

偽妊娠誘起を応用したブタの過剰排卵処理技術の検証

畜産研究センター 竹口琴葉、木下政健、宇都宮昌亀、村上恭彦
緒言

当センターでは、本県の畜産ブランドの1つ愛媛甘とろ豚の種豚である中ヨークシャー種（Y種）の改良を進め、愛媛系Y種を造成しており、生産者へ生体及び人工授精（AI）用精液という形で愛媛系Y種を供給している。また、家畜伝染病発生時の愛媛系Y種の遺伝資源保存対策として養鶏研究所で分離飼育を行っている。しかし、分離飼育により、貴重な遺伝資源は保存できるものの、飼養コストや労力がかかるため、効率的な遺伝資源保存体制すなわち胚の超低温保存技術を活用した遺伝資源保存体制の構築が急務であると考えられる。

ブタ胚は脂肪酸組成比や細胞質内脂肪顆粒の存在といった特異性により、他の家畜の胚と比べ、低温に極めて弱く、凍結融解後の胚生存性が低いため、AIと同等の産子数を得ることが困難であった。しかし近年、胚の発育ステージの中で耐凍性のある胚盤胞（BL）から拡張胚盤胞（Ex-BL）を超急速ガラス化保存することで、高い胚生存性や産子を得たと報告されている。すなわち、ブタ胚の発育ステージを考慮し、超低温保存することで有効な遺伝資源保存対策になりうると考えられる。

現状のブタ胚回収技術においては、自然発情を利用すると発育ステージが分散する傾向が認められるため、通常は過剰排卵処理を施し、発育ステージを統一させている。しかし、ブタの発情周期によって過剰排卵処理の日程が決まるため、胚回収日の調整が困難となる。そこで、一部では計画的に胚回収するため、過剰排卵処理と発情調整技術の1つである人工流産法が併用されるが、流産を強行するという面でアニマルウェルフェア上の問題を抱えている。一方、人工流産法に代わる技術として、ブタの妊娠維持機構を利用し、エストロゲン製剤を投与して妊娠に似た状態を誘起する偽妊娠誘起が注目されている。

そこで、本試験では愛媛系Y種の効率的な遺伝資源保存体制の構築へのアプローチとして、耐凍性のある胚の効率的な回収手法を検証するため、偽妊娠誘起と過剰排卵処理の併用が胚の発育ステージと品質に及ぼす影響を調査した。

材料及び方法

1 試験期間と供試豚

試験は2017年11月から12月にかけて実施した。供試豚は、当センター繋養の約9.9ヶ月齢、体重約130kgの未經産Y種雌豚3頭を用いた。

2 試験区分

表1に示したとおり、3頭のうち、2頭（ブタA及びブタBとする）には偽妊娠誘起及び過剰排卵処理（試験区）、1頭には過剰排卵処理のみ（対照区）を施した。

表1 試験区分

| 区分 | 偽妊娠誘起 | 過剰排卵処理 |
|-----|-------|--------|
| 試験区 | | |
| ブタA | ○ | ○ |
| ブタB | | |
| 対照区 | × | ○ |

※試験区：平成29年2月9日生まれ同腹豚

3 ホルモン処理

試験区は、偽妊娠誘起として発情開始後9～13日目にエストラジオールプロピオン酸エステル (EDP) 20mg を1回筋肉内投与した。EDP投与後21日目から、過剰排卵処理としてプロスタグランジンF2 α (PGF2 α) 2ml (クロプロステノールとして0.175mg) を24時間間隔で2回筋肉内投与し、2回目のPGF2 α 投与時に血清性腺刺激ホルモン (eCG) を1500IU、その72時間後に胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) を500IU 筋肉内投与した。hCG投与24及び41時間後の2回AIを行い、初回AI後6日目に胚を回収した。

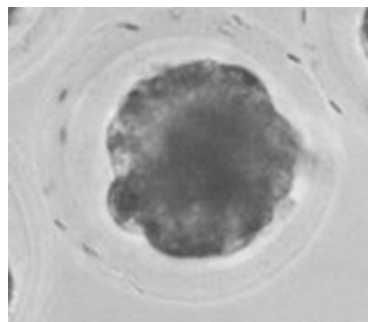
対照区は、偽妊娠誘起を施さず、発情終了後12日目から試験区と同様に、過剰排卵処理及びAIを実施し、胚を回収した。

4 胚の回収方法

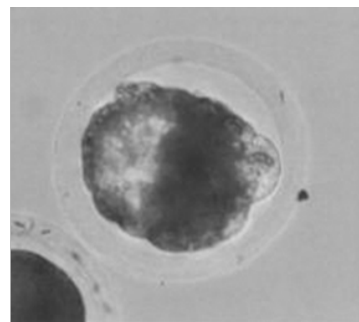
供試豚をと殺後、手術台に仰臥・保定し、術部の洗浄・剃毛消毒を行った。その後、最後乳頭から約20cm幅で正中線切開し、腹膜まで切開して子宮を摘出した。黄体数を確認し、子宮角分岐部から約3cmの部位を穿孔し、バルーンカテーテルを挿入後、片側子宮角に50ccずつ卵管膨大部からブタ卵子・胚回収液 (POE-CM: 株式会社機能性ペプチド研究所) を流し、胚を回収した。

5 胚の発育ステージと品質

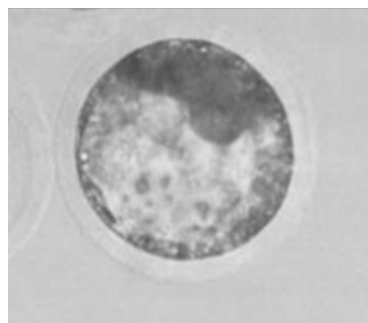
回収胚の発育ステージと品質は、顕微鏡下で検査した。発育ステージは、図1に示したとおり、細胞間の結合が強まり、細胞が小型化した塊となったものを収縮桑実胚 (CM)、胞胚腔が体積の半分未満のものを初期胚盤胞 (E-BL) とした。本試験の対象としたBL及びEx-BLは、胞胚腔が体積の半分以上のものをBL、胞胚腔が拡張し、透明帯の厚さが薄くなったものをEx-BLとした。また、本試験では、変性胚や未受精卵は異常胚としてまとめた。品質は、国際胚移植学会 (IETS) のマニュアルに準じ、コード1からコード4にランク付けした。



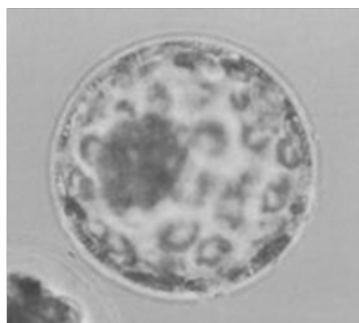
収縮桑実胚 (CM)



初期胚盤胞 (E-BL)



胚盤胞 (BL)



拡張胚盤胞 (Ex-BL)

図1 胚の発育ステージ

結果及び考察

回収成績を表2に示した。黄体数は、ブタBと対照区では各試験区間で差は認められなかった。一方、ブタAは他個体に比べて左右の卵巢共に黄体数が少なく、多数の小卵胞が散見されたが、個体間のホルモン処理に対する感受性の差が原因ではないかと考えられた。回収率及び回収胚における正常胚の割合は、各試験区間で差は認められなかった。

表2 回収成績

| 区分 | 黄体数 (個) | | | 回収胚数 (%) | 正常胚数 (%) | |
|-----|---------|----|----|-----------|------------|-----------|
| | 左 | 右 | 計 | | | |
| 試験区 | ブタA | 6 | 8 | 14 | 14 (100.0) | 12 (85.7) |
| | ブタB | 12 | 14 | 26 | 26 (100.0) | 20 (76.9) |
| 対照区 | 13 | 16 | 29 | 26 (89.7) | 21 (80.8) | |

回収胚の発育ステージ割合を図2に示した。発育ステージにおけるBL及びEx-BLの割合は、対照区では3.8%と低く、発育ステージは分散傾向にあった。一方、試験区ではブタAが64.3%、ブタBが57.7%と高く、発育ステージはBL及びEx-BLに集中していた。上述の結果より、ブタAの黄体数、すなわち回収胚数は少なかったものの、偽妊娠誘起を施すことにより発育ステージの進んだ胚を集中して回収することが可能になると考えられた。

回収胚の品質割合を図3に示した。品質におけるコード1の割合は、対照区に比べ、試験区ではブタAが85.7%、ブタBが69.2%と高い傾向にあったことから、偽妊娠誘起を施すことで高品質な胚をより多く回収することが可能になると考えられた。

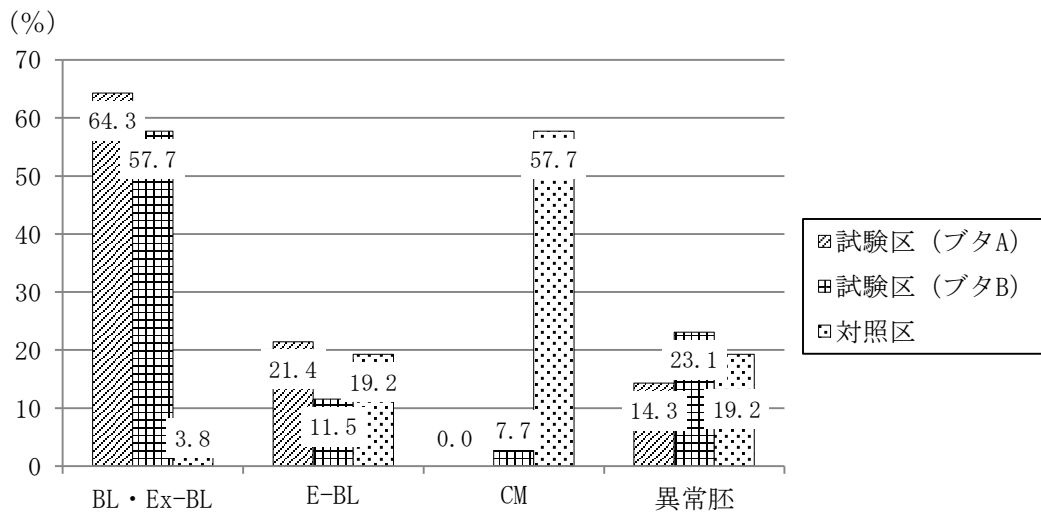


図2 回収胚の発育ステージ割合 (%)

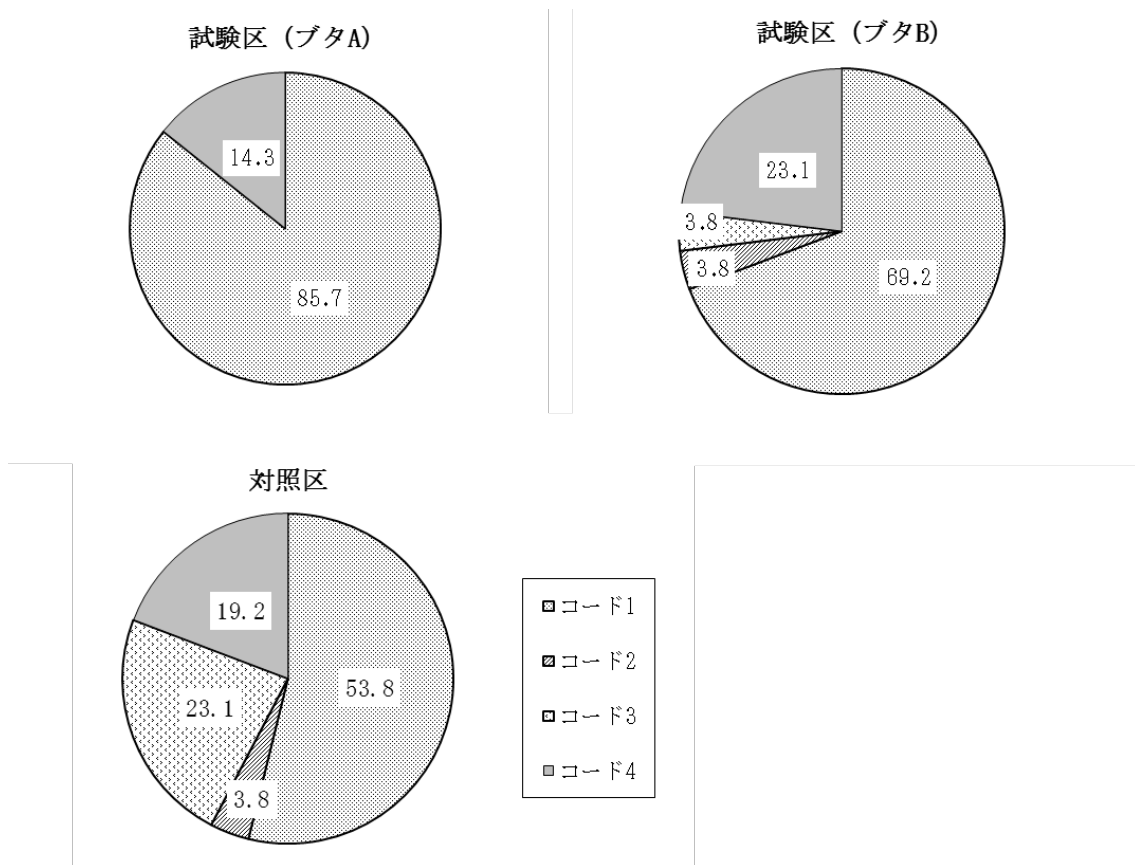


図3 回収胚の品質割合 (%)

コード1における回収胚の発育ステージ割合を表3に示した。BL及びEx-BLの割合は、対照区では7.1%と低かったのに対し、試験区ではブタAが75.0%、ブタBが83.3%と非常に高くなった。

以上の結果から、試験区すなわち偽妊娠誘起を応用した過剰排卵処理技術を用いることで耐凍性の高い高品質な胚の回収が可能になると考えられた。

表3 コード1における回収胚の発育ステージ割合

| 区分 | 発育ステージ割合 (%) | | | |
|-----|--------------|------|------|-----|
| | BL・Ex-BL | E-BL | CM | |
| 試験区 | ブタA | 75.0 | 25.0 | 0.0 |
| | ブタB | 83.3 | 16.7 | 0.0 |
| 対照区 | 7.1 | 21.4 | 71.4 | |

本試験の結果から、偽妊娠誘起と過剰排卵処理を併用することで、偽妊娠期間による胚回収日の調整、発育ステージの統一による耐凍性の高い高品質なBL及びEx-BLの回収が可能であると考えられた。今後は、超低温保存した胚の生存性確認、受胎豚への移植、受胎性及び分娩成績等の調査を実施し、課題を解決すると共に、効率的な遺伝資源保存体制を構築し、将来的には安定的な愛媛甘とろ豚の生産に寄与したい。

引用文献

- 1) 国際胚移植学会(IETS)：胚の衛生的取り扱いマニュアル(第3版)
- 2) 野口倫子：養豚の友, 524, 20～23(2012)
- 3) 大曲秀明ら：日豚会報, 52(1), 1～7(2015)
- 4) 社団法人畜産技術教会：豚の胚移植マニュアル
- 5) 柴田貴子ら：愛知県農業総合試験場研究報告, 38, 161～166(2006)
- 6) 吉岡耕治：動衛研ニュース, 47, 4～5(2012)