

## 腹腔鏡による豚の胚移植について

誌名	静岡県中小家畜試験場研究報告 = Bulletin of Shizuoka Swine & Poultry Experiment Station
ISSN	09146520
著者	河原崎, 達雄 曾根, 勝
巻/号	2号
掲載ページ	p. 27-30
発行年月	1989年10月

# 腹腔鏡による豚の胚移植について

河原崎達雄・曾根 勝

**要 約:** 腹腔鏡による豚の胚移植方法を検討した。Donorには未成熟雌豚を用い、性腺刺激ホルモンにより過排卵処置し、交配後5日目に胚を回収した。Recipientには妊娠初期未経産雌豚を用い、PGF<sub>2</sub>  $\alpha$  Analogue および性腺刺激ホルモン処置し、hCG投与後6日目に桑実胚～初期胚盤胞を移植した。

Recipientは、Thiopentalによる前麻酔後、後軀を約30度持ち上げ横臥保定し、ハロセン、笑気および酸素の混合気相下で吸入麻酔した。腹腔鏡により観察しながら、操作鉗子で子宮角先端を把握し、移植針を把握部の近くに挿入、胚を少量の培養液とともに移植した。

6頭の移植を行った結果、最後の2頭が受胎し、胎子数(移植後25日)は、それぞれ5頭、13頭であった。また、全てのRecipientの卵巣および子宮に癒着等の異常は認められなかった。

(静岡中小試研報 27～30, 2, 1989)

## 結 言

豚の胚移植においては豚の体格が小さいことや生殖器構造が複雑なことから、多くの場合開腹手術によって胚の回収および移植が行われている<sup>1,2,3)</sup>。しかし、開腹手術では手術のために経費と時間が必要とされる。また、腹腔内におこる癒着のためにDonorやRecipientの反復活用が制限される<sup>4)</sup>。

牛においては一般的に、頸管経由による胚の回収および移植が行われている。しかし、豚では少数の報告<sup>5,6)</sup>があるものの成功率はきわめて低く、今のところ応用は不可能である。一方、人の体外受精のための卵胞卵子の採取<sup>7)</sup>や羊の胚移植<sup>8)</sup>においては腹腔鏡が用いられている。腹腔鏡の使用では開腹の手間が省けるため作業時間の短縮が期待される。また、子宮をはじめとした内臓器官が直接外気や術者に接触しないため、癒着の危険性が減少するものと推察される。本研究では腹腔鏡による豚胚の移植が可能であるか検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1) Donor および胚の回収

Donorには未成熟雌豚(約105kg)18頭を用いた。DonorはPMSG(1,500IU)およびhCG(500IU)を72時間間隔で筋肉内投与し、hCG投与24～30時間後に人工授精した。胚は人工授精後5日目に、Whittinghamの修正PBS<sup>9)</sup>により還流、回収した。回収後、倒立顕

微鏡下で胚の形態を観察し、桑実胚～胚盤胞を移植に用いた。

### 2) Recipient

Recipientには交配後21～38日までの妊娠未経産雌豚6頭を用いた。PGF<sub>2</sub>  $\alpha$  Analogue(Sodium Cloprostenol: 92  $\mu$ g/頭)を12時間間隔で2回腔前庭粘膜下に投与し、2回目投与12時間後にPMSG(1,000IU)、その72時間後にhCG(500IU)を、それぞれ筋肉内投与して発情を同期化させた。

### 3) 腹腔鏡および付属部品

使用装置は腹腔鏡本体1、腹腔鏡用トラカール1、操作鉗子2、操作鉗子用トラカール1、移植針1、光源装置1および気腹装置1で、人用装置(町田製作所KK)を表1に示すように改良して用いた(写真1)。

腹腔鏡は直径10mm、有効長22.5mm、操作鉗子は直径5mm、有効長450mmとした。操作鉗子把握部は先端部50mmとし、子宮等を把握した後固定できるようにした。移植針は外套および内針から成り、外套の直径は1.8mm、有効長は170mm、内針の直径は1.0mm、有効長は220mmとした。手術台はRecipientの後軀を高くすることができるように、昇降可能なものを試作した(写真2)。

### 4) 移植方法

Recipientは鼻保定状態で、耳静脈よりSodium Thiopental(10mg/kg)により前麻酔した。手術台上に後軀を約30度持ち上げ横臥保定し、手術中はハロセン、笑気

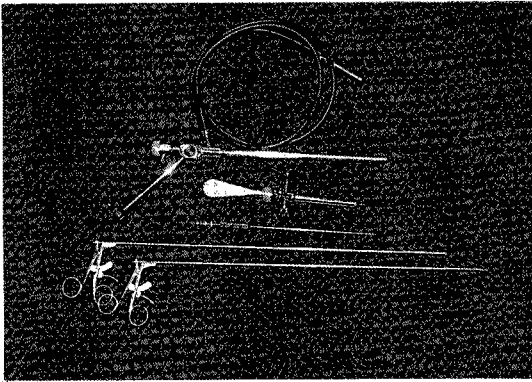


写真1. 腹腔鏡と付属部品

上から、腹腔鏡、腹腔鏡用のトラカール、移植針、移植針操作鉗子

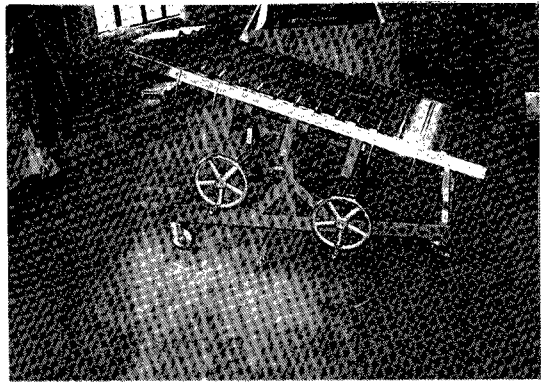


写真2. 手術台

卵巣や子宮を見やすくするため、昇降可能な手術台を試作した。ジャッキ方式により30度まで傾斜が可能で、比較的安価。

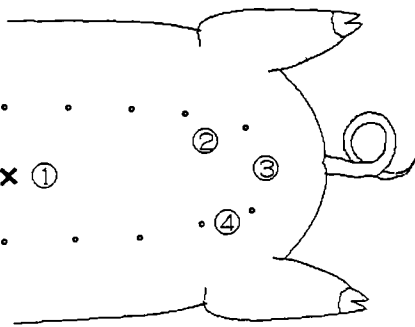


図1. 腹腔鏡、操作鉗子および移植針の挿入部位

①：腹腔鏡，②：移植針，③④：操作鉗子

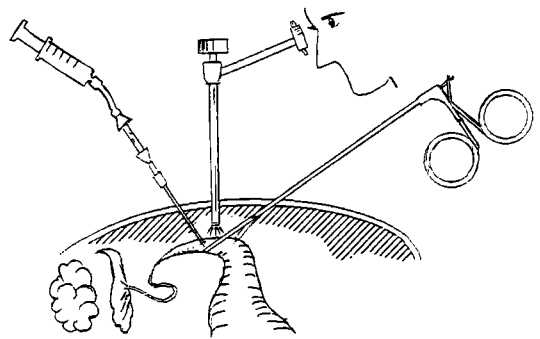


図2. 腹腔鏡での胚の移植

- ① 腹腔鏡により腹腔内を観察しながら、卵巣および子宮を確認する。
- ② 操作鉗子で子宮を把握、2本の操作鉗子で手操るようにして子宮角の先端をつかむ。
- ③ 子宮角の先端に移植針を挿入し、少量の培養液とともに胚を移植する。

および酸素の混合気相により吸入麻酔した。麻酔導入後、術野をよく洗浄、消毒した。

図1および図2に示すとおり、腹腔鏡を臍部の直後に、操作鉗子の1本を最後部乳頭と最後部から2番目の乳頭間に、残り1本の操作鉗子を左右最後部乳頭間に挿入

した。腹腔鏡で観察しながら2本の操作鉗子により子宮角を交互に持ち、手操るようにして子宮角の先端をつかんだ。移植針は把握部の近くの子宮角に挿入し、少量の培養液とともに胚を注入した。尚、最後の2頭の移植時には、移植針の周囲を25℃前後に保温した。

表 1. 移植用器具の改良

器具名	改 良 点
移 植 針	外套：長さ：170mm, 直径：1.8mm 内針：長さ：220mm, 直径：1.0mm
操作鉗子	先端部：平面構造→格子溝構造 把持時固定不可→把持時固定可能 長さ：450mm 直径：5mm
手術台	固定式 → 前後昇降式

表 3. 移植成績-2

移植頭数	受胎数	受胎率	胎子数	平均胎子数
6頭	2頭	33.3%	18頭	9.0頭

## 結果および考察

## 1) 胚の移植成績

Recipient 6頭はいずれも確実に発情を同期化することができた。発情発現の状態も良好であった。また、腹腔鏡でみた卵巣はいずれも正常な排卵後の状態を呈していた(表2)。胚移植のための発情同期化について著者らが検討した結果<sup>10)</sup>では、今回用いた処置が発情発現が正確で回収後の胚の正常性も高く、最も優れた方法の1つと考えられた。したがって、移植結果に対する発情同期化の影響はなかったものと思われた。

移植は器材に改良を加えながら行われ、その結果、最後の2頭が受胎した。受胎例での胎子数は、それぞれ5頭、13頭であった(表2,3)。開腹手術による胚移植での受胎率は報告によって多少の違いがみられるものの、60%前後と考えられる<sup>1,3)</sup>。今回の実験における受胎率は、33.3%(2頭/6頭)と若干低いものであった。しかし、器具の改良、技術の修得の結果、最後の2頭が受胎したことから、今後、受胎率をさらに向上させることができるものと思われた。

受胎例は移植針付近を保温した最後の2例であった。豚卵子や胚の低温に対する抵抗性が極めて弱いことは良く知られるところであり<sup>11,12)</sup>、著者らの成績においても桑実胚から初期胚盤胞の生存限界温度は15°C前後と考えられた<sup>13)</sup>。本実験は1~3月にかけて行われ、手術室の温度は生存限界温度以下であったと考えられた。従って、今回の移植において、移植技術とともに温度条件が

表 2. 胚の移植成績-1

Recipient の No	発情 <sup>1)</sup> 発現	発情 <sup>2)</sup> 状況	卵巣 <sup>3)</sup> 所見	移植胚 STAGE	胎子 数	胎子 数
1	1	良好	良好	M~EB	15	—
2	0	良好	良好	M~B	18	—
3	0	良好	良好	M~EB	18	—
4	0	良好	良好	M~EB	15	—
5	1	良好	良好	M~EB	20	5
6	0	良好	良好	M~EB	22	13

1) hCG 投与日を0日とした 2) 明瞭な許容行動を示したものを良好とした 3) 明瞭な排卵黄体を認めたものを良好とした

M: 桑実胚 EB: 初期胚盤胞 B: 胚盤胞

※: 移植 hCG 投与から6日目に行った

移植成績に影響したのではないかと考えられた。また、移植針の材質がステンレスであったことも温度の低下を早めたものと考えられた。手術室の温度管理を十分に行うとともに、移植針の材質についても検討することが必要と思われた。

## 2) 手術後の生殖器官の状況

腹腔鏡による胚移植を行った6頭について移植後25日で屠殺し、検査した結果では卵巣、卵管および子宮に癒着等の異常はまったく認められなかった(写真4)。

開腹手術による移植ではほとんどの例において癒着がみられ、反復使用が制限されたり、受胎率の低下、産子数の減少、難産などの原因となる。しかし、腹腔鏡を用いた移植では柏崎らの報告<sup>14)</sup>においても癒着を認めておらず、癒着防止のために効果的方法と思われた。

以上の結果から、腹腔鏡による方法は癒着や開腹ストレスを引き起こすことなく、胚の移植ができる方法として有効と思われた。しかし、一方では腹腔鏡およびその付属装置の準備に経費が必要であること、麻酔処置が必要であることが欠点と思われた。胚移植技術を、より普及性のある技術とするためには最終的には麻酔処置を要しない方法について検討することが必要と思われた。しかし、それまでの経過的方法として、腹腔鏡による移植は有効と思われた。

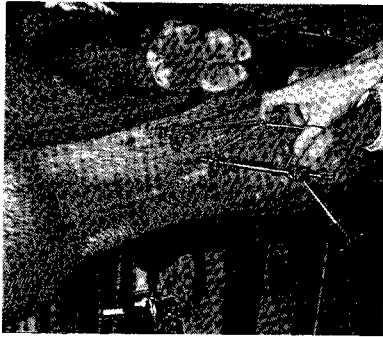


写真3. 腹腔鏡による移植

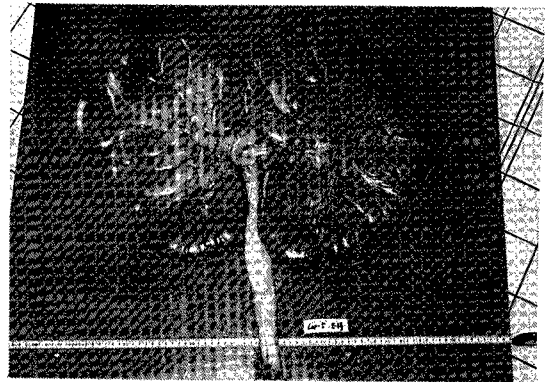


写真4. 受胎例の生殖器

腹腔鏡により、22個の桑実胚～胚盤胞を移植し、移植後25日目に屠殺。卵巣、卵管、子宮等に全く癒着は認められない。13頭の胎子を確認する。

### 引用文献

- 1) Polge, C. 1982. Embryo transplantation and preservation. In: D. J. A. Cole & G. R. Foxcroft (Ed.) Control of Pig Reproduction. pp277-292. Butterworths. London.
- 2) Dziuk, P. J. 1971. Obtaining eggs and embryos from sheep and pigs. In: J. C. Daniel, Jr (Ed.). Methods in Mammalian Embryology. pp76-85. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- 3) 河原崎達雄, 辻岡豊, 関哲夫, 曾根勝, 吉田光敏, 番場公雄, 1986, 豚の受精卵移植に関する研究, I 外科手術による受精卵の回収及び移植について, 静岡県養豚試験場報告, 第33集, 1-9.
- 4) James, J. E. and P. D. Reeser. 1979. Embryo recovery in swine. Theriogenology. 11: 47-50.
- 5) Polge, C. and B. N. Day, 1968. Pregnancy following nonsurgical egg transfer in pigs. Vet. Rec. 15: 712.
- 6) Altenhof, R. L., T. D. Tanksley, Jr., D. A. Knabe P. G. Harms, M. J. Bowen and D. C. Kraemer. 1982. Investigation of nonsurgical embryo collection in swine. Theriogenology. 17: 75 (Abstr.).
- 7) 久保春海, 金子慶賛, 椎名一雄, 林鴻程, 片山進, 小島栄吉, 1984, Culdoscopyによるヒト卵胞卵採取法の検討, 日不妊誌, 29: 47-53.
- 8) Schiewe, M. C., M. Bush, L. S. Stuart and D. E. Wildt. 1984. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep. A preliminary study. Theriogenology. 22: 675-682.
- 9) Whittingham, D. G. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature. 233: 125-126.
- 10) 河原崎達雄, 齊藤美英, 知久幹夫, 曾根勝, 1989, 性腺刺激ホルモンによる豚の発情同期化(unpublished observation).
- 11) Wilmut, I. 1972. The low temperature preservation of mammalian embryos. J. Reprod. Fertil. 31: 513-514.
- 12) Miyamoto, H., E. Sato and T. Ishibashi. 1988. Attempts to cool pig oocytes. Jpn. J. Zootch. Sci. 59: 329-334.
- 13) Kawarasaki, T., T. Kohsaka, M. Sone, S. Tagami and K. Bamba. 1989. The sensitivity and cytological evaluation of pig oocytes and embryos to cooling (unpublished observation).
- 14) 柏崎直巳, 塩原広之, 添田益夫, 武田光彦, 杉本輝夫, 菅原七郎, 正木淳二, 1988, 腹腔鏡法および開腹手術法による豚初期胚の移植, 日豚会誌, 25: 186-190.