— Note —

Embryo Collection from Miniature Pigs and Production of the Piglets after Transfer to Common Pig Recipients

Hirohito YAMAKAWA, Hiroshi NAGASHIMA,
Yukio KATO, and Yoshikuni TANIOKA*

*Feed Research Station, Nisshin Flour Milling Co., Ltd., 1242-6
Iguchi, Nishinasuno-machi, Nasu-gun, Tochigi 329-27 and*

**Central Institute for Experimental Animals, 1430 Nogawa,
Miyamae-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213, Japan*

(Received 22 November 1989/Accepted 2 March 1990)

Embryo collection from Göttingen miniature pigs and transfer to common pig recipients were performed. Embryos were collected 2 to 6 days after the onset of estrus. Two to 7 eggs including unfertilized ova were collected from a naturally ovulated donor and more eggs (7 to 15) were obtained from a superovulated donor. A total of 21 piglets were born after transfer of 33 miniature pig embryos to two common pig recipients. Among them 12 were stillbirths which seemed to have resulted from suffocation during the parturition. Such an embryo transfer technique will be utilized as an inventive method for the purposes such as international exchange of the particular strains of miniature pigs, establishment of a SPF miniature pig herd and so on.

ミニブタからの初期胚採取および家畜ブタへの 移植によるミニブタの生産

山川 宏人・長嶋比呂志・加藤 行男・谷岡 功邦*

日清製粉(株)那須研究所
*財団法人実験動物中央研究所

ブタは、一般に心臓血管系、消化器系、免疫系、皮膚組織などがヒトのそれと類似しており、動脈硬化症などの循環器系疾患、胃潰瘍などの消化器系疾患、免疫グロブリンに関する研究や、皮膚科領域の研究に大変有用な動物であるとされている [4, 5]。しかしながら、家畜のブタは、体格が大きく取扱いが困難であるため、実験用として各種の小型のブタが開発されてきた。近年、その扱い易さと、前述のごとくヒトとの類似性が高いところから、医学、薬学分野での、ミニチュアピッグ (miniature pig), 通称ミニブタの使用が増加の傾向にある [3, 4, 5]。

我々は、このミニブタの繁殖を効率良く行う上で、胚

移植技術が極めて有効な手段になると考え、ミニブタの中でも最も小さく、日本で最も多く使われている、ゲッチンゲン (Göttingen) 系のミニブタから初期胚を採取し、家畜ブタへの移植によるミニブタの生産を行ったので、その概要を報告する。

胚の採取：胚のドナーとして、生後10~12ヶ月、体重30~40kgのゲッチンゲン系ミニブタ雌を用いた。一部のドナーに対しては、PMS 500単位、hCG 500単位の筋肉内注射による多排卵処置を施した。ドナーは、発情期間中毎日1回、約24時間間隔で繁殖能力の確認されている同系の雄ブタと交配させた。胚の採取は、雄許容開始日を day-0 として、day-2~6 に行った。塩酸ケタミ

Table 1. Result of embryo collection from Göttingen miniature pigs

Donor No.	Super-ovulation	Duration of estrus (days)	Embryo collection (day-)*	No. of embryos collected	Stages of collected embryos**						
					2-4 cell	5-8 cell	M	B	EXB	HB	U
6	—	3	2	7	7	—	—	—	—	—	—
2	—	3	4	6	—	4	1	—	—	—	1
34	—	4	5	4	4	—	—	—	—	—	—
6	+	2	5	10	—	—	7	2	—	—	1
2	+	4	5	15	1	12	—	—	—	—	2
7	—	3	6	6	—	—	1	5	—	—	—
7	—	2	6	2	—	—	—	—	1	1	—
3	—	3	6	6	—	—	4	2	—	—	—
3	+	3	6	7	—	—	3	4	—	—	—

* : onset of estrus=day-O ** M : morulae B : blastocysts EXB : expanded blastocysts HB : hatched blastocysts U : unfertilized ova

Table 2. Transfer of Göttingen miniature pig embryos to common pig recipients

Recipient No.	No. of corpora lutea	No. of embryos transferred	Stages and no. of embryos transferred	Gestation length (days)	No. of piglets (Stillbirths)	Developmental rate of transferred embryos (%)
39 (day-4)	16	19*	5-8cell : 12 M : 3 EB*** : 4	112	9 (7)	47
37 (day-4)	10	14**	B : 8 EXB : 6	111	12 (5)	86

* : Embryos were transferred immediately after the collection. ** : Embryos were transferred after culture for 20hr. *** : EB : early blastocysts

ン(ケタラルール, 三共)の筋肉内注射(15mg/kg体重)および4%ハロセン(フローセン, タケダ)による吸入麻酔下で開腹手術を行い, 両側子宮角を灌流した。子宮灌流液には, 1%の非働化ウシ胎児血清(FCS, GIBCO)を添加したダルベッコのリン酸緩衝液(PBS)を用いた。なお, 4頭のドナーについては, 3~7週間の間隔をおいて採卵手術を反復した。

胚の培養: 採取した胚のうち一部は, 約20時間(1晩)培養後レシビエントに移植した。培養液には, 12mg/mlの濃度にウシ血清アルブミンを添加したWhittinghamのマウス胚培養液(M-16)[8]と, 16%FCS加PBSを等量ずつ混合したものを用いた。

胚の移植: 当研究所で飼育されている8ヶ月齢, 体重約110kgの交雑種雌ブタ群(ランドレース×大ヨークシャー種F₁, 以下LW種とする)のうち, ミニブタドナ

ーより1~3日遅く発情を示したブタ2頭を選びレシビエントに用いた。レシビエントの発情は, 毎日1回の試情によって確認し, 雄許容開始日をday-0としてday-4に開腹手術を行い, 形態的に正常と判断されたミニブタ胚を子宮角先端付近に少量の培養液と共に移植した。1頭のレシビエントには, 5細胞期~初期胚盤胞期の胚を19個, 他の1頭には胚盤胞及び拡張期胚盤14個を移植した。

合計9回の胚採取の結果をTable 1にまとめた。自然排卵したドナーからは, 1頭当たり2~7個, 多排卵処理豚からは1頭当たり7~15個の胚および未受精卵が得られた。採取された胚の発達段階を, 採卵日(day)の等しいドナー間で比較すると, 例えばday-5の場合には2細胞期から胚盤胞期までのばらつきが認められた。この原因として, ひとつに自然排卵(#34)と誘起排卵(#2,

6)との差が考えられた。また、本研究で用いたゲッチング系ミニブタの発情期間は、2～4日間と個体差が著しく、このことから、各ドナー間には排卵日のばらつきがあり、それが胚の発達段階の差となって現れたものと推測された。従って今後、ミニブタから希望通りの発達段階の胚を効率よく採取するためには、ミニブタの性周期の内分泌動態を明確にし、多排卵処理方法に検討を加える必要があろう。

ミニブタ胚を、2頭のLW種レシピエントに移植した結果をTable 2に示す。合計19個のミニブタ胚を移植したレシピエント#39からは、妊娠112日目に9頭(♂: ♀=6:3)、また14個のミニブタ胚を移植したレシピエント#37からは、妊娠111日目に12頭(♂: ♀=7:5)の産子が得られた。

レシピエント#39において、移植したミニブタ胚の産子への発生率は47%であり、この成績は通常のブタ胚移植における胚の産子への発生率が60%[1]であるのと比較して低かった。これは、移植した5～8細胞期のミニブタ胚のうちで最も早い発達段階の胚数個がday-4のレシピエントに移植する胚の発達段階としては、必ずしも適当ではなかったと考えられる。

合計21頭の産子のうち、12頭は死産であった。出生時の子ブタ(死産を含む)の体重は、最も小さかった270gの1頭(出生後5日目に死亡)を除き、350～650gで、通常分娩に於けるミニブタの生時体重[6]と差異はなかった。死産の子ブタは、いずれも体重、外観共に正常であったことから、出生時に産道内で窒息死したものと推測された。窒息の原因として、第一にミニブタ胎児の臍帯長が、レシピエントである家畜ブタの産道との対比において十分でなく、そのため娩出される胎児の臍帯の切断が早期に起きた可能性があること、第二に、ミニブタ胎児が著しく小型であるため、子宮の収縮による胎児の娩出が効果的に行われず、胎児が産道内に長時間停滞したと思われることがあげられる。今回の実験では、レシピエントとして交雑種(LW種)の未經産ブタを用いたが、更に若い雌を使用して母親と産子との体格差をなるべく小さくすること、また介護分娩を行うことで死産は減少すると考えられる。生存産子は、以後LW種レシピエントによって自然に哺育され、離乳時までの成長は正常値(日本EDM社:ゲッチング系ミニブタ成長記録より)と変わらなかった。

近年相次いで種々のミニブタの系統が作出され、有名

なものとしては、ミソネタ(Minnesota)系、ゲッチング(Göttingen)系、ユカタン(Yucatan)系、ネブラスカ(Nebraska)系、ホームル(Hormel)系、NIH系[2]などがあげられる[5, 6]。これらのミニブタは、それぞれに特性があり、研究目的に合せて各系統のブタが使用されることが望ましい。しかし、海外で作出、維持されているミニブタを導入することは、防疫上の理由などから種々の制約を受ける。更に生体の輸送と、その後の系統維持には、多くの経費と労力を要する[5]。そこで希望する系統のミニブタ胚を海外から輸送し、国内の家畜ブタのレシピエントに移植することで、各種ミニブタを容易に国内に導入しうる可能性がある。また、清浄に採取、処理したミニブタ胚を、SPFの家畜ブタに移植することで、ある系統のミニブタをSPF化することも可能であると考えられる。

要 約

ゲッチング系ミニブタから初期胚を採取し、家畜ブタへ移植してミニブタの生産を行った。胚の採取および移植は、外科的手術により行った。雄許容開始後2～6日に胚の採取を行った結果、1頭当たり自然排卵では2～7個、誘起排卵では7～15個の胚および未受精卵が得られた。33個のミニブタ胚を2頭の家畜ブタレシピエントに移植した結果、21頭の産子が得られたが、12頭は死産であった。死産の原因は、分娩時の窒息と考えられた。本研究で行った胚移植技術を用いたミニブタの生産は、特殊なミニブタの系統を海外から導入することや、SPFミニブタの作出のために極めて有効な手段と思われる。

文 献

- [1] Polge, C.(1977). Embryo Transfer. In Farm Animal, pp. 45-47, Betteridge, K. J. (edit.), Canada Department of Agriculture., Canada.
- [2] 坂本 薫・落合武徳・磯野可一(1987). *Medical Immunology*, **13**, 275-280.
- [3] 谷岡功邦.(1979). フェルマニア, **15**, 1026-1028.
- [4] 谷岡功邦.(1979). 実験動物の飼育管理と手技, ソフトサイエンス社, 85-96.
- [5] 谷岡功邦.(1984). 開発途上の実験動物, 清至書院, 141-158.
- [6] 谷岡功邦.(1984). 実験医学, **2**, 629-633.
- [7] 谷岡功邦.(1987). 遺伝, **41**, 44-47.
- [8] Whittingham, D. G.,(1971). J Reprod Fert Suppl, **14**, 7-21.