

(研究資料)

受胎率の高いトウキョウX凍結精液の 人工授精方法の検討

鈴木亜由美

東京都農林総合研究センター

摘 要

豚熱などの伝染病侵入時に備え、大分県と広島大学により共同開発された方法に従い、トウキョウX維持群の凍結精液を作製・保存した。融解液中に精漿を10%添加し、種雌豚の発情後期に2回、子宮体部へ人工授精したところ、受胎率は92.3%であった。

キーワード：トウキョウX，凍結精液，人工授精，子宮体部，精漿

簡略表題 トウキョウX凍結精液の人工授精

東京都農林総合研究センター研究報告 16 : 9-14, 2021

2020年10月27日受付，2021年1月6日受理

緒言

トウキョウXは良質な肉生産を目標にパークシャー種、デュロック種、北京黒豚の3品種をかけあわせて造成された国内初の合成種系統豚である。現在国内における豚肉生産は、生産性や強健性に優れたランドレース種と大ヨークシャー種の一代雑種(F₁)に、肉質に優れたデュロック種を交配した三元交雑種が主流であり、トウキョウXも開発過程においては、デュロック種に代わる止め雄としての利用を想定していた。しかしその肉質の良さを最大限に利用するためには、コマーシャル豚(肉豚)もトウキョウX同士の純粋交配による産子が最善であるため、近親交配を回避した厳格な血統管理の下で肉豚生産を進めることとなった。

系統完成から数年の間は、東京都畜産試験場(現:(公財)東京都農林水産振興財団青梅畜産センター、以下、青梅畜産センター)または都内の農家が種雌豚を生産して都外農家に供給し、肉豚を生産するという体制であったが、2010年以降は都内外を問わず、一貫生産を行う農家はすべて種雌豚を自家生産している。一方、種雄豚については、青梅畜産センターで飼養するトウキョウX原々種豚(維持群)の産子から選抜した個体を用いることが定められており、農家ごとに配付される種雄豚の血統が固定されている。このように農家における肉豚の生産はもとより、トウキョウXの種豚生産にも青梅畜産センターにおける原々種豚の系統維持は重要な役割を担っている。

トウキョウXは系統完成直後の2002年から遺伝資源の保存を目的に原々種豚の凍結精液作製と保存をすすめてきたが、2010年に国内で口蹄疫が発生したことを踏まえ、万が一の対策として、凍結精液の保存強化を図ることとなった。その頃、大分県農林水産研究指導センターと広島大学により、融解後の活力が高いブタ精子凍結保存方法が開発されたことから、(公財)東京都農林水産振興財団東京都農林総合研究センター畜産技術科では、この技術を導入すべく、両者と特許技術使用許諾契約を締結し、以降、この方法でトウキョウXの精液保存を行っている。新しい方法で作製した凍結精液は、従来のストロー法(豚凍結精液利用技術マニュアル、一部改変)で作製したものよりも融解後の運動精子率が高く、精子生存指数の低下が緩やかであり、高い精子活力が長時間維持することを確認した。そのため通常の子豚生産を目的とした利用も可能と考え、実際に人工授精を行って受胎率や産子数を検証し

たが自然交配時の受胎率には及ばなかった(鈴木・上原, 2015)。

2018年に国内では26年ぶりに豚熱が発生し、また、近隣諸国ではアフリカ豚熱が猛威を振るっている。トウキョウX維持群を飼養する青梅畜産センターでは厳重な防疫対策を講じているが、2019年より更なる安全策として凍結精液の一部隔離保管を開始した。畜産センターから十数キロ離れた(公財)東京都農林水産振興財団立川庁舎で並行して凍結精液の保管を行い、万が一の伝染病侵入時は、農家で飼養するトウキョウX種雌豚にこの凍結精液を人工授精して、維持群を再生していくことが一案としてあるが、確実に担保するためには人工授精成績の向上が必須である。これに加え、貴重な遺伝資源を無駄なく活用するためには、人工授精の回数低減などの省力化を図り、効率化を進めることも必要である。

今回、子宮内の免疫抑制効果による受胎率向上が期待される物質の検討と種雌豚の自然発情に合わせた適切な人工授精タイミングを示すことにより、子豚生産に向けた凍結精液の活用方法を見出したので報告する。

材料および方法

1. 凍結精液の作製と人工授精

青梅畜産センターで飼養しているトウキョウX種雄豚のベ47頭から精液を採取した。種雄豚を偽牝牝に乘駕させ、膠様物をガーゼで除きながら手圧法で濃厚部精液のみ30~50mL程度採取し、大分県と広島大学で共同開発された方法(「受胎率および産子数向上豚凍結精子およびその製法」, 特許2007-325313)に従い処理した。これらをストロー精液管(富士平工業)に0.5mLずつ封入し、液体窒素上で20分間予備凍結した後、液体窒素中に投下して凍結した。そのうち1本を融解して精子運動性を確認し、活力が50+++以上のもののみ保存し、人工授精に用いた。

1回の人工授精にはストロー10本(総精子数約50億)を用いた。液体窒素タンク中よりピンセットを用いてストローを取り出し、直ちに37℃の温水に1分間浸して融解した。これをpH7.0~7.1に調整した融解液(モデナ液)に懸濁して総量を約50mLとした。顕微鏡下で精子活力が50+++以上であることを確認した後、ザーメンチューブに充填して人工授精に用いた。

2. 融解液中への精漿およびカフェインの添加

凍結精液を作製する際は、通常、精漿中の細菌性内毒素（Lipopolysaccharide:LPS）による精子生存性への悪影響（Okazaki et al., 2009）を除くため、精子とともに射出される精漿はすべて除去している。一方、精子の卵母細胞への侵入には、精漿に含まれる生理活性物質の関与が示唆されており（O'LEARY et al., 2004）、岡崎らは、融解液に精漿を添加した凍結精液の人工授精において、液状精液の人工授精と同等の成績を得ている（岡崎ら, 2011）。また、カフェインの添加は、子宮内における免疫抑制効果によって人工授精の受胎率向上が報告されている（Yamaguchi et al., 2009）。そこで、融解液中にこれらを添加して人工授精を実施し、受胎率の検証を行った。

精漿は、トウキョウX種雄豚のうち自然交配において産子数の多い個体2頭から採取した。濃厚部を含む射出精液をすべて採取し、5,000rpmで10分間遠心分離して上清を分離した。ここに抗生物質を加え、5℃で2時間以上静置した後、さらに上清を8,000rpmで5分間遠心分離して上清を得て、10mLずつ分注して-80℃で保存した。人工授精時の融解液への添加濃度は既報（Okazaki et al., 2009）に準じ10%とした。カフェインは融解液500mL中に無水カフェイン（nacalaitesque）を1~10mM添加して5℃で保存し、人工授精時に分注して用いた。

3. 人工授精の適期検証

青梅畜産センターでは通常、朝の飼養管理時に種雌豚の健康チェックを行い、発情が確認された個体はその日の午前中とその翌日の合計2回自然交配しており、受胎率は68~76%である（2017~2019年実績）。ブタの発情はおよそ21日周期で回帰し、2日程度持続する。排卵は発情開始から25~40時間後に起こり、発情後半の交配および人工授精が有効であるとされている（岩村, 2005）。しかし発情持続時間は個体ごとにばらつきがあるため、正確な排卵時期の推定は難しい。凍結精液の人工授精で高い受胎率を得るためには、1発情期間中に3回の人工授精が推奨されるが、省力化を図る目的で2回の人工授精での受胎を目指し、人工授精の実施タイミングを試験1,2の2通り設定して、受胎率を比較した。試験1では、種雌豚の発情を確認した当日の15~16時に1回目の人工授精を行い、2回目はその翌9~10時に行った。試験2では、発情確認日の翌9~10時に1回目の人工授精を行い、2回目を15~16時に行った。

また種雌豚2頭（I, II）において、3頭の異なる

種雄豚A, B, Cの凍結精液を、発情確認日の15~16時、その翌9~10時と15~16時にそれぞれ人工授精し、得られた産子の父親を特定することにより、人工授精を行う最適期の検証を試みた。父子鑑定には産子の体組織（耳刻肉片）を用い、（一社）家畜改良事業団家畜改良技術研究所に依頼した。

これまで凍結精液の人工授精には、子宮深部注入用カテーテル「TAKUMI」（富士平工業）を用いて、子宮角深部まで精液を注入してきた。ブタの人工授精で一般的に用いられている子宮頸管カテーテルでの精子注入では、トウキョウXの場合、大量の逆流を生じる事例が多く、結果的に不受胎となるものが多数あったためである（鈴木・上原, 2015）。しかし、深部注入カテーテルは注入精液の逆流は発生しないものの、子宮角深部へのインナーカテーテルの挿入に技術を要することや、生殖器粘膜の損傷リスクなどいくつかの課題があった。そこで、より簡便に精子を子宮内部へ注入するため、市販されているいくつかのブタ用人工授精器を検討した。そのうち、カテーテルの先端よりゴム製の内筒が約15cm突出して種雌豚の子宮体部に到達するabsoluteカテーテル（イノセント, 図1）を用いて、子宮収縮運動を誘発するため種雌豚の背部を圧迫しながら精液を注入したところ、ほとんど逆流は生じなかった。この手技は非常に簡便であり誰でも実施できることから、本研究での人工授精はすべてこのカテーテルを用いて実施した。

人工授精した種雌豚はのべ63頭であり、人工授精後は約30日間単独で飼育し、妊娠鑑定を行った。受胎が確認された個体は、青梅畜産センターにおける通常の母豚管理方法に従って管理し分娩させた。不受胎だった個体については、発情回帰時に自然交配または人工授精を実施して連続2回以上受胎しなかった場合、不受胎の原因が卵巣機能等の障害と考え、本試験の実績から除外した。また、複数回の人工授精を行っても受胎実

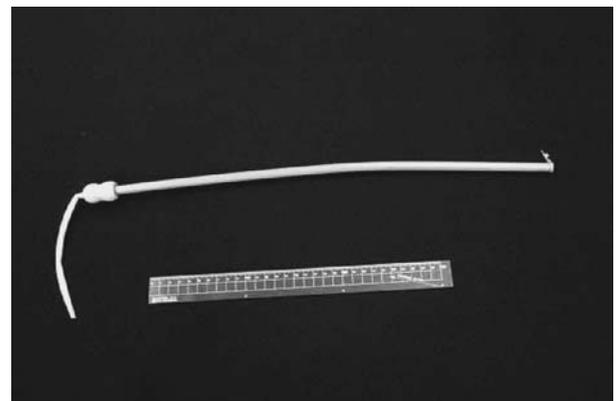


図1. absoluteカテーテル

績が得られなかった種雄豚が3頭あった。種雌豚側に問題はなく、今回検証したあらゆる人工授精条件でも受胎しなかったため、精液自体に何らかの原因があると判断し、この3頭については試験成績から除外した。

結果および考察

1. 精漿またはカフェイン添加時の受胎成績

カフェインを10mM添加した融解液では、のべ5頭の種雌豚に人工授精したがいずれも受胎には至らなかった。そのため、添加量を1mMに低減して種雌豚11頭について受胎率を検討したところ、5頭が受胎・分娩に至った(受胎率45.5%)。一方、精漿を10%添加した融解液を用いたところ、7頭が受胎・分娩に至った(受胎率63.6%)。精漿は使用前の処理が必要であり、また種雄豚のコンディションによる成分変動が考えられるが、精漿添加の方が好成绩だったため、追試を進めた結果、合計のべ29頭の人工授精頭数に対し21頭が受胎した(表1)。この結果から、トウキョウXにおける凍結精液の人工授精は、融解液に精漿を10%添加することが推奨される。

2. 人工授精適期の検証

人工授精の実施時期を約半日ずらし、受胎成績を比較した結果は表2のとおりである。発情開始日に2回人工授精した試験1では、のべ18頭中10頭が受胎(受胎率55.6%)であったのに対し、発情が確認され

た翌日に2回人工授精した試験2では、のべ26頭中16頭が受胎し、受胎率は61.5%だった。やや試験2の成績の方が高かったが、異なる種雄豚の凍結精液人工授精における産子の父子判定の結果、種雌豚Iは産子4頭すべての父親が3回目の人工授精で注入した種雄豚であり、種雌豚IIは産子3頭が2回目、4頭が3回目の人工授精精液の子であった(表3)。これらのことから、トウキョウXにおける凍結精液の人工授精は、種雌豚の発情開始翌日に2回行うことで、高い受胎率が期待できる。

以上の結果をまとめると、融解液中へ精漿を10%添加し、種雌豚の発情発見日の翌日に2回人工授精したときの受胎率は92.3%となり(表4)、トウキョウXにおける凍結精液の人工授精方法として実用可能と考える。本稿執筆時の2020年8月現在、宮城県のトウキョウX飼養農家では未だ豚熱ワクチンの接種が行われておらず、これは豚熱ワクチンを接種した青梅畜産センター産の種豚生体を宮城県に配付できないことを意味する。しかし本研究において作製した凍結精液(ワクチン接種前に作製したものを区分管理している)と、今回試みた人工授精手技を用いることで、ワクチン未接種の地域でも種豚生産が可能となることを示している。さらに、本試験の結果にあるように発情開始翌日の人工授精であれば、農家から発情確認の連絡があり次第、当日の夜までに現地入りして翌日に人工授精をするという工程が構築でき、凍結精液の有効活用とともに職員の労力軽減にもつながる。

表1. 融解液にカフェインまたは精漿を添加したときの受胎成績

区	添加量	供試頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
カフェイン	1mM	11	5	45.5
	10mM	5	0	0.0
精漿	10%	29	21	72.4

表2. 凍結精液の人工授精適期の検討

区	人工授精の実施タイミング		供試頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
	発情日	時間			
試験1	当日	15~16時	18	10	55.6
	翌日	9~10時			
試験2	翌日	9~10時 15~16時	26	16	61.5

表 3. 父子判定による排卵時期の推測

種雌豚	産歴	人工授精した凍結精液(種雄豚)	産子実績		
			総産子数(うち黒子)	父親(種雄豚)	頭数
I	4	A	4 (0)	A	0
				B	0
				C	4
II	3	C	10 (3)	A	0
				B	3
				C	4

*人工授精は I, IIとも発情当日の夕方、翌日の朝と夕方に実施

表 4. 精漿を添加し発情開始の翌日に2回人工授精したときの成績

融解液中添加物	人工授精の実施		種雌豚(頭)	受胎頭数(%)
	発情日	時間		
精漿10%	当日	15~16時	16	9(56.3)
	翌日	9~10時		
	翌日	9~10時 15~16時	13	12(92.3)

今回、凍結精液を人工授精して受胎・分娩に至った種雌豚 28 頭と、本試験人工授精の直前および直後における自然交配での分娩実績がある 16 頭について、それぞれ平均産子数を比較した(表 5)。全体の約 7 割の個体が自然交配時よりも 1 頭以上産子数が少なく、平均すると 3 頭少ない結果だったが、種豚登録の条件となる 1 腹総産子数が 6 頭未満だった事例は 2 例だけであったことから、今後、種豚の生産にも凍結精液の利用は可能と考える。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、種雄豚の精液採取や種雌豚の繁殖管理にご尽力いただいた豚飼養班職員、ならびに人工授精にご協力いただいた畜産技術科研究員に厚く御礼申し上げます。

引用文献

岩村祥吉 (2005) 豚の繁殖生理と繁殖障害(1). All About Swine 26 : 13-17.
 岡崎哲司・秋好禎一・菅 正和・手島久智・島田雅之 (2011) 精漿含有融解液を用いた豚凍結精液による人工授精試験. 日豚会誌 48 : 164-168.

表 5. 産子数実績と自然交配時との比較

人工授精/自然交配	例数	平均産子数(頭)
凍結精液	28	7.3±3.2
自然交配(人工授精の前後2産)	16	10.3±3.2

鈴木亜由美・上原由史 (2015) 凍結精液によるトウキョウ X 遺伝資源保存と効率的子豚生産に向けた検討. 東京都農林総合研究センター研究報告 10 号 : 33-37.
 丹羽太左右衛門監修 (1989) 豚凍結精液利用技術マニュアル. 日本家畜人工授精師協会発行 : 34-38.
 Okazaki, T., S. Abe, S. Yoshida and M. Shimada (2009) Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. Theriogenology. 71:491-498.
 Okazaki, T., Y. Fujita, T. Mihara, M. Shitanaka, H. Negishi, J.S. Richards and M. Shimada (2009) Expression of the Toll-like receptor system that recognize bacterial infection, controls fertilization ability in mammalian spermatozoa, Reprod. Immunol. Biol. 24:174.
 O'Learys, S., M. J. Jasper, G. M. Warnes, D. T. Armstrong and S. A. Robertson (2004) Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig, Reproduction. 128: 237-247.
 Shoichiro Yamaguchi., Hiroaki Funahashi and Tetsuya Murakami (2009) Improved fertility in Gilts and Sows after Artificial Insemination of Frozen-Thawed Boar Semen by Supplementation of Semen Extender with Caffeine and CaCl₂. J. Reprod. Dev. 55:645-649.

High conception rate achieved by artificial insemination of sows with frozen-thawed semen from Tokyo X boars

Ayumi Suzuki¹

¹ Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center

Abstracts

In animal husbandry, it is considered important to prepare for the occurrence of infectious diseases, such as classical swine fever. We therefore prepared frozen semen from “Tokyo X” boar, according to a method developed jointly by Oita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center and Hiroshima University.

Frozen-thawed spermatozoa added to 10% (v/v) seminal plasma were injected two times about 6 hours apart, into the uterine body of sows (n=13) in the latter stages of estrus. As a result, a high conception rate (n=12, 92.3%) was achieved.

Keywords: Tokyo X, frozen semen, artificial insemination, uterine body, seminal plasma

Bulletin of Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center 16: 9-14, 2021

Corresponding author: a-suzuki@tdfaff.com