

[成果情報名] 単為発生胚を利用したブタ胚の発生補助技術

[要 約] 受胚ブタに移植された単為発生胚は、25～30 日齢まで発生し、死亡した後も遺残物として子宮内にとどまり、受胚ブタを偽妊娠状態にする。単為発生胚と同時移植した 1 個の受精胚は、高い確率で産子にまで発生できる。

[キーワード] ブタ、胚、単為発生胚、妊娠維持、偽妊娠、発生補助

[担 当] 静岡畜技研・中小研セ・医療用実験豚プロジェクトスタッフ

[連絡先] 電話 0537-35-2291、電子メール chusyou-butatori@pref.shizuoka.lg.jp

[区 分] 畜産・草地

[分 類] 研究・参考

[背景・ねらい]

ブタは妊娠初期の子宮内に数個の胚が存在しないと妊娠を継続できない。そのため、妊娠初期になんらかの理由で少数になってしまった胚は正常な胚であっても生存できなくなる。一方、単為発生胚はクローン胚作製のためのレシピエント卵子作製と同じ手順で作製することができ、体外培養での発生率も高い。

本研究では、単為発生胚の同時移植が正常な少数ブタ胚の発生を補助できるかどうかについて検討する。

[成果の内容・特徴]

- 1 単為発生胚は、未成熟ブタの卵巢より採取した未成熟卵母細胞を体外で成熟培養し、電気刺激により活性化した後、110 時間培養して作製する。受精胚は、未成熟ブタに eCG および hCG 処理し、hCG 投与 30 および 36 時間後に人工授精し、hCG 投与 134 時間後に開腹手術により回収する。これらの胚を発情同期化した受胚ブタに移植する。
- 2 単独で移植した単為発生胚の 39.3%は、胎齢 25～30 日まではおもに胎子として、それ以降は、胎子遺残物として子宮内に存在する（表 1）。
- 3 単為発生胚を移植した受胚ブタの殆どは、発情発現が抑制される。この際、子宮は粘膜炎が著しい水腫状態になるが、黄体組織および黄体ホルモンの動態は妊娠ブタのものと変わらず、偽妊娠状態となる。
- 4 受精胚 1 個のみを移植した 9 頭の受胚ブタのうち、7 頭は 30 日以内に発情を回帰する一方で、1 個の受精胚と単為発生胚 18～24 個（平均 21.6 ± 0.9 個）を同時移植した 9 頭の受胚ブタのうち 7 頭（77.8%）は、正常な受精胚由来の産子をそれぞれ 1 頭分娩することができる（表 2）。
- 5 単為発生胚の同時移植は、少数ブタ胚の発生を補助することが判明し、1 個の受精胚でも高い確率で産子にまで発生することができる。

[成果の活用面・留意点]

- 1 凍結受精胚、クローン胚、遺伝子組換え胚などの発生率の低いブタ胚の発生を補助する手段として応用できる。
- 2 単為発生胚が死滅した 50 日齢で妊娠診断を行い、ねらいとする胚が生存しているかどうかを確認する。
- 3 不受胎にもかかわらず黄体が存続して偽妊娠状態になった雌ブタは、PGF2 α を投与すると、4～5 日後に発情を発現する。

[具体的データ]

表 1 単為発生胚の発生と受胚ブタの黄体保有状況

移植胚		剖検時の胎子数					発生率 (%)	胎子長(cm)	胎子重量(g)	黄体保 有受胚 ブタ頭 数
日齢 ^a	数	受胚ブ タ頭数	生存	死滅	退行	合計		平均±S.E.	平均±S.E.	
25	64	3	24	9	0	33	51.6	1.2±0.02	877±72	3
30	64	3	9	6	6	21	32.8	2.0±0.04	1028±43	3
40	63	3	0	9	13	22	34.9	-	1172±208	3
50	66	3	0	0	25	25	37.9	-	732±28	3
Total	257	12	33	24	44	101	39.3			12

a: 活性化後の日数

表 2 単為発生胚と受精胚の同時移植

移植胚		再発情発現 頭数(%)	発情回帰までの日数						産子への 発生頭数 (%)	
受精胚	単為 発生胚		移植 頭数	-30日	31- 40日	41- 50日	51日-	無発情		平均 日数
-	-	9(100)	9	0	0	0	0	23.7	0(0)	
-	+ ^b	5(50.0)	10	0	0	3	2	5	62.2	0(0)
+ ^a	-	7(77.8)	9	7	0	0	0	2 ^d	24.9	0(0)
+ ^a	+ ^c	1(11.1)	9	1	0	0	0	1 ^e	33	7(77.8)

a; レシピエントブタ 1 頭あたり 1 個の受精胚を移植

b; レシピエントブタ 1 頭あたり平均 20.9±0.5 個の単為発生胚を移植

c; レシピエントブタ 1 頭あたり平均 21.6±0.9 個の単為発生胚を移植

d; 50 日目に検査したところ、1 頭は卵巣静止、1 頭は正常な生存胎子 1 頭を確認

e; 114 日目に PGF_{2α} を投与したところ、褐色の汚物を排出し、5 日後に発情を発現

[その他]

研究課題名: 体細胞クローン技術による優良種豚の有効活用

予算区分: 県単

研究期間: 2008~2012 年度

研究担当者: 河原崎達雄、塩谷聡子、大津雪子

発表論文等: Kawarasaki T. et al. (2009) Anim. Reprod. Sci. 112(1-2): 8-21

[成果情報名] DNA 多型を利用した三元交雑豚の銘柄鑑別技術

[要 約] フジヨークに特異的な mtDNA を持った F 1 母豚および、金華豚由来の毛色関係遺伝子 (MC1R 遺伝子) をもった止め雄豚から生産された三元交雑豚は銘柄鑑別が可能となる。

[キーワード] 三元交雑豚、ミトコンドリア DNA、MC1R 遺伝子、PCR-RFLP 法

[担 当] 静岡畜技研・中小研セ・養豚・養鶏科

[連絡先] 電話 0537-35-2291、電子メール chusho-butatori@pref.shizuoka.lg.jp

[区 分] 畜産・草地

[分 類] 研究・参考

[背景・ねらい]

静岡型銘柄豚は、フジヨークの雌にランドレースの雄を交配した WL の F1 雌に、フジロックの雄を交配した三元交雑豚を銘柄として認定している。静岡型銘柄豚であることを証明するため、フジヨークに特異的なミトコンドリア DNA (mtDNA) 塩基配列を検索し、選抜育種と同時にすべての個体の mtDNA が特徴的なハプロタイプになるように斉一化をしている。一方、金華豚とデュロック種の交雑家系において、マーカーアシスト導入法によって金華豚由来の毛色関係遺伝子 (MC1R 遺伝子) をもった止め雄豚を作出した。

これらのブタを活用した三元交雑豚を作成し、母系は mtDNA、止め雄は MC1R 遺伝子を検索することによる銘柄鑑別の可否とその産肉性を検証する。

[成果の内容・特徴]

- 1 フジヨークに特徴的な配列の mtDNA をもつ大ヨークシャー種の雌にランドレースの精液を人工授精して得られた産子を種雌豚として試験に供する。一方、金華豚とデュロック種の F1 に、デュロック種を戻し親とする 3 回の戻し交配を行なうと同時に、PCR-RFLP 法により金華豚の MC1R 遺伝子をデュロック種に導入する。この遺伝子を導入した戻し交配第 3 世代豚同士を交配し、MC1R 遺伝子について金華豚型のホモの個体を作出し、止め雄として試験に供する。
- 2 上記の種豚から生産された交雑豚 (試験交雑豚) の発育およびと体形質を通常の三元交雑豚である WLD と比較した結果、出荷日齢、1 日当たり増体量およびと体形質に有意な差は認められなかった (表 1)。
- 3 試験交雑豚 2 腹 20 頭および市販の豚肉 5 銘柄 45 検体を供試し、表 2 に示すプライマーおよび制限酵素により PCR-RFLP 法を行うと、mtDNA、MC1R 遺伝子ともに試験交雑豚と同様のパターンを示す検体は観察されず (表 3)、銘柄レベルでの鑑別が可能となる。

[成果の活用面・留意点]

- 1 フジヨークに特異的な mtDNA を持った F 1 母豚および金華豚由来の毛色関係遺伝子 (MC1R 遺伝子) をもった止め雄豚を使うことにより三元交雑豚の銘柄鑑別が可能となる。
- 2 DNA マーカーアシスト導入法により実用規模の種豚群を作製するには多大な労力と費用が必要となる。

[具体的データ]

表 1 試験交雑豚とWLDの発育およびと体形質

項目	試験交雑豚	WLD
出荷日齢(日)	162.7±12.5	163.5±8.2
1日当たり増体量(g)	676.8±44.9	706.3±39.8
平均背脂肪厚(cm)	3.4±0.3	3.6±0.2
と体長(cm)	89.4±2.6	90.3±3.0
ロース断面積(cm ²)	19.3±2.3	21.4±1.8

表 2 使用プライマーおよび制限酵素

識別部位	名前	プライマー配列	制限酵素	反応温度
mtDNA	Shzuoka F1	5'-att gat cgt aca tag cac ata tca tgt ca-3'	H p h I	37°C
非コード領域	Shzuoka R2	5'-caa gcg ggt tgc tgg ttt cac-3'		
SSC6	F (261)	5'-gtg agc aac gtg ctg gag acg-3'	A c i I	37°C
MC1R	R (282)	5'-cct ggg cgg cca ggg cg-3'		

表 3 PCR-RFLP 法検査結果

区分	品種	サンプル数	m t DNA		MC1R		
			+	-	+	+/-	-
試験交配豚	-	20	0	20	0	20	0
県内 A 銘柄	LWD	13	13	0	0	0	13
県内 B 銘柄	LWD	8	8	0	0	0	8
県内無銘柄	不明	15	15	0	0	0	15
県外 C 銘柄	不明	7	7	0	0	0	7
県外 D 銘柄	B*	2	2	0	0	0	2

+、-は切断の有無。+/-はヘテロ型

*：バークシャー種

[その他]

研究課題名：新静岡型銘柄豚トレーサビリティの確立

予算区分：県単

研究期間：2003～2007年度

研究担当者：柴田昌利、知久幹夫、堀内篤

発表論文等：柴田（2010）静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター研究報告第3号、17-20.

[成果情報名] 産卵後期のフィッシュカルシウム(FCa)給与による卵殻質の改善

[要 約] カツオ中骨から精製されるフィッシュカルシウム (FCa) を産卵後期において飼料中に添加することで、産卵成績に影響なく卵殻強度を改善できる。

[キーワード] 産卵鶏、フィッシュカルシウム、卵殻質

[担 当] 静岡畜技研・中小研セ・養豚・養鶏科

[連絡先] 電話 0537-35-2291、電子メール chusho-butatori@pref.shizuokalg.jp

[区 分] 畜産・草地

[分 類] 技術・参考

[背景・ねらい]

産卵後期における卵殻質改善の有効な手段として、絶食による強制換羽が広く行われている。しかし、絶食処理はアニマルウェルフェアに配慮した飼育法が検討される中で、その趣旨になじまないという指摘もある。我々はこれまでの事前検討において、ラットにおいてカルシウム吸収率を増加するフィッシュカルシウム(FCa)の飼料添加が、基礎飼料およびカキガラ添加に比べ卵殻質を改善する効果があるという結果を得ている。

そこで、産卵後期の卵殻質改善のため、絶食による強制換羽処理、低栄養飼料給与により換羽を誘導する方法、および FCa を鶏の飼料中に添加するそれぞれの方法について、産卵と卵殻質に及ぼす影響を無処理の対照区と比較検討する。

[成果の内容・特徴]

- 1 市販の白色レグ系コマーシャル産卵鶏の産卵後期に、(1) 2週間絶食した後に成鶏用飼料を自由摂取させる区(絶食区)、(2) 育成用後期飼料を1日1羽当たり50gで3週間給与した後に成鶏用飼料を自由摂取させる区(低栄養区)、(3) FCa をカルシウム量として0.3%飼料中に添加して自由摂取させる区(FCa区)、及び無処理の対照区に分け、単飼ケージにて538日齢から705日齢までの168日間、産卵と卵質に及ぼす影響について調査する(表1)。
- 2 FCa はカツオの中骨から精製される乾燥粉末で、主な成分は灰分、タンパク質、カルシウムである(表2)。
- 3 産卵成績は、絶食区では飼料摂取量が有意に少ないが、飼料要求率は対照区より劣る。低栄養区では産卵率、飼料要求率で対照区より劣るが、FCa区はすべての項目で対照区と差が見られない(表3)。
- 4 卵殻強度と卵殻厚ともに絶食区、FCa区、低栄養区が対照区より優れ、FCa区の卵殻強度は絶食区に次いで優れる。ハウユニットは絶食区、低栄養区が他の区より優れる。(表4)。

[成果の活用面・留意点]

- 1 供試した FCa はヒト用のサプリメントで、単価が 1,000 円/Kg であるため、一羽当たり粗収益は FCa 区が他の区より少ない。
- 2 FCa 区の産卵率が高かったためにハウユニットが低下したのではないかとと思われる。

[具体的データ]

表1 試験区分

区 分	処理及び給与飼料	供試羽数
対照区	なし(成鶏用飼料を自由摂取)	12羽3反復
絶食区	2週間絶食後、成鶏用飼料を自由摂取	〃
低栄養区	育成用後期飼料50g/日3週間給与後、成鶏用飼料を自由	〃
FCa区	FCaを成鶏用飼料に0.3%添加し、自由摂取	〃

表2 FCaの成分分析

項目	単位
エネルギー	129 Kcal
水分	0.3 g
タンパク質	27.6 g
脂質	0.3 g
炭水化物	3.9 g
灰分	67.9 g
カルシウム	25.9 g
リン	12 g
ナトリウム	670 mg
マグネシウム	390 mg
亜鉛	17.2 mg

(100g中)

エネルギーは総エネルギー

表3 産卵成績

区 分	産卵率 (%)	平均卵重 (g)	産卵日量 (g)	飼料消費量 (g)	飼料要求率	生存率 (%)
対照区	78.6ab	65.7ab	51.7	97.8a	1.89 a	100
絶食区	74.6ab	65.6 b	48.9	93.8b	1.92 b	95.4
低栄養区	73.1 b	67.2 a	49.4	97.7a	1.98 b	100
FCa区	78.9 a	65.8ab	51.9	99.8a	1.93ab	95.4

異符号間に5%水準で有意差あり

1羽当たり粗収益は卵価：200円/kg、飼料費：60円/kg、FCa：1,000円/kgとして試算

表4 卵殻質成績(全期間)

区 分	卵殻強度 (kg/cm ²)	卵殻厚 (0.01mm)	ハウユニット	卵黄色
対照区	2.87.b	34.7b	77.6bc	11.6b
絶食区	3.35a	36.0a	82.5a	11.6b
低栄養区	3.12a	36.1a	80.6a	11.9a
FCa区	3.15a	35.7a	76.4c	11.4b

[その他]

研究課題名：鶏の生理特性に応じた産卵調整技術

予 算 区 分：県単

研 究 期 間：2007～2009 年度

研究担当者：池谷守司、松井繁幸、望月一男（静岡県工業技術研究所）

発表論文等：池谷（2010）静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター研究報告第3号.