

受精卵移植によるトウキョウX維持群再生と生産現場への応用

[令和 3～6 年度]

鈴木亜由美・椎名浩己*・平間俊吾*² 中村梓・太田久由・大関和也・星広樹*²
(畜産技術科・*² 青梅畜産センター) *現農振事

【要 約】春機発動前の個体を発情誘起して採卵したが、10 カ月齢程度まで育成した個体の方が採卵数が多い。開腹手術による採卵方法を導入し、術後に 2 回目の採卵を可能とした。採取した受精卵をガラス化保存して経産豚に移植したが、受胎には至らなかった。

【目 的】

豚熱やアフリカ豚熱などの悪性伝染病が青梅庁舎に侵入すると、飼養しているトウキョウX原々種をはじめとした全頭が殺処分となり、トウキョウXの壊滅に直結する。そこで万が一の備えとするため、トウキョウXの受精卵をガラス化保存する。限られた供胚豚を効率よく活用するため、1 頭の供胚豚から複数回採卵する技術を導入し、効率化を図る。また、保存胚を母豚に移植して子豚生産を検証する。

【成果の概要】

1. 春機発動前の供胚豚からの採卵と採取胚のガラス化保存

(1) 供胚豚を早期に採卵して受精卵が得られれば、飼養期間が短く効率的であることから、6～6.5 カ月齢の春機発動前のトウキョウX雌個体にウマ絨毛性性腺刺激ホルモン（セロトロピン[®]：以下 eCG）1500IU を投与し、72 時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（ゲストロン[®]、以下 hCG）500IU を投与して発情を誘起した。この後、発情日を同期化させるため、12 日後にプロスタグランジン F_{2α}（プラネート[®]、以下 PG）2 mL を朝夕 2 回（2 回区）、または 12、13 日目の朝夕 4 回投与（4 回区）して発情日を調整し、自然交配した（図 1）。2 回区の 4 頭はすべて明確な発情徴候がみられ、交配・採卵することができたが、4 回区は 5 頭中 3 頭は雄を許容しなかった。交配した供胚豚は 6 日後に食肉処理場でと畜し、子宮および卵巣を切除して青梅庁舎に持ち帰り、0.2%の臭化セチルトリメチルアンモニウム溶液で洗浄した後、実験室に搬入した。受精卵は 50mL の灌流液を子宮内に注入して内部を洗い流すことにより採取した。いずれの区も採卵数は少なく、胚盤胞率もばらつきが大きかった。また卵巣を観察して黄体数を比較したが、PG 投与回数による差はなかった（表 1、2）。このことから、6～6.5 カ月齢の春機発動前のトウキョウXでは採卵効率が低く、性成熟が不十分であると考えられた。そこで春機発動後の 9～10 カ月齢以上の個体を用い、上記と同様に PG 2 回区と 4 回区で採卵成績を検討したところ、採卵数はいずれも 6～6.5 カ月齢時よりも増加した。また胚盤胞率は 2 回区が 4 回区よりも高かった（表 3）。以上のことから、トウキョウXでは春機発動後の個体を供胚豚とし、発情同期化では 2 回の PG 投与により効率的な採卵が可能なが示された。

一方で、ブタの生殖細胞は急激な温度低下に大きく影響を受けることが知られている。そこで、食肉処理場由来の子宮から採卵までの時間（輸送を含め約 3 時間）と、青梅庁舎内で安楽死させ、子宮を採取して採卵した場合（約 1 時間）の所要時間の差が採取胚に影響を及ぼすかを検証したが、ガラス化保存後の発生（後述）に大きな差は見られなかった

(表4)。

(2)採取した受精卵のうち、桑実胚～胚盤胞を定法によりガラス化保存した。後日これらを融解して48時間培養し、発生が進行するか(生存しているか)を検証した。その結果、6～6.5カ月齢時に採卵・保存した胚は発生の進行が確認されず、死滅していた(データ掲載なし)。しかし9～10カ月齢以上の供胚豚からの採取・保存胚は、採卵処理まで時間差があっても発生の進行が確認され、いずれも脱出胚盤胞まで達した(表5)。

2. 開腹手術での採卵による供胚豚の有効活用

9カ月齢以上の雌個体6頭について開腹手術による採卵を実施した。いずれの供胚豚も採卵6日前に発情回帰するよう、PG投与または人工流産法により発情日を調整して人工授精した。開腹手術する個体は導入麻酔を施した後、イソフルランを吸入させて麻酔状態を継続させた。6～7番目(最後部)乳頭付近の正中線を12～15cm切開して子宮を腹腔外に露出し、内部を灌流して受精卵を採取した。また開腹手術に要する時間や手技の採卵成績への影響を比較するため、5頭の供胚豚は青梅庁舎内で導入麻酔を施した後、心臓にKClを50mL注入して安楽死させ、子宮を採取して採卵した。それぞれの採卵成績は表6、7に示す通りであるが、両者の採卵成績に差はないと考える。

開腹手術した6頭は、いずれも術後に発情回帰がみられた。うち3頭については術後2回目以降の発情時に人工授精し、34～70日後に人工流産させて発情を誘起し、再度、人工授精した。この6日後に食肉処理場でと畜して子宮を持ち帰り、受精卵を採取してガラス化保存した。以上のことから、1頭の供胚豚から複数回の採卵が実施可能であり、供胚豚を有効活用できることが示された(表7)。

3. ガラス化保存胚の移植

ガラス化保存した胚を、トウキョウX経産豚に移植した。受胎の可能性を高めるため、受胚豚の発情時に1回のみ人工授精または自然交配し、5日後に保存胚を移植した(追い移植)。経産豚3頭を用い、子宮角深部までカテーテルを挿入して融解した保存胚を少量の融解液とともに6～10個注入した。産子は父子判定により、いずれの産子か判別した結果、移植胚由来の子豚は得られなかった(表8)。正常な移植胚が少なかったことが原因と考え、両親の異なる保存胚を混合して移植胚数を増やし、受胚豚1頭(No.14437)に追い移植した。また1頭(No.16026)については、追い移植は行わず子宮体部への移植を試みた。これは子宮角深部へのカテーテル挿入による子宮内壁の損傷が避けられるメリットがあり、(独)家畜改良センターにおいて実績のある手法である。しかしいずれも受胎しなかった。移植胚はすべて採取時は良好な胚盤胞であったが、胚に悪影響を及ぼすガラス化液中に規定時間よりも長く浸してしまうなどのダメージがあったと推測される。また、過去に体外生産胚を移植した際、交雑種由来胚と混合移植した時のみ受胎・分娩に至ったことから、トウキョウX胚の移植においては、着床促進のための何らかのサポートが必要なかもしれない。

【残された課題・成果の活用・留意点】

開腹手術による採卵は供胚豚を効率的に活用できるが、手技の取得や労力を要することが欠点である。一方、食肉処理場でのと畜採卵は、採卵処理までの温度管理に注意すれば少ない労力で採卵できる。今後はいずれか実施可能な方法で受精卵採取を進め、ガラス化処理を精密に行い、融解法や移植法を再確認し、移植胚由来の子豚生産を実証する。

【具体的データ】

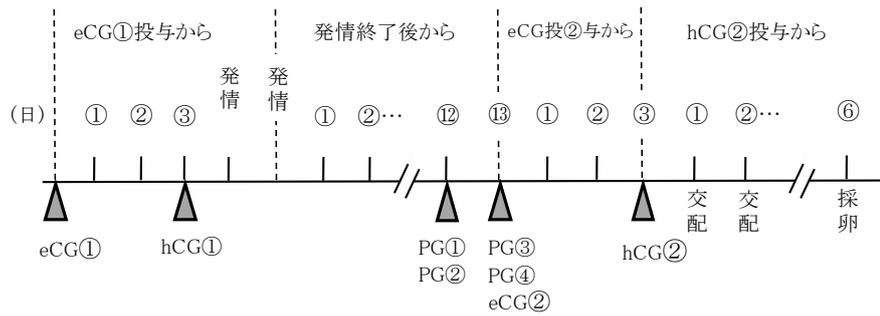


図1 春機発動前個体の発情誘起と採卵に向けたホルモン投与プログラム

表1 若齢供胚豚を用いたPG投与回数の違いによる採卵成績

PG 投与 回数	供試 頭数	採卵時 月齢	採卵 頭数	黄体数 (個)	採卵数 (個)
2	4	7.3±0.3	4	12.5±5.4	4.0±0.8
4	4	7.4±0.2	2	12.5±5.8	6.0

(平均値±標準偏差)

表2 PG投与回数の違いによる採卵成績と発生ステージ

PG 投与 回数	ドナー No.	採取した受精卵内訳 (個)				胚盤胞率 ^a (%)
		未受精卵/ 変性卵	桑実胚	初期胚	胚盤胞	
2	14458	0	0	1	2	66.7
	14480	0	2	2	1	20.0
	14493	0	0	0	4	100.0
	13535	2	0	1	1	25.0
4	14542	1	5	3	0	0.0
	14512	1	0	2	0	0.0

a):胚盤胞数/採卵数

表3 10カ月齢以上の供胚豚でのPG投与回数の違いによる採卵成績

PG 投与 回数	採卵 頭数	供試豚 月齢	総採卵数 (個/頭)	うち 胚盤胞 (個/頭)	胚盤胞 率(%)	黄体数 (個/頭)
2	3	12.1±1.0	8.0±3.6	5.7±2.1	70.8	11.3±1.2
4	3	11.1±0.4	8.7±5.7	3.3±2.5	38.5	15.0±6.6

(平均値±標準偏差)

表4 採卵処理までの時間短縮による採卵成績の比較

と畜 場所	採卵まで の所要 時間	採取 頭数	採卵 総数 (個)	採取胚の内訳(個)			胚盤 胞率 (%)
				未受精 / 変性卵	桑実胚	胚盤胞	
食肉 処理場	2時間半 ~3時間	3	30	12	3	15	50.0
青梅 庁舎内	約1時間	3	26	7	1	18	69.2

表5 採卵処理までの時間短縮とガラス化保存後の発生

と畜場所	供試胚数(個)	胚由来頭数	培養開始時(個)		24時間後(個)				48時間後(個)		
			桑実胚以下	胚盤胞	桑実胚以下	胚盤胞	拡張胚盤胞	脱出胚盤胞	桑実胚以下	胚盤胞	脱出胚盤胞
食肉処理場	23	3	11	12	9	6	4	4	9	5	9
青梅庁舎内	21	3	7	14	3	12	2	4	3	13	5

表6 安楽死後に採卵した時の成績

供胚豚No.	採卵時月齢	総採卵数(個)	うち胚盤胞(個)	胚盤胞率(%)	黄体数(個)	回収率(%)	備考
15143	12.7	8	8	100.0	11	72.7	
15537	10.9	18	10	55.6	22	81.8	
15517	11.5	13	13	100.0	13	100.0	
15860	8.7	7	2	28.6	10	70.0	両卵巣に膿腫あり

表7 開腹手術またはと畜による採卵成績

供胚豚No.	採卵方法	採卵時月齢	総採卵数(個)	うち胚盤胞(個)	胚盤胞率(%)	黄体数(個)	回収率(%)	備考
16022	開腹手術	8.9	11	11	100.0	12	91.7	AI後に複数回排膿、2回目採卵断念
15979	開腹手術	11.0	11	9	81.8	11	100.0	術後発情時AI不能、2回目採卵断念
16090	開腹手術	10.8	0	0	-	-	-	検卵不可能
	と畜	12.2	0	0	-	11	-	検卵不可能
16622	開腹手術	9.8	13	9	69.2	13	100.0	
	と畜	11.0	5	4	-	11	45.5	右卵巣に膿腫あり
16741	開腹手術	10.8	5	4	40.0	14	35.7	
	と畜	13.8	7	7	100.0	14	50.0	両卵巣に膿腫あり
16922	開腹手術	11.2	17	16	94.1	17	100.0	

表8 ガラス化保存胚の移植

受胚豚No.	移植時の産次	移植胚数(個)	移植部位	産子頭数(頭)	父子判定	移植方法
14463	5	10	子宮角深部	5	交配産子	追い移植
14464	5	9	子宮角深部	11	交配産子	追い移植
14856	3	6	子宮角深部	9	交配産子	追い移植
16026	2	18	子宮体部	不受胎	-	移植胚のみ
14437	8	19	子宮角深部	不受胎	-	追い移植