

胚移植を用いた優良豚導入に関する研究

三角 浩司

目 次

略語説明	P. 5
要旨	P. 6
緒論	P. 10
ブタにおける胚移植技術の現状	P. 11
養豚産業分野における胚移植利用の課題点	P. 12
研究の目的	P. 14
第1章 胚移植による疾病制御および種豚導入の実証試験	P. 15
緒言	P. 16
研究1 胚移植を用いたオーエスキー病清浄化実証試験	P. 18
1. 材料および方法	P. 18
2. 結果	P. 21
研究2 胚移植による種豚導入実証試験	P. 27
1. 材料および方法	P. 27
2. 結果	P. 29
考察	P. 33
第2章 ブタ胚の超低温（ガラス化）保存試験	P. 35
緒言	P. 36
研究1 マイクロドロップレット法によるブタ胚のガラス化保存試験	P. 39
1. 目的	P. 39

2. 材料および方法	P. 39
3. 実験区設定	P. 42
4. 結果	P. 42
研究2 Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法によるブタ胚のガラス化保存試験	
	P. 50
1. 目的	P. 50
2. 材料と方法	P. 50
3. 実験区設定	P. 53
4. 結果	P. 54
研究3 MVAC 法に適したブタ胚のステージの検討	P. 63
1. 目的	P. 63
2. 材料および方法	P. 63
3. 実験区設定	P. 64
4. 結果	P. 64
研究4 胚スティックを用いた MVAC 法によるブタ胚のガラス化保存試験	P. 68
1. 目的	P. 68
2. 材料および方法	P. 68
3. 実験区設定	P. 70
4. 結果	P. 71
考察	P. 78
第3章 体外生産胚を用いた種豚生産技術の開発	P. 81
緒言	P. 82

研究 1 異なる発情周期の卵巢から回収した卵子を用いた体外胚生産成績の比較	P. 84
1. 目的	P. 84
2. 材料および方法	P. 84
3. 実験区設定	P. 85
4. 結果	P. 86
研究 2 16 日目の卵巢を用いた卵胞の直径と体外胚生産成績の比較	P. 88
1. 目的	P. 88
2. 材料および方法	P. 88
3. 実験区設定	P. 89
4. 結果	P. 89
研究 3 体外生産胚による純粋種豚生産	P. 91
1. 目的	P. 91
2. 材料と方法	P. 91
3. 結果	P. 92
考察	P. 95
総括	P. 97
謝辞	P. 102
参考文献	P. 103

略語説明

AD：オーエスキー病、仮性狂犬病

PRRS：豚繁殖・呼吸障害症候群

SPF：Specific Pathogen Free はあらかじめ指定された病原体をもっていないという意味。

日本 SPF 豚協会の規制対象はオーエスキー病、萎縮性鼻炎、マイコプラズマ肺炎、豚赤痢、トキソプラズマ病である。

IETS：International Embryo Transfer Society、国際胚移植学会

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。分娩した受胚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胚した性成熟雌豚の卵巢を用いた体外生産(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。この結果から、発情 16 日目の卵巢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 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 頭の受胚豚に移植した結果、3 頭すべてが受胎し、うち 2 頭の受胚豚からは計 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。

緒論

ブタにおける胚移植技術の現状

ブタにおける胚移植は、ウシと同年の 1951 年に Kvasnickii が 9 つの胚を受胎豚に移植して 4 頭の子豚を生産したことから始まる。その後も研究は進められ、外科的開腹手術を用いたブタの胚採取ならびに胚移植の手法は 1960 年代前半にほぼ確立し、主にブタの繁殖生理を研究する上で欠かせない実験手段として利用されてきた。一方、産業面では、ウシにおける胚移植技術とは対照的にブタの胚移植が利用発展していく場面はほとんど無かった。ブタは多胎動物であり妊娠期間もウシに比べ短いため、胚移植を用いてまで育種効率を向上させる必要はなく、さらに豚は群として評価されることが多いため、優良種雄牛のように 1 頭が高価値になることが無いためである。

一方、研究機関においては、食肉処理場から肥育豚の卵巣を容易に入手できることから、それらを利用した体外胚生産技術が継続的に研究され、体外生産胚由来の子豚生産も報告されてきた。また、医療機関等においてブタはイヌやネコといった実験動物の代換えとして期待されている他に、臓器の大きさ、血液の成分等がヒトに類似していることから異種間での臓器移植や再生医療、ヒト疾患モデル動物等への応用が期待されてきた。そのような状況下で 2000 年に体細胞クローン豚の作出が成功する (Onishi *et al.* 2000) とヒト移植用臓器開発を目的とした遺伝子導入技術が飛躍的に進むこととなり、医療分野におけるブタの利用を目的とした技術開発は養豚業利用とは対称的に積極的に行われてきた。

養豚産業分野における胚移植利用の課題点

経済的な理由で養豚産業分野において胚移植が普及しにくい理由は前述したが、技術的な面から普及の妨げになっている点も少なくない。まず、胚の回収および胚の移植に開腹手術が必要なことが大きな理由である。そのため、胚移植については非外科的な移植方法の研究が継続的に行われ、産子の生産もある程度の成績が得られるようになってきた (Suzuki *et al.* 2004; Cuello *et al.* 2005; Nakazawa *et al.* 2007; Yoshioka *et al.* 2012)。

一方、胚の採取については、外科手術により子宮角を短縮させて、ウシのように非外科的に連続採胚する試みが報告された (Kobayashi *et al.* 1989; Hazeleger *et al.* 1989) が、確実に胚を採取するためには外科的に子宮角を洗浄する方法しかない。そのため、雌豚1頭から移植可能な胚を連続的に採取するのは非常に困難である。また、ウシ胚に比べるとブタ胚は低温感受性が非常に強く (Polge *et al.* 1974; Pollard *et al.* 1994)、凍結保存技術の確立が非常に遅れていた。そのため、確実な胚移植を実施するためには新鮮胚移植を実施する必要があるため、供胚豚と受胚豚の準備を同時に行う必要がある。さらに、性成熟に達した豚はプロスタグランジン投与で黄体を退行できる期間が非常に限られているため (Diehl *et al.* 1973)、発情同期化にも大きな制限があり、すでに胚移植が産業的に普及しているウシに比べると技術的に未確立な部分が多いことが最大の問題点であった (表1)。

表 1. ブタとウシの繁殖技術の比較(2004 年当時)

繁殖技術	ブタ	ウシ
発情誘起・ 過剰排卵処理	春機発動直前の豚については、ホルモン処理による発情誘起及び過剰排卵処理が効果的に実施されているが、一旦性成熟に達した雌豚については反応の安定性が低い。	一般的に春機発動前の牛は利用されていない。性成熟に達した牛については比較的容易である。
人工授精	液状精液による人工授精が一般的、凍結精液も使用可能だが、産子数は液状精液より少なくなる傾向がある。人工授精の普及率はウシに比べて低い。	凍結精液による人工授精技術が確立されている
採卵	全身麻酔下での開腹手術により、卵管あるいは子宮から直接採取する。	頸管経由による非外科的採卵技術が確立している。
胚の保存	成功例が少なく、再現性も低かったが、最近、成功例の報告が増えつつある。	確立しており、すでに凍結胚が一般的に流通している
胚移植	全身麻酔下での開腹手術により、卵管あるいは子宮へ直接移植する。 頸管経由の非外科的移植の成功例も報告されるようになってきた。	頸管経由による非外科的移植技術が確立している。
体外胚生産技術	食肉処理場に出荷された未性成熟雌豚の卵巣から卵子を採取し、体外培養後に胚を生産する技術が研究されているがウシに比べると胚生産効率は低い。性成熟に達した純粋種豚の卵巣を用いた報告はほとんど無い。	食肉処理場に出荷された雌牛の卵巣から卵子を採取し、体外培養後に胚を生産する技術はある程度確立している。体外生産胚由来の子牛生産もある程度可能。

研究の目的

本研究の目的は、ブタ胚移植技術を養豚業の分野で応用していくための技術開発である。

養豚業で胚移植を利用する最大のメリットとなりうるのは、疾病伝播リスクの可能性が最も低い種豚導入方法として利用できることである。現在の種豚導入方法はほとんどが生体導入であり、次に多いのは液状精液を用いた人工授精である。これらの方法は常にオーエスキー病などの特定疾病侵入の危険性にさらされている。

以上のことから、第 1 章では、最初にオーエスキー病に感染した豚群の胚移植による清浄化を実施し、胚移植による疾病制御の実用性を検討した。さらに、新鮮胚を用いた胚移植による種豚導入実証試験も実施し、現時点での胚移植による種豚導入の有効性を検討した。

次に第 2 章では、ブタ胚移植の利便性を向上させるためにはブタ胚の超低温保存技術が必須であることから、近年、ブタ胚においても成功例が増えてきたガラス化保存方法に着目し、胚による種豚導入に適したガラス化保存方法の開発を行った。

最後に、第 3 章では、優良種豚から効率的に胚を生産する方法の開発につながる基盤技術の確立のために、今まで事例のなかった性成熟に達した豚から採取した卵子を用いて体外胚生産技術を検討し、体外生産胚を用いた種豚生産技術の検討を行った。

第 1 章 胚移植による疾病制御および種豚導入の実証試験

緒言

養豚農場内に新しく導入した種豚や液状精液に存在する病原体により今まで農場内に存在しなかった疾病が蔓延することは少なくない。さらに、AD や PRRS 等の特定疾病の侵入により、種豚等を導入した農場に大きな損害を与えた事例も多い。そのような中で、AD を含めた 5 つの特定疾病を無くした SPF 農場が注目されるようになってきた。SPF 豚生産ピラミッドの頂点となる原々種豚場には子宮切断あるいは帝王切開によりアイソレーター内で子宮から無菌的に子豚(プライマリーSPF 豚)を取り出した後、衛生的な環境下で人工保育により育成されることで母豚からの疾病伝播の危険性を減少させ、特定疾病が存在しない環境下で繋養されている。しかしながら、この方法は子宮内の子豚の甦生を迅速に行う必要があり、子豚の輸送にもアイソレーター等で空気の清浄化と温度管理をする必要がある。そのため、多額の設備と人手が必要である。さらに子宮切断に供用される雌豚は摘出子豚の蘇生率を下げないために簡易な鎮静処理の状態で子宮を摘出され、その後安楽死させることから、最近では畜産分野においても無視できなくなった動物福祉の問題と直面する危険性がある。

一方、疾病に感染している雌豚から採取した胚を適切に処理した後、清浄な雌豚に移植することで供胚親の疾病を制御した報告があり (James *et al.* 1983; Wrathall *et al.* 1995)、最近、国際胚移植学会が今までの研究成果をまとめている (IETS, 1998)。その中で AD については「採卵から移植までの間、胚が適正に取り扱われれば、伝播の危険性は無視できる疾病」として分類された。そこで、本研究では、AD 感染した豚群を胚移植により清浄化する試みを行い、受胚豚および生産された子豚の AD 抗体の推移を調べて清浄化の評価を実施することとした。

さらに、胚移植による疾病制御の事例には上記の報告があるが、実際の種豚育種現場で、胚移植を用いた新しい育種素材導入の事例は見あたらなかった。そこで、胚移植による新しい種豚導入の有効性を評価する目的から、採胚農場に導入した育種素材から胚を採取し、

SPF に準じた移植農場へ新鮮胚で輸送した。そして、移植農場にて輸送胚を移植して産子を得るまでの実証試験を実施し、養豚業における胚移植技術普及のために必要な改善点について検討を行った。

研究1 胚移植を用いたオーエスキー病清浄化実証試験

1. 材料および方法

今回、感染農場の意向により感染種豚の品種については明記を避けている。

1) 供胚豚

感染農場でAD発生時にワクチン接種した雌豚18頭(うち野外株陽性雌豚9頭)を使用した。

2) 交配雄豚

感染農場でAD発生時にワクチン接種した雄豚11頭(うち野外株陽性雄豚5頭)を使用した。

3) 交配方法と胚の区分

感染豚の交配は人工授精で行った。採取した精液はモデナ液で希釈後、使用時まで15°Cで保存した。交配雌および雄豚のAD感染状況により採取した胚の区分を以下の3つに分けた。

清浄豚由来胚(清浄♀×清浄♂)

感染豚由来胚①(感染♀×感染♂)

感染豚由来胚②(感染♀×清浄♂)

4) 胚の回収

AD感染農場で自然発情を利用して、人工授精を行った。雄許容最終日を1日とし、3~6日の午前中に胚を採取した。採取方法は開腹手術により、子宮角分岐部より卵巣方向10cm

付近にバルーンカテーテルを挿入・固定し、片側子宮角に 50 ml のエンブリオテック (日本全薬工業株式会社, 福島) で灌流する方法で両子宮角の胚を回収した。

5) 胚の確認と洗浄方法

採取した胚は透明帯に欠損および付着物が認められない胚を選別し、以下の洗浄を実施した。胚の移動ごとにパスツールピペットを交換した。

1. エンブリオテックで 5 回洗浄
2. 0.25% トリプシン (Cat. No. 15050-065, GIBCO, NY, USA) で 60~90 秒浸漬処理
3. エンブリオテックで 5 回洗浄

6) 胚の封入および輸送

採卵農場と移植農場の接点を断ち切るため、胚の封入には二重の滅菌袋を準備した。ポリスチレン製の小試験管 (FALCON 352003, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を滅菌袋 A (ハイブリッド滅菌バック HM-1330, ホギメディカル, 東京) に入れる。このとき滅菌袋 A の口は開封のままとした。次に一回り大きい滅菌袋 B (ハイブリッド滅菌バック HM-1302, ホギメディカル, 東京) に滅菌袋 A を入れ、口をヒートシールした後にガス滅菌したものを使用した。採卵農場の技術者はポリスチレン製の小試験管及び滅菌袋 A に直接触れないようにし、洗浄した胚を供胚豚毎に小試験管内へ約 3 ml のエンブリオテックと共に封入した。なお、移植農場での技術者は滅菌袋 B に触れることがないようにすることで採卵農場と移植農場の接点を断つようにした。

封入した胚は 38°C の温湯を入れたデュワー瓶に入れて保温した状態で約 3 時間かけて車で移植農場に輸送した。

7) 胚の受け取り

AD 感染農場職員が移植農場にデュワー瓶を届けた。受け取りの際 AD 感染農場職員と胚移植担当者との直接の接触は避けた。胚移植担当者はデュワー瓶を消毒後、胚の納められたポリスチレン製試験管 (AD 感染農場職員は直接触れていない) のみを取りだし、別のデュワー瓶に入れて移動した。

8) 受胚豚

セカンダリーSPF 豚 (プライマリーSPF 豚が自然分娩した豚) の LW 雑種雌豚 (8 ヶ月齢以上) を使用した。

9) 受胚豚の発情同期化方法

人工授精後 16~40 日目の豚に PGF2 α (クロプロステノールとして 0.184 mg, プラネート, 株式会社インターベット, 東京) を頸部筋肉内投与し、その 24 時間後に同量の PGF2 α と eCG 1000 IU (セロトロピン, あすか製薬株式会社, 東京) を頸部筋肉内投与した。eCG 投与 72 時間後に hCG 500 IU (プベローゲン, ノバルティスアニマルヘルス株式会社, 東京) を頸部筋肉内投与した後、雄許容を確認した (Love *et al.* 1993)。雄最終許容日を 1 日として 4 日目に受胚豚として使用した。

10) 胚の移植

胚は到着後、再度 10 回 M2 液 (Quinn, 1982) で洗浄し、透明帯の欠損を確認した。その後、開腹手術した受胚豚、片側子宮角先端部分に PP カテーテル (富士平工業株式会社, 東京) で AD 感染豚由来胚①あるいは②と清浄豚由来胚を混合して移植した (AD 感染豚由来胚①と清浄豚由来胚の受胚豚 6 頭、AD 感染豚由来胚②と清浄豚由来胚の受胚豚 6 頭)。胚を混合する際は、生まれてきた子豚の由来がわかるように毛色の違う品種から採取した胚を

混合した。また、対照区として新鮮胚のみを移植した受胚豚 33 頭を用いた。移植液は M2 液を使用した。

11) 受胚豚の抗体検査

受胚豚は移植手術直前および移植後 3 週時に採血し抗体検査を実施した。分娩した豚については離乳時に採血し抗体検査を実施した。その後は、廃用処理するまで農場の定期衛生検査 (2 ヶ月に 1 回) によって抗体検査を実施した。

12) 子豚の採血

分娩後 2 ヶ月齢時に採血し抗体検査を実施した。その後は、廃用処理するまで農場の定期衛生検査 (2 ヶ月に 1 回) によって抗体検査を実施した。

13) AD 抗体検査方法

ラテックス凝集反応により、AD 抗体を検査した (AD 抗原ラテックス「ゼンノウ」株式会社 科学飼料研究所, 群馬)。

14) 統計処理

受胎率、分娩率、子豚生産率、離乳率については χ^2 乗検定を行った。

2. 結果

AD 野外株抗体陽性豚由来胚を移植した 12 頭中 7 頭が受胎し、分娩した。受胎率および分娩率はそれぞれ感染豚由来胚①区で 66.7% (4/6)、66.7% (4/6)、感染豚由来胚②区で 50.0% (3/6)、50.0% (3/6) および対照区で 51.5% (17/33)、45.5% (15/33) であり、両方とも区間で有意な差は認められなかった (表 2)。

感染豚由来胚を移植した受胚豚は移植後 3 週目の抗体検査は全て陰性であった。また、分娩した 7 頭の離乳時の抗体検査も全て陰性であった(表 3)。なお、受胚豚はその後、廃用されるまでの約 1 年間抗体陰性を維持し続けた。

感染豚由来胚 59 個から 28 頭の子豚が生産された(表 4)。生産された子豚のうち 21 頭が離乳し、2 ヶ月齢時の抗体検査で全頭陰性を示した(表 5)。また、清浄豚由来胚 53 個から 18 頭の子豚が生産され、全頭が離乳し、2 ヶ月齢時の抗体検査では全頭陰性を示した。子豚生産率および離乳率はそれぞれ感染豚由来胚①区で 38.5% (25/65)、95.5% (21/23)、感染豚由来胚②区で 44.7% (21/47)、85.7% (18/21)および対照区で 43.1% (110/255)、95.0% (96/101)と両方とも区間で有意な差は認められなかった。

表 2. 受胎結果

	移植頭数	受胎頭数(受胎率%)	分娩頭数(分娩率%)
对照区(清浄豚由来胚)	33	17 (51.5)	15 (45.5)
感染豚由来胚①	6	4 (66.7)	4 (66.7)
感染豚由来胚②	6	3 (50.0)	3 (50.0)

表 3. 受胚豚の抗体検査結果

No.	移植前	移植胚数 (AD 感染豚由来胚数)	移植 3 週間後	受胎結果	離乳時
1	陰性	17 (11)	陰性	○	陰性
2	陰性	16 (8)	陰性	○	陰性
感染豚 由来胚①	3 陰性	23 (12)	陰性	○	陰性
4 陰性	9 (5)	陰性	○	陰性	
5 陰性	26 (7)	陰性	×	陰性	
6 陰性	21 (9)	陰性	×	陰性	
7 陰性	13 (6)	陰性	○	陰性	
8 陰性	15 (5)	陰性	○	陰性	
感染豚 由来胚②	9 陰性	19 (12)	陰性	○	陰性
10 陰性	11 (11)	陰性	×	陰性	
11 陰性	21 (15)	陰性	×	陰性	
12 陰性	13 (11)	陰性	×	陰性	

表 4. 受胎成績

	分娩豚への 総移植胚数 (母豚数)	子豚数 (死産)	子豚生 産数 (%) [*]	離乳頭数	離乳率 (%) ^{**}
対照区(清浄豚由来胚)	255 (15)	110 (9)	43.1	96	95.0
感染豚由来胚①	36	21 (2)	58.3	17	89.5
清浄豚由来胚	29	4 (0)	13.8	4	100
計	65 (4)	25 (2)	38.5	21	95.5
感染豚由来胚②	23	7 (0)	30.4	4	57.1
清浄豚由来胚	24	14 (0)	58.3	14	100
計	47 (3)	21 (0)	44.7	18	85.7

*子豚生産率 (%) = 分娩子豚頭数 / 移植胚数

**離乳率 (%) = 離乳頭数 / (分娩頭数 - 死産頭数)

表 5. 子豚の抗体検査結果

	検査頭数	AD 抗体検査結果
対照区(清浄胚由来胚)	95	陰性
感染豚由来胚①	17	陰性
混合した清浄胚由来胚	4	陰性
計	21	陰性
感染豚由来胚②	4	陰性
混合した清浄胚由来胚	14	陰性
計	18	陰性

研究 2 胚移植による種豚導入実証試験

1. 材料および方法

1) 供胚豚

採胚農場で繋養しているデュロック種雌豚 16 頭、大ヨークシャー種雌豚 16 頭(ともに月齢 10 ヶ月以上の性成熟豚)を使用した。

2) 交配雄豚

採胚農場で繋養しているデュロック種雄豚 3 頭、大ヨークシャー種雄豚 3 頭(月齢 10 ヶ月以上の性成熟豚)を使用した。

3) 供胚豚の過剰排卵・発情同期化処理および交配

研究 1 の受胚豚と同様な方法で同期化したが、過剰排卵のため eCG の投与量を 1500IU に変更した。hCG 投与翌日と翌々日に供胚豚と同じ品種の精液で人工授精を行った。hCG 投与翌日を 0 日として 5 日目に供胚豚として使用した。

4) 胚の回収方法

採取方法は開腹手術により、子宮角分岐部より卵巣方向 10 cm 付近にバルーンカテーテルを挿入・固定し、片側子宮角に 50 ml の M2 で灌流する方法で両子宮角の胚を回収した。

5) 胚の確認と洗浄方法

採取した胚は透明帯に欠損および付着物が認められない胚を選別し、以下の洗浄を実施した。胚の移動ごとにパスツールピペットを交換した。

1. M2 で 5 回洗浄

2. 0.25%トリプシンで 60~90 秒浸漬処理

3. M2 で 5 回洗淨

6) 胚の封入および輸送

研究 1 と同様に、二重の滅菌袋を準備し、洗淨した胚を供胚豚毎に小試験管内へ約 3 ml の M2 と共に封入した。封入した胚は 38℃の温湯を入れたデュワー瓶に入れて保温した状態で約 3 時間かけて車で移植農場に輸送した。

7) 胚の受け取り

研究 1 と同様に実施した。

8) 受胚豚

移植農場で繋養されていた中ヨークシャー13 頭およびデュロック種 16 頭を用いた。輸送されたデュロック種胚は中ヨークシャー種に大ヨークシャー種胚はデュロック種に移植した。

9) 受胚豚の発情同期化方法

研究 1 と同様に実施した。

10) 胚の移植

胚の到着後、再度 10 回 M2 液で洗淨し、透明帯の欠損を確認した。その後、開腹手術した受胚豚の片側子宮角先端部分に PP カテーテルで移植した。

本移植により得られた子豚については育種素材として利用するために血統登録を取得する必要があった。日本において種豚血統登録を実施している社団法人日本種豚登録協会(現日本養豚協会)が定める「受精卵移植による生産豚の登録取り扱い要領」には、原則として「生産豚の子豚登記または血統登記を受けようとする者は、受卵豚に対し、一度に 2 腹以

上の供卵豚の受精卵を移植してはならない。」と記載されている。そのため、1 頭から採取した 1 回分の胚を 1 頭の受胚豚に移植した。

2. 結果

1) 採胚結果

デュロック種 16 頭中 13 頭から 1 頭あたり平均 17.2 個の移植可能胚を採取できた。大ヨークシャー種は 16 頭すべてから 1 頭あたり平均 22.7 個の移植可能胚を採取できた(表 6)。

2) 移植結果

デュロック種胚を移植した 13 頭中 9 頭が分娩し、一腹平均産子数は 6.9 頭であった。大ヨークシャー種胚を移植した 16 頭中 11 頭が分娩し、一腹平均産子数は 6.6 頭であった(表 6~8)。生産した子豚は種豚選抜を行った。合格した豚は血統登録を実施した後、種豚として通常の繁殖を行い、新育種群を造成した。

表 6. 採胚成績

	頭数	平均排卵数	平均回収卵数	平均移植可能胚数
デュロック	13	22.0 ± 6.7	21.2 ± 7.3	17.2 ± 6.2
大ヨークシャー	16	31.5 ± 11.3	29.3 ± 9.8	22.7 ± 7.9

平均 ± 標準偏差

表 7. 移植成績

	移植頭数	受胎頭数 (受胎率%)	分娩頭数 (分娩率%)
デュロック胚	13	9 (69.2)	9 (69.2)
大ヨークシャー胚	16	11 (68.7)	11 (68.7)

平均 ± 標準偏差

表 8. 分娩成績

	分娩頭数	移植胚数(1 腹平均)	分娩頭数(1 腹平均)	子豚生産率(%)*
デュロック胚	9	155 (17.2±6.2)	62 (6.9±2.5)	40.0
大ヨークシャー胚	11	250 (22.7±7.9)	73 (6.6±3.9)	29.2

*子豚生産率 = (分娩頭数/移植頭数) × 100

考察

本章は当時すでに確立された手法を用いて、ブタ胚移植による AD の清浄化および育種業務を実施している農場への新しい育種素材導入に胚移植を利用した。

1983 年に James *et al.* が AD 感染豚群を胚移植によって清浄化を行い、国内においては小栗ら (1988) が同様に胚移植を用いて AD 感染豚群の清浄化に成功している。研究 1 は小栗らの報告を参考に実施した結果、AD に感染した供胚豚から採取した胚を的確な処理を施した後に清浄な受胚豚に移植することで、受胚豚への AD の感染は認められず、AD 感染豚由来胚から清浄な子豚が生産できた。さらに今回は AD 感染豚由来胚と清浄豚由来胚を同時に同じ子宮内に移植したが子宮内において、AD 感染豚由来胚から清浄豚由来胚への水平感染も認められなかった。以上のことから本例においても目的とする AD の清浄化を達成することができた。このような研究は他の研究機関や施設においてさらに検証することは困難であると考えられることから、本研究結果は、胚移植が AD の疾病制御に有効なことがあらためて確認できた重要な事例のひとつになりうる。

研究 2 において、採胚農場および移植農場において外科的に採胚および移植が可能であったことから、胚移植による種豚導入の実証試験を実施した。方法のところで述べたが、「生産豚の子豚登記または血統登記を受けようとする者は、受卵豚に対し、一度に 2 腹以上の供卵豚の受精卵を移植してはならない。」という厳密な規定がある。そのために、移植に供する胚の数をなるべく多く確保するため、今回は供胚豚に過剰排卵処理を実施し胚の回収を行った。その結果、両品種とも平均で 17~22 個程度の移植可能胚を採取することができた。今回の供胚豚および受胚豚は性成熟に達していたため、初期妊娠豚を PG 投与により流産を誘発させて発情を誘起する方法を実施した (Love *et al.* 1993)。新鮮胚移植を実施するためには受胚豚と供胚豚を同時に発情誘起する必要があり、さらに今回は供胚豚ならびに受胚豚の頭数も限られた状態であったが、すべての豚がこの方法で発情誘起することができた。今回の受胎成績も 65%を超えることができ、平均一腹産子数も 6 頭以上の

成績であった。そのため、子宮切斷等により作出された SPF 豚と同等以上の疾病制御された種豚を胚移植によって導入することが可能になれば養豚産業で胚移植を利用するニーズは生まれてくると思われる。

今回の胚移植を実施するにあたり、最も改善が必要と思われたのが、胚の採取と移植を同日中に実施しなければならないことであった。また、新鮮胚の輸送では利用範囲が非常に限定されてしまうことから、ブタ胚の超低温保存技術の確立がブタ胚移植の普及のためには必要不可欠であることを再確認するに至った。

このことをふまえ、次章では胚の超低温保存に関する実験を実施した。

第2章 ブタ胚の超低温（ガラス化）保存試験

緒言

ブタ胚は低温感受性が非常に高く、培養液内で 15°C 以下の温度にさらすと死滅することが報告されている (Polge, 1974; Pollard and Leibo, 1994)。このことから、ウシ胚で実施されているプログラムフリーザーを用いた胚の緩慢凍結による凍結保存は困難と考えられていた。しかしながら、1991 年に小栗らは比較的耐凍性を有するとされている透明帯から脱出前後の胚盤胞を用いて凍結胚から産子の生産に成功し、Kashiwazaki *et al.* (1991) は、拡張胚盤胞を 24 時間培養して得られた脱出胚盤胞を緩慢凍結し子豚を得たことを報告している。緩慢凍結法を克服する手法として、後述するガラス化冷却が考案された。ブタでは、1998 年に小林ら (1998) が 0.25m l ストローを用いたガラス化保存した透明帯から脱出前後の胚盤胞の移植により子豚の生産に成功している。しかしながら、新鮮胚移植に比べると分娩率は低く、産子数も少ない成績であり、安定的な技術には至っていなかった。さらに、ブタ胚の低温感受性は細胞に含まれる多量の脂質が関係していると示唆され、長嶋ら (1995) は、遠心処理により胚盤胞より若い発育ステージの細胞内の脂肪顆粒を偏在させた後、マイクロマニピレーターを用いて脂肪顆粒を細胞内から取り除く事で胚の耐凍性が向上する事を報告した。そして、細胞内の脂肪を取り除いた胚を凍結保存した後、その胚を受胎豚に移植することで産子の生産に成功した。

このように、ブタ胚の超低温保存に関する取り組みが継続的に研究されてきた。一方、緒論および第 1 章で述べたようにブタ胚を養豚産業で用いる一番重要なメリットは疾病制御にある。移植にあたり、感染を防御する方法として透明帯の存在する (透明帯に包まれた) 胚をトリプシン処理する手法が執られている (IETS, 1998)。言い換えると、そのためには、トリプシン処理に耐えうる透明帯の存在が必須である。しかしながら、上記の成功例の胚は大半が完全な透明帯を有していなかった。そのため、養豚現場で利用を考慮した場合、完全な透明帯をもつ拡張胚盤胞より若い発育ステージの胚を保存する事が重要となる。この発育ステージの胚の緩慢冷却・凍結保存を行うことはきわめて困難であった。このよう

な問題を克服するために、少量のガラス化液とともに胚を直接液体窒素中に投入するガラス化（超急速ガラス化）方法が、ほ乳動物胚では、1985年に Rall *et al.* によりマウスにて初めて報告開発され、最近になって、各動物種の卵子や胚を含む微量のガラス化液を様々なツールや手法を用いたガラス化液冷却の成功例が報告されるようになった (Martino *et al.* 1996; Vajta *et al.* 1998; Begin *et al.* 2003; Kuwayama *et al.* 2007)。ブタ胚においても Bethelot *et al.* が 2002 年にオープンブルドストロー (OPS) 法を用いてガラス化保存した拡張胚盤胞を外科的に移植することで 80%前後の受胎率を報告した。ガラス化保存法の長所は、高濃度の耐凍剤に曝した胚を急速に冷却するため、緩慢凍結法で最も危惧される低温傷害や氷晶による物理的ならびに化学的傷害が生じないことが挙げられる。逆に問題点として胚が高濃度の耐凍剤による化学的毒性とガラス化液への平衡・希釈時の浸透圧ショックに曝されることである。超急速ガラス化方法では、従来のガラス化保存法よりもガラス化時の液量を少なくすることで冷却・融解速度をさらに早くすることが可能になるから、耐凍性の低かった様々な種の胚や卵子のガラス化保存に応用されており、Beebe *et al.* (2002) は、OPS 法を用いて完全な透明体を持つブタ胚盤胞のガラス化保存に成功した。さらに極最近では、非常に困難とされていたブタ体外生産胚や卵子においても成功例が報告されるようになった (Somfai *et al.* 2009; Maehara *et al.* 2012)。

ブタ胚盤胞のガラス化保存で成功例が報告された OPS 法と同様、超急速ガラス化保存法の 1 つにマイクロドロップレット法がある (Papis *et al.* 2000)。マイクロドロップレット法が、ウシ未受精卵子の融解後の生存性を高めるのに有効という報告はあるが、ブタ胚に応用した例はこれまでなかった。今回、マイクロドロップレット法を応用して、第 1 章の試験で用いた完全な透明帯を有する 5 日目胚 (収縮桑実胚～初期胚盤胞) のガラス化保存を試みた。

一方、超急速ガラス化は冷却速度を速くするために、液体窒素に胚を直接投入する必要がある。そのため液体窒素中に細菌や、真菌あるいはウイルス等の病原体が存在する場合、それらによってガラス化する胚が汚染される危険性が生じるという新たな問題点が生じて

きた。再度繰り返すことになるが、ブタにおける胚移植の最大のメリットが疾病制御であることから、この問題についても改善が必須と考えられた。そこで、胚を含むガラス化液を直接液体窒素に接触させずにガラス化する Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法を考案し、将来的にガラス化保存胚で種豚を輸送するために適したガラス化保存方法の検討を行った。

研究1 マイクロドロプレット法によるブタ胚のガラス化保存試験

1. 目的

完全な透明帯を有する5日目胚をマイクロドロプレットを用いてガラス化保存し、加温した胚の生存性を対外培養ならびに胚移植によって検討した。

2. 材料および方法

1) 供胚豚

月齢8ヶ月以上のランドレース×大ヨークシャー雑種(LW)およびLW×デュロック雑種(LWD)38頭を使用した。

2) 交配雄豚および精液処理

12ヶ月齢以上のデュロック種2頭およびメイシャン種1頭。採取した精液はモデナ液で希釈後、使用時まで15°Cで保存した。

3) 供胚豚の過剰排卵・発情同期化処理および交配

第1章の研究2と同様に実施した。

4) 胚の回収方法

第1章の研究2と同様に実施した。

5) 各溶液の準備

平衡液及びガラス化液は、4-ウエルプレート(Multidish 4 wells, Nunc, Denmark)の1番目のウエルに10% (v/v)エチレングリコール(和光純薬工業株式会社, 大阪)を添加したM2液(ES1)を1 ml、2番目のウエルに10% (v/v)エチレングリコール、0.3 Mショ糖(関東

化学株式会社, 東京)、1% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG #6000 分子量 7300~9000, ナカライテスク株式会社, 京都) を添加した M2 液 (ES2) を 1ml、3、4 番目のウェルには 40% (v/v) エチレングリコール、0.6 M ショ糖、2% (w/v) ポリエチレングリコールを添加した M2 液 (ESP) を 1ml ずつ入れ、それぞれを洗浄用、ガラス化用とした。各溶液は 38°C に保温した。融解及び希釈液は、35 mm のシャーレ (35.0 / 10 MM, Greiner, Germany) に 5% (v/v) エチレングリコール、0.6 M ショ糖を添加した NCSU23 液 (Petters *et al.* 1991) (DS1) を 3 ml 入れた。4-ウェルプレートに DS1 を 1 ml、2 番目のウェルに 2.5% (v/v) エチレングリコール、0.3 M ショ糖と添加した NCSU23 液 (DS2) を 1 ml、3 番目のウェルに、0.3 M ショ糖を添加した NCSU23 液 (DS3) を 1 ml、4 番目のウェルに NCSU23 液を 1 ml ずつ入れた。各溶液は 39°C に保温した (表 9)。

6) マイクロドロップレット法による胚のガラス化および加温・希釈方法

胚を ES1 に移して、5 分間平衡した後、ES2 に移して 5 分間平衡した。ES2 の平衡後に胚を洗浄用 ESP へ移した後、直ちにガラス化用 ESP に移した。その後、胚をパスツールピペットで吸い、ピペットの先端に胚を含んだ ESP 約 1 μ l の微小水滴を形成した。次に、微小水滴を液体窒素液面上に移動し、微小水滴の表面の固化を確認した。その後、微小水滴をパスツールピペットとともに液体窒素内に浸漬し、微小滴から約 1 cm の部分をヤスリで切断して、マイクロドロップ内に封入した胚を液体窒素中に切り離した。胚を ESP 液に移してから液体窒素に浸漬するまでの作業は 30 秒以内におこなった (図 1)。ガラス化した胚は液体窒素に浸漬した状態でチューブ内に液体窒素が充満するようにふたの部分に穴をあけた凍結保存用チューブ (Cryogenic vial, 2 ml, ATG, 東京) に入れて液体窒素内に保存した。加温時は液体窒素を入れた乳鉢に凍結胚を入れたマイクロチューブの中身を移した。ガラス化保存胚をピンセットでつまみ、38°C の DS1 が入った 35 mm のシャーレにガラス化保存胚を入れた。微小水滴が液化したら、直ちに胚を 4-ウェルプレートの DS1 へ移して 5 分間希釈、続いて DS2、DS3 でそれぞれ 5 分間希釈し、最後に NCSU23 で 5 分間希釈した。

7) ストローによる胚のガラス化

マイクロドロップレット法と同じ方法で胚の平衡と ESP での洗浄を行った。次に、あらかじめ DS1 を吸った 0.25 ml ストローに空気層を挟んで胚を含んだ ESP を吸った後、ストローの口をヒートシールし、液体窒素内に投入した。加温時は液体窒素中から取り出したストローを 38°C の温湯に投入した。ストロー内の溶液が液化したらただちにストロー内の液を空のシャーレ内に出した。その後、胚を取りだし、マイクロドロップレット法と同じ方法で希釈した。

8) ガラス化保存胚の体外培養

融解後の胚は、5% CO₂、39°C のインキュベーター内で 10% ウシ胎子血清 (FBS) を添加した NCSU23 で培養した。

9) 受胚豚

月齢 8 ヶ月以上の LW および LWD 合計 5 頭

10) 受胚豚の発情同期化方法

第 1 章の研究 1 と同様に実施した。

11) ガラス化保存胚の移植

移植は開腹手術により受胚豚の片側子宮角先端部分に PP カテーテルを用いて胚を移植した。移植液は M2 液を使用した。

12) 統計処理

胚の生存率および脱出胚盤胞率は χ^2 乗検定を実施し、有意性を検討した。

3. 実験区設定

1) 体外培養試験

一腹から採取した胚を無作為に、マイクロドロップ(MD)区、0.25 ml ストロー(ST)区、ガラス化冷却しない対照(Control)区に分けた。MD区はマイクロドロプレット法、ST区は0.25 ml ストローを用いてガラス化保存した胚を加温し、体外培養した。対照区は新鮮胚を体外培養した。体外培養した胚は24時間後、48時間後の生存性および48時間後の脱出胚盤胞率を調べた。

2) 胚移植試験

MD法を用いてガラス化保存した胚を加温し、5頭の受胎豚に一腹あたり30～35個の加温胚を移植した。

4. 結果

1) 体外培養試験

結果は表10に示した。24時間後の生存率は、ST区が対照区に比べ有意に低い値となった($P < 0.05$)がMD区とControl区に有意な差は認められなかった。48時間後の生存率および脱出胚盤胞率は24時間後と同様にST区がControl区より有意に低い値となった。また脱出胚盤胞率についてはMD区に比べても有意に低い値となった。一方、生存率および脱出胚盤胞率においてMD区とControl区に有意な差は認められなかった。

2) 胚移植試験

5頭の受胎豚に計171個のガラス化保存胚を移植した結果、5頭の受胎豚すべての受胎を確認できた。しかしながら、3頭の受胎豚が妊娠26、31、36日目に流産した。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(表11および及び図3)。

体外培養試験および胚移植試験の結果より、MD法を用いてブタ桑実胚および初期胚盤胞をガラス化保存することが可能であることが示された。しかしながら、受胎分娩成績は第1章の新鮮胚移植の成績よりかなりの差があるため、さらなる改善が必要となった。

また、MD法は胚を含むガラス化液を液体窒素中に直接投入することから、衛生面も重視した手法が必要であると思われた。したがって、次項では、新たなガラス化器具を作製し、それを用いたブタ胚のガラス化保存法を確立することとした。

表 9. ガラス化液及び融解・希釈液

平衡液及びガラス化液	融解及び希釈液
ES1 (M2 + 10% EG)	DS1 (NCSU23 + 5% EG + 0.6 M Suc)
ES2 (M2 + 10% EG + 0.3 M Suc + 1% PEG)	DS2 (NCSU23 + 2.5% EG + 0.3 M Suc)
ESP (M2 + 40% EG + 0.6 M Suc + 2% PEG)	DS3 (NCSU23 + 0.3 M Suc)

*EG: エチレングリコール, Suc: ショ糖, PEG: ポリエチレングリコール

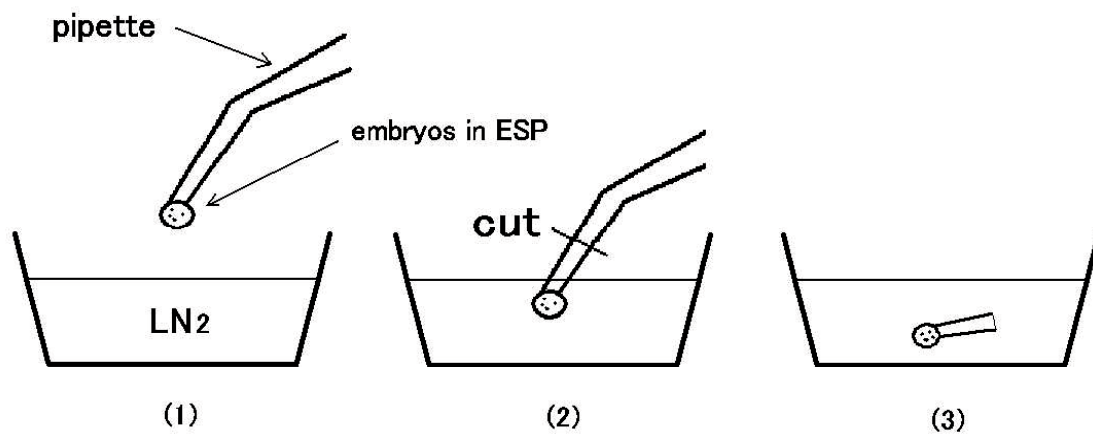


図 1. マイクロドロプレット法

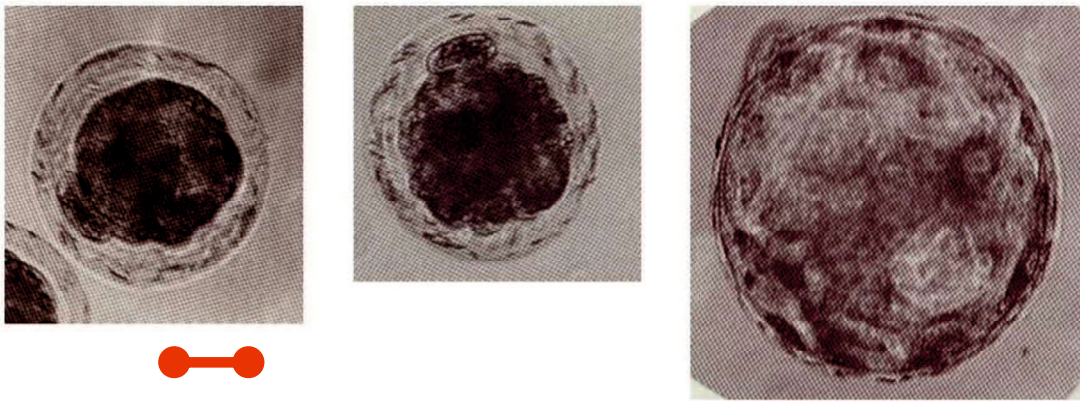
(1) 胚を含んだガラス化液の微小滴 (約 $1 \mu\text{l}$) をパストゥールピペットの先端に形成した後、液体窒素液面上でガラス化液を冷却する。(2) ピペットの先端を液体窒素に投入し、ピペットの先端から約 1 cm の部分を切り落とす。(3) 胚を含むガラス化液が付着したピペットの先端部分を液体窒素中で保存する

表 10. 体外培養試験結果

	胚数	生存数 (個)		脱出胚盤胞数
		24 h 後	48 h 後	48 h 後
MD	23	21 ^{ab}	16 ^{cd}	14 ^e
ST	20	14 ^a	10 ^c	4 ^f
Control	20	20 ^b	19 ^d	16 ^{eg}

MD: マイクロドロップレット区, ST: ストロー区, Control: 5 日目新鮮胚

^{a-b}, ^{e-f} 有意差あり (P < 0.05)。 ^{c-d}, ^{f-g} 有意差あり (P < 0.01)。



(A)

(B)

(C)

図 2. 加温後のガラス化保存胚

(A) ガラス化前、(B) 加温直後、(C) 加温 24 時間後

Bar = 100 μ m

表 11. ガラス化保存胚の移植成績

受胚豚 No.	移植胚数	受胎結果	子豚頭数(子豚生産率)	備考
1	36	+	0 (0)	26 日目流産
2	35	+	0 (0)	36 日目流産
3	35	+	0 (0)	31 日目流産
4	35	+	11 (31.4)	
5	30	+	6 (20.0)	
計	171		17 (9.9)	



図 3. ガラス化胚由来産子

研究2 Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法によるブタ胚のガラス化保存試験

1. 目的

胚を含むガラス化液を液体窒素に接触させずにガラス化保存する Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法を開発し、ブタ拡張胚盤胞のガラス化保存後の生存性を超急速ガラス化器具として市販化されているクライオトップと比較することで MVAC 法の有効性を検討した。

2. 材料と方法

1) 供胚豚

月齢 8 ヶ月齢以上のランドレース種 7 頭およびデュロック種 10 頭、合計 17 頭の性成熟雌豚を用いた。

2) 交配雄豚および精液処理

12 ヶ月齢以上のランドレース種 2 頭およびデュロック種 3 頭を用いた。採取した精液はモデナ液で希釈後、使用時まで 15°C で保存した。

3) 供胚豚の過剰胚卵・発情同期化および交配

第 1 章の研究 2 と同様に実施した。hCG 投与翌日と翌々日に供胚豚と同じ品種の精液で人工授精を行った。hCG 投与翌日を 0 日として 6 日目に供胚豚として使用した。

4) 胚の回収方法

第 1 章の研究 2 と同様に実施した。

5) 各溶液の準備

基本液は、20 mM HEPES を添加した PZM-5 (Yoshioka *et al.* 2008) (H-PZM-5) を使用した。平衡液 1 (EM1) は 1.8 M エチレングリコール (EG) を基本液に添加した。同様に平衡液 2 (EM2) は 1.8 M EG、0.3%トレハロース (和光純薬工業株式会社, 大阪) および 1% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG #6000) を添加し、ガラス化液 (ETP) は 6 M EG、0.6%トレハロースおよび 2% (w/v) PEG を添加した。加温希釈液 (WDM) は 1.8 M EG、0.3%トレハロースを基本液に添加した。すべての溶液は使用時に 38°C に保温した。

6) MVAC 用ガラス化器具

胚を含むガラス化液をステンレス製の U 字の板に付着させて、あらかじめ冷却した 0.25 ml ストロー内の空気で胚を冷却する器具を自作した (図 4)。

7) MVAC 法による胚のガラス化および加温・希釈方法

0.25 ml ストローの綿栓側にステンレスボールをはめ、反対側にはプラスチック製の栓 (Marker Rod, Cryo Bio System Group I.M.V Technologies, France) をはめて、ストローを密閉した状態にする。その後、液体窒素が入った発泡スチロール内に試験管立て等を使用して、綿栓側が下になるようにストローを立てた状態で冷却した。採取した胚 (4~15 個) を EM1 に移して、5 分間平衡した後、EM2 に移して 5 分間平衡した。EM2 の平衡後に胚を洗浄用 ETP へ移した後、直ちにガラス化用 ETP に移した。その後、胚をパスツールピペットで吸い、MVAC 用ガラス化器具のステンレス板上の先端部分に胚を含むガラス化液 (約 1 μ l) を薄く伸ばした。その後、冷却していたストローのプラスチック栓を外した後、ガラス化器具のステンレス板の部分からストローに差し込み、ガラス化器具のプラスチック部分をストローにしっかりとはめ込んだ。その後、ガラス化器具をストローケーンに移して液体窒素タンク内で保存した (図 5)。

加温・希釈方法は、あらかじめ 38℃に加温した WDM を 5 ml シリンジ内に 3 ml 吸い、ストローからガラス化器具を抜き取り、5 ml シリンジの針を装着する部分の穴に胚の付着したステンレス板部分を差し込み、WDM 液内に投入した。その状態で 5 分間胚を加温および希釈した後、ガラス化器具をシリンジから取り除き、シリンジ内の WDM を 35 mm シャーレに出し、胚を回収した(図 6)。回収した胚は H-PZM-5 に移した後、体外培養あるいは移植に供用した。

8) クライオトップによるガラス化保存方法

クライオトップ(Kitazato BioPharma, 静岡)(図 7)によるガラス化保存方法は Ushijima *et al.* (2004)の方法を参考にした。採取した胚は MVAC 法と同じ方法でクライオトップ 1 本あたり 4~6 個の胚を同時に平衡した。その後、ETP に胚を移して洗浄を行った後、パスツールピペットでクライオトップのフィルム部分に胚を含んだガラス化液を乗せた後、胚のまわりの余分なガラス化液をパスツールピペットで吸い取った。その後、胚を乗せてフィルム部分を直接液体窒素内に投入し、液体窒素内でフィルム部分を付属のストローでカバーした。クライオトップをストローケーンに移して液体窒素タンク内で保存した(図 8)。加温・希釈方法は、あらかじめ 38℃に加温した WDM 3 ml を 35 mm シャーレに入れておき、クライオトップのフィルム部分を WDM に投入した。胚がフィルムから遊離したのを確認した後、クライオトップのフィルム部分を WDM から取りのぞき、その状態で 5 分間胚を希釈した後、胚を回収した。回収した胚は H-PZM-5 に移した後、体外培養あるいは移植に供用した。

9) ガラス化保存胚の体外培養

融解後の胚は、5% CO₂、5% O₂、39 °Cのインキュベーター内で 10% FBS を添加した PZM-5 で培養した。

10) 受胚豚

月齢 8 ヶ月以上の LW および LWD 合計 5 頭を使用した。

11) 受胚豚の発情同期化方法

第 1 章の研究 1 と同様に実施した。

12) ガラス化保存胚の移植

移植は開腹手術により受胚豚の片側子宮角先端部分に PP カテーテルを用いて胚を移植した。移植液は H-PZM-5 を使用した。

13) 統計処理

パーセントで得られたデータは、分析の前にアークサイン変換を行った (Snedecor and Cochran, 1989)。それらを一元配置の分散分析 (ANOVA) で解析し、解析モデルが有意と判断された場合は Tukey の平均値の多重比較検定を行った。解析は、Statistical Analysis System (version 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA) で行い、有意差の水準を $P < 0.05$ と設定した。

3. 実験区設定

1) 体外培養試験

一腹から採取した胚を無作為に、自作ガラス化器具 (MVAC) 区、クライオトップ (CT) 区、対照 (Control) 区に分けた。MVAC 区ならびに CT 区では、これらの器具を用いてガラス化保存した胚を加温し、体外培養した。対照区は新鮮胚を体外培養した。体外培養した胚は 48 時間後の生存性および脱出胚盤胞率を調べた。

2) 胚移植試験

MVAC 区ならびに CT 区を用いてガラス化保存した胚を加温した後、MVAC 区と CT 区のガラス化加温胚をそれぞれ 5 頭ずつの受胚豚に外科的に移植した。1 頭あたりの移植胚数は 1 腹採取分 (8~15 個) で実施し、各試験区の子豚生産率 (総産子数/総移植胚数) を比較した。

4. 結果

1) 体外培養試験結果

培養 48 時間後の生存率は MVAC 区が 88.9%、CT 区が 91.7%および Control 区が 100%で有意差はみられなかった。脱出胚盤胞率は MVAC 区が 69.4%、CT 区が 63.9%および Control 区が 94.1%で Control 区が他の試験区より有意に高かった ($P < 0.01$) (表 13)。

2) 胚移植試験

MVAC 区は受胚豚 5 頭中 3 頭が受胎分娩し、合計 8 頭の子豚を生産した。CT 区は受胚豚 5 頭中 2 頭が受胎分娩し、合計 9 頭の子豚を生産した。子豚生産率は MVAC 区で 12.5% (8 頭/64 個)、CT 区で 13.6% (9 頭/66 個) で有意差は認められなかった。

体外培養試験および移植試験の結果から、MVAC 法でガラス化保存したブタ拡張胚盤胞はクライオトップを用いた場合と同等の生存性があることが示された。そのため、次項では、完全な透明帯を有する桑実胚~胚盤胞についての有効性について検討することとした。

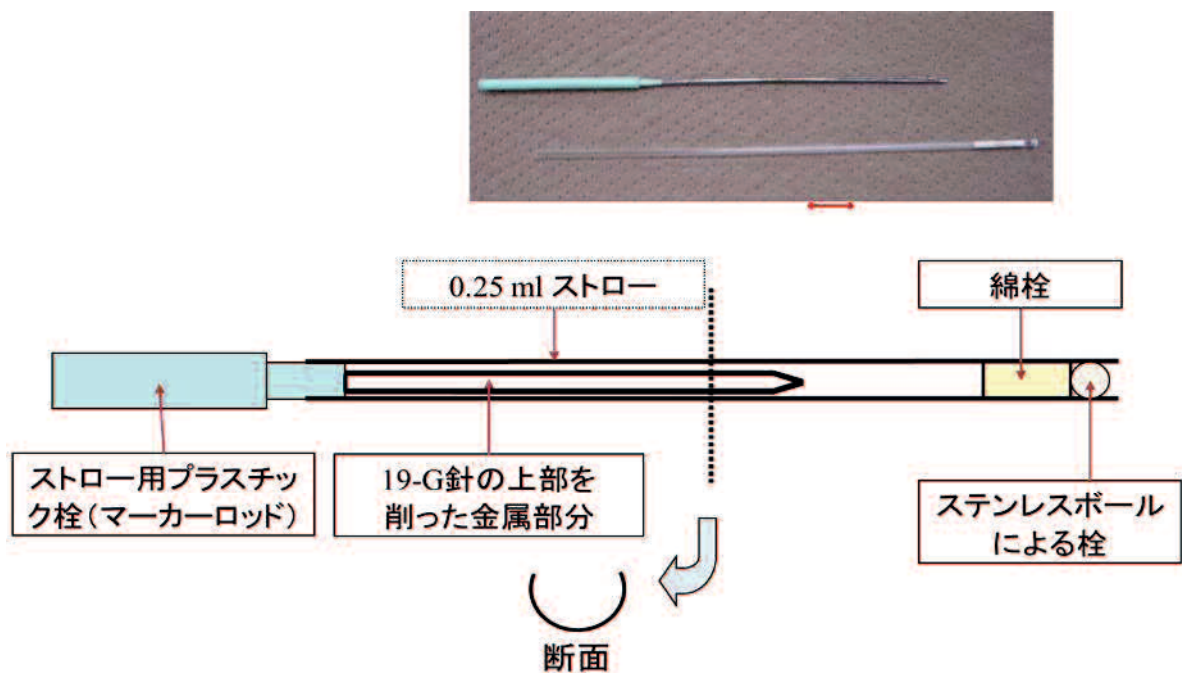


図 4. MVAC 法用自作ガラス化器具

19-G カテラン針(ニプロ株式会社, 大阪)とストロー用プラスチック製栓より作製した。針の上部を削って断面が U 字になるように加工した。そして針のプラスチック製のコネクタを取り除きストロー用プラスチック製に接着した。Bar = 1 cm。

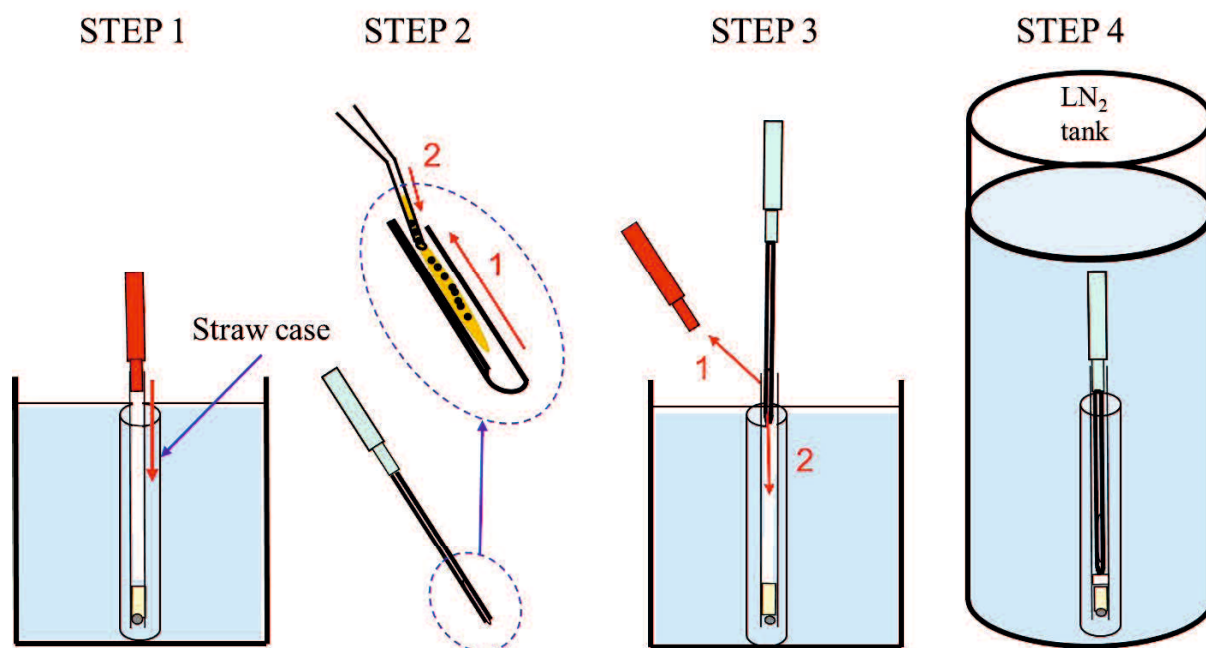


図 5. MVAC 法ガラス化方法

STEP 1: 0.25 ml ストローにプラスチック製の栓（赤色）をはめてストロー内に液体窒素が入らないようにした状態のまま液体窒素中で冷却しておく。STEP 2: 平衡液での平衡が終わった胚(4~15 個)を約 1 μ l ガラス化液と共にガラス化器具の金属部分の溝に薄くのばす。STEP 3: あらかじめ冷却しておいたストローを液体窒素の水面より上に持ち上げ、プラスチック栓(赤色)を取り外す。そして、ストロー内に液体窒素が入ってこないように注意しながら胚を付着させたガラス化器具をストロー内に差し込む。STEP 4: ガラス化器具を液体窒素タンク内で保存する。

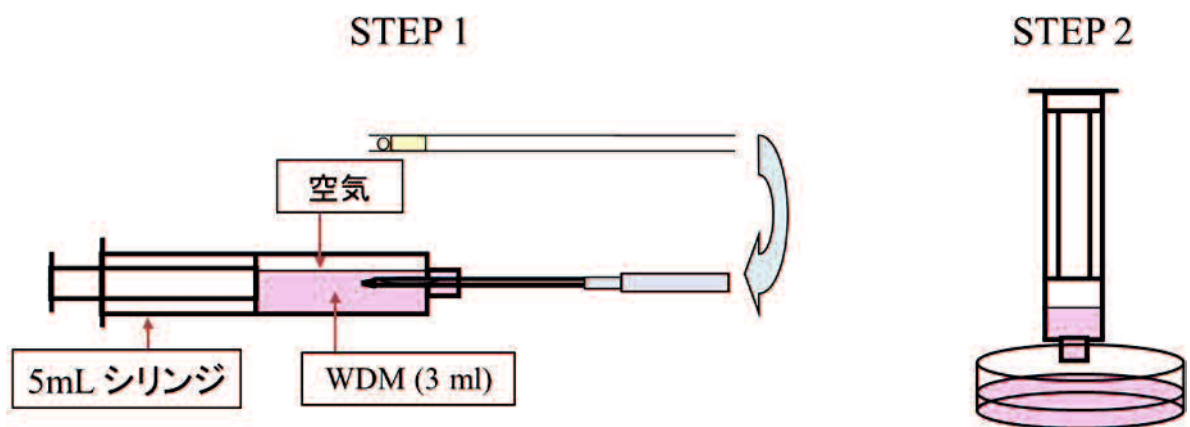


図 6. MVAC 法加温方法

STEP 1: ガラス化器具をストローから取り外す。38℃に保温した3 ml の WDM を 5 ml シリンジに吸っておく。シリンジの針をつける部分からガラス化器具を差し込み、そのまま胚を WDM 内で 5 分間希釈する。STEP 2: 胚を含む WDM を 35 mm シャーレ内に出して胚を回収する。

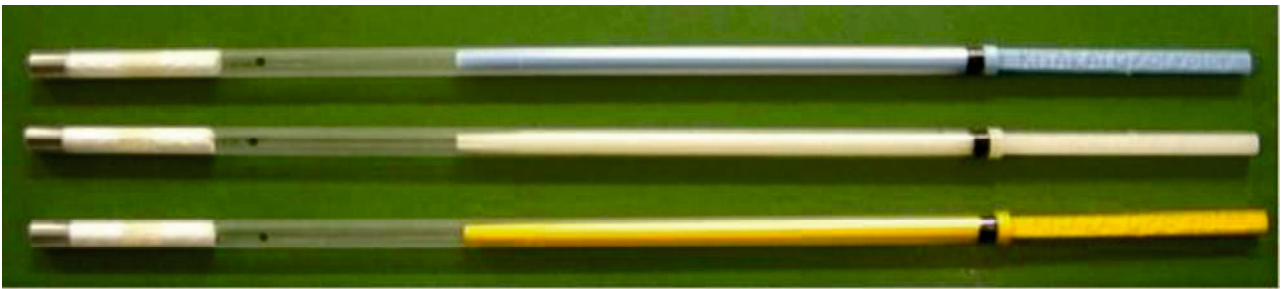
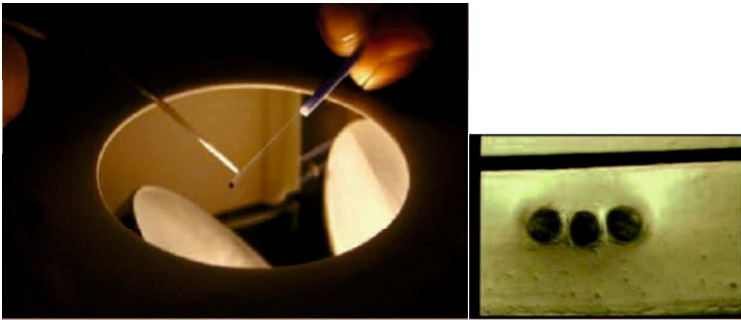


図 7. クライオトップ

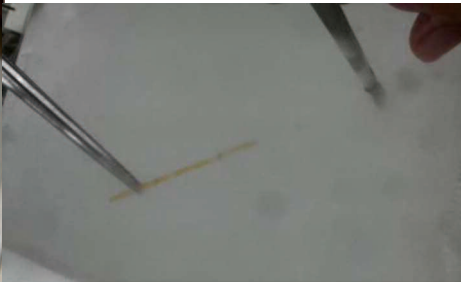
ステップ 1



ステップ 2



ステップ 3



ステップ 4

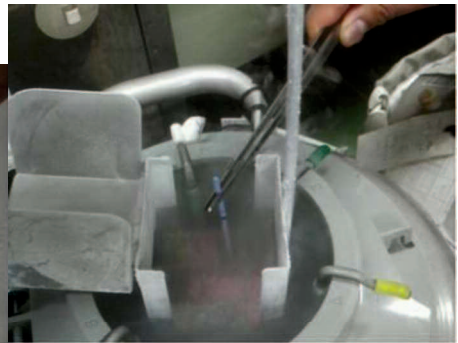


図 8. クライオトップガラス化方法

ステップ 1: 胚をクライオトップのフィルム部分に 3~6 個胚をのせて、胚のまわりの余分なガラス化液を吸い取る。ステップ 2: フィルム部分を液体窒素中に投入する。ステップ 3: 液体窒素中でフィルム部分を付属のストローでカバーする。ステップ 4: クライオトップをストローケーンに入れ液体窒素タンク中に保存する。

表 13. 体外培養試験結果

試験区	供試胚数	48 時間後生存率 (%) ^a	48 時間後
			脱出胚盤胞率 (%) ^a
MVAC	36	32 (88.9 ± 3.9)	25 (69.4 ± 7.3) ^b
CT	36	33 (91.7 ± 3.6)	23 (63.9 ± 5.0) ^b
Control	34	34 (100.0 ± 0.0)	32 (94.1 ± 3.7) ^c

^a 平均 ± 標準誤差。

^{b, c} 有意差あり (P < 0.01)。

MVAC: 自作器具によるガラス化, CT: クライオトップによりガラス化, Control: 新鮮胚。

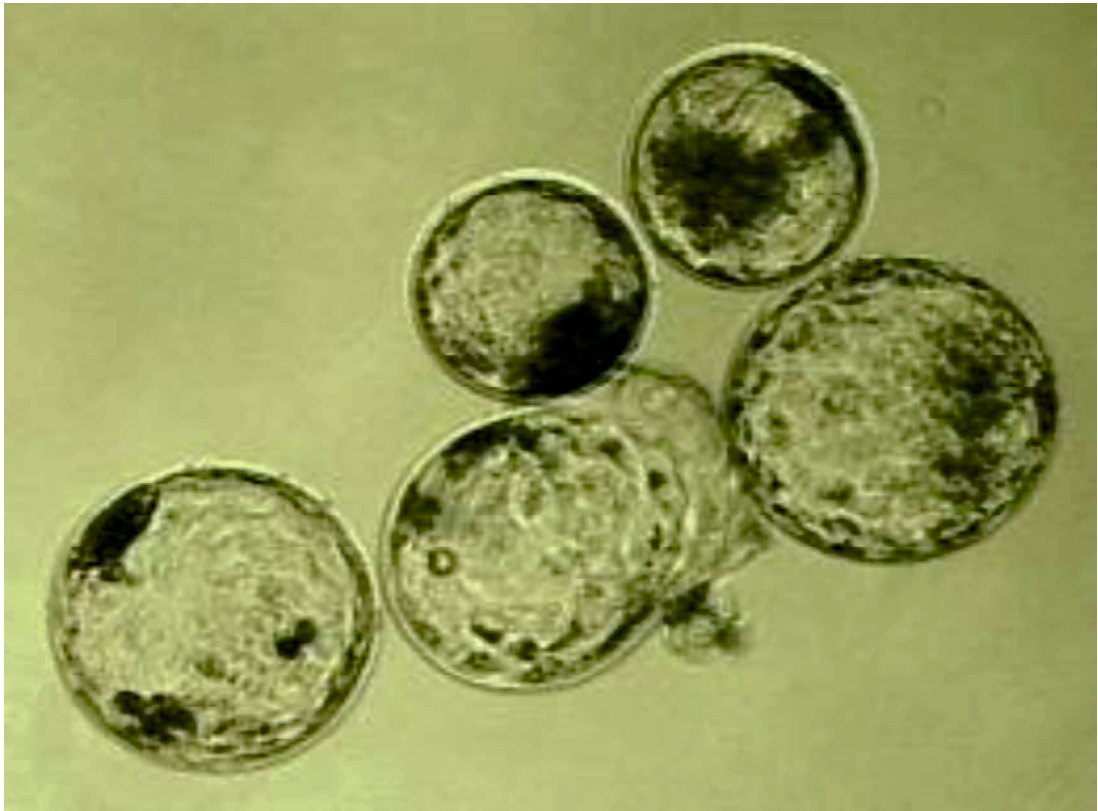


図 9. 加温後の生存胚

表 14. 移植結果

供胚豚	移植胚数	受胎結果	子豚頭数	子豚生産率 (%)*
(MVAC Group)				
1	14	+	2	14.3
2	8	+	2	25.0
3	15	-	0	0
4	15	+	4	26.7
5	12	-	0	0
Total	64		8	12.5 ± 6.5 ^a
(CT Group)				
6	12	-	0	0
7	12	+	2	16.7
8	12	+	7	58.3
9	15	-	0	0
10	15	-	0	0
Total	66		9	13.6 ± 12.7 ^a

*子豚生産率 = (総産子数/総移植胚数) × 100。

^a 平均 ± 標準誤差。

研究 3 MVAC 法に適したブタ胚のステージの検討

1. 目的

完全な透明帯を有する桑実胚、初期胚盤胞および胚盤胞を MVAC 法でガラス化保存し、発育ステージと加温後の生存性について検討した。

2. 材料および方法

1) 供胚豚

月齢 8 ヶ月齢以上のランドレース種 3 頭およびデュロック種 7 頭、合計 10 頭の性成熟雌豚を用いた。

2) 交配雄豚および精液処理

12 ヶ月齢以上のランドレース種 1 頭およびデュロック種 3 頭を用いた。採取した精液はモデナ液で希釈後、使用時まで 15 °C で保存した。

3) 供胚豚の過剰排卵・発情同期化および交配

第 1 章の研究 2 と同様な方法で、ホルモン剤の投与を午前 5 時に実施した。hCG 投与翌日を 0 日として 5 日目の午前 10 時あるいは午後 2 時に供胚豚より胚を採取した。

4) 胚の回収方法

第 1 章の研究 2 と同様に実施した。

5) 各溶液の準備

基本液は、20 mM HEPES を添加した PZM-5 (H-PZM-5) を使用した。平衡液 1 (EM1) は 1.8 M EG を基本液に添加した。同様に平衡液 2 (EM2) は 1.8 M EG、0.3% ショ糖および 1% (w/v) PEG

を添加し、ガラス化液(ESP)は6 M EG、0.6%ショ糖および2%(w/v) PEG を添加した。加温希釈液(WDM)は1.8 M EG、0.3%ショ糖を基本液に添加した。すべての溶液は使用時に38°Cに保温した。

6) ガラス化器具

研究2の自作ガラス化器具を用いた。

7) 自作ガラス化器具による胚のガラス化および加温・希釈方法

研究2のMVAC法のガラス化保存方法と同様に実施した。

8) ガラス化保存胚の体外培養

研究2と同様に実施した。

9) 統計処理

胚の生存率および脱出胚盤胞率は χ^2 乗検定を実施し、有意性を検討した。

2. 実験区設定

1) 体外培養試験

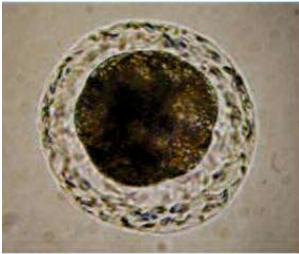
採取した胚を発育ステージごとに桑実胚、初期胚盤胞、胚盤胞に分類し(図10)、発育ステージ毎に胚をガラス化保存した。ガラス化保存した胚を加温し、体外培養した。体外培養した胚は48時間後の生存性および脱出胚盤胞率比較した。

3. 結果

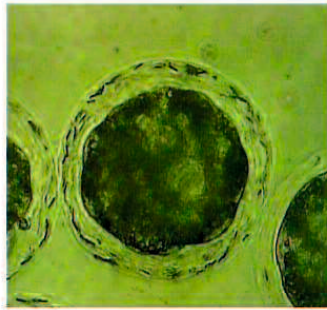
10頭の供胚豚から桑実胚を35個、初期胚盤胞を45個、胚盤胞を28個採取した。

48 時間後の生存率は桑実胚が 37.1%、初期胚盤胞が 64.4%、胚盤胞が 78.6%で桑実胚が他の 2 区より有意に低い値となった ($P < 0.01$)。脱出胚盤胞率は桑実胚が 22.9%、初期胚盤胞が 40.1%、胚盤胞が 57.1%で桑実胚が他の 2 区より有意に低い値となった ($P < 0.01$) (図 11)。

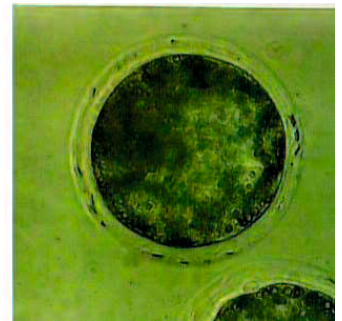
5 日目胚を MVAC 法でガラス化保存した場合、胚盤胞であれば加温後に高い生存性が得られることが示された。そのため、MVAC 法でガラス化する胚を採取する際は、発情誘起処理時間と胚を採取する時間を調整して、胚盤胞が効率的に採取できる 5.5 日齢に近い時期に採胚することが有効であると考えられた。



桑実胚



初期胚盤胞



胚盤胞

図 10. 5 日目胚の発育ステージ

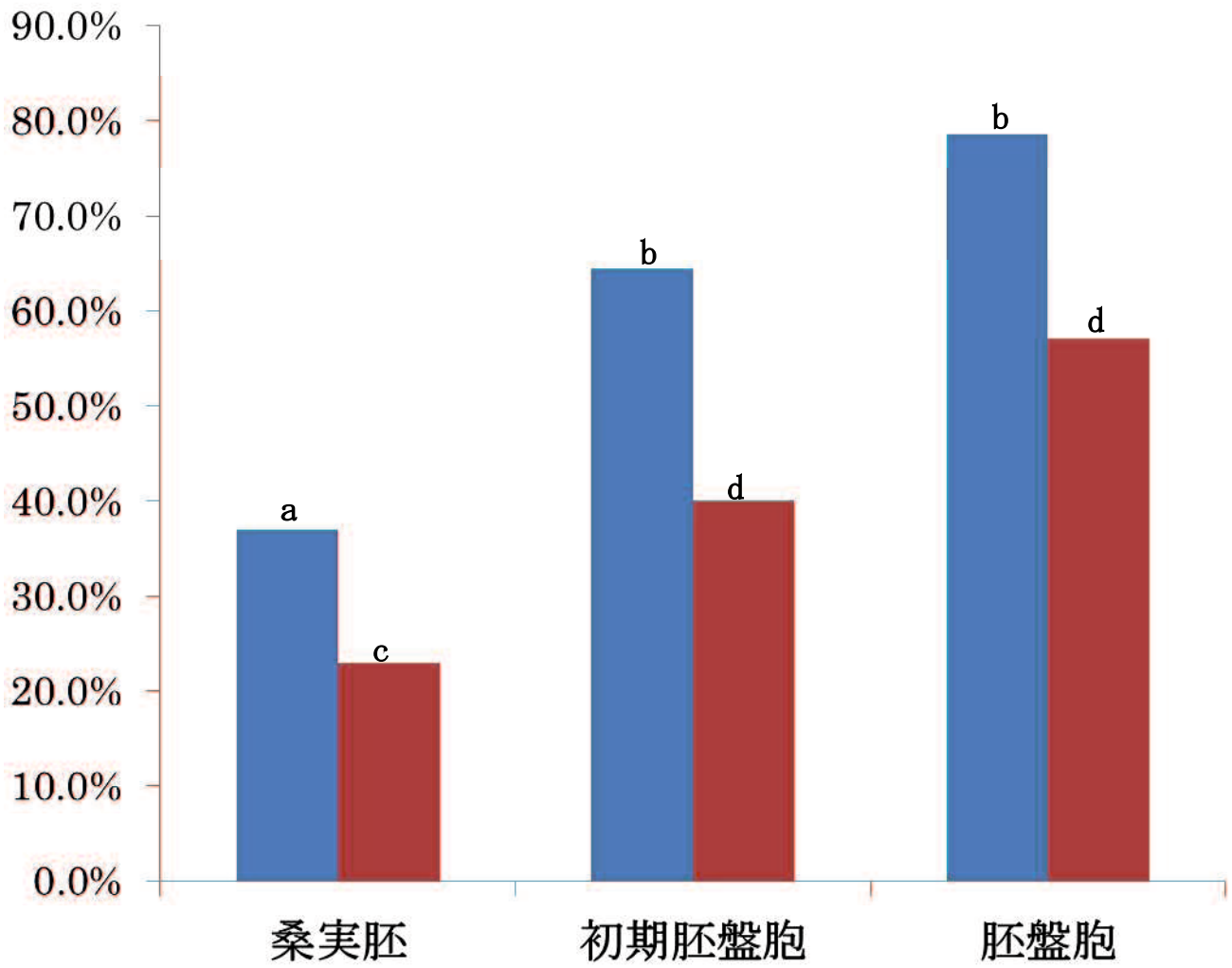


図 11. 体外培養成績

* a-b, c-d 有意差あり (P < 0.01)

研究 4 胚スティックを用いた MVAC 法によるブタ胚のガラス化保存試験

1. 目的

MVAC 法の市販化試作品器具「胚スティック」の有効性を検討した。

2. 材料および方法

1) 供胚豚

月齢 8 ヶ月齢以上のランドレース種 4 頭およびデュロック種 17 頭、合計 21 頭の性成熟雌豚を用いた。

2) 交配雄豚および精液処理

12 ヶ月齢以上のランドレース種 2 頭およびデュロック種 3 頭を用いた。採取した精液はモデナ液で希釈後、使用時まで 15°C で保存した。

3) 供胚豚の過剰排卵・発情同期化および交配

胚盤胞を効率的に採取するために 5.5 日齢の胚が採取できるように発情処理の時間は午後 4 時に実施した。処理の方法は第 1 章の研究 2 と同様な方法でおこなった。hCG 投与翌日と翌々日に供胚豚と同じ品種の精液で人工授精を行った。受胚豚は hCG 投与翌日を 0 日として 6 日目の午前 10 時に胚を採取した。

4) 胚の回収方法

第 1 章の研究 2 と同様な方法で実施した。

5) 各溶液の準備

研究 2 と同様に実施した。

6) ガラス化器具

研究 2 の自作ガラス化器具および胚スティックを用いた(図 12)。

7) 自作ガラス化器具による胚のガラス化および加温・希釈方法

研究 2 の MVAC 法のガラス化保存方法と同様に実施した。加温・希釈方法は、あらかじめ 38℃に加温した WDM 3 ml を 35 mm シャーレに入れておき、ストローから取り外した自作ガラス化器具の胚を付着させたステンレス板部分を WDM に投入した。胚がガラス化器具から遊離したのを確認した後、ガラス化器具を WDM から取りのぞき、その状態で 3 分間胚を希釈した後、胚を回収した。回収した胚は H-PZM-5 に移した後、体外培養あるいは移植に供用した。

8) 胚スティックによる胚のガラス化および加温・希釈方法

液体窒素が入った発泡スチロール内に試験管立て等を使用して、青色のストローのシリコン製のキャップを上にした状態で冷却した。採取した胚は研究 2 と同じ方法で平衡した。その後、ETP に胚を移して洗浄を行った後、直ちにガラス化用 ETP に移した。その後、胚をパスツールピペットで吸い、胚スティックのステンレス板上の先端部分に胚を含むガラス化液(約 1 μ l)を薄く伸ばした。その後、冷却していた青いストローのシリコン製のキャップを外した後、胚スティックの金属部分から青いストローに差し込み、胚スティックのシリコン製の部分をストローにしっかりとはめ込んだ。その後、胚スティックをストローケーシングに移して液体窒素タンク内で保存した(図 13)。

加温・希釈方法は、あらかじめ 38℃に加温した WDM 3 ml を 35 mm シャーレに入れておき、ストローから取り外した胚スティックの胚を付着させたステンレス板部分を WDM に投入した。胚が胚スティックから遊離したのを確認した後、胚スティックを WDM から取りのぞき、その状態で 3 分間胚を希釈した後、胚を回収した(図 14)。回収した胚は H-PZM-5 に移した後、体外培養あるいは移植に供用した。

9) ガラス化保存胚の体外培養

研究 2 と同様に実施した。

10) 受胚豚

月齢 8 ヶ月以上のランドレース種およびデュロック種合計 15 頭を使用した。

11) 受胚豚の発情同期化方法

第 1 章の研究 1 と同様に実施し、hCG 投与翌日を 0 日として 5 日目に受胚豚として使用した。

12) ガラス化保存胚の移植

研究 2 と同様に実施した。

13) 統計処理

胚の生存率および脱出胚盤胞率は χ^2 乗検定を実施し、有意性を検討した。

3. 実験区設定

1) 体外培養試験

一腹から採取した胚を無作為に、自作ガラス化器具 (HDM) 区、胚スティック (HST) 区、対照 (Control) 区に分けた。HDM 区ならびに HST 区はそれぞれの器具を用いてガラス化保存した胚を加温し、体外培養した。Control 区は新鮮胚を体外培養した。体外培養した胚は 48 時間後の生存性および脱出胚盤胞率を調べた。

2) 胚移植試験

HDM 区ならびに HST 区を用いてガラス化保存した胚を加温した後、HDM 区と HST 区のガラス化加温胚をそれぞれ 5 頭ずつの受胚豚に移植した。また、Control 区は新鮮胚を 5 頭の受胚豚に移植した。1 頭あたりの移植胚数は 1 腹採取分(8~15 個)で実施し、各試験区の子豚生産率(総産子数/総移植胚数)を比較した。

3. 結果

1) 体外培養試験結果

培養 48 時間後の生存率は HDM 区が 92.0%、HST 区が 95.8% ならびに Control 区が 100% で有意差は認められなかった。脱出胚盤胞率は HDM 区が 88.0%、HST 区が 87.5% ならびに Control 区が 92.0% で有意差は認められなかった(表 15)。

2) 胚移植試験

HDM 区は受胚豚 5 頭に合計 83 個(16.6 個/1 腹)の胚を移植したところ 4 頭が受胎分娩し、合計 22 頭の子豚を生産した。HST 区は受胚豚 5 頭に合計 65 個(13.0 個/1 腹)の胚を移植したところ 4 頭が受胎分娩し、合計 21 頭の子豚を生産した。Control 区は合計 62 個(12.4 個/1 腹)の胚を移植したところ 3 頭が受胎分娩し、合計 23 頭の子豚を生産した。各試験区の子豚生産率は HDM 区 26.5%、HST 区 32.3%、Control 区 37.1% で有意差は認められなかった(表 16)。また、各試験区の分娩した受胚豚の子豚生産率を比較したところ、HDM 区 33.3% (22 頭/66 個)、HST 区 42.0% (21 頭/50 個)、Control 区 42.0% (23 頭/42 個)となり、HDM 区が Control 区より有意に低くなった($P < 0.05$)。HST 区と Control 区に差は認められなかった(表 17)。

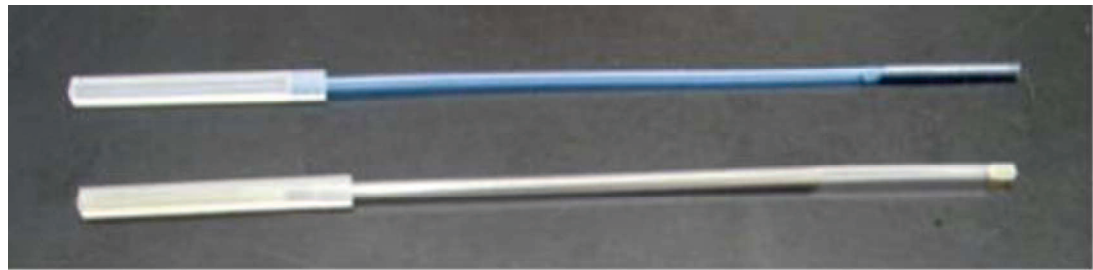
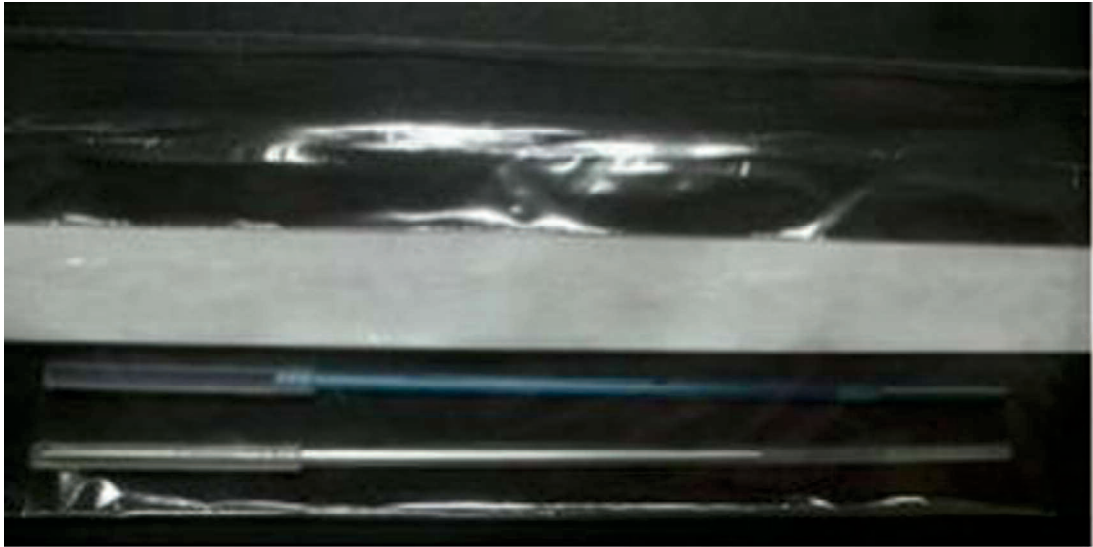
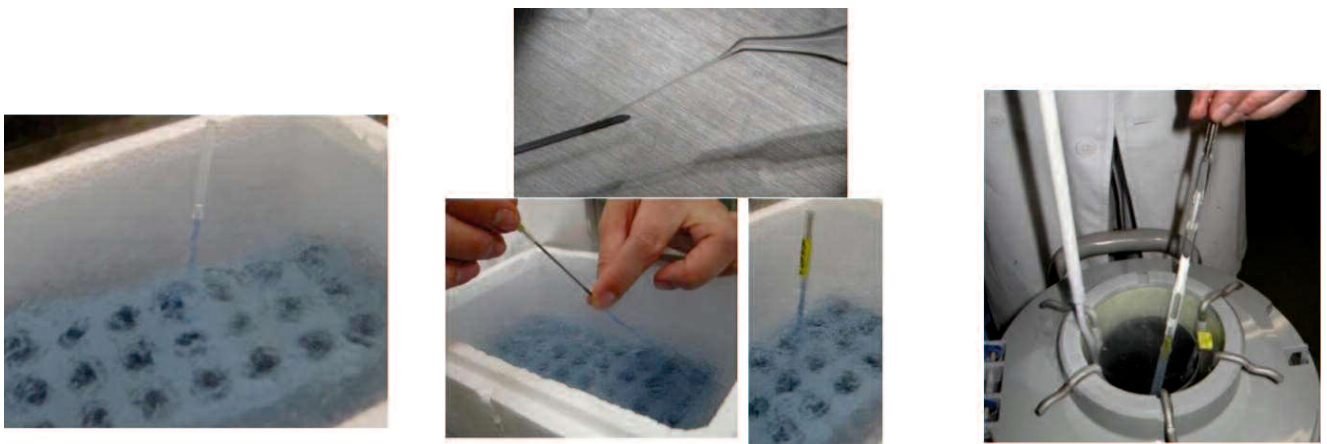


図 12. 胚スティック



ステップ 1

ステップ 2

ステップ 3

図 13. 胚スティックを用いたガラス化

ステップ 1: 液体窒素が入った発泡スチロール内に試験管立て等を使用して、青色のストローのシリコン製のキャップを上にした状態で冷却した。ステップ 2: 平衡液での平衡が終わった胚(4~16 個)を約 1 μ l ガラス化液と共にガラス化器具の金属部分の溝に薄くのばす。その後、あらかじめ冷却していた青いストローのシリコン製のキャップを外した後、ガラス化器具の金属部分から青いストローに差し込み、ガラス化器具をストローにしっかりとめ込む。ステップ 3: ガラス化器具を液体窒素タンク内で保存する。



ステップ 1

ステップ 2

図 14. 胚の加温方法

ステップ 1: 胚スティックを封入した青いストローの下部半分以上が液体窒素に漬った状態で、栓とストローの接合部分を指でつかんで暖める。胚スティックの栓が柔らかくなってきたら胚スティックをストローから抜き取る。ステップ 2: 速やかに胚スティックの先端部分(胚を付着させた部分)を加温・希釈液に投入し、胚スティックの先端を加温・希釈液中で揺すりながら、顕微鏡下で胚が胚スティックから遊離することを確認した後、封入した胚数が加温液・希釈液中にあることを確認する。

表 15. 体外培養成績

試験区*	供試胚数	48 時間後 生存数 (%)	48 時間後 脱出胚盤胞数 (%)
HDM 区	25	23 (92.0)	22 (88.0)
HST 区	24	23 (95.8)	21 (87.5)
Control 区	25	25 (100)	23 (92.0)

*HDM 区：自作器具でガラス化、HST 区：胚スティックでガラス化、Control 区：新鮮胚

表 16. 移植成績

供胚豚	移植胚数	受胎結果	子豚頭数	子豚生産率(%)
HDM 区				
1	16	+	6	37.5
2	17	+	4	23.5
3	15	+	3	20.0
4	17	-	0	-
5	18	+	9	50.0
Total	83		22	26.5
HST 区				
6	7	+	5	71.4
7	15	-	0	-
8	16	+	4	25.0
9	15	+	5	33.3
10	12	+	7	58.3
Total	65		21	32.3
Control 区				
11	12	+	5	41.7
12	16	+	8	50.0
18	8	-	0	-
19	12	-	0	-
20	14	+	10	71.4
Total	62		23	37.1

表 17. 分娩豚の子豚生産率

試験区	分娩頭数	総移植胚数 (一腹平均胚数)	総産子数 (一腹平均)	子豚生産率(%)
HDM 区	4	66 (16.5)	22 (5.5)	33.3 ^{ac}
HST 区	4	50 (12.5)	21 (5.3)	42.0 ^c
Control 区	3	42 (14.0)	23 (7.7)	54.8 ^{bc}

^{a-c} 有意差あり (P < 0.05)

考察

ブタ胚は低温感受性が高いため、超低温保存は困難といわれていたが、最近開発された、OPS 法、クライオトップ法、MMV 法などの超急速ガラス化を用いることで成功が増えてきた。そこで、マイクロドロップレットを用いて、第 1 章の胚移植で用いた 5 日目胚(桑実胚～初期胚盤胞)のガラス化を試みた。その結果、従来の 0.25 ml ストローを用いたガラス化保存方法よりもマイクロドロップレット法の方が高い生存率を示した。さらに、マイクロドロップレット法でガラス化保存した胚を移植したところ子豚生産にも成功した。この発育ステージの胚をガラス化保存した後、移植して子豚を生産した例は、2002 年の Beebe *et al.* の報告に次いで 2 番目の報告であった。このことから、冷却速度を早くすることが今まで超低温保存が難しかった桑実胚や初期胚盤胞に対してもガラス化保存後の生存性を向上させていることが推察できた。しかしながら、今回の試験では一腹当たりの移植胚数が 30～36 個と新鮮胚移植時の 2 倍程度の胚を移植したが受胎豚 5 頭中 3 頭が流産したことから、加温後のガラス化保存胚の子豚発育能力は依然低い結果となった。そのため、移植胚数を新鮮胚移植時と同等に 16 個程度で受胎分娩できるまで胚の生存性をさらに向上させる必要があった。

今回のマイクロドロップレット法を含む超急速ガラス化保存方法は、冷却速度を早くするために、胚を含む微量のガラス化保存液を直接液体窒素内に投入する方法が一般的である。しかしながら、液体窒素を保存しているタンク内には微生物が混在しているとの報告もあり (Bielanski *et al.* 2000, 2003)、上記の方法は液体窒素中の微生物による胚の汚染が懸念されていた。そのため、衛生面を最優先と考えた場合は胚のガラス化保存に使用する液体窒素を滅菌する必要がある。

この問題点を解決するために、あらかじめ液体窒素で冷却した 0.25 ml ストロー内の空気で胚を冷却する MVAC 法を考案した。しかしながら、MVAC 法の 35°C から -196°C までの冷却速度を測定したところ約 -860°C/分 でクライオトップ法(約 -17,250°C/分)より約 20 倍

遅かった。そのため、最初の検討には耐凍性の高い発育ステージとされている拡張胚盤胞を用いて MVAC 法の有効性を検討した。その結果、体外培養下での加温後の生存率は超急速ガラス化保存法であるクライオトップ法と同等な成績が得られた。また、ガラス化保存胚を移植した結果、子豚の生産にも成功し、子豚生産効率も MVAC 法はクライオトップ法と同等の成績であった。このことから、拡張胚盤胞については MVAC 法でもガラス化保存が可能なが推察できた。次に、完全な透明帯を持つ発育ステージの 5 日目胚を用いて MVAC 法の検討を行った。第 1 章で 5 日目に胚を採取した際、胚の発育ステージは桑実胚～胚盤胞とバラツキがあった。拡張胚盤胞以前の胚については耐凍性が低いとされていることから、採取した胚を桑実胚、初期胚盤胞および胚盤胞に分けて MVAC 法でガラス化し、加温胚の生存性を体外培養下で調べた。その結果、桑実胚が胚盤胞より有意に低い値となった。一方、胚盤胞の生存性は 80%弱と良好な成績が得られた。このことから、効率的に胚盤胞を採取することができれば、MVAC 法で完全な透明帯を持つ胚を保存可能になると推測できたことから、おおよそ 5.5 日齢の胚を採取できるように発情誘起処理の時間と胚採取の時間を変更して、研究 4 の供胚豚の発情誘起に実施した。

研究 2、3 で MVAC 法に用いたガラス化器具は自作しているため、齊一な器具作ることが難しく、大量に準備することも困難であった。そこで、MVAC 法のガラス化器具の市販化試作品となる「胚スティック」を完成させた。そこで、研究 4 では胚スティックおよび自作ガラス化器具を用いて MVAC 法で胚盤胞をガラス化保存し、胚の生存性を比較することで胚スティックの有効性を検討した。その結果、体外培養成績では、双方のガラス化保存胚の加温 48 時間後の生存率が 90%以上、脱出胚盤胞率も 80%以上と新鮮胚と差が無い成績であった。そのため、移植試験では器具の改良によるガラス化保存胚の子豚生産率の比較のほか、新鮮胚移植を対照区と設け、新鮮胚とガラス化保存胚の子豚生産率を比較検討した。その結果、移植を実施したすべての受胚豚での子豚生産率は、胚スティック区、自作ガラス化器具区および対照区で有意な差は認められなかったが、分娩した受胚豚で子豚生産率を見たところ、自作ガラス化器具区が対照区より有意に低くなったが、胚スティック区は

自作ガラス化器具区および対照区と差が認められなかった。このことから、胚スティックを用いたガラス化保存胚は自作ガラス化器具使用時と同等以上の子豚発育能力を持っており、さらには新鮮胚に近い子豚発育能力があることを示すことができた。

第 3 章 体外生産胚を用いた種豚生産技術の開発

緒言

ブタの胚回収は、開腹手術により実施されるため、1頭の雌豚から連続的に胚を採取することは困難である。一方、養豚場における種豚の更新サイクルは約3年程度であることから、廃用される母豚の卵巣内の卵母細胞を利用して体外胚生産ができれば1頭の雌豚から一生涯に採取できる胚数を増やすことが期待できる。

近年、食肉処理場由来の卵巣から未成熟卵子を採取し、これらを体外成熟後、体外受精を実施することで良質の体外生産(IVP)胚を得られるようになり、IVP胚を受胎豚に移植して子豚生産に成功した報告もされるようになった(Marchal *et al.* 2001; Kikuchi *et al.* 2002; Mattioli *et al.* 1989; Yoshida *et al.* 1993; Funahashi and Day 1997; Yoshio ka *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2004)。しかしながら、豚の体外胚生産は、そのほとんどが食肉処理場の雑種肉豚由来の卵巣を用いることと、卵子の体外成熟培養に使用されているブタ卵胞液(PFF)は、一般の食肉処理場由来の卵巣から調整され、そのPFFには豚に感染を引き起こす病原体の混入を否定できないため、養豚分野での積極的な利用には至っていなかった。

そこで、Suzuki *et al.* (2004)は、体外成熟時にPFFの代わりにFBSを添加し、IVP胚を生産、その胚を受胎豚に移植した結果、子豚の生産に成功した。このことから、移植によっても受胎豚や胎子への疾病伝搬の可能性が低いと考えられるFBSでも子豚への発育能力を有したIVP胚が生産可能であることを示唆している。

IVP胚の養豚分野への応用方法として、更新のために廃用される雌豚や通常の繁殖ができなくなった稀少品種等の卵巣の利用が考えられる。それらの卵巣からIVP胚を生産し、子豚の生産が可能になれば、稀少品種の増殖・維持に有効利用できる可能性がある。また、我々のように開腹手術により胚を採取した供胚豚の卵巣を利用して、同じ豚から胚をもう一度生産できる可能性がある。そのような目的でIVP胚から子豚生産の対象となる卵巣提供雌豚は性成熟豚である。しかしながら、性成熟豚の卵巣を用いたIVP胚に関する報告は

無い。そこで、開腹手術により胚採取を実施した雌豚の卵巣を用いて IVP 胚生産方法の検討を行った。

胚採取した雌豚はすでに排卵を周期的に行っているため、血中および卵胞内のホルモン濃度は定期的に変動している。そのため、研究 1 では発情日齢の違いが IVP 胚生産に及ぼす影響について調査した。次に、研究 2 では卵胞の直径の違いが IVP 胚生産に及ぼす影響について調べた。

さらに、研究 3 では上記の試験で得られた手法を用いて日本国内だけでなく世界的にも稀少品種の中ヨークシャーの卵巣を用いて IVP 胚由来産子の生産に取り組んだ。

研究1 異なる発情周期の卵巢から回収した卵子を用いた体外胚生産成績の比較

1. 目的

雄許容から6日目、12日目および16日目のデュロック種から卵巢を採取し、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。

2. 材料および方法

1) 供卵豚および卵巢の採取

卵巢の採取は第1ならびに2章で記載された発情誘起処理を実施して一度胚を採取した12ヶ月齢以上のデュロック種の雌豚9頭を用いた。

発情周期(雄許容開始日=0日目)の6日目(6日目区)、12日目(12日目区)及び16日目(16日目区)の性成熟豚(各試験区3頭ずつ)をと殺後、卵巢を摘出した。卵巢は38°CのPBS(日水製薬株式会社, 東京)で数回洗浄後、卵子採取まで同液中で約30分保持した。

2) 卵子の採取

1頭分の卵巢(2個の卵巢)をMedium 199 (M199; with Hanks' salts; Sigma-Aldrich Corp., St Louis MO, USA)の入ったシャーレにいれ、卵巢上にあるすべての卵胞をメス刃で切り裂いた。その後、M199に流出した卵子(卵丘細胞卵子複合体(COC)および卵丘細胞が付着していない裸化卵子)をすべて採取した。

3) 卵子の成熟培養

卵子の成熟は、10% FBS、0.6 mM cysteine、50 μ M β -mercaptoethanol、1 mM dbcAMP 10 IU/ml eCG、10 IU/ml hCG を添加した NCSU37 で20~22時間培養した。その後、1 mM dbcAMP とホルモンを除いてさらに24時間培養した(Suzuki *et al.* 2006)。すべての培養は38.5°C、5% O₂、5% CO₂、90% N₂ の条件下でおこなった。

4) 体外受精

体外受精培地は Pig-FM (Suzuki *et al.* 2002) を用いた。体外受精に用いる精液はデュロック種から採取した精液を Kikuchi *et al.* (1998) らの方法で希釈・冷却し、0.25 ml ストロー内で凍結保存した。体外成熟後の卵子を 1×10^5 精子/ml の精子と 3 時間共培養した。共培養後、ピペッティングより卵丘細胞を卵子より剥離した。

5) 体外培養

体外受精日を 0 日とし、2 日目までは 50 μ M β -mercaptoethanol、4 mg/ml BSA、0.17 mM Na-Pyruvate ならびに 2.73 mM Na-lactate を添加した NCSU37 で培養した。2 日目からは、50 μ M β -mercaptoethanol、4 mg/ml BSA ならびに 5.55 mM Glucose を添加した NCSU37 で培養し、受精後 6 日目の胚盤胞発生率を比較した。

6) 統計処理

パーセントで得られたデータは、分析の前にアークサイン変換を行った (Snedecor and Cochran, 1989)。それらを一元配置の分散分析 (ANOVA) で解析し、解析モデルが有意と判断された場合は Tukey の平均値の多重比較検定を行った。解析は、Statistical Analysis System (version 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA) で行い、有意差の水準を $P < 0.05$ と設定した。

3. 実験区設定

発情周期の 6 日目 (6 日目区)、12 日目 (12 日目区) 及び 16 日目 (16 日目区) の卵巢から卵子を採取し、それぞれの卵子を用いて体外胚生産を行い、各試験区の盤胞発生率を比較した。

4. 結果

各試験区において、回収した COC および裸化卵子の回収率に有意な差は認められなかった。いっぽう、胚盤胞発生率は 6 日目区が他の試験区に比べ有意に低く、12 日目区と 16 日目区には有意な差は認められなかった(表 18)。

表18. 発情周期の異なる卵巣からの卵子回収成績および体外胚生産成績

卵巣回収日*	1頭あたりの平均回収卵子数			体外胚発生率		
	COC	裸化卵子	総数	体外受精したCOCs総数	分割卵数(%) ^a	胚盤胞数(%) ^b
6	39.3 ± 8.8	17.3 ± 7.2	56.7 ± 15.8	90	33 (36.7 ± 20.5)	1 (1.1 ± 1.3) ^c
12	26.0 ± 10.2	13.4 ± 1.4	39.0 ± 11.2	76	27 (35.5 ± 3.6)	7 (9.2 ± 3.8) ^d
16	29.7 ± 1.1	8.0 ± 3.2	37.7 ± 3.6	72	34 (47.2 ± 3.7)	14 (19.4 ± 1.8) ^d

各試験区3頭ずつのデュロック種雌豚を使用した(合計9頭)、*雄許容開始日をDay 0とした平均 ± 標準誤差

COC: 卵丘細胞卵子複合体。

^aDay 2 での分割卵数 (Day 0: 体外受精日)

^bDay 6での胚盤胞発生数 (Day 0: 体外受精日)

^{c, d}有意差あり (P < 0.01)。

研究 2 16 日目の卵巣を用いた卵胞の直径と体外胚生産成績の比較

1. 目的

16 日目卵巣を用いて卵胞の直径の違いが回収した卵子の体外胚生産能力に及ぼす影響について検討した。

2. 材料および方法

1) 供卵豚および卵巣の採取

卵巣の採取は、研究 1 と同様にデュロック種 4 頭を用いた。発情周期(雄許容開始日=0 日目)の 16 日目の雌豚をと殺後、卵巣を摘出した。卵巣の洗浄および保持は研究 1 と同様に行った。

2) 卵子の回収方法

1 頭分の卵巣 (2 個の卵巣) を M199 の入ったシャーレにいれ、卵巣上の 2 mm 以上の卵胞は卵巣より眼下尖刀ならびにピンセットを用いて切り出し、切り出した卵胞はそれぞれの直径を測定した。その後、卵巣の直径が 6 mm 以上 (Large) および 2 mm 以上 6 mm 未満 (Medium) に分け、それぞれを M199 の入った別のシャーレ移した後、ピンセットで卵胞膜を切り裂き、M199 に流出した卵子を採取した。さらに、第 2 節と同じ方法で残りの組織に存在する 2 mm 未満の卵子 (Small) は、メスで細切する方法で M199 に流出後に採取した。

3) 体外成熟方法

研究 1 と同じ方法で実施した。

4) 体外受精方法

研究 1 と同じ方法で実施した。

5) 胚の体外培養方法

研究 1 と同じ方法で実施した。

6) 胚の細胞数測定

体外受精後 6 日目の胚はスライドガラスとカバーガラスの間にマウントし、そのまま固定液(酢酸ならびにアルコールを 1:3 で混合したもの)に投入し固定した。固定開始から約 3 日後に 1%オルセイン酢酸(アセトオルセイン液)で染色し、位相差顕微鏡で細胞数をカウントした。

7) 統計処理

研究 1 と同じ方法で実施した。

3. 実験区設定

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。発生した胚盤胞は細胞数をカウントし、各試験区の平均値を比較した。

4. 結果

回収した COC および裸化卵子の数は Small 区が他の 2 区よりも有意に多かった。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。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(表 19)。

表19. 発情16日目*の雌豚の卵巣から卵子回収成績および体外胚生産成績.

卵胞直径 ^r [mm]	1頭あたりの平均回収卵子数			体外での胚発生			
	COC	裸化卵子	総数	体外受精した COCs総数	分割卵子(%) ^a	胚盤胞数(%) ^b	細胞数
Small [<2]	52.8 ± 12.4 ^c	32.5 ± 9.1 ^c	85.3 ± 19.3 ^c	205	80 (39.2 ± 4.7)	13 (6.3 ± 2.3) ^f	30.6 ± 2.3 ^d
Medium [2 - <6]	17.5 ± 2.9 ^d	0 ^d	17.5 ± 2.9 ^d	70	30 (42.9 ± 3.2)	14 (20.0 ± 3.5) ^e	39.4 ± 2.9 ^c
Large [≥6]	12.8 ± 1.8 ^d	0 ^d	12.8 ± 1.8 ^d	52	28 (53.9 ± 3.9)	10 (19.2 ± 0.9) ^e	43.3 ± 3.0 ^c

供試豚は4頭のデュロック雌豚、*雄許容開始日を Day 0とした
平均 ± 標準誤差

COC: 卵丘細胞卵子複合体。

^aDay 2 での分割卵子数 (Day 0: 体外受精日)

^bDay 6での胚盤胞発生数 (Day 0: 体外受精日)

^{c,d} 有意差あり (P < 0.01)。

^{e,f} 有意差あり (P < 0.05)。

研究 3 体外生産胚による純粋種豚生産

1. 目的

研究 1 ならび 2 において、性成熟に達し、発情が回帰している純粋種(デュロック種)雌豚の卵巣を用いて IVP 胚の作出が可能であることが明らかとなった。そこで、本研究では希少品種である中ヨークシャーから採取した卵巣を用いて体外生産した胚を受胎豚に移植し、子豚への発生能力を検証した。

2. 材料と方法

1) 供卵豚および卵巣の採取

供卵豚は性成熟に達した 12 ヶ月齢以上の中ヨークシャー3 頭を用いた。卵巣の採取は研究 2 と同様に行った。

2) 卵子の採取

研究 1 と同じ方法で実施した。

3) 体外成熟方法

研究 1 と同じ方法で実施した。

4) 体外受精方法

研究 1 と同じ方法で実施した。凍結精液は中ヨークシャー雄豚より採取した精液を使用した。

5) 胚の体外培養方法

研究 1 と同じ方法で実施した。

6) 受胚豚

月齢 8 ヶ月以上の LW 雑種雌豚 3 頭

7) 受胚豚の発情同期化方法

第 1 章の研究 1 と同様に実施した。雄最終許容日を 1 日として 4 日目に受胚豚として使用した。

8) 胚の移植方法

体外受精後 4 又は 5 日目の胚を移植した。その際、妊娠を確実にするためデュロック種同士の交配で得られた体内生産胚を移植当日に採取し、中ヨークシャー IVP 胚とデュロックの新鮮胚 5 個を同時に子宮へ移植した。

3. 結果

3 頭の受胚豚に、中ヨークシャーの IVP 胚を計 53 個およびデュロックの新鮮胚 15 個を混胚して移植した結果、3 頭すべてが受胎し、うち 2 頭の受胚豚からは計 9 頭(内 2 頭が生後直死)の IVP 胚由来の子豚が生まれたほか、3 頭からは計 9 頭のデュロックの新鮮胚由来の子豚が生まれた(表 20、図 15)。

表 20. 中ヨークシャー種体外胚生産成績および移植成績

受胚豚 #	体外成熟培 養した 卵子数	体外培養での発生率					移植成績				
		体外受精 した 卵子数(%)	Day 2 での 分割卵数 (%)	Day 4 での 4細胞期胚 ≤胚数(%)	Day 5 での胚数(%)	胚移植 日	移植胚数	分婍子豚総数 (♂ + ♀)	中ヨーク シャー デューロ ック	中ヨーク シャー デューロ ック	
1	82	46 (56.1)	27 (58.7)	17 (37.0)	11 (23.9)	6 (13.0)	5	17	5	4 (0 + 4)	2 (2 + 0)
2	75	48 (64.0)	28 (58.3)	18 (37.5)	-	-	4	18	5	5 (2 + 3)	3 (0 + 3)
3	65	45 (69.2)	24 (53.3)	15 (33.3)	12 (26.7)	3 (6.7)	5	15	5	0	4 (1 + 3)
Total	222	139 (62.6)	79 (56.8)	50 (36.0)	13 (9.4)	9 (6.5)		50	15	9 (2 + 7)	9 (3 + 6)

Day 0: 体外受精日



図 15. 体外生産胚由来中ヨークシャー

毛色が白い子豚は体外生産胚由来の中ヨークシャー。毛色が褐色の子豚は体内生産胚由来のデュロック。

考察

一度胚採取した雌豚や廃棄される希少品種の卵巣を用いて体外生産胚を作出する方法を検討するため、今まで報告がなかった性成熟に達した純粋豚の卵巣を用いた効率的な体外胚生産方法の検討を行った。研究 1 では発情周期により卵巣上の卵胞と黄体の形状が異なっているため、黄体期である 6 日目、黄体後期の 12 日目、黄体退行期の 16 日目の卵巣を用いて体外胚を生産した結果、12 日目、16 日目の胚盤胞発生率が 6 日目より有意に高かった。そのため、研究 2 では発情 16 日目の卵巣の卵胞の直径の違いによる胚盤胞発生率の差を調べたところ、2 mm 以上の卵巣で高い胚盤胞発生率がみられた。それらの結果から、研究 3 では発情 16 日目の卵巣を用いて、中ヨークシャー種の IVP 胚を移植した結果、IVP 胚由来の中ヨークシャー種子豚の生産に成功した。わわれわれの知るかぎりでは、一頭分の卵巣から IVP 胚を生産し、その胚から血統の明らかな中ヨークシャー種を生産した事例は今回が初めてであると思われる。

性成熟に達した豚の卵巣は発情周期により胚盤胞の発生率が変わることが今回の結果から明らかとなった。今回の試験区は、黄体期である 6 日目、黄体が外部からの PG 投与により退行が可能となる 12 日目、さらに卵胞発育が開始する頃の 16 日目に設定した。その結果、当初の期待とおり黄体退行期の 16 日目卵巣が高い胚盤胞発生率を示す結果となった。また、16 日目卵巣に存在する卵胞直径の大きさと胚盤胞発生率の差については、2 mm 以上の卵胞が適している結果となった。IVP 胚による純粋種豚生産には、血統が明らかとなるよう 1 頭分の卵巣より得られた体外生産胚を移植する必要がある。しかしながら、豚の妊娠成立および維持には 4 個以上の胚が必要であると報告されていることから (Polge *et al.* 1996)、研究 1 ならび 2 の胚盤胞発生率を考慮すると IVP 胚のみの移植胚では、妊娠を維持するだけの胚数を確保することが困難であることが予想された。そのため、本実験では、デュロック種の新鮮胚を妊娠維持のため IVP 胚と一緒に移植した。その結果、移植した受胎豚 3 頭中 2 頭から中ヨークシャーの子豚が生産された。IVP 胚の子豚生産率は 23.5% (4

/17)、27.8% (5/18)の比較的高い成績を得ることができた。また、今回得られた中ヨークシャー種については雄雌共に正常に発育し、後代を生産できることも確認しており、IVP 胚から生産した豚についても能力的には種豚として使用できること確認した。

以上の結果から、黄体退行期にある性成熟豚の卵巣から採取した卵子は、体外胚生産において高い胚発生能力を有しており、これらの IVP 胚を移植することで、血統の明らかな純粋種の生産が可能であることが明らかとなった。

総括

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。現時点でブタ胚の採取および移植を実施するためには外科的手術を実施する施設が必要である。そのため、胚移植を実施できる機関・施設は非常に限られている。そのような中、第1章においてAD感染豚群を胚移植により清浄化を達成した事例について述べた。そして、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。今回の胚移植による種豚導入では受胎率は60%以上で一腹産子数は6頭程度であった。ブタ胚の採取は開腹手術により1m以上ある両子宮角を指で直接しごく必要があるため、一度採胚した豚は子宮角が癒着することが多い。そのため、我々の経験上、1頭の供胚豚から確実に排卵数分の胚を回収可能なのは2回程度である。そのため、今回の移植成績であれば採胚農場に導入した供胚豚1頭から移植2回分の胚を採取することができれば、移植農場に導入豚の遺伝子をすべて入れることが期待できる。新鮮胚移植を実施するうえで最もネックになるのは、供胚豚と受胚豚を同時に発情同期化する必要があることである。特に今回のように2つの農場間で胚採取、輸送、移植を実施する場合は連携を密にしてそれぞれの農場で発情同期化した雌豚を準備する必要がある。また、新鮮胚の場合は輸送範囲も制限されることから、利便性を向上させるためには胚の保存が不可欠となる。そこで、第2章においては、液体窒素中でブタ胚を保存する方法の検討を行った。

ブタ胚の保存はこれまで困難とされていたが(Polge *et al.* 1974; Pollard *et al.* 1994)、超急速ガラス化保存法が開発され、OPS法(Beebe *et al.* 2002, 2005)、クライオトップ法(Ushijima *et al.* 2004)、MMV法(Fujino *et al.* 2008)などによる成功例が報告されてきた。そこで、我々はマイクロドロップレット法(Misumi *et al.* 2003)を用いて胚輸送時に使用した桑実胚～胚盤胞のガラス化保存に取り組んだ。その結果、ガラス化保存胚の加温後の生存率が7割弱という成績が得られ、ガラス化保存胚から子豚の生産に成功した。しかしながら、移植成績による子豚生産効率は10%を下回っており、新鮮胚移植の代替えになりうる成績ではなかった。さらに、液体窒素中の胚の保存形態も胚を含むガラス化保存液が常に液体窒素と直接接触している状態であった。そのため、液体窒素中に微生物が

混入していればそれらによる汚染の可能性も否定できなかった。そこで、胚を含むガラス化保存液を液体窒素に接触させずに胚を保存する方法を検討することとなった。我々がブタ胚を保存する目的は、種豚を胚という形で輸送することであり、そのために必要となるのは、1) 胚を可能な限り衛生的に保存できること、2) 輸送した胚の取り違えが無いように移植 1 回分の胚(15~20 個)を一つの容器内で保存できること、3) 15~20 個の胚を移植して受胎分娩できるガラス化加温後の生存性を有していること、である。そして、その条件を満たすために考案したのが、液体窒素中で冷却した 0.25 ml ストロー内の空気中に胚を含むガラス化保存液を投入してガラス化と同時に胚の封入も行える MVAC 法である。MVAC 法の冷却速度測定したところ液体窒素に胚を直接投入する場合より冷却速度が約 20 倍の遅かった。そのため MVAC 法の最初の検証には耐凍性が高い発育ステージである拡張胚盤胞を用いて実施した。その結果、ガラス化加温後の胚の生存率が体外培養成績で 88.9%、胚移植による子豚生産率は 12.5%とクライオトップ法と同等の成績が得られた。このように良好な結果が得られたことから、次は完全な透明帯を有する 5 日目胚を用いて MVAC 法によるガラス化保存の検証を行った。5 日目の胚を採取した場合、胚の発育ステージが桑実胚から胚盤胞までとバラツキが多かった。そこで、桑実胚、初期胚盤胞、胚盤胞の 3 つの発育ステージ毎に胚をガラス化保存してその生存率を比較した。その結果、桑実胚が初期胚盤胞および胚盤胞より生存率が有意に低い成績であった。しかしながら、胚盤胞であれば MVAC 法でガラス化保存しても十分な生存性が得られる可能性が示された。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を調整しておおよそ 5.5 日目に胚を採取し、その後の MCAC 法の検討に使用することとした。

MVAC 法の問題点は使用するガラス化器具がその当時は自作品であったため、大量生産が不可能で器具の斉一性も低かった。そこで、この問題点を克服するために、MVAC 法の器具を外注して試作したのが胚スティックである。そこで、胚スティックを用いた MVAC 法の検討を実施した。その結果、ガラス化した胚盤胞の生存性が 90%を超え、移植後の子豚生産率も 32.3%と新鮮胚にも匹敵する成績が得られた。加温後成績が向上した理由については

明らかな理由がわからないが、金属部分の材質が変わったことと金属部分の断面の形状が U 字型から V 字型に変更したことにより、ガラス化液の冷却がスムーズに行われたのではないかと推測している。また、現在胚スティックによるブタ胚のガラス化保存は我々の他に 3 つの機関で実施しており、どの機関でも加温後の胚の生存性が 80%を超え、ガラス化保存胚移植により子豚の生産に成功していることから、MVAC 法は再現性も高いことが明らかとなっている。このようなことから、MVAC 法によるブタ胚盤胞のガラス化保存技術は確立したといえる。

一方、胚移植により種豚を導入する場合、1 頭の供胚豚からできるだけ多くの胚を採取することが望まれる。しかしながら前述したように開腹手術による採胚では、採胚回数に応じて子宮がダメージを受けるため連続採胚は難しい。一方、一度採胚した雌豚の卵巣を利用して胚を生産する技術が開発されれば、優良な雌豚から多くの胚を生産できる可能性がある。そこで第 3 章では、一度採胚した雌豚の卵巣を用いた体外胚生産技術の検討を行った。一般的に、ブタの体外胚生産に関する実験には食肉処理場に出荷した未性成熟豚の卵巣が使用されている。これらの卵巣は春機発動前でまだ黄体が存在していない。一方、胚を採取した豚の卵巣には黄体が存在し、発情周期によって卵巣上の卵胞および黄体の形状が異なり血中のホルモン動態も異なっている。そのため、黄体期である 6 日目、黄体後期の 12 日目、黄体退行期の 16 日目の卵巣を用いて、それぞれの卵子の体外生産による胚発生能力を調査したところ、12 日目と 16 日目が良好な成績が得られた。さらに 16 日目の卵巣を用いて卵胞直径と卵子の胚発生能力の関係を検討したところ、大、中卵胞から採取した卵子は胚盤胞発生率が高く、胚盤胞の細胞数も多いことが分かった。この結果を応用して発情 16 日目の中ヨークシャー種雌豚の卵巣を用いて生産した IVP 胚を受胚豚に移植した結果、健康な中ヨークシャー種の子豚が誕生した。以上の結果から、雌豚 1 頭の卵巣から採取した卵子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。ブタの体外胚生産技術は、多くの機関で研究が実施されているが、養豚業へ応用する方法についてはこれまで触れられることは少なかった。しかしながら、今回の成功例からリタイア時

の種雌豚や事故等で通常の繁殖ができなくなった種雌豚の卵巣から、IVP 胚を作出することでリタイヤ豚や事故豚の産子生産が可能になると思われる。また、近年、内視鏡を用いた生体卵子吸引(Ovum pick up, (OPU))の報告がある(Rátky *et al.* 2005)。これらの技術が今後確立されれば、優良種豚や希少品種の胚を連続的に生産することが可能になると思われる。

現在我々は、ガラス化保存胚による種豚配布の実証試験を実施している。現在、外科的移植で 60~70%程度の受胎率および平均産子数が 5 頭前後の成績となっている。この成績は第 1 章で述べた新鮮胚による種豚導入試験に近い成績である。近年、非外科的移植についても安定した受胎率を報告されてきた(Cuello *et al.* 2005 ; Suzuki *et al.* 2006; Nakazawa *et al.* 2007)。このことから、胚の非外科的移植技術が確立されれば、開腹手術の施設がない農場においても胚移植が可能になり、養豚業においても胚移植技術を普及させることは可能だと思われる。

最後に、本学位論文として提示した胚移植を用いた優良豚導入に関する一連の研究は、疾病の蔓延のために起こった養豚業界での種豚流通停滞の打開策となりうるブタ胚移植技術の普及に貢献すると示唆される。

謝 辞

本研究論文をまとめるにあたり終始ご指導を賜りました山口大学連合獣医学研究科 菊地和弘博士、山本芳実博士、音井射重博士、佐藤宏博士、高木光博博士に心から感謝いたします。

筆者に、ブタの胚移植技術全般を教授していただいた、元鹿児島大学農学部獣医学科教授小島敏之博士に心から感謝しお礼申し上げます。

研究を遂行するにあたり常に助言をいただいた独立行政法人農業生物資源研究所 大西彰博士、独立行政法人動物衛生研究所 吉岡耕治博士、鈴木千恵博士、および株式会社機能性ペプチド研究所 星宏良博士、山下祥子博士、水戸友美氏に心より感謝申し上げます。

また、本研究の実証試験としてガラス化保存胚による種豚導入を実施いただいた佐賀県畜産試験場 大曲秀明氏に心より感謝申し上げます。

今回、ガラス化器具の試作品である「胚スティック」を作製していただいたミサワ医科工業株式会社製品開発部長 御澤弘靖氏に心から感謝しお礼申し上げます。

実際の豚の管理から開腹手術までやっていただいた、独立行政法人家畜改良センター技術部技術第一課の相馬正明氏、有賀孝氏、森忠克氏に心からお礼申し上げます。また、一緒に研究をしていただいた、鈴木美佐枝氏(現生物資源研究所)、江川紗智子氏(現家畜改良センター宮崎牧場)、平山裕理氏に感謝いたします。

引用文献

Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB. Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology* 2002;57:2155-2165.

Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 2003;59:1839-1850.

Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C, Terqui M. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 2000;41:116-124.

Berthelot F, Martinat-Botte F, Perreau C, Terqui M. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reproduction Nutrition Development* 2001;41:267-272.

Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallance C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000;40:110-116.

Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003;46:146-152.

Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botté F, Venturi E, Guillouet P, Vázquez JM, Roca J, Martínez EA. Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Animal Reproduction Science* 2005;85:275-286.

Diehl JR, Day BN. Utilization of frozen sections with the vaginal biopsy technique for early pregnancy diagnosis in swine. *Journal of Animal Science* 1973;37:114-117.

Fujino Y, Kojima T, Nakamura Y, Kobayashi H, Kikuchi K, Funahashi H. Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 2008;70:809-817.

Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following *in vitro* fertilization. *Biology Reproduction* 1997;57:49-53.

Guerin B, Nibart M, Marquant-Le Guienne B, Humblot P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology* 1997;47:33-42.

Guthrie HD, Polge C. Treatment of pregnant gilts with a prostaglandin analogue, Cloprostenol, to control oestrus and fertility. *Journal of Reproduction and Infertility* 1978;52:271-273.

Hancock JI, Hovell GJR. Egg transfer in the sow. *Journal of Reproduction and Infertility* 1962;4:195-201.

James JE, James DM, Martin PA, Reed DE, Davis DL. Embryo transfer for conserving valuable genetic material from swine herds with pseudorabies. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1983;183:525-528.

Kashiwazaki N, Ohtani S, Nagashima H, Yamakawa H, Cheng WTK, Lin A-T, Ma RC-S, Ogawa S. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *Theriogenology* 1991;35:221

Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E, Kaneko H, Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology* 1998;50:615-623.

Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M, Leibo SP. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology* 1998;36:20-31.

Hazeleger W, van der Meulen J, van der Lende T. A method for transcervical embryo collection in the pig. *Theriogenology* 1989 Nov;32(5):727-734.

Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T, Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biology Reproduction* 2002;66:1033-1041.

Kobayashi K, Hayashi S, Ohtubo Y, Honda A, Mizuno J, Hirano S. Nonsurgical embryo collection from sows with surgically shortened uteri. *Theriogenology* 1989;32: 123-129.

Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007;67:73-80.

Kvansnickii AV. Interbreed ova transplantation *Sovetsk Zooteh* 1:36-42

Love RJ, Grey RG. Early abortion of gilts as a way of synchronizing oestrus and improving litter size. *Australian Veterinary Journal* 1993;70:452.

Maehara M, Matsunari H, Honda K, Nakano K, Takeuchi Y, Kanai T, Matsuda T, Matsumura Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y, Nagashima H. Hollow fiber vitrification provides a novel method for cryopreserving in vitro maturation/fertilization-derived porcine embryos. *Biology Reproduction* 2012;87:133.

Martino A, Pollard JW, Leibo SP. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Journal of Reproduction and Development* 1996;45:503-512.

Misumi K, Suzuki M, Sato S, Saito N. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 2003;60:253-260.

Nakazawa Y, Misawa H, Fujino Y, Tajima S, Misumi K, Ueda J, Nakamura Y, Shibata T, Hirayama Y, Kikuchi K. Effect of volume of non-surgical embryo transfer medium on ability of porcine embryos to survive to term. *Journal of Reproduction and Development* 2008;54:30-34

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.

Rátky J, Torner H, Egerszegi I, Schneider F, Sarlos P, Manabe N, Brüssow KP. Ovarian activity and oocyte development during follicular development in pigs at different reproductive phases estimated by the repeated endoscopic method. *Journal of Reproduction and Development* 2005;51:109-115

Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Nakai M, Maedomari N, Ito J, Kashiwazaki N, Nagai T, Kikuchi K. Live piglets derived from in vitro-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biology Reproduction* 2009;80:42-49.

Suzuki C, Iwamura S, Yoshioka K. Birth of piglets through the non-surgical transfer of blastocysts produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development* 2004;50: 487-491.

Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Capacitation status and *in vitro* fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *International Journal of Andrology* 2002;25:84-93.

Suzuki M, Misumi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Fuchimoto D, Onishi A, Iwamoto M, Saito N, Nagai T, Kikuchi K. Successful piglet production by IVF of oocytes matured *in vitro* using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. *Theriogenology* 2006;65:374-386.

- Thibier M, Nibart M. Disease control and embryo imports. *Theriogenology* 1967;27:37-47.
- Ushijima H, Yoshioka H, Eraki R, Takahashi K, Kuwayama M, Nakane T Nagashima H. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development* 2004;50:481-486.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, AC.Perry AC Pig cloning microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000;289:1188-1190.
- Papis K, Shimizu M, Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000;54:651-658.
- Petters RM, Wells KD, Culture of pig embryos. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 1993;48:61-73.
- Polge C, Wilmut I, Rowson LEA. The low temperature preservation of cow, sheep, and pig embryos. *Cryobiology* 1974;11:560.
- Polge C, Rowson LEA, Chang MC. The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. *Journal of reproduction and fertility* 1966;12:395-397
- Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994;41:101-106.

Quinn P Barros C, Whittingham G. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility* 1982;66: 161-168

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development* 1998;51:53-58.

Wrathall AE. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. *Theriogenology* 1995;43:81-88.

Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H. Production of piglets derived from in vitro produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine and cysteine during *in vitro* fertilization. *Biology Reproduction* 2003;69:2092-2099.

Yoshioka K, Suzuki C, Onishi A. Defined system for *in vitro* production of porcine embryos using a single basic medium. *Journal of Reproduction and Development* 2008;54:2008-2013.

Yoshioka K, Noguchi M, Suzuki C. Production of piglets from in vitro-produced embryos following non-surgical transfer. *Animal Reproduction Science* 2012;131:23-29.