

ブタの子宮角深部注入(DIUI)法による人工授精と従来法の比較

中根崇・山口倫子・牛島仁・高橋圭二・江森格*1

A Comparison of Deep Intrauterine Insemination Uterine Horn and Original System of Artificial Insemination in Sow

Takashi NAKANE, Tsuneko YAMAGUCHI, Hitoshi USHIJIMA, Keiji TAKAHASHI and Tadasu EMORI *1

要 約

近年、ブタ人工授精の効率化を目的として、子宮角内に精子を注入する手法(Non-surgical Deep Intrauterine Insemination Uterine Horn (DIUI))が開発されている。Martinezらは、DIUI用フレキシブルカテーテル(FFX)を考案し、少精子数の注入でも従来の子宮頸管内注入法(Conventional Artificial Insemination (AI))と同等な繁殖成績を示したことを報告した。そこで、FFXの野外での活用を前提とし、有用性を確認するために、DIUIによる受精成績、作業性および繁殖成績について、当研究センターで通常実施しているAIを対照として比較、検討した。DIUIは、FFXを用い頸管の先30~90cmの子宮角内に希釈精液10ml(精子数10億)を注入した。受精成績は正常な発情周期を認める成熟雌豚32頭を用い、eCGとhCG投与で発情を誘起後、DIUIをhCG投与後に雄許容確認した経産豚14頭に24時間間隔で2回、未経産豚8頭はhCG投与後36時間後に片側の子宮角内に1回実施した。AIは同様な方法で発情を誘起した経産豚10頭に24時間間隔で2回、従来カテーテルの先端を子宮頸管部に固定し、精液が逆流しないようにゆっくりと希釈精液100ml(精子数100億)を注入した。試験豚は授精後4日目にと殺し採胚した。その結果AI経産豚、DIUI経産豚、DIUI未経産豚の受精率と正常胚率は、それぞれ、98.7%と83.5%、97.5%と84.0%、90.7%と80.2%で有意差は認められなかった。作業性は、FFX挿入時の一連の作業時間を測定し、挿入の難易性を調べた。平均作業時間は、4分程で、全豚にFFXの挿入が可能で、出血等の異常は認められなかった。繁殖成績は、雄許容確認後、DIUIを10頭に24時間間隔で2回、AIを6頭に同様に実施し、分娩まで飼養し、受胎率、産子数、死産子数、生時体重を調べた。その結果DIUIとAIに有意差は認められなかった。今回の成績は、Martinezらの報告と一致し、DIUIの有用性を実証した。また、FFXの作業性には特に問題なく、従来のAI技術と同様に使用が可能と思われた。

緒 言

最近、ブタ人工授精における精液利用の効率化を目的として、子宮角内に少量の精子を注入する手法(Non-surgical Deep Intrauterine Insemination Uterine Horn (DIUI))が検討されている¹⁾。スペインのMartinezらは、独自に開発したDIUI用フレキシブルカテーテルを用いDIUIを行った結果、従来のカテーテルによる子宮頸管内注入法(Conventional Artificial Insemination (AI))と比較して、少精子数の注入でも受胎率および産子数に差が認められないことを報告した²⁾

*3)。我々はDIUIの有用性を確認するために、DIUIによる受精成績、作業性および繁殖成績について調査し、対照として、当研究センターで通常実施しているAIと比較、検討した(図1)。

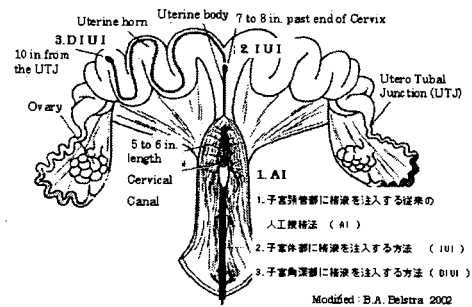


図1 3種類の異なる人工授精法と精液注入部位

*1 現千葉県環境生活部自然保護課
平成16年8月31日受付

材料と方法

1. DIUIおよびAI方法

DIUI方法は、スペインのMagapor社製のDIUI用ファイヤーフレックス (FFX) を用いて実施した (図2)。FFXは、全長が150cm、外径が4mm、内径が1.5mm、最大湾曲角度が160度で、カテーテル自体がかなりの柔軟性があり、子宮角に挿入しても、子宮壁を傷つける危険性が低い構造である。

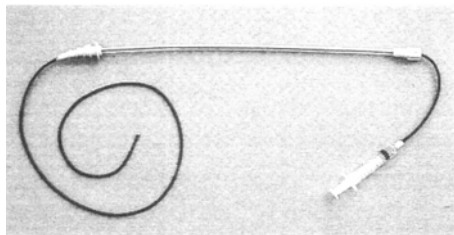


図2. DIUI用フレキシブルカテーテル

使用法は、まず、先端部の精液放出口を拡張するため切断し加工したAI用プラスチック製スパイラル状カテーテル (従来型カテーテル) を外筒として豚の外陰部より挿入して、子宮頸管部に固定し、次に、従来カテーテルの精液注入口からFFXを挿入し、頸管の先30~90cmの子宮角内まで挿入後、その基部に注射器を装着して希釈精液10ml (精子数10億) を速やかに注入した (図3)。



図3. DIUI用カテーテルによる精液の注入作業

AI方法は、従来型カテーテルの先端を子宮頸管部に固定し、精液が逆流しないようにゆっくりと希釈精液100ml (精子数100億) を注入し、2分間カテーテルを子宮頸管内に留置した。

2. 注入用希釈精液

精液は、大ヨークシャー種 (W) とランドレース種 (L) より採取し、モデナ液で1ml当たり1億個の精子を含むように希釈し用いた。

3. 受精試験

試験豚は、正常な発情周期を認め、後述のホルモン処置に反応し採胚が可能であったL経産豚13~14ヵ月齢 (産歴1産) 24頭とW未経産豚8ヵ月齢8頭を用いた。ホルモン処置は、自然発情時にAIを実施し、妊娠させた後25~38日目にクロプロステノール (プラネート、住友化学工業社製) 0.175mgを24時間間隔2回投与し、流産を誘起した。

2回目のクロプロステノール投与時に注射用妊馬血清性腺刺激ホルモン; eCG (ピーメックス、三共社製) 1,000iuを、その72時間後に注射用ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン; hCG (プローベン、三共社製) 500iuをそれぞれ頸部筋肉内に投与し、発情を誘起した。DIUI区はhCG投与後に雄許容確認した経産豚14頭に24時間間隔で2回、未経産豚8頭にhCG投与後36時間後に片側の子宮角内に1回DIUIを実施した。AI区はhCG投与後に雄許容を確認した経産豚10頭に24時間間隔で2回AIを実施した。試験豚は両区とも精液注入後4日目にと殺し、採胚した。なお、胚の判定は、受精卵の細胞が分裂し受精が確認された胚を受精胚とし、4細胞期より発生段階が進んでいる胚で且つ50%以上変性細胞が認められない胚を正常胚とした。

4. 作業性調査

試験豚は、L経産豚45頭を用い、DIUI区は35頭、AI区は10頭を用いた。それぞれ、カテーテルを腔内に挿入してから一連の作業が終了し、抜き取るまでの時間を測定すると共に挿入の難易性を調査した。

5. 繁殖試験

試験豚は、L経産豚13~14ヵ月齢16頭を用い、雄許容確認後、DIUI区は10頭にAI区は6頭に24時間間隔で2回それぞれDIUIおよびAIを実施し、分娩まで飼養した。それぞれ、受胎数、産子数、死産子数、生時体重を調査した。

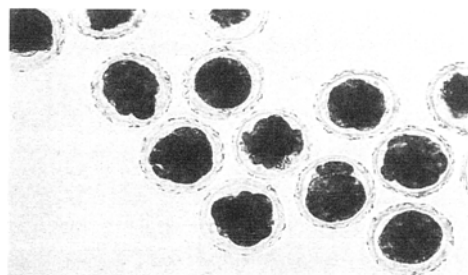
結 果

1. 受精試験成績

受精試験で得られた成績を表1に、採取した胚を図4に示した。回収胚の総数は510個で回収された受精胚の総数は487個で正常胚は424個であった。DIUI区の未経産豚および経産豚とAI区の経産豚との受精率 (受精胚/回収胚数) は、それぞれ90%以上で、正常胚率 (正常胚数/回収胚数) は、それぞれ80%以上と良好な成績を示し、各区に有意差は認められなかった。なお、DIUI区の未経産豚は、

表1 受精試験成績

区 分	頭 数	受精率 (受精胚/回収胚数)	正常胚回収率 (正常胚/回収胚数)
DIUI区			
未経産	8	90.7% (166/183)	80.2% (150/183)
経産豚	14	97.5% (159/163)	84.0% (137/163)
AI区			
経産豚	10	98.7% (162/164)	83.5% (137/164)



(図4. 受精試験で得られた胚)

過排卵用ホルモン処置に良好に反応し、多数の胚が採取された。

2. 作業性調査成績

平均作業時間は、DIUI区で4分9秒±1分33秒、AI区で3分52秒±0分33秒であった。また、試験した全ての豚にFFXの挿入が可能で、出血等の異常は認められなかった。

3. 繁殖試験成績

繁殖成績は、DIUI区およびAI区の分娩頭数、平均産子頭数、平均死産子数及び平均生時体重は、それぞれ、9頭、9.7頭、0.6頭、1.7 kgと6頭、9.8頭、0.6頭、1.5 kgであった(表2)。

全ての項目において、両区に有意差は認められなかった。

なお、DIUI区で不受胎母豚1頭については、その後発情が認められたので、再びDIUIを実施したが再発したため、改めて従来型カテーテルを用いてAIを実施したが再度再発し、最終的には繁殖障害と判断して廃用とした。

考 察

今回、採卵成績からは、DIUI区はAI区と受精率、正常胚率に有意差は認められなかった。また、DIUI区の未経産豚は、片側子宮角に1回のみ少精子数注入でも同等の受精率を認めた。更に今回の試験と別に受精試験と同様に処理したW未経産豚2頭にDIUIを1回実施し、30日後にと殺し、受胎状況を観察し、それぞれ、16個および14個の黄体と16個および10個の胎子を認め、黄体数に見合う胎子が観察された(図5)。このことは、DIUIにおけるFFXは片側

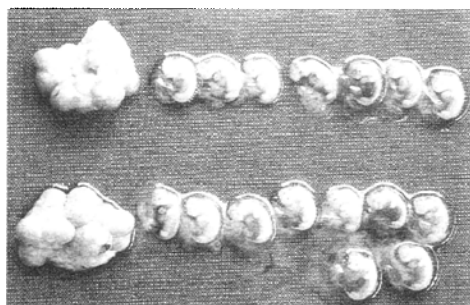


図5 DIUI 30日後に採取した卵巣と胎子

の子宮角にしか挿入されていないにもかかわらず、高い受精率を獲得しており、注入後の精子の動きが注目された。通常の射出された精子は精子自身の運動性と子宮角や卵管などの収縮運動により卵管上部に輸送されるとされている⁴⁾。しかし、DIUI後の両側子宮角に受精卵が認められることから、精子が子宮角分岐部および子宮体方向へ逆向きに動き、再び片側子宮角から卵管上部に移動している可能性が示唆

された。一方、Martinezらは、片側の子宮角を外科的に閉鎖し、FFXを開放側の子宮角のみ挿入しDIUIを実施した場合でも両側の卵が受精していることから、精子が腹腔内移動を行う可能性を推察している³⁾。今回の成績は、Martinezらの試験法と異なるが、精子の運動性および輸送性が従来の知見と異なり、再検討する必要があると思われる。

FFXの作業性には特に問題は認められず、子宮を傷つけることなく従来型カテーテルと同様にFFXの使用が可能と考えられた。また、DIUIを実施した豚の繁殖成績は通常行われているAIと同等であることが確認された。Martinezらは、5mlの稀釈液と共に1千万、2.5千万、5千万および1億5千万の精子をDIUIで片側子宮角のみに注入したところ、5千万の精子を注入しても、従来のAIと受胎率および産子数に差は認められず、1千万および2.5千万に減じた場合に低下したと報告している(表3)²⁾。

今回試験は、野外応用を想定し精子数10億で実施したが、Martinezらの報告と一致し、DIUIは、新たな有用繁殖技術と考えられる。今回の成績から、1回分のAI注入量として、総精子数が約50~100億である80~100mlの流通精液を活用してDIUIで10ml使用する場合、精液の利用効率は、8~10倍に向上することが期待される。

一方、英国のWatsonらは、フランス製のDeep Golden Pigと呼ばれるカテーテルを用い子宮頸管から18~20cm先の子宮体部に精液を注入するIntra-uterine body insemination(IUI)の産業レベルで実施試験を行い、精子数20億で受精率に支障の無いことを報告した(表4)⁵⁾。また、伊東らもWatsonらの報告に準じたIUIを実施し、12億の精子数で良好な受胎性と産子数を認めることを報告している⁶⁾。

これら一連の研究は従来の授精手法に比較して、精子数を減じてでも受精成績が低下しないことを示し、精液の利用効率を高率に向上する可能性があり、今後、更にDIUIの活用方法を研究する必要があると考えられる。

最後にDIUIは、少精子数での利用が可能なることから輸入精液や優良個体の精液を効率的に利用することが可能となり、また、運動性の劣る凍結融解した精子も直接子宮角内に注入されるため移動距離が少なく授精適期時間が拡大するなど急速な豚の育種改良や生産効率の向上が期待される。

謝 辞

試験に用いた豚胚の採材に協力していただいた(株)千葉県食肉公社、光町営東陽食肉センター、東総食肉衛生検査所並びに試験豚の管理をお願いした当研究センター養豚施設の諸氏に深謝する。

表2 繁殖試験成績

区分	交配母豚頭数	受胎母豚頭数	分娩母豚頭数	平均総産子数*	平均死亡産子数*	平均生時体重*
DIUI区	10	9	9	9.7±3.5頭	0.6±0.9頭	1.7±0.2 Kg
AI区	6	6	6	9.8±3.4頭	0.6±0.9頭	1.5±0.3 Kg

*: 平均±標準偏差

表3 AI catheter vs. a long flexible catheter inserted through a modified AI cathete

Site of Semen Depos.	Sperm /se, x 10 ⁹	Vol. /Dose, mL	Doses /Sow	Sows	CR*	FR**, %	TB***	BA****
AI	3.0	100	2	147	86.4	83.0	10.0	9.4
DIUI	0.15	5	1	117	86.3	82.9	19.7	9.3
DIUI	0.05	5	1	126	77.8	76.2	19.4	8.9
DIUI	0.025	5	1	160	51.7	46.7	19.3	8.8
DIUI	0.010	5	1	169	39.1	39.1	19.4	9.0

Modified : Reproduction ; Martinez, et al. 2002

DIUI sows were injected i.m. with 1250 iu of eCG 24 h postweaning and 750 iu hCG 96 h postweaning and were inseminated once in one uterine horn if they expressed estrus with 24 h of the hCG injection. Non-hormone treated sows with a weaning-to-estrus interval of 4 days selected for standard AI were inseminated at 0 and 24 h post estrus onset.

*CR, conception rate; ** FR, farrowing rate; ***TB, pigs total born; **** BA, pigs born alive.

表4 AI catheter vs. a slightly longer flexible catheter inserted through a modified AI catheter

Site of Semen Depos.	Sperm /Dose, x 10 ⁹	Vol. /Dose, mL	Doses /Sow	Sows	CR, %	FR, %	TB	BA
AI	3.0	80	2	540	91.3	91.1	12.5	10.9
IUI	3.0	80	2	540	91.8	90.5	12.3	11.0
AI	2.0	80	2	540	91.1	91.8	12.6	10.9
IUI	2.0	80	2	540	92.6	92.5	12.3	10.8
AI	1.0	80	2	540	66.2	65.8	10.3	9.0
IUI	1.0	80	2	540	88.7	86.9	12.1	10.9

Modified : ICPR ; Watson, et al. 2001

IUI and standard AI sows inseminated at 0 and 24 h post estrus onset. No hormone treatments used.

参 考 文 献

- 1) Belstra B.A Review : Intrauterine (transcervical) and fixed-time artificial insemination in swine. [Http://mark.asci.ncsu.edu/Swine Reports/2002/belstro3.htm](http://mark.asci.ncsu.edu/Swine%20Reports/2002/belstro3.htm)
- 2) Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I and Vazquez JL. Deep intraerine insemination in sows with a low number of spermatozoa : a new and simple procedure. Theriogenology 2001 55 : 248
- 3) Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL and Day BN. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non sedated sows. Reproduction 2002 123 : 163-170
- 4) 塩谷康生.受精及び受精卵の発育.家畜人工授精講習会テキスト.社団法人日本家畜人工授精師協会.平成10年7月 : 195-201
- 5) Watoson PF, Behan J, Decuadro-Hansen G and Cassou B. : Deep insemination of sows reduced sperm numbers does not compromise fertility. a commercialbased field trial. Sixth International Confernce on Pig Reproduction, University of Missouri Columbia. pp. 2001 : 135
- 6) 伊東正吾, 石崎芳彦, 岩村祥吉, 保科和夫:深部注入型カテーテルを用いた豚の人工授精による受胎性と産子状況. 第78回日本養豚学会講演要旨2002 15