

## 高能力繁殖和牛の効率的作出技術の体系化 (I)

北川 師士・新居 康生

### 要 約

本県において黒毛和種素牛の供給は大きく不足しており、高能力な繁殖和牛の選抜と牛群の整備は緊急の課題となっている。そのためには、迅速に繁殖牛の能力を評価するための手法と、高能力と判定された繁殖牛から効率的に産子を得る技術が必要である。そこで、能力指標としての遺伝子診断・超音波診断の活用、および分娩サイクルに採卵を組み込んだ1年3産子確保技術について検討を行った。遺伝子診断については対象遺伝子のalleleと育種価の関連調査、超音波診断については肥育牛ロース部位画像を利用した客観的評価法の検討、1年3産子確保技術については分娩後80日以内の採卵の実証を行い、次の結果が得られた。

- (1) 場内飼養繁殖牛において成長ホルモン遺伝子型と育種価を比較すると、AA型がBB型より「枝肉重量」は有意に大きくなった。
- (2) 肥育牛のロース芯部位超音波画像の輝度と枝肉BMS No. の間に、 $r = 0.5120$ の相関がみられた。
- (3) 超早期離乳法または腔内留置型持続性黄体ホルモン製剤を活用することで、分娩後60.3±12.3日で採卵が可能であり、5.6±4.1個の正常卵が回収できた。

### 目 的

徳島県の牛出荷頭数は中国四国地域第2位であるにもかかわらず、県内で飼養されている繁殖和牛は約1,000頭と和生素牛の多くを県外に依存している状況にある。また、全国的な素牛供給不足から市場での子牛価格は高騰を続けており、能力の高い繁殖和牛の速やかな選抜と、多くの産子を確保する技術が必要とされている。

繁殖雌牛の産肉能力については育種価による評価・選抜がなされているが、産子の生産頭数が少なく評価が判明するまでに時間がかかること、地域独自の評価となること等問題点も多い。そこで、繁殖和牛の能力を直接評価する指標として遺伝子診断・超音波診断を対象とし、育種価を補完でき迅速に評価可能な指標として利用可能か、場内飼養繁殖牛と県内出荷された肥育牛を利用して検討を行った。遺伝子診断には成長ホルモン (GH: Growth Hormone) 遺伝子およびSCD (Stearoyl-CoA Desaturase) 遺伝子を用い、育種価との関連

を調査した。超音波診断については、指標として利用するために画像の評価法を確立する必要がある。そこで、肥育牛177頭の超音波診断画像と枝肉BMS No. を比較し、診断画像の客観的評価方法について検討を行った。

また、高能力と判断された牛については、優良牛群の効率的整備、黒毛和種肥育・繁殖素牛の安定的確保を図るため、多くの産子を得る必要がある。岡久ら(2003)は超早期離乳法・制限哺乳法を利用し発情回帰を早めることで1年1産が可能であることを示したが、さらに分娩後に1度受精卵回収を行うことで、1年3産子の確保が可能となる(図1)。1年3産子技術の必要条件となる分娩後80日以内の採卵について、超早期離乳を利用して実証を行った。

## 材料および方法

### 1-1. DNAの調整

場内で飼養されている黒毛和種繁殖牛34頭の尾根部体毛より毛根部分を採取し、ISOHAIR (NIPPON GENE) を用いてtotal DNAを抽出した。抽出と並行してRNase処理を行い、RNAを除去した。サンプルは分光光度計でDNA濃度を測定し、PCRの鋳型として調整した。

### 1-2. 成長ホルモン遺伝子型の判定

Chikuniら(1997)の方法に基づき、成長ホルモン遺伝子型を判定した。すなわち、Go Taq Green Master Mix (Promega) を用いて、表1に示す組成と表2に示すサイクルでmultiplex PCRを行い、3%アガロースゲルによる電気泳動で遺伝子型を判定した。プライマーはChikuniらの配列 (GH4F, GH5R, GHAR, GHABR) を外注して使用し、サーマルサイクラーはTaKaRaのTP-600を用いた。

### 1-3. SCD遺伝子型の判定

Taniguchi (2004) らの方法に基づき、SCD遺伝子型を判定した。すなわち、Go Taq Green Master Mix (Promega) を用いて、表3に示す組成と表4に示すサイクルでPCRを行い、10 $\mu$ lのPCR産物を2.0 unitの*Fnu*4HIで消化した後、15%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で遺伝子型を判定した。プライマーはTaniguchiらの配列 (SCD-F878, SCD-R878) を外注して使用し、サーマルサイクラーはTaKaRaのTP-600を用いた。

### 1-4. 超音波診断画像の客観的評価法の検討

出荷前に撮影した肥育牛177頭の超音波診断画像を用い、ロース芯部位を画像処理ソフトを利用して解析した。繁殖牛のロース芯は低脂肪交雑であり画像の明るさと比例すると考えられるため、

ロース芯部位の輝度と枝肉BMS No. との関係を調査した。

### 2-1. 超早期離乳を利用した分娩後80日以内の採卵

岡久ら(2003)により、黒毛和種は分娩後26日から27日で子宮が回復することが示されている。そこで、分娩後7日で母子分離を行い、次法により受精卵の回収を行った。発情開始日を0日として10日目からのFSH(20 A.U.)漸減投与(10,6,4)、PG投与(12日目)およびAI(14日目)を行い、21日目に子宮洗浄法により受精卵を回収した。採卵は計7頭で実施し、このうち、2頭は分娩後30日で膈内留置型持続性黄体ホルモン製剤(CIDR)を装着し、40日で過剰排卵処理を開始した。他は自然発情による処理の開始とした。

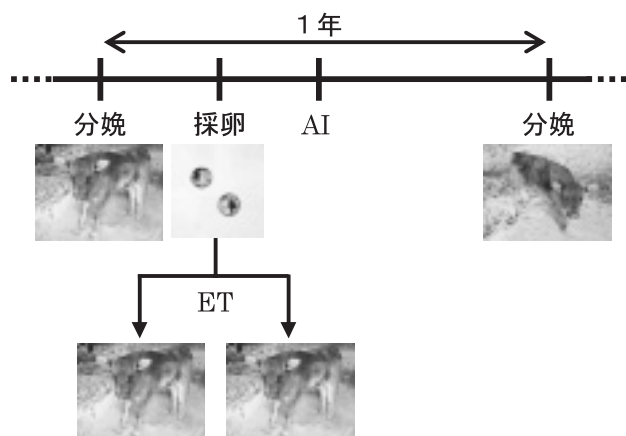


図1 1年3産子確保模式図  
(受精卵回収時の正常卵数は4個で、  
移植時の受胎率は50%とした)

表1. GH遺伝子型判定PCR組成

Go Taq Green Master Mix	10 $\mu$ l	
primer GH4F	8 pmol	(0.4 $\mu$ M)
primer GH5R	8 pmol	(0.4 $\mu$ M)
primer GHAR	3.2 pmol	(0.16 $\mu$ M)
primer GHABR	3.2 pmol	(0.16 $\mu$ M)
template DNA	40 ng	
nuclease free dH <sub>2</sub> O		
volume	20 $\mu$ l	

表2. GH遺伝子型判定PCRプログラム

pre-denaturation	95°C	5 min.	} 30 cycles
denaturation	94°C	30 sec.	
annealing	64°C	45 sec.	
extension	72°C	45 sec.	
post-extension	72°C	7 min.	

表3. SCD遺伝子型判定PCR組成

Go Taq Green Master Mix	10 $\mu$ l	
primer SCD-F878	10 pmol	(0.5 $\mu$ M)
primer SCD-R878	10 pmol	(0.5 $\mu$ M)
template DNA	20 ng	
nuclease free dH <sub>2</sub> O		
volume	20 $\mu$ l	

表4. SCD遺伝子型判定PCRプログラム

pre-denaturation	94°C	2 min.	} 40 cycles
denaturation	94°C	30 sec.	
annealing	63°C	30 sec.	
extension	72°C	1 min.	
post-extension	72°C	7 min.	

## 結果および考察

### 1-1.

場内飼養繁殖牛において、GH遺伝子型はAA型が7頭、AB型が4頭、AC型が3頭、BB型が6頭、BC型が10頭、CC型が4頭であった。また、SCD遺伝子型はAA型が4頭、AV型が22頭、VV型が8頭であった。これらのうち、育種価の判明している繁殖牛について育種価と遺伝子型を比較したところ、項目「枝肉重量」においてGH遺伝子AA型がBB型より有意に高い値を示した(表5)。GH遺伝子についてはA型遺伝子の存在で枝肉重量が重くなることが報告されており(片岡ら2000, 塩田ら2004, 岡ら)、ホモ型のalleleは必ず産子に伝わるため、AA型の枝肉重量育種価が高くなったものと思われた。

### 1-2. 超音波診断画像の客観的評価法の検討

肥育牛177頭の出荷前超音波診断画像を解析した結果、ロース芯部位の画像平均輝度とBMS No.の間に、 $r = 0.5120$ の相関がみられた(図2)。輝

度には数値として上限が存在し上限への漸近が予想されることから、近似曲線には対数関数を採用した。

### 2-1. 超早期離乳を利用した分娩後80日以内の採卵

場内で分娩した繁殖牛のうち、計7頭で採卵の実証を行った。分娩から採卵実施日までの日数(±標準偏差)は $60.3 \pm 12.3$ 日(自然発情牛のみは $63.8 \pm 13.2$ 日)、採卵成績は表6のとおりであった。有安ら(2003)、極山ら(2005)はCIDRを活用し、それぞれ分娩後52日および62日、分娩後61日から69日で採卵を行っている。正常卵個数はいずれの報告とも差はなかったものの、自然発情による採卵の問題点として採卵実施日のばらつきが大きさが示唆された。

表5. 繁殖牛GH遺伝子型と育種価

遺伝子型	頭数	枝肉重量* (kg)	ロース芯 (cm <sup>2</sup> )	バラ厚 (cm)	皮下脂肪 (cm)	歩留	脂肪交雑
AA	3	21.67±7.83	1.44±0.78	0.16±0.13	0.29±0.20	-0.23±0.27	0.25±0.16
BB	4	6.87±4.22	0.95±1.56	-0.11±0.20	-0.03±0.12	-0.01±0.09	0.27±0.19

\* : P < 0.05

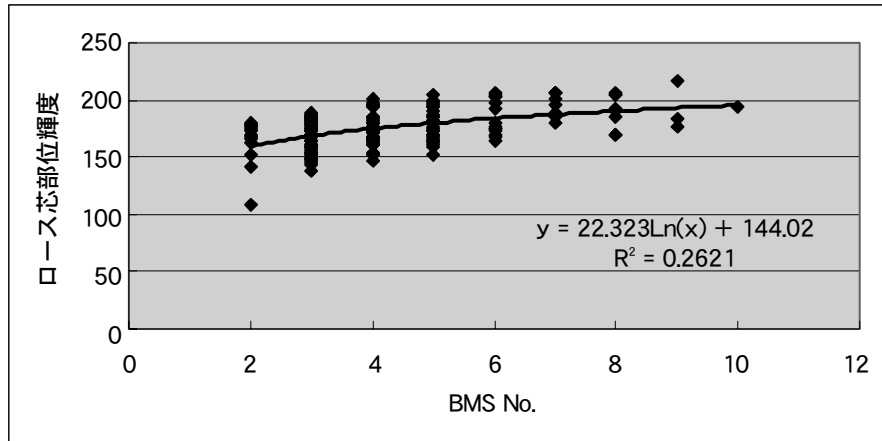


図2 超音波画像ロース芯部位輝度と BMS No. の関係

表6. 採卵実施日および採卵成績

採卵牛	実施日 (分娩後日数)	SOV タイプ	回収個数 (個)	内 訳				正常卵率 (%)
				正常卵		未受精卵	変性卵	
				Aランク	Bランク			
A	47	自然発情	5	4	1	0	0	100.0
B	51	CIDR	10	5	0	5	0	50.0
C	52	CIDR	5	4	0	1	0	80.0
D	57	自然発情	15	6	6	0	3	80.0
E	61	自然発情	12	6	4	0	2	83.3
F	75	自然発情	3	1	2	0	0	100.0
G	79	自然発情	1	0	0	1	0	0
平均	60.3	—	7.3	3.7	1.9	1.0	0.7	76.5
標準偏差	12.3	—	5.1	2.4	2.3	1.8	1.3	—

## 引用文献

- Chikuni, K., Fukumoto, Y., Tanabe, R., Muroya, S., Ozawa, S. (1997) A simple method for genotyping the bovine growth hormone gene. *Animal Genetics* 28: 230-232
- Taniguchi, M., Utsugi, T., Oyama, K., Mannen, H., Kobayashi, M., Tanabe, Y., Ogino, A., Tsuji, S. (2004) Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm. Genome* 14: 142-148
- 有安亮代・小田頼政・小田亘・山本康廣・塚本章夫 (2003) 胚移植技術を応用した「1年1産1採胚」技術の確立. 岡山総畜セ研報14:35-40
- 岡章生・龍田健・岩本英治 黒毛和種肥育牛における成長ホルモン遺伝子多型と産肉性との関連. 平成15年度近畿中国四国農業研究成果情報
- 岡久靖司・新居康生・林和徳 (2003) 肉用子牛生産性向上技術の確立について. 徳島畜研報 3 :64-66
- 片岡博行・馬場誠・石川和人・塚本章夫 (2000) 岡山県の黒毛和種における牛成長ホルモン遺伝子の多型と産肉性. 岡山総畜セ研報11:1-4
- 極山太・森田誠・宮城信司・安村修 (2005) 黒毛和種の効率的な採胚と採胚後の早期受胎技術. 京都畜技セ研報 2:42-46
- 塩田鉄朗・有安亮代・栗木隆吉・平本圭二 (2004) 黒毛和種における牛成長ホルモン遺伝子多型と産肉特性について. 岡山総畜セ研報15:54-58