

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。

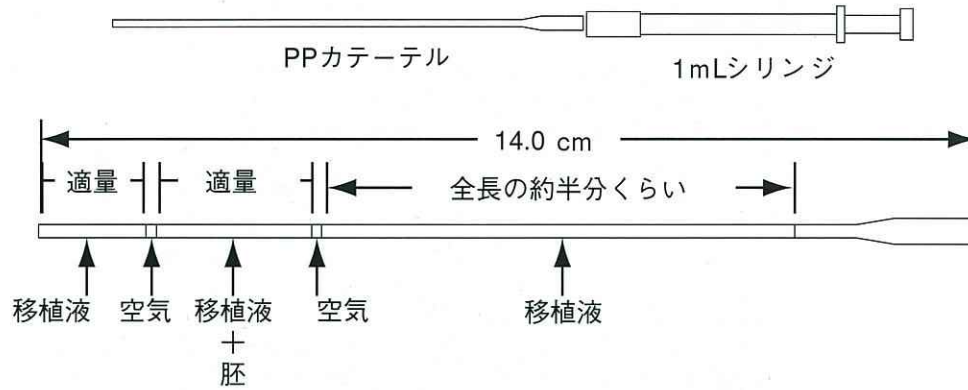


排卵の確認

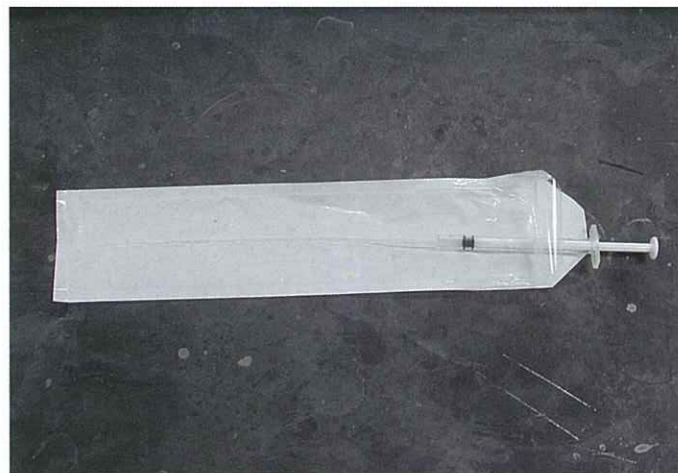
※家畜改良センターでは、手術時間を短縮させるとともに、子宮の全露出を避けるために片側の卵巣の排卵のみを確認したら、その側の子宮角にすべての胚を移植している。

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

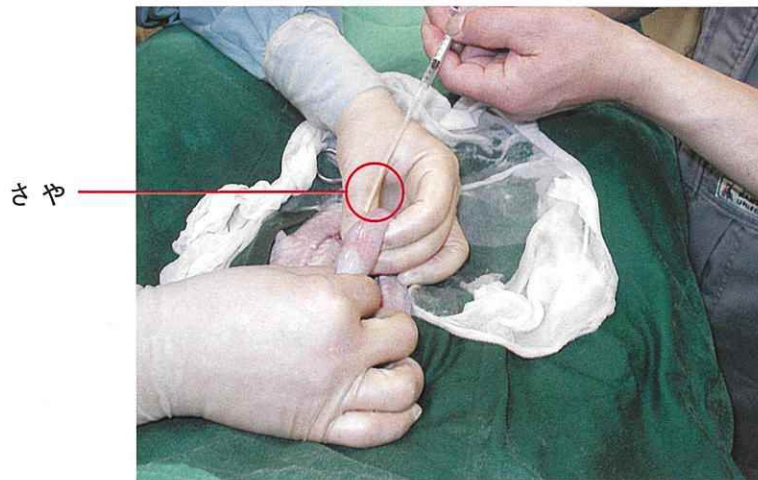
- ④ 術者は子宮角の卵管接合部から10 cm程度子宮角方向に下がった部位（子宮角先端部）に表面の血管を避けて毛糸針で穴を開け、さやとなるストローを移植部位に残す。



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。



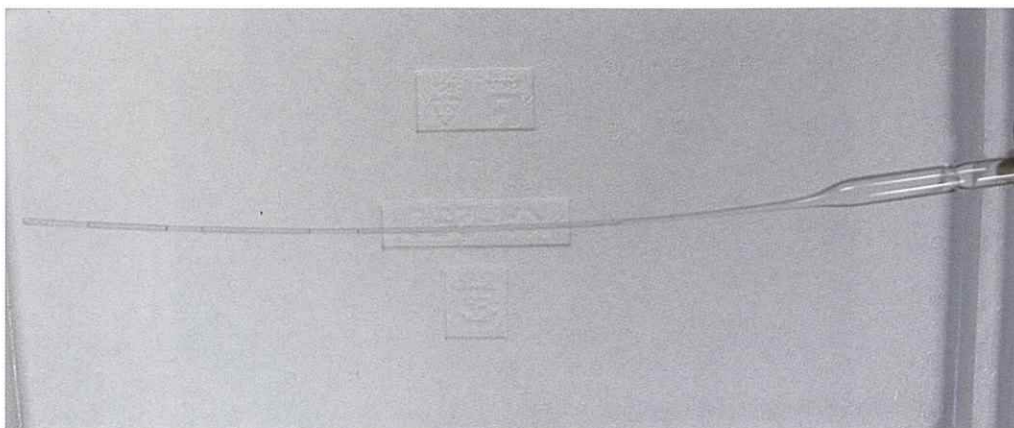
移植の図

※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。