

## 12 豚凍結受精卵を用いた遺伝的希少品種の群再構築手法

### の開発

埼玉県農業技術研究センター

○中村 嘉之 宮崎 綾佳

#### I はじめに

近年、豚熱や口蹄疫等の疾病が国内外で発生し、伝染性疾病の侵入による希少な遺伝資源の消失に対抗することが本県ブランド豚における喫緊の課題となっている。その解決策として、遺伝資源の保存において受精卵の凍結保存技術および移植技術による豚群再構築が最も効果的かつ実用的である。そこで、より多くの受精卵の効率的な回収方法の開発、疾病フリーな受精卵の保存方法の開発および非外科移植方法の改良、子宮内環境の最適化による受胎率向上方法の検討を実施した。開発した技術を用いることで、万が一伝染性疾病が発生した場合、黒豚を代表とした県内の貴重な種豚遺伝資源の消失を防ぎ、群再構築が速やかに可能となる。

#### II 材料および方法

##### 1 試験期間

試験は 2020 年 6 月～2022 年 3 月まで実施した。本試験は農業技術研究センター動物実験等実施規定により実施した。

##### 2 供試豚

生後 6～8 ヶ月齢の英国系パークシャー種未経産豚 66 頭を実験に用いた。

##### 3 試験方法

以下の試験を実施した。

試験 1 : 4 種類のホルモン剤を用いた遺伝的希少品種の効率的採卵方法の検討

排卵誘起処理方法は、下記 4 区について検討した。

(1)コントロール区(無処置区) (2)PMSG(妊馬血清性腺刺激ホルモン)+hCG(ヒト絨毛性腺刺激ホルモン)区(従来区) (3)PG(プロスタグランジン F2 $\alpha$ )+PMSG+hCG 区<sup>1)</sup> (4)FSH(卵胞刺激ホルモン)+PMSG+hCG 区、各区ホルモン処置後に藤野らの方法<sup>2)</sup>に準じて、新鮮精液 50ml(約 2 億/ml)で 2 回人工授精を実施し、5 日後に外科的に子宮角を還流し受精卵を回収した。実体顕微鏡下でピックアップした受精卵は、採卵数、正常受精卵率、発育ステージについて調査した。

試験 2 : 弱酸性次亜塩素酸水を用いた疾病フリーな受精卵凍結保存技術の開発と非外科的移植方法の改良

(1) 弱酸性次亜塩素酸水を用いた疾病フリーな受精卵凍結保存技術の開発

①新鮮精液 5 検体を用いて、改良モデナ液<sup>3)</sup>を基本液とした弱酸性次亜塩素酸水 25ppm、50ppm、100ppm を作成し、精液を 10 秒間浸漬処理し、すぐさま 10 倍量に改良モデナ液で希釈した後、2,000rpm で 2 分間遠心分離処理し上澄みを除去し、再懸濁した精子を CASA システム (コンピュータ精子運動解析装置) を用いて運動性を調査した。

②体内受精卵 50 個を用いて、体外培養液の mNCSU-37<sup>4)</sup>を基本液とした。

弱酸性次亜塩素酸水 25ppm、50ppm、100ppm を作成し、受精卵を 10 秒間浸漬処理した後、すぐさま培地を変えて 3 回洗浄し、CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> インキュベーター (38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>) 内で 3 時間培養後の生存性について調査した。

(2) 非外科的移植方法の改良

パークシャー種雌豚 6 頭を用いて、開発したミタゾラム鎮静法 (0.08mg/kg) で鎮静後、子宮体部移植器具 (ミサワ医科工業: 紅 3 号)<sup>5)</sup> および子宮深部注入用カテーテル (富士平工業 (株): 巧カテーテル) を用いて、受胎豚の子宮体部および子宮角子宮角深部にカテーテル挿入試験 (図 3) を実施し、その操作性や安全性およびカテーテル到達時間について調査した。

試験 3 : 子宮内環境最適化後の受精卵移植による受胎率向上方法の検討

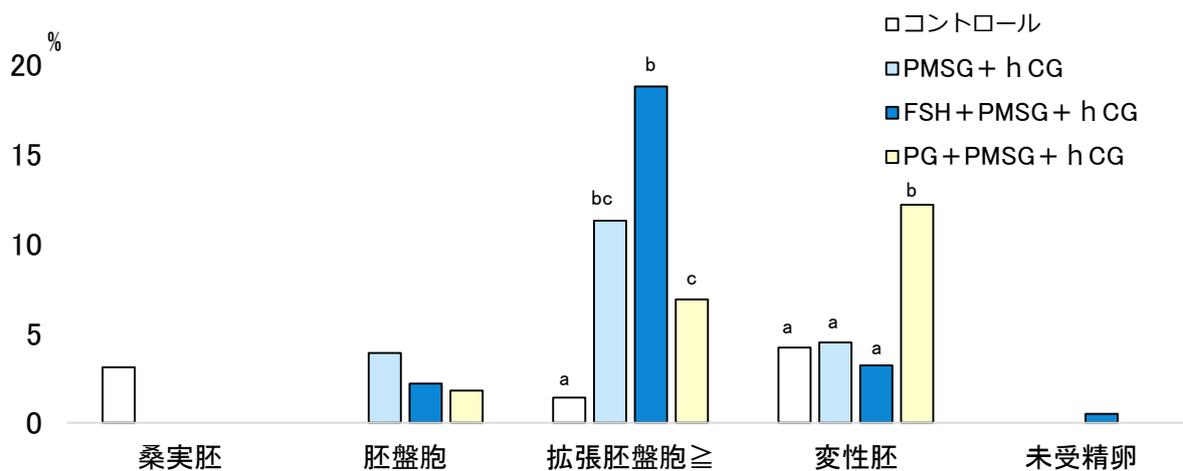
死滅精子および生存精子 20ml (1 億個/ml) を未経産の発情豚計 12 頭に人工授精し、その後 5 日目に非外科的に受精卵移植実験を実施した。また、精液注入前後に頸静脈より採血し、10 種類のサイトカイン量変化について、抗体アレイ法を用いて調査した。

### III 結果

試験 1 : 平均採卵数および正常受精卵率はそれぞれ、コントロール区 (7.3 個, 62.2%)、PMSG+hCG 区 (17.4 個, 74.5%)、PG+PMSG+hCG 区 (17.3 個, 48.4%) および FSH+PMSG+hCG 区 (27.0 個, 85.2%) で、FSH+PMSG+hCG 区においては、他の区と比較して有意に採卵率および正常受精卵率が高く (P<0.05)、発育ステージは胚盤胞から脱出胚盤胞までが認められ、胚の品質が高かった (図 1)。

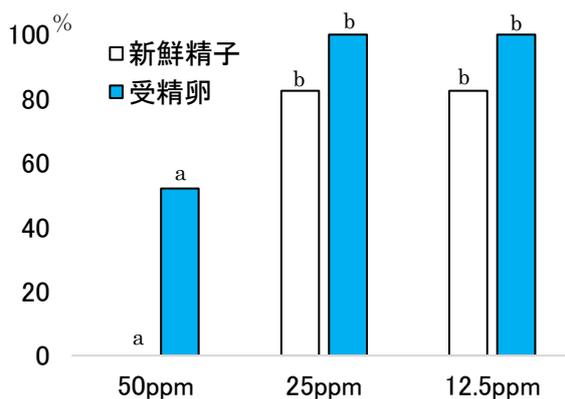
試験 2 : (1) ①新鮮精子においては、50ppm で生存精子は認められず、25ppm 以下で 80%以上の生存性が確認された。②受精卵においては、50ppm で 56%、25ppm 以下で全ての受精卵で生存性が確認できた (図 2)。

(2) 鎮静剤を用いることで、受胎豚を立位のまま、非外科的移植作業 30 分以上保持が可能であり、子宮深部注入用カテーテルと比較して、子宮体部移植器具の操作性は容易であり、子宮の穿孔リスクが低く、挿入時間も短く移植時の安全性が高かった。



同发育ステージ異符号間で有意差あり(P<0.05)

図1 ホルモン処置の違いが受精卵の发育ステージに与える影響



同生殖細胞異符号間で有意差あり(P<0.05)

図2 弱酸性次亜塩素酸水処理後の精子・受精卵の生存率



図3 受精卵の非外科移植の様子

表1 非外科移植方法による操作性等の比較

移植部位	操作性	安全性	カテーテル到達時間
子宮体部移植	容易	◎	短い
子宮角深部移植 (従来法)	やや難	○	長い

試験 3：死滅精子注入区では受胎しなかったが、生存精子注入区において 6 頭中 3 頭が受胎（受胎率 50%）した。また、死滅した精子と生存精子とで誘起されるサイトカイン濃度の変化率が異なり、新鮮精子で IL-1b や IL-12 が誘起され、IFN $\gamma$  が抑制することが解った（表 2）。

表 2 生存精子および死滅精子注入前後の血中サイトカイン量の変化率

サイトカイン	生存精子	死滅精子
	AI 後/AI 前 (%)	AI 後/AI 前 (%)
IL-1b	145.9	110.2
IL-4	83.6	56.6
IL-12	128.0	107.1
IFN $\gamma$	87.3	114.8

#### IV 考察

豚の過排卵誘起処理において、FSH 剤、PMSG 製剤および hCG 製剤を用いることで、高い採卵数（平均採卵数 27 個）および正常受精卵率（85.2%）が得られることが解った。これまで、当所では PMSG 製剤および hCG 製剤を用いた過排卵誘起処理方法を実施してきたが<sup>1)</sup>、平均採卵数が 17.4 個であったことから、新たな過排卵誘起処理方法は採卵効率を約 1.5 倍に向上させることが可能である。今後は採取した受精卵の品質や移植した場合の子豚への発育率について調査をする必要がある。また、1 頭当たりのホルモン剤の使用価格を試算すると、従来法で 1,200 円、新たな過排卵誘起処理方法で約 3,100 円とコスト高となるが、多くの受精卵が採卵出来た場合、受精卵 1 個当たりのコストは同程度になると思われる。

弱酸性次亜塩素酸水を用いた疾病フリーな受精卵凍結保存技術の開発において、50ppm 以下の弱酸性次亜塩素酸水処理方法を用いて、受精卵の清浄化処理後の生存性が確認できたが、ウイルスの不活化効果については、今後の報告と合わせたうえで、感染実験等が必要であると思われる。非外科的移植方法の改良においては、子宮角深部移植に比較して、子宮体部移植は移植時間も少なく安全で操作が簡易であるため、農家の庭先で未経験者が遺伝的希少品種の受精卵を農場に導入するには適しているものと思われる。移植時に、当所で開発した鎮静化方法を実施することで、受胎豚を立位のまま安定的に保持し、アニマルウェルフェアに留意した受精卵移植が可能である。試験 3 において、通常の受精から胚の着床までに起こる適切な子宮内の炎症反応を再現することで、受胎率の向上を目指すために、受精卵移植時に死滅精子および生存精子を子宮内に注入した。その結果、生存精子

では適切な炎症反応が誘起され、受胎率が向上することが解った。また、死滅精子および生存精子<sup>6)</sup>で誘引されるサイトカインの種類や変化量が異なるため、今後受胎率を向上することが期待できるサイトカインを人為的に増加もしくは抑制させることで、生存精子を注入せずに子宮内環境の最適化が可能であることが示唆された。以上より開発した過排卵誘起処理方法による効率的な採卵をするとともに、その清浄化処理についても凍結保存前に合わせて行うことで、疾病リスクの少ない受精卵の半永久的な大量凍結保存が可能となった。さらに今回開発した非外科移植技術とサイトカインの誘導による子宮内環境の最適化技術を組み合わせることで、効率的に農家の庭先で群再構築が可能となる。

## V 参考文献

- 1) Suzuki C, Iwamura S, Yoshioka K. Birth of piglets through the non-surgical transfer of blastocysts produced in vitro. *J Reprod Dev.* 50: 487-291 (2004)
- 2) Fujino Y, Nakamura Y, Kobayashi H, Kikuchi K. Relationship between time elapsed after hCG administration and developmental stage in porcine embryos collected from prepubertal gilts. *J Reprod Dev.* 52: 238-246 (2006)
- 3) Sone M, Chikyu M, Yoshida M, Banba K, Ogasa A. Prolonged storage on boar semen in liquid form. *The Japanese Society of Swine Science* 29 (1), 41-50(1992).
- 4) Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T. Successful Piglet Production after Transfer of Blastocysts Produced by a Modified In Vitro System. *Biol Reprod.* 66:1033-1041(2002).
- 5) Hirayama Y, Takisita R, Misawa H, Kikuchi K, Misumi K, Egawa S, Motoyama S, Hasuta Y, Nakamura Y, Hashiyada Y. Non-surgical transfer of vitrified porcine embryos using a catheter designed for a proximal site of the uterus. *Animal Science Journal.* 91(1): e13457. doi: 10.1111/asj.13457(2020).
- 6) Tajima S, Uchikura K, Kurita T, Kikuchi K. Insemination of recipient sows improves the survival to term of vitrified and warmed porcine expanded blastocysts transferred non-surgically. *Animal Science Journal.* Jan-Dec;91(1):e13453. doi: 10.1111/asj.13453(2020).