

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

独立行政法人 家畜改良センター

豚における胚移植を用いた育種素材の導入

はじめに

豚を飼養管理する上で疾病対策は重要な課題である。特に種豚を改良する際に、外部から新しい育種素材を導入することは不可欠であるが、生体で豚を導入した際に農場内に重大疾病を浸潤させ、農場全体に大打撃を与える例も少なくない。

重大な慢性疾病の1つであるオーエスキー病（以下AD）に感染した雌豚から採取した胚でも、完全な透明帯を持つものであれば、トリプシン処理を併用した洗浄を行った後、清浄な雌豚に移植することで、清浄な子豚が産出できることが報告され¹⁾、衛生的な育種素材の導入に胚移植の応用が期待された。しかしながら、特に豚胚の採取には、開腹手術が必要なこと、胚の長期保存技術が安定した技術ではないことから、牛の胚移植のように農家レベルへの普及に至るまでの技術とは言い難く、現時点では、その利用には様々な制限がある。

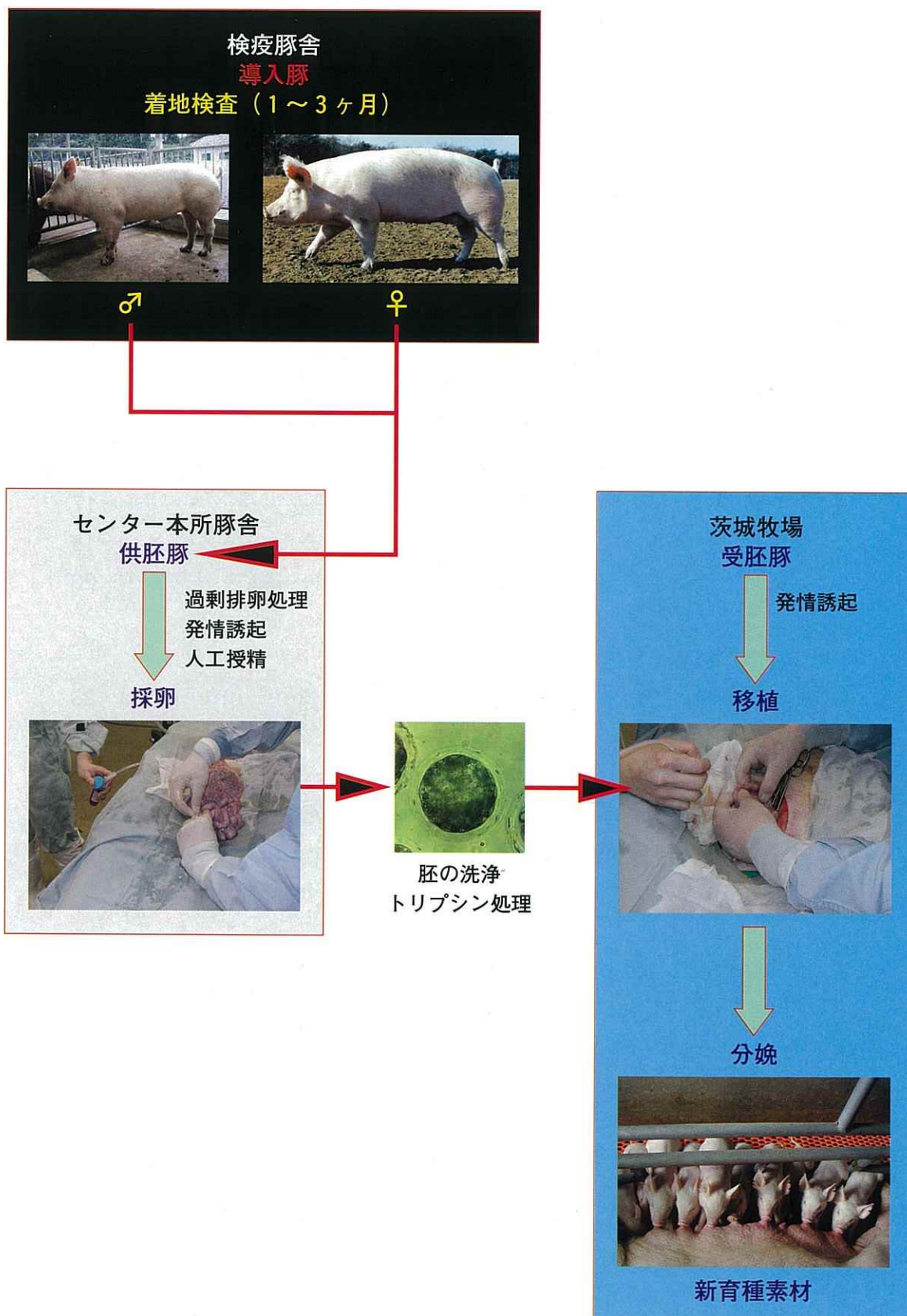
家畜改良センターでは種豚の改良業務を実施しており、今回新たに「豚の遺伝的能力評価」に取り組むこととなった。その業務の円滑な推進のためには、高能力豚を衛生的かつ広範囲で導入あるいは配布する必要がある。まず第一段階として、その基礎豚を衛生的に導入するために、胚による導入を開始したところである。さらに、この事業に参加していただく予定のいくつかの機関のなかには、胚による高能力豚の導入を希望しているところもあるため、今回、「豚における胚移植を用いた育種素材の導入マニュアル」を作成し、当センターで実施している豚胚を用いた育種素材の導入方法を紹介することとした。

なお、本書では採卵移植の基本的な手技についてはふれていないため、その点に関しては「豚の胚移植マニュアル 豚新技術開発研究会編」²⁾を参考にしていきたい。

現在、伝染性疾病の関係で種豚の流通は停滞しており、この事業を円滑に進めるためにも衛生的に高能力豚を流通する方法を早期に確立する必要があり、本書がその参考になれば幸いである。

（独立行政法人家畜改良センター 技術部 技術第一課）

胚移植技術を応用した育種素材の導入の一例 (家畜改良センターでの取り組み)



目 次

はじめに	1
1. 豚の胚移植技術の概要	4
2. 胚移植と疾病伝播制御	
(1) 胚移植により伝播を防ぐことが期待できる疾病	7
(2) 疾病制御に適した胚のステージ	8
3. 供胚豚からの胚の採取	
(1) 供胚豚の準備	11
(2) 採卵	14
(3) 検卵	17
(4) 胚の洗浄	18
(5) 輸送器具への胚の封入	20
4. 受胚豚への胚の移植	
(1) 移植農場の衛生条件	23
(2) 受胚豚の準備	23
(3) 胚の受け取り	25
(4) 胚の確認	27
(5) 胚の移植	27
(6) 移植成績	31
5. 今後期待される技術開発	32
参 考	38
胚移植を用いたオーエスキー病清浄化の実例（研究会報告要旨）	
引用・参考文献	41
おわりに	42

1. 豚の胚移植技術の概要

1. 豚の胚移植技術の概要

豚の胚移植技術の概要

豚の胚移植技術とは、端的に言えば、供胚豚から採取した胚を受胚豚に移植することであり、具体的には、供胚豚及び受胚豚の発情誘起処理、人工授精、外科的手術による胚の採取と移植並びに移植後の妊娠診断などを包含した総合技術である。

しかしながら、すでに農家レベルで普及している牛の胚移植に比べ、豚の胚移植は、養豚産業での普及にまでは至っていない現状である。それぞれの技術レベルについては下の表1に示したが、普及にまでに至らない大きな原因は胚の長期保存技術及び非外科的手法による採卵・移植技術が不完全なことだといえる。

最近になって、ガラス化保存技術の発展による豚胚の超低温保存や、深部注入用の人工授精器具による非外科的移植など、豚の受精卵移植技術の普及につながる周辺技術が著しく進歩しており、大きな期待が寄せられている。

表1. 豚と牛における人工授精、胚移植の技術レベル

	豚	牛
発情誘起・ 過剰排卵処理	春機発動直前の豚については、ホルモン処理による発情誘起及び過剰排卵処理が効果的に実施されているが、一旦性成熟に達した雌豚については反応の安定性が低い。	一般的に春機発動前の牛は利用されていない。性成熟に達した牛については比較的容易である。
人工授精	液状精液による人工授精が一般的。凍結精液も使用可能だが、産子数は液状精液より少なくなる傾向がある。人工授精の普及率は牛に比べて低い。	凍結精液による人工授精技術が確立している。
採卵	全身麻酔下での開腹手術により、卵管あるいは子宮から直接採取する。	頸管経由による非外科的採卵技術が確立している。
胚の保存	成功例が少なく、再現性も低かったが、最近、成功例の報告が増えつつある。	確立しており、すでに凍結胚が一般的に流通している
移植	全身麻酔下での開腹手術により、卵管あるいは子宮へ直接移植する。頸管経由の非外科的移植の成功例も報告されるようになってきた。	頸管経由による非外科的移植技術が確立している。

2. 胚移植と疾病伝播制御

2. 胚移植と疾病伝播制御

(1) 胚移植により伝播を防ぐことが期待できる疾病

豚を胚で導入することは、生体で導入するよりも格段に疾病伝播の可能性を低くすることができる。最近、国際胚移植学会が今までの研究成果を参考にして伝染性疾病を4つに分類した。ここでは、豚の疾病に限って下記に示す³⁾。

分類Ⅰ：採卵から移植までの間、胚が適正に取り扱われれば、伝播の危険性は無視できる疾病

- ・オーエスキー病

分類Ⅱ：分類Ⅰと同様であるが、既存のデータを確認する意味で移植試験を重ねる必要がある疾病

- ・豚コレラ

分類Ⅲ：分類Ⅰと同様であるが、既存の予備試験データを補足する意味で、*in vitro*と*in vivo*の実験を積み重ねる必要がある。

- ・口蹄疫
- ・豚水泡病
- ・アフリカ豚コレラ

分類Ⅳ：現在、試験を実施中である疾病

- ・水泡性口炎
- ・豚パルボウイルス感染症
- ・エンテロウイルス感染症
- ・レプトスピラ感染症

もちろん、将来的に疾病制御を考えて豚胚による本格的な流通を考えるとすれば、胚の衛生状態を証明するためにも供胚豚及び交配雄豚の衛生状態の把握が最も重要で、清浄な雄豚と清浄な供胚豚の交配（人工授精を含む）により得られた胚だけを流通することが大前提になることは言うまでもない。

(2) 疾病制御に適した胚のステージ

胚移植が疾病制御に利用される唯一の根拠は、その透明帯の存在である。胚が透明帯に覆われている間は、透明帯を通過できない細菌やウイルス等の感染を阻止できる。そのため、透明帯に覆われた胚を採取した後、洗浄やトリプシン処理等を実施し、灌流液や透明帯に存在している病原体を取り除いた後、受胚豚に移植すれば、受胚豚及び胚への病原体の感染を防ぐことが可能になる。

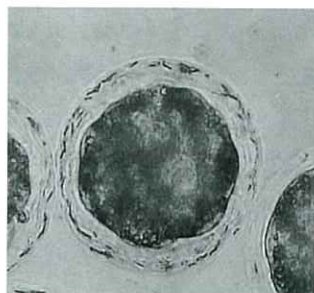
豚の場合、受精後6～7日目には、胚が透明帯より脱出するので、確実に透明帯に覆われた胚を採取するには5日目以前の胚（発育ステージが胚盤胞までの胚）を採取する必要がある。しかしながら、3日目以前の胚は卵管に存在するため、下記の問題が生じる可能性があり、さらに将来的に非外科的移植にも対応できるように、家畜改良センターでは5日目胚の採取および移植に取り組んでいる。

卵管にいる時期の胚を使用する際の問題点

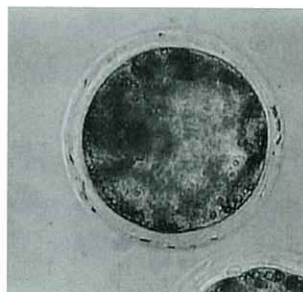
- ① 採卵により内部生殖器官を傷める可能性がある。特に排卵直後のため、卵巣からの出血によって、術後に卵巣および子宮が癒着する可能性が高くなる。
- ② 未受精卵との区別が難しい場合がある。
- ③ 透明帯の周囲に付着物が多いので、洗浄がうまく実施できない。
- ④ 低温保存に相対的に耐性が低い。
- ⑤ 移植を卵管にする必要が生じ、①と同様の問題が起こる。

2. 胚移植と疾病伝播制御

疾病制御を目的とした移植に適した胚

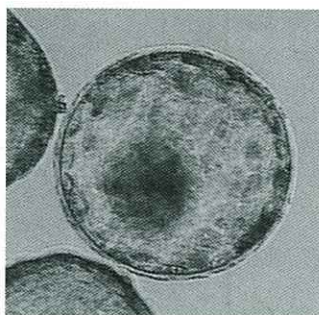


初期胚盤胞



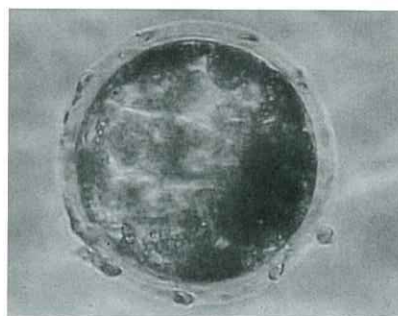
胚盤胞

移植の際に注意が必要な胚



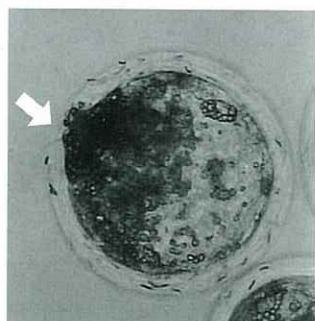
拡張胚盤胞

透明帯が薄くなっており、洗淨の途中で透明帯から脱出する可能性がある。

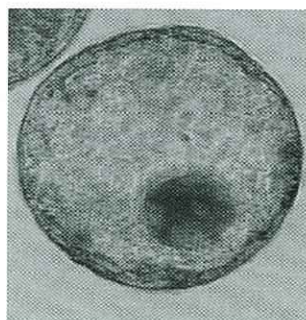


透明帯に付着物がついた胚盤胞
洗淨開始前にピペッティングにより付着物がすべてとれない場合は移植に使用しない。

移植に不適な胚



透明帯が破損している胚盤胞



脱出胚盤胞

3. 供胚豚からの胚の採取

3. 供胚豚からの胚の採取

(1) 供胚豚の準備

【育種素材の導入】

導入種豚は家畜改良センター内の隔離検疫豚舎で着地検査を受ける（隔離検疫豚舎とセンター本所内の豚舎は直線距離で約15Km離れている）。センター本所での検査期間は国内導入の場合1ヶ月間、海外導入の場合3ヶ月間（家畜防疫対策要綱による）となっており、導入豚はその間、各種疾病についての衛生検査を受ける（導入時及び着地検査終了2週間前）。家畜改良センターでその対象としている疾病はブルセラ病、オーエスキー病、PRRS（豚繁殖呼吸器症候群）、サルモネラ、O-157、腸管内寄生虫で、それぞれ抗体検査あるいは糞便検査を受ける。着地検査中は一般状態の観察を行い、家畜改良センターのワクチネーションプログラムに準じたワクチネーションを行う。導入種豚は検査結果が全頭陰性の場合、隔離検疫豚舎から解放され、センター本所内の豚舎に移動される。オーエスキー病及びPRRSの検査において1頭でも陽性豚が検出された場合は全頭の導入を中止する。また、サルモネラ、O-157、腸管内寄生虫検査で陽性だった場合、適宜投薬（抗生剤あるいは駆虫薬）を実施し、休薬期間を経た後再び検査を行う。これは全頭の陰性が確認されるまで繰り返し行われる。

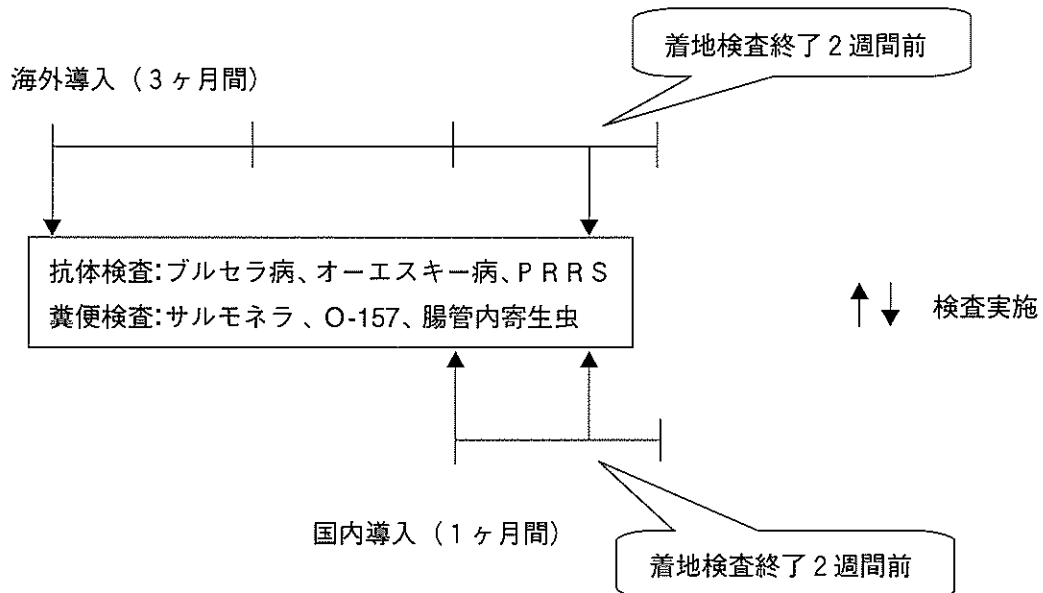
1). 導入元農場の条件

ワクチン接種及び抗体検査等により、疾病のコントロールを行っている農場で、特にオーエスキー病及びPRRSの抗体検査を定期的実施し、過去1年以上連続して抗体検査陽性豚が摘発されていない農場であること

2). 導入豚の条件

- ① オーエスキー病及びPRRSの抗体検査が陰性であること
- ② 豚萎縮性鼻炎、豚マイコプラズマ肺炎、豚胸膜肺炎のワクチン接種済みであること
- ③ サルモネラ菌（*S.ティフィムリム*、*S.コレリス*、*S.ダブリン*、*S.エンテリティディス*）を保菌していないこと
- ④ 骨格筋リアノジンレセプター遺伝子の変異がないもの
- ⑤ 輸入豚に関しては二国間で取り決められた輸入に関する「偶蹄類家畜衛生条件」を満たすこと

図1 隔離検疫豚舎での着地検査スケジュール



※隔離検疫豚舎は種豚導入前に高圧洗浄機による一般洗浄の後、逆性石鹼での消毒、さらにホルマリン薫蒸による消毒を行い、1ヶ月間の空舎期間をおいた後に使用している。

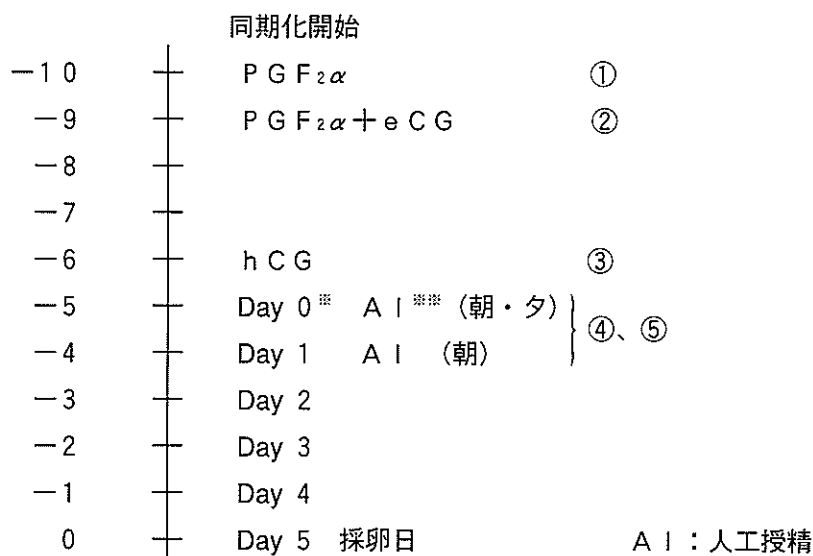
【発情の同期化】

一般的には未性成熟豚を使用する方法がとられているが、家畜改良センターのスケジュールでは着地検査期間中にほとんどの豚が春機発動を迎え、豚舎内に移動してくるときには性成熟に達した豚となっている。そのため、発情の同期化は人工流産を用いた方法を選択している。これは、人工流産後の発情誘起率ならびに同期化率が比較的高位で安定しているためである（表1）。供胚豚には、まず自然発情時に人工授精（AI）を実施し妊娠させた後に発情誘起処置を施している⁴⁾（図2参照）。

- ① AI後12～40日目の豚にPGF₂α（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PGF₂αとeCG（1500IU）を頸部筋肉内投与する。
- ③ eCG投与の72時間後にhCG（500IU）を頸部筋肉内投与する。
- ④ 発情を観察する。
- ⑤ AIを実施する。

3. 供胚豚からの胚の採取

図2. 供胚豚の発情同期化のスケジュール



使用薬品

PGF₂α : 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。

*** 精液はモデナ液で希釈した液状精液を使用している (1頭当たり注入量50ml)。Day 0の午前中の発情観察で雄許容を確認したら直ちに1回目のAIを、次いでその日の夕方に2回目のAIを実施する。Day 1の午前中の発情観察で雄許容を確認したら3回目のAIを実施する。発情の持続時間が長い場合は発情が終わるまで約12時間おきにAIを実施する。

表1. 発情誘起成績

	供試数	AI後日数 [※]	発情誘起率 (%)	雄許容終了日 ^{***}
デュロック	21	23.57±1.69	100	1.43±0.11
大ヨークシャー	43	21.14±0.96	95.3	1.12±0.06

平均±標準誤差

※雄最終許容日のAI後から初回PGF₂α投与までの日数

*** hCG投与翌日をDay 0とする。発情が誘起された豚はすべてDay 0に雄許容を開始した。

発情確認は、1日1回午前中に行った。

(2) 採 卵

第2章で述べたように今回目的とする胚は透明帯にしっかり覆われたものなので、hCG投与翌日を0日として5日目に採卵を行う。採取胚は正常に発育していれば桑実期胚～胚盤胞となっている。胚は子宮角上部（子宮角先端から上部約30cmくらいまで）に位置するが、念のため子宮角全体を灌流する。

【灌流液の準備（M2液）】

調整後（表2参照）、孔径0.22 μm のメンブレンフィルターで濾過滅菌し100mlずつ小分けにして4℃で保存する（1ヶ月程度保存可能）。

【外科手術による採卵（「豚の胚移植マニュアル」に準拠）】

- ① 採卵当日、手術室は室温を25℃以上に保つ。39℃に設定したウォーターバスでM2液、灌流液をうける試験管（50ml～100ml）、生理食塩水（大塚生食注500ml）及びコンドロイチン硫酸溶液（表3参照）を温めておく。
- ② 開腹後、排卵数、卵巣・子宮の状態を観察し、記録する。
- ③ 生理食塩水にコンドロイチン硫酸溶液50mlを加える。この生理食塩水は癒着を防止するため、灌流中に内部生殖器等が乾かないように適宜かける。1回の手術で500ml使用が標準。
- ④ 子宮角の最下部に眼下鉗を用いて小切開孔を作り、バルーンカテーテルを子宮角上部に向かって6～7cm挿入する。
- ⑤ 20mlのシリンジを用い、バルーンが動かなくなるまでふくらませる（図3）。
- ⑥ 50mlのシリンジに灌流液を50ml充填し、カテーテルの液取り出し口から約45mlの灌流液を注入する。この時、カテーテルを傷つけないように18Gの針を鈍針にしたものをシリンジに装着して使用している。
- ⑦ バルーンカテーテルの液取り出し口を試験管（50ml～100ml）に入れる。
- ⑧ 注入した灌流液を子宮角先端まで送る。
- ⑨ 子宮角先端を持ち上げ、マッサージしながら灌流液をカテーテル側へ送る（図4）。
- ⑩ 灌流液が回収できたらバルーンの空気を抜く。
- ⑪ シリンジに充填した灌流液の残り5mlをカテーテルの先端から入れ、カテーテルの中に残った灌流液を試験管に回収する。
- ⑫ カテーテル挿入のために開けた小切開孔をランベルト縫合する。
- ⑬ 同様に反対側の子宮角も灌流する。
- ⑭ 液の回収率が悪い場合は⑧以降の操作を反復する。
- ⑮ 灌流が終了した子宮にコンドロイチン硫酸溶液50mlを散布する。

3. 供胚豚からの胚の採取

表2 M2液の組成成分

	mM	g/litter
NaCl	94.7	5.535
KCl	4.78	0.356
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.19	0.293
KH ₂ PO ₄	1.19	0.162
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.71	0.252
NaHCO ₃	4.0	0.336
Hepes*	21.0	5.004
乳酸ナトリウム (60%シロップ)**	23.3	151.3 (5.754g)
ピルビン酸ナトリウム	0.33	0.036
D(+)-Glucose	5.56	1.002
ゲンタマイシン***		50mg
フェノールレッド		10mg
BSA (4mg/ml)		4g

* : HEPES (Sodium salt) の場合は5.466g

** : 60%シロップを5.754g計り、超純水で200mlにメスアップ後、151.3mlを使用する。

*** : ペニシリン(結晶ペニシリンGカリウム明治 20万単位)10万単位+ストレプトマイシン(硫酸ストレプトマイシン明治 1gカ価)50mgでも可

- ① 超純水に上記を融解し1000mlにメスアップする。
- ② 1N-NaOHでpH調整 (pH7.3~7.4) する。
- ③ 浸透圧を測定する (270~280mOsm/l)。
- ④ 0.22μmのフィルターを用いて濾過滅菌し、100mlずつ分注して冷蔵保存する (約1ヶ月間使用可)。

表3 コンドロイチン溶液の調製

	g/litter
コンドロイチン硫酸塩 (ナカライ 088-15)	10.0

- ① 超純水約800mlに上記を溶解し、1000mlにメスアップする。
- ② 0.22μmのフィルターを用いて濾過滅菌後、100mlずつ分注して冷蔵保存する (約1ヶ月間使用可)。

3. 供胚豚からの胚の採取



図3 カテーテルを挿入しバルーンを膨らませる



図4 灌流液の回収

※この際、出血や過度の摩擦、刺激を避けることが、
二回目以降の採卵手術を容易なものにする

3. 供胚豚からの胚の採取

(3) 検 卵

豚胚は低温感作を受け易いので回収液の温度管理や検卵する部屋の室温には十分気をつける（25℃以上）。移植に供する胚は第2章で述べた条件を満たし、かつ受胎性のあると思われる胚とする（未受精卵や変性卵は除外する）。

- ① 格子入りのφ90mm×20mmディッシュ及び駒込ピペットは39℃の加温板上で温めておく。
- ② 回収液は駒込ピペットを使用して底部より静かに灌流液を吸引しディッシュに移す（図5-1, 2）。
- ③ 実体顕微鏡で観察する（図6）。
- ④ 35mmのディッシュに39℃に温めた新しい灌流液を2ml程度入れ、胚を移す。



図5-1



図5-2

駒込ピペットを使用して試験管の底部より静かに灌流液を吸引しディッシュに移す



図6 実体顕微鏡で観察する

ウォームプレートは38℃に設定して使用している

(4) 胚の洗浄

【適切な胚の洗浄の必須条件】

(「胚の衛生的取り扱いマニュアル第3版」社団法人 畜産技術協会より)

- ・異なる供胚豚由来の胚は移植直前まで別々に取り扱う。
- ・1回の洗浄は10個以下の胚で実施する。
- ・完全な透明帯を持つ胚のみを洗浄する（洗浄前後で確認する。家畜改良センターでは洗浄後に透明帯が破損している胚を発見した場合は直ちにに取り除き、再度洗浄する）。
- ・透明帯に付着物が付いている胚を除外する（必要に応じて洗浄前に除去する）。
- ・最低10回洗浄する。（各洗浄において徹底かつ慎重に胚をパスツールピペットで転がす時間を充分充てる。）
- ・胚を次の洗浄液に移動させるたびに新しい滅菌済みのパスツールピペットを使用する。
- ・各洗浄液中への前洗浄液の混入は少なくとも100倍希釈であるようにする。

※透明帯に破損がないこと及び付着物がないことを確認するためには倍率×50以上で顕微鏡下でパスツールピペットで胚を転がしながら胚の表面すべてを観察しなければならない。

【胚のトリプシン処理】

オーエスキー病ウイルス（ヘルペスウイルスに属す）が体外で胚に暴露されると透明帯に非常に強固に付着するので10回の胚洗浄を行ってもそのウイルスを取り去ることは不可能であることが知られている。しかし、洗浄の間に酵素トリプシンへの簡単な暴露を行うことでウイルスを取り除くことができることが報告されている（胚の衛生的取り扱いマニュアル第3版第2章参照）。

また、トリプシンの酵素活性は再びM2液に浸漬することによりM2液中のBSA（ウシ血清アルブミン）で不活化される。

- ① M2液及び0.25%トリプシン(GIBCO 15050-065)を39℃のウォーターバスで温めておく。
- ② 加温板の上で温めた35mmのディッシュにM2液及びトリプシンを入れる。
- ③ M2液で5回洗浄する。パスツールピペットは胚の移動毎に取り替える。
- ④ トリプシン液のディッシュを2枚用意し、胚を浸漬する。浸漬時間は合計で60～90秒以内にする（図7、8）。
- ⑤ 続けてM2液で5回洗浄する。パスツールピペットは胚の移動毎に取り替える。

3. 供胚豚からの胚の採取

図7. 胚洗浄の手順

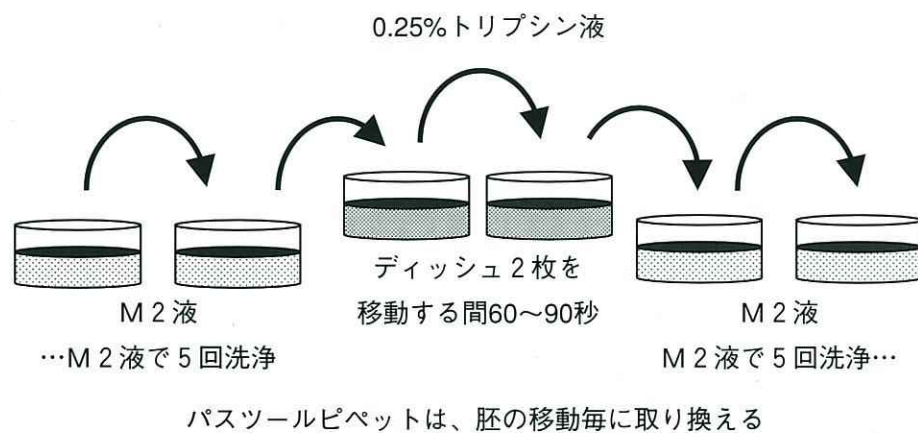
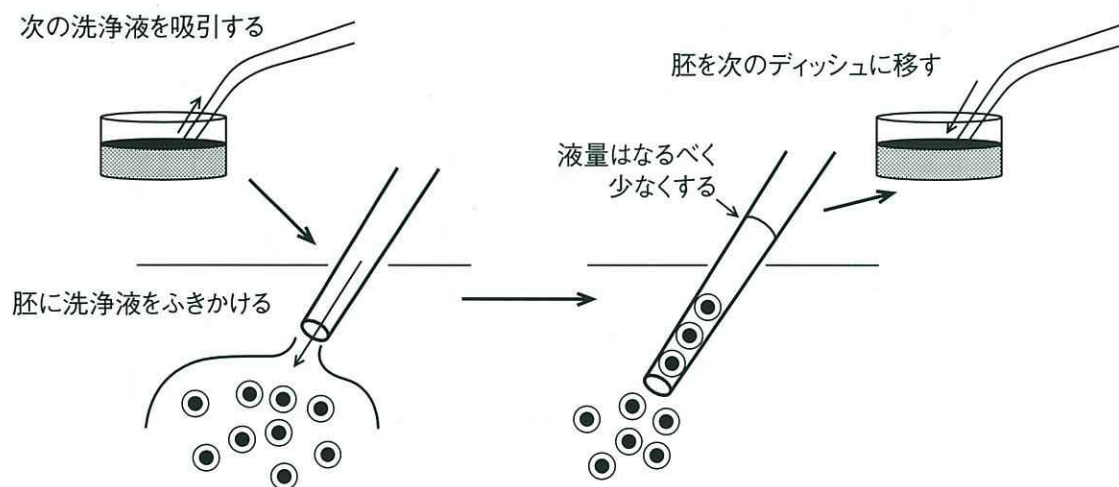


図8. 胚の洗浄



胚が入っているM2液を次のディッシュに持ち込む量をできるだけ少なくするために次の洗浄液 (M2またはトリプシン液) で胚の周囲環境を置き換えながら胚を移動させる。

(5) 輸送器具への胚の封入

採卵農場と移植農場の接点を断ち切るため、二重の滅菌袋を準備する。すなわち、ポリスチレン製の小試験管（FALCON 352003）を滅菌袋A（ハイブリッド滅菌バック HOGY HM-1330）に入れる。このとき滅菌袋Aの開封口はヒートシールしなくてもよい。さらに一回り大きい滅菌袋B（ハイブリッド滅菌バック HOGY HM-1302）に滅菌袋Aを入れ、開封口をヒートシールした後にガス滅菌したものを使用する（図9）。採卵農場の技術者は絶対にポリスチレン製の小試験管及び滅菌袋Aに直接触れないようにする。移植農場での技術者は滅菌袋Bに触れることがないようにする。こうすることによって採卵農場と移植農場の接点を断つことが可能になる。

また、ガス滅菌に用いたガスの残留が胚の生存性に悪影響をもたらすこと、50～60℃前後に加温することにより早く残留ガスを除去することが出来ることが報告されている⁵⁾。そのため、家畜改良センターではガス滅菌物を使用する際、滅菌後の加温処理の実施と滅菌してからの期間に注意して使用している。

- ① 滅菌袋Bのヒートシールされている開封口をクリーンベンチ内で開封し、小試験管とふた及び滅菌袋Aを滅菌袋Bから出すことなくM2液を2～3ml注入する（図10）。
- ② 洗浄した胚を小試験管内に移して蓋をする（図11、12）。
- ③ 滅菌袋Bの開封側を折り曲げる（図13）。
- ④ 滅菌袋ごと胚を39℃の温湯を入れた胚輸送用保温容器に収納し、胚輸送者に渡す（図14）。

3. 供胚豚からの胚の採取

滅菌袋A（片側開封のまま）及び小試験管



図9 二重の滅菌袋 滅菌袋B



図10 クリーンベンチ内での開封
滅菌袋A及び小試験管には直接触れない
ように滅菌済みのピンセットを使用する



図11 洗浄した胚を小試験管内に移す



図12 蓋をする
滅菌袋A及び小試験管には直
接触れないようにする



図13 滅菌袋の開封側を折り曲げる



図14 胚を入れた保温容器
39℃の温湯を入れて使用している。
温湯は2時間後には約37℃になる。