

学 位 論 文 要 旨

氏名 三角 浩司

題 目：胚移植を用いた優良豚導入に関する研究

論文要旨：本研究は、ブタの胚移植を養豚業に応用するための技術開発が目的である。最初に、ブタにおける胚移植の有用性を確認するため、オーエスキー病(AD)感染豚群を胚移植によって清浄化を試みた。AD 抗体陽性豚から採取した胚を適切な処理の後、清浄な受胚豚 12 頭に移植することで 28 頭の子豚が生産した。生産した子豚のうち離乳した 21 頭は、2 ヶ月齢時の抗体検査で全頭陰性を示し、受胚豚も移植後から廃用時まで陰性を維持したことから、胚移植により AD の疾病制御が可能であることを確認した。さらに、その事例を基に新鮮胚移植を用いた育種素材の導入実証試験を実施した。その結果、受胎率は 60%以上で一腹産子数は 6 頭程度であった。以上のことから胚移植による種豚導入は可能であることが実証できた。次に、胚移植の利便性を向上させるため、ブタ胚のガラス化保存方法の検討を行った。まず、マイクロドロップレット法を用いて桑実胚～初期胚盤胞のガラス化保存を実施した。その結果、ガラス化保存胚の加温 48 時間後の生存率が 69.6%、脱出胚盤胞率が 60.9%であった。また、5 頭の受胚豚に計 171 個(30～35 個/1 頭)のガラス化保存胚を移植した結果、受胚豚すべてが受胎し、うち 3 頭は流産したが、残りの 2 頭はそれぞれ 11 ならびに 6 頭の子豚を生産した。一方、超急速ガラス化保存法の問題点となっている液体窒素中の存在が否定できない病原体から胚への汚染を防ぐために、液体窒素に胚を含むガラス化液を接触させずに胚を保存する Micro Volume Air Cooling (MVAC)法を開発し、拡張胚盤胞のガラス化保存に取り組んだ。その結果、ガラス化加温後の胚の生存率は、体外培養 48 時間後で 88.9%、胚移植による子豚生産率は 12.5%と超急速ガラス化保存法の一つであるクライオトップ法と同等の成績が得られた。この結果から次に、完全な透明帯を有する 5 日目胚を MVAC 法でガラス化保存して、発育ステージの違いがガラス化保存胚の生存性に与える影響について調査した。その結果、加温後の桑実胚の生存率が初期胚盤胞および胚盤胞より有意に低い成績であった。一方、胚盤胞は 78.6%の生存率が得られた。そのため、効率的に拡張前から拡張初期の胚盤胞を採取するため、発情誘起処理と胚採取の時間と調整して、おおよそ 5.5 日目に胚を採取し、その後の MCAC 法の検討に用いた。MVAC 法の普及を目的とした「胚スティック」を作製し、胚スティックおよび自作ガラス化器具を用いたガラス化保存後の胚盤胞の生存性を比較した。その結果、体外培養下での生存率は、加温 48 時間後で胚スティックが 95.8%、自作ガラス化器具が 92.0%、新鮮胚(対照区)が 100%と差は認められなかった。胚移植成績では、胚スティックでガラス化保存した 65 個(13.0 個/1 腹)の胚を 5 頭の受胚豚に移植したところ 4 頭が受胎分娩し、合計 21 頭の子豚を生産した。自作ガラス化器具でガラス化保存した 83 個(16.6 個/1 腹)の胚を受胚豚 5 頭に移植したところ 4 頭が受胎分娩し、合計 22 頭の子豚を生産した。また、対照区として新鮮胚 62 個(12.4 個/1 腹)の胚を 5 頭の受胚豚に移植したところ 3 頭が受胎分娩し、合計 23 頭の子豚を生産した。

(別紙様式第 3 号)

分娩した受胎豚の子豚生産率を比較したところ、胚スティックが 42.0% (21 頭/50 個)、自作ガラス化器具が 33.3% (22 頭/66 個)、対照区が 42.0% (23 頭/42 個) となり、自作ガラス化器具が対照区と比べ有意に低くなったが、胚スティックと対照区に差は認められなかった。以上の結果から、胚スティックを用いた MVAC 法でガラス化保存した胚盤胞は、新鮮胚に近い子豚発育能力を有することが明らかになった。最後に、優良な雌豚から多くの胚を生産する技術を検討するため、今まで報告がなかった一度採胎した性成熟雌豚の卵巣を用いた体外生産 (IVP) 胚作出技術の検討を行った。最初に、雄許容から 6 日目、12 日目および 16 日目のデュロック種 (D) から卵巣を採取し、それぞれの卵巣から採取した卵子の体外胚生産能力を比較した。その結果、胚盤胞の発生率は 12 日目、16 日目が 6 日目より有意に高かった。この結果から、発情 16 日目の卵巣を用いて卵胞直径の違いによる胚盤胞発生率の差を調べた。卵胞直径により Small 区 (2 mm 未満)、Medium 区 (2 mm 以上 6 mm 未満) および Large 区 (6 mm 以上) の 3 区に分け、それぞれの卵胞から卵子を回収し、体外胚生産による胚盤胞発生率を比較した。その結果、胚盤胞発生率は Medium 区および Large 区が Small 区よりも有意に高かった。さらに、発生した胚盤胞の細胞数は Medium 区および Large 区が Small 区よりも有意に多かった。以上のことから、性成熟豚の卵巣を用いて IVP 胚を生産する場合は、黄体退行期の卵巣にある 2 mm 以上の卵胞から回収した卵丘細胞卵子複合体 (COC) を用いることで、効率的に高品質な IVP 胚を生産できることが明らかとなった。この結果から、IVP 胚からの純粋種豚生産への応用を試み、発情 16 日目の中ヨークシャー種 (Y) 雌豚の卵巣を用いて IVP 胚を生産し、Y の IVP 胚計 53 個および D の新鮮胚計 15 個を混胚して 3 頭の受胎豚に移植した結果、3 頭すべてが受胎し、うち 2 頭の受胎豚からは計 9 頭 (内 2 頭が生後直死) の IVP 胚由来の Y 子豚が生まれたほか、3 頭からは計 9 頭の新鮮胚由来の D 子豚が生まれた。このことから、1 頭の卵巣から採取した COC を用いて血統が明らかな種豚を生産できることが明らかとなった。

本研究により MVAC 法によるブタ胚盤胞のガラス化保存技術は、新鮮胚移植と同等の生存性が得られる技術として確立した。また、性成熟豚の卵巣を用いた IVP 胚生産により純粋種豚の生産が可能であることが明らかになり、養豚業において胚移植技術の利用が可能であると思われる。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	三角 浩司
審査委員	主 査：農業生物資源研究所 上級研究員 菊地 和弘
	副 査：山口大学 教授 山本 芳実
	副 査：山口大学 教授 音井 威重
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査：鹿児島大学 准教授 高木光博
題目	胚移植を用いた優良豚導入に関する研究
審査結果の要旨： 申請者は、ブタの胚移植を養豚業に応用するための技術開発を主目的に、第 1 章から第 3 章に関する研究を行った。 第 1 章では、ブタにおける胚移植の有用性を確認するため、オーエスキー病(AD)感染豚群を胚移植によって清浄化を試みた。AD 抗体陽性豚から採取した胚を適切な処理の後、清浄な受胚豚 12 頭に移植することで 28 頭の子豚が生産した。生産した子豚のうち離乳した 21 頭は、2 ヶ月齢時の抗体検査で全頭陰性を示し、受胚豚も移植後から廃用時まで陰性を維持したことから、胚移植により AD の疾病制御が可能であることを確認した。さらに、その事例を基に新鮮胚移植を用いた育種素材の導入実証試験を実施した。その結果、受胎率は 60%以上で一腹産子数は 6 頭程度であった。以上のことから胚移植による種豚導入は可能であることが実証できた。 第 2 章では、胚移植の利便性を向上させるため、ブタ胚のガラス化保存方法の検討を行った。まず、マイクロドロップレット法を用いて桑実胚～初期胚盤胞のガラス化保存を実施したところ、ガラス化保存胚の加温 48 時間後の生存率が 69.6%、脱出胚盤胞率が 60.9%であった。また、5 頭の受胚豚に計 171 個(30～35 個/1 頭)のガラス化保存胚を移植した結果、受胚豚 5 頭すべてが受胎し、2 頭から計 17 頭の子豚を生産した。一方、液体窒素中に存在する病原体から胚への汚染を防ぐために、胚を含むガラス化液を液体窒素に直接接触させずに胚を保存する Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法を開発し、拡張胚盤胞のガラス化保存に取り組んだ。その結果、ガラス化加温後の胚の生存率は、体外培養 48 時間後で 88.9%	

で、胚移植による子豚生産率は 12.5% で好成績が得られた。次に、5 日目胚を MVAC 法でガラス化保存して、発育ステージの違いがガラス化保存胚の生存性に与える影響について調査したところ、加温後の桑実胚の生存率が初期胚盤胞および胚盤胞より有意に低い成績であった。一方、胚盤胞は 78.6% の生存率が得られた。そのため、効率的に拡張前から拡張初期の胚盤胞を採取するため、発情誘起処理と胚採取の時間と調整して、おおよそ 5.5 日目に胚を採取し、その後の MCAC 法の検討に用いることとした。MVAC 法の普及を目的とした「胚スティック」を作製し、対照となるガラス化器具比較したところ、体外培養後の胚盤胞の生存率は、加温 48 時間後で胚スティックが 95.8%、自作ガラス化器具が 92.0% で新鮮胚(対照区)が 100% と差は認められなかった。胚移植を行ったところ、胚スティックでガラス化保存した 65 個 (13.0 個/1 腹) の胚を 5 頭の受胚豚に移植したところ 4 頭が受胎分娩し、計 21 頭の子豚を生産した。自作ガラス化器具では、83 個 (16.6 個/1 腹) の胚を受胚豚 5 頭に移植したところ 4 頭が受胎分娩し、計 22 頭の子豚を生産した。対照区として新鮮胚では 62 個 (12.4 個/1 腹) の胚を 5 頭の受胚豚に移植したところ 3 頭が受胎分娩し、計 23 頭の子豚を生産した。子豚生産率を比較したところ、胚スティックが 42.0% (21 頭/50 個)、自作ガラス化器具が 33.3% (22 頭/66 個)、対照区が 42.0% (23 頭/42 個) となり、胚スティックと対照区に差は認められなかった。以上の結果から、胚スティックを用いた MVAC 法でガラス化保存した胚盤胞は、新鮮胚に近い子豚発育能力を有することが明らかになった。

第 3 章では、優良な雌豚から多くの胚を生産する技術を検討するため、性成熟雌豚の卵巢を用いた体外生産胚 (IVP 胚) 作出技術の検討を行った。雄許容から 6 日目、12 日目および 16 日目のデュロック種雌ブタから卵巢を採取し、それぞれの卵巢から採取した卵子の体外胚生産能力を比較した。その結果、胚盤胞の発生率は 12 日目、16 日目が 6 日目より有意に高かった。ここで、発情 16 日目の卵巢から、卵胞の直径の違い (Small 区、Medium 区および Large 区) で分け、それぞれ卵子を回収した。胚盤胞発生率は Medium 区および Large 区が Small 区よりも有意に高かった。胚盤胞の細胞数は Medium 区および Large 区が Small 区よりも有意に多かった。性成熟豚の卵巢を用いて IVP 胚を生産する場合は、黄体退行期の卵巢にある 2mm 以上の卵胞から回収した卵子を用いることで、効率的に高品質な IVP 胚を生産できることが明らかとなった。この結果から、ヨークシャー種雌豚の IVP 胚計 53 個を 3 頭の受胚豚に移植した結果、3 頭すべてが受胎し、うち 2 頭から計 9 頭の子豚が生まれた。このことから、1 頭の卵巢から採取した COC を用いて血統が明らかな種豚を生産できることが明らかとなった。

本研究により胚移植を用いた感染防御技術が確立され、ブタ胚盤胞のガラス化保存技術は、新鮮胚移植と同等の生存性が得られる技術となること、さらに、性成熟豚の卵巢を用いた IVP 胚生産により純粋種豚の生産が可能であり、養豚業への胚移植技術の利用推進が期待される。学術的にも論文発表等で国際的に十分に評価されている。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいと判断された。