

豚における繁殖技術研究の最近の動向

農林水産省家畜改良センター 技術部 小島 敏之

1. 受精卵移植技術関連

(1) 受精卵移植技術は疾病清浄化の完璧な手段か
 受精卵移植技術は、受精卵の構造的特殊性（透明帯に囲まれている）ゆえに、疾病伝播を防止しつつ遺伝子を導入（移動）できる技術として一般

には理解されている。しかし、それは受精卵が厳格に衛生的取り扱いをされた場合に限り言えることで、技術者の不注意から疾病を拡大させる恐ろしい武器にもなり得る。

受精卵と病原微生物との相互関係

表1 病原体に暴露した後洗浄をした透明帯付き受精卵の発育と感染率

病原体	希釈倍率	病原体に暴露した受精卵数	発育に及ぼす影響	病原体を持ち続けた受精卵(%)
アフリカ豚コレラ	10 ⁶ HAdD ₅₀ /ml	80	検知されず	95
口蹄疫ウイルス	10 ⁶ PFU/ml	194	検知されず	5
豚コレラ	10 ⁴ -10 ⁶ FFU/ml	171	検知されず	97
豚パルボウイルス	10 ³ CCID ₅₀ /ml	38	生存性低下	100
豚パルボウイルス	10 ³ PFU/ml	39	検知されず	100
オーエスキー病	10 ⁴ -10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	282	検知されず	24
豚水胞病	10 ⁷ PFU/ml	176	検知されず	100
水胞性口炎	10 ⁵ -10 ⁸ PFU/ml	97	検知されず	85

HAdD₅₀ haemadsorption dose (50%), PFU plaque-forming units, FFU fluorescent focus units, CCID₅₀ cell culture infective dose (50%), TCID₅₀ tissue culture infective dose (50%)

表2 病原体に暴露された透明帯付き受精卵に及ぼすトリプシン処理の効果

病原体	希釈倍率	病原体に暴露した受精卵数	病原体を持ち続けた受精卵(%)
アフリカ豚コレラ	10 ⁶ HAdD ₅₀ /ml	126	30
豚コレラ	<10 ⁶ FFU/ml	114	0
豚コレラ	>10 ⁶ FFU/ml	118	24
オーエスキー病	10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	45	0
豚水胞病	10 ⁷ PFU/ml	100	64
水胞性口炎	10 ⁶ PFU/ml	61	0

◎受精卵の洗浄とトリプシン処理の要領

洗浄：

1. 供卵豚が2頭以上にわたっても、それらをひとつのドロップ内で一緒にしない。
2. 一時に10個以上の受精卵を洗浄するようにする。
3. 透明帯が破損していない受精卵のみを洗浄する（最低でも倍率50倍で透明帯の表面全体を洗浄前と後に精査する）。
4. 透明帯に付着物がない受精卵のみを洗浄する（必要ならば、洗浄前に除去する）。
5. 最低でも、10回洗浄する（1回毎に徹底的

に緩やかな混合のために十分な時間をとる）。

6. 液を代える毎に新しい滅菌済みピペットを使う。
7. 洗浄毎に直前の洗浄液の少なくとも100倍以上の希釈になるようにする。

トリプシン処理：

トリプシン処理が必要な場合も、上記の洗浄操作が基本となる。

1. 広域スペクトル抗生物質および0.4%BSAを含有したPBSによる5回の洗浄
2. 0.25%トリプシン溶液（Hank's balanced salt solution without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺）が

表3 病原体に暴露された透明帯フリー受精卵の発育と感染率

病原体	希釈倍率	病原体に暴露した受精卵数	発育に及ぼす影響	受精卵のアッセイ結果
オーエスキー病	10 ⁴ -10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	46	—	陰性

表4 感染動物あるいは抗体陽性動物から採取した受精卵の移植結果

病原体	移植胚数	受卵豚の数	子豚および受卵豚の抗体
豚コレラ	385	17	陰性
オーエスキー病 (抗体陽性)	805	34	陰性
オーエスキー病 (抗体陽性)	563	47	陰性
オーエスキー病 (経鼻, 経子宮)	70	5	2/5 陽転
オーエスキー病 (経鼻)	45	3	陰性
オーエスキー病 (経鼻, 経口, 経膈)	161	9	陰性 移植前にトリプシン処理された
オーエスキー病 (経鼻, 経口, 経膈)	39	2	2/2 陽転
豚水胞病	205	9	陰性

表5 感染動物あるいは抗体陽性動物から由来する受精卵/卵子のアッセイ結果

病原体	回収胚数	回収卵数	受精卵/卵子のアッセイ
豚コレラ	19	74	陰性
豚水胞病	17	95	陰性

表6 感染動物あるいは抗体陽性動物からの子宮灌流液のアッセイ結果

灌流された供卵動物の状態	陽性/トータル
口蹄疫感染	4/15
豚コレラ感染	6/33
オーエスキー病感染	少なくとも2例
オーエスキー病抗体陽性	0/47
豚水胞病	8/17

表7 インビトロで病原体に暴露された受精卵の移植結果

病原体	希釈倍率	暴露された受精卵数	受卵豚数	子豚と受卵豚の抗体
豚パルボ	10 ⁴ CCID ₅₀ /ml	76	4	4/4 陽性
オーエスキー病	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	45	4	陰性
オーエスキー病	10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	79	5	5/5 陽性

入ったディッシュを2つ用意し、全体で60～90秒間感作させる。

- トリプシン処理後、引き続き5回洗浄を行うが、このときに使用する洗浄液は抗生物質と2%血清を含むPBSとする。

受精卵移植と疾病伝播との関係からみた伝染性疾病的分類

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、豚の疾病に限って示す。

分類Ⅰ：採卵してから移植までの間、受精卵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（ただし、トリプシン液を併用した受精卵洗浄が必要）

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、インビトロとインビボの実験を積み重ねる必要がある疾病

- ・口蹄疫
- ・豚水胞病
- ・アフリカ豚コレラ

分類Ⅳ：現在、試験を実施中である疾病

- ・水胞性口炎
- ・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

受精卵の衛生的取り扱いの重要性

つい最近の台湾の口蹄疫（1997年3月）、オランダの豚コレラ（1997年4月）、香港のトリインフルエンザ（1997年末）の猛威は記憶に新しく、いかなる国も動物の疾病の発生から完全に免れることはできないと思われる（この原稿を準備しているときに、わが国でも92年ぶりに口蹄疫の発生が確認された）。

受精卵を扱う場合でも、家畜という食品を扱っているという認識の上で受精卵の衛生的取り扱い、受精卵の危機管理、器具器材の品質管理、実験室の危機管理にもっと関心を持つ必要がある。

(2) 非外科的受精卵移植

豚の受精卵移植技術が牛のそれほど普及していない理由のひとつに、採卵と移植に全身麻酔による外科的開腹手術を要することがある。採卵に関しては、過去に子宮角短縮術を施した豚から頸管経由法により非外科的に受精卵を採取する方法が考案された経緯があるが、種々の理由で汎用性に欠けることから、現在でも一部の研究グループで用いられているに過ぎない。一方、非外科的移植に関しては、最近わが国、米国、ヨーロッパで実用的な方法による成功が伝えられており、研究者だけでなく民間のブリーダーもその応用に興味を示している。わが国では、鳥取県中小家畜試験場の米村功研究員が精力的に実施している。米村らの方法は、市販の人工授精用スパイラルカテーテ

ルを用いて成功している点で、世界でもユニークである。この方法によれば、受胎率は60%を確保できるが、産子数が平均3～4頭前後であり、今後の解決を要する課題である。豚は多胎であるので、移植する受精卵の個数を増やせばある限度まで産子数を増加させることはできるが、産子生産率を考慮すれば、自ずと最適な移植個数が決まってくる。今のところ、その数字は15～20個と考えられている。米国のミズーリーコロンビア大学のDay教授のグループは、独創的な移植器を開発しており、現在世界中にパテントを申請している。彼らの成績によれば、産子数は米村らの方法に比べて高いが、受胎率が低いようである。両者の方法を比較すると、産子数を高める要因のひとつは、受精卵を子宮角の子宮体付近よりどの程度深部に移植できるかどうかであると考えられる。

(3) 受精卵の凍結保存

豚受精卵の凍結保存の成功は非常に限定されているが、着実にその成果が得られている。最近、埼玉県畜産センターの藤野幸宏研究員は、供卵豚の個体によって、その生産する受精卵の耐凍性が大きく異なることを発見するとともに、耐凍性が高い受精卵を生産することがインビトロで確認された個体から反復して凍結受精卵由来の子豚を生産している。しかし、その耐凍性の差が何に由来するのかについては追求されていない。

従来、豚の受精卵が他の家畜の受精卵に比べて耐凍性が低い理由として、受精卵細胞質中の脂肪の量的、質的および機能的差にあると言われてきたので、上記の個体間差の追求も、これらの方面から調べるのが対策のひとつとして考えられる。

豚は、牛などに比べると非常に発情持続時間に

個体間変異が大きいため、発情持続時間を正確に把握しないと、希望する発育ステージの受精卵が採取できないことになる。とくに、上記の疾病予防では透明帯に覆われている受精卵を使用することが絶対的に必要であり、凍結保存では比較的耐凍性が高い透明帯から脱出前後の発育ステージの受精卵を用いる必要がある。したがって、豚の生殖生理を理解したうえで受精卵移植に取り組むことが効果的である。

2. 豚における繁殖技術研究の最近の動向

以下の古典的な課題に対して、最新技術、知識の応用によって解決を図ろうとする機運が感じられる。また、新世代の技術も豚での応用が期待されている。

排卵数の増加

まず、産子数を増加させるために、排卵数の増加に対するアプローチがある(IGF-IやIGFBPsが介在する代謝経路の亢進を目的とした成長ホルモン、インシュリンの投与)。排卵数の増加が直接的に産子数の増加に結びつくことには限度があるが、受精卵移植においては供卵豚に対しては非常に有用な技術となる。特に、従来豚に対する外来性性腺刺激ホルモンによる過剰排卵処理の有効性は低いので、今後に期待がもてる分野である。

繁殖機能の制御

繁殖機能のすべては、下垂体前葉から分泌されるタンパク質ホルモンであるLH、FSH、プロラクチン、成長ホルモン、ACTHおよび甲状腺刺激ホルモン(TSH)で調節されている。LHやFSHのような繁殖に直接関わるホルモンは繁殖活動を制御しているが、一方TSHのような他の生理機能を制御しているようなホルモンも、間接的には

あるが、繁殖機能に大きな影響を及ぼすと言われている。このように、下垂体前葉由来ホルモンの分泌を制御したり改変することによって、豚の繁殖機能を亢進させることが可能になる。下垂体前葉由来ホルモンは、視床下部から分泌されるホルモンによって調節されており、さらにその視床下部ホルモンは神経伝達物質や神経ペプチドで制御されている。豚でよく研究されているのは、内因性オピオイドペプチド(EOP; endogenous opioid peptides, その仲間に、エンドルフィン、エンケファリンなどがある)と刺激性アミノ酸(ExAA; Excitatory amino acids)である。一般的に、EOPはGnRH、LHの分泌を抑制するが、GHRH (growth hormone-releasing hormone)、成長ホルモンの分泌を刺激する。また、それはプロラクチンに対しては抑制、刺激の両方の効果を有している。ExAAの一種であるNMDA (N-methyl-D-aspartate) は、LH、FSH、成長ホルモン、プロラクチンの分泌を刺激する。しかし、ある条件下では、NMDAはLHの分泌を抑制する。現在、EOPとExAAを用いることによる豚の繁殖機能の制御が盛んに研究されている。

発情発現と排卵のタイミング

豚の発情持続時間は、個体によって24~96時間程度の幅があるが、発情発現開始から排卵までの時間も、10~85時間と幅があるので、発情発現開始は排卵のタイミングの指標とはなりにくい。受精率は排卵時刻からみた授精時刻に大きく左右されるので、排卵のタイミングの指標があれば非常に有用である。現在の所、発情の持続時間がその最もよい指標と考えられる。雄豚の刺激、ストレス、離乳から発情回帰までの日数、季節および産次に発情の持続時間は影響されるとみられている。

現在の研究の興味は、雌豚の発情発現が脳のレベルでどのような調節を受けるかを調べることに置かれている。

プロスタグランディンF_{2α}による黄体退行

豚では12日以前の黄体にはPGF_{2α}は有効性が認められないと言われていたが、最近、排卵後8～10日にPGF_{2α} (ジノプロスト15mg/3ml) を12時間間隔で計6回投与することにより、14日に発情が発現し、16日に排卵が認められると報告されている (岩村ら)。

受精能力が高い精子を選抜する方法

受精能力が高い精液を大量に恒常的に生産することは、雄豚の管理プログラム作成にあたって一番の関心事である。しかし、一般には運動性が60%を越す場合には、精子の運動性とインビトロで

の受精率、産子生産率、産子数との間には有意な関係は見られない。

最近発表された豚精子の受精能力を評価するために用いられ得る測定方法を挙げる (表8)。

栄養面からの受精卵の生存性の改善

猛暑の期間、成熟雌豚に対してリノール酸(n-6系列: 3.75g/100g), γ-リノレン酸(n-6系列: 5.32g/100g), α-リノレン酸(n-3系列: 4.125g/100g)および対照飼料をそれぞれ2ヵ月間給餌した後に、自然発情を利用して人工授精し雄許容終了日を1日目として、その6日後に採卵した結果、γ-リノレン酸を給与した豚の試験区のみが、排卵数、採取卵子数、正常卵数および正常卵率のいずれにおいても他の区よりも有意に高い数値を示した (Kojima et al. Journal of Reproduction

表8 豚精子の受精能力を評価する種々の方法

測定方法	原 理	発 表 年
パーコール勾配	精子の速度は受精能力と正の相関がある。速い速度の精子を、この方法で分離可能。	Grant et al. 1994
蛍光染色	ヘキスト33258は、死んだ細胞のみを染色する。SYBR-14は、逆に生きている細胞のみを染色する。	Johnson et al. 1996
精子染色質構造	二重らせんDNAは緑色の、1重らせんDNAは赤色の蛍光を発する。その比率は受精能力と相関があると言われている。	Evenson et al. 1994
精子細胞膜のタンパク質組成	精子細胞膜のタンパク質のうち、3種が卵細胞膜との結合能力に関連していると言われている。逆に、他の2種は負の相関関係にある。	Ash et al. 1994
卵細胞膜バインディング・アッセイ	卵細胞膜との結合能力と受精能力は、0.80の相関にある	Berger et al. 1996
半切透明帯バインディング・アッセイ	卵子を切断二分離して半切された透明帯のそれぞれに由来の異なる精子を結合させる。結合能力が高い精子を受精能力が高いと判定する。	Fazeli et al. 1995

and Development 43: 121-127, 1997)。

この試験では、機構解明のための実験を組んでいないが、作業仮説として、猛暑のためリノール酸から γ -リノレン酸を通じてアラキドン酸へ向かう経路のなかで、リノール酸から γ -リノレン酸へ移行する際に働く $\Delta 6$ -不飽和化酵素が猛暑のためにうまく働かなかったために、 γ -リノレン酸を与えた給与区のみがエイコサノイド（プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、その他の関連物質）が効率的に生産されたためと推察された。

精子、受精卵の性判別に関する研究開発

豚精子の性判別に関する研究は、米国メリーランド州ベルツビルにある農務省農業研究サービス

の生殖細胞・配偶子生理研究室の成果に負っているところが大きい。ここでは、その成果を紹介する。豚受精卵の性判別に関しては、雄特異的DNA塩基配列をプローブとしてPCRを応用した戸津川らの報告、in situ hybridizationを利用した河原崎らの報告があるが、実用化するには多くの改善を要する。

体細胞クローンと遺伝子導入豚

体細胞クローン技術を言い換えれば、体外培養系で維持できる細胞をドナー細胞として核移植技術により個体を生産する技術といえることができる。したがって、培養細胞に組み換え遺伝子を導入することによって、従来の前核期受精卵に直接遺伝子をインジェクションする方法に比べて格段に効

表9 各種の高度不飽和脂肪酸を給与した試験区における腹部皮下脂肪の脂肪酸組成

脂 肪 酸	対 照 区	リノール酸区	γ -リノレン酸区	α -リノレン酸区
n	10	5	5	5
C14:0	2.74±0.11	2.52±0.10	3.51±0.07	2.81±0.10
C16:0	22.79±0.77	18.24±0.69	23.63±0.49	20.04±0.69
C16:1	4.54±0.57	2.89±0.51	4.69±0.36	4.01±0.51
C18:0	18.54±1.74	17.32±1.55	13.63±1.10	13.58±1.55
C18:1	34.52±1.83	28.72±1.63	35.45±1.15	31.06±1.63
C18:2	16.89±1.20	30.30±1.07	13.03±0.76	13.64±1.07
C18:3 γ	ND	ND	6.07±0.27	ND
C18:3 α	ND	ND	ND	14.85±0.38

表10 各種の高度不飽和脂肪酸を給与した試験区における黄体数、卵回収率、正常受精卵数および正常受精卵率

給与飼料	n	黄 体 数	回収卵数(%)	正常受精卵数(%)
対 照 飼 料	10	13.7±0.71	11.9±0.69*(86.9)	9.9±1.02*(83.2)**
リノール酸	10	12.6±0.71	11.6±0.69*(92.1)	10.2±1.02*(87.9)**
γ -リノレン酸	10	15.0±0.73	14.2±0.71(93.3)	14.0±1.04(98.6)
α -リノレン酸	13	11.2±0.64	10.3±0.62**(90.5)	8.9±0.92**(85.8)**

*P<0.05, **P<0.01

表11 X精子とY精子を分離するために用いられるマーカー

マーカー	パラメーター	引用
D N A 量	X精子>Y精子	Moruzzi JF:1979
大 き さ	X精子>Y精子	Cui K:1997
運 動 性	Y精子の方がX精子より速い	Ericsson et al. 1973
F - B o d y	Y精子上に長腕	Barlow and Vosa: 1970
H - Y 抗 原	精子表面	Hendriksen et al. 1993
タ ン パ ク 質	精子表面	Hendriksen et al. 1996

表12 フローサイトメトリーで性判別した精子で媒精して作出した体外受精卵を移植された豚から生産された子豚の内訳

処 理	同腹子豚数	雄子豚	雌子豚	予知された性別の率(%)
X精子に分類	6	0	6	89
X精子に分類	4	0	4	89

表13 フローサイトメトリーで性判別した精子を卵管内授精された雌豚から生産された子豚の内訳

処 理	授精数	分娩数	産子数	分娩産子(%)		予知された性別(%)	
				雌豚	雄豚	X	Y
初 期 の 技 術							
Y精子に分類	8	4	37	32	68	23	77
X精子に分類	10	5	34	74	26	80	20
未分類/染色	11	5	40	57	43	50	50
未分類/未染色	7	5	46	48	52	50	50
最 新 技 術							
Y精子に分類	1	1	7	14	86	15	85
X精子に分類	1	1	8	88	12	89	11

率がよくなると考えられている。従前は、胚性幹細胞株（ES細胞株）の作出によるインジェクション法の改善を図っていたが、ES細胞株の作出がなかなか成功しないことから、ES細胞株開発の必要性は激減したと見られている。

豚は、遺伝子導入動物あるいは遺伝子改変動物作出のために体細胞クローンが利用される率は牛

に比べて圧倒的に高いと考えられる。そのひとつの好例が、ヒトへの臓器移植(xenotransplantation)用の臓器提供動物として豚を利用する計画である。

しかしながら、豚の場合、核移植技術そのものの完成度が牛に比べれば非常に低く、今まで核移植由来の子豚は米国で1頭が報告されているだけ

である (Prather et al. 1989)。

追記：この原稿を準備しているときに、PPL社が豚の体細胞クローン5頭の生産に成功したという新聞報道があったが、詳細は不明である。

参考文献

- 国際胚移植学会編マニュアル第3版 (1998)
- Control of Pig Reproduction V (1997)
Journal of Reproduction and Fertility Ltd.

☆☆☆☆☆☆

ブタ・ア・ラ・カルト



ネパール・アンナプルナ山麓(標高2,000m付近)で見かけたこの地方在来の豚。体重35kg位のを里で買い求めて、ベルトを付け歩かせながら、山をひとつ越して自分の村へ帰る途中。価格は高く、7,500円(一般公務員の給料の2倍弱)。

(写真提供：赤池洋二氏)