

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

中村 嘉之

目次

要旨	P. 1
緒論	P. 5
ブタにおける体外生産胚作製技術と移植技術の現状	P. 6
ブタにおける単為発生胚作製技術の現状	P. 7
養豚産業分野における体外受精卵/胚作製および移植の課題点	P. 8
研究の概要	P. 9
第1章 体外受精後の培養条件が胚の品質および子豚への発育能力に与える影響	P. 10
緒言	P. 11
研究 1-1 体外成熟・体外受精後の培養環境が胚の品質に与える影響	P. 13
1. 目的	P. 13
2. 材料および方法	P. 13
3. 実験区設定	P. 15
4. 結果	P. 15
研究 1-2 体外成熟・体外受精後の培養環境が胚の子豚への発育能力に与える影響	P. 27
1. 目的	P. 27
2. 材料および方法	P. 27
3. 実験区設定	P. 27
4. 結果	P. 28
考察	P. 31

第2章 凍結精液が体外生産胚の発生率に与える影響の解明	P. 34
緒言	P. 35
研究 2-1 様々な種雄豚から採取した凍結精子が体外生産胚の発生率に与える影響	P. 36
1. 目的	P. 36
2. 材料および方法	P. 36
3. 実験区設定	P. 37
4. 結果	P. 38
研究 2-2 体外受精時の媒精条件が体外生産胚の発生率に与える影響	P. 40
1. 目的	P. 40
2. 材料および方法	P. 40
3. 実験区設定	P. 40
4. 結果	P. 41
考察	P. 46
第3章 ブタ単為発生胚を活用した繁殖技術の開発	P. 48
緒言	P. 49
研究 3-1 体外生産胚と単為発生胚の品質比較	P. 51
1. 目的	P. 51
2. 材料および方法	P. 51
3. 実験区設定	P. 52
4. 結果	P. 53

研究 3-2 ガラス化保存した体内由来桑実胚 (VML) と PA 胚の共移植が胚の 受胎・分娩に与える影響	P. 60
1. 目的	P. 60
2. 材料および方法	P. 60
3. 実験区設定	P. 61
4. 結果	P. 61
考察	P. 65
総括	P. 69
謝辞	P. 72
参考文献	P. 75

要 旨

本研究は、と殺された雌豚の卵巢から卵母細胞(以下、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。これまでに、体外成熟・体外受精後の体外受精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 18 頭の卵管に胚を移植し 5~6 日までブタの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で 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-Pyruvate) 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、ET-vivo 胚の中には、脱出中および脱出胚盤胞が認められた。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ず、ET-vivo 胚には、5 日目同様に脱出中および脱出胚盤胞が認められた。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 25.0 個で、有意に ET-vivo 胚が多く、6 日目の早期胚盤胞の細胞数は、ET-vivo 胚および IVC 胚それぞれ 25.5 個ならびに 29.4 個で有意差は認められなかったが、胚盤胞の細胞数は、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、体外成熟・体外受精直後の体外生産胚(Day = 0)を外科的に受胚豚 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、これまで体外での培養期間が延長するほど、胚盤胞発生率が低下し、子豚への発育率が悪くなると考えられていたが、改良した NCSU-37 液を用いて体外培養することで、体内で発育した胚と比較して体細胞数は少なく、発育ステージや発育速度は劣るが、胚盤胞発生率および子豚への発育能に有意差のない優れた体外培

養系を確立した。

次に、第2章では、第1章で確立した体外胚生産法を用いて、8頭の種雄豚(バークシャー種 B-1～5 の5頭、ランドレース種1頭、大ヨークシャー種1頭ならびにデュロック種1頭)から作製した凍結精子を用いて同一条件下において体外受精後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判明した。そこで、胚盤胞発生率の低かった3頭の他の種雄豚(バークシャー種 B-6、7ならびに8)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(3時間もしくは5時間)、カフェイン濃度(2 mM もしくは5 mM)、精子濃度(1×10^5 精子/mL もしくは 1×10^6 精子/mL)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結果、正常受精率は種豚 B-6 で0.3%から14.3%に変化し、種豚 B-7 で8.3%から28.0%に、種豚 B-8 で0.3%から7.8%に変化した。また、胚盤胞発生率は、種豚 B-6、7ならびに8でそれぞれ0.4%が15.5%に、7.2%が17.6%に、0.6%が10.0%に向上し、媒精条件を変えることで有意に変化することが判明した。さらに、初期胚盤胞および胚盤胞における、発育ステージごとの平均細胞数においては、媒精時間、カフェイン濃度による影響は受けず、精子濃度が高くなるほど、有意に細胞数が増加した。以上より、体外受精時の媒精条件を変えることで、有意に正常受精率や胚盤胞発生率および細胞数が変化することから、体外受精時に用いる凍結精液にあった媒精条件を見つけることで胚の発生能を向上できることを明らかにした。

しかしながら、用いる精子のロット差で胚盤胞発生率が異なることが判明したことから、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。はじめに、と場で採取した卵巣から卵子を採取し、体外成熟を行った後、2区に分けた。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。初期胚盤胞において品質評価コードの成績に有意差は認められなかったが、胚盤胞においては 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、すべてのステージで 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、細胞数は少ないことが判明した。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種雌豚に移植し、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、受胎率および妊娠期間を延長する効果があることが明らかとなった。本研究により、改良型 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、これらの胚を用いて効率的に優良な遺伝形質を持つ豚の生産が可能となった。

緒 論

ブタにおける体外生産胚作製技術と移植技術の現状

ブタにおける体外生産胚作製技術は、作製までに、体外成熟・体外受精・体外培養の3つの工程からなる。食肉処理場のと殺された肉豚の卵巣から、未成熟卵子を採取し体外で培養して成熟させる体外成熟、卵子と精子を体外で受精させる体外受精、受精後の受精卵を体外で培養する体外培養である。近年では、と体からではなく、生体から卵胞卵子吸引技術 (OPU) により卵子を採取し、体外生産胚を作製する試みも行われている。1980年代後半以降に体外生産胚を受胎豚に移植することで産子を得ることが可能になり (Matitioli et al. 1989; Yoshida et al. 1993; Funahashi et al. 1996; Funahashi et al. 1997; Kikuchi et al. 1999)、今日まで多くの研究者たちが体外成熟、体外受精、体外培養および体外生産胚からの産子の作出について研究してきた。しかし、それらの努力にもかかわらず、実用化レベルにまだ到達していないのが現状である。

その理由として、子豚の生産技術が未熟であることが挙げられる。体外生産胚を確実に産子まで発育させるためには、移植する受胎豚の発情を同期化し、移植する胚の発生ステージと子宮内環境を合わせる必要がある。このため、新鮮胚で移植する場合には、体外生産胚の作製と受胎豚の用意を一度に行う必要があり、さらに子宮内に胚を移植するためには、外科的に開腹手術をして移植しなければならないからである。しかしながら近年、体外生産胚をガラス化保存し、必要な時に加温して用いる方法や、特殊なカテーテルを用いて開腹手術せずに非外科的にガラス化後の加温胚 (体内および体外生産胚) を移植する方法が開発され (Fujino et al. 2008)、実用化へ向けての試みが行われるようになってきている。

ブタにおける単為発生胚作製技術の現状

体外生産胚作製技術において、体外受精時に用いる凍結精子の品質が悪い場合には正常受精率や胚盤胞発生率が安定しないという問題が出てくる。特に、ブタの体外受精において多精子侵入率が起こりやすいことも発生率低下の原因となっている。しかしながら、単為発生胚の作製においては、体外成熟後の卵子を若干の電解質を加えたマンニトール液内で電気刺激による人為的活性化処理することで胚発生を進行させることが可能であり、精子の品質の影響を受けないため、安定的な生産が可能であると想定されている。Kurebayashi et al. (1996)が体外成熟した卵子からPA胚の胚盤胞を作製して以来、多くの研究者が単為発生胚を作製して体外成熟や体外培養条件の検討を行い、さらに初期胚に発現する遺伝子の探索を行うなど、生物発生工学分野での研究に用いられてきた。一方、Kawarasaki et al. (2009)は、新鮮胚1個と単為発生胚20個を同時に9頭に移植することで、7頭が受胎・分娩し、それぞれ1頭の新鮮胚由来の産子を得ることに成功している。このことから、PA胚は安定的に大量生産が可能であり、クローン胚(Oonishi et al. 2000; Shibata et al. 2006)やトランスジェニック胚、凍結/ガラス化冷却・融解/加温後の生存率の低いステージの胚など、希少な少数の胚とPA胚を共移植することで、産子を得ることが出来る可能性があるため、効率的な新たな繁殖手法として期待されている。

養豚産業分野における体外受精卵/胚作製および移植の課題点

食肉処理場から毎日大量の卵巢が廃棄されており、ほぼ無尽蔵に卵巢を採取することが可能であるが、その中から、体外で順調に成熟し体外受精、体外培養をへて、胚盤胞まで発育する胚は全体の10～40%程度であり、採取した卵巢の品質や培養環境により、発生率にバラつきが認められる。また、体外培養期間が延長することで、胚が体外培養環境の悪影響を受けて胚盤胞発生率や、移植後の子豚への発育率が悪くなってしまいう問題がある。

また、卵巢をロット単位で採材するため、発育した胚の親豚の特定が難しく、遺伝的に優れた個体を特定した胚の作製が困難である。これまでに、卵巢を採取した種雌豚を特定するために、生体から卵子を採取し体外生産胚を作製する試みが行なわれているが、1頭から2個の卵巢しか採材できないため、採取出来る卵子数(約10～40個)が限られており、その後の胚盤胞の数も限られてしまうため、移植胚数の確保が出来なくなってしまう問題がある。

さらに、移植する場合に体外生産胚は凍結/ガラス化冷却して超低温保存しておくことが体内生産胚と比較して難しく、融解/加温後の生存性が低いので、新鮮胚での移植が基本となる。そのため、受胚豚のホルモン同期化などの準備と、体外生産胚の作製を同時に実施しなければならず、多くの問題がある。また、これまでの体外生産胚由来の産子は、開腹手術を行い外科的に子宮内に移植することで妊娠・出生が可能となるので、手術室や手術台など特殊な設備と特殊な技術のあるところでしか実施できなかった。しかしながら、近年、特殊なカテーテルを用いて受精卵/胚を非外科的に移植する方法が開発されたが(Fujino et al. 2008; Nakazawa et al. 2008)、黄体期にカテーテルを挿入するため、カテーテルが挿入できない個体や、カテーテル先端の到達部位の確認が難しく、まだ研究過程にあるのが現状である。

研究の概要

以上のことより、本研究は、ブタの遺伝的優良資源のフィールドでの利活用を目的として、体外生産胚を用いたブタの繁殖技術の効率化を目指し、以下の実験を行った。

1) 体外受精後の培養条件が胚の品質および子豚への発育能力に与える影響

これまで、体外受精後の体外培養期間が延長するほど、胚の品質や胚盤胞発生率、子豚への発育率の低下が認められている。そこで、体外培養条件を変えることで、胚の品質に与える影響について検討した。特に、体外受精後に体内に戻して体内培養後に再回収した胚の品質と比較した。また、体外受精後直後に受胚豚に移植した胚と、体外受精後に体外で培養後に受胚豚に移植した胚の子豚への発育率を調査した。

2) 様々な種雄豚の凍結精液を用いた体外受精後の胚品質と媒精条件の検討

体外受精に用いる凍結精子の差が、体外生産胚の胚盤胞発生率および細胞数に与える影響を調査し、発生率の悪い精子を用いた場合において、体外受精条件を検討することで、胚の品質改善が可能であるのか調査した。

3) 単為発生胚の品質と凍結保存胚との共移植効果

ブタ単為発生胚は、精子と体外受精しないで作製できるが、体外受精した体外生産胚との品質を比較した研究は少ない。そこで、食肉処理場で採材した卵巢から卵子を採取し、無作為に2つに分けて、単為発生胚と体外生産胚を作製し、その品質を調査した。また、ガラス化冷却・超低温保存した体内由来の桑実胚は、加温後の生存率および移植後の産子への発育率の低いことが報告されているため、これらの低発生能を示す単為発生胚と共移植することで、受胎・分娩率および産子への発育率を向上させることが可能か調査した。

第1章 体外受精後の培養条件が胚の品質および子豚への発育能力に与える影響

緒言

体外成熟および体外受精させたブタ胚の生存性や、体外培養後に受胎豚の子宮内に胚を移植して、子豚にまで発育する能力について様々な研究機関で実験がされ、報告されている。これまでに、体外成熟・受精後に体外で1~2日間体外培養した2~4細胞期胚 (Yoshida et al. 1993; Funahashi et al. 1996; Funahashi et al. 1997; Kikuchi et al. 1999) や、8細胞期胚から桑実胚 (Day et al. 1998)、胚盤胞 (Kashiwazaki et al. 2001; Kikuchi et al. 2002) を受胎豚に移植し産子を得ることに成功している。いくつかの報告では、体外受精後の体外培養によって、体外生産胚の品質が落ちることが報告されており、体外でわずか1~2日間培養するだけで、胚盤胞発生率や子豚への発育能力が低下してしまう (Kikuchi et al. 1999)。一般的に、卵子や胚を体外で培養すると、その発育能力は、体内で発育した卵子や胚と比較して劣ると言われている (Kashiwazaki & Shino 2001; Nagai et al. 2001; Kashiwazaki et al. 2001)。

多くの動物種において、体外培養液に Na-Pyruvate と Na-Lactate を添加することで、胚を胚盤胞まで発生させて、体外培養を成功させることが出来ることが広く知られている。ブタ胚においても、体内で発育した胚を体外で Na-Pyruvate と Na-Lactate を入れた培養液で培養することで胚盤胞を作製することに成功した報告がある (Wright 1977; Davis & Day 1978; Menino & Wright 1982)。一方、ハムスターやマウス、ブタ胚において体外培養初期におけるグルコースの添加は、有害であることが報告されているが (Kikuchi et al. 2002; Schini & Bavister 1988; Ankrah & Appoah-Opong 1999)、胚ステージが桑実胚や胚盤胞の体外培養後期においてグルコースは、エネルギー源として必要であるとの報告がある (Flood & Wiebold 1988; Sturmey & Leese 2003)。そこで、培養条件を改善するために、NCSU-37 を用いた体外培養において体外培養前期 (0~2日) にグルコースの代わりに Na-Pyruvate と Na-Lactate を添加し、それ以降の4日間 (2~6日) はグルコースを添加して培養する改良 NCSU-37 を用いることで、胚の体外での発育を効果的に改善し、胚盤胞を受胎豚

に移植し子豚を得ることに成功した(Kikuchi et al. 2002)。また、2001年に柏崎らは、体外成熟・体外受精胚それ自身は、胚盤胞に発育する高い能力を有しており、体内に移植した後6日後に再び回収することで、優れた品質の胚盤胞を回収できたことを報告している。しかしながら、体内および体外で発育した胚盤胞の子豚への発育能力について明らかになっていない。

本研究では、体外成熟・体外受精後の胚を体内環境（受胎豚に移植）および改良NCSU-37を用いた体外環境で5日もしくは6日間発育させて、胚盤胞に発育する能力および胚の品質、移植した場合の子豚への発育率について調査した。

研究 1-1 体外成熟・体外受精後の培養環境が胚の品質に与える影響

1. 目的

体外成熟・体外受精後の胚を体内環境および体外環境で5日もしくは6日間発育させて、発生した胚盤胞の品質を比較した。

2. 材料および方法

1) 卵子の回収と体外成熟

卵巢は食肉処理場より、主に三元交雑豚(ランドレース、大ヨークシャーならびにデュロックの交配から生産された肉豚)から採取し、卵子回収用液内で卵胞をメスで切開し卵丘細胞卵子複合体を採取した。卵子回収液にはメディウム 199 液に 10% ウシ胎子血清(fetal calf serum 以下、FBS)、20 mM HEPES、抗生物質を添加したものを用いた。卵子成熟は NCSU-37 (Petters & Wells 1993)に、10% 卵胞液、0.6 mM システイン、1 mM dibutyryl cAMP (以下、dbcAMP)、ホルモン剤として 10 IU/mL equine chorionic gonadotropin (eCG; Peamex, Sankyo Lifetech Co., Ltd., Tokyo, Japan)ならびに 10 IU/mL human chorionic gonadotropin (hCG; Puberogen, Novartis Animal Health, Tokyo, Japan)、抗生物質を添加し、20~22 時間培養し、その後、dbcAMP、ホルモン剤を取り除き 24 時間培養した。すべての培養は 39°Cにて、5%酸素、5%二酸化炭素ならびに 90%窒素の気相下で実施した。

2) 体外成熟卵の体外受精

体外受精には、と殺したランドレース種の種雄豚の精巣上体から精子を採取し、凍結保存した精子を用いた。凍結精子は融解後、PH7.8 に調整した(Nagai et al. 1988)メディウム 199 液 (with Earle's salts, Gibco, Waltham, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) で 38°C、15 分間前培養を行い用いた。体外受精培地には、Pig-FM 培地(Suzuki et al. 2000; Suzuki 2001)に 8 mM 塩化カルシウム、2 mM ピルビン酸ナトリウム、2 mM カフェインお

よび 5 mg/mL ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, Fraction V, Sigma、以下、BSA) を添加して媒精時間 3 時間、精子濃度 0.7×10^5 /mL の媒精条件で体外受精を行った。

3) 体外受精・体外受精卵の移植および回収と体外培養方法

体外成熟・体外受精した胚を移植する受胚豚には、7~8 ヶ月齢の三元交雑の未経産豚を用いた。1,000 IU eCG を筋肉内投与し、72 時間後に 500 IU hCG を投与して発情同期化 (Fujino et al. 2006) した受胚豚の両子宮角先端の卵管膨大部に PP カテーテル (3.5Fr, 富士平工業 (株)) を用いて胚を移植した。移植後 5 日および 6 日目に、1% FBS 添加ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's Phosphate buffered saline、以下、PBS) を用いて子宮内を還流し、胚を回収した ET-vivo 胚区と体外成熟・体外受精後そのまま改良 NCSU-37 を用いて体外培養を行った IVC 胚区の 2 区に分けた。体外培養液は 2 種類作製し、培養 0~2 日目までを、IVC-PyrLac (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 NCSU-37) で培養した。2 日目から 6 日目もしくは 7 日目までは、IVC-Glu (50 μ M β -mercaptoethanol、4 mg/mL BSA ならびに 5.55 mM Glucose を添加した NCSU-37) で培養した (Kikuchi et al. 2002)。すべての培養は 38.5°C にて、5% 酸素、5% 二酸化炭素ならびに 90% 窒素の気相下で実施した (Figure 1)。

4) 胚の評価

ET-vivo 胚と IVC 胚は、倒立顕微鏡下で明瞭な胚盤胞腔が認められているものを、胚盤胞として分類し、マイクロメーターを用いて、直径が 180 μ m 未満を初期胚盤胞、180 μ m 以上を胚盤胞および (拡張胚盤胞も含む)、脱出中胚盤胞、脱出胚盤胞の 4 つに分類した。また、胚盤胞発生率および位相差顕微鏡下で細胞数をカウントした。

5) 統計処理

胚盤胞発生率は、統計解析前にアークサイン変換し (Snedecor & Cochran 1989)、平均細胞数とともに Statistical Analysis System (Ver. 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC,

USA、以下 SAS)を用い、分散分析(analysis of variance, ANOVA)を用いて統計処理し、モデルに有意差が検出された場合、Tukey's multiple range test で平均値の多重比較検定を行った。

3. 実験区設定

1) 受精率の評価

体外受精に用いた精子の受精率を評価するため、体外受精後に IVC-PyrLac 液で 7 時間培養した後、カルノア液(酢酸 : エタノール = 1 : 3)で固定・脱脂後、1%酢酸オルセインでクロマチン染色を施し、精子侵入率と前核形成率について、位相差顕微鏡を用い観察した。

2) 体内および体外培養が胚の発育に与える影響

体外成熟・体外受精後に体内および体外で胚を培養した時の、胚盤胞発生率、発育ステージ、胚の形態について比較した。合計 4,457 個の胚を 18 頭の受胎豚に外科的に移植し(Figure 2)、移植後 5 日もしくは 6 日目に子宮角をかん流し回収した ET-vivo 胚と、そのまま体外で 5 日もしくは 6 日間培養した IVC 胚 2,762 個について比較した。

3) 体内および体外培養が胚の品質に与える影響

体外成熟・体外受精後に体内で 5 日もしくは 6 日間培養し胚盤胞に発育した ET-vivo 胚それぞれ 68 個および 79 個と、5 日もしくは 6 日間体外で培養し胚盤胞に発育した IVC 胚それぞれ 87 個および 89 個について倒立顕微鏡下で初期胚盤胞とそれ以上のステージの胚盤胞に分類した後、前述通りカルノア液で固定・脱脂後、酢酸オルセイン液でクロマチン染色を施し、位相差顕微鏡を用いて細胞数を比較した。

4. 結果

1) 受精率の評価

体外成熟培養した卵子のうち 76.4% (84/110)が成熟し、そのうち 44.0%が第一極体およ

び第二極体を放出していた。44.0%のうち70.3%に雄性前核の形成が認められ、正常受精率は56.8%であった(Table 1)。

2) 体内および体外培養が胚の発育に与える影響

Table 2 に示すとおり、計 2,703 個の体外成熟・体外受精胚を 10 頭の受胎の卵管に移植し、5 日後に再回収したところ 10 頭から計 2,190 個の胚を回収した。胚の回収率は 81.0% (2,190/2,703) であった。2,190 個のうち 453 個が胚盤胞まで発育し、胚盤胞発生率は 20.6% (453/2,190) で、胚盤胞の発育ステージは初期胚盤胞から脱出胚盤胞まで認められ、内細胞塊は鮮明であり変性細胞が少なかった。また、いくつかの胚盤胞において透明体にガラス状の付着物が認められた(Figure 3)。

一方、体外で 5 日間培養した胚の胚盤胞発生率は 8.2% (97/1,211) で、発育ステージは初期胚盤胞および胚盤胞であった。各ステージの胚盤胞発生率は、初期胚盤胞および変性胚において有意に ET-vivo 胚と比較して IVC 胚が高く (3.6% ならびに 6.0%, $P < 0.05$; 79.4% ならびに 91.8%, $P < 0.01$)、胚盤胞 (15.1% ならびに 2.2%, $P < 0.01$)、脱出中胚盤胞 (0.8% ならびに 0.0%, $P < 0.05$) および総胚盤胞 (20.6% ならびに 8.2%, $P < 0.01$) において有意に IVC 胚が低かった (Table 2)。

次に、計 1,754 個の体外成熟・体外受精胚を 8 頭借腹ブタの卵管に移植し、6 日後に回収したところ 7 頭から 745 個の胚を回収した。胚の回収率は 42.5% (745/1,754) であった。745 個のうち 178 個が胚盤胞に発育し、胚盤胞発生率は 23.8% (178/745) で、胚盤胞の発育ステージは初期胚盤胞から脱出胚盤胞まで認められた。体外で 6 日間培養した胚の胚盤胞発生率は 21.2% (328/1,551) で、発育ステージ初期胚盤胞および胚盤胞であった。各ステージの胚盤胞発生率は、初期胚盤胞および胚盤胞において有意に ET-vivo 胚と比較して IVC 胚が高く (3.6% ならびに 11.9%, $P < 0.01$; 5.8% ならびに 9.3%, $P < 0.05$)、脱出中胚盤胞 (1.8% ならびに 0.0%, $P < 0.01$)、脱出胚盤胞 (12.5% ならびに 0.0%, $P < 0.01$) および総胚盤胞において有意に IVC 胚が低かった。総胚盤胞および変性胚に有意差は認められなかつ

たが (Table 3)、IVC 胚において変性細胞が多く認められた (Figure 3)。

3) 体内および体外培養が胚の品質に与える影響

Table 4 の示すとおり、5 日目の ET-vivo 胚および IVC 胚における初期胚盤胞、胚盤胞および総胚盤胞の細胞数は有意に ET-vivo 胚が多かった (それぞれ 44.6 ならびに 21.0、89.2 ならびに 25.0、72.8 ならびに 22.1, $P < 0.01$)。6 日目の ET-vivo 胚および IVC 胚における初期胚盤胞に有意差は認められなかったが、胚盤胞および総胚盤胞の細胞数は、有意に ET-vivo 胚が高かった (それぞれ 94.4 ならびに 49.9、78.7 ならびに 39.7, $P < 0.01$) (Table 5, Figure 4)。

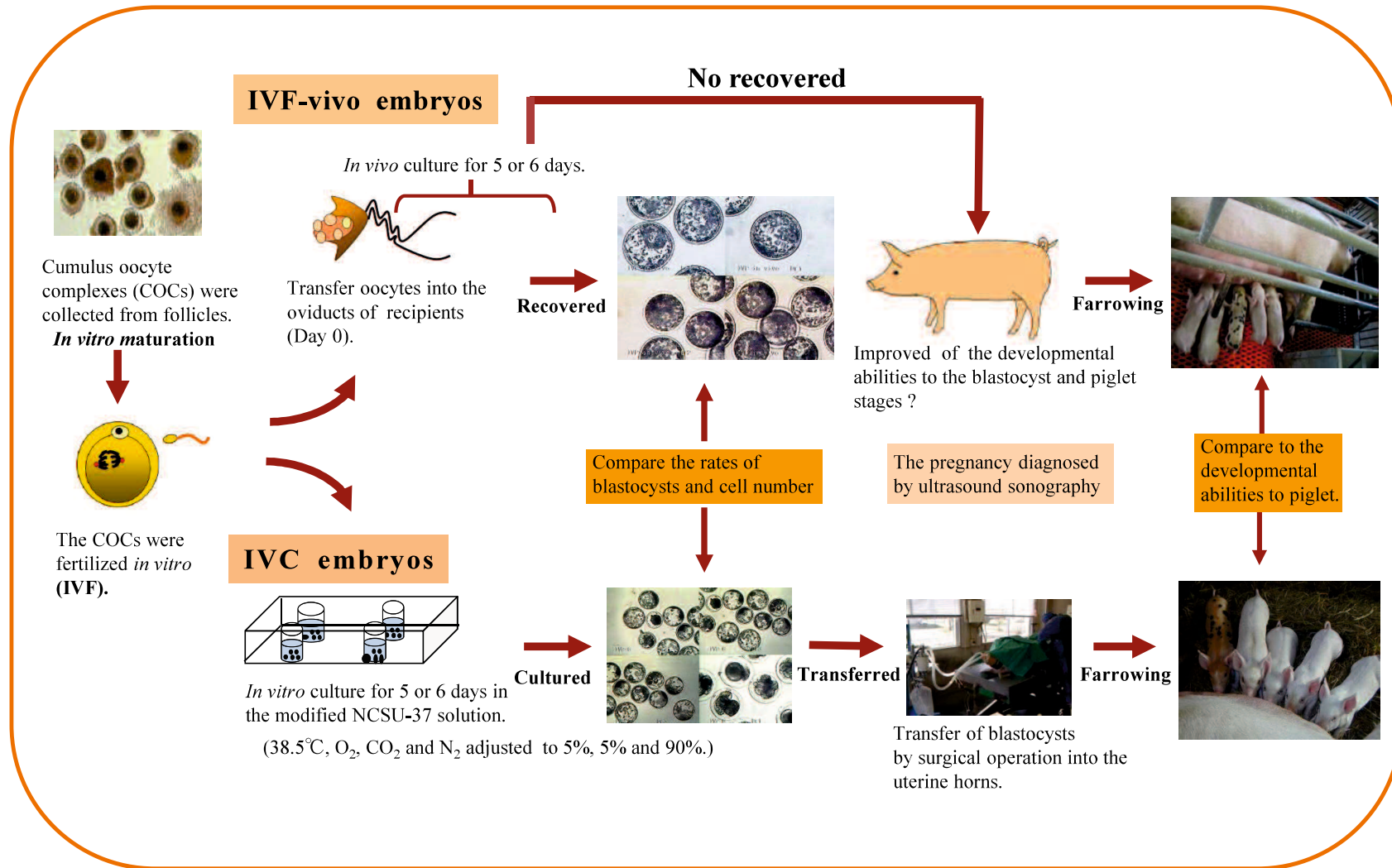


Figure 1. Materials and methods.



Figure 2. Surgical embryos transfer and recover.

Table 1. IVM/IVF of porcine oocytes.

Total No. of oocytes examined	No. (%) of matured oocytes ^a	No.(%) of penetrated oocytes ^b		
		Penetration	MPN ^c formation	Monospermy ^d
110	84 (76.4 ± 4.1)	37 (44.0 ± 3.5)	26 (70.3 ± 6.0)	21 (56.8 ± 15.1)

Four replicated trials were carried out. Percentages are expressed as mean ± SEM.

^aOocytes at the metaphase-II stage or penetrated oocytes with one first and one second polar body.

^bPenetrated oocytes with one first and one second polar body.

^cMPN; male pronucleus(ei).

^dWith both single MPN and female pronuclei.

Table 2. Development of IVM/IVF oocytes to the blastocyst stage on Day 5 after transfer to recipients or culture *in vitro*.

Group	Total No. of transferred /cultured oocytes	Total No. of collected oocytes	No. (%) of embryos that developed to				No. (%) of degenerated embryos	
			Early blastocyst	Blastocyst	Hatching blastocyst	Hatched blastocyst		Total
ET-vivo	2703 [†]	2190	79 (3.6 ± 0.9 ^c)	329 (15.1 ± 2.8 ^a)	18 (0.8 ± 0.3 ^c)	27 (1.2 ± 0.9)	453 (20.6 ± 3.4 ^a)	1737 (79.4 ± 3.4 ^a)
IVC	1211 [‡]	–	73 (6.0 ± 0.4 ^d)	24 (2.2 ± 0.4 ^b)	0 (0.0 ^d)	0 (0.0)	97 (8.2 ± 0.5 ^b)	1114 (91.8 ± 0.5 ^b)

Percentages are expressed as mean ± SEM of total number of examined oocytes.

[†]Total of 2703 IVM/IVF oocytes were transferred to 10 recipients on Day 0 (*in vivo* culture) and embryos were recovered from 10 recipients on Day 5.

[‡]Total 1211 IVM/IVF oocytes were subsequently cultured *in vitro* without transfer until Day5 of IVF.

Values in the same column with different superscripts differ significantly (^{a,b}*P* < 0.01, ^{c,d}*P* < 0.05).

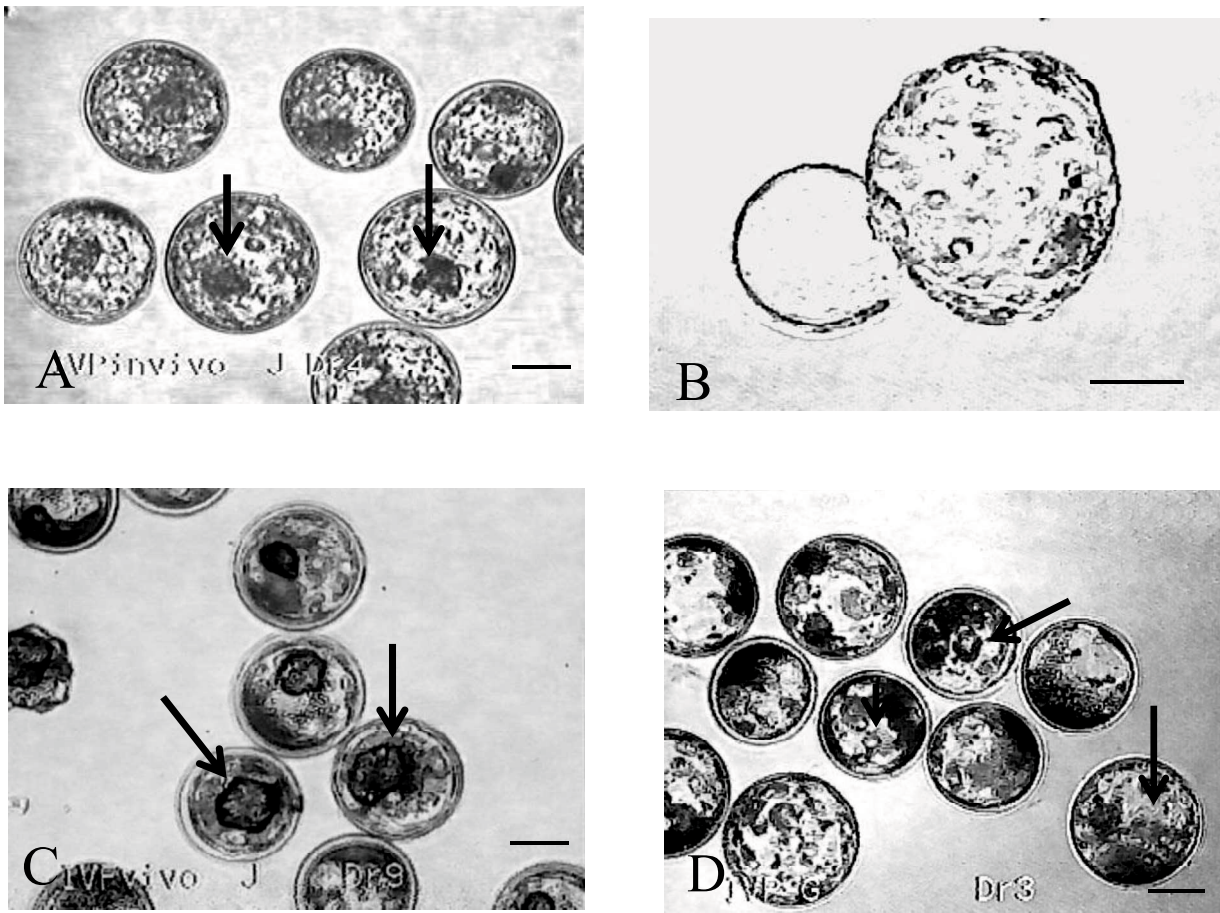


Figure 3. *In vitro*-matured and fertilized oocytes were transferred to recipients and recovered (ET-vivo), or subjected to continuous *in vitro* culture (IVC). Blastocysts after collection and culture were then evaluated.

A) ET-vivo blastocysts recovered on Day 5 (Day 0 = *in vitro* fertilization). An inner cell mass in some blastocysts was clearly confirmed (arrows).

B) ET-vivo hatched blastocysts on Day 5 (arrows).

C) ET-vivo blastocysts on Day 5. These had adherent external glass-like material (arrows).

D) IVC blastocysts on Day 6 had degenerated cells (arrows). Scale bar = 100 μ m.

Table 3. Development of IVM/IVF oocytes to the blastocyst stage on Day 6 after transfer to recipients or culture *in vitro*.

Group	Total No. of transferred/cultured oocytes	Total No. of collected oocytes	No. (%) of embryos that developed to				Total	No. (%) of degenerated embryos
			Early blastocyst	Blastocyst	Hatching blastocyst	Hatched blastocyst		
ET-vivo	1754 [†]	745	26 (3.6 ± 1.5 ^a)	41 (5.8 ± 1.1 ^c)	13 (1.8 ± 0.7 ^a)	98 (12.5 ± 3.1 ^a)	178 (23.8 ± 2.5)	567 (76.2 ± 2.5)
IVC	1551 [‡]	–	180 (11.9 ± 1.2 ^b)	148 (9.3 ± 1.2 ^d)	0 (0.0 ^b)	0 (0.0 ^b)	328 (21.2 ± 1.8)	1223 (78.8 ± 1.8)

Percentages are expressed as mean ±SEM of the total number of examined oocytes.

[†]Total of 1754 IVM/IVF oocytes were transferred to 8 recipients on Day 0 (*in vivo* culture) and embryos were recovered from 7 recipients on Day 6.

[‡]Total 1551 IVM/IVF oocytes were subsequently cultured *in vitro* without transfer until Day 6 of IVF.

Values in the same column with different superscripts differ significantly (^{a,b}*P* < 0.01, ^{c,d}*P* < 0.05).

Table 4. Embryo quality on Day 5 after transfer to recipients or culture *in vitro*.

Group	Mean number of cells per blastocyst (No. of oocytes examined)		
	Early blastocyst	Blastocyst \leq	Total
ET-vivo [†]	44.6 \pm 17.7 ^a (25)	89.2 \pm 37.3 ^a (43)	72.8 \pm 38.2 ^a (68)
IVC [‡]	21.0 \pm 7.8 ^b (64)	25.0 \pm 8.8 ^b (23)	22.1 \pm 8.1 ^b (87)

Cell numbers are expressed as mean \pm SEM.

[†]IVM/IVF oocytes were transferred to 10 recipients on Day 0 and the blastocysts were recovered from 10 recipients on Day 5.

[‡]IVM/IVF oocytes were cultured *in vitro* until Day 5 of IVF. Replication was performed 8 times.

^{a,b}Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.01$).

Table 5. Embryo quality on Day 6 after transfer to recipients or culture *in vitro*.

Group	Mean number of cells per blastocyst (No. of oocytes examined)		
	Early Blastocyst	Blastocyst \leq	Total
ET-vivo [†]	25.5 \pm 10.7 (18)	94.4 \pm 47.1 ^a (61)	78.7 \pm 50.8 ^a (79)
IVC [‡]	29.4 \pm 10.3 (44)	49.9 \pm 16.0 ^b (44)	39.7 \pm 16.9 ^b (89)

Cell numbers are expressed as mean \pm SEM.

[†]IVM/IVF oocytes were transferred to 8 recipients on Day 0 and the blastocysts were recovered from 7 recipients on Day 6.

[‡]IVM/IVF oocytes were cultured *in vitro* until Day 6 of IVF. Replication were performed 10 times.

^{a,b}Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.01$).

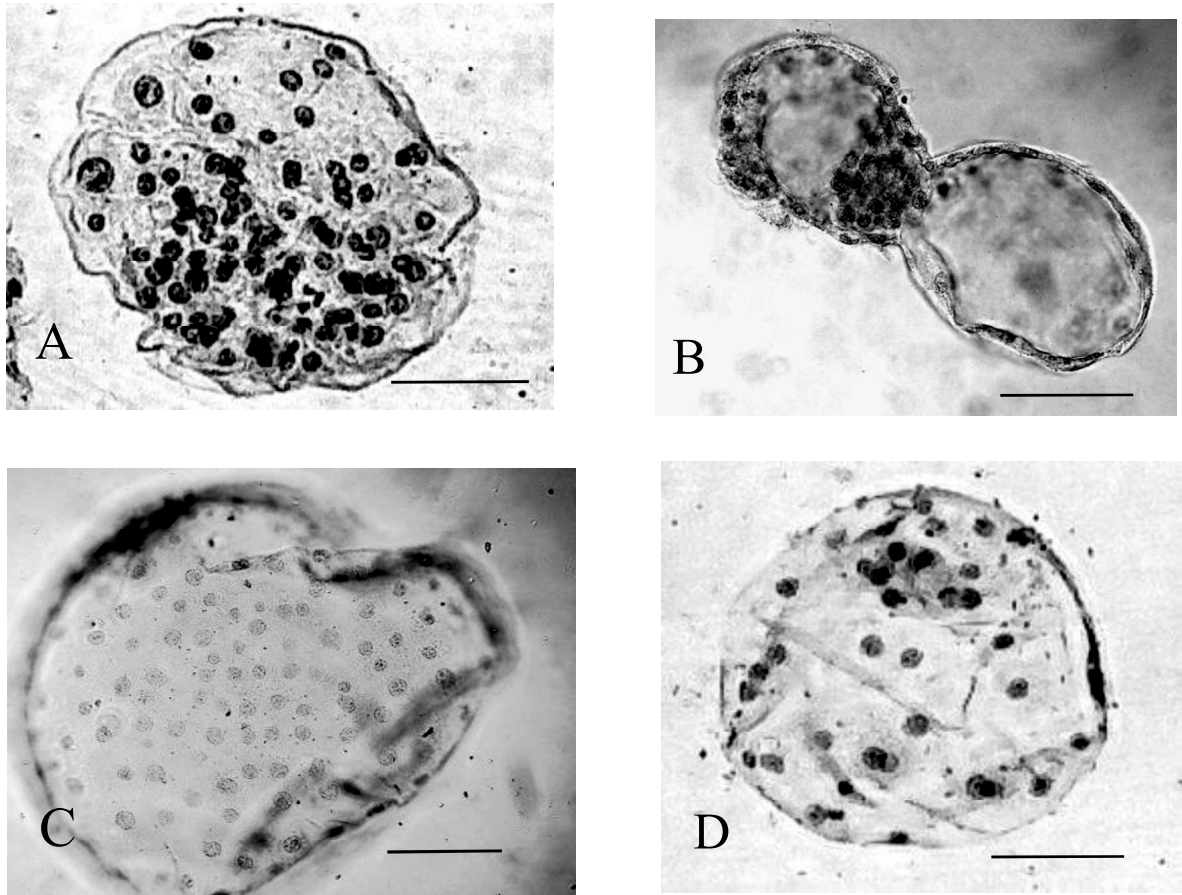


Figure 4. *In vitro*-matured and fertilized oocytes were transferred to recipients and recovered (ET-vivo), or subjected to continuous *in vitro* culture (IVC). Blastocysts after collection and culture were fixed, stained and evaluated.

A) ET-vivo blastocysts on Day 6 (Day 0 = *in vitro* fertilization).

B) ET-vivo hatching blastocysts.

C) ET-vivo hatched blastocysts on Day 6.

D) IVC blastocysts on Day 6. Scale bar = 100 μ m.

研究 1-2 体外成熟・体外受精後の培養環境が胚の子豚への発育能力に与える影響

1. 目的

体外成熟・体外受精後の胚を体内環境および体外環境で 6 日間発育させて、発生した胚盤胞を受胚豚に移植し子豚への発育能力を比較した。

2. 材料および方法

1) 卵子の回収と体外成熟および体外受精

研究 1-1 と同様に実施した。

2) ET-vivo 胚および IVC 胚の移植

移植する受胚豚には、7~8 ヶ月齢の三元交雑の未經産豚を用いた。体外成熟・体外受精直後の ET-vivo 胚は、1,000 IU eCG を筋肉内投与し、72 時間後に 500 IU hCG を投与して発情同期化(Fujino et al. 2006)した受胚豚の両子宮角先端の卵管膨大部に PP カテーテルを用いて移植した。6 日間体外培養を行い胚盤胞まで発生した IVC 胚は、発情同期化した HCG 投与後 5 日目に受胚豚の子宮角先端部に PP カテーテルを用いて胚を移植した。

3) 統計処理

妊娠期間および生時体重および産子数に関するデータについては、前述同様に SAS を用い ANOVA を行った。モデルが有意な場合は、Tukey's multiple range test を行った。胚移植試験に関する受胎データについては、 χ^2 検定および Fisher's exact test により解析した。

3. 実験区設定

1) 体内および体外培養後の子豚への発生能力

体外成熟・体外受精直後に受胚豚に移植した場合と、体外で 6 日間培養後に移植した場合の子豚への発育能力の違いについて検討した。hCG 投与 44 時間後に、3 頭の受胚豚の卵管に体外受精直後の胚をそれぞれ 200 個ずつ外科的に移植した ET-vivo 区と hCG 投与後 5 日目に 6 日間体外培養した胚盤胞 50 個ずつを 3 頭の受胚豚の子宮角に移植した IVC 区について、受胎・分娩率、産子数、平均子豚体重、妊娠期間および子豚への発育率について比較した (Figure 1)。

4. 結果

1) 移植結果

Table 6 のとおり、体外成熟・体外受精胚および IVC 胚を 6 頭 (それぞれ 3 頭ずつ) の受胚豚に移植した結果、すべて受胎・分娩し、計 32 頭の子豚を分娩した (Figure 5)。体外成熟・体外受精胚および IVC 胚の子豚への発育率は、それぞれ 2.6% および 2.1% であった。また、子豚の生時体重および、妊娠期間に有意差は認められなかった。

Table 6. Production of piglets derived from IVM/IVF oocytes (transferred on Day 0) and blastocysts cultured *in vitro* for 6 days.

Group	No. of transfer experiment	Total No. of transferred IVM/IVF oocytes	Total No. of transferred blastocysts	Total No. (%) of farrowed recipients	Total No. of piglets farrowed	Average body weight of piglets at birth ^a [kg]	Gestation period ^a [days]	Developmental Rate ^b [%]
ET-vivo	3	600	–	3 (100.0)	16	1.2 ± 0.5	116.0 ± 2.4	2.6
IVC	3	–	150	3 (100.0)	16	1.5 ± 0.5	117.3 ± 2.3	2.1

Three recipients farrowed 5, 5 and 6 piglets in each group.

^aValues are expressed as mean ± SEM.

^bDevelopmental rates were calculated from the total number of piglets per the total number of the 600 IVM/IVF oocysts transferred (200 per recipient) and 150 blastocysts (50 per recipient) that were cultured *in vitro* from 756 oocytes.



Figure 5. Piglets 10 days after farrowing. These were derived from blastocysts that had been transferred after *in vitro* culture for 6 days.

考察

本章では、体内および体外培養環境が胚盤胞発生率および子豚への発育能力に有意差が無いことが示された。しかしながら、胚の品質や発育ステージは培養環境や培養期間により異なることが示された。Kikuchi et al. (1999)は、体外生産胚の低い生存率や低品質が体外培養環境の不適合によるものであると推察し、2002年に体外生産胚の体外培養方法を改良した。これまで、体外培養に用いられてきた NCSU-37 培養液を基に、体外培養の工程を2区に分けて、培養0～2日までは、グルコースの代わりに Na-Pyruvate および Na-Lactate を添加し、2～6日までは、Na-Pyruvate および Na-Lactate を取り除きグルコースを添加する方法である。

研究1では、改良 NCSU-37 を用いて体外培養することで、体内環境で発育した胚と6日目の胚盤胞発生率を比較したが変わらなかった(23.8%ならびに 21.2%)。このことは、体外培養環境に影響を受けることなく、正常受精した胚(19.2%)のほとんどが胚盤胞に発育出来ることを示している。しかし、細胞数においては体内および体外でそれぞれ 78.7 個および 39.7 個であった。

Kashiwazaki et al. (2001) は、体外成熟・体外培養直後の胚を6日間体内培養することで胚盤胞発生率が体外で培養した場合の 20.1%から 37.1%に向上し、細胞数が 38.4 個から 182 個に増加したことを報告しているが、その時の正常受精率は 15.3%であった。このことは、胚盤胞発生率が大きく正常受精率を超えている。Nagai. (2001)は、多精子受精した胚が胚盤胞に発生してくるため、胚盤胞発生率には正常受精した胚と多精子受精した胚が混在して発育しているので注意する必要があると報告している。三倍体以上の胚は移植しても産子まで発育しないため、胚移植により産子を得るためには、用いる精子の品質に合った体外受精条件を見つけ出す必要がある。また、細胞数において本研究では体内培養することで体外培養に比べ 1.98 倍(78.7/39.7)、Kashiwazaki et al. (2001)の報告において 4.7 倍(182/38.4)の増加効果が認められた。

卵管や子宮角内は、胚が成熟や受精、着床まで存在する場所であり、胚にとって発育するのに最適な環境である。本研究では、受胚豚に7~8ヶ月齢の春機発動前の未経産豚を用いているが、Kashiwzaki et al. (2001)は人工授精し妊娠させ45日目にPGF2 α を用いて人工流産させた豚を受胚豚に用いたため、卵管および子宮角内環境が、本試験で用いた受胚豚より胚が発育するのに優れていた可能性がある。また、体外成熟・体外受精後の胚を通常排卵される以上の個数を一度に移植したため、細胞数の増殖が柏崎らより少なかった可能性が示唆された。また、体内培養5日目の胚が体内培養6日目の胚の回収率より高かった(81%ならびに42.7%)ことから、体内培養期間が延びるほど脱出胚盤胞が着床前の胎盤との相互作用により灌流により回収できず、細胞数に加えることが出来なかったことも、6日目に顕著に細胞数が増加しなかった原因の一つだと思われる。Fujino et al. (2006)は、hCG投与後の胚の発育ステージについて調査した結果、投与後164時間後(6.8日後)に胚盤胞が得られたと報告しており、Hunter et al. (1967)は、未経産豚にhCG処理を行うと、42時間前後に排卵が起こることを報告している。このことから、排卵後に卵子が体内受精し、そのまま子宮内で胚が胚盤胞まで発育するのにかかる時間は122時間(5.1日)前後であると推定できる。本実験において、体外成熟・体外培養胚を体内で120時間(5日間)発育させると胚盤胞が発生し、体外培養を行うと胚盤胞は144時間(6日間)目に発生してきたことから、体内に胚を戻すことで胚の発育スピードは、体内受精胚と同じ発育スピードになるが、体外で培養すると24時間程度発育速度が遅くなることが解った。これらの結果は、明らかに卵管や子宮内環境が胚の発育をサポートすることを示しているが、その原因については今回の研究で明らかに出来なかった。これまでに、卵管上皮細胞から成長因子となる多くの蛋白質の分泌や酸化還元状態の調節など興味深い報告(Bureau et al. 2000; Kouba et al. 2000)がある。さらにそれらの要因について調査する必要がある。体内生産胚と比較してほとんどの体外生産胚は、桑実胚と変性胚を区別することが難しい。そして、体外生産胚の胚盤胞腔内には、しばしば変性細胞が認められる。これらの変性細胞は分裂することが出来ないため、死滅して胚盤胞腔内に取り残されてしまい、細胞数を減少させ

る原因となる。今後、体外生産胚において何故このような変性細胞が出現するのか調査をすすめる必要がある。

次に、体外受精直後の胚と体外で6日間培養した胚を受胚豚3頭ずつ計6頭に移植したところ、すべてが受胎および分娩し、どちらも平均5.3頭の子豚を分娩した。用いた体外成熟・体外受精胚から産子への発育率は、それぞれ2.6%および2.1%であり、ET-vivo胚の胚盤胞発生率(23.8%)から胚盤胞数を試算すると600個の胚から142.8個の胚が胚盤胞になったと仮定した場合の胚盤胞に対する子豚への発育率は11.2%となり、IVCで10.7%となる。これまでに、Kikuchi et al. (2002)の子豚への発育率は11.0%で平均産子数は5.6頭、Marchal et al. (2001)で発育率が2.5%で産子数が2頭、Yoshioka et al. (2003)の発育率24%で平均産子数が5.2頭であった。これらの結果は、移植した環境がそれぞれ異なり、子豚への発育率が様々であることを示したが、これまでの報告の全てにおいて、平均産子数は5.6頭以下であるため、通常的人工授精によって生まれる産子数より少ない。平均産子数は移植する胚の数と関連性がなく、移植する胚の数を増やしても産子を増やすことは出来なかったものと思われる。この現象についてさらに調査する必要がある。

なお、今回の実験で体外培養を6日間おこなっても、子豚への発育能力や妊娠期間、平均産子数および生時体重は、体内培養胚と変わらないことが明らかになった。

第2章 凍結精液が体外生産胚の発生率に与える影響の解明

緒言

体外生産胚は、遺伝的能力の高い種雄豚の凍結精子から作製ができ、安定的に大量生産が可能となる。しかし、体外受精時の正常受精率が、胚盤胞発生率やその後の産子への発育率に重要な要因であることが報告されている。第1章の実験では、1頭の雄豚から採取した精巢上体精子を体外受精時に用いた。精巢上体精子は精漿等に暴露されていないため、融解後の精子の生存性が安定しているが(Rath & Niemann 1997; Kikuchi et al. 1998)、生体から容易には採取ができないという欠点がある。そこで、通常の繁殖管理で用いる雄豚生体から採取した射出精液を凍結保存し、体外受精に供する必要がある。しかし、射出精液の生存性は、採取する品種や個体、年齢などにより異なり、いわゆる耐凍性の違いがあることが広く一般的に知られている(Pelaez et al. 2006)。同一個体であっても採取時期により耐凍性が異なり、凍結・融解後の生存性も個々のロットによって異なる。

本章では、異なる種雄ブタから精液を採取し、凍結・融解後に体外受精に用いることで、個体やロットの違いが胚盤胞発生率に与える影響を検討した。また、胚盤胞発生率の低い凍結精子において体外受精条件を調整することで、正常受精率や胚盤胞発生率を向上させることが可能かどうかについても検討した。

研究 2-1 様々な種雄豚から採取した凍結精子が体外生産胚の発生率に与える影響

1. 目的

様々な種雄豚の射出精液から作製した凍結精子を用いて、同一の体外受精条件で体外生産胚を作製し、胚盤胞発生率に与える影響を比較した。

2. 材料および方法

ブタ精子用希釈液および凍結精液の作製

1) 精液希釈液の作製

希釈液は、曾根ら(1992)の方法に準じた改良モデナ液を用いた。グルコース 152 mM、クエン酸三ナトリウム二水和物 23.5 mM、重炭酸水素ナトリウム 12 mM、EDTA-2Na 6.3 mM、クエン酸水和物 13.8 mM、トリスアミノメタン 46.6 mM、ポリミキシン B 100 IU/mL、ゲンタマイシン硫酸塩 100 μ g/mL により作製した。

2) 凍結媒液 1 (NSF-1) の作製

凍結媒液には、丹羽(1989)および Kikuchi et al. (1998)の方法に準じて作製した。80% (v/v) の 310 mM ラクトース、20% (v/v) の卵黄および抗生物質を 1,600 \times g で 15 分間遠心分離処理した後、上澄み液を NSF-1 とした。

3) 凍結媒液 2 (NSF-2) の作製

92.5% (v/v) の NSF-1 に 1.5% (v/v) Equex Stem (Noba Chemical Sales Inc. Scituate, MA, USA)、6% (v/v) グリセリンおよび抗生物質を添加したものを NSF-2 とし凍結保存した。なお、調整した NSF-1 および NSF-2 は -80°C で保存し、使用時に室温 (25°C) にて融解し、それぞれ 15°C および 5°C で用いた。

4) 精液採取と凍結および融解方法

精液の採取は、性成熟に達した種雄豚のバークシャー種 5 頭、ランドレース種 1 頭、大ヨークシャー種 1 頭、デュロック種 1 頭の計 8 頭を用いた(それぞれ、凍結精液 B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、L、W および D とした)。手圧法により、精子濃度の濃い精液をそれぞれの種雄豚から採取し、金属メッシュ(茶こし：網目の大きさ 0.75 mm、直径 65 mm × 高さ 30 mm)を用いて膠様物を除去した。濾した精子は精液希釈液と 3:2 の割合で混合後、2 時間かけて 15°C まで冷却後、10 分間 800 × g で遠心分離処理し、上澄液を除去した。その後、NSF-1 と混合し 1.5 時間かけて 5°C まで低下させた後、NSF-1 と等量の NSF-2 を混合し、最終精子濃度を 1×10^9 精子/mL として、0.25 mL プラスチックストローに充填した。すべてのストローは試験管立てを使用し液体窒素表面上 4cm のところに静置し、蒸気中で 10 分間予備冷却した後、直接液体窒素に投入し凍結保存した。融解方法は、液体窒素中からストロー取り出し、すぐさま 38°C の温湯中に 10 秒間浸漬し融解した。

5) 統計処理

胚盤胞発生率は、前述同様に統計解析前にアークサイン変換し、SAS を用い ANOVA を行った。統計モデルが有意な場合は、Tukey's multiple range test を行った。

3. 実験区設定

1) 種雄豚の凍結保存精子を用いた体外受精後の胚盤胞発生率

体外成熟、体外受精および体外培養方法は第 1 章の研究 1-1 の方法に準じた。8 頭の種雄豚から採取し凍結保存した精子を用いて、媒精時間 3 時間、カフェイン濃度 2 mM、精子濃度 1×10^5 /mL、の媒精条件で体外受精を行い、体外受精(体外受精日を 0 日とした)後 6 日目の胚盤胞発生率について調査した。

4. 結果

体外培養 6 日目の 8 頭の種雄豚から採取し凍結保存した精子を計 3,910 個の卵子を用いて体外受精した結果、胚盤胞発生率は 1.4%(種雄豚 B-5)から 21.4%(種雄豚 B-4)まで幅が認められた。種雄豚 B-2、B-4 および W において高い胚盤胞発生率を示し(それぞれ 19.5%、21.4%ならびに 20.6%)、種雄豚 B-1、B-3 および D において中程度の発生率を示し(それぞれ 15.9%、12.5%ならびに 15.0%)、種雄豚 B-5 および L において低い発生率を示した(それぞれ 1.4%ならびに 9.0%)。それぞれの精子による胚盤胞発生率には、Table 7 の示すとおり有意差が認められた。

Table 7. Development of IVM/IVF oocytes of using frozen-thawed semen from several boars.

Boars [†]	Replication	Total No. of cultured embryos [‡]	No. (%) of blastocysts	No. (%) of degenerated embryos
B-1	6	518	84 (15.9 ± 3.5 ^{ab})	434 (84.1± 3.5 ^{ab})
B-2	6	538	106 (19.5 ± 1.0 ^a)	432 (80.5± 1.0 ^a)
B-3	11	480	50 (12.5 ± 2.6 ^b)	430 (87.5± 2.6 ^b)
B-4	8	348	66 (21.4 ± 4.0 ^a)	282 (78.6± 4.0 ^a)
B-5	7	512	10 (1.4 ± 0.9 ^c)	502 (98.6± 0.9 ^c)
L	4	268	23 (9.0 ± 2.0 ^b)	245 (92.7± 2.0 ^b)
W	7	546	108 (20.6 ± 2.0 ^a)	438 (79.4± 2.0 ^a)
D	7	700	111 (15.0 ± 1.9 ^{ab})	589 (85.0± 1.9 ^{ab})

Percentages are expressed as mean ± SEM of total number of examined oocytes.

[†]B-1, 2, 3, 4 and 5; Bhaksher, L; Landrace, W; Large White, and D; Duroc.

[‡]Total 3,910 IVM/IVF oocytes were subsequently cultured *in vitro* until Day6.

Values in the same column with different superscripts differ significantly

(^{a,c}; ^{b,c} $P < 0.01$, ^{a,b} $P < 0.05$).

研究 2-2 体外受精時の媒精条件が体外生産胚の発生率に与える影響

1. 目的

体外受精時の媒精条件を変えることで、同一凍結精子を用いた場合に正常受精率、胚盤胞発生率および胚の品質に影響があるか検討した。

2. 材料および方法

3頭のバークシャー種の種雄豚(B-6、B-7ならびにB-8)から手圧法により精液を採取し、凍結・融解方法は研究 2-1 に準じて実施した。また、体外生産胚作製方法、正常受精率の確認、胚盤胞発生率、胚の発育ステージや品質評価については第 1 章の研究 1-1 のとおり行った。

1) 統計処理

胚盤胞発生率は、前述同様に統計解析前にアークサイン変換し、SAS を用い ANOVA を行った。モデルが有意な場合は、Tukey's multiple range test を行った。

3. 実験区設定

1) 媒精条件が受精率に与える影響

体外受精時の媒精条件として研究 2-1 では、媒精時間 3 時間、カフェイン濃度 2 mM、精子濃度 1×10^5 /mL で体外受精を行ったが、本研究では、126 個の卵子を用いて、媒精時間 3 時間もしくは 5 時間、カフェイン濃度 2 mM もしくは 5 mM、精子濃度 1×10^5 /mL もしくは 1×10^6 /mL で実施し、体外受精後 7 時間後にカルノア液で固定・脱脂後、酢酸オルセイン液でクロマチン染色を施し、位相差顕微鏡下で、成熟率、正常受精率ならびに多精子侵入率について検討した。

2) 媒精条件が胚盤胞発生率に与える影響

1,726 個の卵子を用いて、媒精時間 3 時間もしくは 5 時間、カフェイン濃度 2 mM もしくは 5 mM、精子濃度 $1 \times 10^5/\text{mL}$ もしくは $1 \times 10^6/\text{mL}$ で実施し、体外受精後 6 日目の胚盤胞発生率について調査した。

3) 媒精条件が胚盤胞の細胞数に与える影響

体外培養 6 日目に胚盤胞まで発育した初期胚盤胞 (透明帯外周までの直径 $< 180 \mu\text{m}$) および胚盤胞 ($\geq 180 \mu\text{m}$) に分類し、カルノア液で固定・脱脂後、酢酸オルセイン液でクロマチン染色を施し、位相差顕微鏡下で細胞数を測定して媒精条件が細胞数に与える影響について調査した。

4. 結果

1) 媒精条件が受精率に与える影響

Table 8 のとおり種雄豚 B-6 の精液を使用した実験において成熟率は 70.1% であった。媒精時間を 5 時間にする事で正常受精率が 0.3% から 11.3% に上昇する傾向を示した。また、カフェイン濃度の効果は認められなかったが精子濃度を $1 \times 10^6/\text{mL}$ にすることで、正常受精率が 11.2% から 14.3% に増加する傾向を示した。多精子侵入率の増加は認められなかった。種雄豚 B-7 において、同じく成熟率は 70.6% で、媒精時間を 5 時間にする事で多精子侵入率が 12.5% から 3.7% に低下する傾向を示した。また、カフェイン濃度を 5 mM にすることで、正常受精率および多精子侵入率が、それぞれ 11.1% から 25.0%、3.7% から 6.2% に上昇する傾向を示し、精子濃度を $1 \times 10^6/\text{mL}$ にすることで、さらに正常受精率および多精子侵入率がそれぞれ 25.0% から 28.0%、6.2% から 8.1% に上昇する傾向を示した。種雄豚 B-8 において、成熟率は 72.8% で媒精時間を 5 時間にしても正常受精率や多精子侵入率に変化は認められなかった。また、カフェイン濃度を 5 mM にすることで、正常受精率および多精子侵入率がそれぞれ 0.3% から 7.8%、0.1% から 4.1% に上昇する傾向を示したが、精子濃度を

1 × 10⁶/mL にすることで、変化は認められなかった。

2) 媒精条件が胚盤胞発生率に与える影響

Table 9 のとおり種雄豚 B-6 において、媒精時間を 5 時間にすることで有意に胚盤胞発生率が 0.4% から 15.5% に増加したが、カフェイン濃度および精子濃度による有意差は認められなかった。種雄豚 B-7 において、媒精時間を 5 時間にしても胚盤胞発生率は増加しなかったが、カフェイン濃度を 5 mM にすることで、胚盤胞発生率は 11.1% から 16.2% に有意に増加した。種雄豚 B-8 においても同様に、媒精時間を 5 時間にしても胚盤胞発生率は有意に増加しなかったが、カフェイン濃度を 5 mM にすることで、胚盤胞発生率は 0.6% から 6.2% に増加する傾向を示した。また、種雄豚 B-6、B-7 および B-8 において、精子濃度を 1 × 10⁶/mL にすることで、胚盤胞発生率が増加する傾向を示したが有意差は認められなかった。

3) 媒精条件が胚盤胞の細胞数に与える影響

Figure 6 に示すとおり、初期胚盤胞および胚盤胞の細胞数は、媒精時間およびカフェイン濃度による影響は受けず、精子濃度が高くなることで胚盤胞の細胞数が有意に高くなった ($P < 0.05$)。

Table 8. IVM/IVF of porcine oocytes of several IVF-condition.

Boars [†]	Matured oocytes ^a late (%)	IVF-Times (h)	Caffeine concentration (mM)	Sperm concentration (1×10^6)	Polyspermy late (%)	Monospermy late (%)
B-6	70.1	3	2	5	0.0 ± 0.0^a	0.3 ± 0.3^a
		5	2	5	3.4 ± 0.5^b	11.3 ± 2.1^b
		5	5	5	3.2 ± 1.2^b	11.2 ± 3.3^b
		5	5	6	3.6 ± 1.3^b	14.3 ± 3.6^b
B-7	70.6	3	2	5	12.5 ± 2.8^a	8.3 ± 2.2^a
		5	2	5	3.7 ± 3.3^b	11.1 ± 2.3^a
		5	5	5	6.2 ± 3.9^b	25.0 ± 8.2^b
		5	5	6	8.1 ± 5.4^{ab}	28.0 ± 9.4^b
B-8	72.8	3	2	5	0.1 ± 0.4^a	0.3 ± 0.8^a
		5	2	5	0.1 ± 0.3^a	0.3 ± 0.7^a
		5	5	5	4.1 ± 2.1^b	7.8 ± 3.8^b
		5	5	6	3.0 ± 1.6^b	7.0 ± 1.8^b

Percentages are expressed as mean \pm SEM of total number of examined oocytes.

[†]B-6, 7, 8 ; Bhaksher, frozen semen indicated of low development late of the blastocyst on normal IVF-condition (IVF 3 h, Caffeine 2mM, Sperm concentration 1×10^5 sperm/mL).

Values in the same boar and column with different superscripts differ significantly (^{a,b} $P < 0.05$).

Table 9. Development of IVM/IVF oocytes to the blastocyst stage of several IVF-condition.

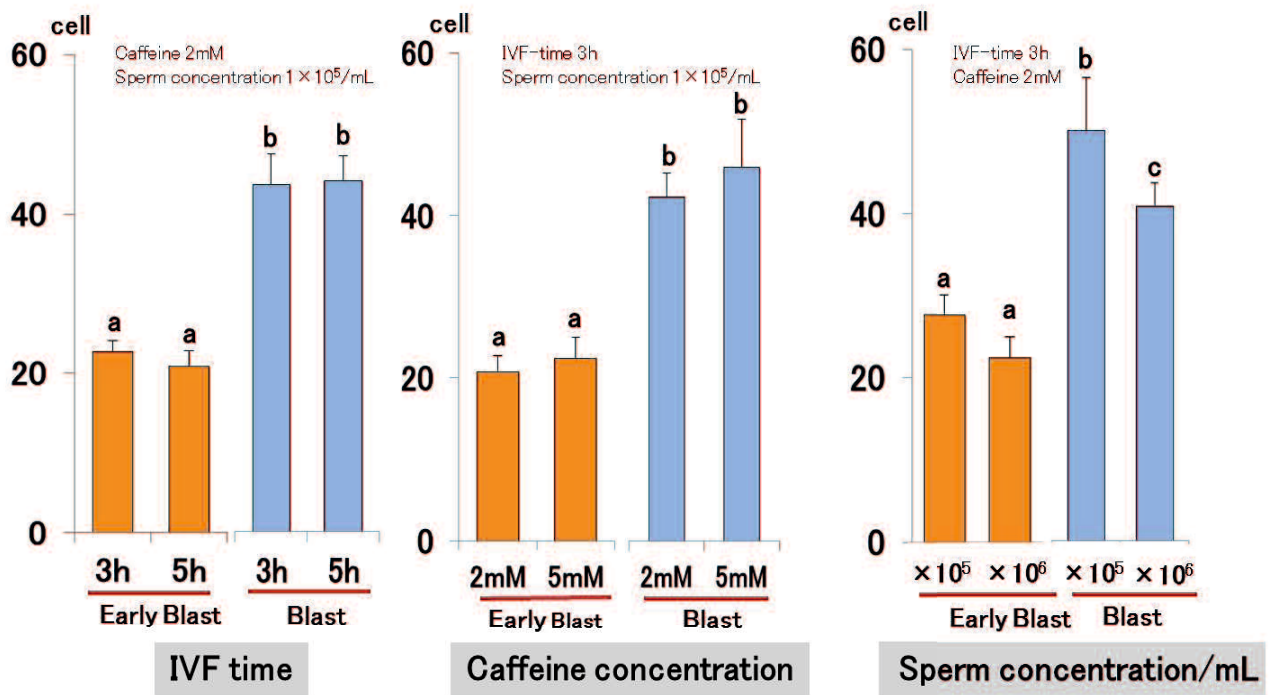
Boars [†]	Total No. of cultured embryos [‡]	IVF-Times (h)	Caffeine concentration (mM)	Sperm concentration (1×10^n)	Developed blastocyst (%)
B-6	249	3	2	5	0.4 ± 0.8^a
	148	5	2	5	10.1 ± 0.5^b
	160	5	5	5	8.8 ± 6.3^{ab}
	200	5	5	6	15.5 ± 4.6^b
B-7	125	3	2	5	7.2 ± 1.0^b
	72	5	2	5	11.1 ± 3.4^b
	130	5	5	5	16.2 ± 3.6^c
	125	5	5	6	17.6 ± 10.3^{bc}
B-8	161	3	2	5	0.6 ± 0.8^a
	96	5	2	5	1.0 ± 0.7^a
	130	5	5	5	6.2 ± 3.8^{ab}
	130	5	5	6	10.0 ± 1.8^b

Percentages are expressed as mean \pm SEM of total number of examined oocytes.

[†]B-6, 7, 8 ; Bhaksher, frozen semen indicated of low development late of the blastocyst on normal IVF-condition (IVF 3h, Caffeine 2 mM, Sperm concentration 1×10^5 sperm/mL).

[‡]Total 1,726 IVM/IVF oocytes were subsequently cultured *in vitro* until Day6.

Values in the same column with different superscripts differ significantly ($^{a,b,c}P < 0.05$).



a,b: a,c P<0.01, b,c P<0.05

Figure 6. Effect of blastocysts cell number after several IVF conditions.

考察

研究 2-1 において、体外成熟・体外受精後に胚が胚盤胞に発育する能力は、用いる凍結・融解精子の違いに影響を受けることが明らかとなった(1.4%~21.4%、Table 1)。これらの結果は、いくつかの研究者の報告と同様である(Wang et al. 1991; Selles et al. 2003; Suzuki et al. 2005)。通常、繁殖用の種雄豚として現場で、肉豚や種豚生産のために自然交配や人工授精に用いられている豚の精液は、ほとんどの場合、新鮮精液で利用されており、凍結・融解後の生存性や受精能力の評価がされてないため、耐凍性の高い精子を生産する種雄豚の選抜が行われていない。そのため、融解後の生存性や受精率の低い精子を体外受精に用いると、胚盤胞発生率が低下してしまう(Pelaez et al. 2006)。また、射出精液は精漿と混合しているため、精漿の品質が体外受精に影響を与えると報告がされている(Rath & Niemann, 1997)。さらに、別の理由としては、Gil et al. (2008)は、体外受精時の精子濃度などの媒精条件が用いる精子に適合していないことを上げている。これら、体外受精時の繊細な条件が体外生産胚の発生率に様々なバリエーションが生まれる原因となっている。凍結・融解精子を用いた人工授精においても、個々の精子によってしばしば同様な観察結果が報告されており、受胎率や産子数に影響が現れる。これらの問題を解決する方法として、精巢上体精子を用いる方法があるが(Kikuchi et al. 1998)、精巢上体を採取しなければならず、回収するための技術や準備が必要となる。そのため、多くの場合、射出精液を用いなければならない。そこで、研究 2-2 では、英国から導入した遺伝的能力の優れたバークシャー種雄豚から射出精液を採取し、体外受精に用いて、胚盤胞発生率があまり高くなかった精子において、媒精条件を検討することで、正常受精率、胚盤胞発生率および細胞数が向上するか検討した。その結果、個々の精子により結果が異なる結果が得られたが、媒精時間を延長することで、胚盤胞発生率が向上し、また基本的な体外受精の条件でも向上しない精子においては、カフェイン濃度、精子濃度を上げることで胚盤胞発生率が向上する傾向を示した。しかしながら、カフェイン濃度および精子濃度を

上げると、多精子侵入率が上昇する傾向を示したため、Nagai (2001)が報告したとおり、三倍体以上の胚が一定の胚のステージまで、正常受精した胚と混在して発生してくる可能性があり注意が必要であると思われる。

以上より、精子の能力を最大限に引き出す体外受精時の最適条件を見つけ出すことで、胚盤胞発生率の低い精子でも発生率を向上させることが可能となり、有効活用が可能となることが示唆された。

第3章 ブタ単為発生胚を活用した繁殖技術の開発

緒言

近年、ブタの受精卵/胚移植技術が急速に進展し、優良な遺伝資源の保存・個体発生や、新たな遺伝資源の導入、クローン豚や人の医学研究用の遺伝子改変豚の生産など、様々な場面で活用されるようになってきた。しかし、多大な努力を費やしてこれらの胚を作製しても、移植後の子豚へ発生する率はかなり低く、それまでの努力が無駄となる状況である。これらの希少な胚は、体外生産胚であれば作製時の体外生産環境、凍結/ガラス化冷却処理、マイクロマニピレーション操作、あるいは体外胚培養等の種々の影響により、着床能力が減少し、受胎しにくい原因の一つになっており、これらの胚の受胎・分娩率を向上させる方法の早急な開発が求められている。

ブタの受胎機構は他の動物種と大きく異なり、子宮内に4個以上の胚が存在しないと着床し妊娠を維持できないと報告されている(Polge et al. 1966; Oguri 1990)。このような生理学的特徴により、これまで貴重な胚を一度に多く移植しなければならなかったが、他の胚と共移植することで、本来の貴重な胚の受胎・分娩をサポートすることが解ってきた。Kawaraski et al. (2009)は、新鮮胚1個と単為発生胚20個を同時に9頭に移植し、7頭からそれぞれ1頭ずつの新鮮胚由来の産子を得ることに成功した。この結果は、希少な胚の着床および受胎をその他の胚がサポートすることを明確に示した。また、単為発生胚は産子にまで発育しないため(Kurebayashi et al. 2000)、共移植により生産された子豚の遺伝子鑑別が必要ないなどの利点がある。

一方、凍結/ガラス化冷却・融解/加温後の桑実胚の生存性は、胚盤胞のそれと比較して落ちることが知られており(Pollard et al. 1994; Beebe et al. 2002; Cuello et al. 2004; Ushijima et al. 2004)、子豚への発育率も低いことから(Berthelot et al. 2001; Misumi et al. 2003)、長い間、このステージの胚の有効な移植方法の開発が期待されてきた。

そこで、本章では、単為発生胚を作製し、第1章で開発した優れた体外培養方法を用い

て、IVF 胚と発生率や品質を比較するとともに、共移植方法を活用することで、凍結・融解した桑実胚の受胎・分娩率を向上させることが可能か検討した。

研究 3-1 体外生産胚と単為発生胚の品質比較

1. 目的

第 1 章で開発した体外培養系を用いて、採取した卵子を無作為に 2 グループに分けてから体外生産胚と単為発生胚を作製し、その胚盤胞発生率および胚盤胞の品質を比較することで単為発生胚の特性について調査した。

2. 材料および方法

1) 体外生産胚の作製

体外生産胚の体外受精には第 2 章の研究 2-1 で高い胚盤胞発生率を示し、保存本数の多い大ヨークシャー種の凍結精液を用いた。また、体外生産胚作製方法、正常受精率の確認、胚盤胞発生率、胚の発育ステージについて第 1 章の研究 1-1 のとおり行った。

2) 単為発生胚の準備

単為発生胚の作製は、Kawarasaki et al. (2009)らの方法を改良して行った。体外成熟を 48 時間行い、卵丘細胞をヒアルロニダーゼ処理およびピペッティング操作で裸化した後、0.28 mM マンニトール液中で電気刺激(150 kV/cm DC)による活性化誘起処理を行った。その後、5 μ g/mL サイトカラシン B を添加した IVC-PyrLac で 2 時間培養後、通常の IVC-PyrLac で 2 日目まで培養し、2 日から 6 日まで IVC-Glu で培養し、胚盤胞に発生した胚を単為発生胚とした。

3) 胚の評価

体外生産胚と単為発生胚は、倒立顕微鏡下ではっきりと胚盤胞腔の認められているものを胚盤胞として選別し、直径 180 μ m 未満を初期胚盤胞、180 μ m 以上を胚盤胞(拡張胚盤胞を含む)の 2 つに分類した。また、胚の品質の形態学的評価について、国際胚技術学会

(International Embryo Technology Society)のマニュアル(Robertson & Nelson, 2009)に基づき分類して評価した(品質評価: Code 1~3, Code 1が最も優れたスコア)。胚盤胞発生率および位相差顕微鏡下で細胞数をカウントした。

4) 統計処理

胚盤胞発生率は、前述同様に統計解析前にアークサイン変換し、SASを用いANOVAを行った。モデルが有意な場合は、Tukey's multiple range testを行った。

3. 実験区設定

1) 体外生産胚の受精率

体外受精に用いた精子の受精率を評価は、体外受精後にIVC-PyrLac液で7時間培養した後、カルノア液で固定・脱脂後、酢酸オルセイン液でクロマチン染色し、第一および第二極体の放出率、精子侵入率と前核形成率について、位相差顕微鏡を用いて調査した。

2) 体外生産胚と単為発生胚の胚盤胞発生率の比較

体外生産胚をIVFグループ、単為発生胚をPA胚グループとした。体外成熟、体外受精および体外培養方法は第1章の研究1-1の方法に準じた。大ヨークシャー種1頭から採取し凍結保存した精子を用いて、媒精時間3時間、カフェイン濃度2mM、精子濃度 1×10^5 /mL、の媒精条件で体外受精を行い、体外受精後6日目の胚盤胞発生率について調査した(IVFグループ)。PA胚グループは、体外成熟後に電気刺激による人為的活性化刺激を行い、体外培養6日目の胚盤胞発生率について調査した。

3) 体外生産胚と単為発生胚の品質比較

IVFグループとPA胚グループの胚盤胞は、初期胚盤胞と胚盤胞の2つの発育ステージに分類し、さらに倒立顕微鏡下で品質評価コードとして、Code 1、2ならびに3に分類した。

また、胚の直径をマイクロメーターで計測した。さらに、初期胚盤胞および胚盤胞はステージごとにカルノア液で固定・脱脂後、酢酸オルセイン液でクロマチン染色し、位相差顕微鏡を用いて細胞数をカウントし比較した。

4. 結果

1) 体外生産胚の受精率

体外成熟培養後の卵子を体外受精したところ、75.7% (109/145)が受精し、そのうち76.1% (39/51)に雄性前核の形成が認められ、正常受精率は56.0% (29/51)であった (Table 10)。

2) 体外生産胚と単為発生胚の胚盤胞発生率の比較

Table 11 に示すとおり、計 914 個の卵子から体外生産胚を作製したところ 72 個の初期胚盤胞と 79 個の胚盤胞の計 151 個の胚盤胞が発生した (IVF グループ)。計 1,001 個の卵子を、電気刺激による活性化誘起処理を行った結果、120 個の初期胚盤胞と 77 個の胚盤胞の計 197 個の胚盤胞が発生した (PA グループ)。初期胚盤胞の発生率は PA 胚グループが IVF 胚グループと比較して有意に高かったが (それぞれ 11.7% ならびに 8.3%, $P < 0.05$)、胚盤胞、総胚盤胞および変性胚の発生率に有意差は認められなかった。

3) 体外生産胚と単為発生胚の品質比較

胚盤胞の品質評価コードは、IVF 胚グループと比較して PA 胚グループが有意に Code 1 の胚が多かった (47.9% ならびに 62.8%, $P < 0.05$) (Table 12, Figure 7)。また、Table 13 のとおり、胚の直径はどの発育ステージにおいても有意差はなかったが、細胞数については、初期胚盤胞、胚盤胞および総胚盤胞のすべての発育ステージにおいて、有意に IVF 胚グループが PA 胚グループと比較して多かった (それぞれ 30.4 個 ならびに 25.7 個, $P < 0.05$; 50.2 個 ならびに 37.4 個, $P < 0.01$; 39.1 個 ならびに 30.6 個, $P < 0.01$) (Figure 8)。

Table 10. IVF status of frozen thawed boar ejaculated sperm[†].

Total No. of oocytes examined	No. (%) of fertilized oocytes ^a	No.(%) of penetrated oocytes ^b		
		Sperm penetration	MPN ^c formation	Monospermy ^d
145	109 (75.7 ± 3.3)	51 (46.7± 3.2)	39 (76.1 ± 3.2)	29 (56.0 ± 4.1)

[†]Sperm from a Large White boar was used

In vitro matured oocytes were inseminated, cultured and fixed at 10 h post-insemination. Four replicated trials were carried out. Percentages are expressed as mean ± SEM.

^aOocytes at the metaphase-II stage or penetrated oocytes with one first and one second polar bodies.

^bPenetrated oocytes with one first and one second polar bodies.

^cMPN; male pronucleus(ei).

^dWith both single MPN and female pronuclei.

Table 11. Development of IVF and Parthenogenetic (PA) oocytes to the blastocyst stage.

Group	Total No. of cultured oocytes	No. (%) of blastocysts			No. (%) of degenerated embryos
		Early blastocyst [†]	Blastocyst [‡]	Total	
IVF-Day 6	914	72 (8.3 ± 0.9 ^a)	79 (8.2 ± 0.9)	151(16.6 ± 1.1)	763 (83.4 ± 1.1)
PA-Day 6	1001	120 (11.7 ± 1.6 ^b)	77 (8.9 ± 1.3)	197 (20.5 ± 2.0)	804 (79.5 ± 2.2)

Percentages are expressed as mean ± SEM of total number of examined oocytes.

[†]Early blastocysts diameter are < 180µm.

[‡]Blastocysts diameter are 180µm ≤ .

Replication were performed 10 times.

Values in the same column with different superscripts differ significantly (^{a,b} $P < 0.05$).

Table 12. Classification of blastocysts on Day 6 in culture.

Group	% Early Blastocysts [†]			% Blastocyst [‡]		
	Code 1	Code 2	Code 3	Code 1	Code 2	Code 3
IVF	7.0 ± 4.1	43.1 ± 5.2	49.9 ± 5.2	47.9 ± 4.7 ^a	46.3 ± 4.2	5.8 ± 3.1
PA	13.4 ± 4.0	42.6 ± 7.7	44.0 ± 5.5	62.8 ± 7.0 ^b	35.5 ± 6.9	3.1 ± 1.7

Embryos lank are expressed as mean ± SEM.

[†]Early blastocysts diameter are < 180µm.

[‡]Blastocysts diameter are 180µm ≤ .

The quality lank (Code 1, 2, or 3) is based on IETS embryo classification. Code 1 is the most excellent.

Values in the same column with different superscripts differ significantly (^{a,b} $P < 0.05$).

Table 13. Diameter and cell number of blastocysts on Day 6 in culture.

Group	Mean diameter [μm] of blastocyst (No. examined)			Mean cell numbers per blastocyst (No. examined)		
	Early blastocyst [†]	Blastocyst [‡]	Total [§]	Early blastocyst [†]	Blastocyst [‡]	Total
IVF	162.4 \pm 1.2 (55)	191.4 \pm 1.5 (54)	177.2 \pm 1.9 (92)	30.4 \pm 1.9 ^c (50)	50.2 \pm 1.9 ^a (39)	39.1 \pm 1.7 ^a (89)
PA	162.8 \pm 0.9 (91)	192.1 \pm 1.7 (48)	177.9 \pm 1.9 (92)	25.7 \pm 1.8 ^d (45)	37.4 \pm 2.3 ^b (33)	30.6 \pm 1.6 ^b (78)

Values are expressed as mean \pm SEM.

[†]Early blastocysts diameter are $< 180 \mu\text{m}$.

[‡]Blastocysts diameter are $180\mu\text{m} \leq$.

[§]Total 92 blastocysts (48 in each stage) were randomly chosen before calculation.

^{a,b}Values in the same column with different superscripts differ significantly (^{a,b} $P < 0.01$, ^{c,d} $P < 0.05$).

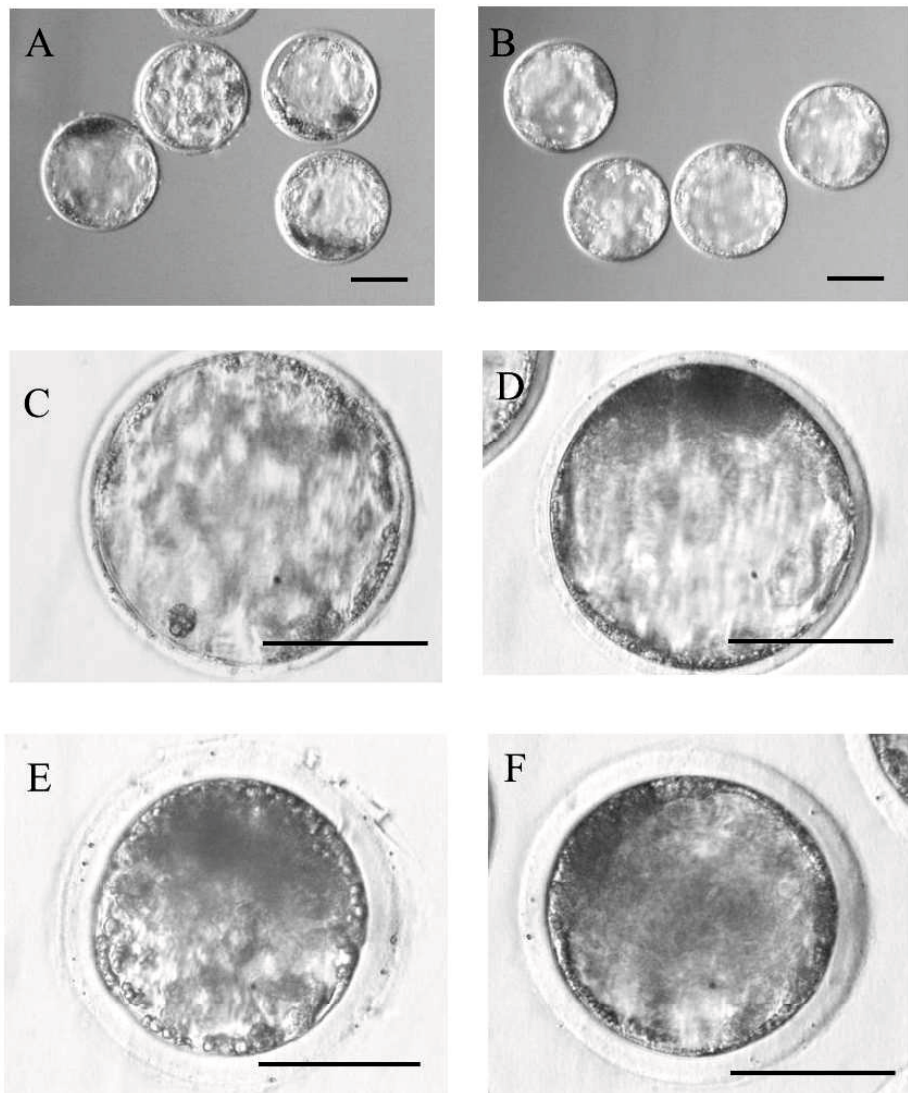


Figure 7. Putative zygotes (IVF oocytes) and parthenotes were cultured *in vitro* for 6 days (Day 0 = *in vitro* fertilization or parthenogenetic stimulation).

A) IVF blastocysts

B) Parthenogenetic blastocysts

C) Code 1 rank IVF blastocyst

D) Code 1 rank parthenogenetic blastocyst.

E) Code 1 rank IVF early blastocyst

F) Code 1 rank parthenogenetic early blastocysts. Scale bar = 100 μ m.

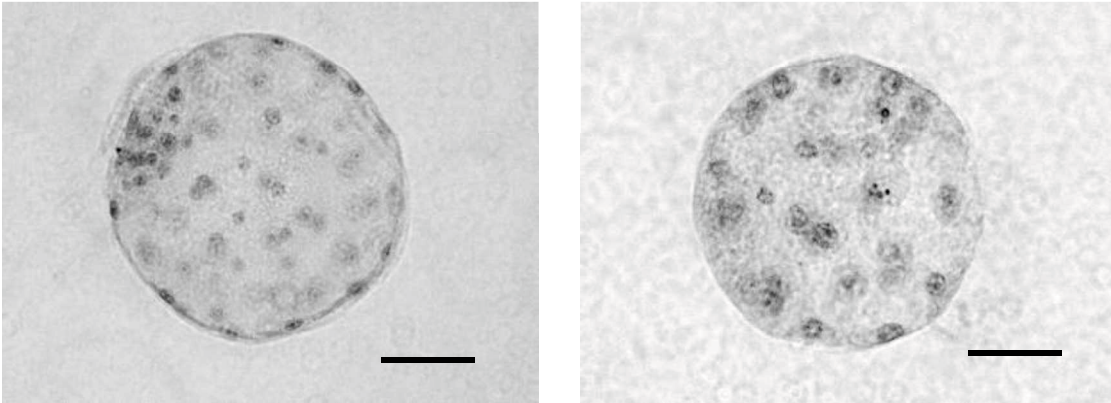


Figure 8. Putative zygotes (IVF oocytes) and parthenotes were cultured *in vitro* for 6 days and fixed, stained and evaluated for cell number.

A) IVF blastocyst (56 cells)

B) parthenogenetic blastocyst (28 cells). Scale bar = 100 μm .

研究 3-2 ガラス化保存した体内由来桑実胚(VML)と PA 胚の共移植が胚の受胎・分娩に与える影響

1. 目的

研究 3-1 で開発した PA 胚を用いて、人工授精で体内受精し桑実胚まで発育しガラス化冷却・超低温保存した胚と共移植を行うことで、これまで子豚への発育率が低いとされた発育ステージの胚から、子豚を得ることが可能か検討した。

2. 材料および方法

PA 胚の作製方法は、研究 3-1 に準じた。

1) 体内由来桑実胚のガラス化保存および加温方法

体内由来桑実胚の回収方法は、Fujino et al. (2006)の方法に準じて実施した。7～8 ヶ月齢の春季発動前のランドレース種を用いてホルモン剤で過排卵誘起処理を行い 1,500 IU の eCG 製剤投与後、72 時間後に 500 IU の hCG 製剤を投与し、人工授精を実施した。

全ての胚は hCG 投与後 140 時間後に外科的に 1 mg/mL BSA 添加 PBS を用いて、左右両方の子宮角を灌流し胚を回収し、桑実胚のみを Fujino et al. (2008)が開発したメタルメッシュを用いた超少量ガラス化保存方法用いて保存した。

胚の加温方法は、メタルメッシュを液体窒素から取り出し 0.5 mM トレハロース、20% FBS 添加 PBS を用いて、37°C で 5 分間浸漬した後、10% FBS を添加した改良 NCSU-37 を用いて 5 分間で 2 回洗浄し移植に用いた。

2) 胚移植方法 (ET)

PA 胚およびガラス化冷却・超低温保存した桑実胚を移植する受胚豚には、7～8 ヶ月齢のランドレース種の未経産豚を用いた。1,000 IU eCG を筋肉内投与し、72 時間後に 500 IU hCG を投与して発情同期化(Fujino et al. 2006)した受胚豚の両子宮角先端部に PP カテー

テルを用いて胚を移植した。

3) 受胎確認方法および流産日の測定

受胎率は、ノンリターン法および移植後 24 日目に超音波画像診断装置 (U-1000, Fukuda Densgi, Tokyo, Japan) を用いて、はっきりと胎胞の確認出来たものを妊娠と診断した (Figure 8)。また、流産日においては、流産胎子の確認もしくは陰部からの漏出物を確認した日とし、発情が回帰した個体のデータを用いた。

4) 統計処理

パーセント表示データは、前述同様に統計解析前にアークサイン変換し、SAS を用い ANOVA を行った。モデルが有意な場合は、Tukey's multiple range test を行った。また、データの一部は、 χ^2 検定および Fisher's exact test により解析した。

3. 実験区設定

PA 胚共移植による妊娠・分娩補助効果

共移植には、ガラス化保存後融解した体内生産した桑実胚と PA 胚の胚盤胞をそれぞれ 10 個ずつを外科的に、5 頭の受胚豚の子宮角先端部に移植した (VML + PA 区)。対照区として、ガラス化保存後融解した体内生産した桑実胚 20 個を同様に 5 頭の子宮角先端部に移植した (VML 区)。

4. 結果

PA 胚共移植による妊娠・分娩補助効果

受胎率は、VML+PA 区および VML 区で有意差は認められなかった (それぞれ 83.0% ならびに 60.0%) (Figure 9) が、VML 区において 1 頭が受胎・分娩した。一方、VML+PA 区および VML 区の流産日は、VML+PA 区が有意に延長することが解った (それぞれ 42.5 日ならびに 27.0

日, $P = 0.08$) (Table 14)。

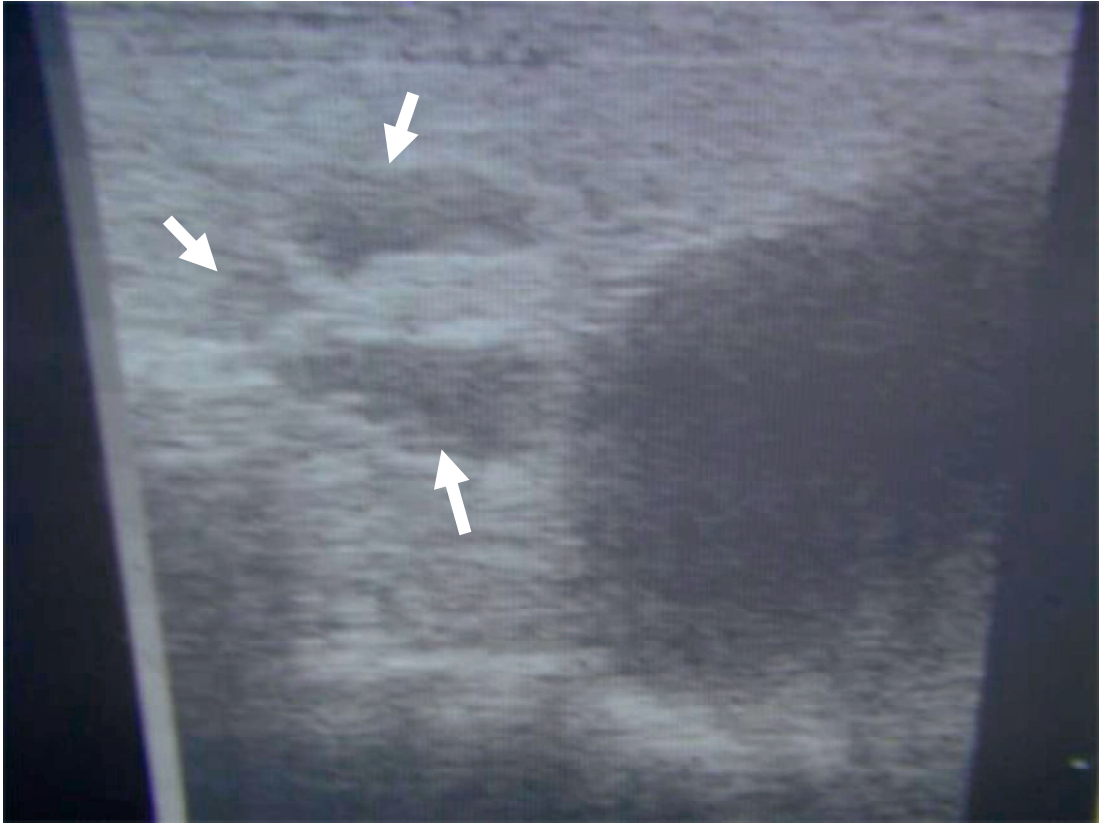


Figure 9. Pregnancy was detected on 24 day (ultrasonic diagnosis) after embryos transfer (arrows).

Table 14. Pregnancy and farrowing after transfer of vitrified and warmed morula (VM) with or without co-transfer of parthenogenetic blastocysts (PAB).

Group	No. of transfer experiment	Total No. of transferred embryos	Total No. (%) of pregnant recipients [‡]	Total No. (%) of recipients farrowed	Average of abortion day ± SEM
VM + PAB	5	20 [†]	4 (83.0)	0 (0.0)	42.5 ± 7.8
VM	5	20	3 (60.0)	1 [§] (20.0)	27.0 ± 1.7

[†] Each of 10 VM and 10 PAB stage embryos are transferred.

[‡] Pregnancy was detected on 17 day (no return estrus) and 24 day (ultrasonic diagnostic) after embryo transfer.

[§] 4 piglets (1 males and 3 females) were delivered.

考察

胚移植技術においてブタが他の動物種と最も異なる点は、同時に多くの胚を移植しなければならない点である。少なくとも4個以上の胚が着床することが、妊娠の継続には重要である(Polge et al. 1966; Oguri 1990)。これらの報告を元に、これまでに、多くの研究者が、凍結/ガラス化冷却・融解/加温後の胚を移植し、産子を得るために、他のドナーから外科的に採取した胚を少なくとも4個を共移植してきた。しかし、貴重な胚を移植すると同時に胚を作製し、共移植することは作業手順としても非常に複雑で、コストもかかってしまう。

そこで、大量生産が可能である体外生産胚や単為発生胚を共移植に利用することを考えた。正常受精率が精子のロットにより違いがあることが判明したため(第2章)、本試験では安定的に受精し(Table 1)、胚に発育する能力の高い射出精液1種類を選んだ(Table 2)。研究3-1では、IVF胚とPA胚の胚盤胞への発育能力を比較したところ、初期胚盤胞においては、PA胚の胚盤胞発生率が高かったが、胚盤胞および総胚盤胞の発生率において両区に有意差は認められなかった。本実験のPA胚の胚盤胞発生率は20.5%で、これまで報告されている発生率より低い(Hou et al. 2015; Sangho et al. 2002の2報では、29.6%よりも高い率が報告されている)。報告によって、何故違いが生じるかの理由の1つとして、今回の実験では、成熟卵子のみを選別することなく、卵丘細胞-卵子複合体を用いた。体外受精時に裸化处理する必要がないが、一方で、極体の観察が出来ないため成熟卵子のみを選別することは不可能であり、それら以外の未成熟卵子も含まれるためと考えられるからである。これらの卵子は当然ながら発生能力は減退する。また、別の理由として、本培養系を用いて、無選別卵子を7日間体外培養を行った結果、29%の胚盤胞が発生した(中村ら、未発表)。もし、成熟卵子(本培養系での平均成熟率75%)のみを選別して、体外受精を行うとともに、体外培養期間を延長することで、これまでの報告と同様の胚盤胞発生率が得られるものと推察できる。Hou et al. (2015)らは、体外培養8日目の体外生産胚とPA胚の細胞

数を比較したところ、有意に体外生産胚の細胞数が PA 胚より多かった(71.2 個ならびに 53.3 個)。本実験においても、体外生産胚の細胞数が PA 胚より多かった(50.2 個ならびに 37.4 個, Table 6)ことから、この品質の問題は、今後も PA 胚を共移植に用いる時の改良すべき点であると考えられる。一方、形態学的な品質評価において、体外生産胚と PA 胚を比較したところ、Code 1 の胚が PA 胚の方が多かった(それぞれ 47.9%ならびに 62.8%)が、胚の直径において有意差は認められなかった。これらの結果は、PA 胚は形態が優れているが(Figure 7)、胚の直径が IVF 胚と同じサイズであるため、1 個の細胞の大きさが大きいと考えられる。しかし、その詳細については明らかに出来なかった。Clay et al. (2012) は、人工授精後もしくは電気刺激後の、IVF 胚および PA 胚の初期分割が 24 時間以内に発生する率はそれぞれ(31.9%ならびに 31.9%)でほとんど同じであったことを報告しており、本実験において、初期分割以降の胚の発育スピードが、IVF 胚の方が早いことを示している。また、PA 胚の胚盤胞発生率は、7 日目に増加したことから (29%; 中村ら、未発表)、PA 胚の分割スピードは IVF 胚と比較して遅く、両区には、違いがあるものと考えられた。

以上より、本研究では、改良された NCSU-37 を用いた体外培養方法で安定的に PA 胚の作製が可能であり、貴重な胚や発生率の低い胚を移植する時に共移植することで、妊娠および子豚への発生を補助すること可能であるものと思われる。

PA 胚は新鮮胚や IVF 胚と比較して、共移植に用いるのに大変優れている。Kurebayashi et al. (2000) は、PA 胚を移植後 29 日目に、Kawarasaki et al. (2009) は、活性化処理後 30 日目に流産し、発情が回帰したと報告している。この報告では、新鮮胚を 1 個と PA 胚を共移植したため、分娩後に、目的の胚由来の子豚を皮膚や毛の色の表現形で識別する必要がない。IVF 胚は食肉処理場から卵巣を採材し採取した卵子を用いるので、様々な品種が混じってしまうため、求める胚から発生した子豚がどれなのか遺伝子診断する必要が出てくるからである。本試験で実施した PA 胚を用いた共移植方法は貴重な胚からの子豚生産に有用であり、ガラス化冷却・加温した桑実胚を移植することで妊娠し、胎子に成長することが判明した。

今回、PA 胚との共移植にガラス化冷却・超低温保存後の桑実胚を用いた。この材料選択した理由として、桑実胚のガラス化冷却・加温後の生存率は、凍結保存した胚盤胞より低いことが報告されており (Pollard et al. 1994; Beebe et al. 2002; Cuello et al. 2004; Ushijima et al. 2004)、また子豚への発育率も低い (Berthelot et al. 2001; Misumi et al. 2003)。本試験において、10 個のガラス化後加温した桑実胚と 10 個の PA 胚を共移植したが子豚を得ることは出来なかったが、桑実胚のみ 20 個を移植した区において 1 頭が 4 頭の子豚を生産した。この結果は、期待した効果と相反しているように思える。一方、共移植した区において、流産日が延びる傾向にある (42.5 ならびに 27.0 日、 $P = 0.08$) ことから、PA 胚には妊娠期間を伸ばす効果があるものと思われる。

これまでに、PA 胚の共移植試験として、Kawarasaki et al. (2009) は、1 個の新鮮胚の胚盤胞と 20 個の PA 胚を 9 頭の受胎豚に共移植してところ、7 頭がそれぞれ 1 頭の子豚を出産した。また、King et al. (2002) は、3 個の新鮮胚の胚盤胞と 55~60 個の PA 胚を 6 頭に共移植し 4 頭が妊娠し、1 頭が分娩した。それぞれの実験において、新鮮胚に対する PA 胚の比率を計算して見ると、20.0 (20 / 1) と 18.3~20.0 (55/3 ~ 60/3) となる。一方、今回の試験では、1.0 (10/10) と計算されることから、共移植した PA 胚の数が少なすぎた可能性が示唆された。

共移植する胚の数は、胚のステージや新鮮胚なのか凍結胚なのか等で条件が変わってくると思われるが、今回の実験でそのヒントが得られた。加温した桑実胚のみを 20 個移植したコントロール区において、1 頭が 4 頭の子豚を分娩したことから、子豚への発育率は 20% (4/20) となる。もし、PA 胚の補助なしに桑実胚を 10 個を移植したと仮定すると、2 個 (20%) の胚が生き残るものと考えられるので、妊娠を成立させるためには、さらに 2 個の桑実胚が着床する必要がある。前述のとおり、1 個の胚の妊娠を PA 胚で継続させるためには 20 個の胚が必要なので、桑実胚 2 個分の計 40 個の PA 胚が必要であったと試算できる。今後、さらに、共移植する PA 胚の数が妊娠や、子豚への発育に与える影響を調査する必要がある。

PA 胚の発生率や品質を改善するために体外成熟や体外培養を改良することも重要である。

体外成熟時にメラトニン(Shi et al. 2009)、L-カルニチン(Wu et al. 2011)、さらにはカルボキシルゲルマニウムの添加(Eunhye et al. 2015)などがPA 胚の品質改善に効果があることが報告されている。体外培養時の浸透圧を改良する、あるいはグリシンを添加すること(Miyoshi et al. 2014)も行われている。

また、別のアプローチとして、PA 胚の凍結保存も大きく期待される。Hongsheng et al. (2015)は、体外培養4日目のPA 胚をガラス化保存し、加温後に胚盤胞まで発育させた。また、Wu et al. (2016)は、2細胞期の胚をガラス化保存し、胚盤胞まで発育させることに成功している。PA 胚を凍結保存することで、いつでも好きな時に加温して利用できることで、さらにブタの共移植技術が進展するものと思われる。良い品質のPA 胚は、貴重な遺伝子を持つ限られた数の胚や、クローン豚、形質転換豚や人の医学研究用モデル豚など、子豚への発育率の低い胚と共移植することで有効活用できる。今後、より優れた品質のPA 胚の生産システムの確立が必要である。

総括

本研究において、体外受精および体外培養系を改良することで、優れた胚の安定生産が可能となった。体外受精において、射出精子を用いる場合には、受精率や胚盤胞発生率は、採取した種雄ブタの個体により大きく異なることが明らかとなったが、体外受精時の条件(媒精時間、カフェイン濃度ならびに精子濃度)を変えていくことで、胚盤胞発生率が10%以上改善できることが解った。このことから、用いる凍結精液の特性に合った媒精条件をその都度ロットごとに見出していくことで、これまで胚盤胞の発生が認められなかった凍結精液においても有効利用が出来る可能性が示唆された。また、これまで多くの研究者が、体外受精後の体外培養環境が胚の品質や子豚への発育率を低下させることを報告しているが、本実験で採用した体外培養方法を用いることで、6日間体外培養を行っても、胚盤胞発生率や子豚への発育率に影響がないことを明らかにした。一般的に胚を受胎豚に移植するためには、発情同期化を行い、胚の発育ステージに受胎豚の子宮の状態やホルモンバランスを合わせなければならないため、フィールドでは受胎豚の発情同期化がうまくいかない場合に良く直面する。そのため、せっかく作製した体外生産胚が無駄になるというきわめて残念な結果となる。しかしながら、本手法で作製した胚は体外成熟・体外受精後の0~6日まで発育能力を損なわずに移植が可能となるため、受胎豚の選択肢が広がり、有効活用が可能となった。今後、優良遺伝子の導入などフィールドで本技術を活用することで、胚の長距離輸送や複数の受胎豚に期日を隔てた移植が可能になるものと思われる。

さらに、この体外培養系を用いて単為発生胚を作製することで、体外受精による精子の影響を受けずに、安定的な生産が可能であることを明らかにした。今回、体外培養6日目での比較を行ったが、体外培養7日目においてIVF胚ではほとんど発生してこないが(2.3%以下)、PA胚では、8.2%の胚が新たに発生してきたことから(中村ら、未発表)、PA胚はIVF胚より長く、大量に活用出来ることが明らかになった。そして、PA胚の胚盤胞の形態学的な評価は非常に優れていることが判明した。胚盤胞腔内に変性細胞がIVF胚より少ないことから、ガラス化保存後の生存性がIVF胚より高かった(中村ら、未発表)。PA胚の分裂速度や細胞増殖を向上させて細胞数を増やすことで、さらに耐凍性の高い胚が作製できる可

能性示唆された。

共移植試験において子豚への発育率の低い体内生産されガラス化保存した桑実胚と単為発生胚を共移植することで、流産までの妊娠期間が延長し、胚の着床および受胎を補助する可能性を示した。単為発生胚は、他の胚と同様に伸長後、エストロジェンを分泌し、プロスタグランジンの局在を変化させることで、黄体を維持させて受胎を成立させているものと推察できるが、その効果についてさらなる解析が必要である。

今回、体外成熟に関する検討は出来なかった。PA 胚の胚盤胞発生率が最大で 41%認められたが、成熟した胚を選別していたとしても、成熟率が 75 %であるにも関わらず、胚盤胞発生率 50%を超えることは出来なかった。そのため、卵子の極体放出のみで成熟度判定することは出来ず、細胞質や核が真に成熟する状態になる体外成熟方法を開発する必要がある。

以上より本論文では、優れた体外培養液を用いることで、品質の良い体外生産胚の作製が可能となり、凍結精子の個々の品質に影響されない体外受精方法を開発できた。また、体外生産胚の安定的生産やその利用方法を開発したことで、体外生産胚を用いたブタの豚繁殖技術の効率化が可能となり、すぐにフィールドで活用できる優れた技術を開発した。

謝 辭

本研究論文をまとめるにあたり、大学院入学を誘って下さったとともに、終始ご指導を賜るとともに、いつも温かい目で研究を見守って下さった山口大学大学院連合獣医学研究科 菊地和弘 客員教授（国立研究開発法人 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）に心から感謝致します。また、御審査の労をとって下さいました、山口大学大学院連合獣医学研究科（山口大学共同獣医学部） 田浦保穂 教授、同 高木光博 教授、ならびに同研究科（鹿児島大学共同獣医学部） 窪田力 教授に心から感謝申し上げます。また、御審査の労をとって頂くと同時に、実験中も副指導教員として定期的に経過を聞いて下さり、様々な助言をして頂きました山口大学大学院連合獣医学研究科（山口大学共同獣医学部） 和田直巳 教授に心から感謝申し上げます。さらに、社会人学生として快く大学院に迎え入れて下さり、畜産の繁殖に関する様々な眼差しをご教授頂きました（旧）山口大学大学院連合獣医学研究科（現：徳島大学生物資源産業学部） 音井威重 教授に心から感謝申し上げます。

著者にブタ繁殖技術の基礎から応用まで幅広く教えて下さり、研究に対する真剣さや心を教えて頂きました、（旧）農林総合研究センター畜産研究所（現：農業技術研究センター）の室長 藤野幸宏 博士（故人）に心から感謝の意を捧げたいと思います。

研究を遂行するのにあたり、快く技術研修をさせて頂いたとともに、温かい目で様々な助言や、先端技術を教えて頂きました、日本大学生物資源学部 大西彰 教授、また、広い知識から、惜しみなく実験の方法や結果を教えて頂くとともに、大変参考になるアドバイスを頂きました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 淵本大一郎 博士、同 千本正一郎 博士に心より感謝を捧げたいと思います。

ブタ繁殖技術全般にわたり、最新技術の紹介や、新たな研究方法など様々な助言して頂きました、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 吉岡耕治 博士、また、いつもブタ繁殖に関する話や、研究って面白いなど感じさせて頂きました、同 鈴木千恵 博士に心から感謝申し上げます。

そして、長きにわたり良き相談相手であり、仲良きライバルでもあります、愛知県農業技術研究センター主任研究員 田島茂行 氏に心から感謝申し上げます。

実際のブタの管理、ホルモン投与から、発情観察、人工授精や、外科移植の補助など多岐にわたって実験を助けて頂きました、農業技術研究センター 品種開発・ブランド育成研究担当の横村雅良 氏、鈴木豊 氏、五十嵐高司 氏、柴崎誠次 氏、大塚敏明 氏、杉田智恵 氏、飯田智 氏に対し心から感謝致します。また、同じ職場の獣医師として、採卵を手伝って頂きました瀧沢慶太 氏、大学の先輩として、暖かく見守り続けて下さいました担当部長の塩入陽介 氏に心から感謝致します。

大学院在校時の所属長として、快く後押しして下さいました、(旧)農林総合研究センター畜産研究所長(現：埼玉県獣医師会理事) 鴻巣泰 氏、吉野賢一 氏(現：秩父高原牧場長)、そして、常にブタに関する研究をバックアップして下さいました、農業技術研究センター所長(現：農業政策課) 福井純夫 氏、農業技術研究センター所長 中畝正夫 氏、副所長 上野敏明 氏、秩父高原牧場 吉羽宣明 氏に心より感謝を捧げたいと思います。

最後に、実験や学会などの不在中に一生懸命家を守って頂いた妻の紅子と、毎日部活に忙しくて、朝学校に車で送ることぐらいしか出来なかった長女の瞳子、大変だねーと明るく接してくれた長男の颯太に心から感謝致します。

参考文献

Ankrah NA, Appoah-Opong R. Toxicity of low levels of methylglyoxal: depletion of blood glutathione and adverse effect on glucose tolerance in mice. *Toxicology Letters*.1999; 20:61–67.

Beebe L, Cameron R, Blackshaw A, Higgins A, Nottle M. Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology* 2002;57:2155–2165.

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.

Bureau M, Bailey JL, Sirard MA. Influence of oviductal cells and conditioned medium on porcine gametes. *Zygote* 2000;8:139–144.

Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botté F, Martínez EA. Vitrification of porcine embryos at various developmental stage using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology* 2004;62:353–361.

Cray Isome S, Rong Feng L, Kristin M, Randall S. 2012. Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the in vitro developmental potential of porcine embryos derived from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development* **79**, 197–207.

Davis DL, Day BN. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. *Journal of Animal Science* 1978;46:1043–1053.

Day BN, Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa stored by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 1998;49:360.

Eunhye K, Yubyeol J, Dae Y, Eunsong L. Antioxidative effect carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on IVM of porcine oocytes and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and IVF. *Theriogenology* 2015;62:353–361.

Flood MR, Wiebold JL. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 1988;84:7–12.

Fujino Y, Nakamura Y, Kobayashi H, Kikuchi K. Relationship between time elapsed after hCG administration and developmental stage in porcine embryos collected from prepubertal gilts. *Journal of Reproduction and Development* 2006;52:267–275.

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, Kim NH, Stumpf TT, Cantley TC, Day BN. Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biology of Reproduction* 1996;54:1412–1419.

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

Gil M, Aluminana C, Roca J, Vazquez J, Martinez E. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. *Theriogenology* 2008;70:1260–1268.

Hongsheng Men, Lee D. Spate, Clifton N. Murphy, and Randall S, Prather. Cryopreservation of in-vitro-produced early-stage porcine embryos in a closed system. *BioResearch Open Access*. 2015;4:1:258–265.

Hou D, Su M, Li X, Li Z, Yun T, Zhao Y, Zhang M, Zhao L, Li R, Yu H, Li X. The efficient derivation of trophoblast cells from porcine in vitro fertilized and parthenogenetic blastocysts and culture with ROCK Inhibitor Y-27632. *PLoS ONE* 2015;10:e0142442.

Hunter RHF. Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotrophin. *The Veterinary Record* 1967;81:21–23.

Kashiwazaki N, Kikuchi K, Suzuki K, Noguchi J, Nagai T, Kaneko H, Shino M. Development in vivo and in vitro to blastocysts of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Development* 2001;47:303–310.

Kashiwazaki N, Shino M. Ability of in vitro manipulated porcine embryos to develop to piglets. *Journal of Reproduction and Development* 2001;47 (suppl):S35–S39.

Kawarasaki T, Otake M, Tsuchiya S, Shibata M, Matsumoto K, Isobe N. Co-transfer of parthenogenotes and single porcine embryos leads to full-term development of the embryos. *Animal Reproduction Science* 2009;112:8–21.

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.

Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H. Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and culture in vitro. *Biology of Reproduction* 1999;60:336–340.

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 of Reproduction* 2002;66:1033–1041.

King TJ, Dobrinsky R, Zhu J, Finlayson HA, Bosma W, Harkness L, Ritchie WA, Travers A, McCorquodale C, Day BN, Dinnyes A, De Sousa PA, Wilmot I. 2002. Embryo development and establishment of pregnancy after embryo transfer in pigs: coping with limitations in the availability of viable embryos. *Reproduction* **123**, 507–515.

Kouba A, Abeydeera LR, Alvarez IM, Day BN, Buhi WC. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein in fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. *Biology of Reproduction* 2000;63:242–250.

Kurebayashi S, Miyake M, Okada K, Katayama M, Miyano T, Kato S. Development of porcine blastocysts from in vitro-matured and activated haploid and diploid oocytes. *Theriogenology* 1996;46:1027-1036.

Kurebayashi S, Miyake M, Okada K and Kato S. Successful implantation of in vitro-matured, electro-activated oocytes in the pig. *Theriogenology* 2000;53:1105–1119.

Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M, Mermillod P. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 2001;56:17–29.

Mattioli M, Bacci M L, Galeati G, Seren E. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1989;31: 1201–1207.

Menino AR, Wright RW. Development of one-cell porcine embryos in two culture systems. *Journal of Animal Science* 1982;54:583–588.

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

Miyoshi K, Mizobe Y. Osmolarity-and stage-dependent effects of glycine on parthenogenetic development of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 2014;60:349–354.

Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A. In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 1988;84:585–591.

Nagai T, Yamauchi N, Kikuchi K. Nuclear and cytoplasmic maturation in vitro of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 2001;47 (suppl 1):S55–S62.

Nagai T. The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 2001;55:1291–1301.

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.

Niwa T (ed.). Manual for Cryopreservation of pig spermatozoa [in Japanese]. Tokyo : *Japanese Artificial Insemination Association*;1989.

Oguri N. Recent progress in porcine embryos transfer and cryopreservation (in Japanese). *Journal Swine science* 1990;27:80–86.

Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awta T, Hanada H, Perry A. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000;289:1188–1190.

Pelaez J, Breininger E, Alegre B, Pena F, Dominquez J. In vitro evaluation in the quality of fertilizing capacity of boar spermatozoa in 0.25 ml straws. 41. *Reproduction in Domestic Animals* 2006;41:153–161.

Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 48 (suppl):61–73.

Polge C, Rowson L, Chang M. The effect of reducing the number of embryos during early stage 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 ;32:101–106.

Rath D, Niemann H. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 1997;47:785–793.

Robertson I, Nelson RE. Certification and identification of embryos. In: Stringfellow DA, Daniel Givens M (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, Fourth Edition, Chapter 2009;9:86–105. International Embryo Transfer Society, Champaign.

Sangho R and Woo-suk H. In vitro development of porcine parthenogenetic and cloned embryos: comparison of oocyte-activating techniques, various culture systems and nuclear transfer methods. *Reproduction Fertility and Development* 2002;14:93–99.

Schini SA, Bavister BD. Two-cell block to development of cultured hamster embryo is caused by phosphate and glucose. *Biology of Reproduction* 1988;39:1183–1192.

Selles E, Gadea J, Romar R, Matas C, Ruiz S. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen to predict the subsequent fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 2003;38:66–72.

Shibata M, Otaake M, Tsuchiya S, Chikyu M, Horiuchi A, Kawrasaki T. Reproductive and growth performance in Jin Hua pigs cloned from somatic cell nuclei and the meat quality of their offspring. *Journal of Reproduction and Development* 2006;52:583–590.

Shi JM, Tian XZ, Zhou GB, Wang L, Gao C, Zhu SE, Zeng SM, Tian JH, Liu GS. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *Journal of Pineal Research* 2009;47:318–323.

Snedecor GW, Cochran WG. Statistical Methods, 8th ed. Ames, IA: *The Iowa State University Press* 1989:273–296.

Sturmeijer RG, Leese HJ. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 2003;126:197–204.

Sone M, Chikyu M, Yoshida M, Banba K, Ogasa A. 1992. Prolonged storage on boar semen in liquid form (In Japanese). *The Japanese Society of Swine Science* **29**, 41–50.

Suzuki C, Yoshioka K, Itoh S, Kawarasaki T, Kikuchi K. In vitro fertilization and subsequent development of porcine oocytes using cryopreserved and liquid-stored spermatozoa from various boars. *Theriogenology* 2005;64(6):1287–1296.

Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. 2000. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *International Journal of Andrology* **23**, 13–21.

Suzuki K. 2001. In vitro fertilizing ability of porcine spermatozoa. Hokkaido, Japan: Hokkaido University. Thesis.

Ushijima H, Yoshioka H, Esaki R, Takahasi K, Kuwayama M, Nakane T and Nagasgima H. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development* 2004;50:481–486.

Wang W, Niwa K, Okuda K. In vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991;93: 491–496.

Wright RW. Successful culture in vitro of swine embryos to the blastocyst stage. *Journal of Animal Science* 1977;4:854–858.

Wu GQ, Jia BY, Li JJ, Fu XW, Zhou GB, Hou YP, Zhu SE. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology* 2011;76:785–793.

Wu GQ, Quan GB, Shao QY, Lv CR, Jiang YT, Zhao ZY, Hong QH. Cryotop vitrification of porcine parthenogenetic embryos at the early developmental stages. *Theriogenology* 2016;85:434–440.

Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T, Nagai T. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1993;39:1303–1311.

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

2003;69:2092-2099.