

# 体外胚生産移植におけるアグー豚の生産について

伊佐常暢 Tamas Somfai\* 親泊元治\*\* 普照恭多  
 當眞嗣平\*\*\* 鈴木直人 金子浩之\* 片桐慶人  
 菊地和弘\*

## I 要 約

沖縄アグー豚(以下、アグーという)の胚(受精卵)を受胚豚へ移植して子豚を生産することを目的に、体外胚生産・移植技術の実現可能性について検討するため、12頭のアグー雌豚の卵巣より卵子を採取し、成熟培養後にアグー雄豚の凍結精子を用いて体外受精および体外胚生産移植を行ったところ、以下のとおりであった。

1. 作製したアグーの胚を4頭を受胚豚に移植し、うち1頭が妊娠した。
2. 妊娠した受胚豚1頭の総産子数は、計8頭(雄5頭、雌3頭)で、うち1頭(雄)は死産、1頭(雌)は虚弱のため分娩翌日に死亡、1頭は31日後に死亡し、残りの5頭は順調に発育した。

以上の結果からアグーにおいて、体外胚生産・移植技術を用いて子豚の生産が可能であることが示唆された。

## II 緒 言

アグーは、沖縄県内でのみ飼養されている貴重な豚であり、ブランド化を推進している<sup>1)</sup>。しかし、過去に著しく数を減らし復元の過程でも小集団で維持されてきた<sup>2)</sup>ことから、遺伝的多様性が少なく特定家畜伝染病の侵入による防疫措置などで一度絶滅してしまえば生体での復元は難しい。そのため遺伝子資源の保全が必要であり、受精卵を用いたアグー子豚を生産する技術の確立が求められている。現状西洋種においての報告<sup>3, 4)</sup>はあるがアグーについての報告はない。そこで本研究では体外胚生産・移植技術を用いたアグー子豚生産の可能性について検討を行ったので報告する。

## III 材料および方法

### 1. 試験期間

試験期間は、2020年8月から2021年2月までの間に4回の卵巣採取および胚移植実験を行った。

### 2. 試験場所

試験場所は、畜産研究センター(以下、当センターという)内の精液処理室および手術室で行った。

### 3. 供試豚

#### 1) 供卵豚

供卵豚は、当センターにて飼養している空胎期のアグー雌豚12頭(13.1~64.6ヶ月齢)とし、4回の実験で3頭ずつ供試した。また卵巣摘出手術当日は絶食とした。

#### 2) 受胚豚

受胚豚は、当センターにて飼養している雌のランドレース種4頭(11.3~17.0ヶ月齢)とした。受精卵移植当日に発情が来るように移植日の5日前に1000単位eCG(セロトロピン®、あすかアニマルヘルス)を筋肉注射し、その3日後に500単位hCG(動物用ゴナトロピン3000®、あすかアニマルヘルス)を筋肉注射した。また移植手術当日は絶食とした。

### 4. 実験方法

実験は独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門の動物実験委員会が承認したプロトコル(承認番号H30-005)に従って実施した。

\* 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 \*\* 現沖縄県中央家畜保健衛生所  
 \*\*\* 現沖縄県宮古農林水産振興センター家畜保健衛生課

供卵豚と受胎豚は保定前に導入麻酔としてメシル酸マホブラジン(マフロパン®、DSファーマアニマルヘルス)を体重1 kgあたり0.05 mlとして計算して筋肉内投与した。保定後、耳介静脈より翼状針を用いてチアミラールナトリウム(イソゾール注射用0.5g®、日医工)を投与した。その後麻酔が完全に効いていることを確認し、豚を手術台に乗せて保定し、手術中は吸引麻酔としてイソフルラン(イソフルラン吸入麻酔薬®、ファイザー)を4%程度で導入し、豚の様子を見ながら2%以下で維持した。滅菌した器具を用いて皮下織、筋肉、腹膜を切開し、切開部位から子宮・卵管・卵巣を確認後、供卵豚の場合は卵巣を摘出、受胎豚の場合は子宮に受精卵移植を行った。

### 1) 体外成熟(以下、IVMという)

IVMは回収した全ての卵巣を、回収液(抗生物質を含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水)を含むペトリ皿に入れ、ピンセットで卵巣を押さえながら全ての胞状卵胞を切開し、卵丘細胞-卵子複合体(COC)を実体顕微鏡下でマウスピペットによって探索し取り出し、4ウェル皿の各ウェルにおいて30~50個ずつ入れ、はじめの22時間を10%(v/v)ブタ卵胞液、1 mMジブチリルcAMP dbcAMP)、10 ng/ml表皮成長因子(EGF)、10 IU/ml eCGおよび10 IU/ml hCGを含むブタ卵子培養液(POM、機能性ペプチド研究所)で、続く22~24時間をdbcAMP含まない液で、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、39°Cの加湿空気中で行った。

### 2) 体外受精(以下、IVFという)

IVFはKikuchiら<sup>5)</sup>およびLinh<sup>6)</sup>らの報告に基づき、以下の方法で実施した。IVM終了後、IVF液(90 mM NaCl, 12 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 10 mM Sodium lactate, 10 mM Hepes, 8 mM CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O, 2 mM Sodium pyruvate, 2.00 mM Caffeine, 抗生物質, 5 mg/ml BSA, Phenol red)でCOCを3回洗浄し、IVF液滴に20個ずつ移した。一方、0.5 ml ストローで凍結保存したアグー豚精巣上体精子を融解し7 mlの精子洗浄培養液(TCM-199 pH 7.8)に導入し、2000 rpm (760×g)で2分間遠心分離を行い、精子濃度が1.0×10<sup>5</sup>/mlで50 μlをCOCの入ったIVF培地ドロップに加えて、IVMと同じ条件下で4時間共培養を行った。

## IV 結 果

### 1. 移植結果

4回のアグー豚の体外胚生産移植の結果を表1に示した。12頭のアグーから合計1061個の卵子を回収し、体外成熟・体外受精後、4頭の受胎豚に合計616個の受精卵を移植した。移植した4頭のうち3頭は発情が回帰し、1頭の妊娠が確認された。

表1 アグー豚胚の体外生産と受胎豚への移植

実験回数	供卵豚数	体外受精卵生産		胚移植		結果
		採卵数	体外成熟・受精卵数	移植胚数	受胎豚数	
1	3	228	133	129	A	不受胎
2	3	299	166	160	B	不受胎
3	3	247	146	146	C	受胎
4	3	287	181	181	D	不受胎
計	12	1061	626	616	4	

### 2. 分娩結果

妊娠した受胎豚の分娩結果を表2に示した。総産子数8頭のうち生存産子数は7頭、1頭は死産、その後1頭が出生翌日に衰弱死、1頭が生後31日目に事故死しており、離乳した子豚は、5頭(雌:1頭、雄:4頭)となった。(令和5年3月6日現在)

なお離乳したそれぞれの個体については、親子関係がある事を確認している。

表2 分娩結果

総産子数	分娩時 生存頭数	死産	衰弱死	事故死	離乳頭数
8	7	1	1	1	5

## V 考 察

体外受精による子豚生産の成功例は、そのほとんどが西洋種に限られており<sup>3, 4)</sup>、アグーでの報告はこれまでされていない。本研究により、従来の体外胚生産・移植技術がアグーにも有効であることが示唆された。また、これまで淘汰されてきたアグー雌豚を供卵豚として用いることで、遺伝資源としての活用の可能性も考えられる。ただし採卵は通常、食肉処理場で屠畜された豚から得られた卵巣を用いて体外受精を行うが、沖縄県の屠畜場では屠畜する際に脱毛のために熱湯処理を行っており、それによる熱が卵巣にダメージを与えることが懸念される。このため本研究では生体のアグー雌豚から手術により採取した卵巣を用いた。またアグーの総産子数の平均は4~5頭と報告されているが<sup>2)</sup>、今回は8頭の子豚を得ることができた。これは、受胚豚として使用した西洋種の子宮のサイズがアグーと比べて大きかったことが影響したと考えられる。今回の分娩例では1例のみであり、今後例数を増やすとともに受胎率を上げる研究を行う必要がある。なお、本研究の成果は、Animal Science Journal 2022, e13685に掲載した。

## VI 引 用 文 献

- 1) 沖縄県アグーブランド豚推進協議会ホームページ (<https://okinawa-agu.com/>)
- 2) 當眞嗣平・親泊元治・翁長桃子・嘉数良子・野中克治 (2015) 近交係数増加が沖縄アグー豚の繁殖成績に及ぼす影響, 沖縄畜研セ研報, **53**, 25-28
- 3) Marchal, R., Feugang, J. M., Perreau, C., Venturi, E., Terqui, M., & Miemillod, P. (2001). Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*, **56**(1), 17-29. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00539-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00539-8)
- 4) Misumi, K., Hirayama, Y., Suzuki, M., Nakai, M., Kaneko, H., Noguchi, L., & Kikuchi, K. (2014). Production of Middle White piglets after transfer of embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, **60**(3), 246-249. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-088>
- 5) Kikuchi, K., Onishi, A., Kashiwazaki, N., Iwamoto, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Akita, T., & Nagai, T. (2002). Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biology of Reproduction*, **66**(4), 1033-1041. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.1033>
- 6) Linh, N. V., Somfai, T., Nguyen, T. H., Nhung, N. -r., Hong, N. -r., Dat, N. -r., Thinh, N. H., van, N. K., Quyen, D. V., Chu, H. H., son, N. & Kikuchi, K. (2018). Optimization of the in vitro fertilization protocol for frozen epididymal sperm with low fertilization ability in Ban-A native Vietnamese pigs. *Animal Science Journal*, **89**(8), 1079-1084. <https://doi.org/10.1111/asj.13045>