

「かごしま黒豚」第4系統における遺伝資源の凍結保存に関する研究

川原賢士*¹・後藤介俊*²・中塩屋正志*³・郷原幸哉*⁴

要 約

本県は、パークシャー種の系統豚である「サツマ」、「ニューサツマ」、「サツマ2001」、「クロサツマ2015」の4系統豚を造成しており、これまでに3系統豚の精液および胚を遺伝資源として保存している。

本研究では、「クロサツマ2015」の精液および胚の凍結保存を行った。また、豚凍結精液は液状精液に比べて人工授精における受胎率等の成績が悪いことから、融解後の精子活力および受胎率・産子数の向上を目指し、凍結精液の作製方法について検討を行った。

(1) 精液の一次希釈液への感作温度を、従来法の室温と水温よりも低下させたところ、凍結・融解時の精子活力を向上させられる可能性が示唆された。

(2) 本研究で検討した方法で作製した凍結精液を用いて1発情あたり1回人工授精を行った結果、従来の方法で作製した凍結精液を用いて1発情あたり2回人工授精を行った結果と同等の受胎成績であった。

キーワード：遺伝資源，系統豚，低温法，凍結精液

緒 言

本県は、国内で唯一パークシャー種の系統豚を造成・維持しており、これまでに造成された系統豚は、「サツマ（以下、B1）」（1983年完成）、「ニューサツマ（以下、B2）」（1991年完成）、「サツマ2001（以下、B3）」（2001年完成）および「クロサツマ2015（以下、B4）」（2015年完成）の4系統があり、これらはそれぞれ10年近い歳月と多額の費用をかけて育種改良され、全国的に知名度の高い「かごしま黒豚」ブランドの基盤となっている貴重な財産である。

鹿児島県農業開発総合センター畜産試験場（以下、畜試）では、各系統豚の精液および胚を遺伝資源として保存している。これらの遺伝資源の保存は、未来世代への遺伝的多様性を確保する意義をもち、さらに、国内で2018年から続発している豚熱、国外で発生のある口蹄疫やアフリカ豚熱等の伝染性疾病により、「かごしま黒豚」の系統が途絶えることを防ぐ手段としても有効である。これまで畜試では、4つの系統豚のうち、B1、B2、B3の遺伝資源を保存しており、本研究では、B4の精液と胚

の保存を行った。

一方で、豚凍結精液の問題点として、融解後の精子活力が液状精液と比較すると低く、受胎成績が悪いことから、生産現場で実用化に至っていないことが挙げられる。

これまでに、邨上ら⁶⁾が凍結精液作製において、精液の二次希釈液への感作温度を従来法の水温下より低くすることで精子生存指数および受胎率を向上させられることを報告している。

そこで、本研究では、凍結精液作製のうち、精液の一次希釈液への感作温度に着目し、融解後の精子活力および受胎成績を向上させることを目指し検討を行ったので報告する。

試験材料および方法

1 系統豚の遺伝資源の凍結保存

(1) 精液の凍結保存

供試豚は、畜試と一般社団法人鹿児島県種豚改良協会（以下、協会）で飼養しているB4種雄豚5頭を用いた。保存する凍結精液の目標本数は2,000本とした。

精液採取には擬牝台を用い、手圧法で精液濃厚部を分画採取した。採取した精液について精子活力検査を行い、活力80+++以上と判定したものを凍結保存に供した。

精液に前処理液（以下、モデナ液）（表1）を20%加え、2,000rpm、10分間遠心分離して上清を除去し、10億精子/mlとなるようにモデナ液で希釈し26℃の室温下で1.5

（連絡先）中小家畜部

* 1 肝属家畜保健衛生所

* 2 鹿児島中央家畜保健衛生所熊毛支所

* 3 北薩地域振興局

* 4 始良家畜保健衛生所

～2 時間放冷した後、15℃の低温インキュベーター内で 20 時間静置した。

次に、15℃の室温下で 2,000rpm、10 分間遠心分離して上清を除去し、20 億精子/ml となるように一次希釈液(表 2)を混合し、水温 15℃の水中に容器を半分浸し、5℃の室温下で 5 時間静置して 5℃まで冷却した。

次に、二次希釈液(表 3)を少量ずつ加え 10 億精子/ml となるように調整して 15 分間静置後、0.5ml の精液ストローに充填した。精液ストローを液体窒素から 4cm 上部に保持し 10 分間予冷を行った後、速やかに液体窒素中に投入し凍結保存した。

作製した凍結精液の品質確認として、凍結精液ストロー 2 本を抽出検査した。精液ストローを液体窒素中から取り出し 10 秒間空气中に保持した後、38℃のウォーターバス中に 50 秒間浸漬して融解した。次に、モデナ液で 10 倍希釈し 38℃で 30 分間加温した後に精子活力検査を行った。活力が 50++以上と判定した場合に、残りの凍結精液ストローを保存に適すると判断した。

表 1 モデナ液の組成 (単位: g/L)

グルコース	27.50
クエン酸ナトリウム	6.90
炭酸水素ナトリウム	1.00
EDTA	2.35
クエン酸	2.90
トリアミノメタン	5.65
硫酸アミカシン	0.40

表 2 一次希釈液の組成 (純水1L中)

トレハロース	99.401g
硫酸アミカシン	400mg
ペニシリンGカリウム	20万単位
鶏卵卵黄	20%(v/v)

表 3 二次希釈液の組成 (単位: ml/L)

一次希釈液	925.2
OEP	14.8
グリセリン(FW=92.09)	60

(2) 胚の凍結保存

供試豚は、畜試と協会で飼養している B4 雌豚 10 頭を用いた。保存する凍結胚の目標個数は 100 個とした。

21 日前後で発情周期を繰り返している個体を選定し、自然交配後 22～40 日目に PGF_{2α} (クロプロステノール 175μg) を 1 回目投与し、2 回目を 24 時間後に同量投与した。

2 回目の PGF_{2α} 投与時にウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (以下、eCG) を 1,500IU 投与し、更に 72 時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (以下、hCG) を 500IU 投与して、発情および排卵を誘起した。これらのホルモン製剤はすべて頸部筋肉内に注射し、hCG 投与後 24 時間後から B4 種雄豚と 2 回交配を行った。

交配を開始した日 (day0) から 6 日後 (day6, hCG 投与後 160 時間後) に採胚を行った。

分娩後の母豚から採胚する場合は、離乳当日に eCG を投与して、前述と同じホルモン処置と交配を行い実施した。

採胚は吸入麻酔下で行い、アトロピン硫酸塩 (0.025mg/kg) を頸部筋肉内に投与後、導入麻酔としてチアミラールナトリウム (1.8～2.5mg/kg) を静脈内投与し、豚用手術台に横臥させた。

維持麻酔として 3～5%濃度のイソフルランを吸入させ仰臥位に保定し、腹部を洗浄・消毒・剃毛後、正中線に沿って開腹し子宮体部の分岐部から卵巢までを片側ずつ体外へ引き出した。

卵巢の排卵状態を確認後、子宮体部の分岐部から卵巢側に約 15cm の部位を 5mm 程度切開し、泌尿器用フォーリーカテーテル (ニプロ製オールシリコーンバルーンカテーテル S, 外径:18Fr) を挿入してバルーン固定した。

50ml の灌流液 (以下、M2 液)³⁾ を挿入したカテーテルから注入し、子宮から卵管まで灌流させて胚を回収した。

回収した M2 液をシャーレに移し、顕微鏡下で胚のステージを確認し、形態的に正常な胚盤胞期および拡張胚盤胞期の胚を保存に供した。初期胚盤胞期の胚は、PBM (ブタ後期胚培養用培地) に移し、マルチガスインキュベーター (38.5℃, 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂) 内で培養し、採取から 5 時間以内で胚盤胞期に発生した胚のみを凍結保存に供した。

胚の凍結保存は、マイクロボリュームエアクーリング (MVAC) 法²⁾ によりガラス化保存を行った。採取した胚を 20mMHepes で緩衝した PBM (PBM-Hepes)⁴⁾ で 10 回洗浄した後、一次平衡液に 5 分間、二次平衡液に 5 分間浸した。次に、ガラス化液に浸してブタ胚用ガラス化保存器具のデバイス上に 1 本あたり 10 個程度乗せ、液体窒素中のストローに速やかに差し込み空冷した後、液体窒素タンクへ移し凍結保存した。胚へのダメージを最小限に抑えるため、ガラス化液に浸してから液体窒素中のストローで空冷するまでを 1 分以内で実施した。

2 凍結精液作製時への一次希釈液への感作温度の検討

凍結精液作製時への一次希釈液への感作温度を、室温 15°C、水温 15°C（以下、従来法）あるいは室温 11°C、水温 8°C（以下、低温法）で行い、従来法および低温法で作製した凍結精液の融解後の精子活力について比較検討した。

供試豚は、畜試で飼養している B4 種雄豚 3 頭を用いた。

精液採取には擬牝台を用い、手圧法で精液濃厚部を分画採取した。採取した精液について精子活力検査を行い、活力 80+++以上と判定したものを凍結保存に供した。作製した凍結精液について、融解後の精子活力検査を行い、その数値から精子生存指数を算出した。

なお、従来法および低温法で作製した凍結精液の精子生存指数の比（融解後の生存指数/採精時の生存指数）について、ウィルコクソンの符号付順位和検定（両側）を実施し、加えて効果量（ $|r|$ ）を算出した。検定には R (ver. 4.0.3) を用い、 $P < 0.05$ で有意とした。

3 低温法で作製した凍結精液を用いた受胎試験

人工授精には、低温法で作製した凍結精液を用いた（図 1）。

供試豚は、畜試で飼養している B4 雌豚 6 頭を用いた。

凍結精液ストロー（総精子数：50 億精子）を液体窒素タンクから取り出し、10 秒間空气中に保持した後、38°C のウォーターバス中に 50 秒間浸漬して融解した。次に、モデナ液 45ml と融解精液 5ml（精液ストロー 10 本）を混合して 38°C で 30 分間加温した後、人工授精を行った。人工授精は、通常使用されるスパイラルカテーテルを用い、1 発情あたり許容確認 1 日後に 1 回のみ行った。不受胎（発情復帰）であった雌豚については、次回発情時に再度同様に人工授精を行った。

本試験結果について、1 回あたりの注入精子数：50 億精子、許容確認後 1 日後に 1 回、その半日後に 1 回の計 2 回を 1 セットとした 1 発情あたり 2 回の人工授精を行うという条件で、過去に畜試で生駒ら⁵⁾が実施した受胎試験結果と比較した。

なお、受胎率（受胎した実母豚数/種付けした実母豚数）には Fisher の正確確率法、生存産子数の差については Burunner-Munzel 検定を実施した。検定には R (ver. 4.0.3) を用い、 $P < 0.05$ で有意とした。

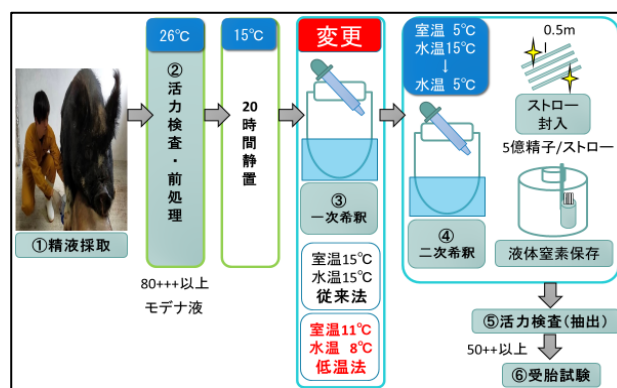


図 1 低温法による凍結精液の作製および人工授精

結果および考察

1 第4系統豚の遺伝資源の凍結保存

B4 種雄豚 5 頭から精液採取を 43 回実施し、2,182 本の凍結精液を保存した（表 4）。

表 4 精液の採取回数および保存本数

個体	採取回数 (回)	保存本数 (本)	合計 (本)	目標数 (本)	達成率 (%)
A	19	666			
B	8	613			
C	10	564	2,182	2,000	109
D	4	212			
E	2	127			

B4 雌豚 10 頭から 52 個の胚を回収し、そのうち 23 個を保存した（表 5）。

表 5 胚の回収および保存個数

個体	回収個数 (個)	保存個数 (個)	合計 (個)	目標数 (個)	達成率 (%)
A	6	6			
B	9	7			
C	2	0			
D	0	0			
E	0	0	23	100	23
F	2	1			
G	2	0			
H	13	0			
I	4	1			
J	14	8			

2 凍結精液作製時の一次希釈液への感作温度の検討

凍結精液作製は、B4 種雄豚 3 頭から従来法と低温法で各 5 回実施した。凍結法ごとの精子生存指数を表 6 に示した。

凍結法ごとの精子生存指数に有意差は認められなかった ($P=0.063$)。しかし、効果量 ($|r|=0.589$) は大きく、

低温法は、従来法よりも凍結・融解後の精子活力を向上させられる可能性が高いと考えられた。

豚精子は低温感受性が高く、低温にさらされると運動性が損なわれる⁵⁾ことが知られており、本研究で凍結前の一次希釈液への感作温度を低下させたことにより、活発な時期における精子の運動性および代謝を抑制できたことで、凍結・融解後の活力向上がみられた可能性が考えられる。今後、サンプル数を増やし検証する必要があると考えられる。

表6 一次希釈液感作温度における精子生存指数

	種雄豚	A	B	B	C	C
従来法	採精時	95.0	95.0	95.0	95.0	95.0
	融解後	37.5	37.5	45.0	30.0	37.5
低温法	採精時	90.0	95.0	95.0	95.0	95.0
	融解後	45.0	52.5	52.5	37.5	48.8

(P=0.063, |r|=0.589)

3 低温法で作製した凍結精液を用いた受胎試験

本研究の低温法で作製した凍結精液を用い、1発情あたり1回の人工授精を行った受胎試験の結果を表7に示した。本研究の受胎試験の結果は、雌豚6頭に対し延べ10回の人工授精を実施して、5頭受胎、平均生存産子数7.0頭となった(表7)。

生駒ら¹⁾が従来法で作製した凍結精液を用い、1発情あたり2回の人工授精を行った受胎試験では、雌豚5頭に対し延べ10回の人工授精を実施して、2頭受胎、平均生存産子数5.5頭であった。

本研究の受胎試験の結果と生駒ら¹⁾の結果には、受胎率、生存産子数ともに有意差は認められず(P=0.242, P=0.740)、同等の結果であった。

低温法で作製した凍結精液を人工授精した本研究での受胎率、生存産子数ともに従来法と比べ有意な結果は得られなかったが、その要因として、授精適期の判定や種付けの季節など、精液凍結法以外の授精条件やサンプル数の少なさが挙げられた。本研究では、スパイラルカテーテルによる子宮体注入での1回授精としたが、多忙な生産現場においては、2回授精より術者や豚への負担や侵襲性が小さいものと考えられる。今後、精液凍結法以外の各種条件を揃えた上でサンプル数を増やした検討を行う必要があると考えられる。

表7 凍結精液(低温法)を用いた受胎試験

個体	受胎状況(AI)		総産子数(頭)	生存産子数(頭)
	発情1回目	発情2回目		
A	×	○	4	0
B	○		6	5
C	×	○	13	12
D	○		12	11
E	×	○	7	7
F	×	×	—	—
平均			8.4	7.0

※○:受胎, ×:不受胎

まとめ

本研究で凍結保存した第4系統豚の精液および胚の遺伝資源は、「かごしま黒豚」の新たな系統豚を造成する際や、飼養している系統豚の近交係数の上昇抑制にも活用できる。

本研究では、凍結精液作製の新技術の確立には至らなかったが、技術開発が進み、将来的に生産現場において凍結精液を用いた人工授精が普及すれば、自然交配や精液採取に必要な種雄豚の導入や飼育に必要なコストを削減できると考えられる。

以上のことを踏まえると、遺伝資源保存の意義は大きく、それらは効率よく利用できることが必要不可欠であることから、今後も凍結精液や凍結胚の受胎率向上の技術開発を継続して進めることが極めて重要であると考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、御協力を頂いた一般社団法人鹿児島県種豚改良協会の職員の皆様方に心から謝意を示します。

引用文献

- 1) 生駒エレナ, 今村修二, 大平徳雄, 丸野弘幸, 稲田年久, 宮菌勉, 2012, 凍結精液を利用したバークシャー種の人工授精, 鹿児島農総セ研報(畜産)第5号, 17-19
- 2) マイクロボリュームエアクーリング(MVAC)法によるブタ胚(体内生産胚)のガラス化保存方法, 家畜改良センター
- 3) 柏崎直巴 1996. 豚の胚移植マニュアル, 農林水産省家畜改良センター豚新技術開発研究会編, 54
- 4) Mito, T, K. Yoshioka, S.Yamashita, C.Suzuki, M.Noguchi and H.Hoshi 2012. Glucose and glycine synergistically enhance the *in vitro* development of porcine blastocysts in a chemically defined medium, *Reprod.*

Fertil. Dev., 24, 443–450

5) 日本家畜人工授精会編 2016. 家畜人工授精講習会
テキスト (家畜人工授精編), 日本家畜授精師協会,
346

6) 邨上正幸, 足立広幸. 2013. 豚凍結精液の生産技術の
改善試験, 鳥取畜試研報 57:1-3

Research on Genetic Resource Conservation and Frozen Semen of "Kurosatsuma 2015"

Kenshi Kawahara, Yukitoshi Goto, Masashi Nakashioya and Yukiya Gohara

Summary

We have created four strains of Berkshire pigs, "Satsuma", "New Satsuma", "Satsuma 2001", and "Kurosatsuma 2015", and has produced semen and embryos of three strains of pigs so far. It is preserved as genetic resource.

In this study, the semen and embryos of "Kurosatsuma 2015" were preserved. In addition, since frozen pork semen has poorer results such as conception rate in artificial insemination than liquid semen, we investigated a method for producing frozen semen with the aim of improving sperm vitality after thawing, conception rate, and number of offspring.

- (1) Regarding the sensitization temperature of the primary diluent, lowering the room temperature and water temperature suggested the possibility of improving sperm vitality during thawing.
- (2) As a result of artificial insemination using the frozen semen prepared by the examined method, the results were equivalent to those of the result using the frozen semen prepared by the conventional method.

Keywords: frozen semen, genetic resources, Kagoshima Berkshire, low temperature method, strain pig