父方半きょうだい家系を用いた QTL 解析で、枝肉重量や脂肪交雑形質に関係する QTL が検出されて<sup>8)</sup>あり、優良牛選抜への活用が可能となってきている。

また、移植前胚を用いて、性別判定、DNA 多型診断や経済形質に関係する遺伝子の判定が行われており、ウシの育種において、胚の DNA 診断は重要な技術に位置づけられる。しかし、胚を用いた DNA 診断では、胚の細胞を一部採取して診断用 DNA サンプルに用いるが、元の胚の生存性や高い受胎性を維持するためには、出来るだけ採取する細胞を少なくすることが必要であるため、十分な DNA 量が確保できず胚の DNA 診断は困難な現状がある。

そのため、少数細胞から全ゲノム増幅方法を用いて

ウシ胚の複数の遺伝子について DNA 診断する研究が進められているが、少数細胞からの全ゲノム増幅では、全胚の診断結果との不一致やアレルの消失が認められるなどの報告<sup>5)</sup>があり課題が残されている。そのため、全ゲノム増幅方法の場合、十分な DNA 量を確保するために、10～15 細胞が必要であることが示唆されている。

我々が実施した核移植胚を用いた DNA 型判定の試験では、元の胚から剥離した細胞から核移植胚の作出および核移植胚による DNA 型判定が可能であり、細胞採取操作を実施した胚のうち、81.5%が DNA 型判定済み胚として生産できた。さらに、DNA 型判定済み胚の移植受胎率が 52.9%、誕生牛における移植前の胚判定結果と生後判定結果と一致していた。

このことから、剥離採取した細胞をドナー細胞として作出した核移植胚を用いて DNA 型判定する方法は、元の胚の DNA 型を判定するためには有効であると考えられた。また、元の胚からの細胞の採取方法に剥離法を用いることにより、元の胚の損傷が少なく生存性および受胎性が高い胚が生産できたため、この方法による DNA 型判定済み胚の生産、普及が可能と考えられた。

さらに今回我々は、桑実胚から剥離した細胞を用いて核移植胚を生産する方法を、種雄牛造成法であるクローン検定にも活用し、剥離細胞を用いる細胞剥離区



と、従来法の 2 分割区における種雄牛の生産効率を比較した。

通常の種雄牛造成は、種雄牛候補牛が成牛になった後、10 頭以上の子牛を生産しその肥育成績から種雄牛候補牛の能力を検定するため、7-8 年という多くの年月と労力が必要である。そこで、胚盤胞を 2 分割し 1 卵生双子を生産し、片方の肥育成績から種雄牛候補牛の能力を検定する方法が取り組まれている。この方法は種雄牛候補牛と肥育牛がほぼ同時に生まれてくることから、検定期間を 3.5 年と短縮できる利点がある。一方で、分割した胚の受胎率が低いことから双子生産は容易ではなく、他県の取り組みでは、173 頭に 1 胚または 2 胚ずつ移植し 12 ペア (13.8%) の生産という報告<sup>23)</sup>もあり、生産効率が低い課題がある。

この課題を解決するために、尾形ら<sup>13)</sup>は、2 細胞期に 2 分割し片方を種雄牛候補牛とし、もう片方を核移植に用い肥育用クローン牛を生産するシステムを開発した。このシステムは、先に種雄牛候補の胚を移植し、受胎確認後に 10 数個の核移植胚を作出・移植するため、肥育検定用クローン牛の確保効率の大幅な向上を可能とした。しかし、この方法では肥育用検定牛の生産効率は改善できたが、2 分割した種雄牛候補胚の受胎率が低い課題は残されたままであった。

そこで、細胞剥離法を種雄牛候補とクローン牛候補生産に活用した結果、移植可能な雄胚の生産効率および雄胚の移植受胎率はいずれも細胞剥離区で高くなり、1 頭の種雄牛候補牛を生産するのに必要な胚数は、細胞剥離区 (4.4 個) は 2 分割区 (9.2 個) の約半数と生産効率が向上した。

以上から、桑実期胚から採取した剥離細胞を用いた核移植胚生産をクローン検定に活用することにより、種雄牛候補牛と肥育検定用クローン牛生産のペア生産効率向上が可能と考えられた。

## 引用文献

- 1) Abe T, Saburi J, Hasebe H, Nakagawa T, Misumi S, Nade T, Nakajima H, Shoji N, Kobayashi M, and Kobayashi E.: Novel mutations of the FASN gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. *Biochemical genetics* 47, 397-411 P, 2009.
- 2) 古川力: クローン技術を用いた肉用牛育種法の検討, *日畜会報* 81, 53-64 P, 2010.
- 3) Hirano T, Kobayashi N, Itoh T, Takasuga A, Nakamaru T, Hirotsune S, and Sugimoto Y.: Null Mutation of RCLN-1/Claudin-16 Results in Bovine Chronic Interstitial Nephritis. *Genome Research* 10, 659-663 P, 2000.
- 4) Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Hirano T, Sugimoto Y, Kobayashi N, Inaba M, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A.: Genetic Diagnosis of Claudin-16 Deficiency and Sex Determination in Bovine Preimplantation Embryos. *Journal of Reproduction and Development* 50, 613-618 P, 2004.
- 5) Hirayama H, Fujiwara A, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A.: Multiple genotyping in bovine pre-implantation embryos with whole genome amplification. *Animal Science Journal* 79, 554-560 P, 2008.
- 6) Hoashi S, Ashida N, Ohsaki H, Utsugi T, Sasazaki S, Taniguchi M, Oyama K, Mukai F, Mannen H.: Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian genome* 18, 880-886 P, 2007.
- 7) 堀内俊孝: 牛の体外受精マニュアル, *広島農業の研究* 26, 31-40 P, 1999.
- 8) 今井佳積, 井原紗弥香, 松重忠美, 平野貴, 渡邊敏夫, 杉本喜憲: 遺伝子型を活用した「広島牛」育種手法の確立に関する研究, *広島県立総技研畜技セ研報* 16, 37-44 P, 2012.
- 9) Inaba M, Yawata A, Koshino I, Sato K, Takeuchi M, Takakuwa Y, Manno S, Yawata Y, Kanzai A, Sakai J, Ban A, Ono K, Maeda Y.: Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. *The Journal of Clinical Investigation*, 91: 1804-1817 P, 1996.

(14)

- 10) Kobayashi N, Hirano T, Murayama S, Matsuno H, Mukoujima K, Morimoto H, Noike H, Tomimatsu H, Hara K, Itoh T, Imakawa K, Nakayama H, Nakamaru T, Sugimoto Y.: Genetic mapping of a locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1. *Animal Genetics* 31, 91-95 P, 2000.
- 11) Leoni G, Ledda S, Bogliolo L, Naitana S. Novel approach to cell sampling from preimplantation bovine embryos and its potential use in embryonic genome analysis. *J Reprod Fert.* 119:309-14 P, 2000.
- 12) 小浜菜美子, 秋山敬孝, 岩城史之, 福島護之: ウシ体外受精胚における複数遺伝子診断のためのDNA抽出法と遺伝子増幅法, 兵庫県農技総合セ研報 48, 5-10 P, 2012.
- 13) 尾形康弘, 谷本陽子, 松重忠美, 栗原順三, 今井昭, 堀内俊孝: クローン技術を活用した種雄牛造成の効率化, 広島県獣医学会雑誌 20, 11-15 P, 2005.
- 14) 尾形康弘, 日高健雅, 松重忠美, 堀内俊孝: ウシ胚からの性判別用細胞採取法の開発, 広島県獣医学会雑誌 22, 16-19P, 2007.
- 15) Ogata Y, Hidaka T, Matzushige T, Maeda T.: Comparison of Two Biopsy Methods in Bovine Embryos. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 2394-1081 P, Vol 2, Issue1 2015.
- 16) 小川博之: 和牛の第X因子欠乏症, *JVM 獣医畜産新報*, 49: 411-412 P.1996.
- 17) Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Asahina S, Nishimori K, Yoneda K, Kunieda T, Sasaki Y.: Homozygosity mapping of the locus responsible for renal tubular dysplasia of cattle on bovine Chromosome 1. *Mammalian Genome* 11, 316-319 P, 2000.
- 18) Setoguchi K, Furuta M, Hirano T, Nagao T, Watanabe T, Sugimoto Y, Takasuga A.: Cross-breed comparisons identified a critical 591-kb region for bovine carcass weight QTL(CW-2) on chromosome 6 and the lle-442-Met substitution in NCAPG as a positional candidate. *BMC Genetics* 10, 43-49 P, 2009.
- 19) 高野博, 新田良平, 加藤容子: 核移植実験系における電気刺激時の温度条件の検討, 繁殖技術会誌 13, 15-19 P, 1991.
- 20) Takasuga A, Watanabe T, Mizoguchi Y, Hirano T, Ihara N, Takano A, Yokouchi K, Fujikawa A, Chiba K, Kobayashi N, Tatsuda K, Oe T, Furukawa-Kuroiwa M, Ogino A, Sugimoto Y.: Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. *Mammalian Genome* 18, 125-136 P, 2007.
- 21) Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S.: Genotype of stearoly-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome* 15, 142-148 P, 2004.
- 22) Thibier M, Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43, 71-80 P, 1995.
- 23) 堤知子, 窪田力, 加治佐修, 横山喜代志, 川畑憲次: 分割胚双子牛の相似性に関する研究, 鹿児島県畜試研報 28, 7-19 P, 1995.
- 24) Yamakuchi H, Agaba M, Hirano T, Hara K, Todoroki J, Mizoshita K, Kubota C, Tabara N, Sugimoto Y.: Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle(Wagyu). *Animal Genetica* 31, 13-19 P, 2000.

# 大腸菌不活化ワクチンの接種が ウシ乳腺の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

森本和秀

広島大学大学院 生物圏科学研究科 (2013)

## 総括

本研究は、乳牛の大腸菌性乳房炎予防のための大腸菌不活化ワクチンの応用を目指し、下痢予防用の大腸菌不活化ワクチンの接種が乳牛の乳腺の免疫機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。このため、野外研究において大腸菌不活化ワクチンが乳房炎の発生率およびそれによる死廃率に及ぼす影響を調べた。さらに、大腸菌不活化ワクチンの接種が、lipopolysaccharide (LPS) を乳房内に投与した際の自然免疫応答に及ぼす影響を調べた。

### 1. 大腸菌不活化ワクチンの接種が牛の乳房炎の発生率、死廃率および乳汁、血液成分に及ぼす影響

#### (1) 大腸菌不活化ワクチンの接種が乳房炎発生率および死廃率に及ぼす影響

2007 および 2008 年に酪農家 5 戸の乳牛を用いてランダム化比較試験を行った。供試牛は、2007 年は 4 戸 273 頭、2008 年は 3 戸 207 頭を用いた。各戸のウシをランダムにワクチン接種牛と非接種牛とに区分けし、接種牛には大腸菌不活化ワクチンを約 1 ヶ月間隔で 2 回接種した。使用した大腸菌ワクチンは、本来妊娠母牛に接種し、初乳を介して子牛に抗体を付与し、子牛の大腸菌性下痢症を防ぐ目的で使われるものだが、実験では接種を 5~7 月に農家ごとに 1 日で行った。家畜診療所の治療を受け、カルテに記録された臨床型乳房炎を乳房炎と定義し、供試頭数に対する乳房炎発生頭数の割合を発生率とした。また、乳房炎発生後の転帰（治癒あるいは死亡・廃用）に基づいて、乳房炎発生頭数に対する死亡・廃用牛の割合を死廃率と定義した。2007 年の試験の結果、接種牛と非接種牛で乳房炎発生率に差はなかったが、接種牛の死廃率が非接種牛に比べて低くなる傾向があり、生存時間分析において両者の生存関数に有意差が認められた。また、症状の重い甚急性乳房炎の発生率は接種牛と非接種牛で差はなかったが、接種牛の死廃率が非接種牛に比べて有意に低かった。2008 年は乳房炎発生率および死廃率ともに差は認められなかった。

以上の結果から、大腸菌不活化ワクチンの接種により、乳房炎発生率は変化しないが、乳房炎発生時の死廃率が低下することが示唆された。

#### (2) 大腸菌不活化ワクチンの接種が大腸菌性乳房炎発生牛の血液成分および乳汁中生菌数に及ぼす影響

罹患乳房からグラム陰性桿菌が分離された大腸菌性乳房炎の乳牛 56 頭を用いて後ろ向きコホート研究を行った。これらのウシをワクチン接種歴により接種牛と非接種牛とに区分けし、それぞれその後の死廃率を比較検討した。また、大腸菌性乳房炎と診断された時の血液および乳汁検査データについて、大腸菌不活化ワクチン接種牛と非接種牛との比較および治癒した症例と死亡・廃用となった症例との比較を行った。56 例中ワクチン接種牛 31 例（治癒 22，死亡・廃用 9），非接種牛 25 例（治癒 14，死亡・廃用 11）であった。接種牛は非接種牛に比べてワクチン抗体価が有意に高く、IgG 濃度が有意に低かった。非接種牛において、年齢、総ビリルビン、血液尿素窒素、生菌数は治癒牛に比べて死廃牛が有意に高く、血小板数は逆に死廃牛が有意に低かった。接種牛においては、総ビリルビン、クレアチンキナーゼ活性、ハプトグロビン濃度および乳汁中の生菌数が治癒牛に比べて死廃牛の方が有意に高かったが、年齢および血小板数については、両者間に有意差は認められなかった。

ワクチンを分娩に関係なく初夏に一斉接種したウシと、季節に関係なく分娩前に接種したウシとを比較すると、初夏一斉接種の死廃率（11%，2/18）が分娩前接種の死廃率（54%，7/13）より有意に低かった。

以上の結果から、大腸菌不活化ワクチンを接種すると高齢牛でも治癒する可能性が高くなり、大腸菌性乳房炎発生時の血小板の減少が緩和されると考えられた。また、ワクチンの接種時期は分娩前の逐次接種よりも初夏一斉接種の方が効果的であると考えられた。

### 2. 大腸菌不活化ワクチンの接種が LPS を注入したウシ乳腺の自然免疫機能に及ぼす影響

大腸菌不活化ワクチンを接種した際に起きる大腸菌性乳房炎の症状の緩和が、自然免疫応答においても起きるか否かを明らかにするため、泌乳中期のホルスタイン種乳牛 14 頭を供試し、7 頭に大腸菌不活化ワクチンを 1 回皮下接種した。その 3 週間後、全頭の後ろの片側の乳房内に LPS を投与した。生乳は、1 日目は LPS 投与前（0 h）および 1 時間（1 h）後から 12 h 後まで 1 時間おきに採取

し、2日目から4日目まで1日2回9時と16時に採取した。血液は0, 4, 8, 24, 48, 72, 96 h後に採取した。生乳は体細胞数(SCC), lactoperoxidase (LPO) 活性, lingual antimicrobial peptide (LAP), lactoferrin (LF) 濃度を測定した。各検査値の平均値がピークとなった時点の値を用いて相関分析を行った。血液成分は、血球数、血清の生化学的検査の他、ワクチン抗体価および抗J5抗体価, haptoglobin 濃度を測定した。

12, 55 h後のSCC, 8 h後のLAP濃度, 55 h後のLF濃度は、それぞれ非接種牛に比べて接種牛の方が有意に低かった。ワクチン接種牛において、0 hのワクチン抗体価と31 h後のLPO活性, 48 h後のLF濃度が有意な正の相関を示したが、非接種牛では相関が見られなかった。非接種牛の0 hのIgG濃度は12 h後のSCCとの間に有意な正の相関を示したが、接種牛では両者間に相関が無かった。24 h後のLPS投与分房の乳量は、非接種牛では投与前に比べて有意に減少したが、接種牛では有意な減少は認められなかった。

以上の結果から、大腸菌不活化ワクチンを接種すると、乳房にLPSを投与した時の乳汁中のSCC, LAP, LF濃度の上昇が緩和されることが示唆された。また、ワクチン非接種牛については、IgG濃度によってそのウシの体細胞動員能力の程度を予測できる可能性が示唆された。

### 3. 結論

本研究の結果、下痢予防用大腸菌不活化ワクチンの接種により、大腸菌性乳房炎発生時の反応が抑制されて乳汁中のSCC, LAP, LFの値の上昇が抑制され、それに伴って過剰な炎症反応が抑制され、乳房炎死産事故が低減することが示唆された。また、下痢予防用不活化ワクチンの接種方法については、従来行われていた分娩前の逐次接種よりも、初夏の一斉接種の方が効果的であると推察された。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なるご指導を賜った広島大学大学院 生物圏科学研究科 家畜生体機構学研究室 磯部直樹准教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、数々の助言と多大なるご配慮を頂いた同研究室 吉村幸則教授、家畜飼養学研究室 谷口幸三教授、免疫生物学研究室 古澤修一教授に深く感謝致します。

本研究を進める上で適切なご助言を頂いたLiao Lawrence Manzano 外国人特任教授、Das Shubash Chandra 博士に深く感謝致します。

本研究を進める上で多大なるご理解・ご配慮を賜った、広島県立総合技術研究所 畜産技術センター 新出昭吾博士、神田則昭さん、岸本一郎さん、河野幸雄博士、沖山恒明さん、城田圭子さん、長尾かおりさん、福馬敬紘さん、塚崎由子さん、大坂隆志さん、吉岡秀美さん、伊藤健一さん、佐原重行さん、須田 涉さん、岩水 正さん、奥山 博さん、搾乳牛班のみなさん、農業技術センター 吉村知子さん、高桑将滋さん、広島県西部家畜保健衛生所 清水 和さんに深く感謝の意を表します。

本研究を進める上で適切なご助言・ご配慮を頂いた広島県農業共済組合連合会 家畜診療所 篠塚康典博士、大下克史先生、中谷啓二先生、秋田真司先生、黒瀬智泰先生、前田陽平先生、金子宗平先生、広島県家畜畜産物衛生指導協会 久保田義信先生に深く感謝の意を表します。

本研究を進める上でご協力いただいた、畑 耕二さん、尾崎昭則さん、沖 正文さん、田辺輝之さん、中丸 仁さんに深く感謝の意を表します。

最後に、本研究を行う過程において、絶えず希望を与え、温かく励ましてくれた家族に深く感謝します。本当にありがとうございました。

# 生殖工学技術によるウシの効率的生産に関する研究

尾形康弘

広島大学大学院 生物圏科学研究科 (2015)

## 総括

ウシはヒトと同じ単胎動物であり、280~285日の妊娠期間で、1年に1頭の子牛しか生産しない。それゆえ育種改良や個体数の増産には長い年月が必要となる。広島県のように生産農家や飼養頭数ともに減少した中で、遺伝的多様性を維持しながら育種改良を行い、ブランド化を図るためには、受精胚移植技術の積極的な利用による優良な遺伝子を有したウシの生産と世代間隔の短縮によって、育種改良に必要な期間の短縮と確実な遺伝的改良を行う必要がある。これまでの黒毛和種からの産子生産に加えて、ホルスタイン種を借り腹とした受精胚移植活用による黒毛和種生産技術の構築が欠かせない。そのためにまず必要なことは、ホルスタイン種の安定的後継牛生産である。借り腹となるホルスタイン種の雌牛を如何に効率的に生産するかが重要なポイントとなる。この効率的生産を達成するための技術が、経膈採卵技術と体外胚操作技術を活用した性判別（遺伝子診断胚）である。通常、ホルスタイン種から受精胚を得るためには、体内受精胚生産技術を用いることが多い。しかしながら、この技術は、泌乳中のウシで実施すると、後継牛生産のための人工授精を休止する必要があり、そのために空胎期間が延長されてしまうこと、採卵のために長い期間乾乳を行えば生乳生産量が減少することから、未経産や乳生産を行わない採卵専用のウシに適用されている。一般的なホルスタイン飼養農家は、自分の経営条件に適合した能力、血統の後継牛を計画的に確保しているため、体内受精胚生産技術活用は現実的でない。そこで、本研究では、分娩後の生理的空胎期間に受精胚生産を実施して、酪農経営に悪影響を与えることなく、酪農家の望むウシからの受精胚の確保を可能させることを目的とした。

本研究では、上記したような効率的なホルスタイン種の後継牛生産を達成するために、第2章では、GnRH投与がウシ経膈採卵に及ぼす影響、第3章では、マニピュレーターを必要としない性判別用細胞のサンプリング方法の開発、第4章では、生理学的空胎期間に経膈採卵を適用したホルスタイン種の効率的増殖方法についての研究を実施した。

第2章のウシ経膈採卵におけるGnRH投与効果については、GnRHの卵胞波新生作用を利用し、ウシ経膈採卵時に、数多くの卵子を採取することを目的とした。発情周期の任意の時期に卵胞波の新生を誘起させるため、2種類のGnRH製剤（フェルチレリンとプセレリン）を投与して、卵巣内卵胞数の推移、COCs採取数及びその品質を検討した。GnRH投与0時間から24時間間隔で72時間目まで、卵巣内の卵胞動態を超音波画像診断装置を用いて行った。また、GnRH投与後48時間目に経膈採卵を実施し、COCs採取数及びその品質を検討した。

実験1では、GnRH投与48時間後の2~4mmの卵胞においてGnRH投与区の値(11.0±4.8個)は、無処理区の値(23.7±13.7個)に比較して有意に低かった。一方4~6mmの卵胞においては、48及び72時間後の両時間ともにGnRH投与区が無処理区に比較して、有意に高い値を示した。同様にGnRH投与48時間後の6~8mmの卵胞においてGnRH投与区の値(3.8±2.8個)は無処理区の値(1.2±1.1個)に比較して有意に高かった。モニター上で観察できる卵巣内卵胞数の平均値もGnRH投与48時間後GnRH投与区の値(32.6±9.7個)は、無処理区の値(30.0±12.7個)に比較して有意に高かった。

モニター上で観察できる平均卵胞径においても、GnRH投与48及び72時間後においては、両時間ともにGnRH投与区が無処理区に比較して、有意に高い値を示した。

2種類のGnRH製剤投与については、投与後48時間目における卵巣内の2~4、6~8、及び8mm以上の卵胞数及び平均卵胞数においては、3つの区には有意差が認められなかった。しかし、4~6mmの卵胞数は、フェルチレリン投与区及びプセレリン投与区の値が無処理区と比較して、有意に高い値であった。また、平均卵胞直径においても同様に、フェルチレリン投与区及びプセレリン投与区が無処理区と比較して有意に高い値を示した。

以上の結果より、GnRH投与後48時間後において、モニター上で観察可能なウシ卵巣内卵胞数が最も高くなり、また、超音波画像診断装置のモニターで観察・吸引作業が容易な4~6mmの中小型卵胞が多く認められたことから、このGnRH投与から48時間後に経膈採卵を実施することが有効であると考えられた。また、フェルチレリン及びプセレリンのいずれも、経膈採卵前に投与することで、体外培養可能なCOCsを効率的に採取することができると考えられた。

第3章のマニピュレーターを必要としない性判別用細胞のサンプリング方法の開発では、ウシ受精胚からマイクロマニピュレーター等の機器を利用せず、性判別（遺伝子診断）のための簡易な、新たなサンプリング方法の開発にある。本研究では、実体顕微鏡と細く伸ばしたガラスツールで桑実期胚から性判別（遺伝子診断）用サンプル細胞を採取する“細胞剥離法”を検討した。細胞剥離法

と従来のブレード切断法でサンプリング後の胚の生存性及び受胎性を比較し、その有効性について検討を行った。

細胞剥離法により、平均  $2.4 \pm 2.0$  個、受精胚からサンプルを採取することができ、ブレード切断より少数の細胞を確実に採取することができた。ウシ体外受精後の桑実期胚もしくは胚盤胞期胚から細胞のサンプリングを行った結果、修復培養後の総細胞数は無処置区で  $117.5 \pm 29.9$  個、ブレード切断区で  $77.3 \pm 24.7$  個及び細胞剥離区  $96.2 \pm 26.6$  個であり、既存法のブレード切断は、他の2区より有意に総細胞数が少なかった。各処置区の実胎率は、無処置区で 68.4%(13/19)、ブレード切断区で 56.5%(13/23)、細胞剥離区 68.0%(17/25)であり、有意差はなかったが、ブレード切断区は他の2区より低い実胎率であった。

以上の結果から、本研究で用いた細胞剥離法は、従来法より少ない細胞採取が可能で、受精胚の細胞数に与えるダメージを最小限にすることで、高い受胎性を維持することが可能であると考えられる。また、細胞剥離法は、マイクロマニピレーター等の特別な器具、機材を用いず、簡易に受精胚から、性判別(遺伝子診断)等に利用可能なサンプル細胞を採取することができ、かつ受胎性を担保できると考えられる。

第4章の経膈採卵を用いたホルスタイン種の効率的な増殖方法の開発では、1年間に生産可能な子牛数を増加させるため、生理的空胎期間を利用して経膈採卵したCOCsからの体外受精胚生産を検討した。採卵数を増加させるために、GnRHを経膈採卵48時間前に投与し、体外受精胚生産を試みた。また、複数回の経膈採卵実施後に人工授精を行い、受胎性に与える影響についても調査した。

モニター上で観察できる卵巣内卵胞数(経膈採卵実施が可能な卵胞数)はGnRHを投与することで  $16.0 \pm 1.0$  個( $n=101$ )から  $19.5 \pm 1.3$  個( $n=102$ )に有意に高くなり、経膈採卵で採取された卵子数も  $11.5 \pm 1.0$  個( $n=101$ )から  $15.3 \pm 1.3$  個( $n=102$ )に有意に高い値を示し、経膈採卵時のCOCs数増加に効果があることが明らかになった。

採取されたCOCs品質についても形態学的な評価でも卵丘細胞が多く付着し、卵細胞質も均質なGrade ~ がGnRH投与により有意に高い値を示しており、BCB染色による細胞質検査でも、陽性がGnRH投与で形態学的検査結果と同様に有意に発生能の高いCOCsが多く採取されており、GnRH投与は、採取されるCOCsの数だけでなく品質改善にも効果があることが明らかにされた。

体外受精成績も全ての発生ステージでGnRH投与区が有意に高い結果を示しており、1回の経膈採卵で得られる移植可能胚数(胚盤胞期胚)は、GnRH投与区  $3.0 \pm 0.3$  個、無処置区  $1.7 \pm 0.2$  個であり、GnRH投与によって、無処置区と比較して1.7倍の移植可能胚を得られることが明らかにされた。

受胎性についても無処置区 42.1%、GnRH投与 59.5%と両者に有意差はないものの、GnRH投与区が高い数値となっており、GnRH投与で生産された受精胚も無処置区と同様な受胎率で受胎しており、正常な受胎性についても確認された。

分娩後40~80日の間に複数回の経膈採卵を実施した供卵牛に経膈採卵終了後、通常の人工授精を行い、受胎性について確認したところ、受胎までの平均人工授精回数はGnRH投与  $1.4 \pm 0.8$  回、無処置  $1.7 \pm 0.7$  回、受胎までの平均日数はそれぞれ  $96.1 \pm 23.5$  日、 $127.8 \pm 114.6$  日と有意差はないものの未処置のものと同様に受胎しており、経膈採卵そのものがその後の人工授精に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。

以上の結果より、生理的空胎期間の分娩後40~80日目にGnRHを経膈採卵48時間前に投与することで、1.7倍の胚盤胞期胚を生産できることが明らかにされた。また、経膈採卵後を実施した後の、人工授精成績も受精回数、受胎に要する日数についてもいずれも良好であり、受精胚生産と人工授精を併用した効率的な後継牛生産の可能性が示された。

## 謝 辞

本研究を遂行し、取りまとめに際して、終始御懇篤なる御指導と御謝達を賜った広島大学大学院生物圏科学研究科前田照夫(家畜生殖学研究室)教授、吉村幸則(家畜生体機構学研究室)教授、都築政起(家畜育種遺伝学研究室)教授、島田昌之(家畜生殖学研究室)准教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究遂行にあたり貴重な御助言と御協力を賜った広島大学大学院生物圏科学研究科磯部直樹(家畜生体機構学研究室)准教授に心から御礼申し上げます。

本研究に際して広島県立総合技術研究所畜産技術センター育種繁殖研究部の皆様にも多大な御協力をいただきました。ここに御礼申し上げます。

## 稲発酵粗飼料の乳牛への給与技術と混合飼料開発に関する研究

Feeding of Rice Whole Crop Silage for Lactating Dairy Cow

新出昭吾

日本草地学会誌 第55号(4), 365-372 (2010)

### 要約

家畜経営は多頭化が進み、飼料生産は輸入飼料依存型に傾き、わが国の飼料自給率は著しく低下した。平成12年頃から、転作田を活用した自給粗飼料、中でも、耕畜連携による家畜堆肥の地域内循環と湿田適性のある飼料イネ（稲発酵粗飼料）の栽培と利用が模索された。

本研究は、乳牛への稲発酵粗飼料の給与における繊維の消化性や子実排せつなどの栄養的問題を検討し、粗飼料、食品副産物を活用した混合飼料（TMR）利用・給与技術について提案し、今後の飼料イネ利用に求められる項目を考察する。

## エストラジオール投与が発情同期化処置に与える影響について

Effects of estradiol on estrus synchronization procedure

日高健雅<sup>1)</sup>・尾形康弘<sup>2)</sup>・山本祐輔<sup>1)</sup>・今井佳積<sup>1)</sup>・吉上 渉<sup>1)</sup>・磯部直樹<sup>3)</sup>

広島県獣医学会雑誌 第26号 27-31 (2011)

### 要約

発情同期化処置法であるオブシンク法（OV）、ヒートシンク法（HE）及び両者の併用法であるヒートオブシンク法（HE-OV）の3種類の区を設定し、各区の特性について調査した。排卵時間は、各試験区ともPG投与48時間後を0と設定し、排卵するまでの時間を調査した。また、排卵8日後のP4濃度を測定した。30時間までの排卵率は、未経産牛及び経産牛ともに各試験区間に有意差はなかった。排卵後8日目のP4濃度は、未経産牛ではOV区 $1.76 \pm 0.61$ ng/ml (n=20), HE区 $2.13 \pm 0.70$ ng/ml (n=24), HE-OV区 $2.28 \pm 0.90$ ng/ml (n=10), 経産牛ではOV区 $1.51 \pm 0.55$ ng/ml (n=24), HE区 $1.88 \pm 0.43$ ng/ml (n=9), HE-OV区 $1.90 \pm 0.50$ ng/ml (n=11)とHE区及びHE-OV区が高い傾向を示した。受胎率は、未経産牛ではOV区56.3%, HE区58.8%, HE-OV区54.5%, 経産牛ではOV区43.0%, HE区38%, HE-OV区50%と、経産牛ではHE-OV区で高くなる傾向が認められた。これらの結果から、経産牛において発情同期化時のエストラジオール（EB）の投与が黄体形成に機能的に寄与する可能性が考えられた。

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2) 広島県立総合技術研究所, 3) 広島大学大学院生物圏科学研究科

## 牛白血病蔓延農家における感染状況の推移

Changes in the infection status in farmers among which bovine leukemia is spread

山本祐輔<sup>1)</sup>・日高健雅<sup>1)</sup>・今井佳積<sup>1)</sup>・尾形康弘<sup>2)</sup>・吉上 渉<sup>1)</sup>

広島県獣医学会雑誌 第26号 33-36 (2011)

### 要 約

県内A, B 2戸の牛白血病蔓延農家で, 母子間の感染リスク, 感染率の推移, さらに抗体陽性牛の発症リスクについて調査した。A農家の感染率は69.3% (52/75 頭), B農家は62.5% (25/40 頭)であり, 感染率の推移として年2回の抗体検査を実施した。母子間の感染リスクとして, 母子間の陽性率についてはA及びB農家の陽性牛27頭, 14頭について, 胎盤感染率についてはA農家の陽性牛8頭について調査を実施した。その結果, 陽性牛から生まれた産子の陽性率はA農家74.1% (20/27 頭), B農家92.9% (13/14 頭)であった。また, A農家の胎盤感染率は50% (4/8 頭)であった。特にA農家の陽性率は平成21年6月の63.2% (48/76 頭)から半年後の12月には87.7% (64/73 頭)と急増した。抗体陽性牛の発症リスクとして, A農家の陽性牛の白血球数は12,000/μl以上を示す牛が50% (23/46 頭)であり, そのうち2頭が牛白血病を発症した。A及びB農家の高陽性率の原因は, 経乳感染及び胎盤感染による母子感染であることが, さらにA農家の陽性率の急増は吸血昆虫以外の感染経路の存在が考えられた。白血球数12,000/μl以上を示す陽性牛は, 持続性リンパ球増多症の可能性が高く, 発症リスク牛と考えられた。

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2) 広島県立総合技術研究所

## BLV 感染牛の凍結初乳給与による新生子牛の感染状況について

State of infection of newborn calves after feeding with frozen colostrum of BLV-infected cows

山本祐輔<sup>1)</sup>・日高健雅<sup>1)</sup>・今井佳積<sup>1)</sup>・尾形康弘<sup>2)</sup>・吉上 渉<sup>1)</sup>

間 陽子<sup>3)</sup>・竹嶋伸之輔<sup>3)</sup>・松本有生<sup>3)</sup>

広島県獣医学会雑誌 第27号 11-14 (2012)

### 要 約

地方型牛白血病の一般的な経乳感染防除対策として, 牛白血病ウイルス感染牛の初乳給与であっても凍結することでウイルス感染を防除している。今回, ホルスタイン種の新生子牛18頭について, 感染牛の凍結初乳給与と試験を実施した。感染牛及び凍結初乳(乳清)の抗体価を測定し, 新生子牛に給与した。移行抗体は, 母牛及び新生子牛の分娩直後, 1日齢, 1~6ヶ月齢の1ヶ月間隔の抗体価を調査し, 感染状況調査では, 12ヶ月齢以降に抗体検査及びウイルス遺伝子を調査した。凍結初乳の抗体価は512~2048倍以上を示し, 母牛及び新生子牛の分娩直後の抗体は全頭で陰性を示した。初乳給与後1日齢では, 全頭が32~1024倍以上の抗体価を示し, うち12頭が2~4ヶ月齢までに陰転, 12ヶ月齢以降も陰性を示した。また, 4頭が2~4ヶ月齢で陰転後, 4~6ヶ月齢に陽転し, 12ヶ月齢以降で再度陰転した。さらに, 2頭は2~4ヶ月齢で陰転後, 12ヶ月齢以降に陽転し, うち1頭はBLVプロウイルス疑陽性であった。以上のことから, 感染牛の凍結初乳給与について, 移行抗体は給与後1日齢で上昇し, 6ヶ月齢時でも検出されることが考えられた。また, 陰性農場内で飼養されたにもかかわらず, 12ヶ月齢以降で2頭においてBLV感染が考えられたことから, 感染牛の凍結初乳給与では, 新生子牛へのBLV感染が完全には防除できないことが示唆された。

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2) 広島県立総合技術研究所, 3) 独立行政法人理化学研究所



## 和牛受精胚産子のほ育育成技術の検討

Evaluation of the technology to nurse calves of Japanese cattle developed from fertilized embryos

松雪暁子・日高健雅・横田文彦・吉上 渉

広島県獣医学会雑誌 第27号 25-30 (2012)

### 要 約

和牛受精胚産子を良好に発育させることを目的に、代用乳の給与量及び濃度が1日増体量(DG)や人工乳摂取量に及ぼす影響を調査した。

0~28及び0~84日齢間のDG(kg/日)は、代用乳多給与区である8.5L及び5.5Lの場合に、それぞれ良好な値を示した(0~28日齢間,8.5L区:0.70±0.09,5.5L区:0.66±0.05,4.2L区:0.36±0.07。0~84日齢間,8.5L区:0.94±0.03,5.5L区:0.99±0.02,4.2L区:0.79±0.02)。

0~84日齢間のDGは、代用乳給与濃度が6倍希釈の場合に良好な値を示した(6倍希釈区:1.05±0.04,7倍希釈区:0.94±0.03)。

人工乳摂取量(kg/日)は、28日齢までではすべての代用乳給与区で少なく、かつ差がみられなかったが、その後は代用乳多給与区で人工乳摂取量が多くなる傾向がみられた(56日齢時,8.5L区:1.2kg,5.5L区:1.3kg,4.2L区:0.8kg。84日齢時,8.5L区:3.5kg,5.5L区:3.0kg,4.2L区:2.5kg)。

下痢などの疾病の発生はすべての区において軽微で、発育に影響するような重篤な症状を示したものはみられなかった。

これらのことから、和牛受精胚産子は1ヶ月齢までに代用乳を十分に給与することで良好な発育が期待できると考えられた(本文項10,図9,表2)。

## 経膈採卵・性別技術を用いたホルスタイン種雌牛生産の実証

Validation of production of female Holsteins  
using transvaginal egg collection and sex discrimination technologies

日高健雅<sup>1)</sup>・尾形康弘<sup>2)</sup>・今井佳積<sup>1)</sup>・松重忠美<sup>3)</sup>・吉上 渉<sup>1)</sup>

広島県獣医学会雑誌 第27号 31-35 (2012)

### 要 約

ウシ胚の性別用のサンプル細胞採取方法として、酵素処理によりサンプル細胞を採取する簡易な採取方法(細胞剥離法)を開発し、採卵から移植までの効率的な一連の雌胚生産システムを構築した。

センター内及び酪農家での採卵成績は、1回の経膈採卵で2個以上の雌胚を生産し、酪農家において採卵牛1頭当たり0.9頭の雌牛の受胎を確保できた。

経膈採卵においては、採卵日の午後0.800,採卵翌日の午前0.510の泌乳量の減少が認められ、平均1.310(最大1.830)泌乳量の減少を認めた。また、採卵後の雌牛は人工授精により全頭が受胎し、空胎日数の延長もなかった。

1回の採卵で0.9頭の雌牛が確保できたこと、経膈採卵による泌乳量や繁殖性への影響は少ないことから、本システムによる効率的な雌胚生産の普及が可能と考えられた(本文項11,表5)。

1)広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2)広島県立総合技術研究所, 3)北部畜産事務所

## Effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine on innate immune function of bovine mammary gland infused with lipopolysaccharide

K. Morimoto <sup>1)</sup>, N. Kanda <sup>1)</sup>, S. Shinde <sup>1)</sup>, N. Isobe <sup>2)</sup>

Journal of Dairy Science, 95, 5067-5074, (2012)

### ABSTRACT

The effects of using an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine on innate immune responses following intramammary infusion of lipopolysaccharide (LPS) were investigated in midlactation Holstein-Friesian cows. Seven out of 14 cows were inoculated with *E. coli* vaccine. Three weeks later, 100 µg of LPS dissolved in 10 mL of saline was infused into 1 quarter of all cows. Milk was collected every hour from infusion to 12 h after infusion, and twice daily (at 0900 and 1600 h) for 4 d. Blood samples were collected 0, 4, 8, 24, 48, 72, and 96 h after infusion. Rectal temperatures and milk yields were measured. The somatic cell count (SCC), lingual antimicrobial peptide concentration, lactoperoxidase (LPO) activity, and lactoferrin (LF) concentration in milk, and haptoglobin concentration in serum were determined. The mean rectal temperature in vaccinated cows was higher than in control cows at 10 h. The mean milk yield was decreased significantly in the infused quarter of control cows at 24 h compared with pretreatment, but not in vaccinated cows. The mean SCC in milk from vaccinated cows at 12 and 55 h was significantly lower than that of control cows. The lingual antimicrobial peptide and LF concentrations were significantly lower at 8 h and 55 h, respectively, in vaccinated cows than in control cows. The mean antibody titer in the serum against the vaccine at the time of LPS infusion into vaccinated cows was significantly higher than in control cows. These antibody titers were positively correlated with the peak concentrations of LPO and LF in milk following challenge; therefore, cows with a high antibody titer were accompanied by high LPO activity and LF concentration in milk. These results suggest that vaccination suppresses the innate immune reaction after intramammary LPS infusion; however, the elevated antibody titer was unlikely to be responsible for the modification of the innate immune reaction.

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2) 広島大学大学院生物圏科学研究科

## 受精卵クローン作出技術を活用した種雄牛造成効率化のための 胚 DNA 型判定方法の検討

Development of an embryo-based genotyping system for efficient sire breeding

今井佳積<sup>1)</sup>・尾形康弘<sup>2)</sup>・松井茉由<sup>3)</sup>・日高健雅<sup>3)</sup>・平野 貴<sup>4)</sup>・松重忠美<sup>5)</sup>

The Journal of Animal Genetics, 41, 67-75, (2013)

### 要 約

現在、広島県の種雄牛造成では受精卵クローン作出技術を活用した「クローン検定」を導入している。本試験では、優良形質を導く DNA 型を数多く保有する候補種雄牛の出生前選抜を可能にし、効率的な候補牛生産と精度の高い検定を行うために、検定牛用に生産されるクローン胚を用いた出生前胚 DNA 診断技術の確立を試みた。診断対象の遺伝子には、CL-16 (タイプ1欠損)と脂肪酸組成関連遺伝子3種 (SCD, FASN, SREBP-1) のうちの親牛の DNA 型がヘテロである SREBP-1 を用いた。候補種雄牛となる体外受精胚は、広島県立総合技術研究所畜産技術センター繋養の供卵牛から経膈採卵して得た卵子と広島県供用種雄牛精液を用いて作出した。5日齢の桑実胚で細胞剥離を行い、得られた細胞をドナーとして核移植胚を作出し、核移植後5から6日目で32細胞期に達していない発育不良胚を DNA 型判定用サンプルとして用いた。そこで得られた SREBP-1 と CL-16 の DNA 型は、細胞剥離後正常に発育し、受胎および出生に至った元の胚の出生後診断による DNA 型と一致した。このことから、DNA 型の出生前診断が可能であることが示され、核移植技術と胚 DNA 診断技術を用いることにより、候補種雄牛の遺伝情報を出生前に獲得し、目的形質の優良 DNA 型を保有する種雄牛の効率的な選抜が可能であると考えた。

1)広島県立総合技術研究所保健環境センター, 2)広島県立総合技術研究所西部工業技術センター生産技術アカデミー, 3)広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 4)東京農業大学農学部, 5)広島県西部畜産事務所

## 黒毛和種牛の細胞質が枝肉形質に及ぼす影響

Effect of cytoplasm on carcass traits of Japanese Black cattle

日高健雅<sup>1)</sup>・福馬敬紘<sup>1)</sup>・井原紗弥香<sup>2)</sup>・今井佳積<sup>2)</sup>・尾形康弘<sup>3)</sup>・吉上 渉<sup>4)</sup>・松重忠美<sup>5)</sup>

日本畜産学会報, 85(1), 33-39 (2014)

### 要 約

広島県の黒毛和種牛(和牛)の枝肉形質とミトコンドリア(mt) D-loop 領域の関連を調査した。広島県の和牛群の D-loop 領域は、44の変異を認め41のハプロタイプが判明した。ハプロタイプは非加重結合法により6つのmtタイプ( ~ )に分類された。枝肉重量(CW), ロース芯面積(LMA), パラの厚さ(RT), 皮下脂肪(SFT), 歩留まり(YE), 脂肪交雑(BMS)の育種価を6タイプ間でBLUP法により比較した。CW, RT, SFT, YEにおいてmtタイプ間に有意差を認めた。CWではと間に, RTではと間に, SFTではとおよびと間に有意差を認めた( $P < 0.05$ )。また, YEではと, と, と, と間に有意差を認めた( $P < 0.05$ )。以上から, 和牛において細胞質が枝肉形質に影響を及ぼすことが明らかになった。

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2)広島県立総合技術研究所保健環境センター, 3)広島県立総合技術研究所西部工業技術センター生産技術アカデミー, 4)広島県北部家畜保健衛生所, 5)広島県西部家畜保健衛生所

## 曲げセンサーを用いた放牧牛のそしゃく行動による転牧時期の判定

Judgment of Grazing Stop Timing by the Chewing Behavior in Cattle with Bending Sensor

新出昭吾<sup>1)</sup>・森本和秀<sup>1)</sup>・弓場憲生<sup>2)</sup>・神田則昭<sup>1)</sup>・長尾かおり<sup>1)</sup>

近畿中国四国農業研究 第24号 45-49(2014)

### 要約

放牧牛の健康状態や繁殖成績などは、放牧地の草の質的、量的影響を受けることから、たえずモニタリングが必要である。最近では、耕種農家、集落営農法人および農業外企業が新たな畜産の担い手として位置付けられ、放牧への参入が誘導されているが、家畜飼養の経験が少なく取り組みが進んでいない。そこで、従来、人間が感覚で行っていた転牧時期の判定について、牛自身の発するサインで放牧地の残存草量の状態を、そしゃくセンサーによるアゴの動きで取得し、そしゃく行動データで適切な転牧時期の判定を行う方法を検討した。

採食草の減少に伴うそしゃく行動の変化を捉えるため、予備試験として、舎内において、摂取量を100%、75%、50%とする3区でそしゃく行動を調査した。そしゃく行動では、100%摂取区に比較し、総そしゃく時間、採食時間、反芻時間は75%摂取区で40%減少、50%摂取区で55%減少した。また、総そしゃく回数、反芻における総吐出回数などが減少した。これらの知見で放牧牛を調査したところ、放牧地で放牧地内の残存草量が減少すると、1日当りの採食時間が一時的に増加した後減少するという特徴的な現象が観察され、舎内での試験結果と異なった。一方、反芻に伴う食塊吐出回数は、放牧地の草量減少につれ、漸増したが、さらなる草量が減少すると急激に低下した。これは、13回の転牧試験で同様に観察された。また、そしゃく行動データにより転牧を実施すると、入牧時および転牧時の体重差はほとんど認められず、転牧指標として妥当と考えられた。

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター 2) 広島県立総合技術研究所西部工業技術センター生産技術アカデミー

## 草地の刈り取り間隔の違いが総乾物収量に及ぼす影響

Effect of Cutting Interval on the Dry Matter Yield of Grass Field

森本和秀・長尾かおり・神田則昭・福馬敬紘・新出昭吾

近畿中国四国農業研究 第24号 57-60(2014)

### 要約

耕作放棄地における和牛放牧の際に、放牧地を有効活用するための方法を検討した。寒地型牧草主体の採草地およびセイタカアワダチソウ等が優占する耕作放棄地において、刈り取り間隔の違いが年間の総乾物収量に及ぼす影響を検討した。その結果、4~9月の時期においては45日間隔で刈り取ると最も乾物収量が多くなった。また、刈り取り高さについて検討したところ、7~9月には地上5cmで刈るよりも地上10cmで刈る方が再生量が高かった。これらのことから、放牧の目安として、退牧後45日以降に次の放牧を行い、過放牧を避けることが望ましいと考えられた。

## 広域連携周年放牧技術普及の可能性

Diffusion Potential of Year-Round Grazing System by Regional Cooperation

長尾かおり・森本和秀・新出昭吾

近畿中国四国農業研究 第24号 71-75 (2014)

### 要約

広島県では「広島牛」の素牛安定供給のため、肉用牛繁殖経営の新たな担い手として集落営農法人を位置付け、繁殖和牛の導入を推進している。2006年度以降に繁殖和牛を導入した集落営農法人および集団は県北部を中心に25団体である(2011年度末時点)。また、広島県は行政政策として、肉用牛繁殖経営における飼料自給率の向上、耕作放棄地および里山の環境保全、生産コストの低減等を目的に放牧技術の普及定着を推進している。

県南部に耕作放棄地の75%が存在していること、県北部の繁殖和牛飼養者(集落営農法人)6法人のうち5法人が冬季放牧に関心を示したことから、広島県には広域連携周年放牧技術普及の素地があると思われる。技術の普及、定着には、耕作放棄地のとりまとめや家畜輸送費の補助等、行政サイドの支援が必要である。また、広域で家畜を移動させるため、広域連携周年放牧の実施には家畜診療所や行政機関との連携も不可欠である。繁殖和牛を預かる県南部の集落営農法人や団体の育成、北部と南部のマッチングが最大の課題である。

## 極短穂型飼料イネ品種「たちすずか」による

## ホールクロップサイレージの栄養価と第一胃内分解性

Nutrient value and ruminal degradability of whole crop silage prepared from Tachisuzuka as short panicle paddy rice cultivar

河野幸雄・新出昭吾・神田則昭・城田圭子・福馬敬紘・塚崎由子

日本草地学会誌 60 (2) 91-96 (2014)

### 要約

飼料イネの極短穂型品種「たちすずか」と普通品種「クサノホシ」のホールクロップサイレージの栄養価及び第一胃内分解特性の違いを明らかにするため、1年目はヒツジ4頭、2年目はウシ3頭を用いて2回の消化試験を行った。両品種の粗タンパク質、粗脂肪及び可溶無窒素物の消化率に差はみられなかったが、粗繊維と中性デタージェント繊維の消化率は「たちすずか」が高かった。ヒツジ及びウシにおける「たちすずか」の可消化養分総量は「クサノホシ」より4.3及び5.4ポイント高かった。「たちすずか」は葉鞘を含む茎部の乾物及び中性デタージェント繊維の第一胃内有効分解率が「クサノホシ」よりも高く、リグニンとケイ酸含量の低さが要因と考えられた。これらの結果から、「たちすずか」は「クサノホシ」よりホールクロップサイレージの栄養価が優れていることが明らかになった。

## エストラジオール製剤投与が経膈採卵 体外受精成績に及ぼす影響

Effects of estradiol benzoate (EB) administration  
on transvaginal ovum pick up-in vitro fertilization results

日高健雅<sup>1)</sup>・森本和秀<sup>1)</sup>・今井 昭<sup>1)</sup>・栗原幸一<sup>1)</sup>・福本 豊<sup>1)</sup>・山崎瑞穂<sup>1)</sup>

横田文彦<sup>2)</sup>・山本祐輔<sup>2)</sup>・尾形康弘<sup>3)</sup>・山田博道<sup>1)</sup>・堀内俊孝<sup>4)</sup>

広島県獣医学会雑誌 第30号 43-48 (2015)

### 要 約

牛体外受精卵生産のために、牛の生体の卵巣中の卵胞から針で卵子を吸引採取する経膈採卵法が利用されている。我々は、エストラジオール製剤(EB)の投与による卵胞波の制御が経膈採卵-体外受精成績(OPU-IVF)に及ぼす影響を当センターに繋養されている黒毛和種経産牛10頭を用いて調査した。試験区は、GnRH製剤投与48時間後の採卵区(GnRH区)およびEB投与84時間後の採卵区(EB区)を設定し、採卵成績及び体外受精卵発生成績を経膈採卵前に処置しない無処置区と比較し調査した。経膈採卵時の卵巣内推定卵胞数、採取卵子数、未受精卵子の体外受精供試数(体外受精可能卵子)は、GnRH区 $31.7 \pm 2.3$ 個、 $25.2 \pm 2.5$ 個、 $18.2 \pm 2.0$ 個、一方、EB区 $31.7 \pm 2.1$ 個、 $23.8 \pm 2.4$ 個、 $19.2 \pm 1.9$ 個と両区間に有意差はなく、いずれも無処置区より良好であった。また、Blast数、移植可能胚数は、それぞれGnRH区 $6.2 \pm 0.9$ 個、 $3.8 \pm 0.7$ 個、EB区 $8.3 \pm 0.9$ 個、 $4.5 \pm 0.7$ 個と無処置区と比較してEB区が高くなった。EB製剤投与により卵胞波が開始し、経膈採卵における卵巣中の卵胞数および回収卵子数が増加したと考えられた。また、EB区において体外受精供試数及び体外受精卵発生率が向上したことから、EB製剤が卵巣中の卵胞の発育を促進させることが考えられた。

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2) 広島県北部畜産事務所, 3) 広島県立総合技術研究所西部工業技術センター生産技術アカデミー, 4) 県立広島大学生命環境学部

## Comparison of Two Biopsy Methods in Bovine Embryos

Yasuhiro Ogata<sup>1)2)</sup>, Takemasa Hidaka<sup>1)</sup>, Tadami Matzushige<sup>1)</sup>, Teruo Maeda<sup>2)</sup>

Journal of Advances in Biology & Biotechnology, 2(1) 16-23 (2015)

### ABSTRACT

In this study, the accuracy of sex identification, the viability of biopsied embryos, and the pregnancy rate after biopsied embryo transfer were compared in bovine embryos biopsied by two methods (cutting and pipetting). The cells were more efficiently collected by the pipetting method ( $2.4 \pm 2.0$  cells), and the success rate of sex identification was 94.8%. Moreover, the survival, and pregnancy rates of embryo biopsied by pipetting method were 91.7 and 68.0%, respectively, and were numerically higher than those seen in the cutting group (84.4 and 56.5%). From these results, the pipetting method appears to be a simple cell collection method of bovine embryos for sex identification, and assures greater safety of the biopsy process and better embryonic development after biopsy.

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2) 広島大学大学院生物圏科学研究科

## 和牛のミオグロビン含量を指標とした 肉色に関わるゲノム育種価の推定

Prediction of genomic breeding values for meat color defined  
by myoglobin content in longissimus muscle of Japanese Black cattle

山崎瑞穂<sup>1)</sup>・戸水一志<sup>1)</sup>・河野幸雄<sup>1)</sup>・渡邊敏夫<sup>2)</sup>・杉本喜憲<sup>2)</sup>

食肉に関する助成研究調査成果報告書 第33号 308-313 (2015)

### 要約

本研究では、黒毛和種牛において、肉食の新たな評価指標として無脂乾物中ミオグロビン含量を用い、ゲノム育種価による能力評価を試みた。無脂乾物中ミオグロビン含量は、BCS No. と相関し、比較的高い遺伝率を持つことから、肉食のよりの確かな育種改良指標となりうると考えられる。肥育牛 739 頭を訓練群としたゲノム育種価評価は、後代育種価と高い相関(0.79)を示し、種雄牛選抜に有効であることが示唆された。一方、今回の研究では、ミオグロビン含量情報を持つ肥育牛数が少ないために、後代育種価の正確度が低いという課題もある。今後、ミオグロビン含量を対象にゲノム育種価を活用した種雄牛選抜を行うためには、高い推定精度を実現することが重要であり、訓練群を拡大してさらに検討する必要がある。

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター、2) 公益財団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所

## 下痢症予防ワクチンの接種が牛に及ぼす影響

森本和秀

臨床獣医(34)7 7-8 (2016)

### 要約

大腸菌性下痢症の予防ワクチンが乳房炎対策に効果を示す理由を考察した。酪農家 4 戸において飼養牛の半数にワクチンを接種し、その後の乳房炎発生率および乳房炎罹患牛の死廃率を調査した。接種牛は非接種牛に比べて乳房炎発生率および甚急性乳房炎発生率に差はなかったが、甚急性乳房炎罹患牛の死廃率が有意に低かった。次に、乳牛 14 頭の乳槽内に Lipopolysaccharide を注入して急性乳房炎を発症させ、接種牛と非接種牛各 7 頭を比較した。その結果、接種牛の方が泌乳量の低下率が低く、症状が軽いの傾向が認められた。さらに、乳汁から腸内細菌が分離された甚急性乳房炎 56 症例を、その後の転帰により死廃牛と治療牛に分け、初診時の血液成分や乳汁中の菌数を比較した。その結果、死廃牛では治療牛に比べ、乳汁中細菌数が有意に多く、血小板数が有意に少なかった。これらのことを考え合わせると、ワクチン接種牛に死廃事故が少なかったのは、乳房炎の初期段階に原因菌の増殖を抑制できた個体が多かったからかもしれない。甚急性乳房炎の初期の免疫応答は自然免疫であることから、ワクチンの接種により自然免疫応答に変化が生じた可能性が考えられる。近年、自然免疫にも記憶が存在することが示された。これらのことから、下痢症予防ワクチンの接種により免疫記憶が残り、感染に対する抵抗性が増し、甚急性乳房炎罹患時の症状が緩和され、結果として死廃率が低下したのではないかと、という仮説を考えている。

## Effective embryo production from Holstein cows treated with gonadotropin-releasing hormone during early lactation

Yasuhiro Ogata<sup>1)2)</sup>, Guang-Min Yu<sup>2)</sup>, Takemasa Hidaka<sup>1)</sup>, Tadami Matzushige<sup>1)</sup>, Teruo Maeda<sup>2)</sup>

THERIOGENOLOGY(86)6 1421-1426 (2016)

ABSTRACT

The low efficiency of embryo production in Holstein cows during early lactation presents many challenges for animal production. To improve its efficiency, the outcomes of single GnRH injections 48 hours before each of three cycles of ovum pick up (OPU; weeks 2, 4, and 6) were compared with three cycles of unstimulated OPU (controls; weeks 1, 3, and 5) in 35 Holstein cows during 6 weeks of early lactation (40-80 days postpartum). More total follicle numbers (19.5 vs. 16.0;  $P < 0.05$ ) but fewer dominant follicles (0.5 vs. 1.4;  $P < 0.01$ ) were observed by ultrasound, and more cumulus-oocyte complexes were collected in a single OPU in the treatment cycles compared with controls (15.3 vs. 11.5;  $P < 0.05$ ). The numbers of morphologically "good" cumulus-oocyte complexes graded A and B in the stimulated OPUs were significantly greater than in controls (2.8 vs. 1.7 and 5.8 vs. 4.2, respectively;  $P < 0.05$ ). Significantly, more oocytes stained positively with brilliant cresyl blue after GnRH treatment compared with the control cycles (13.7 vs. 9.6;  $P < 0.05$ ). After in vitro fertilization, embryos in the treatment cycles had improved development ( $P < 0.01$ ) during each developmental stage compared with the controls (9.0 vs. 6.2 two-cell embryos; 4.7 vs. 3.0 four-cell embryos; 3.3 vs. 2.0 morulae; and 3.0 vs. 1.7 blastocysts, respectively). Moreover, there was no significant difference in pregnancy rate of the recipient cows after embryo transfer (57.1% vs. 42.1%;  $P > 0.05$ ) no matter if the embryos came from the GnRH-treated cycles or not. Thus, GnRH-stimulated OPUs improved the efficiency of embryo production in Holstein cows during early lactation. This novel method for in vitro embryo production should benefit the dairy industry.

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2) 広島大学大学院生物圏科学研究科



## 和牛のミオグロビン含量を指標とした 肉色に関わるゲノム育種価の推定

Prediction of genomic breeding values for meat color defined  
by myoglobin content in longissimus muscle of Japanese Black cattle

山崎瑞穂<sup>1)</sup>・戸水一志<sup>1)</sup>・河野幸雄<sup>1)</sup>・渡邊敏夫<sup>2)</sup>・杉本喜憲<sup>2)</sup>

食肉に関する助成研究調査成果報告書 第34号 148-155 (2016)

### 要約

本研究では平成26年度、黒毛和種において、肉中のミオグロビン(Mb)含量(無脂肪乾物中)が肉色の新たな育種改良指標となることを明らかにし、ゲノム育種価による能力評価を試みた。平成27年度は、Mb含量情報を持つ肥育牛を拡大することで、評価精度の向上を目指した。肥育牛1197頭のSNP情報を用いたゲノム育種価は、後代育種価と高い相関(0.92)を示し、平成26年度の739頭のSNP情報を用いた場合(0.86)から評価精度が向上した。

また、黒毛和牛の肉色は濃いほど評価が高いが、Mb含量を低下させる改良を行えば、Mbはヘム鉄を構成するため、肉および血液中の鉄含量も低下する懸念があった。今回、Mb含量の低下により肉中铁含量も低下する可能性が高いことが明らかになった。鉄含量の多少が牛肉らしい風味に影響するとの報告もあることから、肉色の改良が食味に与える影響についても検討する必要がある。一方、血液中鉄含量の低下は認められず、Mb含量の低下が、貧血等で牛の健康に影響を与える可能性は低いと考えられる。

1)広島県立総合技術研究所畜産技術センター、2)公益財団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所

## 黒毛和種繁殖雌牛の 枝肉6形質におけるゲノム育種価の実用化に向けた精度検証

柴田愛梨<sup>1)</sup>・山崎瑞穂<sup>1)</sup>・兵庫真理<sup>2)</sup>・渡邊敏夫<sup>3)</sup>

畜産生産に関する研究調査成果報告書 第7号 87-95 (2017)

### 要約

広島県では、平成25年度から広島固有血統を受継ぐ県産和牛肉を県が承認する「広島県和牛血統承認制度」を開始した。全国農業協同組合連合会広島県本部(全農広島)では、この制度を活用した県産和牛肉ブランドを立ち上げ、血統による広島県産和牛肉の高付加価値化を図っている。

本県の繁殖雌牛集団における枝肉6形質(枝肉重量、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪厚、推定歩留及び脂肪交雑)のゲノム育種価を算出し、育種価とゲノム育種価を比較することによって評価値の予測精度の検証を行った。6形質すべてにおいてゲノム育種価の方が期待育種価よりも高い相関を示し、育種価未判明の若齢の雌牛において、ゲノム育種価により遺伝的能力を推定し活用することが雌牛選抜の有効な手段になる可能性が示唆された。

1)広島県立総合技術研究所畜産技術センター、2)全国農業協同組合連合会広島県本部、3)公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所

## Estradiol benzoate treatment before ovum pick-up increases the number of good quality oocytes retrieved and improves the production of transferable embryos in Japanese Black cattle

T Hidaka<sup>1)</sup>, Y Fukumoto<sup>1)</sup>, Y Yamamoto<sup>1)</sup>, Y Ogata<sup>1)</sup>, T Horiuchi<sup>2)</sup>

Veterinary and Animal Science(5) 1 - 6 (2018)

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficacy of treatment with estradiol benzoate (EB) at luteal phase prior to the ovum pick-up (OPU) during in vitro production of transferable embryos in Japanese Black cattle. A total of 15 cows were used as oocyte donors for OPU. Of those, four donors were randomly allocated (three times) into each of two treatment groups as a crossover study, and OPU session was carried out six times per one donor. Another eleven donors were used in a paired difference test by one crossover trial. Donors in the control group received no hormonal treatment; whereas, donors in the EB group received 1 mg of EB as a single injection. First, we observed dynamics of ovarian follicles and emergence of follicular wave after EB injection using transrectal ultrasonography. The number and proportion of medium-sized follicles with 4 to 6mm in diameter increased gradually and achieved a peak at 72 and 96 hours after EB injection. The OPU was performed 88 hours after EB injection. The EB-treated donors had a higher proportion of follicles with 4 to 6mm in diameters at the time of OPU. The stimulation with EB significantly increased the numbers of follicles aspirated, and the good quality cumulus-oocyte complexes per OPU. Furthermore, in the EB group, the percentage of transferable blastocysts was significantly greater than that in the control group ( $P<0.05$ ). In conclusion, a single EB injection before OPU increases the number of medium-sized follicles and can produce more transferable embryos.

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2) 県立広島大学

# Variations in bovine embryo production between individual donors for OPU-IVF are closely related to glutathione concentrations in oocytes during in vitro maturation

T Hidaka<sup>1)</sup>, Y Fukumoto<sup>1)</sup>, S Yamamoto<sup>1)</sup>, Y Ogata<sup>1)</sup>, T Horiuchi<sup>2)</sup>

Theriogenology(113) 176 - 182 (2018)

## ABSTRACT

Variations in embryo production between individual oocyte donors represent a serious problem in cattle production, when implementing ovum-pick up (OPU) and in vitro maturation (IVM) of oocytes. However, the precise cause of this problem is unknown. Here, we aimed to investigate the relationship between the glutathione (GSH) concentration in IVM oocytes and embryo development to explore a potential cause of the variations between individual donors. First, we found a high positive correlation ( $r=0.80$ ) between the GSH concentration in IVM oocytes and the blastocyst development rate of oocytes collected in the same OPU session for each donor ( $N=11$ ). Second, we selected two donors with significantly different blastocyst development rates. In samples from these donors, we examined the dynamics of oocytes GSH concentrations, and the gene expression of the glutathione synthetase (GSS) and glutathione peroxidase (GPX) genes in cumulus-oocyte complexes (COCs) during IVM. At 0 and 24h after IVM, oocytes from the donor with the highest blastocyst development rate (high donor) exhibited significantly higher oocyte GSH concentrations than oocytes from the donor with the lowest blastocyst development rate (low donor,  $P<0.05$ ). At 4 and 9h after IVM, GSH concentrations gradually decreased in oocytes from both donors. The GSS expression levels at 0, 4, and 9h after IVM were significantly higher in COCs from the high donor than in COCs from the low donor ( $P<0.05$ ). The expression levels of GPX, a marker of oxidative stress, at 4 and 9h after IVM were significantly higher in COCs from the low donor than in COCs from the high donor. Finally, adding cysteine into the IVM medium of oocytes collected in the same OPU session from the low donor significantly increased oocytes GSH concentrations and blastocyst development rates ( $P<0.05$ ). In conclusion, we showed that oocyte GSH concentrations were related to the differences in embryo development between individual donors. Our results suggested that increasing the GSH concentration in IVM oocytes could reduce the individual differences in embryo production between donors.

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 2) 県立広島大学

広島県立総合技術研究所畜産技術センター研究報告第 17 号

---

平成 30 年 12 月 発行

編集兼発行者 尾形 康弘  
発行所 広島県立総合技術研究所畜産技術センター  
広島県庄原市七塚町 584 番地  
郵便番号 727-0023  
電 話 0824-74-0331  
F A X 0824-74-1586

<http://www.pref.hiroshima.lg.jp/soshiki/31/>

---