石川畜試研報 Bull.Ishikawa Pref.List. Ress.Center

> Bulletin of the Ishikawa Prefectural.Agriculture And Forestry Research Center Livestock Experiment Station No. 4 6 December-2016

石川県農林総合研究センター 畜産試験場研究報告

第46号

平成28年12月

石川県農林総合研究センター 畜産試験場

石川県羽咋郡宝達志水町坪山

Ishikawa Prefectural. Agriculture And Forestry Research Center
Livestock Experiment Station
Hodatsushimizu, Ishikawa, Japan

石川県農林総合研究センター畜産試験場研究報告

第46号

平成28年12月

目 次

1.	黒毛和種における連続的な生体内卵子吸引(OPU)による		
	体外受精胚生産の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		1
2.	黒毛和種肥育前中期における高栄養が発育等に及ぼす影響・・・・・	 1	1

黒毛和種における連続的な生体内卵子吸引(OPU)による 体外受精胚生産の検討

河合愛美、堀 登

Examination of in-vitro Embryo Production by Repeated Transvaginal Ovum Pick-Up(OPU) in Japanese Black Cattle

Megumi Kawai, Noboru Hori

キーワード:連続的な生体内卵子吸引、体外受精、黒毛和種

要 約

黒毛和種において、安定的に継続して体外受精(IVF)胚を生産するための最適な生体内卵子吸引(OPU)プログラムは確立されておらず、また、連続してOPUを行った場合の供卵牛の卵巣機能や繁殖性への影響に関する報告は少ない。

そこで、黒毛和種において連続して OPU を行い、ホルモン剤の投与による前処置の有無および OPU 実施回数が OPU 成績 (OPU 実施時の総卵胞数、回収卵子数、培養卵子数) および胚生産成績 (卵割数、卵割率、胚盤胞数、胚盤胞数、胚盤胞発生率、凍結可能胚 (A・B ランク胚) 数、凍結可能胚率) に及ぼす影響を検討した。また、卵胞数の指標として有用である血中抗ミューラー管ホルモン濃度 (AMH 値) を測定し、連続的な OPU が供卵牛の卵巣機能に及ぼす影響を調査した。

OPU 成績および胚生産成績は、H 区が N 区よりも、前期が後期よりも優れていた。さらに、OPU 実施回数別の比較では、前期においては、H 区では、回収卵子数、培養卵子数および卵割数が 3 回目に比べ 6 回目で有意に低下したが、N 区では、いずれの項目も各回数で差は認められなかった。また、後期においては、両区ともいずれの項目も各回数で差は認められなかった。一方、AMH 値は、総卵胞数との間に高い正の相関が認められ、OPU 実施前(H 区はホルモン処置前)の AMH 値は、A 群、B 群ともに前期に比べ後期で有意に低下した。

以上より、ホルモン剤の投与による前処置は無処置に比べ OPU・IVF による体外受精胚の生産効率を高める可能性があることが示唆された。また、6回連続して OPU を行った後、2か月の間隔を空けると、OPU 成績および胚生産成績が低下するとともに、AMH 値が低下することが明らかとなった。

I 緒論

生体内卵子吸引 (OPU) と体外受精 (IVF) による体外受精胚生産は、供卵牛の性周期に関わらず週 1~2 回の頻度で卵子を採取でき ^{1,2)}、妊娠初期の牛や繁殖障害牛からも卵子が採取できる ^{2,3)}等、過剰排卵処置による体内受精胚生産に比べ大きな利点を有する技術である。しかし、連続して OPU を行った場合、実施

回数の増加に伴い回収卵子数や正常卵子数、発生する 胚盤胞数が減少する傾向にあることが報告されている ^{4,5)}。また、OPU・IVFにおいてより効率的に体外胚を 生産するためには、OPUにより得られる卵子の数およ び品質の向上が課題である。そのため、OPU実施前に 卵胞刺激ホルモン(FSH)や性腺刺激ホルモン放出ホル モン(GnRH)、馬絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG)を投 与し、回収卵子数の増加や卵子の品質向上を図るための様々な試験が実施されている 5~8)。しかし、黒毛和種において安定的に継続して体外受精胚を生産するための最適な OPU プログラムは確立されていない。また、連続して OPU を行った場合の供卵牛の卵巣機能や繁殖性への影響に関する報告は少ない。

近年、卵巣内の発育卵胞の顆粒膜細胞から分泌される抗ミューラー管ホルモン (AMH) が卵胞数の指標として有用であることが報告されている 9~11)。我々もこれまでに、体内受精胚の生産において、供卵牛の採卵前の血中 AMH 濃度 (AMH 値) が過剰排卵処置後の推定 黄体数や回収胚数、正常胚数を反映しており、供卵牛の卵巣の反応性の指標となり得ることを報告した 12)。

今回、黒毛和種において連続して OPU を行い、ホルモン剤の投与による前処置の有無および OPU 実施回数が体外受精胚の生産に及ぼす影響を検討するとともに、AMH 値を指標として供卵牛の卵巣機能に及ぼす影響を調査した。

Ⅱ 材料および方法

1. 供試牛および試験区分

当場で飼養している黒毛和種供卵牛6頭(平均年齢7歳、平均産次3.3産)を供試した。供試牛は、年齢および産次に偏りが出ないようにA群(n=3)およびB群(n=3)の2群に区分し、無処置(N区)またはホルモン処置(H区)後に14日間隔で6回連続して0PUを行った(前期)。その後、2か月の間隔を空け両区を反転して再び6回連続して0PUを行った(後期、図1)。H区は、0PU実施4日(96時間)前にGnRH(酢酸フェルチレリン、コンセラール、ナガセ医薬品株式会社)100μgを投与した後、0PU実施2日(48時間)前にFSH(アントリンR、共立製薬株式会社)5AUを投与した(表1)。

2. OPU の方法

供試牛を枠場に保定、徐糞後、2%塩酸プロカインによる尾椎硬膜外麻酔またはパドリン 10ml 静脈注射後に OPU を行った。OPU は超音波画像診断装置(アロカ

社、IP-1233C) にコンベックス深触子(アロカ社、UHT-9106-7.5)を装着し、ディスポーザブル採卵針(ミサワ医科工業株式会社) および卵子吸引システム (クック社、吸引システム 5100) を用いて行った。OPU 実施時には、超音波画像診断装置により大卵胞(直径 8mm以上)、中卵胞(直径 5~7mm) および小卵胞(直径 5mm未満)の数を測定し、総卵胞数を算出した。

卵胞内卵子の吸引は 1%子牛血清および 10 単位/ml のヘパリン (ノボ・ヘパリン注 5 千単位/5mL 、持田製薬株式会社)を添加した乳酸リンゲル液 (ハルゼンV注射液、日本全薬工業株式会社)(以下、卵子回収液)を用いた。卵胞内卵子は吸引圧 110mmHg で卵胞液と共に吸引採取し、恒温槽 (FHK社、 VD-01)にて 30℃に保温した。採取した卵子は卵子回収液で洗浄した後、卵丘細胞の付着状況等によって次のとおり分類し、A~C ランクの卵子を体外受精に供試できる培養卵子とした。

A ランク: 卵丘細胞が3層以上で透明帯周囲に緊密に付着したもの

B ランク: 卵丘細胞が 2 層以下まはた透明帯周囲に 1/3 以上付着したもの

C ランク:裸化卵子または B ランクより卵丘細胞の付着が少ないもの

D ランク:卵丘細胞層が膨化または蜘蛛の巣状に変性したもの

Eランク:直径が明らかに小さい卵子 Fランク:変性卵子または透明帯のみ

3. IVF の方法

1) 成熟培養

前述の分類に基づき A~C ランクの卵子 (以下、培養卵子)を成熟培養に供した。成熟培養は、堀ら $^{13)}$ の方法により、5%新生仔牛血清 (NBS) 添加 TCM199 に FSH (0.02AU/ml)、Estradiol- β (E $_2$: 1 μ g/ml)、ピルビン酸 (0.2mM)、システアミン (100 μ M)、シスチン (200 μ M) および上皮成長因子 (EGF:10ng/ml)を添加した培地でを行った(38.5℃、5%CO $_2$ 、95%Air、湿度飽和、21~23 時間)。

2) 媒精

37℃温湯で融解した黒毛和種の凍結精液(2 種類)を IVF100 (機能性ペプチド研)で 2 回遠心 (2,000rpm、5 分間) 洗浄後、IVF100 により精子濃度 500 万個/ml に調整した。成熟培養した卵子を IVF100 で洗浄した後、先に準備した精子浮遊液のドロップ中に入れ、6 時間 媒精を行った (38.5℃、5%Co₂、95%in air、湿度飽和)。

3) 発生培養

Imai ら $^{14)}$ の方法に準じて 5%NBS 添加 CR1aa により発生培養を行った(38.5 \mathbb{C} 、 $5\%C0_2$ 、 $5\%0_2$ 、 $90\%N_2$ 、湿度飽和、9 日間)。

4. AMH 値の測定

N区の OPU 実施前 (N区 OPU 実施前)、H区の処置前 (H区処置前) と処置後 OPU 実施前 (H区 OPU 実施前) にヘパリン真空採血管により頸静脈より血液を採取し (表1)、遠心分離 (3,000rpm、30分間、4℃) を行い血漿を分離した。血漿は AMH 値の測定まで−25℃で保存した。保存血漿は室温で融解した後、AMH Gen II ELISA Kit (BECKMAN COULTER) を用いて AMH 値を測定した。

5. 調查項目

OPU 成績として、OPU 実施時の総卵胞数、直径別卵胞数、回収卵子数、および培養卵子数を調査した。IVF後の胚生産成績として、媒精開始 48 時間後の卵割数、卵割率 (卵割数/培養卵子数×100)、媒精日を 0 日目とし、7~9 日目の胚盤胞発生数、胚盤胞発生率 (胚盤胞発生率/培養卵子数×100)、および凍結可能胚(A・Bランク胚)数および凍結可能胚率 (凍結可能胚数/培養卵子数×100)を調査した。

また、AMH 値を指標とした供卵牛の卵巣機能に及ぼす影響については、OPU 実施時の総卵胞数、各群における期別の総卵胞数、実施回数別 AMH 値およびホルモン処置前後の AMH 値を調査した。

6. 統計処理

得られたデータについて、平均値の比較は、 Student's t-test または分散分析により、率(%) の値の比較は、カイ2乗検定またはアークサイン変換 した後分散分析により有意差検定を行い、危険率5% 未満を有意差ありとした。

Ⅲ結果

1. OPU・IVF 成績

1) N区とH区の比較

卵胞数、卵割数および卵割率は、両区の間に有意な差は認められなかった(表 2)。回収卵子数および培養卵子数は、それぞれ H 区が 13.9±8.1 個および 12.6±7.6 個、N 区が 9.2±5.3 個および 7.9±4.5 個であり、H 区が N 区に比べ有意に多かった(表 2、P<0.05)。胚盤胞発生数および凍結可能胚数は、それぞれ H 区が 6.3±4.7 個および 3.4±3.7 個、N 区が 2.9±2.7 個および 1.4±1.8 個であり、H 区が N 区に比べ有意に多かった(表 2、P<0.05)。発生率および凍結可能胚率は、それぞれ H 区が 50.3%および 26.7%、N 区が、36.1%および 17.2%であり、H 区が N 区に比べ有意に高い値を示した(表 2、P<0.05)。

また、直径別卵胞数の比較では、小卵胞数は両区の間に有意な差は認められなかったが、大卵胞数および中卵胞数は、それぞれ H 区が 4.2 ± 2.2 個および 12.3 ± 7.0 個、N 区が 2.4 ± 1.7 個および 9.3 ± 5.0 個であり、1.2 1.2

2) 前期と後期の比較

卵胞数、回収卵子数および培養卵子数は、それぞれ前期が 29.0±7.9 個、15.9±7.2 個および 13.9±6.9 個、後期が 17.5±6.5 個、7.3±3.9 個および 6.6±3.7 個であり。前期が後期に比べ有意に多かった(表 4、P<0.05)。卵割数、胚盤胞発生数および凍結可能胚数は、それぞれ前期が 10.5±5.4 個、6.6±4.9 個および 3.8 ±3.1 個、後期が 4.4±3.1 個、2.6±2.0 個および 0.9 ±1.1 個であり、前期が後期に比べ有意に多かった(表 4、P<0.05)。卵割率、胚盤胞発生率および凍結可能胚率のいずれも前期が後期に比べ有意に高い値を示した(表 4、P<0.05)。胚盤胞発生率は、前期が後期に比べ高い傾向が認められた(表 4、P=0.09)。

また、直径別卵胞数の比較では、大卵胞数は両区の

間に有意な差は認められなかったが、中卵胞数および小卵胞数は、それぞれ前期が 12.4 ± 7.2 個および 13.5 ±5.2 個、後期が 9.2 ± 4.6 個および 4.9 ± 3.6 個であり、前期が後期に比べ有意に多かった (表 5, P<0.05)。

3) OPU 実施回数別の比較

前期において H 区 (B 群) では、回収卵子数、培養卵子数および卵割数は 3 回目で最も多く、それぞれ 30.0 ± 5.6 個、 27.0 ± 7.5 個および 21.7 ± 6.7 個であったが、6 回目ではそれぞれ 15.0 ± 3.0 個、 14.0 ± 2.6 個および 9.3 ± 3.1 個と有意に低下した (表 6、P<0.05)。その他の 0 PU 成績および胚生産成績のいずれの項目も各回数で差は認められなかった (表 6)、N 区 (A 群)では、いずれの項目も各回数で差は認められなかった (表 7)。また、後期においては、両区ともいずれの項目も各回数で差は認められなかった (表 8, 9)。

2. AMH 値

1)総卵胞数とAMH値との関係

OPU 実施時の総卵胞数と OPU 実施前の AMH 値との間には有意な正の相関が認められた (r=0.75、P<0.01、図 2)。

2) 各群における期別の総卵胞数と AMH 値

前期および後期別に比較すると、OPU 実施時の総卵胞数は、A 群では前期 (N 区) が 23.3±4.9個、後期 (H 区) が 15.6±4.1個、B 群では、前期 (H 区) が 34.8 ±5.8個、後期 (N 区) が 19.4±7.8個であり、両群とも前期に比べ後期で有意に減少した (表 10、P<0.05)。OPU 実施前 (H 区は処置前) の AMH 値は、A 群では前期 (N 区) が 0.22±0.25ng/ml、後期 (H 区) が 0.07±0.10ng/ml、B 群では前期 (H 区) が 0.64±0.26ng/ml、後期 (N 区) が 0.19±0.09ng/ml であり、両群とも前期に比べ後期で有意に低下した (表 10、P<0.05)。

3) OPU 実施回数別の AMH 値測定区分間の比較

OPU 実施回数別の各測定区分 (N区 OPU 実施前、H区 処置前、H区 OPU 実施前)間に有意な差は認められず、また、それぞれの測定区分において、各回数間で差は認められなかった (図 3)。

4) H区におけるホルモン処置前後の AMH 値の変化

前期の H 区 (B 群) の AMH 値は、ホルモン処置前が 0.41 ± 0.21 ng/ml、処置後が 0.64 ± 0.26 ng/ml であり、処置前に比べ処置後に有意に増加した (P<0.05)が、後期の H 区 (A 群) では、ホルモン処置前後で AMH 値に 差は認められなかった (表 11)。

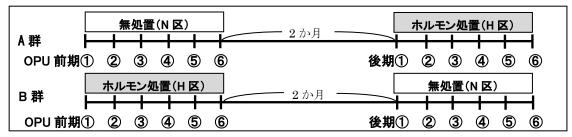


図1 OPU プログラム

表 1 ホルモン処置と採血区分(AMH 値測定区分)

区分	処置 採血	-4 日 (96 時間前)	一3 日	-2 日 (48 時間前)	一1 日	0日 (OPU 実施当日)
T []	処置	GnRH100μg (コンセラール 2ml)	١	FSH5AU (アントリン R)		OPU
H 区	採血	○ (H 区処置前)	1	_		○ (H 区 OPU 実施前)
N区	処置	_	_	_	_	OPU
N Z	採血	_	_	_	_	○ (N 区 0PU 実施前)

○印:採血実施

表 2 各区の OPU 成績および胚生産成績

区分	総卵胞数	回収 卵子数	培養 卵子数	卵割数 (卵割率)	胚盤胞発生数 (発生率)	凍結可能胚数 (凍結可能胚率)
H区	25.2 ± 10.9	13.9 \pm 8.1 ^a	12.6 \pm 7.6 ^a	9.0 ± 6.2	6. 3±4. 7 ^a	3. 4±3. 7 °a
(n=36)				(71.1%)	(50. 3%) °	(26. 7%) °
N区	21.4 ± 6.7	9.2±5.3 b	7.9 $\pm 4.5^{-6}$	5.9 ± 3.9	$2.9\pm 2.7^{\text{ b}}$	1.4±1.8 b
(n=36)				(75.1%)	(36. 1%) ^d	(17. 2%) ^d

- ・数値は平均値±標準偏差、同列異符号間に有意差あり a-b, c-d (P<0.05)
- ・卵割率=卵割数/培養卵子数×100、発生率=胚盤胞発生数/培養卵子数×100、
- ・凍結可能胚率=凍結可能胚数(A・Bランク胚数)/培養卵子数×100

表 3 各区の直径別卵胞数

区分	大卵胞	中卵胞	小卵胞
H区(n=36)	4.2±2.2 a	12.3±7.0°	8.7 \pm 6.2
N区(n=36)	$2.4\pm1.7^{\text{ b}}$	9.3±5.0 b	9.7 \pm 6.2

- ・大卵胞:8mm 以上、中卵胞:5~7mm、小卵胞:5mm 未満
- ・数値は平均値±標準偏差、同列異符号間に有意差あり a-b (P<0.05)

表 4 前期・後期の OPU 成績および胚生産成績

時期	総卵胞数	回収 卵子数	培養 卵子数	卵割数 (卵割率)	胚盤胞発生数 (発生率)	凍結可能胚数 (凍結可能胚率)
前期	29.0±7.9 a	15.9 \pm 7.2 a	13.9±6.9 a	10.5 \pm 5.4 a	6.6±4.9 a	3.8±3.7 a
(n=36)				(75. 5%) °	(47.0%) ^e	(27. 3%) ^c
後期	17. $5\pm6.5^{\ b}$	7. 3±3.9 b	6.6 \pm 3.7 b	4.4±3.1 b	$2.6\pm2.0^{\ b}$	0.9±1.1 b
(n=36)				(67.8%) d	(40.3%) ^f	(14.0%) ^d

[・]数値は平均値±標準偏差、同列異符号間に有意差あり a-b, c-d (P<0.05), 傾向あり e-f (P=0.09)

表 5 前期・後期の直径別卵胞数

区分	大卵胞	中卵胞	小卵胞
前期(n=36)	3. 1 ± 2.3	12.4±7.2 a	13.5±5.2 a
後期(n=36)	3.4 ± 2.0	$9.2\pm 4.6^{\text{ b}}$	$4.9\pm3.6^{\ b}$

[・]数値は平均値±標準偏差、同列異符号間に有意差あり a-b (P<0.05)

表 6 前期における H 区 (B 群) の OPU 実施回数別の OPU 成績および胚生産成績

OPU 実施 回数	総卵胞数	回収 卵子数	培養 卵子数	卵割数 (卵割率)	胚盤胞発生数 (発生率)	凍結可能胚数 (凍結可能胚率)
1回目	29. 0 ± 4.6	18.0 \pm 1.0	14. 7 ± 2.1	13.0±1.0 (88.6%)	9. 3±3. 2 (63. 6%)	6. 7±4. 5 (45. 5%)
2 回目	36.3±8.6	19.3±4.5	18.3±3.5	13. 3±2. 5 (72. 7%)	9. 3±4. 0 (50. 9%)	5. 7±3. 8 (30. 9%)
3 回目	35.0±1.0	30.0±5.6°	27.0±7.5 ^a	21. 7±6. 7 ^a (80. 2%)	15. 3±7. 5 (56. 8%)	7. 7±6. 4 (28. 4%)
4 回目	40.0±6.9	22.7 ± 4.7	20.3±6.5	11. 7±5. 7 (57. 4%)	7. 7±2. 3 (37. 7%)	4. 7±3. 2 (23. 0%)
5 回目	37.3 ± 0.6	18.0±3.6	16.7±1.5	13.3±1.5 (80.0%)	9. 0±1. 7 (54. 0%)	5. 7±5. 0 (34. 0%)
6 回目	31. 0±4. 4	15.0±3.0 b	14.0±2.6 ^b	9. 3±3. 1 ^b (66. 7%)	8. 3±2. 3 (59. 5%)	3. 3±2. 3 (23. 8%)

[・]数値は平均値±標準偏差、同列異符号間に有意差あり a-b (P<0.05)

表7 前期におけるN区(A群)のOPU実施回数別のOPU成績および胚生産成績

OPU 実施 回数	総卵胞数	回収 卵子数	培養 卵子数	卵割数 (卵割率)	胚盤胞発生数 (発生率)	凍結可能胚数 (凍結可能胚率)
1回目	26. 7 ± 4.6	9.0 ± 5.2	8.3 ± 5.8	6. 3±4. 9 (76. 0%)	2. 7±2. 1 (32. 0%)	2. 7±2. 1 (32. 0%)
2 回目	23.7 ± 6.4	13.7 \pm 0.6	11.3±0.6	8. 3±1. 2 (73. 5%)	4. 0±1. 7 (35. 3%)	2. 0±1. 0 (17. 6%)
3 回目	23.7±4.9	15.7±6.1	12.7±4.9	11.0±4.4 (86.8%)	6. 7±4. 9 (52. 6%)	4. 7±4. 0 (36. 8%)
4 回目	21.0 ± 5.3	7.7±4.5	5. 3±2. 1	3. 7±1. 2 (68. 8%)	1. 0±1. 0 (18. 8%)	0. 3±0. 6 (6. 3%)
5 回目	23. 3±4. 9	9.7±6.4	8.0±4.4	7.0±3.6 (87.5%)	3. 3±1. 5 (41. 7%)	1. 3±0. 6 (16. 7%)
6 回目	21.3±5.5	12.0±5.0	10.7±4.7	7. 7±2. 5 (71. 9%)	2. 0±2. 0 (18. 8%)	1. 0±1. 0 (9. 4%)

数値は平均値±標準偏差

表8 後期における H 区 (A 群) の OPU 実施回数別の OPU 成績および胚生産成績

OPU 実施 回数	総卵胞数	回収 卵子数	培養 卵子数	卵割数 (卵割率)	胚盤胞発生数 (発生率)	凍結可能胚数 (凍結可能胚率)
1回目	17.0 ± 5.6	8.0 ± 2.6	8.0 ± 2.6	5. 0±1. 7 (62. 5%)	4.0 ± 1.0 (50.0%)	2.3 ± 1.2 (29.2%)
2 回目	15. 7 ± 1.2	6.3±3.1	4.7±2.3	3. 3±1. 2 (71. 4%)	2. 3±0. 6 (50. 0%)	1. 3±0. 6 (28. 6%)
3 回目	14.0 \pm 5.0	5.0±3.0	4.0 ± 2.0	3. 3±1. 5 (83. 3%)	2. 3±1. 2 (58. 3%)	0.7±0.6 (16.7%)
4 回目	13. 0 ± 7.0	8.7±3.2	8.7±3.2	4. 0±1. 7 (46. 2%)	2. 3±1. 2 (26. 9%)	2. 0±1. 0 (23. 1%)
5 回目	17.7±3.8	9.0±1.7	8. 3±2. 3	6. 3±4. 5 (76. 0%)	3. 0±2. 6 (36. 0%)	0 (0%)
6 回目	16.0±1.0	7.3±4.7	6.3±3.8	4. 0±3. 5 (63. 2%)	3. 0±1. 7 (47. 4%)	0. 3±0. 6 (5. 3%)

数値は平均値±標準偏差

表 9 後期における N 区 (B 群) の OPU 実施回数別の OPU 成績および胚生産成績

0PU 実施 回数	総卵胞数	回収 卵子数	培養 卵子数	卵割数 (卵割率)	胚盤胞発生数 (発生率)	凍結可能胚数 (凍結可能胚率)
1回目	26. 0 ± 3.5	6. 3 ± 4.5	5. 7 ± 4.0	4. 3±4. 5 (76. 5%)	2. 7±3. 1 (47. 1%)	1. 0±1.7 (17. 6%)
2 回目	17. 0±4. 4	5.3±5.1	4.3±4.2	3. 3±3. 5 (76. 9%)	3. 0±3. 0 (69. 2%)	1. 3±1. 2 (30. 8%)
3 回目	21.0 ± 7.2	6.3±1.5	6.0±2.0	3.0±2.0 (50.5%)	1.7±1.5 (27.8%)	0 (0%)
4 回目	14. 7±9. 3	9.0±7.0	8.0±7.2	6. 7±6. 1 (83. 3%)	2. 3±2. 5 (29. 2%)	0.7±1.2 (8.3%)
5 回目	19.7±9.5	10.0±5.0	9.0±4.6	6. 3±4. 0 (70. 4%)	2. 7±3. 8 (29. 6%)	0.7±1.2 (7.4%)
6回目	18.3±11.9	7.0±6.2	5.7±4.9	3. 7±3. 5 (64. 7%)	2. 3±3. 2 (41. 2%)	0.7±1.2 (11.8%)

数値は平均値±標準偏差

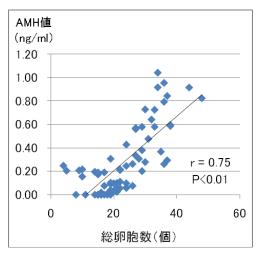


図2 OPU 実施時の総卵胞数と AMH 値との関係

表 10 各群における期別の総卵胞数と AMH 値

群	OPU 実施時期(区分)	総卵胞数(個)	AMH 値 (ng/ml)
 A 群	前期 (N区)	23.3±4.9 a	0. 22 ± 0. 25 a
A 和干	後期(H区)	15.6 \pm 4.1 ^b	0.07 ± 0.10
B群	前期(H区)	34.8±5.8 a	0.64±0.26 a
D 种	後期 (N区)	19.4 \pm 7.8 ^b	0.19 ± 0.09 b

- ・H区の総卵胞数は OPU 実施時の数値、AMH 値は処置前の数値
- ・数値は平均値±標準偏差、各群の同列異符号間に有意差あり (P<0.05)

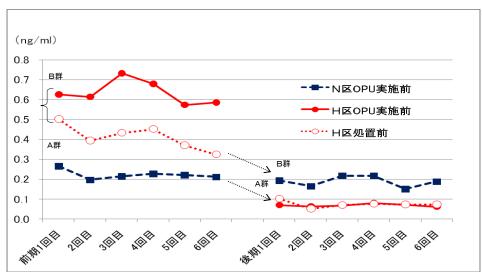


図3 OPU 実施回数別の AMH 値測定区分間の比較

表 11 H区におけるホルモン処置前後の AMH 値の変化

AMH 測定区分	前期(B 群)	後期(A群)
H 区処置前	0.41±0.21 a	0.07 ± 0.11
H 区 OPU 実施前(処置後)	0.64 ± 0.26 b	0.07 ± 0.10

[・]数値は平均値±標準偏差、同列異符号間に有意差あり (P<0.05)

IV まとめおよび考察

OPU・IVFによる体外受精胚生産は、体内受精胚生産の際に必須である過剰排卵処置を行う必要が無く、年間を通じて効率的・安定的に胚を生産できる技術として期待されている。しかし、黒毛和種において安定的に継続して体外受精胚を生産するための最適な OPU プログラムは確立されていない。また、連続して OPU を行った場合の胚生産に及ぼす影響や供卵牛の卵巣機能・繁殖性への影響に関する報告は少ない。

そこで、本研究では、黒毛和種において 14 日間隔で 6 回連続 OPU を行った後、2 ヶ月の間を空けて再び 6 回連続で (合計 12 回) OPU を行うとともに、GnRH と FSH による前処置を行い、前処置の有無および OPU 実 施回数が OPU 成績 (OPU 実施時の総卵胞数、回収卵子数、培養卵子数) および胚生産成績 (卵割数、卵割率、胚盤胞数、胚盤胞発生率、凍結可能胚 (A・B ランク胚)数、凍結可能胚率) に及ぼす影響を検討した。さらに、AMH 値を指標として供卵牛の卵巣機能に及ぼす影響を 調査した。

これまでに、OPU 実施時の卵胞数や回収卵子数を増 加させるための前処置として、優勢卵胞の除去や低単 位の卵胞刺激ホルモンの投与等について検討されてき ている。尾形ら⁷⁾は、OPU 実施 48 時間前に GnRH200 μgを投与することにより、優勢卵胞を人為的に排卵 させ、新たな卵胞波を誘導することで、卵胞数が増加 し、回収卵子数が増加することを報告している。また、 岡崎ら ⁶⁾は、GnRH100 μg 投与 48 時間後に総卵胞数が、 FSH10AU (5AU を 8 時間間隔で 2 回) 投与 24 時間後に 5 ~7mm サイズの卵胞数が有意に増加することを報告し ている。今回、我々は、OPU 実施 96 時間前に GnRH100 μg を投与し、さらに OPU 実施 48 時間前に FSH5AU を 投与したが、これらのホルモン処置により、無処置に 比べ卵胞数に有意な差は認められなかったが、回収卵 子数、培養卵子数、胚盤胞発生数および凍結可能胚数 が有意に増加した。しかし、卵胞数について、直径別 に比較すると、ホルモン処置の有無により、直径 5mm 未満の小卵胞の数に有意な差は認められなかったが、

ホルモン処置により無処置に比べ直径 8mm以上の大卵胞および直径 5~7mm の中卵胞の数が有意に増加した。そのため、これまでの報告と同様に、GnRH の作用により新たな卵胞波が出現し、さらに、FSH の作用により卵胞発育が促進された結果、中卵胞の数が増えて卵子の吸引もより容易となり、回収卵子数および培養卵子数が増加したと考えられた。また、ホルモン処置により無処置に比べ胚盤胞発生率および凍結可能胚率も向上した。0'Dohertyら¹⁵⁾は、胚は互いに作用し合って胚の発育を促進する何らかの「胚発育因子」を培養液中に分泌しており、集合培養により胚盤胞発生率が向上し、胚の細胞数も増加することを報告している。このことから、ホルモン処置により培養卵子数が増加したことが、胚盤胞発生率および凍結可能胚率を向上につながったと考えられた。

以上のことから、ホルモン剤の投与による前処置は 無処置に比べ OPU・IVF による体外受精胚の生産効率を 高める可能性があることが示唆された。

一方、前期と後期の OPU 成績および胚生産成績の比 較では、胚盤胞発生率以外の全ての項目で、前期が後 期に比べ有意に高い値を示した。さらに、OPU 実施回 数別の比較では、前期において H 区では、回収卵子数、 培養卵子数および卵割数が3回目に比べ6回目で有意 に低下したが、その他の OPU 成績および胚生産成績の いずれの項目も各回数で差は認められず、N 区では、 いずれの項目も各回数で差は認められなかった。また、 後期においては、両区ともいずれの項目も各回数で差 は認められなかったが、前期に比べ低く推移する傾向 が認められた。小原ら 4) は、過剰排卵処置 (SOV) に よる体内受精胚生産の1週間後から週1回、連続3・5・ 7週で OPU を実施し、その後、最初の SOV から 70 日後 に再び SOV を行い、OPU 成績および連続 OPU 後の SOV 採卵成績を比較している。その結果、連続 5 週で OPU を実施した場合、週毎に回収卵子数が減少する傾向が 認められたことを報告している。さらに、OPU を連続 3・5 週で実施した場合、2回目の SOV でも初回 SOV と 正常卵率においてはほぼ同様の結果となったが、連続

7 週で実施した場合、正常卵がほとんど採取できなくなったと報告している。また、秋山ら 5) は、7~15 日間隔で 0PU を 5~6 回反復した結果、実施回数の増加に伴い胚盤胞発生数が減少する傾向にあったことを報告している。これらのことから、概ね 5 回以上の連続した 0PU は、卵巣に何らかの障害を来たし、0PU 成績および胚生産成績を低下させると考えられた。実際に、今回の研究においても、後期の 0PU 実施の際に程度に差はあるものの卵巣の癒着が認められる個体もあり、卵巣穿刺による卵巣内末梢血管の損傷や卵巣周囲の線維化に伴う血行障害がその要因の一つではないかと考えられた。

さらに、AMH 値についてもこれらを裏付ける結果となった。すなわち、供卵牛のAMH 値はこれまでの報告 9~11)と同様に総卵胞数と高い正の相関が認められ、卵巣機能の指標となり得ることが確認されたが、OPU 実施前(H 区はホルモン処置前)の AMH 値は、A 群、B 群ともに前期に比べ後期で有意に低下していた。このことから、前期の OPU によるダメージが 2 か月後の後期の卵巣機能に影響を及ぼしていたと考えられる。また、前期の H 区(B 群)では、ホルモン処置前に比べ処置後に AMH 値が有意に増加したが、後期の H 区(A 群)では、ホルモン処置前後で AMH 値に差は認められなかったことからも、特に前期に無処置で OPU を行った A 群において卵巣へのダメージが大きく、ホルモン剤への反応性が低下していたことが示唆された。

しかし、OPU 実施回数別の各測定区分 (N 区 OPU 実施前、H 区処置前、H 区 OPU 実施前)間およびそれぞれの測定区分における各回数間の比較では、有意な差は認められなかった。これらのことは、例数が少ない上に固体差もあったことがその要因の一つと考えられ、例数を増やし検討する必要があると思われた。

以上のことから、6 回連続して OPU を行った後、2 か月の間隔を空けると、卵巣機能の低下により OPU 成績および胚生産成績が低下することが明らかとなった。

今後は、特に、前処置にするホルモン剤の種類・投 与時期・用量や OPU 実施回数・間隔等について例数を 重ねさらに検討し、OPU 成績および胚生産成績を低下 させることのない OPU プログラムの確立を目指した い。

V 謝辞

本研究の実施にあたり、OPU プログラムの設定に関してご助言をいただいた酪農学園大学の今井敬教授に深謝いたします。

VI 引用文献

- 1) Gibbons JR, et al (1994), Effects of once-versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development, Theriogenology 42(3), 405-419
- 2) 平田統一ら(2005), 繁殖障害ホルスタイン腫乳牛に 対する経膣生体内卵子吸引-体外受精・培養法の適用, 岩獣会報(Iwate Vet.) Vol. 31 (No.2), 43-45
- 3)中川邦昭ら(2010), OPU-IVF を用いた妊娠牛からの 胚生産, 第 26 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大 会講演要旨, 18-19
- 4)小原剛ら(2005),過剰排卵処理(SOV)と経膣採卵(OPU)を組み合わせた牛胚生産の検討,東北農業研究(Tohoku Agric. Res.)58, 121-122
- 5) 秋山清ら(2009),経膣採卵と体外受精による牛胚の 生産,神畜技セ研報No.2,1-5
- 6) 岡崎尚之ら(2003),種々のホルモン前処理がウシ生体卵巣からの採取卵子数に及ぼす影響,島根畜試研報36,12-15
- 7)尾形康弘ら(2006), GnRH 製剤を用いた経膣採卵法の 検討, 広島県獣医師会雑誌No.21, 20-23
- 8)橋谷田豊ら(2003), 黒毛和種の連続生体内卵子吸引における eCG前処理の効果, 第18回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 34-35
- 9) Ireland JL, et al(2008), Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle, Biol Reprod 79(6), 1219-1225
- 10) Rico C, et al (2009), Anti-mullerian hormone is

an endocrine marker of ovarian gonadotropin -responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow, Biol Reprod. 80(1), 50-59

11) Rico C, et al(2012), Determination of anti-mullerian hormone consentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to farm, Reprod Fertil Dev. 24(7), 932-944

12)河合愛美ら(2013)、 黒毛和種供卵牛の血中抗ミュ ーラー管ホルモン濃度と採卵成績との関係、北信越畜 産学会報第 107 号, 17

13) 堀登ら(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

14) Imai K, et al(2006), The efficiency of embryo production by Ovum Pick-Up and in vitro fertilization in cattle, Journal of Reproduction and Development 52(Suppl), S19-26

15)0'Doherty, et al. (1997), Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts, Theriogenology 48, 161-169

肥育前中期における高栄養が発育等に及ぼす影響

中村 勝、石田美保、坂井良輔1

1 北陸学院大学

Effects of high nutrition during the former and the medium period of fattening on growth performance and carcass characteristic

Masaru NAKAMURA, Miho ISHIDA, Ryousuke SAKAI

キーワード:栄養水準強化、肥育、黒毛和種

要 約

肥育前期から肥育中期にかけて粗飼料に対する濃厚飼料の割合を高め、栄養水準を強化したところ、発育や格付成績に良好な結果が得られ収益性も高くなった。しかし、おいしさ指標であるオレイン酸割合に差はみられず、また、と畜後の内臓所見に濃厚飼料多給による弊害がみられた。

I 緒論

肥育経営においては、枝肉格付け等級における上物率 (A5・A4割合)の向上や、おいしさの指標であるオレイン酸含有割合の向上を図る必要がある。また、近年、肥育素牛の体格の大型化に伴い肥育前中期における栄養水準の見直しが必要となっている。そこで、肥育ステージ早期に栄養水準を高め、発育や健康状態、さらに肉質・肉量・収益性に及ぼす影響について検討した。

Ⅱ 材料及び方法

1. 供試牛

供試牛の内訳は表1のとおりで、石川県産黒毛和種を1区当たり5頭で対照区および試験区の2区を設け、計10頭を用いた。なお、No.9号牛は20ケ月齢に肝機能障害を発症し、著しく発育不良でありデータの集計対象外とした。

表1 供試牛一覧

10 1	スル	下 晃					
区分	No.	生年月日	と畜月齢	名 号	父	母の父	母の祖父
	1	H23.07.02	28.9	能登586	勝忠鶴	北国7の8	紋次郎
	2	H23.07.07	28.7	能登588	勝忠鶴	安平照	北国7の8
	3	H23.07.11	28.6	能登590	安福勝	肥後桜	北仁
対照区	4	H23.07.17	28.4	能登592	北平安	茂花国	安茂勝
	5	H23.07.28	28.0	安寿6775	肥後桜	松福美	北国7の8
		平均	28.5				
	6	H23.07.03	28.8	能登587	茂花国	安茂勝	高栄
	7	H23.07.10	28.6	能登589	若茂勝	北仁	安茂勝
=+=>-	8	H23.07.12	28.5	能登591	北平安	安茂勝	北国7の8
試験区	9	H23.07.26	28.1	安天8496	若茂勝	安茂勝	北仁
	10	H23.07.31	27.9	安寿7408	若茂勝	安茂勝	北国7の8
		平均	28.4				

2. 試験期間

平成 24 年 5 月 22 日から平成 25 年 11 月 26 日まで とした。

3. 飼料給与設計および試験区設定

飼料給与は当場の慣行法で飼養した対照区と肥育 前・中期に栄養水準を強化した試験区とした。すなわ ち、図1のように肥育ステージが進むにつれ、濃厚飼 料の給与割合は増えるが、試験区はそのレベルを高め、 時期も早めることで濃厚飼料を多く摂取できるように 設計した。

4. 飼養管理方法

供試牛は約36 m²(6m×6m)の牛房に5頭1区とし、

飼料給与はドアフィーダーによる個体管理、水は水槽による自由飲水、鉱塩(尿石予防剤入り)は自由舐食、 敷料はオガ粉を利用し、おおむね2週間毎に交換した。 飼料は、図1のとおり給与し、毎日残餌を測定した。 発育調査は、体重は2週間おきに、その他体測尺は 肥育ステージ毎に行った。

	年月	24/5	6	7	8	9	10	11	12	25/1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	月齡	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	ステージ		肥育	前期				肥育	中期			肥育後期				仕上期				
	濃厚飼料比(TDN)	70.0%			86.0%			90.0%						99	.0%					
対	期待DG	1.0kg		0.8kg				0.6kg						0.7	8kg					
照	配合飼料	70.0%		81.0%					85.0%						96.0%					
区	生米ぬか	_		5.0%				5.0%						3.0%						
<u> </u>	稲わら	15.0%		14.0%				10.0%						1.	0%					
	乾草	15.0%		_				_						-	_					
	濃厚飼料比(TDN)	73.0%			88.0%				92.0%						99	.0%				
試	期待DG	1.2kg			1.0kg					0.8kg						0.7	8kg			
験	配合飼料	73.	0%			83.0%				87.0%						96	.0%			
区	生米ぬか	_			5.0%				5.0%						3.	0%				
	稲わら	14.0%		12.0%				8.0%						1.	0%					
	乾草	13.	0%			_	_							_					-	_

図1 飼料給与設定

5. 血液性状

約2カ月間隔で血液を採取し、血清中総コレステロール(T-Cho)、尿素態窒素(BUN)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミラーゼ(GOT)、 $\gamma-グルタミルトラスペプチダーゼ(<math>\gamma-GTP$)濃度等およびビタミンA濃度を検査した。

6. 枝肉性状

格付成績は、公益社団法人日本食肉格付協会の成績 を用いた。

脂肪酸組成は、食肉脂質測定装置(富士平工業株式 会社)を用いて第6~7肋間の筋間脂肪のオレイン酸 等を測定した。

牛肉理化学的特性は、第6~7肋間の胸最長筋を用いて水分、加熱損失、融点等を測定した。

Ⅲ 結果及び考察

1. 飼料摂取量状況

1日1頭当たり飼料摂取量(原物)およびTDN粗 濃比を表2に示した。濃厚飼料は設計のとおりに試験 区が通算で平均270kg多く摂取した。残飼は、両区と もに後期あたりから若干見られた程度だった。

表2 飼料摂取量および粗濃比

衣 2 即科採取	衣 2 - 門科授取里ねよい租侲比						
形質	区分	対!	照区	試	験区	有意差	
濃厚飼料	前期	4. 1	± 0.1	4.5	± 0.4	†	
(TDNkg/日・頭)	中期	5.4	± 0.2	5. 7	± 0.6		
	後期	6.3	± 0.5	6.7	± 0.4		
	仕上期	6.5	± 0.7	7.4	± 1.0		
	通算	5.6	± 0.3	6.0	± 0.5		
粗飼料	前期	1.7	± 0.1	1.4	± 0.1	*	
(TDNkg/日・頭)	中期	0.6	± 0.1	0.6	± 0.0		
	後期	0.3	± 0.1	0.3	± 0.0		
	仕上期	0.1	± 0.0	0.1	± 0.0		
	通算	0.6	± 0.1	0.5	± 0.0		
総摂取量	前期	5.8	± 0.2	5.9	± 0.4		
(TDNkg/日・頭)	中期	6.0	± 0.2	6.3	± 0.6		
	後期	6.6	± 0.5	7.0	± 0.4		
	仕上期	6.6	± 0.7	7.4	± 1.0		
	通算	6.2	± 0.3	6.5	± 0.5		
粗濃比	前期	29.4	± 0.9	23.8	± 1.7	*	
(%)	中期	10.4	± 1.2	9.8	± 0.7		
	後期	4.0	± 1.2	4.3	± 0.7		
	仕上期	1.1	± 0.2	1.0	± 0.1		
	通算	9.0	± 1.0	8.1	± 0.7		

平均 ± 標準偏差、*: P<0.05、†: P<0.1

2. 発育成績

発育成績を表3に示した。両区とも順調に推移した が差は認められなかった。

体尺値においては体長で試験区が対照区よりも10 cm長かった他、両区で目立った差はなかった。

表 3 発育成績

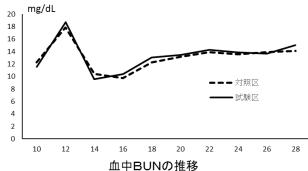
形質	区分	対	照区	試	験区	有意差
体重	試験開始時	300.2	± 15.5	308.8	± 44.2	
(kg)	前期終了時	407.8	± 20.9	413.3	± 49.7	
	中期終了時	598.4	± 29.4	622.5	± 75.0	
	後期終了時	762.0	± 40.5	768.0	± 64.9	
	試験終了時	792.0	± 37.7	811.0	± 67.3	
DG	前期	1.09	± 0.08	1.06	± 0.11	
(kg/日・頭)	中期	0.93	± 0.08	1.03	± 0.13	
	後期	0.78	± 0.11	0.70	± 0.12	
	仕上期	0.81	± 0.24	1.16	± 0.24	
	通算	0.90	± 0.05	0.91	± 0.06	
飼料効率	前期	0.187	± 0.009	0.180	± 0.014	
(体重増加	中期	0.154	± 0.009	0.162	± 0.011	
/TDN摂取量)	後期	0.118	± 0.009	0.101	± 0.022	
	仕上期	0.124	± 0.036	0.157	± 0.040	
	通算	0.145	± 0.003	0.141	± 0.009	

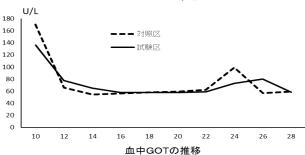
平均±標準偏差、*:P<0.05、†:P<0.1

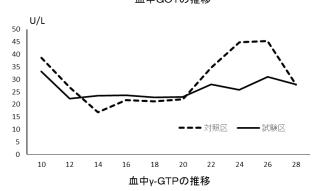
3. 血液性状

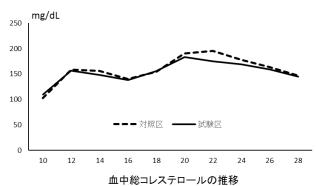
血中BUN、GOT、 γ -GTP、T-Cho、ビタミンA濃度の推移を図2に示した。 γ -GTPで対照区より試験区が肥育後期以降安定して推移した以外は両区ともに同様に推移した(図2)。

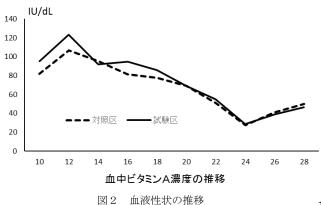
血中ビタミンA濃度は過去の試験と比較して良好に コントロールされた。 $^{1)}$ (図1)これは入荷した稲わ ら中に β カロテンが残留しないように措置した効果と











思われる。また、血中ビタミンA濃度が強く制御されたことによりNo.6号牛は格付時にスネ部分にズル(水腫)が認められた。

4. 枝肉成績

格付成績は枝肉重量・バラ厚・BMSNoが試験区で高いが、(表4)ロース芯面積は対照区で高かった。

育成期に過剰な脂肪がロース芯周辺に付着することで発達が阻害されるといわれ²⁾、早期肥育ステージに移行後も同様の傾向がみられる可能性が考えられる。

表4 枝肉成績

女士 スパル県			
形質	対照区	試験区	有意差
枝肉重量(kg)	502.8±31.9	513.1±49.4	N.S.
歩留(%)	63.5 ± 1.5	63.2 ± 1.6	N.S.
ロース芯面積(cm ²⁾	65.2 ± 9.4	61.0 ± 4.7	N.S.
バラ厚(cm)	7.3 ± 0.3	7.7 ± 0.4	N.S.
皮下脂肪厚(cm)	2.9 ± 0.8	2.8 ± 1.0	N.S.
歩留基準値(%)	73.8 ± 1.5	73.5 ± 1.2	N.S.
步留·肉質等級	A5:1, A4:3, B3:1	A5:2、A4:1、B4:1	-
BMS No.	10,7,6,5,5	9,8,7,6	_

平均±標準偏差

5. 脂肪酸組成

肉のおいしさに影響を与える不飽和脂肪酸と、その主な構成成分であるオレイン酸含有割合は両区とも石川県産黒毛和種の平均値57.4%(2013年4月~12月石川県枝肉販売会去勢平均)を上回った(表5)。これは遺伝子型と「生米ぬか」給与の効果によるものと考えられる。

SCD (脂肪酸不飽和化酵素) 遺伝子型 $^{3,4)}$ については両区ともAV型が1頭で、他はAA型であった。

表5 脂肪酸組成

区分		対照区	試験区
オレイン酸	(%)	58.2 ± 1.3	58.1±1.8
飽和脂肪酸	(%)	32.4 ± 0.8	32.8 ± 2.3
一価不飽和脂肪酸	(%)	63.9 ± 1.9	64.0±2.2
SCD遺伝子型		AA: 4,AV: 1	AA: 3,AV: 1

6. 牛肉理化学特性

筋肉内の脂肪含有割合の差から、試験区で水分が低く、加熱損失が大きい傾向がみられる。他の形質に試

察したいと考えられた。

表6 ロース芯の理化特性

形質	対照区	試験区	有意差
水 分(%)	42.4 ± 3.5	40.6 ± 2.8	N.S.
伸 展 率 (cm2/g)	15.7±3.0	14.2 ± 1.5	N.S.
保水性(%)	96.5 ± 1.4	97.2 ± 0.8	N.S.
加 熱 損 失 (%)	17.6±1.8	19.3 ± 3.0	N.S.
脂肪融点 (℃)	29.8±2.9	29.9 ± 3.3	N.S.

平均±標準偏差

Ⅳ まとめ

肥育前期から肥育中期にかけて濃厚飼料比を高め栄養水準を強化したところ、発育や格付肉成績に良好な結果が得られた。おいしさの指標とされているオレイン酸含量は両区とも県平均よりも高く、差はなかった。また、と畜後の内臓所見では肝膿瘍や第1胃パラケラトージス、第4胃炎等の濃厚飼料多給による弊害がみられ、これは試験区でより顕著にみられた。このため、試験区の肥育前中期の飼養方法を検討するとともに、育成期における十分な第1胃の発育についても考

▼ 引用文献

- 1) 山本宏・干場宏樹・織部治夫・菅野常雄 ビタミンA制御による黒毛和種の肉質向上(第1報) 石川県畜産総合センター研究報告 36:12-18
- 2) 松本大策 どんどんよくなる肥育管理(日本畜産 振興会) 199-206
- 3) Taniguchi M, et al. 2004. Genotype of steroyl-CoA desaturase is accociated with fatty acid compostition in Japanese Blackcattle. Mammalian Geneme. Volume 14:142-148.
- 4) 小林正人 脂肪の質とオレイン酸とSCDの話 畜産技術(2012) 6:15-17

VI Summary

When a concentrate feed ratio was raised in the early stage of fattening and a nutrition level was strengthened, the result good for production of beef was obtained, and also profitability became high.

However, there is no difference in an oleic acid rate, and since the evil which gives many concentrate feed was seen, feed management of the rearing period is considered from now on.