

課 題 名	受精卵移植事業の普及定着化に向けた関連試験 (1) 黒毛和種における効率的過剰排卵処置方法の検討 － 肉用牛広域後代検定推進事業(育種牛群整備事業)－		
予 算 区 分	県 単	担 当	改良技術研究室 繁殖システム研究グループ
研 究 期 間	継 続 (平成23年度～)	協 力 関 係	県下5家畜保健衛生所 全国6県
研 究 目 的	近年、黒毛和種受精卵の需要が高まっている。そこで、効率的に移植可能な受精卵を確保するため、1回の採卵で回収される受精卵数及び受精卵の品質を向上させる採卵プログラムを検討する。		
全 体 計 画	1 黒毛和種の過剰排卵処理において、採卵成績を向上させる採卵プログラムを検討する。		
研 究 対 象	肉用牛	専 門 部 門	受精卵移植、家畜繁殖
<p>○ 本年度試験のねらい 黒毛和種の過剰排卵処置において、採卵成績を向上させる卵胞ウェーブ調整方法を検討する。</p> <p>試験 G n R H製剤を用いた卵胞ウェーブ調整方法の検討 (時 期) 平成27年4月～3月 (試験期間: 365日) (試験の内容) 過剰排卵処置の前にG n R H製剤とP Gを投与して、卵胞ウェーブを調整し、採卵成績を向上させることができるか、各県と共同で検討する。</p> <p>○ 前年度までの成果</p> <p>1 F S H製剤1回投与方法(対照区)において、e C Gを併用して投与(試験区)したところ、対照区では推定黄体数、回収卵数、正常卵数、Aランク数が14.8±8.5、11.8±9.2、7.6±8.3、6.2±7.2であったのに対して、試験区では24.6±12.4、23.2±14.2、14.2±10.0、12.6±9.1となった。有意な差はなかったものの、試験区において回数卵数、正常卵数、Aランク数が増加する傾向が認められた。</p> <p>2 G n R H製剤(試験区)とE 2製剤(対照区)を用いて卵胞ウェーブ調整を行ったところ、対照区では推定黄体数、回収卵数、正常卵数が24.5±21.9、22.0±24.0、14.5±14.8であったのに対して、試験区では16.0±9.9、10.5±4.9、7.5±6.4となり、有意な差は認められなかった。</p> <p>○ 協力関係・分担 青森県、宮城県、神奈川県、奈良県、京都府、宮崎県と共同試験 アドバイザー: (独)家畜改良センター</p>			

# 黒毛和種における効率的過剰排卵処理方法の検討

## 背景

受精卵移植(ET)による  
黒毛和種生産が年々増加

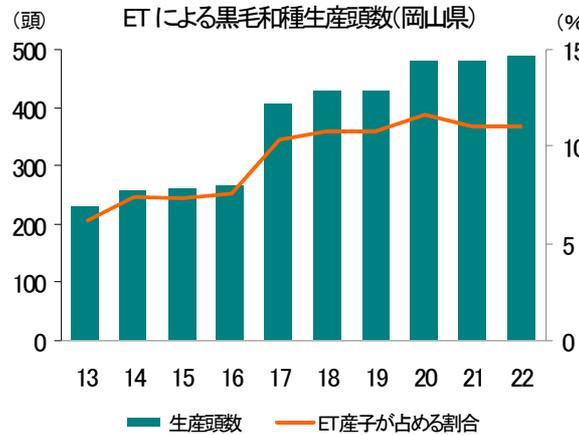


受精卵の安定的な確保が必要！



品質の良い受精卵がたくさん

採れる採卵プログラムを構築！



## 実施内容

- ①馬絨毛性生腺刺激ホルモンを併用した過剰排卵処理方法の検討  
→ 卵胞刺激ホルモンに併用して投与することで、正常卵数の増加及び品質向上につながるか検討
- ②性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤を用いた卵胞ウェーブ調整方法の検討  
→ 卵胞ウェーブを効果的に調整し、過剰排卵処理への反応性が向上するか検討

## 成果の活用

効率的に黒毛和種受精卵を生産できる！

→ 受精卵の安定的な確保

→ 受精卵の生産効率アップ！

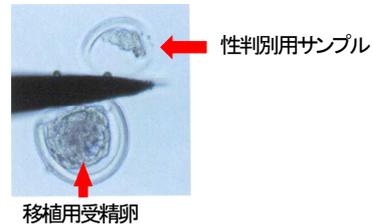


課 題 名	受精卵移植事業の普及定着化に向けた関連試験 (2) クライオトップで保存された性判別胚の直接移植法の検討 － 超高能力牛群高度利用システム化事業 － － 肉用牛広域後代検定推進事業（育種牛群整備事業） －		
予 算 区 分	県 単	担 当	改良技術研究室 繁殖システム研究グループ
研 究 期 間	平成21年 ～	協 力 関 係	県下5家畜保健衛生所 4道県と共同試験
研 究 目 的	性判別のためバイオプシーされた卵は耐凍性が低く、保存にはクライオトップを用いた超急速ガラス化が用いられている。クライオトップ法は、高い受胎性が得られる一方、農家での直接移植が困難であり、普及する上での課題となっている。 このため、フィールド普及を推進するため、クライオトップで保存された卵の農家の庭先で直接移植できる方法を検討する。		
全 体 計 画	1 クライオトップ保存された胚の庭先融解に適した融解時間、融解液を検討する。 2 ストロー内融解方法を検討する。 3 庭先融解による受胎性を検討する。 4 クライオトップで保存された卵の直接移植に向けた実証試験を行う。		
研 究 対 象	乳用牛、肉用牛	専 門 部 門	受精卵移植、家畜繁殖
<p>○ 本年度試験のねらい</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・フィールド技術者による超急速ガラス化卵の直接移植法の普及を検討する。</li> <li>・新しく開発された直接移植器具の有効性を検討する。</li> </ul> <p>試験1 性判別胚の直接移植技術の確立 クライオトップを用いて超急速ガラス化保存した性判別卵をフィールドで直接移植し、受胎性を調査する。</p> <p>試験2 新しく開発された直接移植器具の有効性の検討 新しい直接移植可能な保存器具を用いて超急速ガラス化保存した性判別卵の融解後の生存性並びに直接移植による受胎性を検討する。</p> <p>○ 前年度までの成果</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 クライオトップで保存した性判別卵の庭先融解に適した融解液を選択するため、融解媒液並びに融解液に添加するシュウクロース濃度を検討したところ、融解媒液に空気中でのpH変動の少ないPBS溶液を用い、添加するシュウクロース濃度を0.2Mに低くしても生存率、受胎性に影響がなく、庭先融解に利用可能であった。</li> <li>2 融解時に用いる希釈液中での保存時間を検討したところ、保存時間が5分(79.3%：23/29)、15分(89.7%：26/29)、30分(80.0%：24/30)のいずれであっても生存率に差はなく、直接移植を行う場合30分以内に移植を完了すれば問題ないことが明らかとなった。</li> <li>3 直接移植する場合のストロー内希釈時間を短縮するため融解時間を5分、2分、30秒と短縮して生存性を調査したところ、30秒に短縮しても生存率に差はなかった(5分：83.3%、2分：86.8%、30秒：86.5%)。このことから希釈時間を30秒に短縮し直接移植を実施した結果、58.0%(18/31)の良好な受胎率が得られた。</li> <li>4 直接移植法のマニュアルを作成し、研修会を実施後、家保による庭先融解・直接移植を実施したところ、受胎率は33.3%(7/21)と低率であったため、ストロー内家保融解切り替えたところを融解後の生存率が42.8%(6/14)と低かったが、生存卵の移植による受胎率は66.7%(4/6)と高かった。</li> </ol> <p>○ 協力関係・分担 北海道、静岡県、岐阜県、愛知県と共同試験 アドバイザー：(独)家畜改良センター</p>			

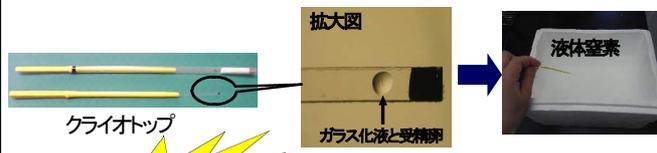
# クライオトップで保存された性判別胚の直接移植法の検討

## 背景および目的

- 性判別のため分割された受精卵は耐凍性がDown ↓
  - 従来の凍結法では、性判別受精卵の凍結は困難!
- (ストローに受精卵を充填して凍らせる方法)



- 性判別胚の凍結には、超急速ガラス化法が有効!
- (下の道具を用いてガラス化液(不凍液)中に受精卵を包埋して保存する方法で移植用のストローを用いない)
- 超急速ガラス化法の利用で性判別受精卵の受胎率向上!!



## 超急速ガラス化法の特徴

- 冷却スピードが速いため、細胞へのダメージが少ない → 融解後の生存性が高い
- 移植用ストローを用いない凍結方法であるため、実験室で融解後、受精卵をストローに詰め直す必要がある → 農家の庭先で利用できない

さらなる課題が...

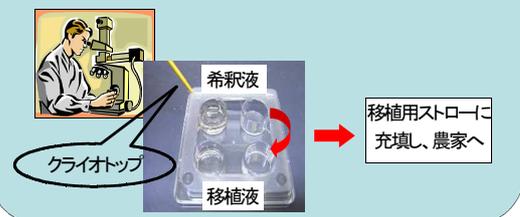
- 農家の庭先で人工授精を行うように直接移植できない
- フィールドから利便性の向上ができないの?
- (農家の庭先で人工授精を行うように液体窒素から取り出して融解し、そのまま移植できる方法の開発)

## 実施内容

- 1) 農家の庭先融解に適した融解液、融解時間の検討
- 2) ストロー内での融解手技の検討
- 3) 農家の庭先融解による受胎性の検討と実証試験

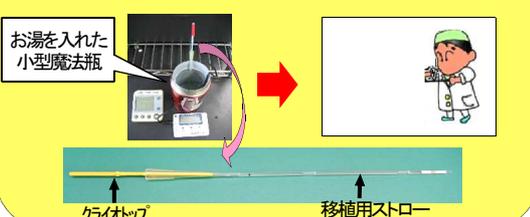
### 従来の融解方法

実験室内で融解後、移植用ストローに詰め直して農家へ



### 新しい融解方法

農家の庭先で移植用ストローを用いて融解後、直接移植



## 成果の活用

- 融解方法の工夫で直接移植が可能

- ⇒ 利便性UP !!
- ⇒ 普及の拡大 !!



課 題 名	受精卵移植事業の普及定着化に向けた関連試験 (3) 性選別精液を活用した受精卵の客観的品質評価方法の検討 － 超高能力牛群高度利用システム化事業 － － 肉用牛広域後代検定推進事業（育種牛群整備事業） －		
予 算 区 分	県 単	担 当	改良技術研究室 繁殖システム研究グループ
研 究 期 間	平成25年～	協 力 関 係	県下5家畜保健衛生所
研 究 目 的	性選別精液の普及に伴い、性選別精液を活用した受精卵の活用が見込まれるが、その品質について視覚的（主観的）な評価だけではなく、客観的な評価法を検討し、利用の拡大を図る。またあわせて凍結保存法について検討を行い、凍結保存卵としてのフィールドでの普及を計る。		
全 体 計 画	1 性選別精液を活用した受精卵の客観的な品質評価方法を検討する。 2 客観的評価に基づき卵の品質に適した凍結保存法を検討する。		
研 究 対 象	乳用牛	専 門 部 門	受精卵移植、家畜繁殖
<p>○ 本年度試験のねらい 性選別精液を活用した受精卵の客観的評価法を検討する。</p> <p>試験1 性選別精液を活用した受精卵の品質評価法の確立 性選別精液で生産された受精卵の呼吸量を測定し、これまでの視覚的評価、呼吸量、受胎性との相関を調査する。</p> <p>○ 前年度までの成果 通常精液を使用し、PCR法により性別別を実施した受精卵の受胎率は新鮮卵移植（58.5%：69/118）、クライオトップ凍結卵移植（38.6%：22/57）であったのに対して、性選別精液を利用した受精卵の受胎率は新鮮卵移植（36.8%：7/19）、超急速ガラス化保存卵移植（80.0%：4/5）、緩慢凍結によるダイレクト移植（41.0%：16/39）という結果であった。</p> <p>○ 協力関係 県下5家畜保健衛生所</p>			

# 性選別精液を活用した受精卵の客観的品質評価方法の検討

## 背景

- ・性選別精液の普及、利用が増大
- ・これ以外にも、性選別精液を活用した受精卵の利用も増大
- ・従来とおりの視覚的(主観的)な評価だけでは大丈夫？

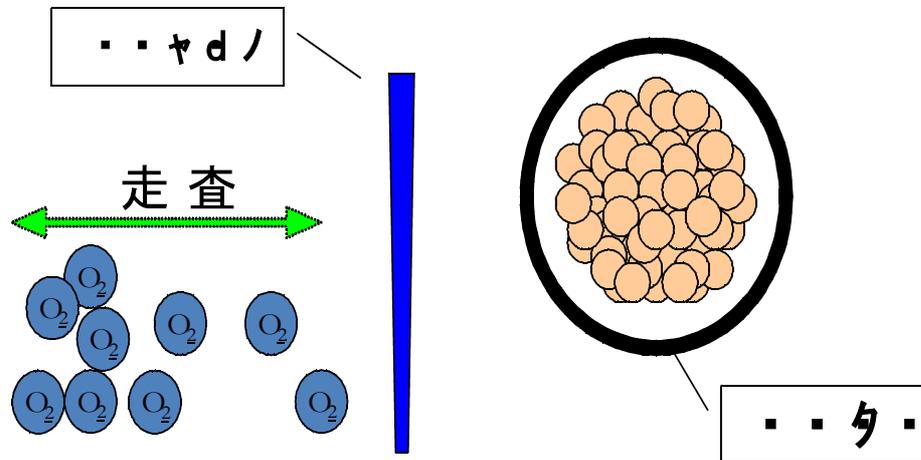


なにか客観的な品質評価方法はないか？  
凍結方法も今までどおりでいいのか？



## 実施内容

- ・品質の高い受精卵は酸素消費量も高いことに着目し、走査型電気化学顕微鏡を用いて、受精卵の呼吸量(酸素消費量)により客観的な品質評価を実施



- ・この技術により、呼吸量と視覚的品質評価との関連および受胎性について検討
- ・あわせて、凍結方法についても検討

## 成果の活用

- 客観的な品質評価により、
- ・性選別精液を活用した受精卵のさらなる利用拡大
  - ・受胎率の向上

課 題 名	受精卵移植事業の普及定着化に向けた関連試験 (4) 性選別精液を利用した体内卵生産の高度化 — 超高能力牛群高度利用システム化事業 —		
予 算 区 分	県 単	担 当	改良技術研究室 繁殖システム研究グループ
研 究 期 間	平成24年～	協 力 関 係	県下5家畜保健衛生所 全国9県と共同試験
研 究 目 的	性選別精液の利用が拡大してきているが、封入精子数が少なく、精子の運動持続時間が短いとされ、過剰排卵処理後の採卵成績が通常精液に比べ低く、改善が求められている。 そこで、性選別精液に適した採卵プログラムを構築し、フィールド普及を計る。		
全 体 計 画	1 排卵時間を集約させる採卵プログラムを検討する。 2 開発した採卵プログラムを用いて性選別精液による採卵成績を検討する。 3 フィールド普及を目指した採卵プログラムの実証試験を検討する。		
研 究 対 象	乳用牛	専 門 部 門	受精卵移植、家畜繁殖
<p>○ 本年度試験のねらい</p> <p>これまでに開発した採卵プログラムを用いてホルスタイン種における性選別精液による卵回収成績を調査し、フィールド普及の可能性を検討する。</p> <p>試験1 フィールド普及を目指した選別精液を用いた採卵成績の実証試験 岡山式過剰排卵プログラムを用いて選別雌精液による採卵をフィールドあるいは当所事業で実施し、採卵成績を調査する。</p> <p>試験2 正常卵数の向上を目指した採卵プログラムの検討 乾乳牛における正常卵数の向上を目指して過剰排卵プログラムの修正を行い、選別雌精液による採卵成績を検討する。</p> <p>○ 前年度までの成果</p> <p>1 優性卵胞除去とGnRH製剤投与を組み合わせた過剰排卵プログラムで排卵時間を調査した結果、GnRH製剤投与から48時間以内にほとんどの個体において排卵が終了していた。</p> <p>2 開発した採卵プログラム（通常法）を用いて性選別精液（試験区）と通常精液（対照区）で採卵成績を比較したところ、対照区では推定黄体数、回収卵数、正常卵数が14.8±11.2、14.5±13.7、11.9±10.7であったのに対して、試験区では14.5±10.4、15.3±12.8、6.3±9.2と有意な差はなかったものの、試験区で正常卵数が少ない傾向が認められた。ただ、採卵あたりの推定雌卵数（対照区：雌率50%、試験区：雌率90%）を比べると対照区6.0±5.4、試験区5.7±8.3と同等であった。</p> <p>3 性選別精液による卵回収成績の向上を目指して過剰排卵処理方法において通常法（対照区）とPG投与時間を遅らせた岡山法（試験区）で性選別精液を用いた採卵成績を比較したところ、対照区では推定黄体数、回収卵数、正常卵数が12.4±7.4、9.6±8.9、4.6±4.4であったのに対して、試験区では18.2±10.0、18.4±12.2、5.0±4.9と正常卵数では両区に差がなかったものの、推定黄体数、回収卵数では、試験区で増加する傾向が認められた。</p> <p>4 乾乳牛を用いた性選別精液による採卵成績を通常法（対照区）とPG投与時間を遅らせた岡山法（試験区）で比較したところ対照区で推定黄体数、回収卵数、正常胚数が15.0±9.4、12.3±10.0、5.8±5.0であったのに対して、試験区では24.5±11.4、26.5±13.0、2.5±2.5と推定黄体数、回収卵数は向上するものの正常卵数は逆に低下する傾向が認められた。</p> <p>○ 協力関係・分担</p> <p>栃木県、神奈川県、山梨県、岐阜県、愛知県、島根県、福岡県、宮崎県と共同試験 アドバイザー：（独）家畜改良センター、（一）家畜改良事業団</p>			

# 性選別精液を利用した体内卵生産の高度化

## 背景および目的

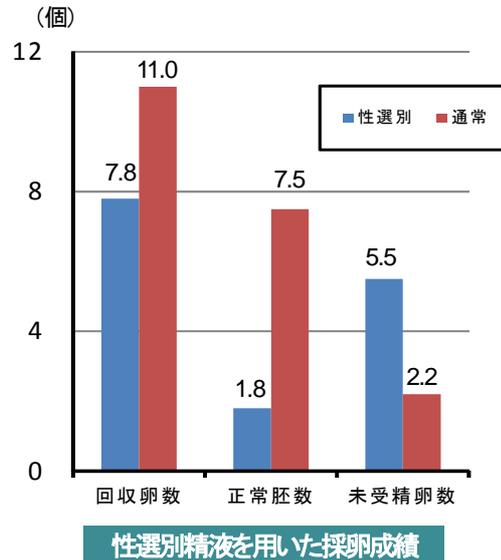
- 牛精液の性選別が可能となり、後継牛の計画的生産に利用
- フィールドでは性選別精液を用いた採卵の要望が増大
- 性選別精液を用いた採卵成績は通常精液に比べ低率

問題点は...

### 性選別精液の特徴

- 封入精子数が少ない  
(通常精液 3,000万個 VS 性選別精液 300万個)
- 運動活動時間が短い!!

少ない精子での受精が求められるため  
受精のタイミングが重要!



排卵時間をコントロールできる過剰排卵プログラムを構築できれば正常卵数が確保できるかも?  
(排卵時間を集中化した過剰排卵処理プログラムの開発)

## 実施内容

- 1) 排卵時間を集約させる採卵プログラムを検討  
? 卵胞ウェーブコントロールによる卵胞発育の斉一化とGnRH製剤の併用による排卵の集約化を調査
- 2) 開発した採卵プログラムを用いて性選別精液による採卵成績を検討  
? 新しく構築した過剰排卵プログラムでの通常精液と性選別精液での採卵成績を比較
- 3) フィールド普及を目指した採卵プログラムの実証試験  
? 採卵マニュアルを作成し、フィールドでの実証試験を実施

## 成果の活用

雌受精卵の安定的な確保が可能

- ⇒ 後継牛の計画生産率が向上!!
- ⇒ 雌受精卵の低コスト化!!  
(雌雄半別手数料: 9670円/個が不要)

