

## ブタ体外生産輸送胚の非外科的移植による産子の作出 (短報)

中根崇・鈴木千恵\*1・山口倫子・高橋圭二・神山佳三\*2・吉岡耕治\*1

### Birth of Piglets Through Non-Surgical Transfer of In Vitro-Produced Embryos Following Transportation (NOTE)

Takashi NAKANE, Chie SUZUKI\*1, Tsuneko YAMAGUCHI, Keiji TAKAHASHI, Yoshimi KOHYAMA\*2 and Koji YOSHIOKA\*1

#### 目 的

ブタでの胚移植は主に開腹手術により行われ、特殊な設備・技術を必要とするため、一般的には普及していない。一方、非外科的胚移植は、技術的な問題から実用化に至っていないが、開腹手術の必要がないことから受胚豚への負担が軽く、生産現場での実施も可能である。牛では体外受精で作出した胚が宅配便により酪農家まで輸送され、非外科的移植 (開腹手術を必要としない) による子牛生産技術が実用化され、品種改良や優良子牛の増産に広く活用されている。しかし、豚では体外受精で作出した胚の生存性は、培養環境変化に弱く、今までに宅配便で輸送された胚の非外科的移植による子豚生産に成功した例はない。

近年、SUZUKI et al は、体外生産 (IVP) した豚胚盤胞を市販の子宮深部人工授精用カテーテルを用いて、非外科的に移植して産子を得ることに成功した (J Reprod Dev, 2004, 50:487-491)。

そこで、本研究は、媒精後の異なるステージの IVP 胚を宅配便で配送し、非外科的移植を実施し、輸送後の胚の発育状況や品質、受胎・分娩状況等を調査し、移植条件を検討した。

#### 材料及び方法

IVP 胚は、YOSHIOKA et al の方法 (J Reprod Dev, 2008, 54:208-213) により、動物衛生研究所において、茨城県の土浦食肉協同組合と畜場で採取した卵巣から卵胞卵子を吸引し、Porcine Oocyte Medium で 44 時間成熟培養し、媒精 (IVF) を 10 時間実施した。その後、胚をトリプシン処理し、Porcine Zygote Medium (PZM) -5 培地で 4 日 (Day4) (Day0: day of IVF) および 5 日 (Day5) 間培養後、10% (v/v) 牛胎子血清 (FBS) 加 PZM-5 培地で 0.25ml ス

トローに注入し、千葉県畜産総合研究センターへ輸送した。ストローは、38.5°C に保温される専用の胚輸送箱に収納され、宅配便で 16 時に集配し、翌日 12 時 (約 20 時間) に到着後正常な発育を認める胚を選抜して、3 時間以内に Day5 および Day6 の胚を移植した。

移植試験は、表 1 のとおり受胚豚 38 頭を胚移植時期の異なる A・B・C の 3 区に分け実施した。A 区には、Day5 の胚を自然発情後 3~6 日の受胚豚に移植し、B 区には、Day5 の胚を離乳時期の調節により発情同期化し、移植日の前に良好な発情が起きるように牝馬血清性腺刺激ホルモン (eCG) 750 単位を離乳 24 時間後に接種し、72 時間後にヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) 500 単位を接種し、hCG 投与後 4~6 日目の受胚豚に移植した。C 区には、Day6 の胚を B 区と同様なホルモン処置を実施し、hCG 投与後 6 日目の受胚豚に移植とした。

移植法は、無麻酔により市販の子宮深部人工授精用カテーテル (匠; 富士平工業(株)) を用い、非外科的に移植した。本カテーテルは、子宮頸管まで挿入できるスパイラル型の長さ 60cm のガイドカテーテルおよび長さ 120cm のフレキシブルなポリエチレン製移植用インナーカテーテルで構成されている。インナーカテーテルをガイドカテーテル先端から子宮角内まで挿入し、インナーカテーテルの基部に胚が入られたストローを装着し、更に移植液 PZM-5+10% (v/v) FBS 2.5ml 入り注射器を装着し、移植液と共に胚を注入した。

妊娠診断は、モバイル超音波画像診断装置 (トリンガ-V ダウンファイア; すみれ医療(株)) を用い、移植後 18 日目より実施した。子宮角内に胎水の貯留あるいは胎子が認められる場合を妊娠陽性と診断し、胎水が認められない場合はその 2 週間後に再度検査を実施し、2 回目の検査でも胎水が認められない場合に妊娠陰性と診断した。

流産の診断は、胎子の排出が認められた場合、および胎子の排出は未確認であるが、妊娠陽性と診断した後に再発情を認めた場合とした。また、流産日齢は、流産日及び再発情日と子宮頸管粘液の性状から推定し、IVF 後の日数とした。

平成 21 年 8 月 31 日受付

\*1 動物衛生研究所

\*2 元千葉県畜産総合研究センター

## 結 果

試験区別移植胚の概要は、到着した輸送胚数 2,171 個中正常な発育を示し移植した胚数が、1,184 個 (54.5%) であった。試験区別の移植胚数は、A 区で Day5 胚 350 個 (1 頭当たり 31.8 個)、B 区で Day5 胚 398 個 (1 頭当たり 36.2 個)、C 区で Day6 胚 436 個 (1 頭当たり 27.1 個) であった (表 2)。

移植時の状況は、インナーカテーテル先端のブタの外陰部からの平均挿入長が 98.4cm、移植に要した平均時間が 5 分 17 秒であった (表 3)。

繁殖成績は、38 頭中 11 頭 (28.9%) が受胎し、8 頭が IVF 後 26 から 72 日間で流産し、3 頭 (7.9%) が IVF 後 115 から 119 日目に 7 頭の産子 (平均体重 1.65kg) を分娩した (表 4)。

表 1. 試験区別受胎胚の移植時期及び構成

| 試験区 | 受胎胚の移植時期      | 受胎胚数 (頭) | ランドレス種 | 大ヨークシャー種 | 交雑種 | 月齢 (ヵ月) <sup>a</sup> | 産歴 (回) <sup>a</sup> | 体重 (kg) <sup>a</sup> |
|-----|---------------|----------|--------|----------|-----|----------------------|---------------------|----------------------|
| A   | 自然発情後 3～6 日   | 11       | 9      | 2        | 0   | 29.2 ± 12.4          | 3.6 ± 1.8           | 211.8 ± 16.6         |
| B   | hCG 接種後 4～6 日 | 11       | 4      | 4        | 3   | 20.4 ± 6.3           | 2.1 ± 1.1           | 206.4 ± 29.8         |
| C   | hCG 接種後 6 日   | 16       | 5      | 8        | 3   | 31.2 ± 16.4          | 3.0 ± 1.8           | 209.1 ± 23.7         |
| 計   |               | 38       | 18     | 14       | 6   | 27.5 ± 13.6          | 3.1 ± 1.9           | 215.9 ± 26.7         |

<sup>a</sup> 平均 ± 標準偏差

表 2. 試験区別移植胚の概要

| 試験区 | 移植胚齢 (日) | 総輸送胚数 (個) | 総移植胚数 (個) | 移植胚数 (個) <sup>a</sup> | 胚盤胞 (個) <sup>a</sup> | 拡張胚盤胞 (個) <sup>a</sup> | 脱出胚盤胞 (個) <sup>a</sup> |
|-----|----------|-----------|-----------|-----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| A   | 5        | 1,661     | 350       | 31.8 ± 4.0            | 26.9 ± 5.0           | 5.4 ± 2.7              | -                      |
| B   | 5        |           | 398       | 36.2 ± 11.8           | 28.0 ± 16.8          | 10.0 ± 6.3             | -                      |
| C   | 6        | 510       | 436       | 27.1 ± 5.0            | 7.7 ± 4.0            | 15.5 ± 4.5             | 5.2 ± 2.4              |
| 計   |          | 2,171     | 1,184     | 31.2 ± 8.2            | 19.4 ± 13.8          | 11.2 ± 6.3             | 5.2 ± 2.4              |

<sup>a</sup> 平均 ± 標準偏差

表 3. 試験区非外科的移植時のカテーテル挿入状況

| 試験区 | ガイドカテーテル挿入長 (cm) <sup>a</sup> | インナーカテーテル挿入長 (cm) <sup>a</sup> | 移植時間 (分) <sup>a</sup> |
|-----|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| A   | 39.9 ± 2.3                    | 99.9 ± 2.3                     | 4'16" ± 1'16"         |
| B   | 37.7 ± 3.6                    | 97.7 ± 3.6                     | 5'00" ± 1'29"         |
| C   | 39.1 ± 6.6                    | 97.9 ± 8.9                     | 6'11" ± 2'10"         |
| 計   | 38.9 ± 4.8                    | 98.4 ± 6.1                     | 5'17" ± 1'54"         |

<sup>a</sup> 平均 ± 標準偏差

表 4. 繁殖成績

| 試験区 | 受胎 [流産] 率 (%)     | 分娩率 (%)       | 流産胎子頭数 [日齢] <sup>c</sup>        | 分娩日齢 (日) <sup>c</sup> | 分娩頭数 [♂ : ♀] | 生時体重 (kg) <sup>a</sup> |
|-----|-------------------|---------------|---------------------------------|-----------------------|--------------|------------------------|
| A   | 1[0] / 11 (9.1)   | 1 / 11 (9.1)  | -                               | 117                   | 3[3:0]       | 1.37 ± 0.4             |
| B   | 4[4] / 11 (36.4)  | -             | NF[26,29,37,72]                 | -                     | -            | -                      |
| C   | 6[4] / 16 (37.5)  | 2 / 16 (12.5) | 3[53], NF[28,33,52]             | 115, 119              | 4[0:4]       | 1.86 ± 0.6             |
| 計   | 11[8] / 38 (28.9) | 3 / 38 (7.9)  | 3[53], NF[26,28,29,33,37,52,72] | 117.0 ± 2.0           | 7[3:4]       | 1.65 ± 0.5             |

<sup>a</sup> 平均 ± 標準偏差

<sup>b</sup> NF; 流産胎子未確認、再発情日及び粘液性状より流産日齢推定

<sup>c</sup> IVF 後日齢