

(原著論文)

トウキョウX体外生産胚の効率的な作出と移植による子豚生産

鈴木亜由美¹・椎名浩己²・丹澤 舞³・岡田幸之助³

¹ 東京都農林総合研究センター・畜産技術科

² 現 東京都農業振興事務所

³ 日本獣医生命科学大学

摘 要

肉豚として出荷されたトウキョウXの卵巣から採取した卵丘－卵母細胞複合体を，体外成熟を経て体外受精し，胚盤胞を作出した。これをトウキョウXの雌個体に移植したが受胎には至らず，改めて培養条件等を見直したところ，媒精に用いる凍結精液は雄個体により精子侵入率が異なり，多精子受精などの異常発生卵が多数存在したことが示唆された。また三元交雑種豚から採取した卵丘－卵母細胞複合体から同様の方法により体外生産胚を作出したところ，同じ胚日齢においてトウキョウXよりも胚盤胞の細胞数が多いことが示された。そこでトウキョウXと三元交雑種豚の体外生産胚を混合移植したところ，トウキョウX卵子由来胚の子豚が生産された。

キーワード：トウキョウX，卵胞切り出し法，体外生産胚，受精卵移植

簡略表題 トウキョウX体外生産胚の移植

東京都農林総合研究センター研究報告 20 : 9-16, 2025

* 著者連絡先：鈴木亜由美 Email : a-suzuki@tdfaff.com

緒 言

東京都で開発した銘柄豚「トウキョウX」は、系統造成が完了してから20年あまりが経過し、現在は1都4県で年間約1万頭の肉豚を生産している。肉豚（肥育豚）は一定の条件を満たした農家が生産した種雌豚に、近縁にならないよう決められた血統のトウキョウX種雄豚を交配して生産している。生まれた子豚は1頭ごとに耳標を装着し、青梅畜産センターに報告することが定められており、自家生産した種雌豚を含め肥育豚もすべて個体識別が可能であるため、食肉処理場へ出荷された肥育豚もすべて出自が明らかなトウキョウXの純粋種である。しかし一般的な肉豚は三元交雑種（以下、LWD）が大半であるため、肥育豚の卵巢から採取される卵子は利用されることなく廃棄されている。

近年、ブタ体外生産胚を安定的に作出する技術が確立され、またこれを簡易的に母豚へ移植し産子を得る方法も開発された。そこで、トウキョウX肉豚の卵巢から卵子を採取し、体外生産胚を作出して母豚に移植し、産子が得られれば、未利用の遺伝資源が有効活用できるとともに、新しい子豚生産の方法としての道が拓ける。今回、肉豚として出荷されたトウキョウX雌個体の卵巢を活用して子豚を生産する方法を検討したところ、顕微鏡下で卵巢から卵胞をメスとピンセットを用いて卵丘－卵母細胞複合体（以下、複合体）を採取する卵胞切り出し法（以下、切り出し法）により胚盤胞発生率が向上することや、体外受精に用いる精子の卵子への侵入率に個体差があることが明らかになった。これらの知見を活用して多くのトウキョウXの体外生産胚を作出し、それらを移植後に子豚を得ることができたので報告する。

材料および方法

1. 体外生産胚の作出と品質の向上

食肉処理場へ肉豚として出荷されたトウキョウX雌個体、また比較検討のためLWD雌個体から左右の卵巢を採取し、約37℃の少量のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）とともに保温ポットに入れて実験室まで持ち帰った。直径4～6 mmの卵胞から注射針－注射筒を用いて卵胞から卵丘－卵母細胞複合体（以下、複合体）を吸引する方法（以下、吸引法）、ま

たは卵胞をメスとピンセットを用いて切り出して顕微鏡下で卵胞を選別一切開する「卵胞切り出し法（以下、切り出し法）」により、複合体を採取した。複合体をブタ卵子・胚回収液 POE-CM（機能性ペプチド研究所、以下表記のないものはすべて同社製）で数回洗浄し、高性能ブタ卵子成熟用基本培地 HP-POM に入れ、「ブタ胚の体外生産マニュアル」（2016）および Yoshioka et.al（2008）の方法に従い、38℃、5%CO₂、5%O₂、90%N₂のインキュベーター内で44～45時間体外成熟した。成熟後の卵子をブタ媒精液 PFM50μL に約20個ずつ分配し、融解したトウキョウX凍結精液を精子数が100万個/mLとなるよう調整して、各 PFM に50μL ずつ添加した（最終精子濃度：5×10⁵個/mL）。

凍結精液については、予め一定の精子侵入率が確認されている種雄豚Aのものをを用い、以降、さらに進入率が高い個体の探索を進めた。

媒精開始6～19時間後、卵子内に侵入せず表面に付着した精子をボルテックスミキサーで剥離し、目視で正常卵子のみをブタ培養胚発生用培地 PZM-5 に約20個ずつ入れて発生培養に供した。媒精日を0日として、胚日齢2日目に卵割の状態を観察して未受精卵および異常卵を除いた。胚日齢4日目において、桑実胚期以上に発生しているものをブタ後期胚発生用培地 PBM に約20個ずつ入れ、引き続き培養した。

作出した体外生産胚の品質を検証するため、胚日齢6日目の胚の細胞数を測定した。胚盤胞以上のものを選別して4%パラホルムアルデヒドに浸して約1時間固定した後、蛍光色素（4',6-diamidino-2-phenylindole）で染色し、蛍光顕微鏡下で測定し、同じ食肉処理場で採取したLWDの複合体から発生したものと比較した。同時に、精子侵入率および正常受精率についても両者を比較した。

胚盤胞発生率の向上効果が認められている Lipid-Rich BSA（ALBUMAX I, Thermo Fisher Scientific）を胚日齢4日目の培地に1 mg/mL 添加し、胚日齢5日目の発生率を検証した（Suzuki et.al, 2016）。一部は胚日齢7日まで培養を継続し、細胞数を無添加で培養したものと比較した。

2. 体外生産胚の移植

作出した体外生産胚を、青梅畜産センターで飼養するトウキョウX雌個体のべ5頭に移植した。移植胚として17～48個のトウキョウX由来胚を用い、

うち2回は18～29個のLWD由来胚を混合して移植した。これは受胎促進を目的に単為発生胚（PA胚）を混合移植した事例に倣ったものであり（河原崎ら；2005，中村；2018），生産性に優れている交雑種の卵子に同様の効果があるのではないかと推測したためである。いずれの移植胚も発生開始から115～117時間後（胚日齢5日目）に，目視で初期胚～拡張胚盤胞を確認されたものを採取し，ウシ胎児血清（FBS）を10%添加し，10～25mMのHEPES緩衝液（SIGNA社）を加えた後期発生培地PBMに移動させ，少量の培養液とともに0.5mlストローに充填した（大曲ら；2018）。受胚豚はジプロピオン酸による偽妊娠法（野口；2012）を利用して，移植日に発情開始6日目となるよう調整した。移植には子宮角深部注入カテーテル（匠：富士平工業）を用いて，非外科的に行った。移植から3～4週間後に超音波妊娠診断法により妊娠鑑定し，受胎が確認された個体は分娩まで単独飼育とした。

3. 体外生産胚由来産子の品種判別

体外生産胚由来産子の耳刻片からDNAを抽出し，「東京都銘柄豚トウキョウXの判別のためのDNAマーカー，およびその利用」（特許第5622141号）に従い，産子がトウキョウXか否かを判別した。

なお，本論文における一連の実験は，（公財）東京都農林水産振興財団動物実験等実施規定（2024年改訂）および家畜・家きん飼養管理の手引き（2019年）に準じて飼養・管理した。

結果

1. 体外生産胚の作出と品質の向上

複合体を吸引法と切り出し法で採取したときの，胚盤胞発生率を比較した結果を表1に示す。ブタの生殖細胞は温度変化による性状低下が著しい，つまり受精能力が低下することが知られており，生体から採取した卵子等は供胚豚の体内環境と同じ約37℃に保つ必要がある。また，切出し法は吸引法よりも手技に熟練を要するうえに，採取に時間がかかることから，採取から培養環境下に移すまでにより厳密な温度管理が必要となる。しかしながら，本法と吸引法で採取した複合体の発生2日目の分割率，および発生7日目の胚盤胞発生率を， χ^2 乗検定で検証した結果，切り出し法が有意に高かった（表1）。また発生した胚盤胞の細胞数をWelchのt-検定により検証した結果，吸引法では平均34.0個に対し，切出し法は50.2個であり，有意に多かった（表2）。

表1 卵丘－卵母細胞複合体の採取法の違いによる発生の比較

採取法	供試卵母細胞数	発生2日目の分割卵子数	発生7日目の胚盤胞数(個)	
			総合	拡張
吸引法	455	215 (47.3%)	25 (5.5%)	12 (2.6%)
卵胞切出し法	463	283 (61.1%)	46 (9.9%)	30 (6.5%)
χ^2 -test		P<0.01	P<0.05	n.s.

n.s.=有意差なし．表中の(%)は供試卵母細胞数に対する比率．

表2 発生7日目の胚盤胞の細胞数比較

複合体の採取法	供試胚盤胞数(個)	平均細胞数*	最大細胞数	細胞数50以上**	細胞数100以上**
吸引法	7	34.0±11.5	53	-	-
卵胞切出し法	87	50.2±23.6	116	40 (45.9%)	4 (4.7%)

*:平均値±標準偏差，**:吸引法は供試数が少ないため算出せず．

表中の(%)は供試胚盤胞数に対する比率．

より卵子侵入率が高い種雄豚の凍結精液を探索した結果、媒精6時間で種雄豚Aよりも侵入率が高い種雄豚Bを見出し、また正常受精率も種雄豚Aよりも高いことが示された（表3）。このことから、移植に向けた体外生産胚の作出には、種雄豚Bの凍結精液を用いて、媒精時間を6時間とした。

トウキョウX卵子由来胚とLWD卵子由来胚について、胚日齢6日目の胚盤胞の細胞数を比較したところ、精子侵入率および正常受精率においては両者に差みられはなかったが（データ略）、LWD由来胚の胚盤胞の細胞数は、トウキョウX由来胚のものより有意に多かった（表4）。

表3 媒性精液の違いによる成績比較（媒精時間＝6時間）

精子由来 種雄豚	供試卵母 細胞数	精子侵入率 (%)	正常受精率 (%)
A	414	25.0	17.1
B	1299	48.1	28.6

表4 トウキョウXまたはLWD由来卵子の体外発生成績（発生6日目）

卵子 由来豚	供試卵母 細胞数	胚盤胞	
		発生数	細胞数 ^a
LWD	130	34(26.2%)	39.2±14.0 ^a
トウキョウX	52	12(23.1%)	31.5± 6.5 ^b

平均値±標準偏差, 異符号間に有意差あり(P<0.05).

表中の(%)は供試卵母細胞数に対する比率.

胚盤胞発生率の向上効果が認められている Lipid-Rich BSA を胚日齢4日目の培地（PBM）に1 mg/mL 添加したところ、24時間後に胚盤胞期まで発生しているものが、無添加の区よりも多いことが確認

された。胚日齢7日目の胚盤胞の細胞数を測定したところ、Lipid-Rich BSA 添加区が無添加の区よりも有意に多かった（表5）。

表5 LR-BSA 添加による胚盤胞発生数と細胞数（発生7日目）

発生培地	供試胚数 (トウキョウX)	発生 胚盤胞数 (個)	胚盤胞の 細胞数
LR-BSAを 添加したPBM	82	35 ^a (42.7%)	65.3±30.8 ^a
PBMのみ	84	9 ^b (10.7%)	29.9± 8.4 ^b

平均値±標準偏差, 異符号間に有意差あり(P<0.05).

表中の(%)は供試胚数に対する比率.

2. 体外生産胚の移植

トウキョウX卵子由来胚およびLWD 卵子由来胚を混合移植した各回の結果①～⑤を表6に示す。移植胚数は各回でばらつきがあるが、これは胚盤胞の発生率が異なったためである。特にトウキョウX卵子由来胚のみを移植した3例のうち④と⑤は、移植胚数が①～③よりも少なくなってしまった。これらは受胎に至らず、また約50個の胚を移植した②についても受胎しなかった。一方で、LWD 卵子由来胚と混合移植した①と③の2例は受胎・分娩に至り、

体外生産胚移植による子豚を得ることができた。

2例の体外生産胚由来の子豚はいずれも育成に問題はなく、生後12週目における去勢が原因でへい死した1頭を除き、すべて順調に生育した。これら15頭の子豚の多くは体毛が茶色や黒、または白黒の斑であり(図1)、LWDに多く見られる全身がほぼ白い体毛の子豚は2頭だったことから、トウキョウX卵子由来の子豚が多数生産されたものと期待された。

表6 体外受精卵の非外科的移植の結果

移植回	移植胚数(個)	移植胚の内訳					移植後妊娠日数	産子(頭)
		品種*(個)	発生率(%)	初期胚盤胞(個)	胚盤胞(個)	拡張胚盤胞(個)		
①	50	X : 32	30.2	10	16	6	109	6 (黒子1)
		雑 : 18	17.1	4	5	9		
②	48	X : 48	24.9	12	17	19	-	-
③	55	X : 26	17.7	6	10	10	110	9
		雑 : 29	24.8	6	14	9		
④	17	X : 17	8.6	1	10	6	-	-
⑤	22	X : 22	12.2	7	10	5	-	-

*:X=トウキョウX, 雑=三元交雑種由来卵子にトウキョウXの精子を用いて作出。



図1 体外生産胚移植由来の産子

3. 体外生産胚由来産子の品種判別

体外生産胚由来の子豚の品種判別を実施した結果、トウキョウXと判定された個体は15頭中5頭であった(表7)。分娩1例目の産子6頭はすべてLWD 交雑種であり、トウキョウX卵子由来の個体

はいなかったため、トウキョウX卵子由来の子豚が生産できたのは1例のみとなった。産子の体毛色からの予想に反し、トウキョウX卵子由来の子豚は少なかったが、今回初めて、体外生産胚の移植によってトウキョウX産子を得ることができた。

表7 移植胚由来産子の品種判別結果

移植胚（個） 品種*	生存産子 （頭）	品種	
		トウキョウX （頭）	LWD交雑種 （頭）
X : 32 雑 : 18	6	0	6
X : 26 雑 : 29	9	5	4

*:X=トウキョウX, 雑=三元交雑種由来卵子にトウキョウXの精子を用いて作出.

考 察

ブタの卵胞から複合体を採取する際は、吸引法で行うのが一般的であるが、吸引時の圧力が複合体にダメージを与えることが危惧される。今回、切り出し法で採取した複合体は吸引法で採取した複合体よりも発生率が高く、また胚盤胞の細胞数も多かった。切り出し法は複合体へのダメージが少なく、複合体の成熟率が高まるとの報告もあることから(小川と梨本, 2022), 優良な複合体が採取できる方法と考える。

媒精に用いる凍結精液は、種雄豚ごとに精子侵入率が異なることが明らかとなり、当初、種雄豚Aを用いて18～19時間媒精して作出した胚盤胞は、その殆どが多精子受精した異常発生胚だったと考えられる。過去に、この種雄豚Aで作出した18～34個の胚盤胞を、のべ6頭の雌個体に移植したがすべて不受胎だったのは、これが大きな原因であったかもしれない。

トウキョウX卵子由来またはLWD卵子由来の胚盤胞について、後者の細胞数が有意に多かったことは、トウキョウX卵子由来胚はLWD由来胚よりも発生が遅い、または発生能力が低い可能性があると考えられる。

後期発生培地へのLipid-Rich BSA添加により発生率が向上したことは、Suzukiらの報告と一致する結果となり、より多くの胚盤胞が作出され、移植胚数の増加につながった。

今回、最適と考えられる条件で作出したトウキョウX卵子由来胚を17～48個、のべ5頭のトウキョウX雌個体に移植した結果(表6), LWD卵子由来胚と混合移植した時のみ子豚が得られている。トウ

キョウX卵子由来胚のみを17個または22個移植した④と⑤では、正常胚数が少なく、比例して正常胚も少なかったことが不受胎の大きな原因と考えられる。しかしながら、混合移植時とほぼ同数の48個移植した②でも受胎に至らなかったことは、トウキョウX卵子由来胚よりも発生能力が高いと考えられるLWD卵子由来胚の存在が、受胎豚の子宮内環境、またはトウキョウX卵子由来胚の発生に何らかの刺激を与え、結果的にトウキョウX卵子由来胚の着床・受胎を促した可能性がある。また得られた産子の多くがLWD交雑種だったことから、トウキョウX卵子由来胚の発生能力の弱さがうかがえる。今後はさらなる培養条件の検討が必要と考えるが、より多くの良質な移植胚を作出し、トウキョウX卵子由来胚だけの移植で産子を得ることを目指していきたい。

一方で、今回のように肉豚由来の卵子から作出された子豚は、その親である肉豚が種豚登録されていないため、種豚となることが認められていない。しかし供胚豚である個体が肉豚であるが故に、その肉質は明らかであり、優良な資質の利用につながると考える。筋肉内脂肪含有量の遺伝率は0.32～0.50と高いことから(兵頭, 2001), 肉質がよい供胚豚の子はこれを受け継ぐ可能性が高いと考えられ、肉豚由来の体外生産胚を活用した新しい生産体制として検討したい。

謝 辞

本研究にあたり、体外生産胚の作出および非外科的移植技術をご指導いただいた農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門(当時)吉岡耕治様、体外生産胚由来子豚の品種判別にご協力いただいた

日本獣医生命科学大学応用生命科学部古田洋樹様に、厚く御礼申し上げます。またブタの卵巢採取に協力いただいた（株）アグリスワン職員の皆様、供試豚の飼養管理を担っていただいた豚飼養班職員の皆様に深く感謝いたします。

引用文献

- 動物衛生研究所 病態研究領域（繁殖障害）（2016）
ブタ胚の体外生産マニュアル
- K. Yoshioka, C. Suzuki, and A. Onishi. (2008) Defined System for *In Vitro* Production of Porcine Embryos Using a Single Basic Medium. J. Reprod. Dev. 54: 208-213
- C. Suzuki, Y. Sakaguchi, H. Hoshi and K. Yoshioka (2016) Lipid-rich bovine serum albumin improves the viability and hatching ability of porcine blastocysts produced *in vitro*. J. Reprod. Dev. 62: 79-86
- 河原崎達夫, 大竹正剛, 土屋聖子, 柴田昌利 (2005) 単為発生胚の同時移植は1個のブタ受精胚を産子にまで発生させる. 静岡県中小家畜試研報 (16) 19-23
- 中村嘉之 (2018) 体外生産胚を用いたブタの繁殖技術の効率化に関する研究. 埼玉県農技研研報 (17) 39-41
- 大曲秀明, 三角浩司, 宮下美保, 長渕成樹, 山下祥子, 星 宏良, 平山祐理, 吉岡耕司 (2012) 養豚場での活用を想定した非外科的胚移植技の検討. 日獣会誌72 : 285～290
- 野口倫子 (2012) 偽妊娠誘起を応用した豚の発情同期化法. 養豚の友11 : 20～23
- 小川杏奈, 梨本千栄 (2022) 種々のブタ複合体採取法が体外成熟に及ぼす影響. 日本獣医生命科学大学動物生殖学教室 卒業論文
- 兵頭 勲 (2001) Tokyo-X 豚の育種とその肉質. 食肉の科学42 : 135-138

Efficient production of *in vitro* fertilized embryos from Tokyo X and piglet production through transplantation

Ayumi Suzuki ^{1*}, Koki Shiina ², Mai Tanzawa ³, Konosuke Okada ³

¹ Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center

² Tokyo Metropolitan Agricultural Promotion Office

³ Nippon Veterinary and Life Science University

Abstract

Cumulus–oocyte complexes collected from the ovaries of Tokyo X and matured *in vitro* were fertilized to produce blastocysts. The embryos were then transferred but not conceived. When the culture conditions were examined again, a difference was observed in the frozen semen. Many abnormal embryos, such as those with polyspermy, have been suggested. In contrast, *in vitro* embryos were generated from the cumulus-oocyte complexes collected from three-way cross pigs (Duroc sires × F1 dams: Landrace × Large White) using the same method. The number of cells was higher than that of Tokyo X at the same embryonic stage. Therefore, *in vitro* embryos from Tokyo X and LWD were transferred together. Some piglets were obtained from the Tokyo X-IVF embryos.

Keywords: Tokyo X, *in vitro* fertilized embryo, embryo transfer

Bulletin of Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center, 20: 9-16, 2025

*Corresponding author: a-suzuki@tdfaff.com