

石川畜総セ研報
Bull.Ishikawa Pref.List.
Resc.Center

ISSN 1347—913X

Bulletin
of the
Ishikawa Prefectural.Livestock Research Center
No. 4 2
June-2010

石川県畜産総合センター研究報告

第 42 号

平成 22 年 7 月

石川県畜産総合センター

石川県羽咋郡宝達志水町坪山

Ishikawa Prefectural.Livestock Research Center
Hodatsushimizu,Ishikawa,Japan

石川県畜産総合センター研究報告

第 42 号

平成 22 年 7 月

目 次

1. アスタキサンチン混合飼料給与が黒毛和種供卵牛の採卵におよぼす影響 …… 1
(第 2 報)
2. 脂肪酸組成に着目した「能登牛」生産技術の開発 …… 4
3. 体外受精卵の雌雄判別技術の確立 …… 8
—効率的なサンプル採取法の検討—
4. 個体別体外受精技術の確立 …… 12
—成熟培地への還元剤および成長因子の添加がウシ卵子の体外成熟
受精、胚発生に及ぼす影響—
5. 個体別体外受精技術の確立 …… 17
—ウシ体外受精培地へのグルコースの添加が受精
胚発生に及ぼす影響—
6. 育種価評価に基づく産肉能力改良推移の解析 …… 22

アスタキサンチン混合飼料給与が黒毛和種供卵牛の採卵におよぼす影響（第2報）

向野 逸郎¹⁾、長門 正志¹⁾、岡田 徹²⁾、山崎 孝一²⁾、西村 省治²⁾
葭谷 收平²⁾

1 石川県畜産総合センター能登畜産センター、2 協和発酵バイオ株式会社

Effect of astaxanthin mixed feed on ovarian response and the number of collected embryos after superovulation in Japanese Black donor cattle (The Second Report)

Itsuro Mukono, Masashi Nagato, Toru Okada, Kouichi Yamazaki, Shouji Nishimura
Shuhei Yoshiya

キーワード：黒毛和種、供卵牛、アスタキサンチン、過剰排卵処置、受胎率

要 約

黒毛和種供卵牛の採卵成績の向上を目的に、アスタキサンチンを含む混合飼料の給与試験を実施している。2009年度に第1報¹⁾で採卵成績の悪い個体に40日間給与を実施したところ正常卵率、移植可能卵率が有意に高くなり、卵品質の向上効果が期待出来ると報告した。そこで今回、給与期間短縮の目的で20日間および30日間の給与試験をランダムに選抜した供卵牛に対して行なった。20日間の給与では効果はみられず、30日間では正常卵率、移植可能卵率の向上がみられた。また、2009年の給与試験で採取した受精卵と、同時期に採取した受精卵との受胎率を調査したところ有意差はみられなかった。

I 緒 論

当センターでは、肉用牛の増産を目的に黒毛和種供卵牛より受精卵を採取し、県内の畜産農家に譲渡している。2006年より堀ら²⁾によりエストラジオール配合膈内留置ホルモン製剤(以下、PRID)を使用した過剰排卵処理(以下、SOV)前処置法により、採卵数は飛躍的に増加した。また、2009年にアスタキサンチン0.1%を含む混合飼料を採卵成績の悪い牛群に採卵前40日間給与し、採卵成績を前産時同回成績と比較した。正常卵率が67.3%から82.9%、移植可能卵率43.6%が66.1%に向上した。今回、前回の成績から得られた1成績良好な供卵牛への給与2給与期間の短縮の検討3給与して得られた受精卵の受胎率の良否を課題として給与試験を行った。

II 材料および方法

試験1

供試牛：2009年2月から12月まで当センター飼養の前産時採卵歴のある黒毛和種供卵牛をランダムに、30日給与群、20日給与群および無給与群に区分しアスタキサンチン0.1%を含む混合飼料(協和発酵バイオ株式会社提供)50gを採卵日まで毎日給与した。

1. 採卵試験

30日給与群は37頭、20日給与群は21頭、無給与群は12頭供試し採卵を実施した。SOVはFSH-R17Aの3日漸減法で行いPRID(あすか製薬株式会社)を11~12日間留置後PGF2 α (クロプレステノールとして0.5mg)を投与し発情誘起させ、AI後7日目で子宮還流法で採卵した。採卵成績は採取卵数、正常卵数率、移植可能卵数率(Bランク以上)を今産次と前産次同回を比較した。なおホルモン処置等は対照とする前産次同回採卵と同等とした。

2. 血液検査

それぞれの試験区で採血1(給与前もしくはPRID留置前)、採血2(SOV後)、採血3(採卵前日)を実施した。血清分離し冷凍保存後、血中抗酸化能は30日給与群21頭、20日給与群15頭、無給与群13頭をPAO抗酸化能測定キット(日本老化制御研究所)を用い測定、また血中尿素態窒素(以下、BUN)を30日給与群17頭、20日給与群12頭、無給与群9頭を自動分析法により測定し、その動態を調査した(図-1)。

試験2

2008年6月から12月に40日間給与試験により採取、供給、移植され妊否の確認が行われた受精卵98個の受胎率を調査し、昨年度採卵された受精卵628個の受胎率と比較した。

III 結 果

試験1

1. 採卵試験

正常卵率、移植可能卵率(Bランク以上)の成績(前産次：今産次)は30日給与群では70.2%:76.0%、60.5%:66.3%、20日給与群では69.0%:59.3%、48.5%:46.1%、無給与群では75.4%:71.3%、59.2%:61.1%であった。20日給与群、無給与群で低下傾向であるが、30日給与群①では前産次より向上した。

(表-1)

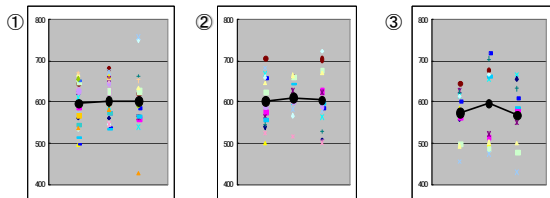
2. 血液検査

抗酸化能、BUN とともに試験区間で数値の動態に違いは見られなかった。しかし、2 回目の採血で無給与群の標準偏差値は抗酸化能、BUN それぞれ 94.3、4.9 で、30 日給与群の 45.6、2.8、20 日給与群の 39.3、2.8 に比べ大きく数値のばらつきが大きい傾向を認めた。(図-1)

表-1 試験1 給与期間別前産次と今産次の採卵成績

		採取卵		正常卵		移植可能卵	
		前産次	今産次	前産次	今産次	前産次	今産次
①30日 給与群 n=37	卵数	521	596	366	453	315	395
	1採卵当	141	161	99	12.2	8.5	10.7
	率	—	—	702%	760%	60.5%	66.3%
②20日 給与群 n=21	卵数	332	280	229	166	161	129
	1採卵当	184	156	12.7	9.2	6.8	5.3
	率	—	—	690%	593%	48.5%	46.1%
③無給与群 n=2	卵数	191	157	144	112	113	96
	1採卵当	159	131	12.0	9.3	9.4	8.0
	率	—	—	754%	713%	59.2%	61.1%

抗酸化能 上段: $\mu\text{mol/L}$ 下段: 標準偏差	採血1	採血2	採血3
	給与前	SOV後	採卵前
①30日給与群	594 57.6	601 45.6	602 69.3
②20日給与群	602 64.4	610 39.3	603 66.8
③無給与群	573 58.0	595 94.3	568 68.3



BUN 上段: mg/dl 下段: 標準偏差	採血1	採血2	採血3
	給与前	SOV後	採卵前
①30日給与群	11.8 4.0	10.5 2.8	10.4 2.5
②20日給与群	13.8 5.1	11.5 2.8	12.8 3.6
③無給与群	10.7 4.0	12.0 4.9	11.5 3.5

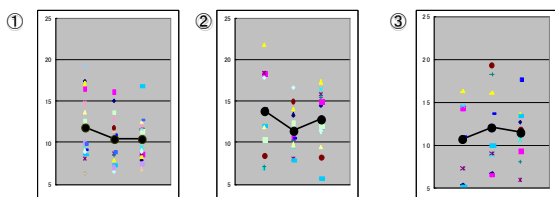


図-1 血中抗酸化能、尿素態窒素の動態

試験 2

給与試験で得られた受精卵 98 個中受胎 39 個で受胎率は 39.8%、全体では受精卵 628 個中受胎 246 個で受胎率は 39.2%であり差はなかった。(表-2)

表-2 給与試験卵と生産供給卵の受胎率比較

	ET	受胎	受胎率
給与試験 供給卵	98	39	39.8%
H20生産 供給卵	628	246	39.2%

IV 考察

2009 年に採卵成績の悪い供卵牛を対象にアスタキサンチン 40 日間給与試験の結果、品質向上がみられた。今回、無差別に供卵牛を選別し給与期間を短縮し試験を行なった。30 日給与群で有意差はないが品質の向上傾向が認められた。20 日給与群では成績が低下する傾向を示した。その理由として、試験期間中、天候不順および病害虫の被害の影響で良質の粗飼料が安定して給与できず、そのような飼養環境が反映しているのではないかと考える。しかし、その環境下で 30 日給与群で受精卵の品質向上傾向が見られたのは、アスタキサンチンの効果が現れるまで一定期間継続して (少なくとも 30 日間) 給与する必要があることが示唆された。

無給与群の SOV 後の血中抗酸化能値と BUN 値が給与群に比べ標準偏差が大きくバラツキがみられることから、アスタキサンチンは SOV によるストレスによって血中物質が大きく変動するのを防ぎ生体の恒常性を高める作用を示唆した。

アスタキサンチンを給与して採取した受精卵は、凍結や子宮環境の変化等のストレスに強く受胎率の向上を期待したが、受胎率には差はなかった。このことは、アスタキサンチンの給与は供卵牛の生体組織に作用しその抗酸化作用で生殖組織の酸化ストレスを軽減し受精卵の正常な発育を促すが、受精卵そのものの抵抗性を高めることはないと考えられる。

今後アスタキサンチンを継続給与し良品質の受精卵を安定して供給できる体制を目指したい。

V 引用文献

- 1 向野逸郎他 (2009) アスタキサンチン混合飼料給与が黒毛和種供卵牛の採卵成績におよぼす影響. 石川県畜産総合センター研究報告, 41:6-8
- 2 堀登、松田達彦 (2008) 膣留置型黄体ホルモン製剤による採卵成績の改善効果. 石川県畜産総合センター研究報告, 40:13-15

VI Summary

To improve the number and quality of embryo collection after superovulation in Japanese Black donor cattle, the feed of the mixed meal including the astaxanthin(ASX) is examined.

We reported by the first report that normal growth rate and transplantable rate of collected embryos improved significant when we feeded the ASX to the breeding cattle of bad result of collect embryo in 40 days in 2009 , and the improvement of the embryo quality was able to be expected by feeding the ASX. Then examination of the feeding of the ASX in 20 and 30 days was done to the donor cattle that selected it at random for the purpose of shortening at feeding period. It did not do in the 20 days though that the 30 days was improved of the normal growth rate and the transplantable rate of collected embryos.

There was no difference when the conception rate for the embryos collected in the examination feeded the ASX for 40 days was compared with it of the embryos collected in 2009.

脂肪酸組成に着目した「能登牛」生産技術の開発

表俊雄¹、島野健¹、庄司勇一¹、坂井良輔²、石田美保³

1 畜産総合センター、2 北陸学院大学、3 南加賀保健福祉センター

Development of products technology of “Notoushi beef” focus to fatty acid composition

Toshio Omote, Takeshi Shimano, Yuichi Shoji, Ryosuke Sakai, Miho Ishida

キーワード：肥育、生米ぬか、オレイン酸

要 約

黒毛和種去勢牛28頭を用い、肥育中期（15～20月齢）および後期（21～28月齢）に給与飼料のTDN換算で5～7%の生米ぬかを添加し、産肉性、枝肉脂肪の脂肪酸組成、および飼料費について調査した。その結果、生米ぬかの添加は増体量や肉質に影響はないが、肉の脂肪中のオレイン酸含量や不飽和脂肪酸含量の増加に効果がみられた。また、生米ぬかは単価が他の購入濃厚飼料価格よりも安く、飼料費の削減にも寄与できる。

I 緒 論

肥育経営は穀物を中心とした購入飼料に頼ることが余儀なくされ、昨今の穀物価格の高騰は「能登牛」の肥育経営を圧迫している。また、和牛肉の産地間競争が激化する中、特色ある「能登牛」のブランド化を推進し市場において有利性を確保しなければならない。

このため、比較的安価で入手が容易かつ牛肉の脂肪の質向上に効果の高いとされている食品製造副産物である生米ぬかを活用し、不飽和脂肪酸が豊富でおいしく、特徴ある「能登牛」の生産技術を開発する必要がある。

II 材料及び方法

1. 供試牛

県内産黒毛和種去勢牛28頭を供試した。

2. 試験区の設定

1) 生米ぬか給与試験

飼料は肥育期間を前期、中期、後期に分けTDN換算で前期は濃厚飼料70%、粗飼料30%。中期は濃厚飼料86%粗飼料14%。後期は濃厚飼料90%、粗飼料10%として給与した。対照区は、市販の配合飼料、試験1区は中期～後期にTDN換算で生米ぬかを5%添加、試験2区は中期に5%添加、試験3区は後期に5%添加、試験4区は中期～後期に7%添加、試験5区は後期に7%添加とした（表-1）。

3. 試験期間

1) 生米ぬか給与試験

対照区、試験1区：平成18年6月～平成19年12月
試験2区、試験3区：平成19年6月～平成20年12月
試験4区、試験5区：平成20年6月～平成21年12月

4. 給飼及び給水方法

飼料はドアフィーダーを設置し、朝夕各1回計2回給与。
水は自由給水

5. 調査項目

発育成績、血液性状、枝肉成績、肉の理化学的分析成績、飼料費など。

III 結果および考察

1. 発育成績

出荷時の生時体重は対照区716.8kg、試験1区716.0kg、試験2区779.5kg、試験3区752.8kg、試験4区778.8kg、試験5区754.0kgで肥育期間の平均DGはそれぞれ、794g、779g、863g、825g、878g、851gで、ばらつきがあったが、生米ぬかの飼料は増体量に悪影響はなく、発育は順調であったが、生米ぬか7%添加区は給与期間を等して軟便状態が続いた（図-1 図-2）。

表-1
飼料給与の設定(TDN)
肥育期間

	前期 (10~14月齢)	中期 (15~20月齢)	後期 (21~28月齢)
調査区 濃:	70%	86%	90%
粗:	30%	14%	10%

米ぬか添加(TDNで置き換え)

調査区	前期	中期	後期
対照区	-	-	-
試験1区	-	5%	5%
試験2区	-	5%	-
試験3区	-	-	5%
試験4区	-	7%	7%
試験5区	-	-	7%

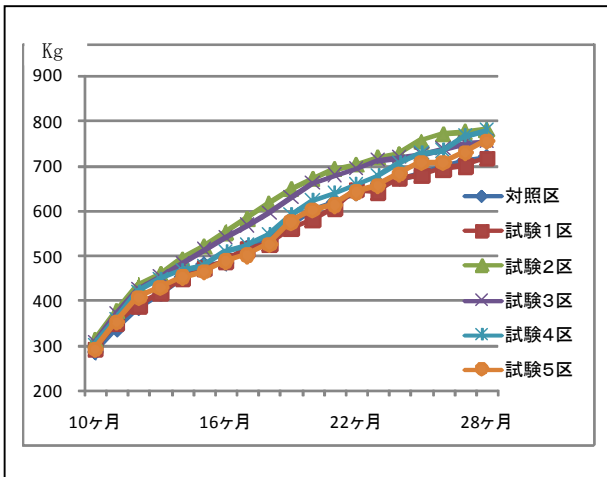


図-1 体重の推移

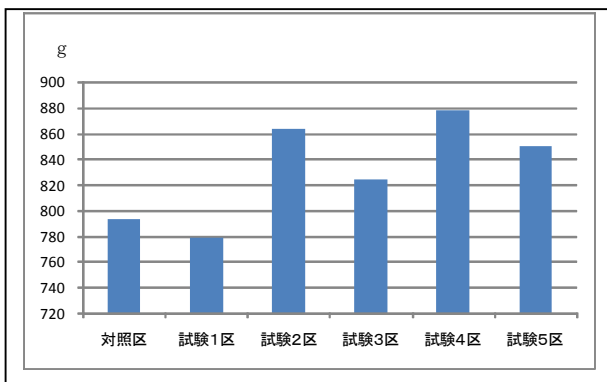


図-2 期間のDG

2. 血液性状

肉質に影響がある血中ビタミンA値は、対照区、試験1区、試験5区、試験6区を制御したが試験3区、試験4区は肥育前期から高く推移し、その結果、肥育中期に計画通りの制御はできなかった。このことから肥育牛の血中ビタミンA濃度の制御は、必要により肥育前期から始めることが必要であると考え（図-3，表-2）。

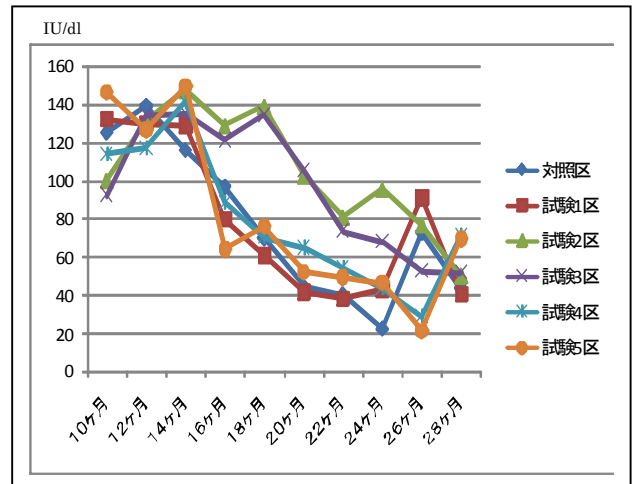


図-3 ビタミンAの推移

表-2 ビタミンAの肥育期別推移

調査区	14ヶ月 肥育中期 開始期	16ヶ月 肥育中期	18ヶ月 肥育中期	20ヶ月 肥育後期 開始期	22ヶ月 肥育後期	26ヶ月 肥育後期
対照区	116.00	96.75	70.00	44.40	40.25	73.00
試験1区	128.80	79.80	61.00	41.86	38.40	91.00
試験2区	147.25	128.34	138.75	102.00	80.50	76.25
試験3区	135.20	121.00	134.20	105.00	73.40	52.40
試験4区	141.00	88.40	70.20	64.60	54.10	28.60
試験5区	149.00	64.20	76.00	52.20	49.40	21.60

BUNおよび総コレステロール値は経時的変動が多く枝肉等級は、数値が高値ほど枝肉等級が高くなる傾向を示した（図-4，図-5）。

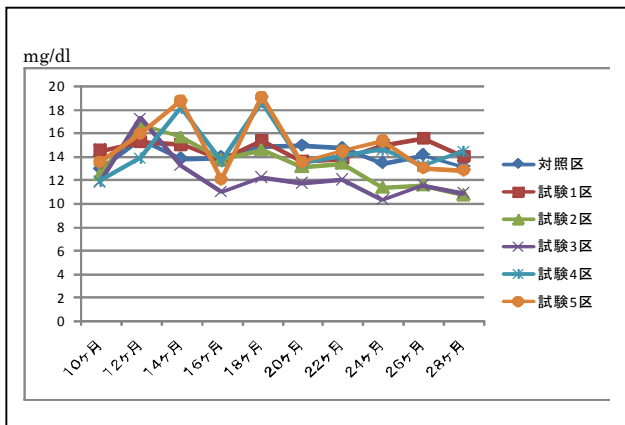


図-4 BUNの推移

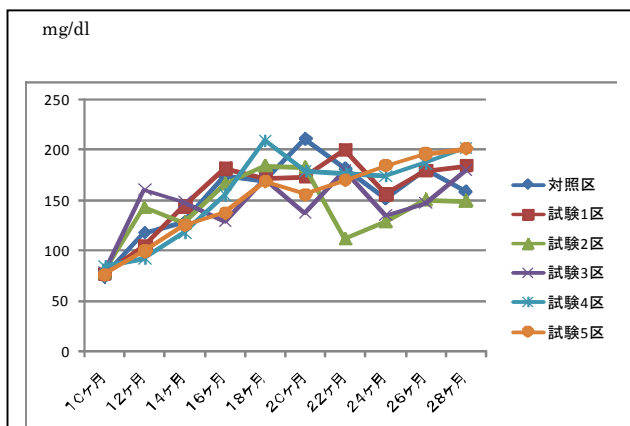


図-5 総コレステロール値

3. 枝肉成績

対照区、試験区ごとの枝肉の成績において、枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚については有意差なかった（表-3）。

4. 理化学的分析成績

1区のロース芯の脂肪酸組成は、対照区と比較して不飽和脂肪酸含量およびオレイン酸含量が高く（5%水準で）有意差があった。また、すべての試験区でも不飽和脂肪酸含量およびオレイン酸含量が高く推移している（図-6）。

本試験では、中期以降（15～28月齢）の14カ月間生米ぬかを5%添加することで、オレイン酸が有意に増加した。群馬県畜試の浅田らは、不飽和脂肪酸は第一胃で水素添加するため、水素添加能力を超過する量の米ぬかの添加が必要で、8%添加しないと効果がないとしている。しかし、今回の試験では中期以降6か月間以上5%添加で効果があるという結果となった。

また、ロース芯の水分含量と加熱損失については対照区、試験1区との比較では有意差はなかった（図-7）。

5. 飼料費

試験区の飼料単価は対照区の飼料単価に置換え飼料摂取量から計算した結果、肥育期間合計の肥育牛1頭当たり対照区211千円、試験1区、192千円、試験2区211千円、試験3区214千円、試験4区195千円、試験5区194千円であった。また、肥育牛1頭当たり1kg増体するに必要な飼料費は、対照区490円、試験1区、453円、試験2区452円、試験3区479円、試験4区411円、試験5区422円で対照区に比較してすべての試験区が安くなった（図-8，図-9）。

6. 食味調査

肉食味アンケート調査では、格付等級A5とB3では、脂身の色以外はB3よりA5の方が成績がよかった。特に肉色は1%水準でA5の方が有意であった。また、この食味アンケート調査で用いた牛肉の脂肪酸組成は、A5牛の不飽和脂肪酸およびオレイン酸含量は高い値を示した（図-10）。

したがって、生米ぬかの飼料利用は肉のオレイン酸含有量を向上させるとともに、飼料費削減に寄与できることが判明されたが、牛の健康管理面等総合的に考察すれば肥育中期から出荷前まで生米ぬかを必要TDN量5%の飼料利用が最適と推察される。

IV 引用文献

1. 中西直人他 黒毛和種去勢牛の産肉性に及ぼすビタミンAの影響, 日畜会報 73(2):273-282, 2002
2. 浅田勉他 米ぬか添加が黒毛和種去勢牛の産肉性および枝肉脂肪の脂肪酸組成に及ぼす影響, 群馬畜試研報第14号(2007):9-20
3. 石田光晴他 肥育期間中における黒毛和種去勢牛の皮下脂肪の脂肪酸組成の変動, 日畜会報 59:496-501
4. 阿久津友紀子他 黒毛和種肥育牛における生米ぬか給与試験, 栃木県畜産試験場だより No. 51 (H22/1/21)
5. 塚崎由子他 牛肉脂肪組織の実態と変動要因, 第44回広島県畜産関係業績発表会資料(2007)

表-3 枝肉の成績

	出荷月齢 (ヶ月)	枝肉等級 (頭数)	枝肉重量 (kg)	ロース芯面積 (cm ²)	バラ厚 (cm)	皮下脂肪厚 (cm)
対照区	27.9	A5 (2), A4 (1), A2 (1)	466.8 ± 69.7	56.5 ± 5.1	7.3 ± 1.0	2.3 ± 0.4
試験1区	28.1	A5 (2), A4 (1), B4 (1), A3 (1)	464.5 ± 44.6	56.8 ± 6.5	7.5 ± 0.6	3.0 ± 0.6
試験2区	27.7	A3 (2), B3 (1), A2 (1)	480.4 ± 48.7	57.5 ± 7.0	7.4 ± 0.6	3.4 ± 0.9
試験3区	27.4	A4 (2), A3 (3)	471.0 ± 61.3	52.0 ± 5.3	7.6 ± 1.0	2.8 ± 0.4
試験4区	27.9	A4 (2), A3 (1), B3 (2)	483.3 ± 15.8	54.0 ± 3.4	7.0 ± 0.7	2.8 ± 0.6
試験5区	28.0	A5 (1), A4 (2), A3 (2)	460.2 ± 43.4	57.8 ± 8.3	7.3 ± 0.7	2.6 ± 0.5

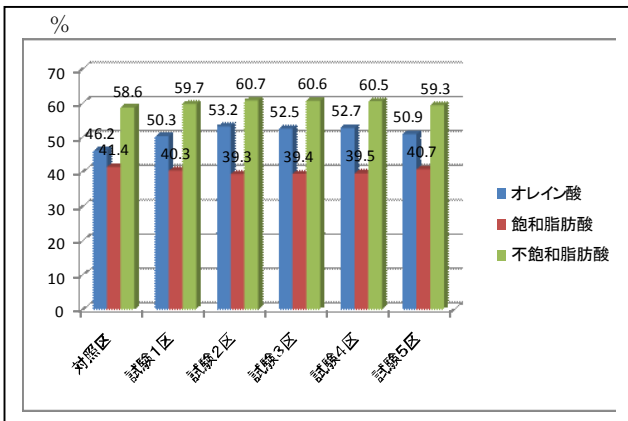


図-6 ロース芯の脂肪酸組成

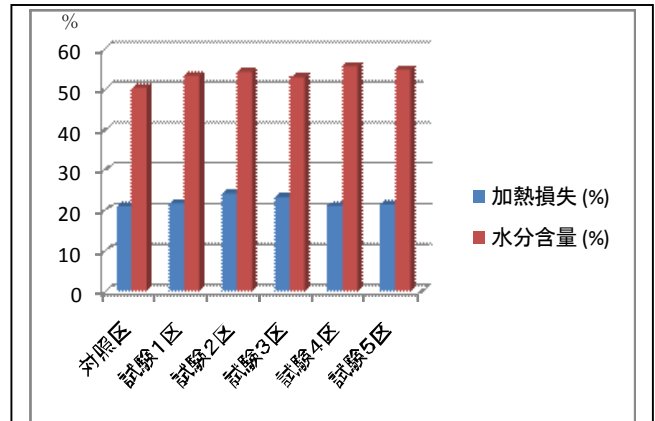


図-7 ロース芯の加熱損失

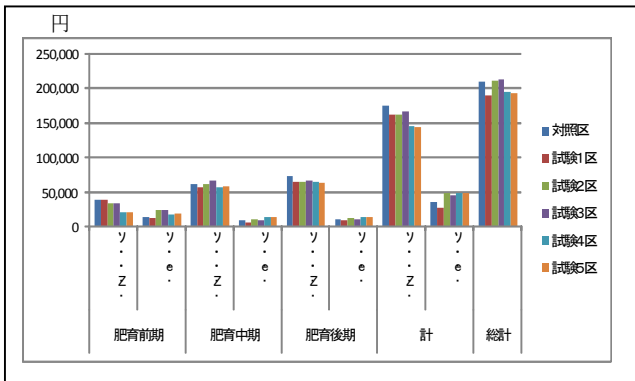


図-8 肥育期間中の飼料費

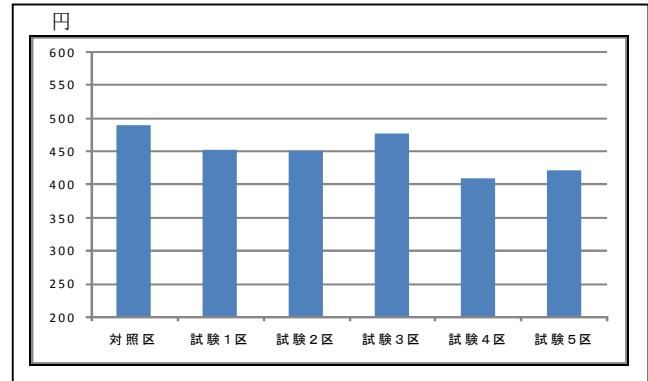


図-9 肥育期間中の1kg増体に要した飼料費

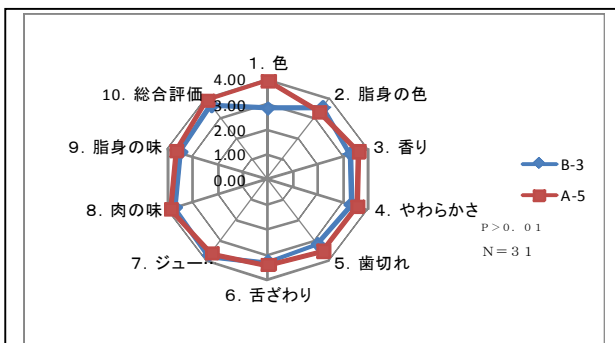


図-10 食味調査 (焼肉)

体外受精卵の雌雄判別技術の確立 —効率的なサンプル採取法の検討—

林 みち子、堀 登、長井 誠

畜産総合センター

Establish of Methods of Sampling of Bovine Embryo in vitro Fertilization for Sex Detection Examination on Efficient Method of Sampling

Michiko Hayashi, Noboru Hori, Makoto Nagai

キーワード：体外受精卵、細胞採取、細胞吸引、性判別、胚生産効率

要 約

乳用牛における雌雄判別体外受精卵(体外胚)の効率的な生産を目的に細胞吸引法(吸引法)による性判別体外胚の生産効率について検討した。その結果、媒精後6日目(媒精日=0日目)の桑実期以上胚の細胞を吸引しても、対照区と比べ、その後の胚発生には影響はなかった。また、吸引法において、吸引前の桑実期以上胚のステージ・ランク別脱出中以上胚盤胞率では、早いステージ(桑実期胚)、低いランク(Cランク)胚での発生率が低かった。さらに15個の桑実期～初期胚盤胞期胚を吸引法により細胞採取・性判別(LAMP法)した結果、判別率は100%(15/15)であった。以上のことから、体外胚での性判別のための吸引法は早いステージ(桑実期胚)、低ランク(Cランク)胚の使用を避けることで、雌雄判別体外胚の生産技術として実用可能であると考えられる。

I 緒 論

乳用牛における雌雄判別体外受精卵(体外胚)を効率的に生産するには、生体卵子吸引技術、体外授精技術、凍結保存技術の他に性判別技術が必要である。性判別のためには、細胞サンプルを採取する必要があるが、近年、金属製ブレードによる栄養膜切断法¹⁾が主流となっているが、本県では、体内胚における雌雄判別技術(平成16～20年度)の確立試験で、林ら²⁾が細胞へのダメージの少ないサンプル採取法(吸引法)を報告した。しかし、体内胚より品質が劣る体外胚での雌雄判別技術は未確立であり、耐凍能の高い胚を作製するとともに染色体検査、遺伝子検査などの品質評価を含めたサンプル採取法の開発が必要である。そこで、第1段階として林ら²⁾が報告した細胞へのダメージの少ない細胞吸引法(吸引法)による性判別体外胚の生産効率について検討したので報告する。

丘細胞卵子複合体を用いて検討した。対照区は、6日目に桑実期以上胚を検査し、5%CS加CR1aa培地で継続培養し、一方、吸引区では、各ステージの胚をマイクロピペット(Drummond MICRODISPENSER 10ul、Drummond MICROCAPS 50ulいずれも先端を加工して使用)を用い、0.3%ポリビニルピロリドン(PVP)添加m-PBSドロップ中で3～4細胞を吸引採取した後、20%CS加TCM199+100μMのβ-MEで個別培養し、供試卵数に対する8日目の胚盤胞期胚以上率および10日目の脱出中以上胚盤胞率、桑実期以上胚に対する胚盤胞発生率、胚盤胞期胚に対する脱出胚盤胞率を比較検討した。また、吸引区では、吸引胚に対するステージ、ランクごとの胚盤胞期以上胚率、脱出胚盤胞率を検討した。体外胚のランクは、成書³⁾に基づいて行った。

II 材料および方法

1. 供試卵子および供試胚

供試卵子は、食肉処理場由来のホルスタイン種の卵巣またはホルスタイン種経産牛の生体から得た卵丘細胞卵子複合体を用いた。供試胚は、Imaiら³⁾の方法で、5%非働化牛血清(CS)加TCM199により成熟培養を行い、ハイポタウリン/ヘパリン法で1種類のホルスタイン精液を用いて媒精し、5%CS加CR1aa培地で発生培養を行い作成した。

なお、気相はすべての試験において、38.5℃、5%CO₂ in airで行った。

2. 試験方法

1) サンプル採取が胚盤胞期以上胚の発生への影響(試験1:図1)

媒精後6日目(媒精日=0日目)の桑実期以上胚について、森安ら⁴⁾の方法に準じて、細胞(割球)を3～4個吸引する細胞吸引法について、食肉処理場由来のホルスタイン種の卵巣(ホルスタイン種)から採取した卵

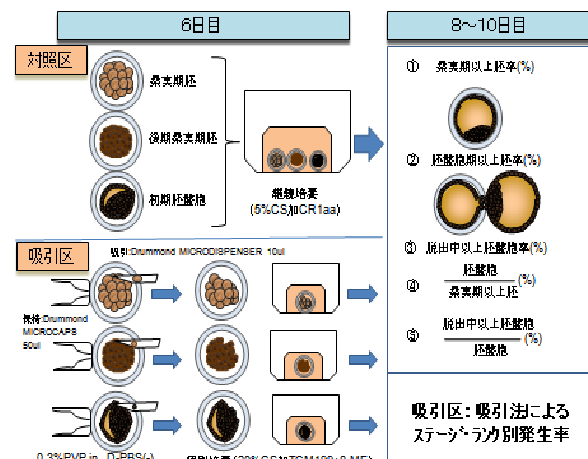


図1. サンプル採取が胚盤胞期以上胚発生に及ぼす影響

Ⅲ 結果

2) 生体卵子吸引(OPU)・体外受精(IVF)によるサンプル採取と性別の実証(試験2:図2)

OPU・IVFにより生産された媒精後6日目の桑実期以上胚を用いて、サンプル採取と性別の実証を3頭のホルスタイン種経産牛で実施した。なお、OPU・IVF法はImaiら³⁾の方法、超音波診断装置はアロカSSD1000で行い、媒精後6日目の供試卵数に対する桑実期以上胚率、8日目の胚盤胞期以上胚率および10日目の脱出中以上胚盤胞率およびLAMP法により性別検査を15個の胚で実施し判別率を検討した。性別は「Loopamp牛胚性別判定キット」(栄研化学)用い、マニュアルに準じて実施した。

3. 統計処理

検査成績は、階二乗検定もしくはイエーツの補正、フィッシャーの直接確率検定で行った。

1. 媒精後6日目に桑実期以上胚の細胞を吸引しても対照区と比べ、その後の胚盤胞期以上胚率、脱出中以上胚盤胞率に有意差は認めなかった。しかし、吸引区は対照区に比べ胚盤胞期以上胚に対する脱出中以上胚盤胞率が高かった(表1)。
2. 吸引区では、吸引前の桑実期以上胚のステージ別脱出中以上胚盤胞率では、桑実期、後期桑実期、初期胚盤胞期で各々、25.0、76.9、94.1%と桑実期が他ステージに比べ低く、同様にランク別では、A、B、Cで各々、90.0、76.2および28.6%とCランクでの発生率が他ランクに比べ低かった(表2)。ステージ・ランク別顕微鏡所見では、図1のとおり吸引用マイクロピペットによる透明帯穿孔孔から脱出する所見がほとんどであった。
3. OPUで採取した卵子での体外受精では、供試卵数が少なく吸引前の胚生産効率が低い試験牛もいるが、その後の胚生産効率は高かった(表3)。なお、15個の桑実期～初期胚盤胞期胚を吸引法により細胞採取・性別判定した結果、吸引胚15個の雌雄判別では、雄と判別したのは8胚、雌と判定したのは7胚で15個すべて判定でき判定率は100%(15/15)であった。

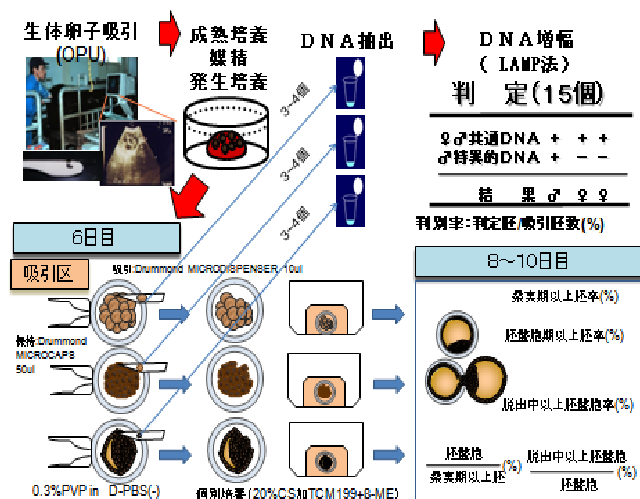


図2. OPU・IVFによるサンプル採取と性別の実証

表 1 吸引法による細胞採取後の胚発生検査成績

試験区分	供試卵数	桑実期以上胚 (吸引胚率 ¹⁾)		胚盤胞期以上胚率 ²⁾		脱出中以上胚盤胞率 ³⁾		2)/1) × 100 ^{*1}	3)/2) × 100 ^{*2}
		胚数	(%)	胚数	(%)	胚数	(%)	(%)	(%)
対照区	142	56	(39.4)	46	(32.4)	26	(18.3)	(82.1)	(56.5) ^a
吸引区	147	46	(31.3)	34	(23.1)	30	(20.4)	(73.9)	(88.2) ^b

注1) 試験回数: 6回、注2): 1)、2)、3)は供試卵数に対する割合、注3)同列異符号間に有意差あり(p<0.01)

※1: 桑実期以上胚に対する胚盤胞期以上胚率、※2: 胚盤胞期以上胚に対する脱出中以上胚盤胞率

表 2 吸引胚のステージ・ランク別胚発生成績

ステージ	ランク	吸引胚数	胚盤胞期以上胚率 ¹⁾		脱出中以上胚盤胞率 ²⁾	
			胚数	(%)	胚数	(%)
桑実期	A	2	2	(100.0)	1	(50.0)
	B	5	3	(60.0)	2	(40.0)
	C	9	1	(11.1)	1	(11.1)
	計	16	6	(37.5) ^a	4	(25.0) ^c
後期桑実期	A	4	4	(100.0)	4	(100.0)
	B	5	5	(100.0)	4	(80.0)
	C	4	2	(50.0)	2	(50.0)
	計	13	11	(84.6) ^b	10	(76.9) ^d
初期胚盤胞期	A	5	5	(100.0)	5	(100.0)
	B	11	11	(100.0)	10	(90.0)
	C	1	1	(100.0)	1	(100.0)
	計	17	17	(100.0) ^b	16	(94.1) ^d
合計	A	11	11	(100.0) ^e	10	(90.0) ^g
	B	21	19	(90.5) ^e	16	(76.2) ^g
	C	14	4	(28.6) ^f	4	(28.6) ^h
	計	46	34	(73.9)	30	(65.2)

注1) 1)、2)は吸引胚数に対する割合、注2) a vs b,c vs d,e vs f,g vs h:p<0.05

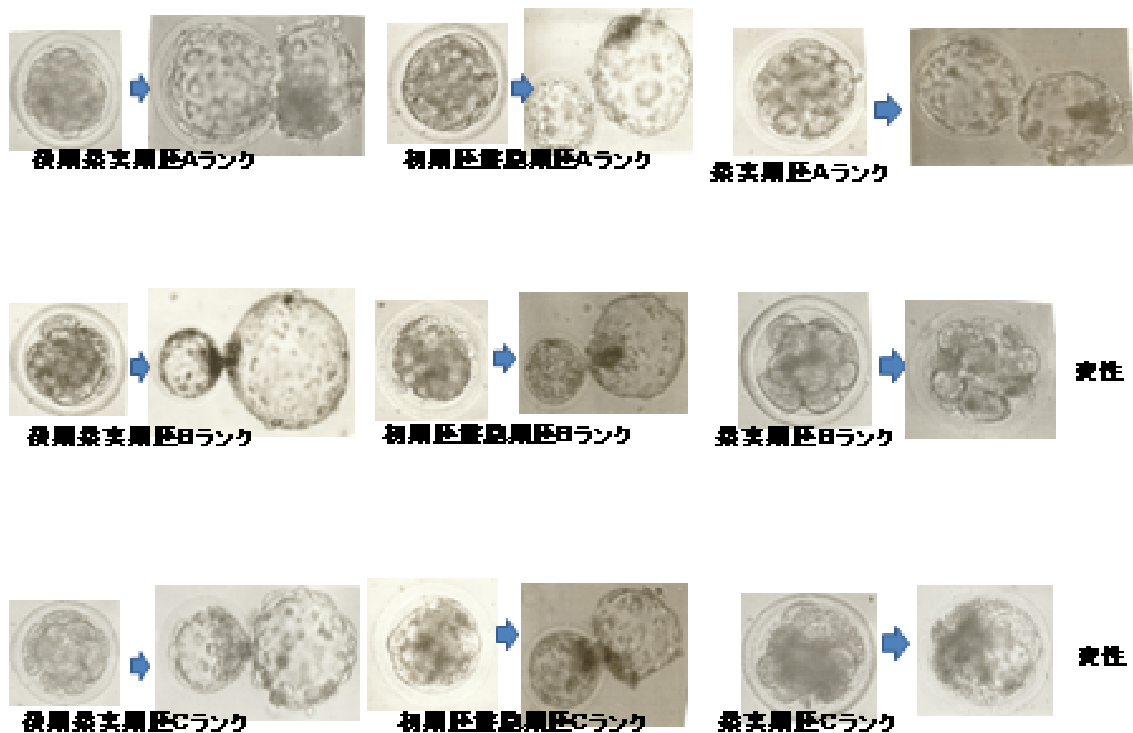


図3. ステージ・ランク別所見

表 3 生体卵子吸引(OPU)・体外受精による細胞採取(吸引法)後の胚発生検査成績

試験牛	供試卵数	桑実期以上胚 (吸引胚)率 ¹⁾		胚盤胞期以上胚率 ²⁾		脱出中以上胚盤胞 発生率 ³⁾		2)/1)× 100 ^{*1}	3)/2)×100 ^{**2}
		胚数	(%)	胚数	(%)	胚数	(%)	(%)	(%)
No.1	9	3	(33.3)	2	(22.2)	2	(22.2)	(66.7)	(100.0)
No.2	20	13	(65.0)	11	(55.0)	10	(50.0)	(84.6)	(90.9)
No.3	8	2	(25.0)	2	(25.0)	2	(25.0)	(100.0)	(100.0)

IV まとめおよび考察

吸引法は、体外受精卵においても性判別のためのサンプル採取法として活用可能であり、早いステージ(桑実期胚)や低ランク(Cランク)胚の利用を避けることにより、性判別実施後の移植可能胚の生産効率を高めることができると考える。

本県では、「乳用牛における雌判別体外受精卵生産技術の開発」試験を平成21年度より開始し、第1段階として性判別のための微量サンプル採取方法を検討した。今後、凍結試験および移植試験を行う必要があるとともに、Tagawaら⁶⁾の割球分離による2つの胚盤胞作出方法のように染色体、遺伝子検査などの品質評価が可能な大量サンプル採取方法の開発を進めたい。

V 謝辞

本試験の実験にあたり、卵巣の採材にご協力いただきました金沢市食肉公社および同食肉衛生検査所の職員の方々に御礼申し上げます。

VI 引用文献

1. 後藤ら(1994)PCR法によるウシ胚の性判別と臨床応用. 日本胚移植学雑誌, 17(1):19-25
2. 林ら(2009)牛胚の雌雄判別のためのサンプル採取と保存技術の確立. 石川県畜産総合センター研究報告, :41:9-12
3. Imai K., *et al.* (2006) The efficiency of embryo production by Ovum Pick-Up and in vitro fertilization in cattle. J Reprod Dev., 52, Suppl. S19-26
4. 森安ら(2004)吸引法による性判別胚凍結保存後の受胎率向上. 第19回東日本受精卵移植技術研究会, 46-47.
5. 家畜人工授精講習会テキスト(家畜体外受精卵移植編). (1993) 社団法人日本家畜人工授精師協会発行:113-119
6. Tagawa M., *et al.* (2008) Production of monozygotic twin calves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system. Theriogenology, 69:574-582

個体別体外受精技術の確立

成熟培地への還元剤および成長因子の添加がウシ卵子の体外成熟、受精、胚発生に及ぼす影響
堀 登¹、長井 誠¹、林 みち子¹、永井 卓²

1. 畜産総合センター、2. 農研機構畜産草地研究所

Establish of Technique of individually In vitro Fertilization

Effects of Reducing Agents and Growth Factors in Maturation medium on In vitro Maturation, Fertilization and subsequent development of bovine oocytes in vitro.

Noboru Hori, Makoto Nagai, Michiko Hayashi, Takashi Nagai

キーワード：成熟培養、還元剤、成長因子、胚生産効率

要 約

成熟培地への還元剤および成長因子の添加がウシ卵子の体外成熟、受精、胚発生に及ぼす影響について、従来からの 5% 非働化牛血清 (CS) を添加した TCM199 培地 (I 区)、I 区に FSH (0.02AU/ml)、Estradiol- β (E_2 :1 μ g/ml)、ピルビン酸 (0.2mM)、EGF (10ng/ml) を添加した培地 (II 区)、II 区にシステアミン (100 μ M)、シスチン (200 μ M) を添加した培地 (III 区)、III 区に EGF 濃度を 50ng/ml に変更し、IGF-I (100ng/ml) を添加した培地 (IV 区) について検討した。

その結果、成熟率では、III、IV 区が I 区、また III 区が II 区に比べ有意に高く、精子侵入率および単精子侵入率では、III、IV 区が I 区に比べ有意に高かった。卵割率では、I 区に比べ、他区が有意に高く、8 細胞期胚以上率、胚盤胞以上胚率、および脱出胚盤胞率はともに I 区に比べ、III、IV 区は有意に高かった。細胞数および染色体検査での正常胚の割合では、区間に有意差は無かったが、Mitotic index では、I 区に比べ、III、IV 区は有意に高く、II 区の成熟培地をベースにしてシステアミン、シスチンの添加が牛胚生産に効果的であることが示唆された。

I 諸 論

ウシの体外授精技術 (IVF) で移植可能な胚盤胞期以上胚 (体外胚) の発生率は、30~40% で、過排卵処理を施し生体から回収する体内胚の発生率、60~70% に比べ依然として低く、また、個体別体外受精での少数培養 (10 個以下の未成熟卵) における体外胚の発生率は更に低下する。その発生率の向上には体外成熟、受精 (媒精)、発生培養の各段階で課題が残されており、生体卵子吸引 (OPU)・IVF 技術の効率的活用を困難にしている。

体外成熟の課題として、卵巣から吸引採取する卵子は未成熟な時期 (卵核胞期) にあり、受精可能な第 2 減数分裂中期まで核を成熟させる必要があるが、体外成熟培養は体内成熟と同じ環境下で行われるのではなく、改良の余地がある。近年、卵子に侵入した精子頭部の雄性前核形成に関与し¹⁻⁵⁾、細胞の酸素障害から守るために卵子内のグルタチオン含量が非常に重要であること⁶⁻⁹⁾、酸化ストレスが卵子成熟時の核の紡錘体構造を変化させること¹⁰⁾、グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンがペプチド結合したトリペプチドであり、システインは培地中で容易にシスチンに酸化されること²⁰⁾、システアミンはシスチンをシステインに還元し、システアミンの添加が体外成熟卵子のグルタチオン含量を培養前のレベルに維持することにより、ウシ体外胚の発生率を高めることが報告されている¹¹⁾。また、OPU では、裸化卵子を回収することがあるので、ヤギ裸化卵子の成熟培養へのシステアミン 100 μ M、システインの材料となるシスチン 200 μ M の添加が成熟率を有意に高め、胚発生に効果的であること¹²⁾ は非常に興味深い。さらにウシ卵子では、インスリン様成長因子 (IGF-I) 100ng/ml、上皮成長因子 (EGF) 50ng/ml の添加が未成熟卵子の卵丘細胞の膨化、酸化的代謝、核の成熟率、および卵割率を有意に高めたこと¹³⁾、ヒツジ卵子で IGF-I、EGF、システアミンの添加が胚発生に効果的であるが、無血清培地で行なうより血清添加培地で行った

方がより効果的であったことが報告されている¹⁴⁾。

しかし、ウシにおけるシステアミン、シスチン、EGF および IGF-I の組み合わせが体外成熟、体外受精後およびその後の胚発生に及ぼす影響について詳細に検討した報告はない。

そこで、本研究では、OPU・IVF による効率的な体外胚の生産を目的に、血清添加をベースとした体外成熟培地へのシステアミン、シスチン、EGF および IGF-I の添加がウシ未成熟卵子の体外成熟、体外受精後およびその後の胚発生に及ぼす影響について検討した。

II 材料および方法

1. 供試胚

食肉処理場由来のウシ卵巣 (ホルスタイン種) から得た卵丘細胞卵複合体 (COCs) を以下の 4 区の成熟培養試験に供試した。

2. 成熟培養試験

I 区は、5% 非働化牛血清 (CS) を添加した TCM199 培地、II 区は、I 区の培地をベースに FSH (0.02AU/ml)、Estradiol- β (E_2 :1 μ g/ml)、ピルビン酸 (0.2mM)、EGF (10ng/ml)、III 区は、II 区をベースにシステアミン (100 μ M)、シスチン (200 μ M)、IV 区は、III 区をベースに EGF 濃度を 50ng/ml に変更し、IGF-I (100ng/ml) を添加し、20~22 時間成熟培養を行った。

COCs のランクは家畜人工授精講習会テキスト¹⁵⁾に基づき、A 型、B 型にランキングし成熟、受精、発生検査に用いる卵子のランク割合を各区統一した。また、各区の卵数は、OPU によって回収される COCs の数を 1 頭当たり、15 から 20 個であると仮定し、15~20 個を 1 ドロップ 100 μ l 中で成熟培養した。

Ⅲ 結果

3. 体外受精（媒精）および発生培養

媒精は、今井ら¹⁶⁾の方法により90%パーコールで生存精子を回収し、5mMハイポタウリン/へパリン法（ホルスタイン種精液1種類：精子濃度200万/ml）で6時間行った。発生培養も、今井ら¹⁶⁾の方法により媒精後に卵丘細胞を剥離し、5%CS加CR1aa培地により8日間（媒精日=0日目）実施した。

なお、気相は、全行程を38.5°C、5%CO₂ in airで行った。

4. 検査項目

検査は、アセトアルセイン染色法により、成熟率、媒精後10時間目の精子侵入率、単精子、多精子侵入率¹⁷⁾、媒精後72時間目の卵割率、8日目の胚盤胞期以上胚率、脱出胚盤胞率、また、一部の8日目拡張胚盤胞については、内細胞塊（ICM）。栄養膜細胞（TE）の細胞数を阪谷ら¹⁸⁾の方法により計測した。染色体検査では、早期胚芽死、流産など受胎率低下の原因となる倍数性の異常を吉澤ら¹⁹⁾の方法で調べ、倍数性の異常胚（haploid、mixploid、polyploid）の割合、Mitotic index（分裂指数：染色体中期相像数/総細胞数×100）について検査した。

5. 統計処理

成熟、受精、および胚発生、染色体検査成績は、階二乗検定もしくはイエーイツの補正、フィッシャーの直接確率検定、平均細胞数および、Mitotic indexについてはスチューデントのt検定で行った。

1. 成熟率では、I、II、III、IV区で各々、77.7、85.7、93.4、89.3%であり、III、IV区はI区に比べ、また、III区はII区に比べ有意に高かった（表1）。精子侵入率および単精子侵入率では、I、III、IV区で各々、72.4、94.8、90.9%および51.3、76.6、70.1%であり、ともにIII、IV区はI区に比べ有意に高かった。しかし、多精子侵入率では、18.2~24.3%の範囲にあり、有意差は認められなかった（表2）。
2. 卵割率では、I、II、III、IV区で各々、80.2、88.8、92.6、90.2%でI区に比べ、他区が有意に高く、8細胞期胚以上率、胚盤胞期以上胚率、および脱出胚盤胞率では、I、III、IV区で各々、50.7、65.1、62.1%、41.4、51.9、50.0%、および2.2、8.1、7.6%であり、ともにI区に比べ、III、IV区は有意に高かった（表3）。
3. 細胞数では、ICM、TEおよび総細胞数で各々、平均28.5~34.4、74.3~87.3、および104.5~116.7個であり、いずれも区間に有意差は無かった（表4、図1）。
4. 染色体検査では異常胚の割合は、9.7~25.0%で区間に有意差は無く、正常胚の割合は、75.0~90.3%の範囲であった。しかし、Mitotic indexでは、I、III、IV区で各々、10.8±5.0、16.9±12.2、17.5±12.8%であり、I区に比べ、III、IV区は有意に高かった（表5、図2）。

表 1 成熟検査成績

試験区分 ^(※)	供試卵数	成熟率	
		卵数	(%)
I	121	94	(77.7) a
II	119	102	(85.7) ab
III	122	114	(93.4) c
IV	122	109	(89.3) cb

(※)

I区：TCM199+5%CS

II区：I区+FSH+E₂+ピルビン酸+EGF(10ng/ml)

III区：II区+システアミン(100μM)+シスチン(200μM)

IV区：III区（EGF10→50 ng/ml）+IGF-I(100ng/ml)

注1) 試験回数：8回、注2) 同列異符号間に有意差あり(ac:p<0.01,ab,bc:p<0.05)

表 2 受精検査成績

試験区分	供試卵数	精子侵入率		単精子侵入率		多精子侵入率	
		卵数	(%)	卵数	(%)	卵数	(%)
I	76	55	(72.4) a	39	(51.3) d	16	(21.1)
II	74	64	(86.5) ab	46	(62.2) de	18	(24.3)
III	77	73	(94.8) b	59	(76.6) e	14	(18.2)
IV	77	70	(90.9) bc	54	(70.1) ef	16	(20.8)

注1) 試験回数：5回、注2) 同列異符号間に有意差あり(ab,de:p<0.01,ac,df:p<0.05)

表 3 発生検査成績

試験区分	供試卵数	卵割率		8細胞期以上胚率		胚盤胞期以上胚率		脱出胚盤胞率	
		胚数	(%)	胚数	(%)	胚数	(%)	胚数	(%)
I	268	215	(80.2) ^a	136	(50.7) ^c	111	(41.4) ^e	6	(2.2) ^g
II	260	231	(88.8) ^b	153	(58.8) ^{cd}	117	(45.0) ^{ef}	11	(4.2) ^{gh}
III	258	239	(92.6) ^b	168	(65.1) ^d	134	(51.9) ^f	21	(8.1) ^h
IV	264	238	(90.2) ^b	164	(62.1) ^d	132	(50.0) ^f	20	(7.6) ^h

注1) 試験回数：5回、注2) 同列異符号間に有意差あり(ab,cd,gh:p<0.01,ef:p<0.05)

表 4 細胞数検査成績

試験区分	供試胚数	細胞数(平均±標準偏差)		
		ICM ^{※1}	TE ^{※2}	総細胞数
I	15	34.4±10.1	82.3±13.4	116.7±21.1
II	15	31.3±13.9	74.3±31.3	105.6±38.3
III	21	28.5±9.3	87.3±32.3	115.9±35.6
IV	25	29.4±12.3	75.1±27.7	104.5±35.9

注1) 試験回数：3回、※1：内細胞塊、※2：栄養膜細胞

表 5 染色体検査成績

試験区分	供試胚数	分析胚数(%) ※1	胚の割合(%) ^{※2}					Mitotic index ※3
			正常	異常			計	
			Diploid	Haploid	Mixploid	Polyploid		
I	33	24(72.7)	20(83.3)	0(0)	3(12.5)	1(4.2)	4(16.7)	10.8±5.0 ^a
II	29	24(82.8)	18(75.0)	1(4.2)	5(20.8)	0(0)	6(25.0)	13.2±9.2 ^{ab}
III	36	33(91.6)	28(84.8)	0(0)	5(15.2)	0(0)	5(15.2)	16.9±12.2 ^b
IV	36	31(86.1)	28(90.3)	0(0)	3(9.7)	0(0)	3(9.7)	17.5±12.8 ^b

注1) 試験回数：5回、注2) 同列異符号間に有意差あり(ab:p<0.05)、

※1：供試胚数に対する割合、※2：分析胚数に対する割合、※3：染色体中期相像数／総細胞数×100

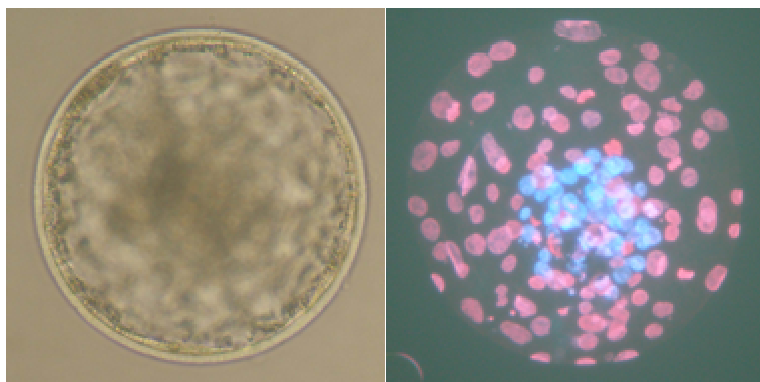
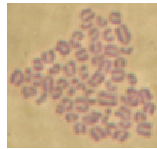


図1 左は染色前の8日目拡張胚盤胞期胚の鏡検像。右は同一胚の二重染色像。Propidium Iodideにより栄養外胚葉が赤色に、bis-benzimideにより内部細胞塊が青色に良好に染め分けられている。

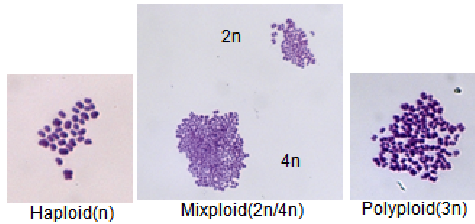
正常



染色体(2n=60本)の中期像

Diploid(2n)

異常



Haploid(n)

Mixploid(2n/4n)

Polyploid(3n)

図2 染色体中期像(倍数性の異常)

IV まとめおよび考察

成熟培地への還元剤および成長因子の添加がウシ卵子の体外成熟、受精、胚発生に及ぼす影響について、従来からの5%CS加TCM199培地(I区)、I区にFSH(0.02AU/ml)、Estradiol- β (E_2 :1 μ g/ml)、ピルビン酸(0.2mM)、EGF(10ng/ml)を添加した培地(II区)、II区にシステアミン(100 μ M)、シスチン(200 μ M)を添加した培地(III区)、III区のEGF濃度を50ng/mlに変更し、IGF-I(100ng/ml)を添加した培地(IV区)の4区で検討した。

その結果、成熟率では、III、IV区はI区、III区はII区に比べ、また、精子侵入率および単精子侵入率では、III、IV区はI区に比べ有意に高かった。卵割率では、I区に比べ、他区が有意に高く、8細胞期胚以上率、胚盤胞以上胚率、および脱出胚盤胞率はともにI区に比べ、III、IV区は有意に高かった。細胞数および染色体検査での正常胚の割合では、例数は少ないが区間に有意差は無かった。しかし、Mitotic indexでは、I区に比べ、III、IV区は有意に高く、卵割率を除いたI区とII区間、およびIII区とIV区間において各検査項目に有意差がないことから、II区の成熟培地をベースにしてシステアミン、シスチンの添加が牛胚生産に効果的であることが示唆された。

血清添加をベースとした理由は、我々は、従来から5%のCSを添加した成熟培養方法を行ってきたが、血清成分の有用なホルモンや成長因子等が卵胞内へ20分の1しか移行しないとは考えにくいと推察している。実験ベースでは、無血清培地をベースにするのが本来の手法であるが、未だ生産効率が上昇しない原因が未知の成分の解明が不十分か適正な濃度がわかっていないことが原因と考え今回採用した。

また、FSHを添加した理由は、従来からのI区とFSH、エストロゲンを添加した成熟培養方法では、胚発生効率に有意差がないことを我々は経験していること、また、EGFは細胞内のグルタチオン濃度を上昇させ²¹⁾、エストロゲンの産生を促進すること²²⁾から、EGFを添加したII区を設けた。しかし、II区では卵割率が有意に高くなったが、胚盤胞の発生効率がやや高い傾向を示したものの有意差が出なかったことから、EGFのみでは発生能を改善できないと考えた。

今回、ヤギ裸化卵子への添加効果が報告されているシスチン添加が、ウシ裸化卵子に及ぼす影について検討できなかったが、卵丘細胞を有するウシ裸化卵子については効果があった。

また、EGFとIGF-Iの同時添加は相乗効果があると報告されていること²³⁾から添加したが、III区とIV区の間には有

意差がなかったことから、その相乗効果は認められなかった。

I区とIII、IV区、II区とIII区での成熟率が上昇した理由は、II区でのEGF添加だけでは、細胞内グルタチオン濃度の上昇が不十分であり、システアミン、シスチンの添加によりグルタチオン濃度が有意に上昇したと考える。また、単精子侵入率が上昇した理由としては、成熟率の有意な上昇が、その後の単精子侵入率を上昇させたと考えられる。しかし、システアミン、シスチンの添加により、多精子侵入率を低減させることはできなかったと考えられる。胚盤胞の胚発生率が向上した理由は、単精子侵入率の向上によるものと考えられる。細胞数および染色体検査で正常性に有意差がなかったことは、システアミン、シスチンの効果がなかったと考える。しかし、Mitotic indexに有意差がでたことは、脱出胚盤胞率がIII、IV区がI区に比べ有意に高いことから発育が有意に速くなっていることと関連性があると考えられた。

今後、III区の成熟培地を基本に、胚生産効率の向上および多精子侵入率の低減等の品質向上手法の開発をさらに進めていきたい。

V 謝辞

本試験の実験にあたり、卵巣の採材にご協力いただきました金沢食肉公社および同食肉衛生検査所の職員の方々に御礼申し上げます。また、体外受精方法のご指導を賜りました家畜改良センター技術第一課 今井敬 生産技術専門役、および成長ホルモンの保存方法等のご指導を頂いた元大分県農林水産研究センター畜産試験場、現大分県家畜保健衛生所 梅木英伸主幹研究員、ならびにシステアミンの調整方法、細胞数の測定方法等についてご指導を賜りました農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター 高橋昌志上席研究員および阪谷美樹研究員、染色体検査手技のご指導を賜りました宇都宮大学 吉澤緑教授に深謝いたします。

VI 引用文献

- 1 . Calvin H. I., *et al.* (1986) Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res.* 14:265-275
- 2 . Perreault S. D., *et al.* (1988) Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* 125:181-186
- 3 . Perreault S. D., *et al.* (1984) The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev. Biol.* 101:160-167
- 4 . Yoshida M., *et al.* (1992) Effect of maturation media on male pronuclear formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 31:68-71
- 5 . Yoshida M., *et al.* (1993) Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocyte in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 35:76-81
- 6 . Lim J. M., *et al.* (1996) Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology.* 46:429-439
- 7 . Meister A. (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science.* 220:472-477
- 8 . Lafleur M. V., *et al.* (1994) The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Radic. Res.* 21:9-17
- 9 . Furnus C. C., *et al.* (2007) Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 109:88-99
- 10 . Choi W. J., *et al.* (2008) Oxidative stress and tumor necrosis factor- α -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertility and Sterility.* 88:1220-1231
- 11 . Geshi M., *et al.* (1999) Addition of cysteamine to a serum-free maturation medium enhances in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes. *J Mamm. Ova Res.* 16:135-140
- 12 . Zhou P. *et al.* (2008) The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. *Reproduction.* 135:605-611
- 13 . Rieger D., *et al.* (1998) The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *J Reprod Fertil.* 112:123-130
- 14 . Shabankareh H. K., *et al.* (2009) Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. *Fertil Steril.* 24:1-6
- 15 . 家畜人工授精講習会テキスト (家畜体外受精卵移植編). (1993) 社団法人日本家畜人工授精師協会発行:93-94
- 16 . Imai K., *et al.* (2006) The efficiency of embryo production by Ovum Pick-Up and in vitro fertilization in cattle. *J Reprod Dev.* 52:Suppl. S19-26
- 17 . 家畜人工授精講習会テキスト (家畜体外受精卵移植編). (1993) 社団法人日本家畜人工授精師協会発行:94-104
- 18 . 阪谷ら (2010) 蛍光試薬を用いた胚盤胞の簡便な染色法. *日本胚移植学雑誌.* 32(1):13-17
- 19 . Ulloa C. M. U., *et al.* (2008) Blastocyst production from In Vitro-produced Day-2 bovine embryos classified by cleavage stage, and cytogenetical evaluation of the resultant Day-8 blastocysts. *J Reprod Dev.* 54:465-472
- 20 . Bannai S. (1984) Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 779:289-306
- 21 . Abeydeera L. R., *et al.* (2000) Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 54:787-797
- 22 . Nelson K. G., *et al.* (1991) Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:21-25
- 23 . Purohit G. N., *et al.* (2005) Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 87: 229-239

個体別体外受精技術の確立 ウシ体外受精培地へのグルコースの添加が受精、胚発生に及ぼす影響 堀 登、長井 誠、林 みち子

畜産総合センター

Establish of Technique of individually In vitro Fertilization
Effects of Glucose in Fertilization medium on In vitro Fertilization and subsequent development of bovine oocytes in vitro.

Noboru Hori, Makoto Nagai, Michiko Hayashi

キーワード：媒精方法、ハイポタウリン、グルコース、汎用性、胚生産効率

要 約

ウシ体外受精技術において、汎用性および胚生産効率の高い体外受精法（媒精方法）について検討した。

試験 1：食肉処理場由来のウシ卵巣（ホルスタイン種）から得た卵丘細胞卵子複合体を成熟培養し、以下の体外受精試験に供試した。18 種類の凍結精液について、グルコース不含の 5mM カフェイン(Caf)/ヘパリン(Hep)法（対照区）および 10mM ハイポタウリン(HT)/Hep 法（試験区）で媒精を各々実施した。その結果、精子侵入率、単精子侵入率では、両区に有意差はなかったが、多精子侵入率では、対照区に比べ、試験区が有意に低い値を示した。胚発生成績では、卵割率、8 細胞期以上胚率は、対照区が有意に高かったが、胚盤胞期以上胚率および脱出胚盤胞率は、有意に試験区が高かった。また、胚盤胞期以上胚が発生しなかった精液は、対照区、試験区各々、2、1 種類であった。

試験 2：胚生産効率の悪かった精液（不良精液）1 種類について、以下のグルコース添加試験を実施した。G(13.9mM)の添加の有無（G+,G-）の 2 区、5mM Caf/Hep 法(Caf 区)、5mM HT/Hep 法(HT 区)の 2 区で計 4 区（Caf(G-), Caf(G+), HT(G-), HT(G+)区）の体外受精培地にて媒精を行った。その結果、精子侵入率および単精子侵入率で、Caf(G+)区および HT(G+)区が Caf(G-)区に比べ有意に高かった。HT(G+)区は、卵割率、8 細胞期以上胚率、胚盤胞期以上胚率、脱出胚盤胞率、全ての項目において他区に比べ有意に高かった。

試験 3：試験 2 の同一精液の胚生産効率が低率であることから、HT を添加した精子洗浄液で洗浄し、HT(G+)区、HT+Caf(G+)区の 2 区にて、HT の精子洗浄液への添加および Caf および HT の複合処理効果について検討した。その結果、HT(G+)区が HT+Caf(G+)区に比べ、胚発生成績のすべての項目で有意に高く、胚盤胞期以上胚率が 53.3%と高率となった。

以上のことから、Caf/Hep 法より HT/Hep 法の方が、汎用性、および胚生産効率が高く、不良精液では、遠心洗浄時から HT を添加し、受精培地にグルコースを添加することで胚生産効率が有意に上昇することが示唆された。

I 諸 論

平成 21 年度より乳用牛における雌判別体外受精卵生産技術の開発試験を行っているが、汎用性および胚生産効率の高い体外受精法（媒精方法）を検討する必要がある。体外受精では、人工授精用凍結精液を用いるが、受胎性検査済みのものが市販されている。しかし、体外受精では受精可能な凍結精液がある一方、全く受精しない精液もあり、種雄牛によって胚生産効率が大きく変わる。また、媒精方法によって胚生産効率が異なり、しかも、種雄牛毎の詳細な媒精条件について公表されていない。野外での牛の改良は、市販凍結精液による部分が現在も体勢をしめており、日々、種雄牛の評価成績は変動し、農家の望む精液は 1 年もたないうちに変わってしまうことから、どんな精液でもすぐ使えてかつ胚生産効率が安定して高い体外受精法が必要である。

そこで、Hori ら¹⁾の報告をもとに抗酸化剤であるハイポタウリン(HT)を使用する HT/ヘパリン(Hep)法と従来からのカフェイン(Caf)/Hep 法の 2 つの媒精方法について、汎用性、胚生産効率について比較検討した。

II 材料および方法

1. 供試胚

食肉処理場由来のウシ卵巣（ホルスタイン種）から得た卵丘細胞卵子複合体を供試した。なお、卵子のランクは成書 2)に基づき、A 型、B 型にランクに分け成熟、受精、発生検査に用いる卵子のランク割合を各区統一した。

2. 試験方法

1) 試験 1（図 1）

成熟培養は、5%非働化牛血清(CS)加 TCM199 で 21～22 時間を行い、以下の媒精試験に供した。18 種類の精液（黒毛和種精液 13 種類：B1～B13、ホルスタイン種精液 5 種類：H1～H5）を用い、凍結精液を融解、グルコースを含まない精子洗浄液（精子洗浄液）で 2 回遠心洗浄後、沈査の精子濃度を調整後、グルコースを含まない従来からの 5mM Caf/5IU/ml Hep(Caf/Hep(G-))液で媒精を行う対照区(Caf/Hep(G-))法と、Hori ら¹⁾が報告したグルコースを含まない 10mM HT/5IU/ml Hep(HT/Hep(G-))液を試験区(HT/Hep(G-))法として、媒精時間 5 時間、個々の凍結精液の濃度により、精子濃度は 350 から 600 万/ml に調整して各々媒精を実施した。

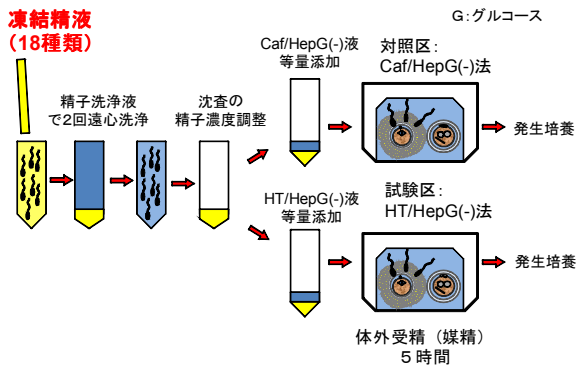


図1. ハイポタウリン(HT)/ヘパリン(Hep)法の汎用性、胚生産効率の検討

なお、発生培養は、成熟培養液(5%CS加TCM199培地)をそのまま、発生培養液で使用する Hamano らの方法³⁾で、受精検査は、アセトオルセイン染色法⁴⁾により、媒精後18時間目の精子侵入率、単精子侵入率、多精子侵入率、発生検査は、媒精後72時間目の卵割率および8細胞期以上胚率、8日目の胚盤胞期以上胚率、10日目の脱出胚盤胞率について比較検討した。

2) 試験2 (図2)

次に体外受精で胚生産効率の悪い精液(不良精液1種類:黒毛和種)における両区の体外受精培地にグルコースを添加し受精、胚発生に及ぼす影響について検討した。精子処理法はImaiらの方法⁵⁾により90%パーコールにて生存精子を回収し、精子洗浄液で1回遠心洗浄、精子濃度を300万/mlに調整後、
 5mMCaf/5IU/ml Hep(G-)培地 (Caf(G-)区)、
 5mMCaf/5IU/ml Hep(G+)培地 (Caf(G+)区)、
 5mMHT/5IU/ml Hep(G-)培地 (HT(G-)区)、
 5mMHT/5IU/ml Hep(G+)培地 (HT(G+)区)
 で媒精を各々6時間行った。

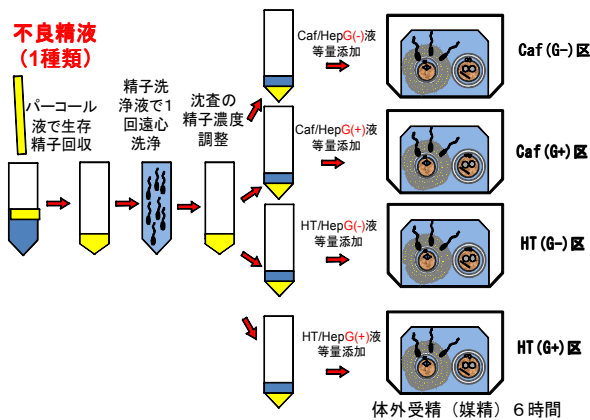


図2. 胚生産効率の悪い精液におけるG(13.9mM)添加の検討

なお、成熟培養方法は、5%CS加TCM199培地にFSH(0.02AU/ml)、Estradiol-β(E₂:1μg/ml)、ピルビン酸(0.2mM)、EGF(10ng/ml)、システアミン(100μM)、シスチン(200μM)を添加した堀らの方法⁶⁾で20~22時間行い、発生培養は5%CS加CR1aa培地で10日間行った。検査は、試験1と同じ方法で行い4区を比較検討した。

3) 試験3 (図3)

試験2の不良精液において胚発生効率をさらに向上させるために、精子洗浄方法および複合処理方法について検討した。同様に生存精子を回収後、精子洗浄液にHTを10mM添加し、2区の体外受精培地、5mMHT/5IU/mlHep(G+)培地 (HT+HT(G+)区)、およびHTとCafを同時に混ぜる5mMHT/5mMCaf/5IU/mlHep(G+)培地 (HT+HT/Caf(G+)区)で同様に媒精を各々6時間行った。

なお、成熟培養は試験2の成熟培養法で20~22時間行い、発生培養は5%CS加CR1aa培地で10日間行った。検査項目は、媒精後72時間目の卵割率、8細胞期以上胚率、8日目の胚盤胞期以上胚率、10日目の脱出胚盤胞率で実施した。すべての試験における気相は、38.5°C、5%CO₂ in airで行った。

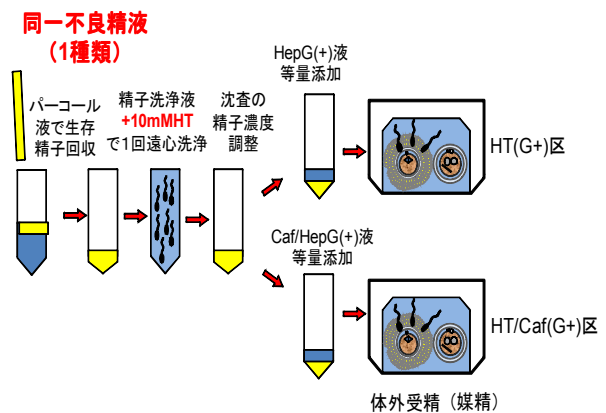


図3. 胚生産効率の悪い精液における検討(精子処理とCafの影響)

3. 統計処理

実験1の受精および胚発生検査成績は、スチューデントのt検定で、実験2および3は、階二乗検定もしくはイエーツの補正、フィッシャーの直接確率検定で行った。

III 結果

1. 試験1

受精検査成績(表1)では、供試卵に対する精子侵入率、単精子侵入率では、両区に有意差はなかった。しかし、多精子侵入率では、対照区22.2%に比べ、試験区11.1%が有意に低い値を示した。胚発生検査成績(表2)では、卵割率、8細胞期以上胚率は、対照区が有意に高かったが、移植可能な胚盤胞期以上胚率および脱出胚盤胞率は、有意に試験区が高かった。また、18種類の精液で胚盤胞期以上の胚が発生しなかったのは、対照区、試験区各々、2、1種類であった。

個別成績(図4)では、B1からB13までは黒毛和種、H1~H5まではホルスタイン種の精液で、上から単精子侵入率、多精子侵入率、胚盤胞期以上胚率を示しており、単精子侵入率は個別に見てもほぼ同様の値を示しているが、多精子侵入率は、対照区で20%以上から60%台までが10個体と多くみられる。試験区では、4個体しか認めなかった。胚盤胞期以上胚率では、両区とも全く発生しなかったのはB3種雄牛、対照区で発生しなかったのはB8種雄牛で、対照区で40%以上発生したのはB10種雄牛1種雄牛のみで、試験区では、11種雄牛に及んでいる。

表1. 受精検査成績

区分	供試卵数	精子侵入率(%)	単精子侵入率(%)	多精子侵入率(%)
対照区	612	75.4 ± 29.2 ^a	51.3 ± 23.4 ^b	22.2 ± 16.9 ^c
試験区	615	69.4 ± 29.7 ^a	58.1 ± 22.8 ^b	11.1 ± 9.6 ^d

注) 精液 18 種類の平均±標準偏差、同列異符号間に有意差あり (p<0.001)

表2. 胚発生検査成績

区分	供試卵数	卵割率(%)	8細胞期以上胚率(%)	胚盤胞期以上胚率(%)	脱出胚盤胞率(%)
対照区	1275	65.1 ± 26.0 ^a	46.6 ± 20.2 ^a	24.1 ± 11.2 ^c	11.2 ± 7.1 ^c
試験区	1289	61.7 ± 26.1 ^b	42.6 ± 18.2 ^b	38.6 ± 17.2 ^d	22.2 ± 12.6 ^d

注) 精液 18 種類の平均±標準偏差、同列異符号間に有意差あり (a vs b:p<0.05, c vs d:p<0.001)

2. 試験2

受精検査成績 (表3) では、精子侵入率および単精子侵入率では、Caf (G+) 区および HT (G+) 区が Caf (G-) 区に比べ有意に高かった。胚発生検査成績 (表4) では、HT (G+) 区は、全ての項目において、他区に比べ有意に高かった。しかし、HT (G+) 区の胚盤胞期以上胚率は、28.3%と低率であった。

3. 試験3

HT+HT (G+) 区は HT+HT/Caf (G+) 区に比べ発生成績のすべての項目で有意に高い値を示し、HT+HT (G+) 区の胚盤胞期以上胚率は、53.9%に達した (表5)。

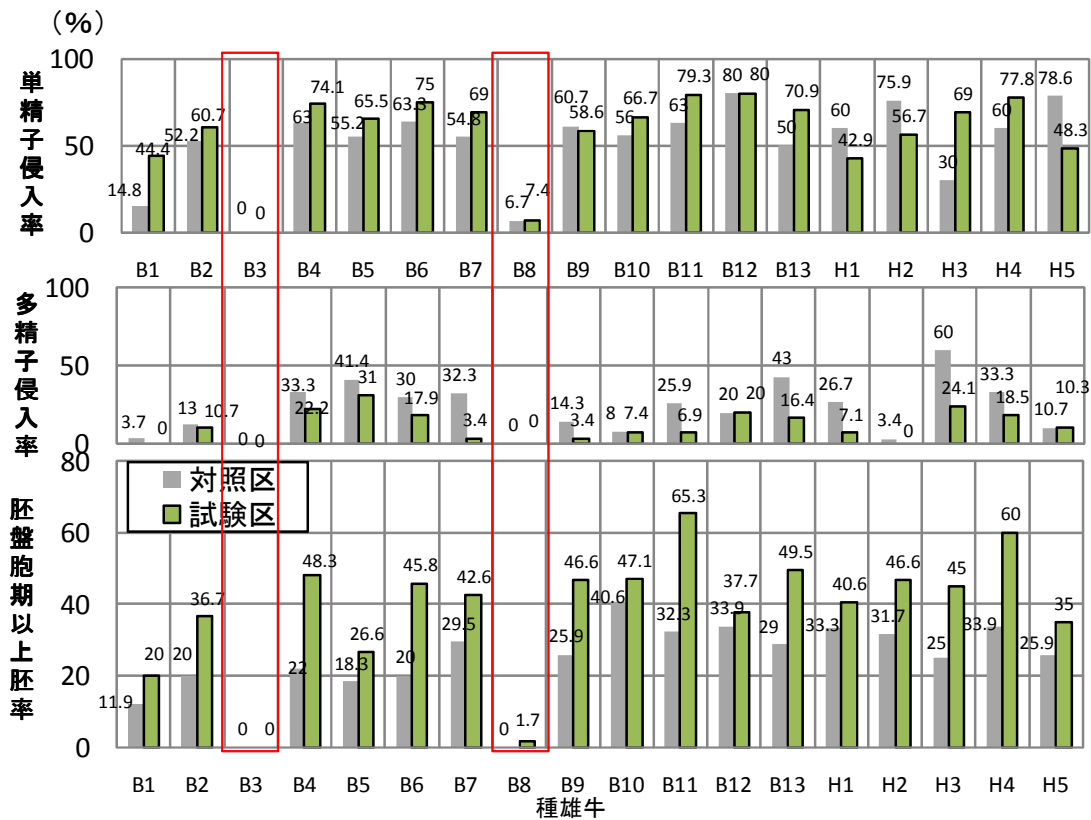


図4. 個別成績(18種類)

表 3 受精検査成績

試験区分	供試卵数	精子侵入率		単精子侵入率		多精子侵入率	
		卵数	(%)	卵数	(%)	卵数	(%)
Caf(G-)	41	12	(29.3) ^a	9	(22.0) ^c	3	(7.3)
Caf(G+)	45	24	(53.3) ^b	21	(46.7) ^d	3	(6.7)
HT(G-)	45	21	(46.7) ^{ab}	17	(37.8) ^{cd}	4	(8.9)
HT(G+)	45	28	(62.2) ^b	24	(53.3) ^d	4	(8.9)

注1) 試験回数: 3回、注2) 同列異符号間に有意差あり (p<0.05 または p<0.01)

表 4 胚発生検査成績

試験区分	供試卵数	卵割率		8細胞期以上胚率		胚盤胞期以上胚率		脱出胚盤胞率	
		胚数	(%)	胚数	(%)	胚数	(%)	胚数	(%)
Caf(G-)	60	14	(23.3) ^a	2	(3.3) ^d	2	(3.3) ^g	1	(1.7) ⁱ
Caf(G+)	60	24	(40.0) ^b	11	(18.3) ^e	5	(8.3) ^g	2	(3.3) ⁱ
HT(G-)	60	22	(36.7) ^{ab}	11	(18.3) ^e	6	(10.0) ^g	2	(3.3) ⁱ
HT(G+)	60	39	(65.0) ^c	24	(40.0) ^f	17	(28.3) ^h	8	(13.3) ^j

注2) 試験回数: 3回、注2) 同列異符号間に有意差あり (p<0.05 または p<0.01)

表 5 胚発生検査成績

試験区分	供試	卵割率		8細胞期以上胚率		胚盤胞期以上胚率		脱出胚盤胞率	
	卵数	胚数	(%)	胚数	(%)	胚数	(%)	胚数	(%)
HT+HT (G+)	60	41	(68.3) ^a	39	(65.0) ^c	32	(53.3) ^e	22	(36.7) ^g
HT+HT/Caf (G+)	53	22	(41.5) ^b	16	(30.2) ^d	6	(11.3) ^f	3	(5.7) ^h

注1) 試験回数：3回、注2) 同列異符号間に有意差あり(p<0.01)

IV まとめおよび考察

Hori ら¹⁾の報告したHT/Hep法でCaf/Hep法と比較したのは、黒毛和種の凍結精液1種類を用いて行っていたことから、今回、汎用性、胚生産効率を18種類の精液で検証した。その結果、すべての精液で効果的であるとは言えなかったが、Caf/Hep法よりHT/Hep法の方が、汎用性、および胚生産効率が高く、不良精液では、遠心洗浄時からHTを添加し、受精培地にグルコース(13.9mM)を添加することで胚生産効率が有意に上昇することが示唆された。丹羽ら⁷⁾は、Caf/Hep法ではグルコース(13.9mM)添加の有無にかかわらず種雄牛(11頭)間での変動が小さくかつ高い受精率が得られたことを報告していることから、Horiら¹⁾の報告では、精子洗浄液および受精培地の基礎培地は、BrackettとOliphant⁸⁾のdefined mediumからアルブミンとグルコースを除去した培地(m-B0液)を使用しており、HT/Hep法でのグルコースの添加の有無について試験を行っていなかった。しかし、Parrishら⁹⁾およびNiwaら⁷⁾報告では、ウシでは体外受精においてヘパリン存在下でグルコースの添加は抑制効果があること、また、Niwaら⁷⁾の報告では、カフェイン存在下でグルコースの添加の有無により精子侵入率に統計的有意差が無かったこと、さらに、Williamsら¹⁰⁾は、人の精子では、グルコースが運動性、受精能獲得を支持することを報告している。このことから、ウシの精子の中にもグルコースが必要な精子がいるのではないかと考えグルコース添加試験を行った。不良精液でのグルコース添加効果の作用機序については、今回の受精培地の基礎培地(m-B0液)には、ピルビン酸しかエネルギー源が含まれておらず、エネルギー源としてグルコースが関与していると考えられる。

また、Horiら¹⁾のHT/Hep法は、精子洗浄液からHTを添加しているが、精子濃度を同じ条件にすることから、試験2では、精子洗浄液にHTを添加しなかった。しかし、試験3でHT+HT(G+)区が胚盤胞期以上胚の発生率が高率であったことから、試験2のHT(G+)区は、精子洗浄液にHTを添加しなかったことが他区に比べ有意差はあるものの低率な結果になったと考える。

さらに、今回の成績では単精子侵入率は、種雄牛間で変動があり、平均で50%台であることから、十分な媒精方法とは言えず、今後、更に汎用性・胚生産効率の高い体外受精法を検討する必要がある。しかし、汎用性、胚生産効率についての成績を公表し、広く活用することは有意義なことであり、今後、全国レベルでの異なる媒精方法の公表により、ウシの体外受精技術の効率的な実用化の道がさらに開けることを期待する。

V 謝辞

本試験の実験にあたり、卵巣の採材にご協力いただいた金沢市食肉公社および同食肉衛生検査所の職員の方々に御礼申し上げます。

VI 引用文献

- Hori N., *et al.* (1997) Effect of hypotaurine in fertilization medium on fertilization of in vitro matured bovine oocytes and their subsequent development. *J Reprod Dev.*, 43(6):j33-40
- 家畜人工授精講習会テキスト(家畜体外受精卵移植編). (1993) 社団法人日本家畜人工授精師協会発行:93-94
- Hamano., *et al.* (1993) In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39:703-712
- 家畜人工授精講習会テキスト(家畜体外受精卵移植編). (1993) 社団法人日本家畜人工授精師協会発行:94-104
- Imai K., *et al.* (2006) The efficiency of embryo production by Ovum Pick-Up and in vitro fertilization in cattle. *J Reprod Dev.*, 52, Suppl. S19-26
- 堀ら(2010) 成熟培地への還元剤および成長因子の添加がウシ卵子の体外成熟、受精、胚発生に及ぼす影響. 石川県畜産総合センター研究報告:42:12-16
- Niwa K., *et al.* (1992) Effect of glucose in medium with caffeine and/or heparin on in-vitro penetration of bovine oocytes matured in culture. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I.*, Hague, Abstr. 194(3pages)
- Brackett BG., *et al.* (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12:260-274
- Parrish J. J., *et al.* (1998) Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* 41:683-699
- Williams A. C., *et al.* (2001) The role of glucose in supporting and capacitation in Human Spermatozoa. *J Andro.* 22(4):680-695

育種価評価に基づく産肉能力改良推移の解析

中村 勝

石川県畜産総合センター能登畜産センター

Analysis of the Genetic Trend of Carcass Traits on Japanese Black Cattle based on the Breeding Value Evaluation Result

Masaru Nakamura

キーワード：育種価、遺伝率、近交度、改良方針

要 約

石川県育種価評価結果を基に黒毛和種の産肉能力の改良推移を解析した。脂肪交雑基準値の観測値（枝肉成績）や育種価（遺伝的能力）は順調に向上してきたが、「枝肉重量」や「ロース芯面積」は上昇傾向にあるものの、改良の余地が残されている。また、遺伝率では脂肪交雑基準値・枝肉重量・ロース芯面積の順で高く推移し、改良目標の高いものからの序列と一致した。改良の進展に伴い懸念される近交度の上昇は認めなかった。

I 緒 論

県内肉用牛生産基盤を強化するため効率的に受精卵供給事業を遂行する必要があり、明確な改良方針の作成と適正な供卵牛の能力評価が求められる。石川県では1993年度より2009年度まで通算21回の育種価評価を行ってきた。そこで、累積された結果から枝肉成績の推移と産肉能力の遺伝的特性を解析し改良の進展と今後の方向性の把握することを目的に解析を行った。

II 材料及び方法

1. データの内訳

1993年度から2009年度までの「石川県育種価評価結果」を基に枝肉成績や育種価等の推移を集計した。

育種価は後代牛の枝肉成績を基に種雄牛や繁殖雌牛といった親世代の遺伝的能力を推定するもので、年度ごとの枝肉データ件数（類型）の推移を（表1）に示した。

また、年度内に複数回評価したものは最終評価を集計対象とした。

表1. 枝肉データおよび評価頭数の推移

年 度	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	
枝肉件数	364	489	629	1,001	1,269	1,546	1,764	1,922	
2001	2,002	2,003	2,004	2,005	2,006	2,007	2,008	2,009	
	2,297	2,598	2,898	3,246	3,690	4,013	4,306	4,636	5,033

2. 評価対象形質

改良推移を把握するため以下の項目を集計・評価した。

1) 観測値（実際に計測された各枝肉成績）

A. 基本統計量：形質ごとに平均と標準偏差を求めた。（表2）

表2. 各形質の基本統計量

	単位	平均	標準偏差	最大値	最小値
枝 肉 重 量	kg	405.9	54.4	621.2	209.0
ロース芯面積	cm ²	49.6	7.5	89.0	26.0
バラの厚さ	cm	7.2	0.9	11.2	4.0
皮下脂肪厚	cm	2.4	0.8	7.0	0.1
歩留基準値	%	73.4	1.2	77.8	68.9
脂肪交雑基準値	Unit	1.4	0.7	5.0	0.3
屠殺時月齢	月	29.4	2.7	48.6	21.5

B. 歩留及び肉質等級の分布：各等級別の件数と割合を求めた。

C. 脂肪交雑の分布：BMSNo.と交雑基準値を対比させながら件数と割合を求めた。

D. 産地別集計：肥育素牛の生産地を県内・県外にわけて性別ごとに求めた。

E. 年次別集計：過去6年間の成績を性別ごとに求めた。

2) 遺伝的パラメーター（遺伝率）

枝肉記録は遺伝子によるものと環境効果によるものとの産物であるため、枝肉成績の大小もしくは優劣からどれだけ正確に遺伝子に由来しているかを判定する目安を求めることが必要であり、全分散に占める遺伝分散の割合を遺伝率¹⁾として推定した。

3) 育種価（遺伝的能力）

累積された5,033件の枝肉データを用い、全国和牛登録協会から提供された「アニマルモデルBLUP法」によるプログラムにより解析し、以下の項目を集計・評価した。

A. 評価頭数：種雄牛と繁殖雌牛（評価全体、供用中、地域内）の評価頭数を求めた。

B. 育種価の分布：各形質の育種価の割合を等間隔のレンジ（範囲）ごとに求めた。

C. 年次内育種価の推移：各形質の育種価を繁殖雌牛の生年ごとに求めた。

D. 次内近交係数の推移：近交係数を繁殖雌牛の生年ごとに求めた。

Ⅲ 結果及び考察

1. 観測値の解析

「能登牛」の基準は歩留等級がAおよびB、肉質等級が3以上のものであり、脂肪交雑ではBMSNo.が3以上のものが等級3として扱われ脂肪交雑の分布(表4)からみた限りでは大部分が含まれた。しかし、歩留および肉質等級の分布(表3)の格付結果をみると、脂肪交雑以外の肉質形質(肉の締まり・きめ等)の低いものや、歩留等級補正のデータが含まれていることから2等級以下がかなりの割合を占めた。

表3. 歩留・肉質等級の分布

	1	2	3	4	5	計
A	2	523	1,727	1,352	678	4,282
去勢	0	10	34	27	14	85
B	1	174	360	172	39	746
去勢	0	3.5	7.2	3.4	0.8	14.8
C	0	4	1	0	0	5
去勢	0	0.10	0	0	0	0.10
計	3	701	2,088	1,524	717	5,033
	0.1	13.9	41.5	30.3	14.2	100.0

単位 頭：上段
%：下段

表4. 脂肪交雑 (BMS) の分布

BMS No.	1	2	3	4	5	6
交雑基準値	0	0+	1-	1	1+	2-
頭数	0	154	973	1,224	833	548
割合(%)	0	3.1	19.3	24.3	16.6	10.9
	7	8	9	10	11	12
	2	2+	3-	3	4	5
	456	378	262	142	53	10
	9.1	7.5	5.2	2.8	1.1	0.2

産地別集計では、頭数の内訳は雌雄ともに県内産が70%強を占め、出荷月齢は県内産が約1ヶ月早い傾向にあるが、肉質では各形質ともに大差はなかった。(表5)

表5. 産地別集計

	頭数	月齢	枝肉重量	ロース芯面積	バラ厚	皮下脂肪厚	歩留基準	脂肪交雑基準
	月	kg	cm ²	cm	cm	%	Unit	
全体	合計 5,033	29.45	405.78	49.65	7.16	2.41	73.39	1.42
	県内 3,702	29.19	404.51	49.79	7.13	2.35	73.45	1.42
	県外 1,331	30.16	409.31	49.27	7.22	2.56	73.20	1.42
去勢	合計 1,957	30.17	374.97	48.52	7.00	2.70	73.26	1.37
雌	合計 1,352	29.90	370.50	48.48	6.95	2.64	73.33	1.38
	県内 605	30.79	384.96	48.60	7.09	2.82	73.09	1.35
	県外 3,076	28.99	425.38	50.37	7.26	2.22	73.47	1.44
去勢	合計 2,350	28.79	424.08	50.54	7.24	2.19	73.53	1.43
	県内 726	29.64	429.60	49.83	7.32	2.34	73.30	1.48
	県外							

年次別集計では過去6年間の枝肉成績の改善が把握でき、主要な形質について、枝肉重量では・ロース芯面積・脂肪交雑基準値といった主要な形質では、それぞれ10%強の上昇がみられた。(表6)

表6. 年次別集計

	頭数	月齢	枝肉重量	ロース芯面積	バラの厚さ	皮下脂肪厚	歩留基準値	脂肪交雑基準
	月	kg	cm ²	cm	cm	%	Unit	
2004年	合計 348	29.19	389.68	49.99	7.08	2.29	73.69	1.45
	雌 132	29.95	366.30	48.47	7.04	2.62	73.47	1.49
	去勢 216	28.72	403.97	50.92	7.09	2.09	73.82	1.43
2005年	合計 390	29.31	387.95	49.57	7.06	2.40	73.53	1.51
	雌 180	29.91	360.72	48.03	6.86	2.61	73.35	1.47
	去勢 210	28.79	411.29	50.90	7.23	2.22	73.69	1.55
2006年	合計 354	29.51	401.16	49.82	7.03	2.62	73.20	1.38
	雌 169	30.10	372.50	47.82	6.96	2.89	73.00	1.36
	去勢 185	28.97	427.35	51.64	7.10	2.37	73.37	1.41
2007年	合計 303	29.55	411.98	52.11	7.11	2.71	73.33	1.65
	雌 155	30.02	387.97	50.73	7.09	2.84	73.32	1.62
	去勢 148	29.05	437.11	53.56	7.14	2.58	73.34	1.68
2008年	合計 343	28.99	430.49	54.36	7.44	2.59	73.70	1.69
	雌 134	29.31	397.78	52.71	7.36	2.94	73.53	1.62
	去勢 209	28.79	451.46	55.41	7.50	2.37	73.81	1.73
2009年	合計 397	29.37	439.05	56.44	7.70	2.68	73.95	1.65
	雌 162	29.88	419.04	56.43	7.77	3.03	73.92	1.57
	去勢 235	29.02	452.85	56.45	7.65	2.44	73.97	1.71

2. 遺伝的パラメーター (遺伝率) の解析

過去6年間の主要3形質の遺伝率の推移は(図1)の様に脂肪交雑基準値・枝肉重量・ロース芯面積の順で高く推移しており、改良目標設定の高いものからの序列であった。

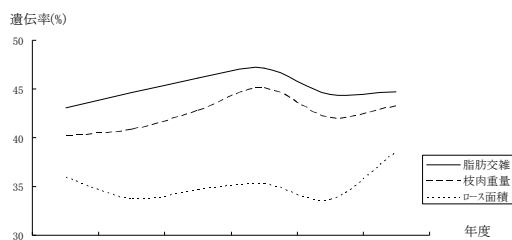


図1. 主要3形質の遺伝率の推移

遺伝率の最も高い「脂肪交雑基準値」は、以前より改良の最重点形質であり、観測値も前述の(表6)のように順調に推移してきた。

「枝肉重量」の遺伝率は近年になって高く推移するようになってきた。また主要形質のうち、最も遺伝率の低い「ロース芯面積」は上昇傾向にあるが「脂肪交雑基準値」に比べてゆるやかであり、改良の余地が残っている。

一般的に改良が進むと各形質の遺伝率は高まるが、強い選抜がなされて遺伝的に斉一性のとれた集団では環境の影響を強く受けることになり、逆に遺伝率は低くなる場合がある。また、遺伝率が高いことは必ずしも良成績とはいえず、近交度が進んだ閉鎖群における育種では遺伝率は高くても近交による弊害で成績が劣化する例もある。²⁾しかしながら、石川県の黒毛和種集団の遺伝的特性には近交係数の推移(後述)からそのような傾向は認められない。

3. 育種価（遺伝的能力）の解析

種雄牛の評価頭数は約 5,000 件の枝肉データで 751 頭が評価され、他県と比較してかなり多い数字である。これは、石川県は改良のために固有の種雄牛を持たず、県外からの素畜や家畜改良事業団の精液導入によるものであり、過去に多種多様な血統が導入された経緯によるものと思う。反面、繁殖雌牛では相互の血縁が少ないことから評価される頭数は少ない傾向にある。

繁殖雌牛の内訳では「全繁殖雌牛」（評価全体）とは今回評価されたすべての雌牛を対象としている。そのうち過去 3 ヶ年（今回は 2007 年 2 月以降）に分娩記録のあるものを、「供用中繁殖雌牛」（供用中）とし、さらに石川県内で飼養されているものを「地域内供用中繁殖雌牛」（地域内）として集計した。なお、実務面では「ランク付け」をしているが、その場合の基本統計量は「地域内供用中繁殖雌牛」を基準にしている。

また、地域内飼養頭数に対する地域内供用中繁殖雌牛の割合を「（育種価）判明率」といい、石川県は以前より高い数字を示している。これは、育種価解析時になるべく直近のデータを収集する体系が早くから整備されてきた成果であったと思う。（表 7）

表 7. 育種価評価頭数（他県データを含む）

県名	実施時期	枝肉件数	育種価評価頭数				判明率 (%)
			種雄牛	評価全体	供用中	地域内	
高知	2009.1	6,169	212	4,838	817	812	66.4
岐阜	2009.4	85,684	2,060	135,870	37,517	5,834	65.0
石川	2010.3	5,033	751	6,326	1,088	407	64.6
鹿児島	2009.3	451,261	1,645	256,840	91,181	86,321	63.5
鳥取	2009.3	19,757	1,200	28,506	7,612	2,382	61.3
秋田	2009.4	26,542	1,045	26,617	5,815	4,757	61.1
広島	2009.2	23,472	749	20,903	3,855	3,108	60.5
山形	2009.2	76,500	1,949	138,950	37,257	3,323	60.0
新潟	2009.2	13,751	1,008	29,539	4,772	850	59.2
岡山	2009.1	18,902	782	16,127	3,772	3,190	59.2
島根	2008.12	43,710	735	33,518	7,669	6,497	59.1
山口	2008.12	16,230	629	14,085	3,393	3,046	58.5
佐賀	2009.4	36,100	872	33,409	8,045	6,306	58.3
長崎	2009.2	84,452	1,087	78,101	21,047	17,950	58.2
山梨	2009.4	2,808	432	7,404	1,858	296	57.5
福井	2009.3	1,533	239	1,778	324	223	56.7
愛媛	2008.12	5,983	422	6,083	1,062	796	55.0
愛知	2009.3	5,585	479	5,436	1,273	1,000	53.7
兵庫	2009.1	51,237	774	41,173	9,330	8,619	52.8

※石川県の判明率は2008年度の値

育種価の分布では、遺伝的特性により「標準正規分布」に対する「ひずみ（歪度）」や「とがり（尖度）」をみることが出来る。

脂肪交雑基準値では「評価全体」では“0.00”付近を中心にした強いとがり（尖度:2.92）の分布である、「供用中」や「地域内」の若い世代は中心が“0.53”付近へずれて、相対的に改良が進展してきたことを意味している。反面、ゆるやかな分布（歪度:0.87,0.78）であり、遺伝的にバラツキのある集団といえる。（図 2）

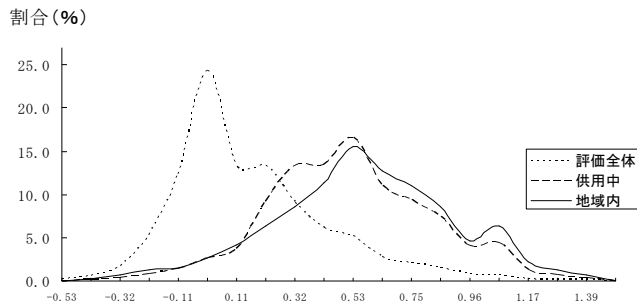


図 2. 脂肪交雑基準値の育種価の分布

この傾向は他の形質にもあてはまるが、枝肉重量は「評価全体」「供用中」「地域内」いずれも正規分布に近く必ずしも若い世代が遺伝的に優れているとはいえず、比較的古い世代の中に優良な個体がいることを示唆している。（図 3）

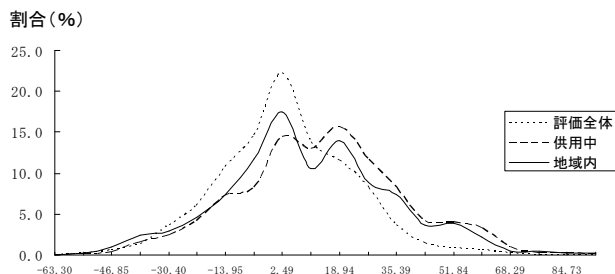


図 3. 枝肉重量の育種価の分布

年次内育種価の推移は、「遺伝的趨勢」とよばれ改良の経緯がわかりやすく示されている。前掲の観測値推移や育種価分布とともに脂肪交雑基準値は順調に改良が進展してきたことがグラフからわかる。反面、脂肪交雑基準値偏重の改良方針には問題点があるとの意見も聞かれる。（図 4）

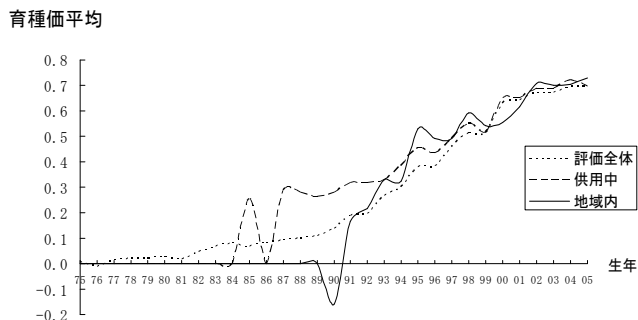


図 4. 脂肪交雑基準値育種価の推移

反面、枝肉重量とロース芯面積には、このような顕著な傾向はみられておらず、肥育技術向上との相乗効果により近年は良好な枝肉成績であり、遺伝的解析からは依然として改良の余地が残っている。（図 5 及び図 6）

育種価平均

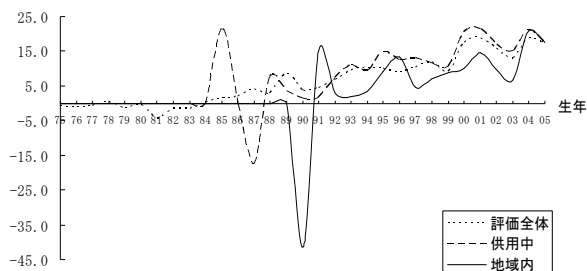


図5. 枝肉重量準値育種価の推移

育種価平均

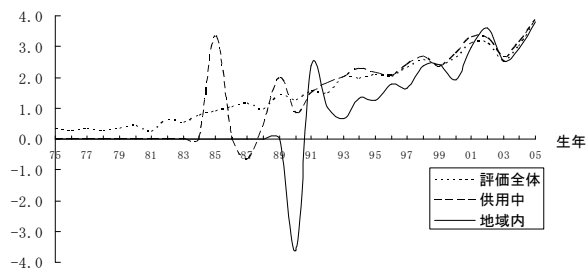


図6. ロース芯面積育種価の推移

改良の進展に伴い最も危惧されるのは「近交度」の上昇といわれ、²⁾ 極端な近親交配は当然避けるべきであり、さらに育種価による強い選抜が繰り返されれば、必然的に近交係数は高まる可能性があり留意が必要である。しかしながら、現時点の石川県では懸案されるほど高い値は認められない。(図7)

近交係数平均

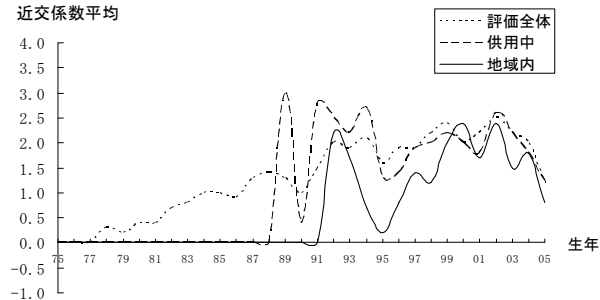


図7. 近交係数の推移

供卵牛の個々の遺伝的能力を評価し、適切な交配を行うとともに繁殖雌牛集団の遺伝的特性を明確に捉えることは、改良速度を高め受精卵の高位生産につながってくる。

石川県では過去に「脂肪交雑基準値」を中心とした改良目標を設定し、繁殖雌牛の遺伝的特性を十分に考慮せず様々な特性の「種雄牛」の血統が導入されてきた。今後は重点改良形質を定めた改良方針の斉一性が必要である。また、供卵牛は「産肉能力」と同時に「受精卵生産能力」の改良も重要であり、複数形質を同時に改良するための選抜指数法³⁾を確立し供卵牛の選抜・淘汰のための基準策定が必要となってくる。このことは、実際に選抜し適正交配により生産した受精卵産子の市場成績を解析することで、より精度の向上が期待でき、計画・実践・検証の循環システムを構築することが、改良速度と高位生産に寄与できるものと考えられる。

今後は育種価評価を通じて必要な情報を順次検討し、より効果的な改良方針の確立に努めていきたい。

IV 引用文献

1. 養賢堂 畜産大事典. (1978). 210-213
2. 佐藤正寛 農林水産省畜産試験場育種部計量遺伝育種研究室編. 最良線形不偏予測の話. (1997). 106-109
3. 社団法人 全国和牛登録協会. これからの和牛の育種と改良 (2007). 60-62

V Summary

The improvement transition of the carcass trait of Japanese Black Cattle was analyzed based on the Ishikawa Prefecture breeding value evaluation result. The effort of the improvement is more necessary though "Carcass Weight" and "Rib-eye area" are in uptrend though the observation (dressed carcass result) of "Beef Marbling Score" and the breeding value (inherent capacity) have changed well. The heritability rose from the one with a high improvement target sequentially in order of "Beef Marbling Score" "Carcass Weight", and "Rib-eye area". When the improvement advanced, the rise of the inbreeding coefficient that worried was not seen.