

実用的な豚胚移植技術の開発

亀山賢次

(全国農業協同組合連合会・飼料畜産中央研究所：〒300-4204 茨城県つくば市作谷1708-2)

Kameyama, K. (1999). Study on practical porcine embryo transfer. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 35:10-12

はじめに

豚の胚移植に関する研究は、清浄豚の作出や防疫面を考慮した閉鎖集団への胚の輸送ならびに系統豚の改良や増殖率の向上等を目的として取り組まれているが、ほとんど実用化されていない。豚胚移植の実用化を妨げている大きな技術的な理由は、発情同期化が難しいこと、生殖器構造が複雑なため非手術的な採卵・移植が困難であることや胚が低温感作に弱く凍結保存が難しいことなどである。個体の価値は牛ほど高くなく、そもそも多胎動物で妊娠期間も短いため、コストと手間のかかる胚移植がコマーシャル段階で利用されるとは考えられない。ただし、系統造成や系統維持段階では凍結保存が可能になれば非常に有効な手段となる。

全農には豚の系統造成部門と2つの原種豚場があるため、豚胚の凍結保存が可能になれば系統豚の維持や種豚場間の豚の輸送に胚移植が即応用できる。このため、特に凍結保存の試験を中心に取り組み、実用レベルの技術ができつつある。その他の課題（発情同期化、過排卵処理、胚の培養）も含め豚胚移植技術の現状について当所のデータをもとに紹介する。

現在の技術レベルと問題点

胚移植を行うにあたり、発情同期化、過排卵処理、採卵、移植、胚の培養・凍結保存などは基本的技術として必須である。胚移植はこれら一連の総合的な技術であり、胚移植関係の試験では体外系で良い成績が得られても最終的には移植試験の成績により評価される。豚は多胎動物であるため、受胚豚の妊娠率とともに生産率（産子数/移植胚数）も重要である。

1. 発情同期化と過排卵処理

発情周期の同期化ができないと、特に採卵・移植を外科的に（全身麻酔による開腹手術でありコストと手間がかかる。）行う豚では作業日程を組むことが難しくなってしまう。豚の性周期に合わせて実施する場合、多頭数確保しなければならない。

5ヵ月齢-90kg程度の性成熟前の豚であればeCGを投与して同期化と過排卵が可能だが、性周期が周り始めてしまうとd15か16にeCGを投与することにより過排卵処置はできるが同期化はできない。離乳豚が使えれば離乳日を調整し、離乳時にeCGを投与することにより同期化できる。当所では主に離乳豚を用い、eCG投与後72時間にhCGを投与し、その翌日(d0)と翌々日にAIを実施して採卵している。eCGとhCGのドーズの違いによる採卵成績を表1に示した。ドーズを増やすと黄体数や回収卵数は増えるが、正常胚数は増え続けない。eCG1,500iu、hCG750iuの区が正常胚数で良好な傾向を示した(表1)。品種別の採卵成績(表2)では黄体数と回収卵数においてデュロック種より大ヨーク種の方が多くなっているが正常胚数は差がない。ただし、デュロックの採卵は冬場、大ヨークのは夏場であったことも関与している可能性もある。いずれにしても、ばらつきが非常に大きい。自然発情豚7頭から採卵したときの平均正常胚数は6.1個であったため、過排卵処理により2倍にはなった。牛では通常(1個のため)の6~9倍も回収できるのはうらやましい限りであるが、牛と同様、反応のばらつきの大きさも問題である。発育段階や品質もかなりばらついてしまう。他に、同期化のために妊娠させてPGF2 α 製剤投与により流産させて調整する手法もある。海外ではレギュ

表1 離乳豚における過排卵処理による採卵成績

過排卵処理	頭数	平均±SD		
		黄体数	回収卵数	正常胚数
eCG1,000iu, hCG 500iu	8	15.5 ± 4.4 ^b	9.5 ± 5.3 ^b	7.3 ± 5.8
eCG1,500iu, hCG 750iu	11	27.3 ± 11.7 ^a	19.4 ± 12.6 ^{ab}	13.1 ± 11.5
eCG2,000iu, hCG1,000iu	5	34.0 ± 7.6 ^a	30.8 ± 8.7 ^a	8.2 ± 7.1

異符号間に有意差あり

表2 離乳豚における過排処理による採卵成績 (品種別) *

品種	頭数	平均±SD (最大値)		
		黄体数	回収卵数	正常胚数
デュロック	99	25.2 ± 9.3 ^b (51)	22.4 ± 10.6 ^b (51)	15.6 ± 11.0 (45)
大ヨーク	130	29.1 ± 17.4 ^a (108)	27.5 ± 18.0 ^a (108)	14.6 ± 12.9 (63)
合計	229	27.4 ± 14.6	25.3 ± 15.5	15.0 ± 12.1

*過排卵処理; eCG1,500iu, hCG750iu

異符号間に有意差あり

合計での回収卵率 (回収卵数/黄体数) =91.8%, 正常胚率 (正常胚数/回収卵数) =59.5%

メート (合成黄体ホルモンの経口投与剤) が使われているが、日本では認可されていない。

2. 採卵

外科的に子宮を露出してバルーンカテーテルを装着し、灌流液を入れて子宮をマッサージする。その後、灌流液を回収して検卵する。卵巣や子宮の癒着の発生や開腹手術による供胚豚のダメージなどの問題があり、反復利用はあまり多くはできない。

豚胚はd3の4~8細胞期くらいで子宮に下降し、d4の8~16細胞期にコンパクトを起す。d5で胚盤胞、d6で拡張胚盤胞となり、透明帯からの脱出も始まる。

3. 移植

子宮に移植する場合、外科的に子宮を露出して穴を開け、移植用カテーテルを確実に子宮腔内に導入し移植する。子宮に開けた穴を確保するためにストローを入れておくと移植用カテーテルをうまく子宮腔内に導入できる。

非外科的な移植法は最近国内外で再現性ある手法が報告されてきており、今後安定した妊娠率と産子生産率の向上が望まれる。

4. 胚の培養

胚移植を行うにあたり、最低数時間から数日間の胚培養が必要になる。豚胚の培養はd4に採取した桑葉期胚は乳酸、ピルビン酸を除いたm-BMOC-2などの単純な培地が良く、d5に採取した胚盤胞期以降はTCM199などの組織培養液でも良好な発育がみられた。

豚の胚移植試験を始めたころのデータであるが、新鮮胚 (数時間培養) の移植では4頭中3頭 (75%) が

受胎し、分娩豚当たりの生産率 (総産子数/移植胚数) は21/56 (38%) であった。1~2日間培養した胚の移植試験では16頭中12頭 (75%) が受胎し、分娩豚当たりの生産率は74/176 (42%) であった。なかにはd4に採取して2日間培養した区で18個移植して15頭 (83%) の産子を分娩した個体もあり、今後生産率向上の検討を進めれば、より良好で安定した成績になっていくものと考えている。

5. 胚の凍結保存

凍結保存法が確立されれば採卵から移植までの時間的・空間的制約は解除され、胚移植の利用性は大いに高まる。かつて、豚胚は低温に弱く15℃以下で生存不可能と言われていた。その原因についても大型の脂肪滴を多量に含むためとされていたながら詳細な検討はされていなかった。1989年、小栗らは凍結保存後、新鮮胚との混合移植 (妊娠を成立させるために新鮮胚を同時に移植) により凍結胚由来の産子1頭を得た。翌1990年、全農で凍結保存胚のみの移植で3頭の産子 (うち死産1、他にミイラ1) を得た。しかし、その後の成功は数例しかない状態が続いた。1995年、長島らは脂肪を遠心で偏らせてからマイクロマニピュレーションでその脂肪を抜き取った後に凍結保存した胚を39個移植し3頭の産子を得た。耐凍性の低い原因として脂肪が大きな問題であることははっきりした。その問題を克服するための手法の検討もあり、近年、豚凍結保存胚の移植成功例の報告が増えてきている。

当所では1990年に産子が得られたものの、その産子生産率は低く実用化は無理だった。豚胚の凍結保存の試み自体がまだ少なく凍結保護物質の種類、濃度、凍結曲線等の基本的手法についても十分検討されていないため、牛胚等の凍結保存に用いられているいくつか

表3 豚凍結保存胚の移植成績；分娩豚中の手法別成績

手法*	移植頭数	融解胚数	移植胚数	平均		
				融解胚数	移植胚数	総産子数**
SW	6	258	169(66%)	43.0	28.2	4.8(17%)<11%>
D	6	135	135(100%)	22.5	22.5	4.2(19%)<19%>
合計	12	393	304(77%)	32.8	25.3	4.5(18%)<14%>

*；手法

SW(ステップワイス法)。融解後凍結溶液を段階的に希釈し、数時間培養(生存検査)後に移植。

凍結溶液；1.5Mグリセロール+20%調整血清(FCS)±1%デキストラン in M199(PBS)

凍結曲線；-6.8℃(植氷,10分)→0.6℃/分(所要時間47分)→-35℃；液体窒素投入

D(ダイレクト法)。融解後、その凍結溶液のまま移植。生存検査は行わない。

凍結溶液；4%エチレングリコール+4%プロピレングリコール+20%調整血清+1%デキストラン in M199

凍結曲線；-6℃(植氷,15分)→0.5℃/分(所要時間53分)→-32.5℃；液体窒素投入

**；()移植胚当たり、<>融解胚当たりの%

の方法を基にして種々の凍結法を比較検討しながらより良い条件を検索してきた。

今までに延べ48頭に移植し、18頭(38%)が分娩している。分娩豚中の融解胚当たり生産率は15%(75頭娩出/517個融解)であった。受胎率や生産率に影響を与えた要因としては胚の発育段階や凍結溶液に使用した血清の種類、発情同期化に用いたホルモン製剤の種類などが挙げられる。他に胚の耐凍性に対する個体差も示唆された。胚の発育段階や個体による受胎率や生産率の差はその原因解明と手法の改良により解消されていくものとする。分娩豚中の手法別成績を表3に示した。ダイレクト法の方が融解胚当たりの生産率で良い傾向を示している。ダイレクト法では受胎豚の黄体確認後に凍結胚を融解して移植するため、卵巣状態が悪く移植中止となるようなケースでも胚が無駄にならず、また、手術室にCO₂インキュベーターも不要である。現在、さらにダイレクト法の凍結溶液に検討を加え、より高位安定的な手法ができつつある。

おわりに

技術的問題点の多い中、当所では凍結保存の確立に力を入れ、1～2頭の供胚豚から受胎豚1頭分の凍結胚を確保し、8頭生産できれば事業へ応用できるという具体的な数値目標を掲げて取り組んでいる(供胚豚2頭からの場合、品種を変えて産子の血統を明らかにする)。この場合、系統豚の維持等に豚を飼い続けるよりもコストが低減できるうえにジーンバンクや豚の輸送手段としても利用できる。

引用文献

- Galvin, J. M. et al. (1994) A produce for successful nonsurgical embryo transfer in swine. *Theriogenology*, 41:113-118.
- Guthrie, H. Dand Polge, C. (1978) Treatment of pregnant gilts with a prostaglandin analogue, Croprostero, to control oestrus and fertility. *J. Reprod. Fert.* 52:271-273.
- 亀山賢次ら(1990)「豚受精卵の短期保存後の移植試験」全農飼料畜産中央研究所試験研究報告第18号(平成元年度)222-225.
- 亀山賢次ら(1990)「豚胚の凍結保存におけるレシチン添加の効果」第78回家畜繁殖学会講演要旨。-54
- Kameyama, K., et al. (1997) Transfer of cryopreserved pig embryos. *Theriogenology*, 47:366
- 河原崎達雄ら(1990)「豚胚移植における発情同期化法について」静岡県中小家畜試験場研究報告 第3号:13-17.
- Nagashima, H., et al. (1995) Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*, 374:416
- 小栗紀彦(1989)「豚胚の移植ならびに保存における最近の進歩」第53回日本養豚学会講演要旨p48・54
- Reichenbach, H. D. et al. (1993) Piglets born after transcervical transfer of embryos into recipient gilts. *Veterinary Record*, 133, 36-39.
- Wilmot, I. (1972) The low temperature preservation of mammalian embryos. *J. Reprod. Fert.* 31: 513-514.
- Yonemura, I. et al. (1996) Transcervical transfer of porcine embryos under practical conditions. *J. Reprod. Dev.*, 42: 89-94.