

## 豚胚の回収・移植技術の実用化

誌名	滝川畜産試験場研究報告
ISSN	03892271
巻/号	26
掲載ページ	p. 21-25
発行年月	1991年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 豚胚の回収・移植技術の実用化

仙名 和浩 川本 哲 大原 睦生 草刈 直仁 伊藤 俊輔  
山崎 昶 芹川 慎 山田 渥 八田 忠雄

**要約** 豚における胚移植技術の実用性を明らかにするために、開腹手術の反復性および胚移植による繁殖成績について検討した。10頭の母豚を用いた開腹手術の反復回数は平均2.3回(1~4回)であり、反復を困難にする理由として術創の膿瘍形成、生殖器の癒着および繁殖障害があげられた。これらの障害がない場合、開腹手術は4回以上の反復が可能であることが示唆された。また、反復手術のうち18回が胚回収手術であり、形態学的に優良な excellent ランクの胚は1手術当たり平均 $11.1 \pm 7.2$ 個(0~29個)回収された。5~6日齢の胚を移植した場合の受胎率は66.7%(6/9)であり、受胎豚における移植胚数に対する産子数の割合は48.3%(42/87)であった。

豚の胚移植の初成功例は KVASNICKII<sup>7)</sup>によって報告されているが、その後大きな技術的進展はみられなかった<sup>3)</sup>。しかし近年、豚の慢性感染症による経済的被害の高まりから、感染症を持ち込む危険のより少ない種豚導入法として胚移植技術が注目され始め<sup>8,10)</sup>、発情調整や胚の回収・移植法について新たな研究が進展した<sup>1,3,9)</sup>。

そこで、本試験では豚胚移植技術の実用性を明らかにするため、開腹手術の反復性および新鮮胚移植による繁殖成績について検討した。

### 材料および方法

#### 1. 供試豚および実験計画

手術の反復性の検討には、ランドレースの初産後離乳母豚10頭を用い、離乳後の初回発情から手術に供した。その後、原則として手術後の初回発情を見送り、その次の発情で手術に供した。そして手術に供する発情予定日の5~6日前に妊馬血

清性性腺刺激ホルモン(以下 PMSG と略す)1,000 IU を筋肉内投与した。これらの供試豚には試験開始後約5ヵ月間可能な限り反復して胚の回収および移植手術を実施した。

胚移植による繁殖成績の検討には、供胚豚として交配後5~6日目の、受胎豚として発情発見後4~6日目のランドレース経産豚をそれぞれ8頭および9頭用いた。

なお、母豚の発情周期および胚の日齢は、発情発見日を0(day 0)とし、その後の経過日数として表した。供胚豚の交配は発情発見日から1日1回自然交配によって実施した。

#### 2. 胚の回収および移植

胚の回収・移植手術は以下の手順で実施した。供試豚の麻酔は表1に示したように、アトロピンおよびアザペロンを前投薬し、チアミラールナトリウムで麻酔導入後、ハロセン・笑気・酸素またはハロセン・酸素による吸入麻酔で維持した。術野および術者消毒はいずれも手術用イソジンにより2回、0.5%クロルヘキシジン添加80%エタノール液で1回実施した。消毒後、滅菌有窓覆布を豚全体に掛け、切皮後創孔に沿ってさらに滅菌布で

Table 1. General anesthetic method for swine embryo transfer

Preanesthetic medication	
Atropine sulfate	0.04mg/kg im.
Azaperone	3mg/kg im.
	↓ 20~30minutes later
General anesthesia	
Induction :	Thiamylal sodium 5mg/kg iv.
Maintaining :	Halothane · Nitrous oxide · Oxygen or Halothane · Oxygen inhalation

覆った。なお、術野は剃毛しなかった。また、術者は滅菌手術衣および手術用手袋を装着した。開腹、胚の回収・移植および縫合法は、小栗ら<sup>9,11)</sup>の方法に従って実施した。腹腔内臓器の癒着防止のために1%コンドロイチン硫酸液および不織布ガーゼを使用した。子宮の還流および胚の保存には非働化したウシ胎児血清を10%添加したダルベッコ・リン酸緩衝液を用いた。手術室温は25℃以上に保持し、還流液は可能な限り37℃に保温した。回収した胚は移植時まで37℃で1.5~3.5時間保存した。胚の品質についての判定は、牛で用いられている金川らの方法<sup>4)</sup>に準じて形態学的に優良なものから劣悪なものへ excellent, good, fair および poor と4ランクに分類した。手術後の豚は2~3日間アンピシリン (1.5g/頭) の経口投与と創面へのヨードチンキ噴霧を行い、術後7日目に抜糸した。受胎の判定は超音波断層法によって術後22~28日目 (day27~34) に実施した。

### 結果および考察

10頭の母豚における反復手術回数と手術を中止した理由を表2に示した。1頭の平均手術回数は2.3回 (1~4回) であり、このうち手術回数が3または4回であった2頭では、手術創の化膿や子宮などの癒着がほとんど認められず、試験期間の終了により供試を中止した。試験期間の終了前に手術の反復を中止した理由では、術創の膿瘍形成が2頭、術創の高度線維化が1頭、生殖器の癒着

が1頭、繁殖障害によるものが4頭であった。繁殖障害の内訳は、卵胞囊腫が1頭、発情周期の不整が2頭および無発情が1頭であった。生殖器の癒着は卵巣・卵管・卵管采および子宮角先端部に種々の程度で認められる例があったが、それが供試中止の理由となったのは1頭のみであった。

豚の胚移植技術は清浄豚群への遺伝資源導入法としての利用が検討されている<sup>9)</sup>。そのメリットの一つとして従来の導入法である子宮切断や帝王切開では困難な優良母豚の反復利用が可能であることがあげられる。今回の成績では手術操作および後療法が反復利用性を大きく左右したものと考えられた。すなわち、術創の感染による膿瘍形成が反復手術を障害する原因の一つとなった。医学領域では、術創の感染を増加させる原因について検討されている<sup>9)</sup>。それによると、手術操作の清浄度の低下、カミソリによる剃毛、手術時間の延長、手術手袋の穿孔などで感染率は増加するという。今回の検討では術野が腹部正中であり、術後に収容した豚房がコンクリート床であったため、糞便による術創の汚染がみられた。このことから、すのこ床など患部を清潔に保てる豚房や後療法的重要性が示唆された。

一方、生殖器の癒着は卵巣・卵管采を中心に種々の程度で認められる場合があったが、反復利用上問題となるものは少なかった。繁殖障害は母豚の反復利用そのものを困難にするが、今回の検討でも繁殖障害による供試中止が4例を数えた。この問題の解決は実用上重要であり、今後さらに検討が必要であると考えられた。

Table 2. Repeatability of celiotomy for embryo collection and embryo transfer

Sow	The number of operations			Reasons of stopping to use for experiment
	Embryo collection	Embryo transfer	Total	
1	3	1	4	End of experiment
2	3	0	3	End of experiment
3	3	0	3	Fibrosis of the surgical wound
4	2	0	2	Infection of the surgical wound
5	1	1	2	Infection of the surgical wound
6	2	0	2	Adhesion of uterus and ovarium
7	2	0	2	Follicular cyst
8	2	0	2	Abnormal estrus
9	0	2	2	Delay of estrus cycle
10	0	1	1	Anestrus
Average			2.3	

Table 3. Pregnancy and parturition results by fresh embryo transfer

Donor	Day	Tranferred embryo			Recipient	Day	The number of piglets (B)	B/A(%)
		Stage <sup>a)</sup>	Grade <sup>b)</sup>	The number of embryos (A)				
D1	5	M~CM	Excellent	16	R1	3	5	31.3
D2	5	4~CM	Poor	20	R2	4	0	0.0
D3	5	8~M	Poor	18	R3	4	0	0.0
D4	5	4~M	Good-Fair	16	R4	5	0	0.0
D5	6	EB~B	Good-Fair	16	R5	6	11	68.8
D6	6	EB~B	Excellent	14	R6	5	9	64.3
D7	6	EB~B	Good-Fair	16	R7	5	3	18.8
D8	6	EB~B	Excellent	15	R8	4	8	53.3
D8	6	EB~B	Excellent	10	R9	6	6	60.0
Average of six pregnant recipients				14.5			7.0	48.3

<sup>a)</sup> 4 or 8 : 4 or 8 cells, M : morula, CM : compacted morula, EB : early blastocyst, B : blastocyst

<sup>b)</sup> Embryos were classified morphologically into four grades; excellent, good, fair and poor.

手術回数23回のうち胚回収手術は18回であり、計263個、平均14.6±7.6個(2~30個)の胚および未受精と考えられる卵(以下未受精卵)が回収された。回収された胚のうち excellent ランクと判

定されたものは計199個、平均11.1±7.2個(0~29個)で、未受精卵を含む回収胚数に対する割合は75.7%であった。今回の反復手術で得られた excellent ランク胚の平均回収個数に平均手術回数を乗

じて1頭当たりの回収個数を算出すると25.5個となった。この個数は必ずしも多くないが、手術不適の母豚はと殺によっても胚回収が可能であり、さらに術創の感染などの問題を解決した場合、1頭当たり50個以上のexcellentランク胚を得ることができるものと推定された。

胚移植による受胎および分娩成績を表3に示した。合計141個、平均15.7個(10~20個)の胚を9頭に移植したところ、そのうちの6頭が受胎し、受胎率は66.7%であった。胚の日齢別では、day 5胚で4頭中1頭が受胎したのに対し、day 6胚では全5頭が受胎した。移植胚の全体的な所見と受胎成績との関連では、胚の品質が優れたものほど受胎性が良い傾向が認められた。受胎豚はすべて分娩し、計42頭、平均7.0頭の産子を得た。受胎豚への移植胚数は計87個、平均14.5個であり、移植胚数に対する産子数の割合(以下発生率とする)は48.3%(18.8~68.8%)であった。豚胚移植では、供胚豚のday 4~7で回収された胚を用い、かつ受胎豚の発情が供胚豚より0~2日遅い場合に高い受胎率(60~80%)が得られている<sup>9,12)</sup>。また、手術室の室温や清浄度も受胎に影響するという<sup>2)</sup>。本試験ではこれらの報告と同様の条件で検討し、ほぼ同等の成績を得ることができた。移植した胚の日齢によって受胎率に差がみられたが、小栗らの報告<sup>9)</sup>では、day 5とday 6の胚で受胎率に有意な差はなく、今回の結果は胚の日齢というよりも胚の品質の違いによるものと考えられた。

豚胚移植による発生率は報告者によって様々であるが、平均的には60%前後である<sup>1,12)</sup>。今回の成績は平均で48.3%とやや低かった。しかし、豚では他の家畜と比較して初期胚の死滅が高率に起き、自然繁殖でも受精後40日目で約30%が死滅することから<sup>13)</sup>、必ずしも豚胚移植の実用性を否定するものではない。特に遺伝資源を導入する場合、この程度の発生率でも十分利用価値があろう。一方、今回の成績では発生率に18.8~68.8%と大きなバラツキがみられた。その原因は明確でなく、低い発生率を改善するには今後さらに検討が必要と思われた。

本研究では、開腹手術による豚胚移植技術を確

立し、その実用性を示すことができた。今後、さらにその実用性を高め技術の普及を進めるためには、手法の迅速化ならびに簡便化が望まれる。また、本研究では新鮮胚による受胎成績の検討にとどまったが、長期培養胚や凍結保存胚の利用についても今後検討しなければならない。

## 引用文献

- 1) 番場公雄・吉田光敏・河原崎達雄・曾根 勝・梶尾規一(1986)食肉に関する助成研究調査成果報告書, 4: 6-12
- 2) 林 哲・小林一彦・本多昭彦・大坪安典・石井知幸・鈴木 保・安部道夫・赤池洋二・井上忠恕・波岡茂郎(1985)第99回日本獣医学会講演要旨集: 221
- 3) 井上忠恕・金川弘司・波岡茂郎(1985)食肉に関する助成研究調査成果報告書, 3: 13-17
- 4) 金川弘司・高橋芳幸・井上忠恕・福井 豊(1984)牛の受精卵移植: 66-65, 近代出版
- 5) 金川弘司・波岡茂郎・高橋芳幸・井上忠恕(1986)食肉に関する助成研究調査成果報告書, 4: 1-5
- 6) 小林寛伊(1986)臨床と微生物, 13: 323-330
- 7) KVANSNICKII, A. V. (1951) SOVETSK. Zootech., 1: 36-42 [Anim. Breed. Abst., 19: 224]
- 8) MARTIN, P. A. (1983) Theriogenology, 19: 43-48
- 9) 小栗紀彦・相馬 正・小島敏之(1987)日豚会誌, 24: 113-115
- 10) 小栗紀彦・相馬 正・小島敏之・今田忠雄・川村 斉(1988)日豚会誌, 25: 88-87
- 11) 小栗紀彦(1990)日豚会誌, 27: 80-86
- 12) 菅原七郎(1988)畜産の研究, 42: 585-591
- 13) 菅原七郎(1988)畜産の研究, 42: 931-937

## Utilizing the embryo transfer technology in swine

Kazuhiro SEN-NA, Satoshi KAWAMOTO, Mutsuo OHARA,  
Naohito KUSAKARI, Syunsuke ITOH, Hisashi YAMAZAKI,  
Shin SERIKAWA, Atsushi YAMADA, and Tadao HATTA

This examination was conducted to investigate the degree of repeatability for surgical collection as well as transfer of embryos in swine.

In the case of some post surgical complications such as the infection of the surgical wounds, adhesion of the genital and reproductive organs and reproductive disorders, the animal can only be used to an average of 2.3 celiotomy ( $n=10, 1-4$ ). If these problems are avoided, however, results showed that the sow can be reused more than 4 times. Embryos were collected 18 times during these operations; an average of  $11.1 \pm 7.2$  collected embryos were graded as excellent.

Embryos were collected surgically 5-6 days after estrus, and then cultured for about 1.5-3.5 hours before being transferred to the synchronized recipients. Six transfers out of nine resulted in pregnancy (66.7%) and out of the 87 embryos transferred, 42 piglets were born, resulting in a 48.3% birth rate.

These results show the utility of embryo transfer in swine.

**Key words:** embryo transfer, repeated operations, swine.

