

学 位 論 文 要 旨

氏名 中村 嘉之

題 目：体外生産胚を用いたブタの繁殖技術の効率化に関する研究

論文要旨：本研究は、食肉処理場でと殺された雌豚の卵巣から卵子を採取し体外成熟、体外受精、体外培養を行うことでブタの体外生産胚を作製し、効率的に子豚を作出する繁殖技術の開発を目的とした。第 1 章では、これまでに胚を体外培養することで、体内で発生させた時と比較して、胚の品質や子豚への発育能が劣ることが知られている。そこで、体外成熟・体外受精直後に、受胎豚に移植し、5～6 日まで体内で培養した移植・体内培養(以下、ET-vivo)胚、体外培養液を 2 種類用いた体外培養方法(0～2 日目まで、一般的に培養に使用されるグルコースの代わりに、ピルビン酸ナトリウム(Na-Pruvate)と乳酸カルシウム(Na-Lactate)を添加した改良型 North Carolina University (NCSU)-37 液で培養し、その後グルコースを添加して 5～6 日まで培養する方法で発育した体外培養(以下、IVC)胚と品質を比較した。その結果、総胚盤胞発生率は、5 日目で ET-vivo および IVC それぞれ 20.6%ならびに 8.2%で、ET-vivo 胚が有意に高く、6 日目ではそれぞれ 23.8%ならびに 21.2%で有意差は認められなかった。また、5 日目の早期胚盤胞における細胞数は、ET-vivo 胚および IVC 胚で、それぞれ 44.6 個ならびに 21.0 個であり、胚盤胞の細胞数は、それぞれ 89.2 個ならびに 21.0 個で、有意に ET-vivo 胚が多く、6 日目の胚盤胞においても、それぞれ 94.4 個ならびに 49.9 個で、有意に ET-vivo 胚が多かった。さらに、体外受精直後の体外生産胚(Day = 0)を外科的に受胎豚 3 頭に移植した場合と、体外受精後に 6 日間体外で培養した体外生産胚(Day = 6)を受胎豚 3 頭に移植した場合の受胎・分娩率は、それぞれ 100%で、子豚への発育率はそれぞれ 2.6%ならびに 2.1%で有意な差は認められなかった。以上のことから、これまで体外培養期間が延長すると胚盤胞発生率が低下し、子豚への発育率が悪くなると報告されていたが、改良 NCSU-37 液を用いて体外培養することで、細胞数が少ないなど品質は劣るが、胚盤胞発生率および子豚への発育能力に影響のない優れた体外培養方法であることを明らかにした。

第 2 章では、第 1 章で確立した改良 NCSU-37 液を用いて、8 頭の種雄豚から作製した凍結精子を用いて体外受精後 6 日目の胚盤胞発生率に与える影響を調査した。その結果、胚盤胞発生率は、1.4～21.4%までばらつきが認められ、種雄豚により胚盤胞発生率が有意に異なることが解った。そこで、胚盤胞発生率が低い他の 3 頭の種雄豚から採取し凍結保存した精子を用いて、体外受精時の、媒精時間、カフェイン濃度および精子濃度の条件を変えることで、正常受精率や胚盤胞発生率、細胞数に与える影響を調査した。その結果、媒精条件を変えることで有意に胚盤胞発生率や胚の品質を改善出来ることが明らかになった。

第 3 章では、体外受精の影響を受けないブタ単為発生胚(以下、PA 胚)の品質の解明とその有効利用方法を検討した。体外成熟・体外受精後に 6 日間体外培養を行った IVF 区と、電気刺激によ

(別紙様式第 3 号)

る人為的活性化処理後に 6 日間体外培養を行い単為発生させた PA 区に分け、両区の胚盤胞発生率、胚の直径、形態学的観察による胚の品質評価コード(国際胚技術学会マニュアルによる Code 1、2 ならびに 3)および細胞数について調査した。初期胚盤胞の発生率は、IVF 区および PA 区でそれぞれ 8.3%ならびに 11.7%で有意に PA 区が高く、胚盤胞発生率はそれぞれ 8.2%ならびに 8.9%で有意差は認められず、総胚盤胞発生率も 16.6%ならびに 20.5%で有意な差は認められなかった。胚盤胞において、IVF 区と比較して PA 区が有意に Code 1 の割合が高かった(47.9%ならびに 62.8%)。また、胚盤胞の直径において、両区に有意差は認められなかったが、IVF 区および PA 区の細胞数は、初期胚盤胞でそれぞれ 30.4 個ならびに 25.7 個、胚盤胞で 50.2 個ならびに 37.4 個、総胚盤胞で 39.1 個ならびに 30.6 個で、すべてにおいて IVF 区の細胞数が PA 胚より多かった。以上より、PA 胚の安定的な生産が可能であり、IVF 胚と直径が変わらず形態学的観察による品質評価が優れているが、細胞数が少ないことが明らかになった。次に、PA 胚の有効活用方法として、耐凍能が低く、加温後の生存性や移植した場合に産子への発育率の低いガラス化冷却・超低温保存した体内生産された桑実胚(以下 VM)と PA 胚の胚盤胞(以下 PAB)を同時に 10 個ずつ移植(計 20 個)した区(VM+PAB 区)、ガラス化保存した体内生産された桑実胚のみを 20 個移植した対照区(VM 区)、それぞれ 5 頭ずつ発情同期化をした受胎豚に移植し、PA 胚の妊娠補助効果について検討した。その結果、受胎率は、それぞれ 83%(4/5)ならびに 60%(3/5)で、VM 区の 1 頭が 4 頭の子豚を分娩し、分娩率が 20%(1/5)であった。移植後の平均流産日はそれぞれ 42.5 日および 27.0 日で、VM+PAB 区が VM 区と比較して妊娠期間が長い傾向を示した($p = 0.08$)。このことから、PA 胚を共移植することで、分娩まで至らなかったが、受胎率が向上する傾向があり妊娠期間を延長する効果があることが明らかとなった。

以上より、改良 NCSU-37 液を用いて体外成熟・体外受精胚および体外成熟・電気刺激による人為的活性化処理胚を体外培養することで、安定的に体外生産胚および PA 胚の作製が可能となり、これらの胚を移植に活用していくことで、フィールドでの利活用やブタの繁殖技術の効率化が可能になった。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	中村 嘉之
審 査 委 員	主 査： 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 主席研究員 菊地 和弘
	副 査： 山口大学 教授 田浦 保穂
	副 査： 山口大学 教授 和田 直己
	副 査： 山口大学 教授 高木 光博
	副 査： 鹿児島大学 教授 窪田 力
題 目	体外生産胚を用いたブタの繁殖技術の効率化に関する研究

審査結果の要旨：

申請者は、食肉処理場でと殺された雌豚の卵巢から卵子を採取し体外成熟、体外受精、体外培養を行うことでブタの体外生産胚を作製し、効率的に子豚を作出する繁殖技術の開発を目的とした。

第1章では、これまでに胚を体外培養することで、体内で発生させた時と比較して、胚の品質や子豚への発育能が劣ることが知られている。そこで、体外成熟・体外受精直後に、受胚豚に移植し、5～6日まで体内で培養した移植-体内培養(以下、ET-vivo)胚、体外培養液を2種類用いた体外培養方法(0～2日目まで、一般的に培養に使用されるグルコースの代わりに、ピルビン酸ナトリウム(Na-Pruvate)と乳酸カルシウム(Na-Lactate)を添加した改良型 North Carolina University (NCSU)-37 液で培養し、その後グルコースを添加して5～6日まで培養する方法で発育した体外培養(以下、IVC)胚と品質を比較した。その結果、総胚盤胞発生率は、5日目で ET-vivo および IVC それぞれ 20.6%ならびに 8.2%で、ET-vivo 胚が有意に高く、6日目ではそれぞれ 23.8%ならびに 21.2%で有意差は認められなかった。また、5日目の早期胚盤胞における細胞数は、ET-vivo 胚および IVC 胚で、それぞれ 44.6 個ならびに 21.0 個であり、胚盤胞の細胞数は、それぞれ 89.2 個ならびに 21.0 個で、有意に ET-vivo 胚が多く、6日目の胚盤胞においても、それぞれ 94.4 個ならびに 49.9 個で、有意に ET-vivo 胚が多かった。さらに、体外受精直後の体外生産胚(Day = 0)を外科的に借腹豚3頭に移植した場合と、体外受精後に6日間体外で培養した体外生産胚(Day = 6)を受胚豚3頭に移植した場合の受胎・分娩率は、それぞれ 100%で、子豚への発育率はそれぞれ 2.6%ならびに 2.1%で有意な差は認められなかった。以上のことから、これまで体外培養期間が延長する