

4. 受胚豚への胚の移植

4. 受胚豚への胚の移植

(1) 移植農場の衛生条件

移植農場は日本SPF協会が定める衛生条件に準じており、以下の内容で衛生検査を実施している。

- ① オーエスキー病及びPRRS抗体検査：毎月1回、抽出で実施（飼養頭数の1／3）。
- ② ブルセラ：種畜検査対象豚及びET受胚豚、産子（全頭）
- ③ サルモネラ菌糞便検査：ET受胚豚（全頭2回）、産子（全頭）、繫養豚（30頭）
- ④ 豚マイコプラズマ肺炎抗体検査：ET受胚豚及び産子（65％抽出）
- ⑤ 豚胸膜肺炎抗体検査：ET受胚豚及び産子（全頭）
- ⑥ トキソプラズマ抗体検査：ET受胚豚及び産子（全頭）
- ⑦ 鼻腔内細菌検査：ET受胚豚及び産子（全頭）

(2) 受胚豚の準備

Polgeらの報告⁶⁾では、供胚豚より0～2日遅れで発情を発現した受胚豚に胚を移植した結果、受胎率が70%を超え、その中でも特に2日遅れで発情発現した受胚豚では86%の受胎率を示した。逆に受胚豚が供胚豚よりも雄許容が早かった場合は、受胎率が下がることを報告している。このことから、家畜改良センターでは、発情同期化が1日程度ずれることを予め想定して、受胚豚は供胚豚よりも発情誘起処理開始を1日遅らせて、hCG投与翌日を0日として、4日目の受胚豚を移植に用いている。

発情誘起処理方法については供胚豚と同様な手法を用いている。

- ① 供胚豚の処理を開始した翌日に、人工授精後12～40日目の豚にPGF2 α （クロプロステノールとして0.184mg）を頸部筋肉内投与する。
- ② その24時間後に同量のPGF2 α とeCG（600～1000IU）を頸部筋肉内投与する。
- ③ eCG投与72時間後にhCG（500IU）を頸部筋肉内投与する。
- ④ 発情を観察し、雄許容を確認する（供胚豚との雄許容のずれを計算して、0～2日の豚のみを使用する）。

図1. 受胎豚の発情同期化のスケジュール

供胚豚		受胎豚
PGF _{2α}	-10	
PGF _{2α} +eCG	-9	PGF _{2α}
	-8	PGF _{2α} +eCG
	-7	
hCG	-6	
Day 0 [※]	-5	hCG
Day 1	-4	Day 0 [※] AI(朝・夕)
Day 2	-3	Day 1 AI(朝)
Day 3	-2	Day 2
Day 4	-1	Day 3
採卵日 Day 5	0	Day 4 移植日

使用薬品

- PGF_{2α} : クロプロステノールNaとして0.184mg
(プラネート 武田シェリング・プラウ アニマルヘルス)
- eCG : 血清性腺刺激ホルモンとして1500IU
(セロトロピン 帝国臓器)
- hCG : 胎盤性性腺刺激ホルモンとして500IU
(プベローゲン 三共)

[※] hCG投与翌日をDay 0とする。

今回の胚移植により得られた子豚については育種素材として利用するために血統登録を取得する必要がある。社団法人日本種豚登録協会が定める「受精卵移植による生産豚の登録取り扱い要領」⁷⁾には、「生産豚の子豚登記または血統登記を受けようとする者は、受胎豚に対し、一度に2腹以上の供卵豚の受精卵を移植してはならない。」と記載されている。そのため、家畜改良センターではその要領に準じて胚移植の計画を組んでいる。

4. 受胚豚への胚の移植

(3) 胚の受け取り

- ① 採卵農場の胚輸送担当者は、移植農場に到着したら受付にて電話で到着したことを連絡し、所定の場所に輸送用保温容器を置き、検卵者に接触しないように、直ちにその場を立ち去る。
(胚輸送担当者と移植農場職員の歩行経路が重ならないように配慮する。パスボックス等があれば、それを利用した方が望ましい。)



- ② 移植農場職員は、胚輸送者が立ち去ったことを確認した後、場外専用の輸送用保温容器をアルコールにて充分消毒する。



- ③ 場内専用の保温容器を場外専用の輸送用保温容器の近くに置き、蓋を開ける。



4. 受胚豚への胚の移植

- ④ 移植農場職員は、滅菌手袋を着用し、外側の滅菌袋Bの開封口を手で広げて、胚を封入した小試験管が入った内側の滅菌袋Aを滅菌したピンセットで取り出す。



滅菌手袋を着用し蓋を開ける



外側の滅菌袋Bを取り出す



内側の滅菌袋Aを滅菌した
ピンセットで取り出す

- ⑤ 取り出した滅菌袋Aを場内専用の保温容器に移し替える。



取り出した滅菌袋Aを保温容器に移す

- ⑥ 移植農場職員は手袋を外した後、手指をアルコールで噴霧消毒し、場内専用の保温容器に蓋をする。



手袋を外す



保温容器に蓋をする

- ⑦ 場内専用の保温容器をアルコールで噴霧消毒した後、検卵室に輸送する。
⑧ 検卵者は保温容器を受け取る。
⑨ 胚輸送担当者は、移植農場職員が立ち去ったことを確認した後、場外輸送用保温容器及び移植農場職員が使用した手袋を片付ける。

4. 受胚豚への胚の移植

(4) 胚の確認

胚の確認をする部屋の室温を25℃以上にする。

胚の操作を無菌的に行うため、クリーンベンチ等の中で実施する。

- ① 5 ml程度のピペットを使用して、小試験管内の胚が入ったM2液を試験管の底から静かに35mmのディッシュ内に移す。
- ② 胚の数及び発育ステージを確認し、採卵農場から送られてきたFAXの内容と誤りがないことを確認する。
※この時点で、変性胚は取り除き、移植には使用しない。
※透明帯に破損や付着物がある胚が確認された場合は、同じ試験管内で輸送されてきた胚すべてが汚染されている可能性があるので移植には使用しない。
- ③ 移植前の胚の洗浄及び移植液はM2液を使用し、39℃に温めた新しいM2液を2 ml程度入れた35 mmのディッシュを数枚用意し、それらに移植可能な胚を移した後、数回洗浄する。
- ④ 胚の洗浄後、移植までに時間がある場合は、M2液を2 ml程度入れた35 mmのディッシュ内に胚を移し、38℃、5%CO₂のインキュベーター内で保存する。

(5) 胚の移植

体外で胚を保存する時間をできる限り短くするため、胚の到着と同時に、移植手術準備班は受胚豚に麻酔をかけ、手術台に移し、開腹手術がいつでも開始可能な状態にしておく。検卵者が胚を確認後、移植可能と判断した後、開腹手術を開始する。

【外科的手術による胚の移植（「豚の胚移植マニュアル」に準拠）】

- ① 手術室の室温を25℃以上に保つ。39℃に設定したウォーターバスで生理食塩水、コンドロイチン硫酸溶液を温めておく。使用方法は、採卵時と同様。
- ② 術者は開腹後、卵巣を取りだし、排卵を確認する。

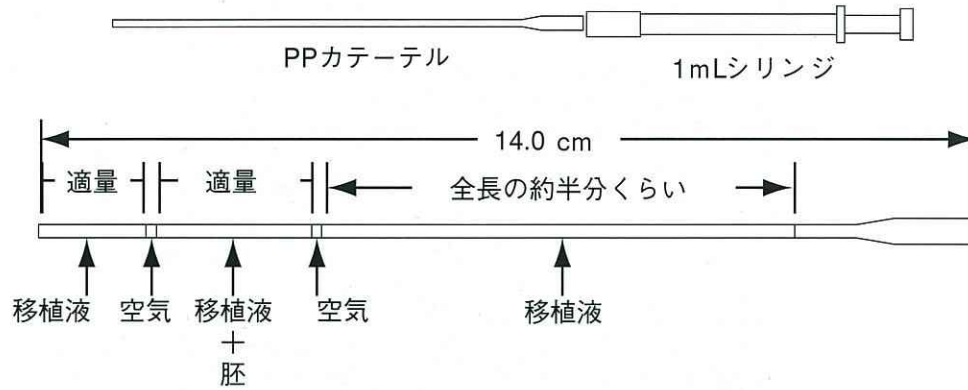


排卵の確認

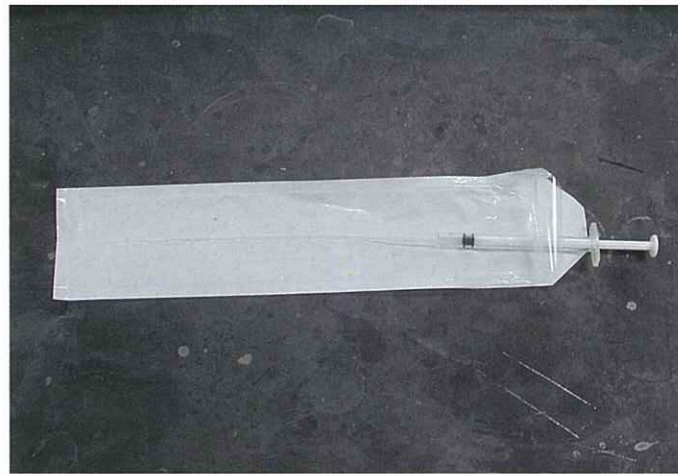
※家畜改良センターでは、手術時間を短縮させるとともに、子宮の全露出を避けるために片側の卵巣の排卵のみを確認したら、その側の子宮角にすべての胚を移植している。

4. 受胚豚への胚の移植

- ③ 検卵者はPPカテーテル（フジヒラサビックス F140-1）に胚を吸引し、移植者にわたす。



移植胚のPPカテーテルへの吸引



胚を封入したPPカテーテル

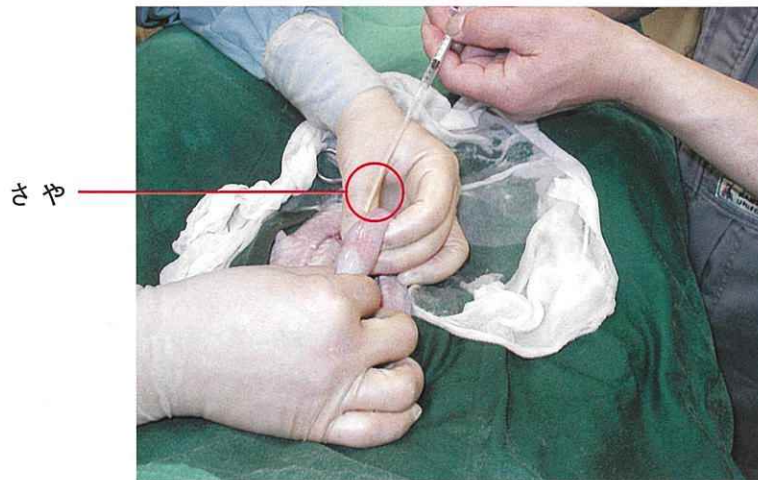
- ④ 術者は子宮角の卵管接合部から10 cm程度子宮角方向に下がった部位（子宮角先端部）に表面の血管を避けて毛糸針で穴を開け、さやとなるストローを移植部位に残す。



子宮にさやを刺した状態

4. 受胚豚への胚の移植

- ⑤ 移植者は、PPカテーテルをストローを通して子宮内に挿入し、胚を注入する。



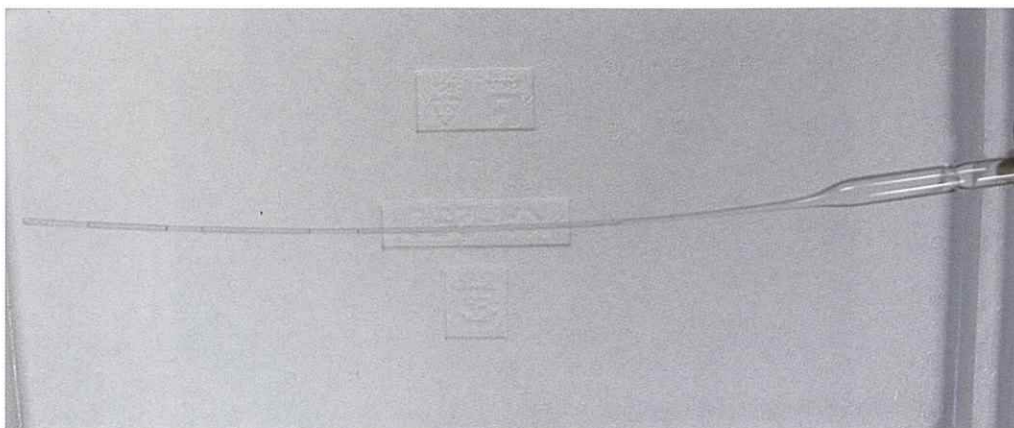
移植の図

※家畜改良センターでは、移植液がさやのストローとPPカテーテルの隙間に毛細管現象で入り込み、胚をうまく子宮に注入できなかった事態に遭遇したので、胚を注入する前にさやのストローを子宮内から抜いた後に、胚を注入するようにしている。

移植が終わった受胚豚は、移植後、隔離検疫豚舎で分娩予定日の1週間前まで飼養管理し、飼養管理期間中、発情確認をする。

受胚豚は、飼養管理期間中3～5回の採血を行い、抗体検査を実施する。但し、うち1回は精密検査のため、鼻腔内採材及び糞の採取を行う。解放前検査に合格した受胎豚は、豚舎区域内の分娩豚舎へ移動する。不受胎豚は豚舎区域内に移さず、廃用豚として出荷する。

(参考) 家畜改良センター本所ではPPカテーテルではなく、パスツールピペットで移植を実施しているのでその方法も紹介する。



パスツールピペットに胚を吸引
(胚の吸引方法はPPカテーテルと同様)

4. 受胚豚への胚の移植



子宮角先端に血管を避けて毛糸針を用いて移植用の小孔をあける



胚の移植



胚移植により得られたデュロック種子豚

4. 受胚豚への胚の移植

(6) 移植成績

家畜改良センターでは、実際にデュロック種と大ヨークシャー種を胚移植によって茨城牧場に導入したので、その成績を下記の表に示す。

1) 採卵成績

	採卵頭数	平均 排卵数	平均 回収卵数	平均 移植可能胚数
デュロック	13	22.0±6.7	21.2±7.3	17.2±6.2
大ヨークシャー	16	31.5±11.3	29.3±9.8	29.3±9.8

(平均±標準偏差)

2) 移植成績

	移植頭数	受胎頭数(受胎率%)	分娩頭数(分娩率%)
デュロック胚	13	9(69.2)	9(69.2)
大ヨークシャー胚	16	11(68.7)	11(68.7)

3) 分娩成績

	分娩頭数	移植胚数(1腹平均)	分娩頭数(1腹平均)	着床率(%)
デュロック胚	9	171(19.0±6.4)	62(6.9±2.5)	36.3
大ヨークシャー胚	11	250(22.7±7.9)	73(6.6±3.9)	29.2

$$*着床率 = (\text{分娩頭数} / \text{移植頭数}) \times 100$$

受胎率及び着床率にはまだ改善の余地があるが、生産された子豚及び受胚豚については定期的な衛生検査の結果、現在も良好な衛生状態を維持している。言い換えれば、コンベンショナル農場由来の胚からSPF豚を生産することができた。今後の課題として、導入豚すべての血液を導入するため、同一個体からの連続採卵を検討し、一個体から最低2回の胚輸送を目指している。

5. 今後期待される技術開発

5. 今後期待される技術開発

今回紹介した方法は、採卵農場、移植農場ともに開腹手術が実施できる施設が必要であり、さらに新鮮胚で輸送するため、胚の輸送範囲が限定される。そのため、牛の胚移植のように凍結胚を国家間で取り引きし、農家の庭先で移植できる技術には至っていない。今後、豚の胚移植を普及させるには以下の技術開発が必要と思われる。

- 1) 胚の長期保存技術の高位安定化
- 2) 非外科的な採卵移植技術（特に非外科的移植技術）の高位安定化
- 3) 同一供胚豚からの連続採卵技術および過剰排卵技術の高位安定化

特に牛のように胚の長期保存技術が確立すれば、胚の輸送範囲が格段に広がる。さらに、採卵直前と採卵1ヶ月後に供胚豚の衛生検査を実施し、この期間、供胚豚が疾病に感染していないことが証明できれば、採取した胚の安全性を保証できると考えている。

そこで、家畜改良センターでは今回の胚輸送に用いている5日目胚のガラス化保存技術の開発に取り組んだので、参考として紹介する。

【豚胚の超急速ガラス化保存】

ガラス化保存法の長所は、高濃度の耐凍剤に曝した胚を急速に冷却するため、緩慢凍結法で最も危惧される低温傷害や氷晶による物理的ならびに化学的傷害が生じないことが挙げられる。逆に問題点として胚が高濃度の耐凍剤による化学的毒性とガラス化液への平衡・希釈時の浸透圧ショックに曝されることがあげられる。さらに最近では、従来のガラス化保存法よりもガラス化時の液量を少なくすることで、冷却・融解速度を早くする超急速ガラス化保存法が開発され、その方法の一つであるオープンプルドストロー（OPS）法によって、これまでガラス化保存が困難だった桑実胚や初期胚盤胞においても、細胞内の脂肪滴を処理せずに胚が保存できることが報告⁹⁾された。

OPS法と同様、超急速ガラス化保存法の1つにマイクロドロップレット法がある。マイクロドロップレット法が、牛未受精卵子の融解後の生存性を高めるのに有効という報告⁹⁾はあるが、豚胚に応用した例はこれまでなかった。今回、我々は、マイクロドロップレット法を応用して5日目胚（収縮桑実胚～初期胚盤胞）のガラス化保存法の検討を行った。

ホルモン処理後に人工授精した雑種雌豚より、5日目齢の収縮桑実胚～初期胚盤胞を採取し、検卵後直ちにES1、ES2の順に5分間ずつ平衡後、ESPに胚を移し、直ちに少量のガラス化液と共に胚をパスツールピペットに吸った。ガラス化は、家畜改良センター独自の方法で、ピペット先端にガラス化液の小滴を形成した後、液体窒素内にピペットごと胚を直接浸漬させて行った（図1）。融解時は38℃のDS1にガラス化した小滴を投入し、その後、DS1、DS2、DS3、NCSU23の順に5分ずつ希釈した（ES1、ES2、ESP、DS1、DS2、DS3は表1参照）。

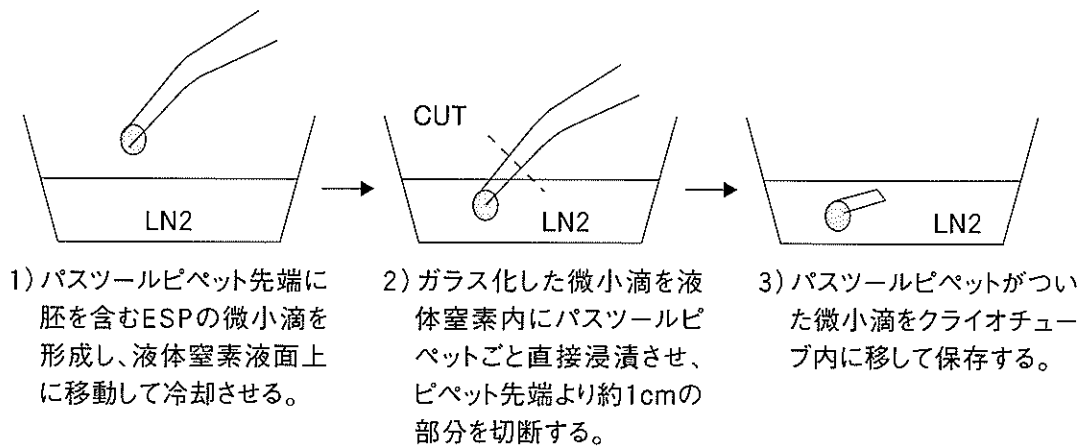


図1 ガラス化保存法

表1. ガラス化液及び融解・希釈液

平衡液及びガラス化液	融解及び希釈液
ES1 (M2 + 10% EG)	DS1 (NCSU23 + 5% EG + 0.6 M Suc)
ES2 (M2 + 10% EG + 0.3 M Suc + 1% PEG)	DS2 (NCSU23 + 2.5% EG + 0.3 M Suc)
ESP (M2 + 40% EG + 0.6 M Suc + 2% PEG)	DS3 (NCSU23 + 0.3 M Suc)
	NCSU23

*EG :エチレングリコール, Suc :ショ糖, PEG :ポリエチレングリコール

融解後の胚は、5%CO₂、39℃のインキュベーター内で10%FBS（牛胎子血清）を添加したNCSU23で培養した。その結果、融解した胚23個中、24時間後に21個（91.3%）が胚盤胞以降に発育し、48時間後に14個（60.9%）が脱出胚盤胞まで発育した（表2及び図2）。

5. 今後期待される技術開発

表2. ガラス化保存胚の融解後の体外培養成績

	胚数	生存数(個)		脱出胚盤胞数
		24 h 後	48 h 後	48 h 後
MD	23	21 ^{ab}	16 ^{cd}	14 ^e
ST	20	14 ^a	10 ^c	4 ^f
Control	20	20 ^b	19 ^d	16 ^{eg}

*MD: マイクロドロップレット区, ST: ストロー区, Control: 5日目新鮮胚

*ガ二乗検定 a-b, e-f ($p<0.05$), c-d, f-g ($p<0.01$) に有意差あり

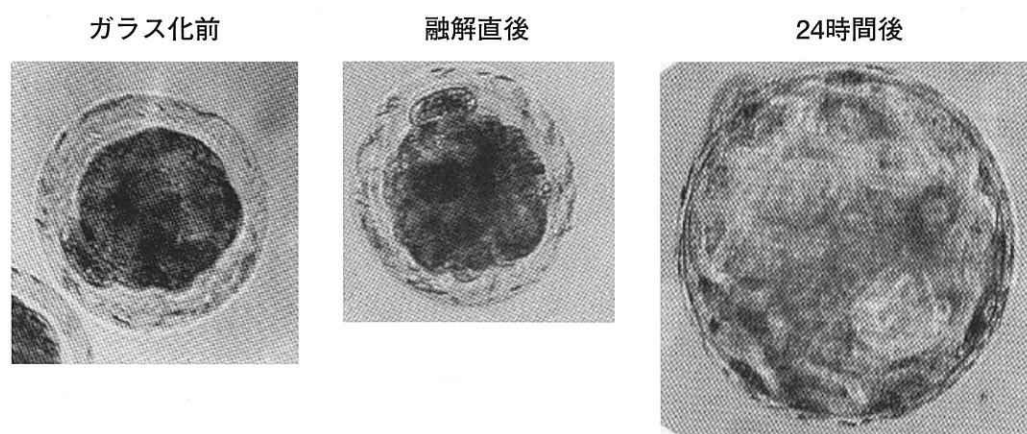


図2 体外培養経過

次に5頭の受胚豚に計171個のガラス化保存胚を融解直後に移植した結果、2頭の受胚豚から17頭の子豚が生まれた(残りの3頭は流産した。表3及び図3)。今回の結果から、細胞内の脂肪滴を除去するなどの前処理を行わなかった5日目胚(収縮桑実胚~初期胚盤胞)でもガラス化保存時にマイクロドロップレット法を用いることでガラス化・融解後に正常な子豚に成長することが明らかになった。

表3. ガラス化保存胚の移植成績

受胚豚 No.	移植胚数	受胎結果	子豚頭数 (子豚生産率)	備考
1	36	+	0 (0)	26日目流産
2	35	+	0 (0)	36日目流産
3	35	+	0 (0)	31日目流産
4	35	+	11 (31.4)	
5	30	+	6 (20.0)	
計	171		17 (9.9)	



図3. ガラス化胚由来産子

参 考

胚移植を用いたオーエスキー病清浄化試験

鈴木美佐枝・三角浩司・小島敏之・斉藤則夫

独立行政法人 家畜改良センター

豚の胚移植は、伝染性疾病に汚染された豚群を清浄化する有効な手段と考えられている。しかしながら、そのような事例報告は数が限られているため、実際に応用するには種々の点で不明な点が多い。今回、胚移植によりオーエスキー病（以下ADとする）が発生した農場の豚群の清浄化を実施し、清浄化の有効性を評価するため、受胚豚およびAD野外株抗体陽性豚から採取した胚の移植により生まれた子豚の抗体検査結果の推移を調査した。

【材料および方法】

供試豚はAD感染農場でAD発生時にワクチン接種した雌豚18頭（うち野外株陽性9頭）および雄豚11頭（うち野外株陽性5頭）を用いた。胚移植に用いた胚は、清浄豚由来胚（野外株陰性♀×野外株陰性♂）、感染豚由来胚①（野外株陽性♀×野外株陽性♂）および感染豚由来胚②（野外株陽性♀×野外株陰性♂）の組合せで人工授精を実施した供胚豚から授精後3～5日目に外科的に採取した。採取した胚は透明帯に欠損等が見られたものを除いた後、国際胚移植学会により推奨された方法による洗浄および0.25%トリプシンによる洗浄を行った（IETSマニュアル第3版）。洗浄後の胚は供胚豚毎に分別して、38℃の温湯を張ったデュワー瓶に入れ当所まで輸送した。胚は到着後、再度10回洗浄し、人工流産によりDay4に同期化したLW雌豚の子宮角に感染豚由来胚と清浄豚由来胚を混合して、外科的に移植した。受胚豚は移植直前、移植後3週目およびその後2ヶ月後、分娩豚は離乳時、子豚は2ヶ月齢時に採血を行い、ラテックス凝集反応によりAD抗体を検査した。また、清浄豚由来胚を移植した受胚豚33頭を対照区とし、比較検討した。

【結果および考察】

AD野外株抗体陽性豚由来胚を移植した12頭中7頭が受胎し、分娩した。受胎率および分娩率はそれぞれ感染豚由来胚①区で66.7%（4/6）、66.7%（4/6）、感染豚由来胚②区で50.0%（3/6）、50.0%（3/6）および対照区で51.5%（17/33）、45.5%（15/33）であり、両方とも区間で有意な差は認められなかった（表1）。

感染豚由来胚を移植した受胚豚は移植後3週目の抗体検査は全て陰性であった。また、分娩した7頭の離乳時の抗体検査も全て陰性であった（表2）。なお、受胚豚はその後2ヶ月毎の定期検査を実施し、廃用されるまでの約1年間抗体陰性を維持し続けた。

感染豚由来胚59個から28頭の子豚が生産された（表3）。生産された子豚のうち21頭が離乳し、2ヶ月齢時の抗体検査で全頭陰性を示した（表4）。また、清浄豚由来胚53個から18頭の子豚が生産され、全頭が離乳し、2ヶ月齢時の抗体検査では全頭陰性を示した。子豚生産率および離乳率はそれぞれ感染豚由来胚①区で38.5%（25/65）、95.5%（21/23）、感染豚由来胚②区で44.7%（21/47）、85.7%（18/21）および対照区で43.1%（110/255）、95.0%（96/101）と両方とも区間で有意な差は認められなかった。

表 1. 受胎結果

	移植 頭数	受胎頭数 (受胎率%)	分娩頭数 (分娩率%)
対照区 (清浄豚由来胚)	33	17 (51.5)	15 (45.5)
感染豚由来胚①	6	4 (66.7)	4 (66.7)
感染豚由来胚②	6	3 (50.0)	3 (50.0)

表 2. 受胚豚の A D 抗体検査結果

	No.	移植前	移 植 胚 数 (AD感染豚 由来胚数)	移植 3W後	受胎 結果	離乳時
感染豚 由来胚 ①	1	陰性	17 (11)	陰性	○	陰性
	2	陰性	16 (8)	陰性	○	陰性
	3	陰性	23 (12)	陰性	○	陰性
	4	陰性	9 (5)	陰性	○	陰性
	5	陰性	26 (7)	陰性	×	-
	6	陰性	21 (9)	陰性	×	-
感染豚 由来胚 ②	7	陰性	13 (6)	陰性	○	陰性
	8	陰性	15 (5)	陰性	○	陰性
	9	陰性	19 (12)	陰性	○	陰性
	10	陰性	11 (11)	陰性	×	-
	11	陰性	21 (15)	陰性	×	-
	12	陰性	13 (11)	陰性	×	-

表 3. 子豚生産成績

	分娩豚への 移 植 胚 数 (母 豚 数)	分娩子豚数 (死産)	子豚 生産率 (%)	離乳頭数	離乳率 (%)
対照区 (清浄豚由来胚)	255 (15)	110 (9)	43.1	96	95.0
感染豚由来胚①	36	21 (2)	58.3	17	89.5
混合した清浄豚由来胚	29	4 (0)	13.8	4	100
計	65 (4)	25 (2)	38.5	21	95.5
感染豚由来胚②	23	7 (0)	30.4	4	57.1
混合した清浄豚由来胚	24	14 (0)	58.3	14	100
計	47 (3)	21 (0)	44.7	18	85.7

注) 子豚生産率(%) = 分娩子豚頭数 / 移植胚数
 離乳率(%) = 離乳頭数 / (分娩頭数 - 死産頭数)

表 4. 子豚抗体検査結果 (2ヶ月齢時)

	検査頭数	AD抗体検査結果
対照区 (清浄豚由来胚)	95	陰性
感染豚由来胚①	17	陰性
混合した清浄豚由来胚	4	陰性
計	21	陰性
感染豚由来胚②	4	陰性
混合した清浄豚由来胚	14	陰性
計	18	陰性

引用・参考文献

- 1) 小栗紀彦ら 受精卵移植による清浄化 日本養豚学会誌25巻2号 (1988)
- 2) 豚の胚移植マニュアル 豚新技術開発研究会編 (1996)
- 3) 社団法人畜産技術協会 胚の衛生的取り扱いマニュアル (国際胚移植学会 I E T S マニュアル第3版) (2001)
- 4) Love RJ. Early abortion of gilts as a way of synchronizing oestrus and improving litter size. Aust Vet J (1993)
- 5) 遠山牧人ら E O ガス滅菌後の胚移植ストローに対する加温処理が胚の生存性に及ぼす影響 東日本家畜受精卵移植技術研究会報通刊16号 (2000)
- 6) Polge C. Embryo transplantation and preservation. In Control of Pig Reproduction (Cole,D.J.A.;Foxcroft,G.R.Eds.),London,UK,Butterworths (1982)
- 7) 社団法人日本種豚登録協会登録委員必携
- 8) Berthelot F. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. Reprod Nutr Dev 41:267-272 (2001) .
- 9) Papis K. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. Theriogenology 54:651-658 (2000)

おわりに

養豚産業における豚胚移植の利用目的は、S P F 豚群の作出及び衛生的な種豚流通への応用が有力視されていると考えられる。しかしながら、試験目的以外で豚胚移植を実施している例はほとんど無いため、今回紹介した例は、特に防疫的な観点から、できるだけ採卵農場と移植農場の接点を少なくすることを重視しつつ旧農林水産省畜産試験場で行われたオーエスキー病の清浄化試験¹⁾を参考に我々が手探り状態で実施しているのが現状である。そのため、まだまだ多くの改善箇所があると思われるので、御気付きの点があれば、ご指摘いただければ幸いである。

今後は、胚の保存技術や非外科的移植技術がさらに発展することが期待されるので、その技術を取り入れながら、より効率的に胚移植が実施できるように改良していきたいと考えている。

最後に旧畜産試験場でのご経験を基に、今回の手法についてご指導頂いた小島敏之獣医学博士に感謝いたします。

家畜改良センター 技術マニュアル11
豚における胚移植を用いた育種素材の導入
著 者／三角 浩司、鈴木美佐枝
発 行／独立行政法人 家畜改良センター
企画調整部企画調整課
発行日／平成15年 3 月
印刷所／不二印刷株式会社

本文用紙は再生紙を使用しております。