

### 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、休業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。

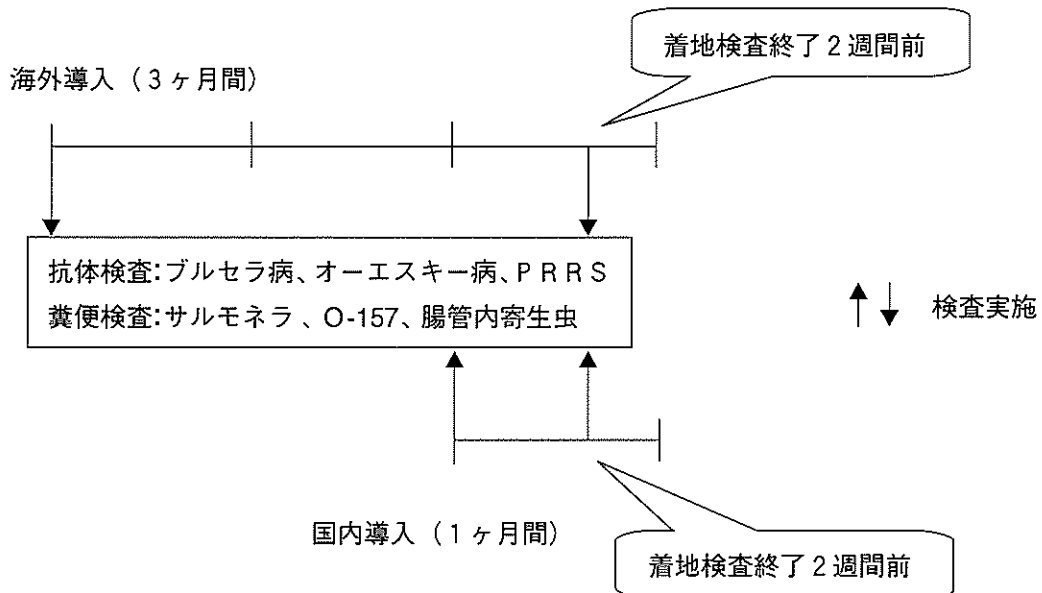
##### 1). 導入元農場の条件

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。

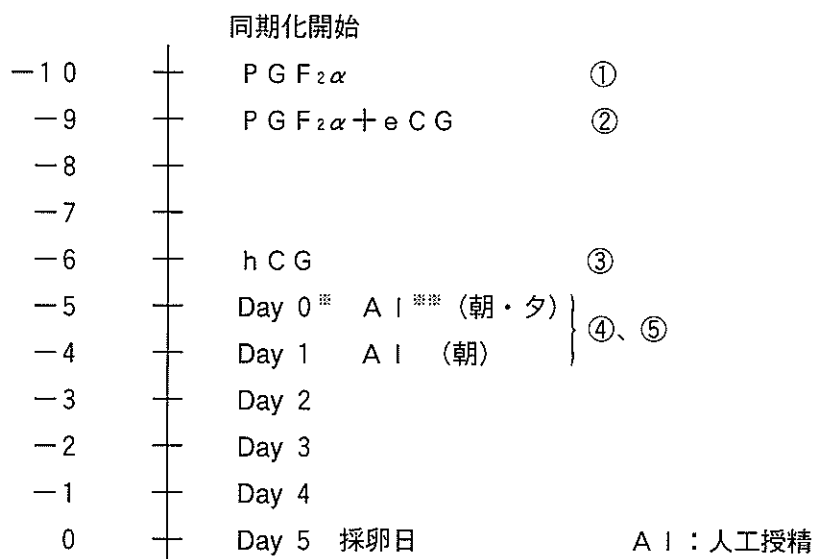
### 【発情の同期化】

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<sup>4)</sup>(図2参照)。

- ① AI後12～40日目の豚にPGF<sub>2</sub>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PGF<sub>2</sub>α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

P G F<sub>2α</sub> : 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)

e C G : 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)

h C G : 胎盤性性腺刺激ホルモンとして500IU  
(プベローゲン 三共)

※ h C G 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 <sup>※</sup>	発情誘起率 (%)	雄許容終了日 <sup>※※</sup>
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P G F<sub>2α</sub>投与までの日数

※※ h C G 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 $\mu$ m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 <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.19	0.293
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19	0.162
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.71	0.252
NaHCO <sub>3</sub>	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除去し、再度洗浄する）。
- ・透明帯に付着物がつ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

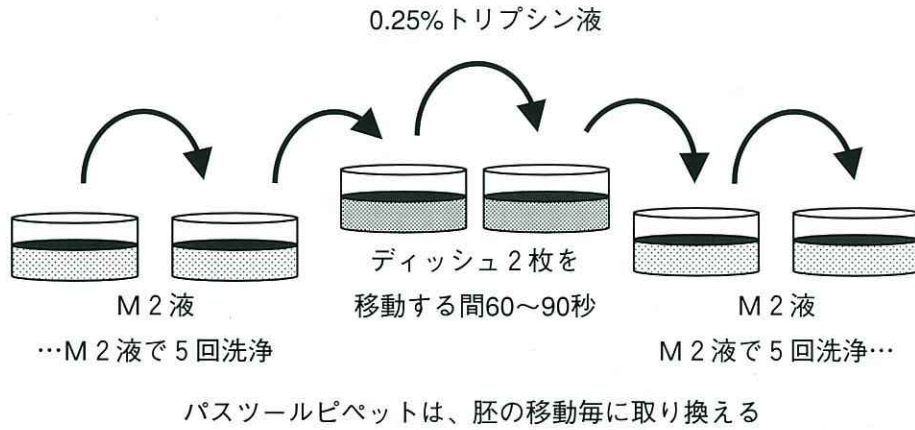
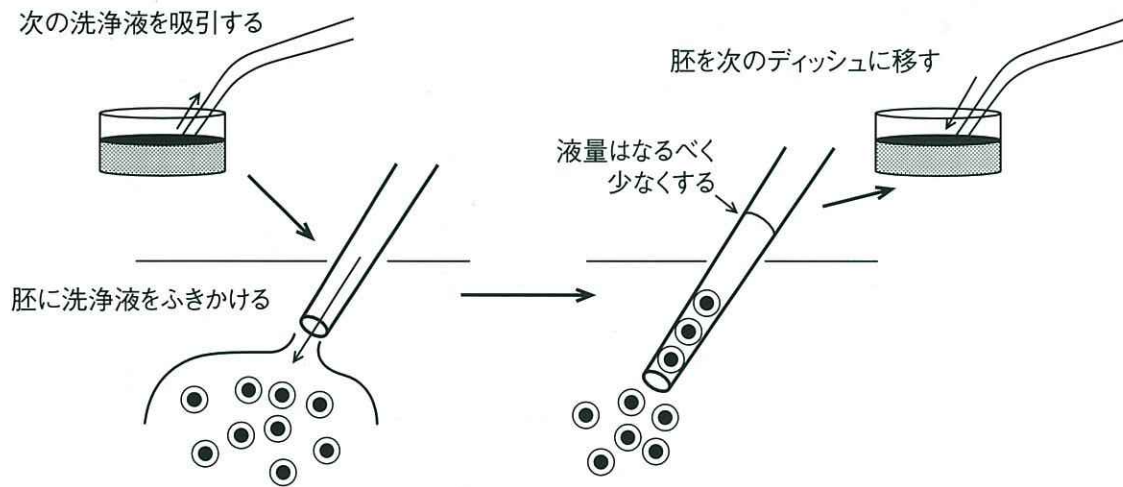


図8. 胚の洗浄



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<sup>5)</sup>。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。