

## 豚受精卵を活用した遺伝資源保存技術の確立

今岡豊\*、高橋哲也\*\*

### 要約

愛媛甘とろ豚の生産に不可欠な中ヨークシャー種（以下：Y種）は、当センターにおいて育種改良を続けている重要な遺伝資源である。本県においては、万が一に備え、生体の分散飼育に取り組んでいるものの、感染力の強い伝染性疾病等が発生した際には、貴重な遺伝資源が消滅する恐れがある。そこで、新たな遺伝資源保存体制の構築を目的とし、受精卵のガラス化保存を活用したY種の遺伝資源保存技術について検討した。

効率的排卵同期化処理技術については、安息香酸エストラジオール製剤を用いた偽妊娠誘起と排卵同期化処理の併用により、ガラス化保存に適したステージ（BL及びEx-BL）の受精卵を安定的に採取できることが確認された。ガラス化保存技術については、受精卵を含むガラス化液の液体窒素への接触の有無が加温融解後の生存性に及ぼす影響について比較検討した結果、その後の生存性は同等（48時間後の生存率 接触有 60%と接触無 58%）であったものの、防疫上の観点等を考慮すると、受精卵を含むガラス化液を液体窒素に直接接触させず保存するガラス化保存手法がY種受精卵の保存に有用であると考えられた。さらに、非外科的移植技術の検討により、ガラス化保存後の受精卵の追い移植により産子が得られた（産子生産率 4.4%）ことから、Y種受精卵のガラス化保存の活用は遺伝資源保存技術として有用であることが示唆された。

キーワード：中ヨークシャー種、受精卵、ガラス化保存

### 緒言

愛媛甘とろ豚の生産に不可欠なY種は、当センターにおいて育種改良を続けている重要な遺伝資源である。しかしながら、本県においては、Y種生体を遺伝資源として保存する体制をとっているため、育種改良に必要な系統遺伝資源の計画的な保存が困難な状況にあり、加えて、CSF（豚熱）等感染力の強い伝染病発生時には、重要な遺伝資源が途絶える可能性があるといった課題も残されている。

そこで、伝染性疾病発生時のリスク回避及びより安全性の高い優良種畜の持続的育種改良を可能とする本県Y種に適した遺伝資源保存体制の構築を目的とし、効率的な排卵同期化処理技術及び近年様々な種の遺伝資源保存技術として注目されている受精卵のガラス化保存技術の有効性について検討するとともに、それに続く移植技術として従来の外科的移植に代わる簡易な

非外科的移植の有用性について検討した。

### 材料および方法

1) 効率的排卵同期化処理技術の検討 [試験 1]  
供胚豚としてY種未経産豚 15頭を用い、2022年4月～2023年3月の間に受精卵を採取した。

排卵同期化処理方法については、家畜改良センターのデュロック種（以下：D種）で報告されている平山ら<sup>1)</sup>の処理方法に準じて実施した。即ち、供胚豚の発情開始日から10日目に安息香酸エストラジオール（以下：EB）20mgを投与し偽妊娠を誘起し、その後8～12日目の間に、プロスタグランジン F2 $\alpha$ （PGF2 $\alpha$ ）として0.184mgを投与し、24時間後に再び同量投与した。2回目のPGF2 $\alpha$ 投与時に1500IU血清性性腺刺激ホルモン（eCG）を投与し、eCG投与72時間後に500IUヒト絨毛性性腺刺激ホ

\*食肉衛生検査センター \*\*退職

ルモン（hCG）を投与して排卵を誘起した。これらのホルモン製剤はすべて頸部筋肉内に投与した。人工授精は、hCG 投与後 24 時間及び 42 時間に実施し、その後、初回人工授精 6 日目に、イソフルラン（3～4%）吸入麻酔下で開腹手術を施し、子宮角内を豚卵子・胚回収液（POE-CM 株式会社機能性ペプチド研究所）で灌流して受精卵を採取した（第 1 図）。

調査項目は、回収受精卵数及び発育ステージとした。

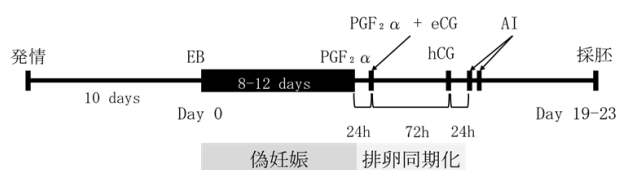


図 1 偽妊娠誘起と排卵同期化処理

## 2) ガラス化保存技術の検討 [試験 2]

受精卵を含むガラス化液の液体窒素への接触の有無が加温融解後の生存性に及ぼす影響について検討するため、液体窒素とガラス化液が接触する Cryotop®（株北里コーポレーション）を用いた手法と三角らが開発した液体窒素とガラス化液が接触することのない胚スティック（ミサワ医科工業株）を用いた MVAC 法<sup>2)</sup>により、採取した受精卵をガラス化保存した。受精卵のガラス化保存は、市販のブタ胚ガラス化保存液キット（PEV-SK 株式会社機能性ペプチド研究所）を使用し、付属のマニュアルに準じて処理を行った。ガラス化保存受精卵の加温融解処理は、ブタ胚加温・希釈液（PWDS 株式会社機能性ペプチド研究所）に保存器具の先端を投入・遊離後 3 分間保持した後、ブタ後期胚培養用培地（PBM 株式会社機能性ペプチド研究所）で 3 回洗浄し、PBM ドロップに移し 38℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%air の条件化で 48 時間体外培養を行った。

生存性は、体外培養後 3、24、48 時間目に倒立顕微鏡下の形態学的観察により評価判定した。試験期間は 2021 年 4 月～2022 年 3 月で実施した。

## 3) 非外科移植技術の検討 [試験 3]

受胎豚として、受精卵のみを移植する受精卵移植区 5 頭、人工授精後 6 日目に受精卵を移植する追い移植区 3 頭を用いた。ガラス化保存した受精卵は、瀧下らの報告<sup>3)</sup>に準じ、豚舎内にて加温、希釈後に、移植器具（紅 3 号：ミサワ医科工業株）を用いて受胎豚 1 頭当たり 15 個非外科的移植し受胎性と産子数を調査した。

試験期間は 2022 年 3 月～2023 年 3 月で実施した。

## 結果

### 1) 効率的排卵同期化処理技術の検討 [試験 1]

供胚豚 15 頭を用い延べ 22 回受精卵の採取を行い合計 276 個の受精卵を回収し、1 回あたり平均回収個数は 12.5 個であった。採取した受精卵の発育ステージは CM：1 個、E-BL：7 個、BL：103 個、Ex-BL：79 個、Hd-BL：24 個、未授精（mono）及び変性（dege）が 62 個であり、豚受精卵のガラス化保存に適した発育ステージとされる BL 及び Ex-BL は、回収個数 276 個のうち 182 個（66%）であった（第 1 表）。

表 1 回収受精卵の発育ステージ

区 分	発 育 ス テ ー ジ						合 計	
	mono	dege	CM	E-BL	BL	Ex-BL		Hd-BL
受精卵個数	23	39	1	7	103	79	24	276

### 2) ガラス化保存技術の検討 [試験 2]

Cryotop®にてガラス化保存した受精卵数は 15 個で、培養 3 時間後の生存率は 87%、24 時間後の生存率は 67%、48 時間後の生存率は 60%であった。また、胚スティックにてガラス化保存した受精卵は 31 個で、3 時間後が 87%、24 時間後が 74%、48 時間後が 58%であった（第 2 表）。時間経過とともに生存率は減少するものの、両器具ともに 48 時間後に約 6 割の受精卵が生存していることが確認された。

表2 ガラス化受精卵の融解培養後の生存率

供試器具	培養時間		
	3h後	24h後	48h後
Cryotop® (n=15)	87% (13)	67% (10)	60% (9)
胚スティック (n=31)	87% (27)	74% (23)	58% (18)

単位：( )内個

## 3) 非外科移植技術の検討 [試験 3]

受精卵移植区では供試豚5頭のべ75個の受精卵を移植した結果受胎は認められなかった。追い移植区では供試豚3頭中2頭の受胎が確認され、移植受精卵45個に対して2頭の産子が生まれたことから、産子生産率は4.4%であった(第3表)。

表3 非外科的移植技術の検討

方法	移植頭数	受胎頭数	移植卵数	産子数	産子生産率(%)
受精卵移植	5	0	75	0	0
追い移植	3	2	45	2	4.4

## 考察

効率的排卵同期化処理の検討において、ガラス化保存適性ステージ(BL及びEx-BL)<sup>4)</sup>の受精卵回収率が60%を上回ったことから、D種で報告されているEBを用いた偽妊娠誘起技術と排卵同期化処理の併用処理<sup>1)</sup>はY種においても有効であることが示唆された。Y種受精卵を含むガラス化液の液体窒素への接触の有無が加温融解後の生存性に及ぼす影響についての検討では、Cryotop®及び胚スティック両器具ともY種受精卵のガラス化保存に有用な結果が得られたものの、1保存器具当たりのガラス化保存可能受精卵数(Cryotop®1~5卵に対し胚スティック3~15卵)及び防疫面におけるリスク低減を考慮すると、Y種受精卵のガラス化保存器具としては、胚スティックがより有用であると考えられた。

また、ガラス化保存受精卵の非外科的追い移

植により産子が得られたことから、受精卵のガラス化保存は、Y種の遺伝資源保存技術として有用であることが示唆された。

しかしながら、ガラス化受精卵の非外科的移植の受胎率および産子生産率が、他報<sup>5)6)</sup>と比較して低かったことから、今後は、ガラス化保存受精卵非外科的移植の産子生産率を向上させるための詳細な条件検討が必要である。

## 参考文献

- 1) Hirayama, Y et al: Anim. Sci. J 90 1523-1529 (Abs)
- 2) Misumi, K et al: J. Reprod. Dev 59 520-524
- 3) 瀧下梨英ら：日本養豚学会誌, 57, 138-146 (2020)
- 4) 大曲秀明ら：日本養豚学会誌, 52, 1-7 (2015)
- 5) 本山左和子ら：日本養豚学会誌, 56, 77 (2019)
- 6) 田島茂行ら：日本養豚学会誌, 56, 78 (2019)