



# 畜産技術ひょうご

第 144 号 (発行: 2022 年 11 月)

## 目 次

### 【衛生情報】

ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法の  
山羊における有用性の検討…………… 2  
朝来家畜保健衛生所 川口 黎子

### 【普及情報】

高病原性鳥インフルエンザ発生農場の経営再建支援…………… 4  
北淡路農業改良普及センター 梅脇 冨矢香

### 【家畜診療所だより】

黒毛和種繁殖牛の膈壁に発生した  
炎症性ポリープの一症例…………… 7  
兵庫県農業共済組合 南あわじ家畜診療所 小河原 愛理

### 【研究情報】

但馬牛改良に向けた伸長胚からのゲノム解析の検討…………… 10  
兵庫県立農林水産技術総合センター 北部農業技術センター三木 遥子



第 12 回全国和牛能力共進会 第 6 区 (総合評価群) 出品代表牛 (種牛)

(右より中村文吾さん、村尾和広さん、上田伸也さん、植田秀作さん)

左の二人は肉牛群出品の県立農業高校および県立農業大学校

## 巻 頭 言

コロナ対策が緩和され、様々な会議や行事が 3 年ぶりに対面で開催されるようになった。当たり前と思っていたことが、当たり前でない状況を経験し、当たり前のありがたさが身に染みた。また、当たり前輸入され供給されると思っていた飼料が、お金を出しても買えない状況も経験したことにより、日々の飼養管理の中で、当たり前のことを当たり前に行うことがどんなにありがたく、かつ難しいことを改めて強く認識させられている。

海外渡航者の人数制限撤廃と全国旅行支援が 10 月 11 日から実施され、円安の影響も加わりコロナ前と同等かそれ以上の内外観光客が日本各地を訪れることになる。それにともない、枝肉の需要拡大が見込まれる一方で、牧場への立入制限等のさらなる飼養衛生管理基準の点検と見直しが必要になるだろう。

現在、畜産を含む「農業」を取り巻く状況は、かつてないほど厳しい状況であることは間違いない。はたして 3 年前の状態に戻るだろうか。今は何とか「踏ん張って」と願うばかりだ。

そんな中、自身の明るい話題がある。休暇で岩手県にある「牛の博物館」に立ち寄った際、前沢牛の基礎を作った種雄牛 3 頭のはく製と出会った。体格は想像していたよりも小柄だった。それもそのはず 3 頭ともすべて純粋な但馬牛であった。遠い地で地域の基軸となり活躍していた但馬牛たちを誇らしく思った。そして、5 年に一度開催される全国和牛能力共進会が、今年度、和牛生産日本一の鹿児島で盛会に開催された。「和牛新時代、地域かがやく和牛力」のテーマにふさわしくベテランと若手が一致団結して牛を育て上げる姿にこれからの畜産の底力を感じた。兵庫県勢も改めて資質の高さを評価され、関係者各位の努力と技術に感服した。和牛新時代のスタート、すこし気持ちが前向きになった。

(M.H)

本紙は、インターネットを利用して掲載しております。またメールによるファイル送信も受付しています。  
事務局:公益社団法人兵庫県畜産協会 URL <http://hyougo.lin.gr.jp> E-mail [sien@hyotiku.ecweb.jp](mailto:sien@hyotiku.ecweb.jp)

## 衛 生 情 報

### ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法の山羊における有用性の検討

朝来家畜保健衛生所 川口 黎子

#### はじめに

ヨーネ病 (JD) は牛だけではなく、緬山羊にも同様に下痢や消瘦等の症状を引き起こす法定伝染病である。現在、牛飼養農場でヨーネ病が発生した場合、JD 防疫対策実施要領に基づき、ELISA 法によるスクリーニング検査を実施した後、ELISA 陽性牛に対してヨーネジーン・KS (共立製薬(株))を用いた定量判定リアルタイム PCR 検査 (qPCR) を行い、患畜を摘発している。一方で、緬山羊には国内承認された ELISA キットが無く、緬山羊を多数飼養している動物園等の施設で JD が発生した場合、簡便で迅速なスクリーニング検査が実施できない状況である。

平成 28 年より市販されている、ヨーネプライマーセット RL ((株)ファスマック) は、JD の定性判定によるスクリーニング遺伝子検査 (sPCR) 用に開発された試薬である。この試薬は、糞便を最大 10 検体までプール可能であり、また、qPCR でハンドリングエラーの要因となる陽性対照の希釈、及び反応液の分注が不要であることから、JD 検査を簡便化できる。

今回、山羊由来野外株における sPCR の有用性について検討したので、その概要を報告する。

#### 材料及び方法

1. ヨーネ菌 DNA 量が判明している JD 患畜山羊糞便 16 検体について、動物衛生研究部門 (動衛研) の『ヨーネ病検査マニュアル』に従って糞便液を作成後、DNA を抽出し、sPCR 試薬の取扱説明書に従って PCR を実施し、個別検体における sPCR の検査感度を確認した。

2. ヨーネ菌 DNA 量が 0.0004~0.04 pg/well で

ある 10 検体について、動衛研の『プール糞便を用いたヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法』に従って糞便液をヨーネ菌陰性糞便液で 10 倍希釈した 10 頭プール糞便液を作成し、遠心して上清を除いた上で DNA 抽出及び sPCR を実施し、10 頭プール検体における sPCR の検査感度を確認した。

3. sPCR と qPCR について、検査所要時間や試薬単価について比較した。

#### 結果

1. 個別検体の sPCR では、15/16 検体が陽性を示した。このうち、ヨーネ菌 DNA 量が 0.001 pg/well 以上である定量陽性検体では 14/15 検体 (93.3%) が陽性を示した (表 1)。

2. 10 頭プール検体の sPCR では、8/10 検体が陽性を示した。また、プール前に定量陽性であった検体では 8/9 検体 (88.9%) が陽性を示した (表 2)。

表 1 個別検体の sPCR 結果

#### 結果

検体番号	DNA量 (pg/well)	個別 sPCR
1	6.51	+
2	2.20	+
3	0.263	+
4	0.068	+
5	0.040	+
6	0.014	+
7	0.011	+
8	0.010	+
9	0.010	+
10	0.008	+
11	0.005	+
12	0.003	+
13	0.001	+
14	0.001	+
15	0.001	-
16	0.0004	+

#### 1 (1) 個別検体でのsPCR

DNA量 (pg/well)	定量判定陽性	
	<0.001	0.001≤
検体数	1	15
陽性検体数	1	14

- 15/16検体陽性 (93.8%)
- 定量陽性検体は14/15検体陽性 (93.3%)

3. 各検査の所要時間について、PCR の反応時間は同一であったが、試薬の調整時間が sPCR では 15 分短縮された。また、今回は未比較の DNA 抽出においても、sPCR ではプール検体を利用できることから、個別検体よりも作業時間の短縮が見込まれる。

30 検体当たりの試薬単価について、qPCR は 55,000 円であったのに対し、sPCR では 18,000 円と、37,000 円が削減された。

**まとめ**

個別 sPCR では、定量陽性検体の 93.3%を検出した。また、10 頭プール sPCR では、定量陽性検体の 88.9%を検出した。10 検体プールでの検査が可能であることから、検体数が削減でき、検査労力の軽減やハンドリングエラーのリスク低減が見込まれる。qPCR よりも検査時間は短縮され、費用も削減された。

以上より、sPCR は山羊における JD スクリー

ニング検査にも有効であると思われる。

**【実際の検査での想定】**

実際に行う検査では、以下のような検査体制を想定している。①新規発生等、農場内の汚染状況が不明な農場では、全頭についてプール検体による sPCR を実施し、陽性および判定不能検体については、続けて qPCR を実施する。②清浄性確認検査を継続中など、ある程度汚染状況を把握できている農場では、患畜と血縁関係がある、同一房での飼養歴があるなど JD 陽性リスクが高い個体については、個別検体による sPCR を実施し、その他の個体については、プール検体による sPCR を実施する。

今後、農場での検査回数を重ね、最適なプール頭数や、プール検査あるいは個別 sPCR の選択基準、プール検査実施後における個別 sPCR の必要性といった事項についてさらなる検討を行っていく (図 1)。

表 2 10 頭プール検体の sPCR 結果

**結果**

1 (2) 10頭プール検体でのsPCR

	DNA量 (pg/well)	10頭プール sPCR
①	0.04	+
②	0.01	+
③	0.01	+
④	0.008	+
⑤	0.005	+
⑥	0.003	+
⑦	0.001	+
⑧	0.001	+
⑨	0.001	-
⑩	0.0004	-

定量判定陽性	
DNA量 (pg/well)	<0.001   0.001≤
検体数	1   9
陽性検体数	0   8

- 8/10検体陽性 (80%)
- 定量陽性検体は8/9検体陽性 (88.9%)

**実際の検査での想定**

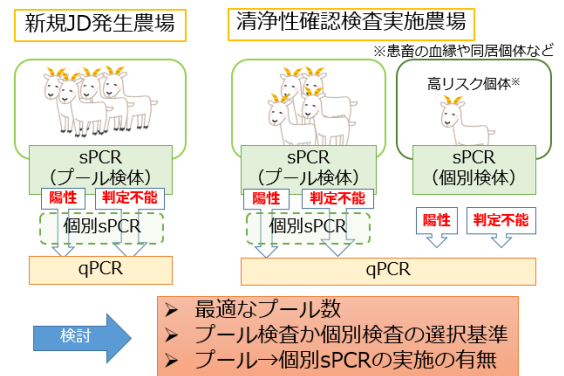


図 1 実際の検査方法想定

普及情報

高病原性鳥インフルエンザ発生農場の経営再建支援

北淡路農業改良普及センター 梅脇 冨矢香

はじめに

令和2年11月25日、淡路市内の採卵鶏農場（以下「A農場」）において、高病原性鳥インフルエンザ（以下「HPAI」）が発生した。殺処分や農場消毒などの防疫措置は同年12月3日に完了したが、経営再建に向けた計画はまだ無い状態だった。そこで、関係機関との協力による支援を展開した。

が必要となる。そこで、A農場代表者、淡路市、淡路家畜保健衛生所（以下「家保」）、洲本農林水産振興事務所（以下「農林」）、北淡路農業改良普及センター（以下「普及センター」）で経営再建支援チーム（以下「支援チーム」）を立ち上げた。

初回の支援チーム会議では経営再建に向けた防疫、臨床検査等のスケジュール、各関係機関の経営支援内容を共有した。具体的には、A農場代表者は導入雛の調整、家保は防疫や臨床検査を中心とした対策の指導、農林は各資金等の申請書類の作成支援、普及センターは飼養管理および採卵計画（表）や申請書類の作成支援、渡り鳥対策お

経営再建に向けた取組

(1) 経営再建支援チームの活動

A農場では、経営再建に向け防疫・臨床検査等

表 飼養管理計画書の一部

鶏舎	飼養管理計画						鶏卵生産量(kg)						
	成鶏舎への導入年月	導入羽数	導入日齢	採卵開始日齢	採卵終了日齢	淘汰年月	R3.5	R3.6	R3.7	R3.8	R3.9	R3.10	R3.11
5号鶏舎	R3.4	24,000	120	150	550	R4.6	43,747	43,747	43,747	43,747	43,747	43,747	43,747
6号鶏舎	R3.6	27,000	120	150	550	R4.8			49,216	49,216	49,216	49,216	49,216
1号鶏舎	R3.8	27,000	120	150	550	R4.10					49,216	49,216	49,216
2号鶏舎	R3.10	27,000	120	150	550	R4.12							49,216
3号鶏舎	R3.12	27,000	120	150	550	R5.2							
4号鶏舎	R4.2	24,000	120	150	550	R5.4							
計		156,000					43,747	43,747	92,963	92,963	142,179	142,179	191,395
育成舎	入雛年月	入雛羽数	移動日齢	移動先	成鶏舎への導入年月	導入先	R3.4・6は成鶏を導入						
	R3.5	27,000	120	1号鶏舎	R3.8	孵卵場	1ヶ月の生産量の算出方法 羽数 × 生存率 × 日卵量 / 1000 30日 生存率 98% 日卵重 62g						
	R3.7	27,000	120	2号鶏舎	R3.10	孵卵場							
	R3.9	27,000	120	3号鶏舎	R3.12	孵卵場							
計		81,000											

採卵計画 鶏舎	令和3年度計画												令和4年度計画							
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8			
1号鶏舎					20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800			
2号鶏舎							20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800			
3号鶏舎										20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800			
4号鶏舎																19,200	19,200			
5号鶏舎	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	17,736	消毒期間				
6号鶏舎			20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800			
卵のサイズ																				
SS(40~45g)	17,736		20,800		20,800		20,800			20,800						19,200				
S(46~51g)		17,736		20,800		20,800		20,800			20,800						19,200			
MS(52~57g)			17,736	17,736	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800	20,800		20,800	20,800							
M(58~63g)					17,736	17,736	38,536	38,536	59,336	41,600	62,400	41,600	41,600	41,600	41,600	20,800	20,800			
L(64~69g)										17,736	17,736	38,536	38,536	41,600	41,600	41,600	41,600			
LL(70~75g)														17,736	17,736	20,800	20,800			
合計(個数/日)	17,736	17,736	38,536	38,536	59,336	59,336	80,136	80,136	80,136	100,936	100,936	100,936	100,936	100,936	100,936	102,400	102,400			



よび堆肥処理等の指導を行った。

## (2) 渡り鳥飛来対策の実施

HPAI が発生した鶏舎に隣接する貯水池にカモ類、カラス、スズメ等の野鳥がおり、鶏舎の隙間から侵入した痕跡があった。また多数の野鳥の侵入目撃などから支援チームでは野鳥のふんから感染したものと推測した。野生動物対策の一環として、貯水池でウイルスを媒介する野鳥の飛来対策等を実施し、飼養衛生管理基準に必要な防疫効果について検証した。飛来対策前は貯水池を囲むように雑木が生い茂っており、4羽/日の野鳥の飛来が確認されていた（写真1）。

そこで、支援チームは令和3年3月に貯水池周辺の雑木伐採および防鳥対策として貯水池上部にテグスを張った。カモ類やカラスの翼開長（翼を広げたときの端から端までの長さ）は1m前後なのでテグスが羽ばたきの邪魔になるように概ね1m間隔で設置した。更に貯水池を囲むフェンスの上部が野鳥の休憩場所になってしまうため、ステンレスピンを設置し、貯水池周辺に野鳥が留まらないよう飛来防止対策を実施した。

また、野鳥飛来防止の効果を高めるため、令和3年10月に劣化で緩んだり切れたテグスを張り替える際にテグスに反射テープを設置した。併せて毎年A農場自ら張替ができるよう、A農場代表者および従業員にテグスの張り方を指導した（写真2）。

貯水池への野鳥の飛来数を確認するため、野生

動物用のトレイルカメラを設置し、効率的に効果を確認した。また小動物が侵入可能な大きさの隙間が鶏舎内外の防鳥ネットや鶏舎壁に認められたため、野生動物への対策を徹底するよう指導した。

## (3) 飼養衛生管理基準遵守に向けた取組

以前は幼雛を導入していたが、早期に経営再建できるように、大雛の導入に変更することにより導入から採卵までの期間を短縮する計画作成を支援した。導入の1週間～1か月前の立入検査により、飼養衛生管理基準の遵守状況を確認した。特に HPAI 発生時に国から派遣された疫学調査チームから不遵守が指摘された専用着、専用靴及び手指消毒、車両消毒について重点的に指導し、遵守できるまで立入検査を行った。立入は、消費者に向けた見学を実施している直売所も対象として実施し、冬期の鶏の飼育展示は中止するよう家保が中心となり指導を行った。

## (4) 衛生管理研修会の実施

出荷を再開するにあたり、衛生管理の徹底が求められており、従業員も含め関係者が一丸となって鶏舎隙間の点検・修繕、防鳥ネットの設置・修繕などを進めた。また、農場 HACCP や畜産 GAP のような国が推進する認証制度に取り組むことで、農場全体の衛生管理を見直す機会にしたいという意向があった。

そこで、A農場の従業員を対象に、令和3年7月から隔月で農場 HACCP 指導員資格を持つ家



写真1 飛来防止対策前の貯水池



写真2 テグスに反射テープを設置した貯水池

保職員と畜産 GAP 指導員資格を持つ普及センター職員が、それぞれの取組の違いや取組方法についての研修会を開催した（写真 3）。

### 普及活動の成果

関係機関と協力しつつ、早期経営再建に取り組み、防疫措置完了から約 140 日後の令和 3 年 4 月に経営を再開した。

野鳥飛来対策を実施したことにより、野鳥の飛来数が 4 羽/日が 0～1 羽/日となった。その結果、令和 3 年から令和 4 年にかけて、HPAI の再発は確認されなかった。A 農場では衛生管理を意識した働き方が広がっており、今後もさらなる飼養衛生管理基準遵守に向けた取組を進めていく必要がある。

また、A 農場の従業員が中心となり、令和 3 年

11 月から直売所併設施設にて消費者向けに HPAI の発生当時から経営再開までの約 5 か月をまとめたギャラリーを公開した（写真 4）。

### おわりに

A 農場では令和 4 年 3 月、飼養羽数及び生産量は HPAI 発生前まで戻っており、販売量及び販売額も回復してきている。同年 6 月には、疫学調査チームが指摘した箇所を含め全ての事項が遵守されたことを確認し、全鶏舎の立入検査が完了した。

今後は、疾病の発生防止による安定した生産及び安全・安心な食品を提供することによる顧客の拡大のため、農場 HACCP 認証取得に向けて支援していく。



写真 3 農場全体を対象とした衛生管理研修



写真 4 ギャラリーの様子



## 家畜診療所だより

### 黒毛和種繁殖牛の膣壁に発生した炎症性ポリープの一症例

兵庫県農業共済組合 南あわじ家畜診療所 小河原 愛理

牛の膣に発生する腫瘍には、ホルスタイン種で線維腫、平滑筋腫、平滑筋肉腫、黒毛和種で線維腫、牛伝染性リンパ腫などが報告されている。今回、黒毛和種繁殖牛において膣壁に認められた腫瘍を外科的に切除し、病理組織学的検査により炎症性ポリープと診断した。炎症性ポリープは長期にわたる膣脱に起因するものと推察された。

#### 材料および方法

##### 症例概要

症例は黒毛和種繁殖牛で2011年生まれの9歳であった。2017年3月本農場に導入され、導入時から起立で自然還納するこぶし大の軽度の膣脱が認められていた。往診依頼があった前日の2020年12月6日に畜主による牽引で介助分娩しており、翌日の12月7日に食欲不振との稟告で診療した。



図1 腫瘍肉眼所見（第3病日）

##### 臨床経過

第1病日は食欲・活力の減退が認められた。胎盤は排出済みであり、産道損傷の有無を確認するため内診したところ、外陰部より約15cm深部の膣前庭背側壁に約1cm×8cm×8cm大の腫瘍を触知した。腫瘍は有茎で、表面はブドウの房状の凹凸を呈し、暗赤色で一部に黄白色の膿様物が付着していた（図1）。また、牽引することで疼痛を呈した。腫瘍による外尿道口の閉鎖はなく、排尿は可能であり、治療としてセファゾリンナトリウムを投与した。第2病日には全身状態の良化が認められたが、腫瘍に変化は認められなかった。第3病日に携帯型超音波画像診断装置を用いて超音波検査を行い、腫瘍茎部を絹糸にて結紮し、経過観察とした。また、同時に採血を行い自動血球計数機および生化学自動分析装置にて血液検査を実施した。

2週間後の第17病日に腫瘍結紮部の脆弱化を確認したため、用手にてある程度剝離した後に外科剪刃にて切除を行った。採取した腫瘍を用いて病理組織学的検査を行った。また、第53病日に再度血液検査を行った。

##### 結果

##### 超音波検査

腫瘍の長軸像・短軸像ともに、全体的に均一な高輝度エコー像のみで、内腔や流動性は認められなかった（図2）。

##### 血液検査

表1に示した。第3病日では、白血球数(WBC)、コレステロール(T-CHO)の低値を認めたが、その他に異常な項目は認められなかった。第53病

日では、WBC は正常値まで増えたが T-CHO は変化が認められなかった。

#### 病理組織学的検査

表面に認められていた黄白色の膿様物は偽膜と膿の混合物であった (図 3)。腫瘍の表面付近では赤血球と多数のリンパ球および形質細胞の浸潤が認められた (図 4)。中間層の付近ではリンパ球および形質細胞のほか一部膠原線維の析出が認められた (図 5)。また、より内層では膠原線維がほとんどを占めており、膠原線維と浸潤した細胞とで結合組織の形成が認められた (図 6)。最内層の付近には中型の動静脈が認められた (図 7)。

#### 考察

超音波検査では腔壁に対する腫瘍の浸潤が認められず局所に限定されて見えたことや内腔がないこと、病理組織像で核の分裂像がない炎症細胞により形成された肉芽腫であったことなどから、本症例は腔前庭背側壁の局所に発生する良性

腫瘍であると判断した。ポリープは消化管粘膜に生じる付着部の細い上皮性腫瘍であり、そのうち炎症性ポリープは、多彩な炎症性細胞の浸潤による肉芽腫を正常な上皮が覆う、あるいは高分化な胚中心がみられるリンパ球の病変を上皮が覆っているポリープであると定義されている。これらの検査結果を踏まえ、炎症性ポリープと診断した。

炎症性ポリープは犬や人の腸管において多数報告されているが牛での報告は少ない。

症例は長期にわたり腔脱が認められていたことから、外陰部より脱出した腔壁の一部が地面と擦れるといった慢性刺激に加え、外傷が加わったことにより、炎症性の肉芽組織が形成され炎症性ポリープとなったと考えられる。腫瘍が大きくなるにつれ腔壁とも擦れることが刺激となり、さらに内部で腫大していったものと考えられ、このこ

表 1 血液検査結果

		第3病日	第53病日
WBC	/ $\mu$ L	2,700	4,800
RBC	$10^4$ / $\mu$ L	563	594
HCT	%	32.4	33.2
PLT	$10^4$ / $\mu$ L	34.6	27.1
TP	g/dL	7.7	9.3
ALB	g/dL	2.9	3.2
GLOB	g/dL	4.8	6.1
A/G		0.6	0.5
GLU	mg/dL	90	70
T-CHO	mg/dL	71	67
AST	U/L	68	43
GGT	U/L	31	36
TBIL	mg/dL	0.2	0.1
BUN	mg/dL	17.1	14.5
CRE	mg/dL	1.0	0.9
CPK	U/L	57	43
Ca	mg/dL	9.4	9.9
IP	mg/dL	5.7	4.6
Na	mEq/L	141	144
K	mEq/L	4.4	4.1
Cl	mEq/L	101	105

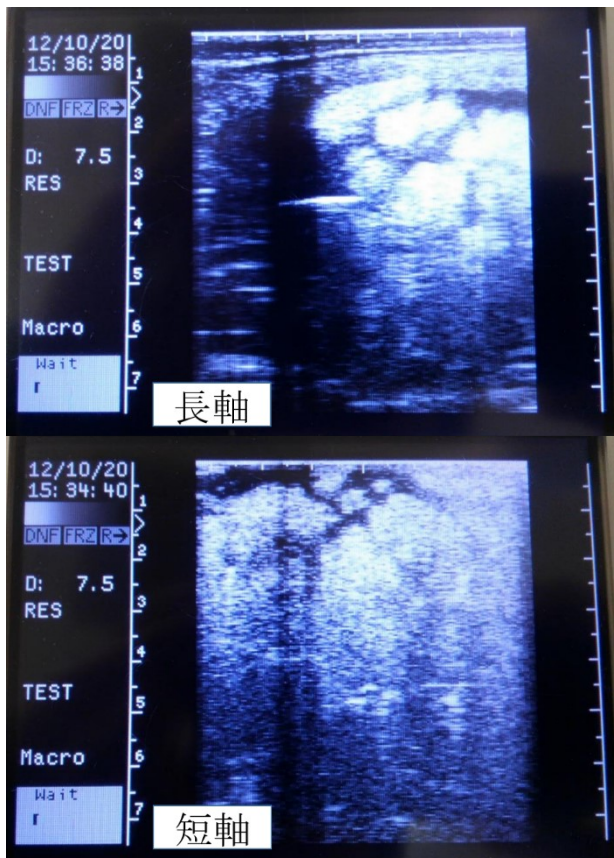


図 2 腫瘍の超音波検査結果 (第 3 病日)



とは腫瘍表面で炎症が起こり偽膜形成されていたことから推測される。

病理組織学的に中型の動静脈が認められたことから、2週間程度の結紮で著しく縮小したのは、慢性炎症の修復の過程で多数新生された血管において、突然血流が絶えたためと考えられる。また、結紮により大量出血を防ぐこともできたのではないかと考察され、血流を遮断してからの切除は適切であったと言える。

膣部に発生する腫瘍は人工授精の妨げ、外陰部からの細菌感染、膣内部の慢性刺激、難産の一因になりうるため、早期の切除が望まれる。また、人での報告によると、最初は良性腫瘍であったものの悪性腫瘍に転じる例もあるため慎重かつ迅速な対応が求められると言える。今後も症例の膣

脱の状況や炎症性ポリープの再発の有無、繁殖成績について経過観察するとともに、膣脱になりやすい牛のケアについて農場と検討を重ねたい。

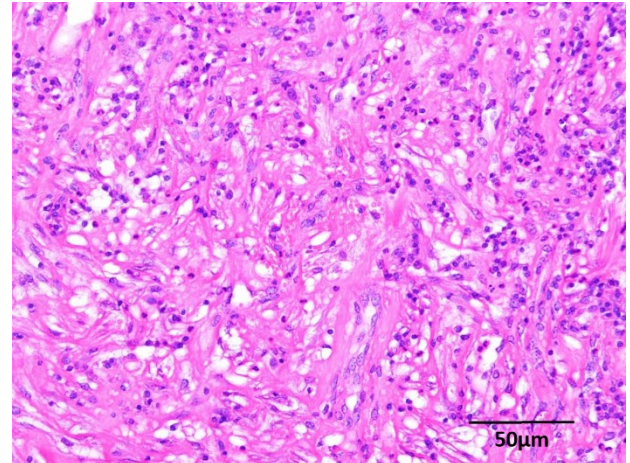


図 5 中間層の炎症細胞及び膠原繊維析出

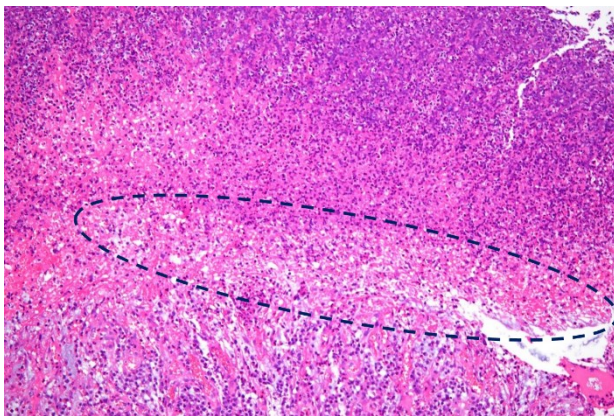


図 3 膣様物内の偽膜形成

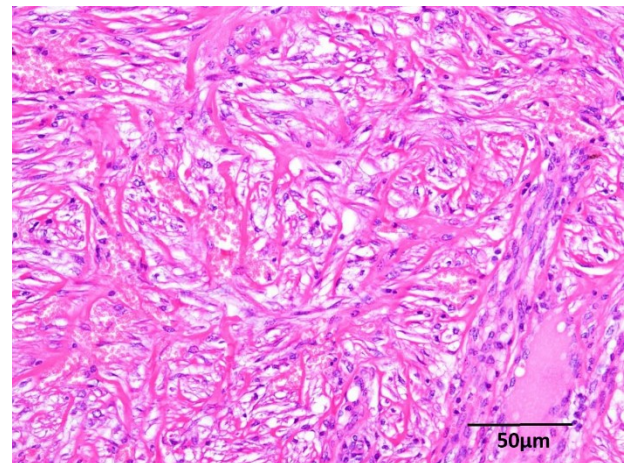


図 6 内層の膠原繊維析出

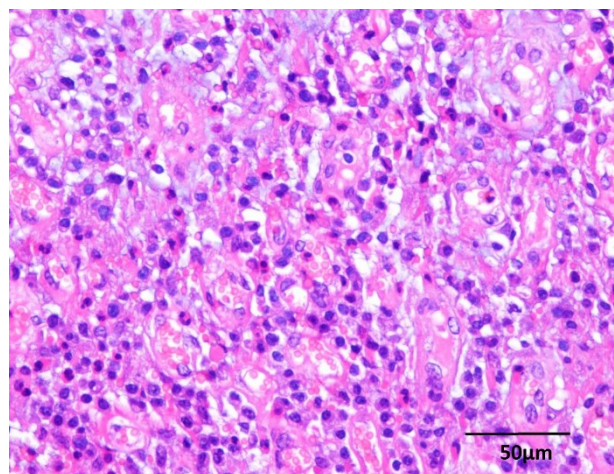
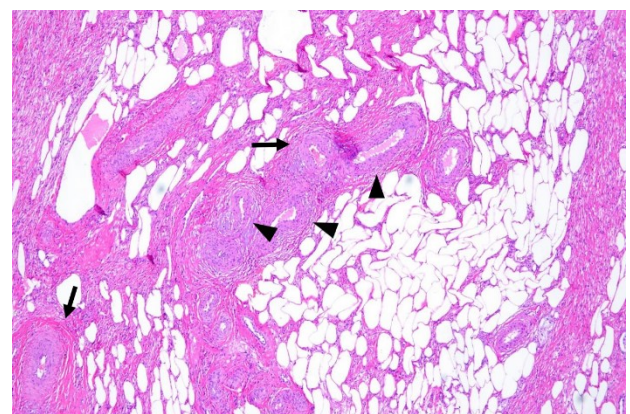


図 4 表層の炎症細胞浸潤



動脈：矢印 静脈：矢頭

図 7 最内層の血管新生



## 研究情報

### 但馬牛改良に向けた伸長胚からのゲノム解析の検討

兵庫県立農林水産技術総合センター  
北部農業技術センター 三木 遥子

#### はじめに

近年、ゲノム解析技術の進歩により、ウシゲノム情報が急速に解明されつつある。このゲノム解析技術には、Single Nucleotide Polymorphism(SNP)が用いられている。SNPは、一塩基多型とも呼ばれ、個体間においてDNA上の1塩基が異なる現象を指す。乳用牛では、SNPを用いた改良が実用化されており、和牛においても産肉能力や種牛性(繁殖能力・泌乳能力)などへの活用が検討されている。また個体間でSNP型が異なるため、全きょうだいであっても、能力差を知ることができる上、着床前の胚の段階でゲノム解析ができれば、但馬牛の改良スピードと生産性を向上できると考えられる。着床前遺伝子診断は、従来から、受精後7日目の胚(7日目胚)を用いて実施されているが、ゲノム解析に必要なDNAを得るためには、高度な技術や精密機器が必要になる。一方、伸長胚と呼ばれる受精後13~15日目の胚を用いた研究が進められており、伸長胚の長径は、受精後13日目では、約2mm、14日目では、約6mmに達すると報告されている。伸長胚であれば、肉眼で確認できるため、細胞採取を容易に行うことができる。なお、伸長胚の受胎能については、当センター場内で飼養する但馬牛に伸長胚を移植し、受胎することが確認できている。今回、採胚した伸長胚の切断片から、DNA抽出後、実際にゲノム解析を試みた。

#### 1. 試験の概要

##### (1) 供試材料および試験方法

供試材料として、但馬牛繁殖雌牛2頭に過剰排卵処理を行い作製した伸長胚を用いた。過剰排卵処置後、スタンディング発情確認後に2回にわたり人工授精を実施し、1回目の人工授精後14日

目に伸長胚を回収した。採胚では、既製のバルーンカテーテルの回収穴を大きく加工した(写真1)。回収した胚の数および長径の測定後に長径が3mm以上あった伸長胚について眼科用のメス刃を用いて1mm程度切断した。切断片は洗浄後、4 $\mu$ lのPBSに浸漬し、全ゲノム増幅法(WGA法)を実施し、微量分光光度計でDNA濃度の測定と波形を確認した。さらに抽出したDNAを用いて、1検体につき30K(30,000か所)SNPチップを用いてSNPの型判別を行った。

##### (2) 成績

採胚成績を表1に示す。2頭から回収した伸長胚数は12個と3個の合計15個であった。また、回収伸長胚の長径の平均値はそれぞれ3.8mmと6.3mmであり、1~10mmの範囲でばらつきがみられたが、すべての胚を肉眼で確認できた(写真2,3)。

そのうち、長径が3mm以上の伸長胚は8個であり、それらの切断片から抽出した平均DNA濃度は、2,261ng/ $\mu$ lだった(表2)。SNPの型判別を行うためにはDNAの純度も重要である。そのためには波形を確認する必要がある、これにより



写真1 加工したバルーンカテーテルの回収穴

抽出した DNA に試薬の残留やタンパク質など不純物が混入していないかが分かる。今回の結果のような波形（図 1）であれば、問題がないとされており、サンプルに不純物の混入はなかった。

抽出した DNA を用いて、SNP タイピングを実施したところ、コールレイト（判明率）が 95% 以上必要なところ、99% 以上であり、精度の高い型判別できることを確認した。さらに、同一個体か



写真 2 回収した伸長胚 (繁殖雌牛 A)



写真 3 回収した伸長胚 (繁殖雌牛 B)

表 1 伸長胚の採胚成績

黒毛和種 繁殖雌牛	回収伸長胚数 (個)	長径の平均値 (mm)
A	12	6.3
B	3	3.8

表 2 切断胚から抽出した DNA 濃度

サンプル数	DNA 濃度の平均値 (ng/μl)
8	2,261 [2,102~2,496]

[□] : 範囲

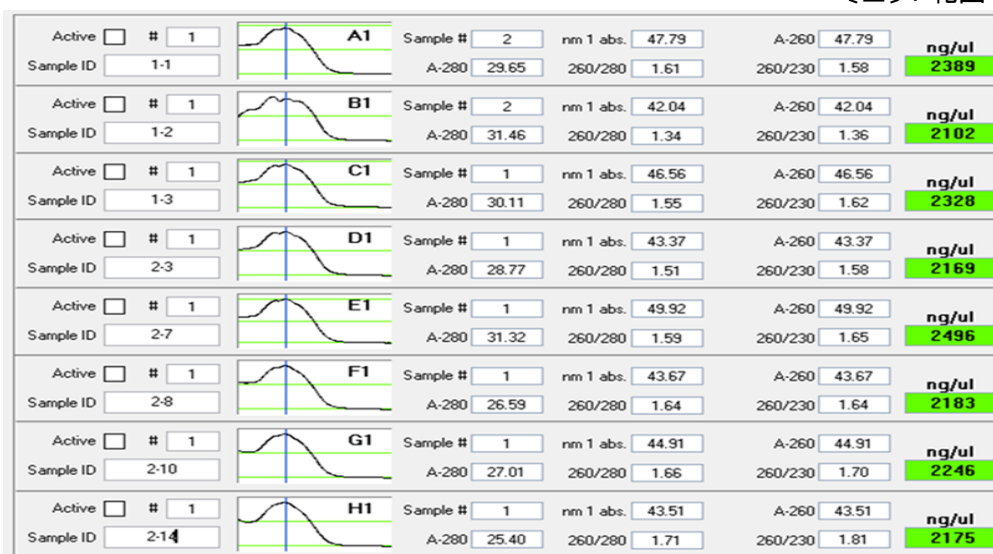


図 1 切断胚から抽出した DNA の成績 (WGA 後)



ら採取した伸長胚間で SNP 型に差が認められ、移植前の伸長胚について能力評価の比較が可能であることが分かった。

#### おわりに

今回の研究結果から、但馬牛における伸長胚からのゲノム解析は可能であることが示唆された。切断後の伸長胚は緩慢凍結法で凍結保存ができるという当センターにおける過去の成績とあわせると、採胚後、切断片からゲノム情報を解析す

る間、凍結保存することは可能であると考えられる。ゲノム情報が判明した胚を移植することで、着床前に能力の高い個体を選抜でき、但馬牛の改良効率を高めることができる。

伸長胚の受胎能については、切断していない伸長胚ではあるが当センター場内で飼養する但馬牛に移植し、受胎することが確認できている。今後は切断した伸長胚の受胎能について、さらに検討していく。

## 表 紙 写 真

去る 10 月 6 日より鹿児島県にて開催された第 12 回全国和牛能力共進会。

この 5 年に一度の「和牛オリンピック」とも称される共進会に兵庫県代表として出品された第 6 区（総合評価群）の出品者の皆さん。

第 6 区には種雄牛『照和土井』産子の雌牛 4 頭と肉牛 3 頭が群として出品され、写真の種牛群は全 15 群出品中第 3 席に入賞、また肉牛群は全体の 14 席となり、全体の序列は優等賞 9 席に入賞した。

また、種牛群として出品した美方郡和牛育種組合には特別賞「資質賞」も併せて授与された。

### 第12回全国和牛能力共進会 兵庫県成績

1. 会期                    令和4年10月6日(木) ～ 10日(月)  
 2. 会場                   種牛の部      鹿児島県霧島市牧園町  
                              肉牛の部      鹿児島県南九州市知覧町

区	区分	番号	名号	出品者	住所	成績	順位
1区	若雄(種牛)	5	茂鐘波	中井 勝	美方郡新温泉町	優等賞10席	10/21
2区	若雌の1(種牛)	52	こうふく735	上田 伸也	美方郡香美町	優等賞15席	15/33
3区	若雌の2(種牛)	78	ただにしき	中村 文吾	美方郡新温泉町	優等賞10席	10/32
4区	繁殖雌牛群 (種牛)	109	まりな6	淀 貴至	美方郡香美町	優等賞7席	7/18
		110	ゆりか2	谷口衣津美	豊岡市目坂		
		111	よしの	小牧 伸典	豊岡市但東町		
6区	総合評価群 (種牛)	214	おおみぞ7の3	村尾 和広	美方郡新温泉町	優等賞9席 種牛の部 3席 肉牛の部 14席 (総合評価 9席)	9/15
		215	ちはるふく3	中村 文吾	美方郡新温泉町		
		216	おふくてる	上田 伸也	美方郡香美町		
		217	よしふく5	植田 秀作	美方郡新温泉町		
	総合評価群 (肉牛)	7	幸	県立農業高等学校	加古川市	特別賞【資質賞】 美方郡和牛育種組合	
		8	和春	県立農業高等学校	加古川市		
高校・農業大学校特別区		251	はなみ	県立農業高等学校	加古川市	優等賞10席	10/24

- ※ 1区は優等賞15点、1等賞6点（計21頭出品）
- ※ 2区は優等賞17点、1等賞12点、2等賞4点（計33頭出品）
- ※ 3区は優等賞16点、1等賞11点、2等賞5点（計32頭出品）
- ※ 4区は優等賞11点、1等賞7点（計18群出品）
- ※ 6区は優等賞10点、1等賞5点（計15群出品）
- ※ 高校・農業大学校特別区は全て優等賞で24点（計24校参加）

※ 出品団体賞            兵庫県・鹿児島県・宮崎県・大分県の4県

【特別区を除く5つ以上の出品区に出品している道府県において、出品した全ての区で「優等賞」を獲得した県に対し、一般社団法人全国肉用牛振興基金協会長から授与される】

畜産技術ひょうご 第144号  
令和4年11月7日発行

編集・発行 公益社団法人兵庫県畜産協会

〒650-0024  
神戸市中央区海岸通1番地 農業会館7階  
TEL (078) 381-9362・FAX (078) 331-7744

本紙はインターネットを利用して配信しております。またメールによるファイル送信も受付けています。

URL <http://hyougo.lin.gr.jp> E-mail [sien@hyotiku.ecweb.jp](mailto:sien@hyotiku.ecweb.jp)