

4 雌雄判別技術を活用した酪農経営の早期再生実証

背景と目的

原発事故により避難を余儀なくされた酪農家は、その多くが避難時に牛を手放しているため、営農を再開し安定した経営を継続するためには、早期の生産基盤の確立と収入の確保が必要である。

そこで、乳用後継雌牛を確保するため性選別精液の人工授精適期を明らかにするとともに、高価格販売が可能な黒毛和種雄子牛生産による増収を目指して黒毛和種の性判別受精胚移植に係る技術を構築する。

成果の内容 (1) 性選別精液の人工授精適期の解明

① 定時人工授精による人工授精適期解明

ホルスタイン種性選別精液の人工授精適期を解明するため、ホルモン製剤投与プログラム（シダーシンク、又はダブルシンク）（表 1-1、1-2）による定時人工授精により検証した。その結果、GnRH 投与後 8~12 時間で受胎率の高い傾向にあることが判明した（表 2）。

② 性選別精液の人工授精適期の実証

実証牧場と 2 戸の横展開酪農家において、ホルスタイン種経産牛 19 頭に GnRH 投与後 8~12 時間に人工授精を行ったところ、6 頭で受胎が確認され、受胎率は約 31.6%であった（表 3）。ホルスタイン種経産牛における GnRH 投与後 8~12 時間の受胎状況については、今後も継続して検証を行う。

成果の内容 (2) 黒毛和種の性判別体外受精胚の効率的生産

① 効率的な経膣採卵方法

良質な卵子が効率的に数多く得られ、なおかつ、作業者と供卵牛にとって負担が少ない卵胞刺激方法について検証した。卵子を 1 度に複数個得るためのホルモン製剤投与（卵胞刺激処理）は、6~8 回の筋肉注射による漸減投与が慣行法として行われているが、1 回の頸部皮下注射で全量投与する頸部皮下単回投与方法においても、21 日ないし 14 日間隔での 3 回反復試験における採卵成績で慣行法と同等の結果であった（表 4、表 5）。また、体内成熟卵子の採卵成績および体外受精成績についても頸部皮下単回投与方法は慣行法と同等の結果であることを確認した（表 6、表 7）。

② 性判別率を高める細胞採取方法

LAMP 法による性判別に係る細胞採取方法は、定法では 10 細胞以上（7 日目胚頃）の採取が必要とされるところ、酵素を用いた細胞分離法を取り入れることにより（表 8）、3 日目胚（8-16 細胞期）の最小でも 2 細胞あれば判定が可能であることが示唆された（表 9）。

③ 性判別体外受精胚移植技術の実証

実証牧場と横展開農家 4 戸の経産牛 20 頭および畜産研究所の未経産牛 1 頭に性判別体外受精胚の移植を行ったところ供試牛すべてが不受胎であった。この要因として、泌乳中の経産牛は生乳生産に多くのエネルギーが消費され、繁殖機能に必要なエネルギーが不足しがちであることなど受胎しにくい状態であったことが考えられる。このため、今後は供試牛を経産牛からそのような要因がない未経産牛に替えて受胎状況を検証する。

具体的データ

表 1-1 人工授精プログラム:P1(シダーシンク法)

処理日	処理内容
day0	GnRH※1、CIDR※2 挿入
day7	PGF2 α ※3、CIDR 抜去
day9(day9 PGF2 α 投与から 48 時間後)	GnRH

※1 GnRH:酢酸フェルチレリン 200 μ g

※2 CIDR:膈内留置型徐放性プロゲステロン製剤

※3 PGF2 α ジノプロスト 25mg

表 1-2 人工授精プログラム:P2(ダブルシンク法)

処理日	処理内容
day 0	PGF2 α ※1
day 2	GnRH ※2
day 9	PGF2 α ※1
day11(day9 PGF2 α 投与から 48 時間後)	GnRH ※2

※1 PGF2 α クロプロステノール 0.5mg

※2 GnRH:酢酸フェルチレリン 200 μ g

表 2 性選別精液による定時人工授精の適期(単位 頭、%)

GnRH 投与後	頭数	受胎頭数	受胎率 ※
6～7 時間	6	0	0.0
8～9 時間	5	1	20.0
10～12 時間	34	11	32.4
13～14 時間	11	0	0.0
24 時間	27	7	25.9
合計	83	19	22.9

※ 受胎率=受胎頭数/実施頭数

注 シダーシンク:H25～26 年度に 54 頭に実施、ダブルシンク:H28 年度に 29 頭に実施

表3 性選別精液による定時人工授精結果(単位 頭、%)

	実施頭数	受胎頭数	受胎率
A 農場	7	2	28.6
B 農場	6	2	33.3
C 農場	6	2	33.3
合計	19	6	31.6

表4 3回反復経膣採卵方法

処理日	頸部皮下単回投与法	尾椎硬膜外腔単回投与法	漸減投与法(慣行法)
day0	卵胞発育同調のための大卵胞除去 CIDR 挿入		
day2	FSH 20AU PGF2 α	FSH 20AU PGF2 α	FSH 5AU×2 回(朝、夕) PGF2 α
day3	—	—	FSH 3AU×2 回(朝、夕)
day4	—	—	FSH 2AU×2 回(朝、夕)
day6	CIDR 抜去、OPU(経膣採卵)実施		

注 21 日ないし 14 日間隔で 3 回反復で実施

表5 3回反復経膈採卵における総採卵成績(単位 個、%)

投与方法	卵胞数	回収卵子数	良質卵子率
頸部皮下単回投与	96.7±30.0	57.0±21.2	78.4
尾椎硬膜外腔単回投与	114.7±17.9	67.0±14.7	80.1
漸減投与投与(慣行)	112.7±33.7	67.7±35.2	77.8

注 供試頭数各区3頭

表6 体内成熟卵子 OPU 方法(単位 AU)

処理日	共通処理	頸部皮下単回投与方法	漸減投与方法(慣行法)	
			朝	夕
day 0	CIDR ※1 膈内挿入	—	—	—
day 5	8mm 以上の卵胞を吸引除去	—	—	—
day 6	—	20	—	4
day 7	—	—	4	3
day 8	PGF2 α※2 投与	—	3	2
day 9	CIDR 抜去	—	2	1
day10	GnRH ※3 投与	—	1	—
	25-26 時間後 OPU			
	30 時間後 IVF 実施(体内成熟卵子)			

※1 膈内留置型徐放性プロジェステロン製剤

※2 クロプロステノール 0.5mg

※3 酢酸フェルチレリン 200 μg

注1 OPU 及び IVF は(独)家畜改良センター技術マニュアルに準じた

注2 発生培養はタイムラプス装置で実施した

表7 体内成熟卵子 OPU の採卵成績及び体外受精成績(単位 個、%)

投与方法	卵胞数	採取卵子数 (採取率※1)	発生培養数	卵割数 (卵割率※2)	胚盤胞数 (胚盤胞形成率※3)
頸部皮下単回	26.4±5.6	20.3±9.1(76.8)	11.1±8.0	6.1±3.5(55.1)	4.2±2.7(39.3)
漸減投与	29.6±10.6	20.8±9.5(70.0)	13.5±6.7	6.4±4.1(47.2)	3.8±3.1(27.8)

※1 採取卵子数/卵胞数 × 100

※2 卵割数/発生培養数 × 100

※3 胚盤胞数/発生培養数 × 100

表8 性判別のための試料調製方法(単位 個)

処理方法	供試胚数	供試胚期	細胞採取法	発生又は回復培養方法
細胞分離	54	3日目胚 (8~16細胞期)	プロテアーゼで透明帯を溶解除去後、ピペッティングにより細胞分離(2~4個採取)	残りの細胞を個別培養、ディッシュで7~10日目胚まで発生培養 ※1
切断(慣行)	18	7日目胚	マイクロマニピュレーターを用いて、胚の一部切断(15%程度採取)	切断後の胚を35mmシャーレ上のドロップで2~3時間回復培養 ※2

※1 発生培養液 5%CS 加 CR1aa

※2 回復培養液 20%CS 加 0.1mM システアミン又は β ME 加 TCM199

注1 供試胚 県内と場採取卵巣に体外受精を実施

表9 性判別率及び細胞採取後発生率又は回復率(単位 個、%)

処理方法	検体数	性判別数	発生培養数	性判別可能数	性判別率 ※1	細胞採取後	
						発生数 (発生率 ※2)	回復数 (回復率 ※2)
細胞分離	54	51	54	51	100.0a	33 (66.1)	—
切断(慣行)	18	17	16	14	76.5b	—	10 (62.5)

※1 性判別可能数/性判別数 × 100

※2 発生数又は回復数/発生培養数

注1 異符号間に有意差あり(カイ二乗検定、 $p < 0.01$)