

ブタガラス化冷却・加温胚移植における
子豚生産向上に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

田島 茂行

2021年3月

目 次

要旨	P. 5
略語説明	P. 9
緒論	P. 10
ブタ胚の移植技術と長期保存技術の現状	P. 11
養豚産業分野における胚移植利用の課題点	P. 12
研究の概要	P. 13
第1章 移植前に行う人工授精がガラス化冷却・加温胚移植由来の子豚生産に及ぼす影響	P. 15
緒言	P. 16
研究1-1 Open Pulled Straw (OPS) 法によるブタ胚のガラス化冷却保存実験	P. 19
1. 目的	P. 19
2. 材料および方法	P. 19
3. 実験区設定	P. 22
4. 結果	P. 22
研究1-2 移植前に行う人工授精 (AI) が受胚豚の繁殖成績に及ぼす影響	P. 29
1. 目的	P. 29
2. 材料および方法	P. 29

3. 実験区設定	P. 30
4. 結果	P. 31
考察	P. 33

第2章 ガラス化冷却・加温胚由来子豚を効率よく生産できる非外科的移植法の開発

	P. 37
緒言	P. 38

研究2-1 Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法によるガラス化冷却・加温 (V/W)

胚の非外科的移植	P. 40
1. 目的	P. 40
2. 材料および方法	P. 40
3. 実験区設定	P. 43
4. 結果	P. 43

研究2-2 移植前に行う人工授精 (AI) が受胚豚の繁殖成績に及ぼす影響

	P. 49
1. 目的	P. 49
2. 材料および方法	P. 49
3. 実験区設定	P. 50
4. 結果	P. 51
考察	P. 55

第3章 ガラス化冷却・輸送・加温胚の非外科的移植による一般の養豚農場での子豚生産

実証 P. 59

緒言 P. 60

研究3-1 Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法によるガラス化冷却・加温 (V/W)

胚の子宮浅部非外科的移植実験 P. 62

1. 目的 P. 62

2. 材料および方法 P. 62

3. 実験区設定 P. 64

4. 結果 P. 65

研究3-2 一般の養豚農場におけるガラス化冷却・輸送・加温 (V/T/W) 胚の非外科

的移植実験 P. 73

1. 目的 P. 73

2. 材料および方法 P. 73

3. 実験区設定 P. 75

4. 結果 P. 75

考察 P. 78

総括 P. 81

謝辞 P. 85

参考文献 P. 87

要旨

本研究は、胚移植（ET）による子豚生産を一般の養豚農場で実用するため、雌豚から採取した初期胚（胚盤胞～拡張胚盤胞）をガラス化冷却保存し、加温後、効率的に子豚を生産できる移植技術の開発を目的とした。ブタガラス化冷却・加温（V/W）胚の移植において、確実に子豚生産するためには、開腹手術による外科的移植が行われており、受胚豚が高い受胎率を獲得し安定して子豚生産するために、1回の移植に20個以上のV/W胚が必要とされている。

そこで、第1章では、V/W胚の利便性を図るため、外科的移植に用いるV/W胚が20個より少ない場合でも、安定した繁殖成績が得られる移植技術の開発に取り組んだ。まず、Open Pulled Straw（OPS）法を用いて、ガラス化冷却保存胚を作製した。体外培養におけるガラス化冷却保存胚の加温48時間後の生存率は82.9%で、脱出胚盤胞率が61.0%であった。また、7頭の受胚豚に計150個（1頭あたり20～23個）のV/W胚を外科的移植したところ、6頭（85.7%）が受胎し、うち4頭が計22頭の子豚を生産した。ETによる産子生産効率（産子生産効率）は14.7%であった。これらの成績は既報と同等であった。さらにOPS法で作製したV/W胚を10頭の受胚豚にそれぞれ10個ずつ外科的移植した。受胚豚のうち5頭は移植前に人工授精（AI）を実施し（AI/ET区）、AIを行わなかった受胚豚（non-AI/ET区）と繁殖成績を比較した。non-AI/ET区では、2頭が受胎したが、分娩例は得られなかった。一方、AI/ET区では5頭すべてが受胎および分娩し、うち4頭（80.0%）はV/W胚由来産子を計10頭生産した。AI/ET区の産子生産効率は20.0%であり、non-AI/ET区よりも有意に高かった。また、1頭あたり20～23個のV/W胚を移植した場合と比較しても、同等の結果が得られた。以上の結果から、移植前にAIを実施することにより、移植するV/W胚が必要量の半数にあたる10個の場合でも、効率よくV/W胚由来産子を生産できることが明らかとなった。これは受胚豚の体内で発育したAI由来の胚により、受胚豚が妊娠維持できる子宮内環境を獲得し、移植胚の子豚への発生をサポートしたものと推測された。

次に第2章では、ETの汎用性を高める目的で、V/W胚の非外科的移植について検討した。胚のガラス化冷却・加温はMicro Volume Air Cooling（MVAC）法で実施した。体外培養に

おけるガラス化冷却保存胚の加温 48 時間後の生存率は 90.0%で、脱出胚盤胞率は 66.7%であり、既報と同等の結果であった。非外科的移植は、市販カテーテルを用い、外陰部より可能な限り子宮角先端（以下、子宮深部）へ挿入し、10～15 個の V/W 胚を移植した。まず、移植の至適条件を得るため、受胚豚と供胚豚の発情周期差が繁殖成績に及ぼす影響を調査した。採胚日を基準に、受胚豚の発情周期が供胚豚に対し 2 日および 1 日遅れた場合と、同期した（0 日）3 区を設定し、区間の繁殖成績を比較した。発情周期を 2 日および 1 日遅らせた受胚豚の分娩率は、それぞれ 27.3%（3/11 頭）および 25.0%（3/12 頭）であり、産子生産効率は 13.9%および 15.7%であった。0 日の受胚豚からは分娩例が得られなかった。これらの結果から、V/W 胚の子宮深部への非外科的移植では、供胚豚に対し、発情周期が 2 日または 1 日遅れた受胚豚に実施することが有効と考えられた。次に非外科的移植前に AI を行った場合の繁殖成績に及ぼす効果を検討した。供胚豚に対し、発情周期が 2 日遅れた 12 頭の受胚豚に対し、10～15 個の V/W 胚を子宮深部へ非外科的移植した。全ての受胚豚が AI 由来産子と移植胚由来産子を同時に分娩し（分娩率 100%）、産子生産効率は 25.2%であった。以上の結果から、MVAC 法による V/W 胚は、10～15 個を非外科的移植すれば子豚生産は可能だが、移植前に AI を実施することにより、効率よく安定して子豚生産できることが明らかとなった。この効果は、第 1 章と同様の原理により発現するものと考えられた。

最後に第 3 章では、一般の養豚農場で実施可能な ET の技術開発に取り組んだ。まず、V/W 胚の非外科的移植について、移植部位への器具の挿入が容易で、受胚豚への侵襲リスクが低い、専用のカテーテル試作品を用い、子宮体部付近（子宮浅部）への移植を検討した。研究施設において、MVAC 法による V/W 胚 14～18 個を、発情周期を供胚豚に対し 2 日および 1 日遅らせた受胚豚に移植したところ、1 日遅らせた受胚豚では、8 頭中 4 頭が受胎および分娩（50.0%）し、産子生産効率は 21.1%であったが、2 日遅らせた受胚豚からは分娩例が得られなかった。この結果、子宮浅部への非外科的移植では、供胚豚に対し、発情周期を 1 日遅らせた受胚豚への移植が有効と考えられた。次に研究施設において、MVAC 法によるガラス化冷却保存胚の加温と段階的な希釈操作を、顕微鏡下での胚操作を用いない手法（以下

ワンステップ法) で実施した、すなわち加温液に胚を投入後にダイレクトに子宮浅部へ非外科的移植した場合の繁殖成績を調査した。供胚豚に対し、発情周期を 1 日遅らせた受胚豚へ V/W 胚 14~19 個を移植したところ、受胎率は 42.9% (3/7 頭) で、産子生産効率は 6.4% であった。この結果から、胚操作に必要な設備や技術を有しない農場でも、ガラス化冷却保存胚を用いた ET が可能であり、子宮浅部への非外科的移植により子豚生産できる可能性が示唆された。そこで、4 か所の一般養豚農場で、上述の手法を活用した子豚生産の実証実験を行った。MVAC 法で作製したガラス化冷却保存胚をドライシッパーにて輸送し、輸送した農場内でワンステップ法により加温した胚 (ガラス化冷却/輸送/加温胚: V/T/W 胚) 11~20 個を、供胚豚に対し発情周期を 1 日遅らせた受胚豚 16 頭に、子宮浅部へ非外科的移植した。受胚豚のうち 4 頭は非外科的移植前に AI を実施した (AI/Ns-ET 区)。その結果、計 25 頭の V/T/W 胚由来子豚が生産され、4 農場全てで分娩例が得られた。移植前に AI を実施しない場合 (non-AI/Ns-ET 区) の分娩率は 33.3% (4/12 頭) で、産子生産効率は 6.3% であった。一方、AI/Ns-ET 区の分娩率と産子生産効率は、それぞれ 75.0% (3/4 頭) および 21.3% であった。以上の結果から、一般の養豚農場において、V/T/W 胚の非外科的移植により子豚生産できることが実証された。加えて、移植前に AI を実施することにより、効率よく、安定して子豚生産できることが示唆された。

本研究により、一般の養豚農場でも V/W 胚由来の子豚を生産できる ET 技術が開発され、移植前に AI を実施すれば、移植胚由来の子豚を効率よく安定して生産できることが実証された。今後、本研究の成果が活用され、一般の養豚農場における ET の実用が強く期待される。

略語説明

ET: Embryo Transfer、胚移植

AI: Artificial Insemination、人工授精

V/W: Vitrified and Warmed、ガラス化冷却・加温

V/T/W: Vitrified, Transferred and Warmed、ガラス化冷却・輸送・加温

OPS: Open Pulled Straw、オープン・プルド・ストロー

MVAC: Micro Volume Air Cooling、マイクロ・ボリューム・エア・クーリング

eCG: equine Chorionic Gonadotropin、血清性性腺刺激ホルモン

hCG: human Chorionic Gonadotropin、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン

緒 論

ブタ胚の移植技術と長期保存技術の現状

ブタの ET による子豚生産は約 70 年前に初めて報告された (Kvasnitski 1950)。その後も研究は進められ、Day (1979) によれば、開腹手術による外科的移植法は、ほぼ 1960 年代に確立されている。しかしながら、外科的移植は特殊な設備や技術を必要とするため、一般には普及していない。一方、開腹手術を行わず、胚を子宮内へ移植する非外科的胚移植は、1968 年に最初の妊娠例が報告された (Polge & Day 1968) が、ブタの子宮頸管や子宮角の形状が複雑であるため、非外科的に子宮内へ胚を移植することは困難とされ、その開発は停滞していた。ところが、1990 年以降、子宮浅部や子宮深部注入用カテーテルの改良が進み、様々な研究機関から非外科的移植による子豚生産が報告されているようになった (Martinez et al. 2004; Nakazawa et al. 2008; Yoshioka et al. 2012)。しかしながら、外科的移植による繁殖成績と比べ、分娩率や産子生産効率が低く、確実に子豚生産するには外科的移植が有効とされている (Martinez et al. 2015)。

採取した胚は、ET 実施までの期間、その発生能を維持したまま保存する必要がある。体外培養における保存では数日間が限度のため、ET の普及のためには、超低温下の液体窒素中で、胚の代謝や発生をほぼ停止させた状態で保存する長期保存技術が必須である。しかしながら、ブタ胚は低温感受性が非常に高く、培養液内で 15°C 以下に冷却するだけで死滅することが報告されている (Pollard & Leibo 1994)。このため、1990 年代にウシ胚で既に実用化されていた緩慢凍結による長期保存技術 (Kashiwazaki et al. 1991; Hayashi et al. 1989) は、胚を低温下に長時間暴露する必要性から、有効な手法とならなかった。一方、1990 年代後半には、緩慢凍結法を克服する手法として、ガラス化冷却法が考案され、ブタ胚においても、Kobayashi et al. (1998) がウシ AI 用の 0.25 mL ストローを用いた手法により、V/W 胚由来の子豚生産に成功した。以降、ブタ胚の長期保存技術はガラス化冷却法が主流となり、これに係る技術開発が急速に進展し、様々なデバイスを用いたガラス化冷却法が開発された。現在では、V/W 胚由来の子豚生産の成功事例が数多く報告されている

(Berthelot et al. 2000, 2001; Fujino et al. 2008; Misumi et al. 2003, 2013)。これらのほとんどは外科的移植によるものだが、非外科的移植による成功例も報告されるようになった (Cuello et al. 2005; Gomis et al. 2012; Martinez et al. 2015)。

養豚産業分野における胚移植利用の課題点

畜産における ET の主な目的には、優良個体由来産子の増産、優良種畜の輸送における効率化や疾病伝播の防止が挙げられる。ブタは多胎動物であり、妊娠期間が比較的短い (114 日) ことから、ウシのように産子増産のために利用されてこなかったが、近年、特に防疫面の活用が注目されている。しかしながら、ブタの ET 実用には、これまで技術面で妨げになっている点が多かった。その中でも特に大きな問題が非外科的移植と胚の長期保存が困難な点であったが、前述のとおり技術開発が進み、ブタ ET は実用化に大きく前進した。しかしながら、技術の実用・普及には、さらに解決すべき課題が残されている。

その 1 つが、多数の受胚豚に移植する胚の回収が困難な点にある。ウシにおいては、1 頭の供胚牛から過剰排卵処理により多数の胚を非外科的に回収し、これらを複数の受胚牛に移植できる技術が確立している。一方、ブタにおいては、子宮頸管や子宮角の形状が複雑であることから、非外科的に胚を回収することが難しいため、開腹手術が必要である。また、1 頭の供胚豚から 1 回あたり回収できる胚は約 20 個 (Fujino et al. 2006) と報告されている。さらに、V/W 胚の移植において、受胚豚が確実に受胎し子豚生産するためには、20 個以上の V/W 胚が必要とされており (Cuello et al. 2016; Fujino et al. 2008)、多数の受胚豚に胚の供給を継続することは困難である。また、ET の実用には非外科的移植が必須だが、前述のとおり、外科的移植と比較して繁殖成績が劣るため、1 回あたりの移植において、さらに多数の V/W 胚が必要と考えられる (Martinez et al. 2015)。従って、得られた胚を効率よく活用するために、1 回の移植に使用する V/W 胚が少数であっても、受胚豚が確実に子豚生産できる移植技術が必要となる。

また、試験研究機関等の供胚施設で作製されたガラス化冷却保存胚を、一般の養豚農場で移植するには、胚の輸送が必要である。胚の輸送には、供胚施設でガラス化冷却保存胚を加温・希釈後に V/W 胚で輸送する方法と、ガラス化冷却保存胚を輸送する方法が挙げられる。前者では、輸送における V/W 胚の保温と培養法について検討が必要である。一方、後者において、ほとんどの農場は胚操作に必要な設備や技術を保有していないことが想定されるため、胚操作が不要なガラス化冷却保存胚の加温・希釈法を開発する必要がある。さらに、これまで開発された移植法に対し、胚の輸送を組み込んだ技術体系においては、繁殖成績について、十分な検証が行われていない。

性成熟に達した雌豚については、プロスタグランジン投与で黄体を退行できる期間が限られているため (Diehl & Day 1974)、採卵および移植における発情同期化に大きな制限がある。近年、Noguchi et al. (2013) がエストラジオールプロピオン酸エステルで偽妊娠を誘起し、プロスタグランジンを用いて簡便に発情同期する手法を報告しているが、ET への応用については、研究過程にある。

研究の概要

本研究の目的は、ET による子豚生産を一般の養豚農場で実用可能にするための技術開発である。そのため、特に、雌豚から採取した初期胚 (胚盤胞～拡張胚盤胞) をガラス化冷却保存し、加温・希釈後、効率的に子豚を作出できる移植手法の開発をめざし、以下の研究を行った。

1) 移植前に行う人工授精がガラス化冷却・加温胚移植由来の子豚生産に及ぼす影響 (第 1 章)

V/W 胚の外科的移植では、受胚豚が確実に受胎して子豚生産するために、20 個以上の V/W 胚が必要とされており、20 個未満で移植した場合には、受胎率および産子生産効率の

低下が認められる。この要因として、移植した胚の損耗により、妊娠維持に必要な受胎産物を受胎豚が確保できないことが推測される。このため、移植前に AI を実施し、人為的に妊娠維持できる子宮内環境を整えた受胎豚に、少数の V/W 胚（10 個）を移植した場合の移植胚由来子豚生産に及ぼす効果を検討した。

2) ガラス化冷却・加温胚由来子豚を効率よく生産できる非外科的移植法の開発（第 2 章）

ET の汎用性を高めるためには V/W 胚の非外科的移植が必須となる。しかしながら非外科的移植による繁殖成績は、外科的移植に比べ、劣ることが知られている。そのため、繁殖成績に影響を及ぼす因子について、移植における至適条件を精査し、効率よく子豚生産できる V/W 胚の非外科的移植法を検討した。

3) ガラス化冷却・輸送・加温胚の非外科的移植による一般の養豚農場での子豚生産実証（第 3 章）

ET を実用可能な技術として確立するため、これまで事例のなかった、一般の養豚農場における、V/T/W 胚による非外科的移植からの子豚生産実証を試みた。また技術の実用性についても検討した。

第1章 移植前に行う人工授精がガラス化冷却・加温胚移植由来の
子豚生産に及ぼす影響

緒言

ETにより子豚生産する技術を活用すれば、優れた遺伝形質を持つ個体の導入において、輸送コストを低減し、省力的に実施することが可能となる。また、生体や精液に比較し、伝染性疾病に係る病原体の伝播を低リスクで実施できるため、感染症伝播の防除にも有効である。このため、定期的に種畜を導入する一般の養豚農場では、ET技術の実用が望まれている。

ETの実用には、胚の長期保存技術が欠かせない。ブタ胚の長期保存技術は「ガラス化冷却法」により急速に進歩し、特に胚盤胞から拡張胚盤胞の発育ステージの胚では、V/W胚から子豚生産できることが明らかにされている (Dovrinsky et al. 2000; Kobayashi et al. 1998)。今日では、OPS法 (Beebe et al. 2002; Berthelot et al. 2000, 2001)、マイクロドロップレット法 (Misumi et al. 2003)、Cryotop法 (Ushijima et al. 2004)、Metal mesh法 (Fujino et al. 2008) やMVAC法 (Misumi et al. 2013) などのデバイスの異なるいくつかの手法が開発されている。しかしながら、V/W胚由来子豚を生産する過程では、開腹手術が必要なことなど、多大な手間とコストがかかるため、効率性の観点で技術改良が求められる。

外科的移植において、20個以上のV/W胚を用いた場合、研究機関や、用いられるガラス化冷却法により差があるものの、受胚豚の受胎率は80%以上であり、産子生産効率(獲得産子数/移植胚数×100)は、13.5~29.7%と報告されている (Berthelot et al. 2000; Cameron et al. 2004; Cuello et al. 2016; Fujino et al. 2008)。一方、移植胚数が20個未満の場合では、受胎率および産子生産効率が低下する傾向が認められる (Misumi et al. 2013)。これらの事実は、受胚豚が安定した繁殖成績を得るために、20個以上のV/W胚を外科的移植する必要があることを示唆する。多胎動物であるブタは、妊娠初期に、子宮内に存在する一定数の受胎産物がエストラジオール17 β を産生および放出し、母体がこれをシグナル物質として認識することにより、妊娠成立・維持することが知られており (Bazer &

Thatcher 1977; Geisert et al. 1982)、Polge et al. (1966) は妊娠成立・維持に4つ以上の受胎産物が必要としている。Belthelot et al. (2000) は OPS 法による V/W 胚 20 個の外科的移植で、受胎率 80% と産子生産効率 13.5% を獲得している。この場合の受胎例では、少なくとも 3 個の受胎産物が存在し、これが母体とのシグナル伝達に寄与したと思われるが、この状況は受胚豚が妊娠成立・維持できる閾値と推測される。このため、V/W 胚 20 個未満の外科的移植では、多くの場合、受胚豚が妊娠維持に必要な受胎産物を確保できず、分娩に至らないものと考えられる。以上のことから、V/W 胚の移植により確実に産子を得るためには、非常に多数の胚を確保する必要性が示唆される。しかしながら、ブタ胚の採卵は開腹手術が必要なおうえ、1 頭の供胚豚から 1 回あたり回収できる胚は約 20 個 (Fujino et al. 2006) であるため、必要数の受胚豚に 1 頭あたり 20 個以上の胚を移植するのは、現実的には非常に困難である。従って、ET を実用するには、極少数の V/W 胚を移植した場合でも、優れた繁殖成績を得られる手法の開発が急務である。

一方、移植胚のみでは受胚豚が妊娠維持できる十分な受胎産物を確保できない場合でも、人為的操作により受胚豚を妊娠維持させ、移植胚から子豚生産できることが報告されている。Kawarasaki et al. (2009) はたった 1 個の新鮮胚を約 20 個の単為発生胚と供移植することによって、新鮮胚からの子豚生産に成功している。さらに Kawarasaki et al. (2012) は 1 個の新鮮胚を移植し、その後、受胚豚への estradiol dipropionate 投与により妊娠維持および子豚生産させることに成功した。これらの手法は、ブタが妊娠初期に妊娠成立・維持するメカニズムを人為的に模倣または発現させ、受胚豚が妊娠維持できる子宮内環境を整えることにより、移植胚由来の少数の受胎産物が着床から個体発生する過程をサポートするものである。同様の観点から、受胚豚に人工授精 (AI) を実施すれば、AI 由来の胚の受胎により受胚豚が妊娠維持できる状態を保持することが予測できるため、このような受胚豚に V/W 胚を移植すれば、移植胚数が極少数であっても効率よく子豚生産できることが期待できる。しかしながら、AI を行った受胚豚への胚の移植実験による子豚生産については、新鮮胚やガラス化冷却保存胚を含め、これまでに報告がない。また、ET の実用面を考

慮した場合、容易に操作できる手法が求められる。

そのため、本研究では、受胚豚に AI を実施した場合に、外科的移植した V/W 胚からの子豚生産に及ぼす効果を検証した。加えて、手法の簡便性や操作性に係る考察も行った。

研究 1-1 Open Pulled Straw 法 (OPS 法) によるブタ胚のガラス化冷却保存実験

1. 目的

透明帯を有するブタ拡張胚盤胞を OPS 法によりガラス化冷却保存し、加温・希釈後、体外培養および外科的移植を行い、本研究で作製したガラス化冷却保存胚が確実に生存性および個体発生能を保持しているかどうかを確認し、以降の実験 (研究 1-2) に供試できるかどうか検討した。

2. 材料および方法

1) 供試豚

供胚豚は、6~7 か月齢の春機発動前の雌豚で、ランドレース種 (L)、大ヨークシャー種 (W) およびデュロック種 (D) の計 21 頭を用いた。受胚豚には 8~9 か月齢の L、W、D および L と W の一代雑種 (LW) 未経産雌豚 7 頭を使用した。供胚豚と交配するための雄豚には、12 か月齢以上の L、W および D 各 2 頭を用いた。

2) 試薬

実験に使用した試薬類は、別段の指示がない限り、Sigma-Aldrich (MA, USA) の製品を使用した。

3) 胚の回収方法

供胚豚の発情および排卵誘起は以下のホルモン投与により実施した。すなわち、1,000 IU の eCG (ピーメックス、全薬工業株式会社、福島) を投与し、さらにその 72 時間後に 500 IU の hCG (プベローゲン、全薬工業株式会社) を投与した。ホルモン処理した供胚豚に対し、hCG 投与 24 時間後と 40~42 時間後に AI を 2 回実施した。AI に用いた精液は、AI 実

施当日または前日に供試雄豚から採取した。採取した精液は、顕微鏡下で活力等の性状を確認後、モデナ液 (Weitze, 1991) で 1×10^8 精子/mL に希釈し、使用するまで 15°C の保冷库内で保存した。1 回の AI には希釈精液 50 mL を使用した。胚の回収は、hCG 投与 160～164 時間後に吸入麻酔下で開腹手術により実施し、子宮角分岐部より子宮角先端へ約 5 cm 付近にバルールカテーテル (French size = 16、ニプロ、東京) を挿入・固定し、それぞれの子宮角を 50 mL の HEPES 緩衝 CZB 液 (Chatot et al. 1989) (Table 1) で還流して行った。

4) 供試胚の評価

採取した胚から倒立顕微鏡下で透明帯に欠損が認められない胚を選別し、更に、胚直径が 200～230 μm の拡張胚盤胞を選択して、実験に供するまで、5%酸素、5%二酸化炭素、38°C のインキュベータ内で修正 CZB 液 (小林ら 2001; Table 1) (以下、培養液) 中に保存した。

5) 胚のガラス化冷却・加温に使用する各溶液

胚のガラス化冷却・加温に使用する各種溶液は小林ら (2001) の報告に準じて作製した。胚の平衡、ガラス化冷却および加温・希釈に係る溶液の基本液は、ウシ血清アルブミン (以下 BSA) を 0.5 mg/mL 添加したリン酸緩衝生理食塩水を使用した。ガラス化冷却には前平衡液とガラス化液の 2 種類の溶液を使用した。前平衡液はエチレングリコールを 2.0 M、ポリビニルピロリドン (分子量 10,000) を 4% (w/v) で添加した溶液を使用し、ガラス化液はエチレングリコールを 7.2 M、ガラクトースを 1.0 M、ポリビニルピロリドンを 7% (w/v) で添加した溶液を用いた。一方、加温・希釈には、3 段階の加温・希釈液と胚洗浄液の 4 種類の溶液を使用した。第 1 段階加温・希釈液はガラクトースを 1.7 M を添加した溶液で、第 2 段階と 3 段階加温・希釈液は、10% (v/v) でウシ胎子血清 (以下 FBS) を添加した基本液 (以下、胚洗浄液) に、エチレングリコールをそれぞれ 1.0 M および 0.5 M 加えた溶液

を用いた。

6) OPS 法によるガラス化冷却保存および保存胚の加温・希釈方法

胚のガラス化冷却・加温操作は小林ら（2001）の報告に準じた（Figure 1）。一連のガラス化冷却に係る操作は 25℃の室温下で、38℃に設定した加温プレート上で実施した。一度にガラス化冷却する胚数は 4～5 個とし、基本液で 2 回洗浄して供試した。供試胚は、4 ウェルプレート（Nunc 4-well dish、Thermo Fisher Science、USA）に用意した平衡液中で 5 分間平衡した。平衡後の胚は、洗浄用ガラス化液に数秒間浸漬させた後、予め 35 mmシャーレ（Falcon 353001、Corning、USA）に用意した約 20 μ L のガラス化液ドロップへ移行し、更に、胚を含んだ約 2 μ L ドロップを作製して OPS（Demtek、Denmark）の先端に吸引した。吸引後、OPS を直ちに液体窒素へ投入し、実験に供するまで少なくとも 1 ヶ月間、液体窒素内に保存した。胚をガラス化液へ浸漬した後、液体窒素に投入するまで 50 秒以内で実施した。ガラス化冷却保存胚の加温・希釈は 4 段階で実施した。液体窒素内から取り出した OPS を約 3 秒空気中に保持し、OPS 先端を 1 段階加温・希釈液へ浸漬し、胚をストロー外へ排出させ、1 分間保持した。続いて、2 段階および 3 段階加温・希釈液にそれぞれ 2 分間浸漬し、最後に胚洗浄液で 2 分間加温・希釈した。V/W 胚は、実験に供するまで、5%酸素、5%二酸化炭素、38℃のインキュベータ内で 10%（v/v）の FBS を添加した培養液中に保存した。

7) ガラス化冷却・加温胚（V/W 胚）の移植

受胚豚の発情は 12 時間間隔で 1 日 2 回雄許容を確認した。移植は、雄許容開始日を 0 日として、4 日または 5 日目に吸入麻酔下での開腹手術により加温後 1 時間以内実施し、片側子宮角先端部に尿道カテーテル（カフライン UR0516HY、オーキッド、静岡）を挿入して移植した。移植後、ノンリターン法および 30 日目に超音波診断装置（HS-1500V、本多電子、豊橋）を用い、胎胞がはっきり確認できた場合、受胎と診断した。また受胎産物の排

泄が確認された場合、流産と判定した。受胎と診断された受胚豚は、以降の分娩成績の調査（分娩率、胚移植による産子生産効率）に供した。

8) 統計処理

胚の体外培養による胚生存率、脱出胚盤胞率および細胞数について、The Statistical Analysis System (Ver.9.2, SAS Institute Inc., USA、以下 SAS) を使用し、一元配置の分散分析で解析した。有意差水準は $P < 0.05$ と設定した。

3. 実験区設定

1) 体外培養実験

V/W 胚の体外培養 48 時間後の胚生存率と脱出胚盤胞率を調査した。1 頭の供胚豚から得られた胚を無作為にガラス化冷却・加温区と対照区に配分して実験を行い、8 頭の供胚豚から得られた 78 個の胚を使用した。対照区はガラス化冷却保存を行っていない新鮮胚を培養した。胚の生存判定は、形状を完全に回復した胚と発育していることを確認できた胚を生存とした。さらに培養後の胚はカルノア液（酢酸:エタノール = 1:3）で固定後、1%オルセイン酢酸液で染色し、位相差顕微鏡を用いて細胞数を測定した。

2) 胚移植実験

V/W 胚を受胚豚に移植して、繁殖成績を調査した。13 頭の供胚豚から得られた 150 個の胚を使用した。7 頭を受胚豚にそれぞれ 20~23 個の胚を移植した。

4. 結果

1) 体外培養実験

結果は Table 2 および Figure 2 に示した。ガラス化冷却・加温区の加温後 48 時間での生存率は対照区と比べ有意に低かった（それぞれ 97.3% および 82.9%, $P < 0.05$ ）。また脱出胚

盤胞率も同様であった（それぞれ 94.6%および 61.0%, $P<0.05$ ）。胚の品質評価としての細胞数もガラス化冷却・加温区は対照区に比べ、低い値を示した（それぞれ 115.8 個および 97.6 個, $P<0.05$ ）。

2) 胚移植実験

結果は Table 3 に示した。受胚豚の 7 頭中 6 頭が受胎した（受胎率 85.7%）。しかしながら、2 頭は 35 日目と 29 日目に流産した。受胎した受胚豚のうち、4 頭がそれぞれ、4、4、3、および 11 頭の正常な子豚を分娩した（分娩率 57.1%）。産子生産効率は 14.7%（22 頭/150 個）であった。

Table 1. Composition of media

Component (mM)	Hepes buffered CZB	Modified CZB
NaCl	81.62	81.62
KCl	4.83	4.83
KH ₂ PO ₄	1.18	1.18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.41	2.41
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.24	2.24
Na-pyruvate	0.32	-
Na-lactate syrup (mL/L)	4.42	-
EDTA·2Na	0.11	0.11
Hepes	20.85	-
NaHCO ₃	4.15	25.00
Taurine	7.23	7.23
L-glutamine	0.10	0.10
Glucose	-	5.81
Basal Medium Eagle amino acids (mL/L)	-	20.00
Minimum Essential Medium nonessential amino acids (mL/L)	-	10.00
Streptomycine	0.12	0.12
Penicillin	0.22	0.22
BSA (mg/mL)	5.00	1.00
Phenol red (µg/mL)	2.00	2.00
Osmolarity (mOsm)	280	250

All media were adjusted to pH 7.4.

Abbreviations: CZB, Chatot Ziomek Bavister medium

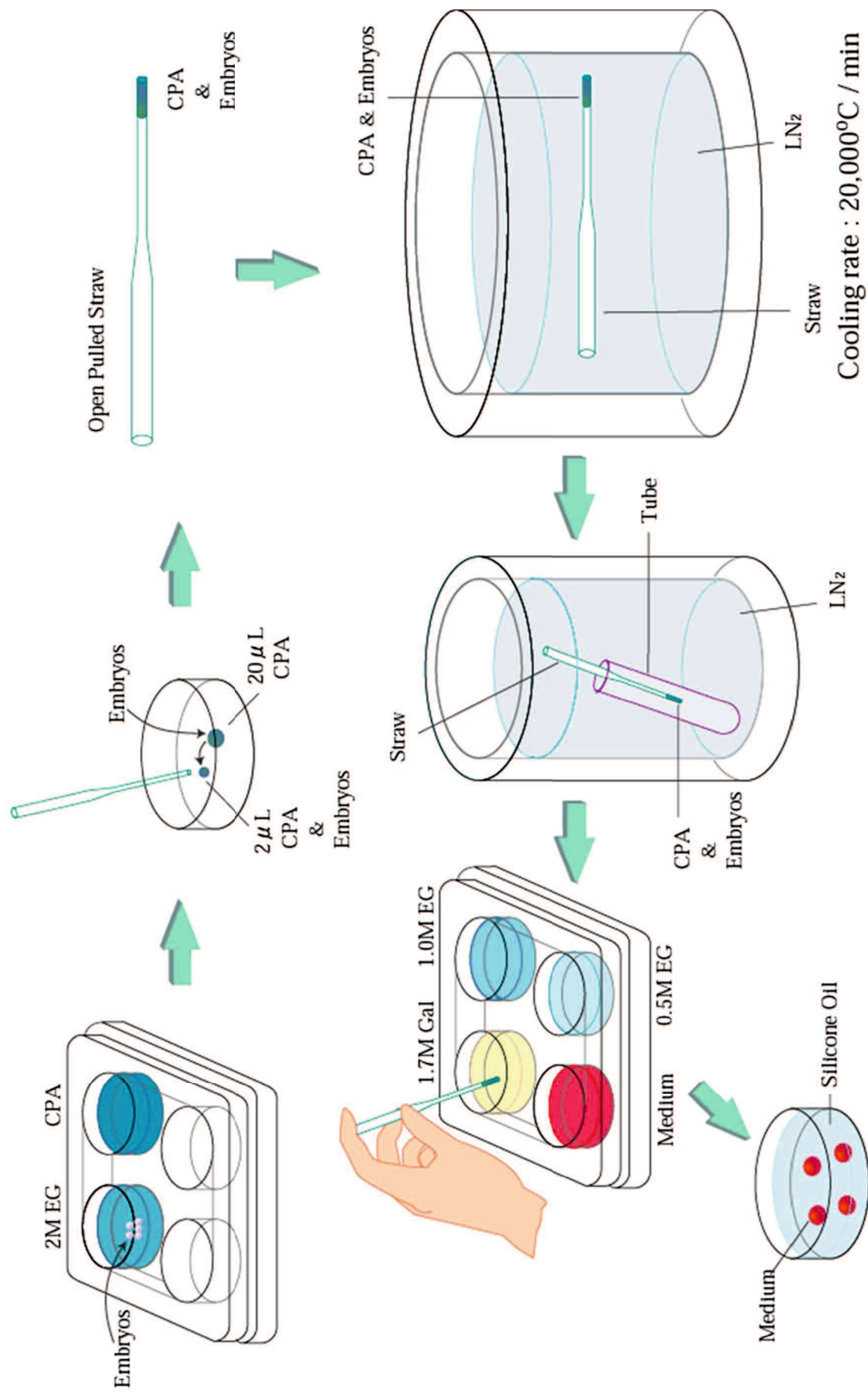


Figure 1. Procedure of vitrification by OPS method

Table 2. In vitro viability of porcine expanded blastocysts vitrified and warmed by OPS method.

Source of embryo	No. of embryos	In vitro viability ^a rate after 48 h (%) ^b	Hatching blastocysts after 48 h (%) ^b	Number of cells per embryo
Control	37	36 (97.3 ± 2.1) ^c	35 (94.6 ± 3.5) ^c	115.8 ± 7.7 ^c
V/W	41	34 (82.9 ± 6.0) ^d	25 (61.0 ± 5.2) ^d	97.6 ± 11.8 ^d

^a Blastocysts showing re-expansion or development to the hatching/hatched embryo stages.

^b Means ± SEM. Eight replicated trials were performed for each embryo source.

^{c, d} Within each column, values with different subscripts differ significantly (P<0.05)

OPS: open pulled straw

V/W: vitrified and warmed

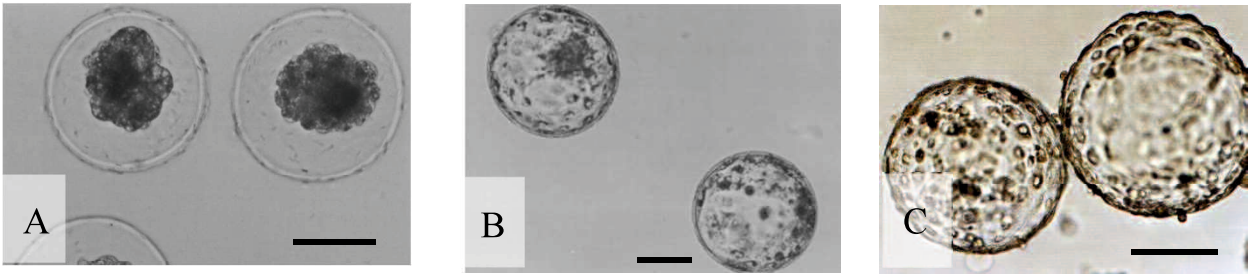


Figure 2. Vitrified and warmed expanded blastocysts by OPS method.

A) In vitro culture for 0h.

B) Expanded blastocyst fully recovered the spherical shape by in vitro culture for 24h.

C) Hatched blastocysts developed by in vitro culture for 48h.

Scale bar = 100 μ m

Table 3. Transfer of vitrified and warmed embryos and piglet production by OPS.

Trial No.	No. of embryos	Pregnancy	No. of piglets	Survival rate to term of transferred embryos (%) ^a	Note
1	21	+	4	19.0	
2	23	+	0	0	aborted at 35 days after ET
3	23	+	4	17.4	
4	23	-	0	0	
5	20	+	0	0	aborted at 29 days after ET
6	20	+	3	15.0	
7	20	+	11	55.0	
total	150		22	14.7 ± 7.4 ^b	

^a Calculated as follows: (number of piglets/number of transferred embryos) × 100

^b Mean ± SEM

ET: embryo transfer

研究 1－2 移植前に行う人工授精（AI）が受胚豚の繁殖成績に及ぼす影響

1. 目的

研究 1－1 で発生能を確認した V/W 胚を用い、移植胚由来の産子を効率よく生産する技術として、移植前に AI を行った場合の繁殖成績に及ぼす効果について検討した。

2. 材料および方法

1) 供試豚

供胚豚は、6～7 か月齢の春季発動前の雌豚で、L、W および D の 10 頭を用いた。受胚豚には 8～9 か月齢の L、W、および D 未経産雌豚 10 頭を使用した。供胚豚への交配用雄豚として、12 か月齢以上の L、W および D 各 2 頭を用いた。移植前に実施する AI で用いる雄豚には、12 か月齢以上の D 1 頭を使用した。

2) 試薬

別段の指示がない限り、Sigma-Aldrich (MA, USA) の製品を使用した。

3) 胚の回収方法

研究 1－1 と同様の方法で実施した。

4) 供試胚の評価

研究 1－1 と同様の方法で実施した。

5) 胚のガラス化冷却・加温に使用する各溶液

研究 1－1 と同じ溶液を使用した。

6) OPS 法によるガラス化冷却保存および保存胚の加温・希釈方法

研究 1-1 と同様の方法で実施した。

7) ガラス化冷却・加温胚 (V/W 胚) の移植

研究 1-1 と同様の方法で実施した。

8) 統計処理

胚移植による産子生産効率と胚の体外培養における胚生存率については、SAS を使用し、一元配置の分散分析で解析した。胚移植における受胚豚の受胎率と分娩率については、フィッシャーの正確確率検定を行った。有意差水準は $P < 0.05$ と設定した。

3. 実験区設定

1) AI を行った受胚豚への V/W 胚移植実験

研究 1-1 では約 20 個の V/W 胚を移植したが、本実験では半数 (10 個) の V/W 胚を用いて移植を行い、移植前に AI を実施した場合、V/W 胚由来産子の分娩率および産子生産効率について、AI を実施しない場合と比較するとともに、V/W 胚 10 個を移植した場合でも効率よく、安定した子豚生産が可能であるかどうかを検討した。1 頭の供胚豚から採取し、ガラス化冷却保存した 10~15 個を加温・希釈し、10 個を無作為に抽出して外科的移植した。試験区は以下の 3 区を設定した。[1] non-AI/ET 区として、5 頭の受胚豚に AI を実施せず外科的移植した。[2] AI/ET 区として、D 以外 (L もしくは W) の 5 頭の受胚豚に対し、雄許容確認 10~12 時間後に AI を 1 回実施し、D の V/W 胚を外科的移植した。受胚豚が分娩した場合の胚の由来は子豚の毛色により行い、全身が茶色の個体は V/W 胚由来の子豚 (D 種) であり、白またはスポットを有する個体は AI 由来の子豚と判定した。[3] AI/non-ET 区として、8~9 か月齢の未経産雌豚 7 頭に、AI/ET 区で用いた雄豚の精液により AI を実施し、ET は実施しなかった。

2) 体外培養実験

1) で外科的移植に使用しなかった V/W 胚をそれぞれ体外培養し、24 時間後の胚の生存率を調査した。合計 34 個の胚を使用した。

4. 結果

1) AI を行った受胎豚への V/W 胚移植実験

結果を Table 4 に示した。non-AI/ET 区では、5 頭中 2 頭が受胎した。しかしながら、それぞれ 22 日目ならびに 31 日目に流産したため、分娩例は得られなかった。AI/ET 区では 5 頭すべてが受胎および分娩し、計 43 頭 (8.6 頭/腹) の子豚を生産した。43 頭のうち、33 頭は AI 由来の子豚であったが、10 頭は V/W 胚由来の子豚で、4 頭の受胎豚から生産された (分娩率 80.0%)。AI/ET 区の胚移植による産子生産効率は 20.0% (10 頭/50 個) であり、non-AI/ET 区より有意に高かった ($P < 0.05$)。子豚の生時体重 (平均±標準誤差) は、V/W 胚由来の子豚が 1.16 ± 0.28 kg で、AI 由来子豚が 1.19 ± 0.30 kg であり、由来による差はなかった。AI/non-ET 区では、7 頭中 6 頭が分娩し、56 頭の子豚を生産した (8.0 頭/腹)。

2) 体外培養実験

結果を Table 4 に示した。non-AI/ET 区と AI/ET 区間における胚の生存率 (それぞれ 62.5% および 68.3%) と胚の細胞数 (それぞれ 89.5 および 91.1) に差は認められなかった。このことから、移植に使用した V/W 胚の品質について区間に差は無いものと判断した。

Table 4. Results of transfer of 10 vitrified and warmed embryos or AI, and in vitro viability of vitrified and warmed embryos by OPS method.

Exp. group	ET						In vitro culture			
	Total number of recipients	No. of pregnant recipients (%)	No. of recipients farrowed (%)	No. of piglets (Means \pm SEM)	No. of recipients producing piglets derived from ET (%)	No. of piglets derived from ET ^g	Survival rate to term of transferred embryos (%) ^a	No. of embryos	In vitro viability ^d after 24 h (%) ^e	Number of cells per embryo ^f
Non-AI/ET	5	2 (40.0)	0 (0) ^b	0 (0)	0 (0) ^b	0 (0)	0 ^b	18	11 (62.5 \pm 8.3)	89.5 \pm 8.4
AI/ET	5	5 (100)	5 (100) ^c	7, 14, 6, 9, 7 (8.6 \pm 1.4)	4 (80.0) ^c	4, 4, 1, 1 (2.0 \pm 0.8) ^e	20.0 ^c	16	11 (68.3 \pm 1.8)	91.1 \pm 6.0
AI /non-ET	7	6 (85.7)	6 (85.7)	10, 8, 5, 10, 12, 11 (8.0 \pm 1.5)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

^a Calculated as follows: (number of piglets/number of transferred embryos) \times 100

^{b, c} Within a column, values with different subscripts differ significantly (P<0.05)

^d Blastocysts showing re-expansion or development to the hatching/hatched blastocyst stages.

^e Means \pm SEM.

^f Means \pm SEM. Three replicated trials were performed for each embryo source.

^g Piglets from vitrified and warmed Duroc embryos possess whole brawn, whereas those from embryos derived from AI shows whole white or with spotted.

AI: artificial insemination, ET: embryo transfer

考察

これまでに、雌豚の体内から採取したブタ胚（特に胚盤胞から拡張胚盤胞の発育ステージ）をガラス化冷却保存し、加温後の胚から子豚生産できることが明らかにされている（Berthelot et al. 2000; Cameron et al. 2004; Cuello et al. 2016; Fujino et al. 2008）。これらの成功例は、20 個以上の V/W 胚を外科的移植した場合であり、受胎率 80% 以上の安定した繁殖成績を得ている。一方、約 10 個の V/W 胚を移植した場合には、成功例はほとんど報告されていないが、Misumi et al. (2013) が 8~15 個（平均 12.8 個）の V/W 胚を外科的移植して、受胎率 60% を示している。移植胚数が 20 個未満の場合に、受胎率が低下する主要因は、おそらく、妊娠成立および維持するために、子宮内に 4 つ以上の受胎産物を必要（Polge et al. 1966）とする豚特有の繁殖生理にある。上記の成功例のうち、V/W 胚 20 個を外科的移植した場合には、産子生産効率は 13.5~18.7% と報告されており、約 10 個の V/W 胚を移植した場合には、おそらく、移植した胚のうち数個が子豚への発生能を保持していても、結果的に受胎豚は妊娠維持することができないため、ほとんどの場合、分娩に至らないと考察される。20 個以上のブタ胚の供給を継続することは困難であるため、少数の V/W 胚からでも安定して子豚生産できる移植技術が必要であるが、本章では、移植前に受胎豚へ AI を実施することにより、必要数の半数にあたる 10 個の V/W 胚を移植した場合でも、安定して子豚生産できることを明らかにした。

まず研究 1-1 において、OPS 法による V/W 胚の体外培養後の胚生存性と外科的移植による繁殖成績を確認した。体外培養 48 時間後の胚生存率と脱出胚盤胞率（それぞれ 82.9% および 61.0%）や、約 20 個の外科的移植による受胎豚の分娩率と産子生産効率（それぞれ 85.7% および 14.7%）は、既報（Berthelot et al. 2000; et al.; Fujino et al. 2008）と同等であった。この結果から、本研究で作製したガラス化冷却保存胚を用いて得られる成果は、一般的に適応できると判断した。

そこで研究 1-2 では研究 1-1 で実施した OPS 法による V/W 胚を用いて、移植前に AI

を行った場合の繁殖成績に及ぼす効果を検討した。受胚豚に AI を実施した場合、受胚豚は AI 由来の体内生産胚を獲得し、得られた体内生産胚が受胚豚の妊娠成立・維持を高い確率でサポートすると期待される。そのため、移植する V/W 胚が少数の場合でも、いくつかの V/W 胚は発生を継続することができ、V/W 胚由来の子豚生産が可能になると考えられる。実際に本研究では 5 頭の受胚豚に対し、移植前に AI を実施し 10 個の V/W 胚を外科的移植したところ、5 頭全てが子豚を分娩し、うち 4 頭は AI 由来子豚と V/W 胚由来子豚を同時に生産した。胚移植による分娩率は 80% (4 頭/5 頭) であり、産子生産効率は 20.0% (10 頭/50 個) であった。一方、AI を実施せずに 10 個の V/W 胚を外科的移植した場合、5 頭中 2 頭が受胎したものの、妊娠維持できず、分娩例は得られなかった。これらの結果は「受胚豚が AI 由来の体内生産胚を獲得し、得られた体内生産胚が受胚豚の妊娠成立・維持を高い確率でサポートする」といった前述の仮説を裏付けるものと示唆された。

一方、受胎産物が着床し、発生を継続できる子宮内スペースは限られている。そのため、過剰に胚を移植しても、母体が全てを許容できない可能性があるため、適正な移植胚数を把握することは重要と考えられている (Beebe et al. 2005; Berthelot et al. 2007; Cameron et al. 1989)。同様の観点から、本研究では、AI 由来の胚が過剰に生産された場合、V/W 胚の着床と競合する、もしくは阻害する可能性を懸念した。そのため、V/W 胚を阻害しない程度に AI 由来の体内生産胚を生産する方法の検討も行った。研究 1-2 において、受胚豚への AI は雄許容を確認した 10~12 時間後に 1 回のみ実施した。このタイミングは、雄許容を約 60 時間継続した雌豚に対し、排卵 36~24 時間前と推測される。最も産子の得られる交配のタイミングは、排卵 24~12 時間前であると報告されているため (Bortolozzo et al. 2005; Soede et al. 2000)、本研究で実施した AI のタイミングでは、AI 由来の体内生産胚を少なめに生産できると予測された。私たちの研究施設において、受胚豚と同じ月齢の雌豚が 1 度に生産する子豚数は平均 10 頭以上 (未発表データ) であるが、AI/non-ET 区で分娩した 6 頭の平均産子数は 9.3 頭 (試験区の平均は 8.0 頭) であった。また移植前に AI を行った 5 頭のうち、4 頭は AI 由来と V/W 胚由来の子豚を同時に生

産し、平均産子数は 8.6 頭であった。これらの結果から、本手法においては、受胚豚には胚が着床できる十分なスペースが残されており、V/W 胚は AI 由来胚に競合または阻害されることなく、同時に着床できたものと示唆された。つまり、OPS 法による V/W 胚の産子効率が本研究では 20% であるため、結果的に 10 個移植の場合、2 頭分の着床できるスペースが残されていることが想定される。

ET による繁殖成績に影響を及ぼす要因の 1 つとして、受胚豚と供胚豚間の発情同期差が知られている (Blum-Reckow & Holtz, 1991; Pope et al. 1986; Wilde et al. 1988)。ブタの外科的な ET では、供胚豚に対し、発情開始が 1 日または 2 日遅れた受胚豚に移植した場合に、優れた繁殖成績の得られることが知られており (小栗, 1990)、本研究でもこれを踏襲した。しかしながら、本研究では、受胚豚と供胚豚間の発情同期差に関する検証を十分実施していないため、今後、より優れた繁殖成績の得られる条件を把握するために更なる調査が必要となる。

また、精漿に含まれる成分には、子宮での免疫系およびサイトカインネットワークへの効果を介して子宮環境を変化させることにより、受胎産物の着床や受胎維持を向上する作用のあることが知られている (Robertson et al. 2007)。さらに卵巣へも白血球の誘導を促進し、黄体のプロジェステロン産生を高めるとの報告もある (O' Leary et al. 2006)。本研究において、移植前に AI を行った場合では、精液中の精漿が注入されるため、移植された V/W 胚は、繁殖成績に関わる直接または間接的作用を受けている可能性がある。精漿が子宮環境を改善するメカニズムは明らかにされていないため、今後、本研究で繁殖成績が向上した機序と精漿の関連性についても、検討すべき課題の 1 つと思われる。

本研究と同様の観点から、人為的に受胚豚の妊娠成立・維持をサポートする技術が報告されている。Kawarasaki et al. (2009) と King et al. (2002) は単為発生胚を使用した手法を開発しており、Fujino et al. (2007) と Misumi et al. (2003) は、4 個の新鮮胚を V/W 胚と共移植し、V/W 胚由来産子の生産効率を高めることに成功している。しかしながらこれらの手法では、あらかじめ単為発生胚を作製したり、余分に新鮮胚を採取したりする

必要があり、手間やコスト面で問題がある。本研究の手法は、一般に実施可能な AI を活用するため、よりシンプルに効果を発揮できる点で有利と思われる。一方、Kawarasaki et al. (2012) は受胚豚への estradiol dipropionate 投与により妊娠維持し、1 つの新鮮胚からでも子豚生産できる技術を開発したが、上記の単為発生胚を利用した場合も含め、一度の分娩で得られる総産子は少ない。本研究で開発した手法は、AI 由来産子を同時に獲得できる。種畜場など、AI 由来の子豚を通常から生産している機関においては、V/W 胚由来産子以外にも、受胚豚から効率よく利用可能な子豚を生産できる点で有効な手段と考えられる。

第2章 ガラス化冷却・加温胚由来子豚を効率よく生産できる
非外科的移植法の開発

緒言

前章で示したように、ブタの ET では、胚のガラス化冷却保存技術が開発され、長期保存した V/W 胚から、外科的移植による子豚生産が可能となった。しかしながら、外科的移植を実施するには、開腹手術を行う特別な施設や技術が必要であり、一般的に普及させることは困難である。そのため、ET の普及には、外科的移植の代替として、非外科的移植が注目されている。ブタの非外科的移植では、カテーテルをできる限り子宮深部に挿入して移植する手法（深部注入法）が主流であり、この手法を用いて、V/W 胚から子豚生産できることも明らかにされている（Cuello et al. 2005）。ところで、非外科的移植により得られる繁殖成績は、外科的移植の場合と比べて低いことが知られており（Martinez et al. 2015）、V/W 胚の非外科的移植で安定した繁殖成績を得るには、約 40 個の胚が必要とされている（Gomis et al. 2012; Martinez et al. 2015）。しかしながら、第 1 章で述べたとおり、ブタ胚の採取には開腹手術が必要であり、1 回に得られる胚数は約 20 個である。これらの限りある資源を有効活用することを考慮すれば、ET の普及には、移植する V/W 胚をなるべく少なくし、その場合でも十分に高い繁殖成績の得られる非外科的移植法の開発が必須である。

V/W 胚の外科的移植では、一定の繁殖成績を得るため、20 個以上の胚が必要と考えられるが、Misumi et al. (2013) はガラス化冷却保存用のデバイスを作製し、8~15 個の V/W 胚を外科的移植した場合でも、高い繁殖成績が望めるブタ胚のガラス化冷却保存法として、Micro Volume Air Cooling 法（MVAC 法）を開発した。大曲ら（2015）や Sakagami et al. (2016) も MVAC 法による V/W 胚の外科的移植を実施し、移植胚数が 15 個以下でも、これまでと同等の成績が得られることを明らかにした。これらの報告から、MVAC 法による V/W 胚の活用は、「少ない胚数の移植でも、安定した子豚生産を達成する」本研究の目的に合致する。しかしながら、非外科的移植に活用した場合の繁殖成績については、十分な検証が行われておらず、外科的移植と同数の胚数で移植した場合でも安定した繁殖成績の得られ

る手法が求められている。

このため、本章では、MVAC 法による V/W 胚を非外科的移植した場合の繁殖成績を調査するとともに、より優れた繁殖成績が獲得できる受胚豚側の要因を精査した。また、第 1 章では、外科的移植前に AI を実施することにより、移植胚数が 10 個の場合でも高い繁殖成績が得られることを明らかにしたが、非外科的移植においても同様の効果が期待できる。このため、非外科的移植前に AI を実施した場合の繁殖成績に及ぼす効果についても検討を行った。

研究 2 - 1 Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法によるガラス化冷却・加温 (V/W) 胚の非外科的移植

1. 目的

透明帯を有するブタ拡張胚盤胞を MVAC 法によりガラス化冷却保存し、加温・希釈後、体外培養および非外科的移植を実施して、本研究で作製したガラス化冷却保存胚が確実に生存性および個体発生能を保持しているかどうかを確認し、以降の実験（研究 2 - 2）に供試できるかどうか検討した。また、非外科的移植においては、受胚豚と供胚豚の発情周期差が繁殖成績に及ぼす影響を検証し、MVAC 法による V/W 胚の非外科的移植における繁殖能力について確認した。

2. 材料および方法

1) 供試豚

供胚豚は、8～10 か月齢の未經産雌豚で、W、D および W と L の一代雑種 (WL) 35 頭を用いた。受胚豚は 13～16 か月齢の経産豚で、W、D および WL34 頭を使用した。交配用の雄豚には、12 か月齢以上の L および D 各 1 頭を用いた。

2) 試薬

実験に使用した試薬類は、別段の指示がない限り、Sigma-Aldrich (MA, USA) の製品を使用した。

3) 胚の回収方法

最初に 12 時間間隔で供胚豚の雄許容を確認した。雄許容が確認された供胚豚は、許容確認後 13～16 日目に黄体退行の目的で、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 類縁体であるクロプロステノール（プラネート、MSD アニマルヘルス株式会社、東京）0.276 mg を 12 時間間隔で 2 回

筋肉内投与した。その 24 時間後、1,000 IU の eCG を投与し、さらにその 72 時間後に排卵誘起の目的で 500 IU の hCG を投与した。ホルモン処理した供胚豚に対し、hCG 投与 24 時間後と 40～42 時間後に AI を 2 回実施した。AI に用いた精液は、AI 実施当日または前日に供試雄豚から採取した。採取した精液は、顕微鏡下で活力等の性状を確認後、モデナ液で 1×10^8 精子/mL に希釈し、使用するまで 15°C の保冷库内で保存した。1 回の AI には希釈精液 50 mL を使用した。胚の採取は、hCG 投与後、約 160 時間にて吸入麻酔下で開腹手術により実施し、子宮角分岐部より子宮角先端へ約 5 cm 付近にバルールカテーテルを挿入・固定し、それぞれの子宮角を 50 mL の回収液 (POM-CM) (Mito et al. 2015) で還流して行った。

4) 供試胚の評価

採取した胚は、倒立顕微鏡下で透明帯に欠損が認められない胚を選別し、更に、胚直径が約 200 μm の拡張胚盤胞を選択して、実験に供するまで、5%酸素、5%二酸化炭素、38.5°C のインキュベータ内で培養液 (PBM) (Mito et al. 2015) 中に保存した。

5) 胚のガラス化冷却・加温に使用する各溶液

胚のガラス化冷却・加温に使用する各種溶液として、ブタ用市販キット (PEV-SK IFP16PVSK、機能性ペプチド研究所、山形) を使用した。

6) MVAC 法によるガラス化冷却保存および保存胚の加温・希釈方法

胚のガラス化冷却・加温操作は Misumi et al. (2013) の報告に準じて実施した。一連の操作は 38°C の温度条件下で行った。回収した胚は、ガラス化冷却前に 20 mM HEPES を添加した PBM (Hepes-PBM) (Mito et al. 2015) で 2 回洗浄し、ガラス化冷却に供試した。供試胚 (5～12 個) は一次平衡液と二次平衡液でそれぞれ 5 分間平衡した。平衡後の胚は、ガラス化液へ移行し、約 1 μL のガラス化液とともにデバイス (胚スティック、ミサワ医科工業株式会社、笠間) (Figure 3) へ付着させた。胚を載せたデバイスは、予め、筒の内側の空

気を液体窒素で冷却したストローへ直ちに挿入し、胚をガラス化冷却した。ガラス化冷却保存胚を封入したストローは液体窒素中で1ヵ月以上保存した。胚をガラス化液へ浸漬後、ストローに挿入するまでの操作は1分以内を実施した。ガラス化冷却保存胚の加温・希釈は38°Cに加温した加温・希釈液3 mLを入れた35 mmシャーレにデバイスを浸漬し、胚をデバイスから遊離させて、そのまま3分間加温・希釈した。V/W胚は、実験に供するまで、5%酸素、5%二酸化炭素、38.5°Cのインキュベータ内でPBMに培養した。

7) ガラス化冷却・加温胚 (V/W胚) の非外科的移植

受胚豚の発情同期化は、研究2-1-3)「胚の回収」で供胚豚に実施した方法を用いた。ホルモン処理した受胚豚は12時間間隔で1日2回雄許容を確認した。移植はhCG投与120~168時間後に無麻酔下で実施した。移植に使用するV/W胚は、加温後4時間培養した胚で、Hepes-PBMで2回洗浄して0.25 mLストロー (NFA121、富士平工業株式会社、東京) に封入し、ストロー開口部をヒートシールして、38.5°Cの保温下で移植まで保持した。非外科的移植器具は子宮深部注入用カテーテル (匠、富士平工業株式会社) (Figure 4)を使用した。受胚豚の外陰部およびその周辺を洗浄消毒後、外陰部よりスパイラルガイドカテーテル (全長60 cm) を挿入し、子宮頸管部に固定した。固定したスパイラルガイドカテーテルを通して、子宮深部注入用カテーテル (全長120 cm) を挿入した。子宮深部注入用カテーテルは、Hepes-PBMであらかじめ管内を洗浄、充填して使用した。子宮深部注入用カテーテルの挿入完了後、胚を封入したストローをカテーテルのストローホルダーに装着し、ストローの反対側を38°CのHepes-PBMで充填した2.5 mLシリンジに接続し、シリンジ内のHepes-PBMを押し出すことにより、胚を子宮内へ注入した。移植終了後、ガイドカテーテル挿入から移植終了までの所要時間を記録し、抜き取った子宮深部注入用カテーテルに折れ曲がった後がないかどうかを確認した。以後、第1章と同様に妊娠診断を行った。受胎が確認された受胚豚は、以降の分娩成績の調査 (分娩率および産子生産効率) に供試した。

8) 統計処理

胚の体外培養による胚生存率、脱出胚盤胞率および産子生産効率は、SAS を使用し、一元配置の分散分析で解析した。移植に係るその他のデータはフィッシャーの正確確率検定を行った。有意差水準は $P < 0.05$ と設定した。

3. 実験区設定

1) 体外培養実験

V/W 胚の体外培養 48 時間後の胚生存率と脱出胚盤胞率を調査した。5 頭の供胚豚から得られた 52 個の胚を、個体毎で無作為にガラス化冷却・加温区と対照区に分配した。対照区は新鮮胚を培養した。胚の生存判定は、形状を完全に回復した胚と発育していることを確認できた胚を生存とした。

2) 発情周期の異なる受胚豚への非外科的移植実験

受胚豚と供胚豚の発情周期差が受胎率、分娩率および産子生産効率に及ぼす影響について調査した。受胚豚には 34 頭の経産雌豚を用いた。1 回の移植において、1 頭の供胚豚から得られた 10~20 個のガラス化冷却保存胚を加温し、10~15 個を無作為に抽出して非外科的移植した。移植に使用しなかった V/W 胚は、上記「1) 体外培養実験」と同様の方法で、体外培養 24 時間後の胚生存率を求めた。本実験では、合計 433 個の V/W 胚を使用した。非外科的移植は、hCG 投与 5 日、6 日および 7 日後の受胚豚に行い、それぞれ 11 頭、13 頭および 10 頭を供試した。hCG 投与 5 日および 6 日の受胚豚は供胚豚に対し、発情周期がそれぞれ 2 日および 1 日遅れており、hCG 投与 7 日後の受胚豚は供胚豚と発情周期が同期しているため、それぞれ 2-day 区、1-day 区および 0-day 区として試験区を設定した。

4. 結果

1) 体外培養実験

結果は Table 5 に示した。ガラス化冷却・加温区の加温 48 時間後の生存率は対照区と比べて有意に低かった(それぞれ 100%および 90.0%, $P<0.05$)。また脱出胚盤胞率も同様であった(それぞれ 90.9%および 66.7%, $P<0.05$)。

2) 発情周期の異なる受胚豚への非外科的移植実験

移植後、子宮深部注入用カテーテルを抜去した際にカテーテル自体に強く屈曲した跡が認められた 4 頭は、子宮角内にカテーテルが挿入されていないと判断し、有効なデータには含めなかった。そのため、解析には 30 頭分のデータを用いた。実験結果は Table 6 に示した。0-day 区では、分娩例が得られなかった。一方、2-day 区と 1-day 区では、それぞれ 3 頭に受胎が確認され、その後分娩に至った。分娩率はそれぞれ 27.3% (3/11 頭) および 25.0% (3/13 頭) であった。2-day 区と 1-day 区の産子生産効率はそれぞれ 13.9% (19 頭/137 個) および 15.7% (22 頭/140 個) であった。受胎率、分娩率および産子生産効率について、区間に有意差は認められなかった。子豚の生時体重(平均±標準誤差)は、2-day 区の子豚が 1.47 ± 0.10 kg で、1-day 区の子豚が 1.39 ± 0.07 kg であり、2 区間に差はなかった。また、V/W 胚の体外培養における 24 時間後の生存率も区間に差を認めなかった。

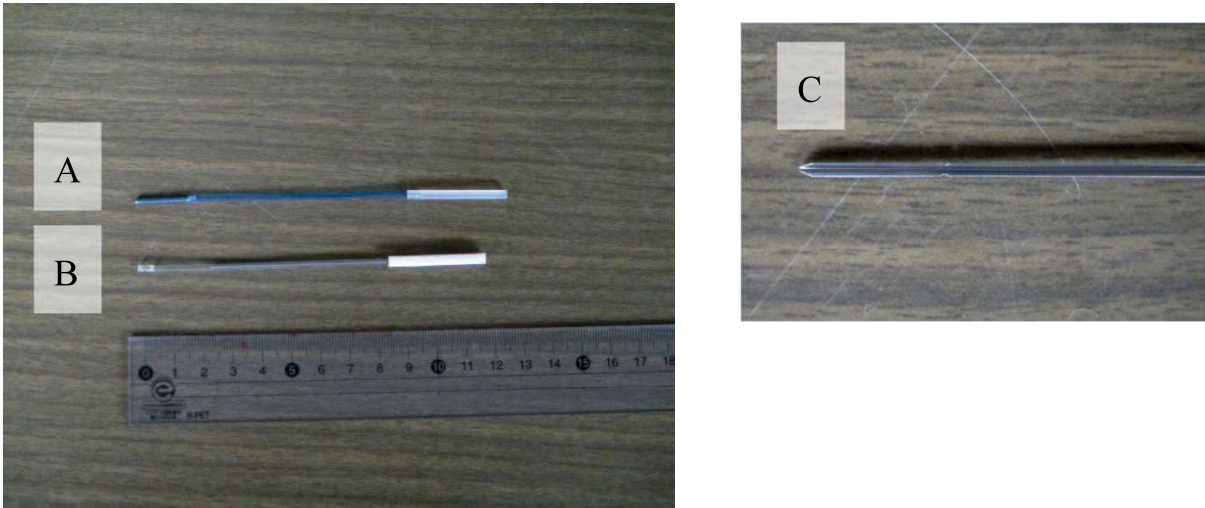


Figure 3. Device for vitrification by MVAC method. (Embryo-stick; Misawa Medical Industry, Kasama, Japan)

A) The straw stored Embryo-stick.

B) Embryo-stick.

C) The tip part of Embryo-stick on which embryos were loaded.

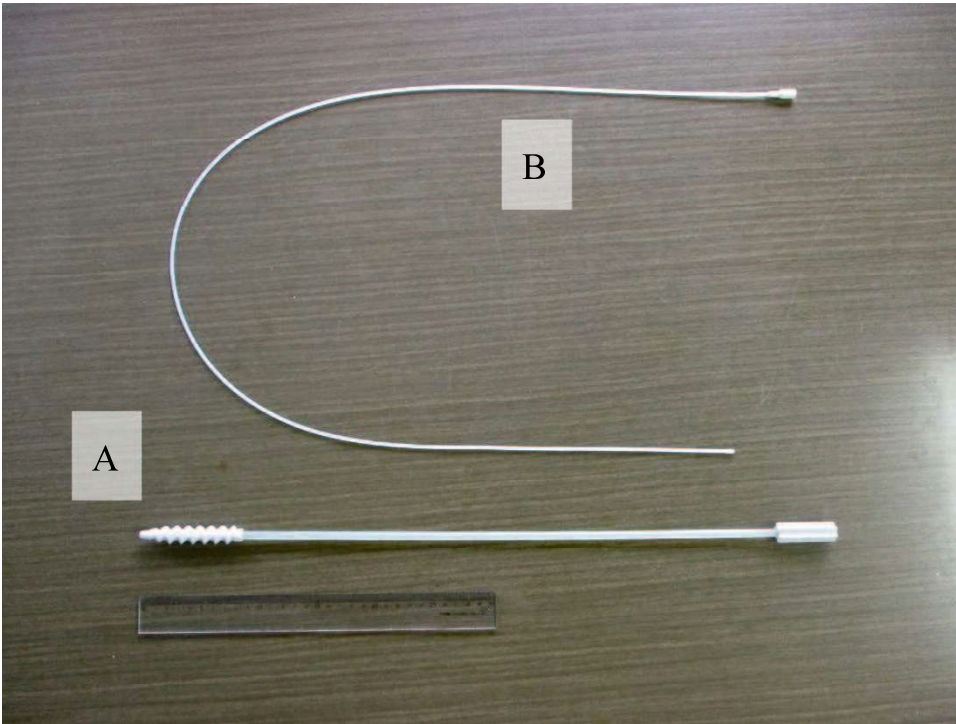


Figure 4. Catheter used for non-surgical ET into deep intrauterine. (Takumi; Fujihira Industry Co., Tokyo, Japan)

A: spiral guide spirette

B: deep intrauterine catheter

Table 5. In vitro viability of V/W porcine expanded blastocysts by MVAC method

Source of embryos	No. of embryos examined	No. (%) ^a of viable embryos after culture for 48 h		
		Total	Re-expanded	Hatching/hatched
Control	22	22 (100)	2 (9.1 ± 4.1)	20 (90.9 ± 5.7) ^b
V/W	30	27 (90.0 ± 4.2)	7 (23.3 ± 4.2)	20 (66.7 ± 3.7) ^c

^a Means ± SEM.

Five replicated trials were performed for each embryo source.

^{b,c} Within each column, values with different subscripts differ significantly (P<0.05)

MVAC: micro volume air cooling

V/W: vitrified and warmed

Table 6. Effect of asynchrony between donor and recipient estrous cycle on reproductive performance after non-surgical transfer (Ns-ET) of 10 to 15 vitrified and warmed embryo, and in vitro viability of vitrified and warmed embryos by MVAC method

asynchrony between donors and recipients (days) ^a	Ns-ET					In vitro culture			
	Total number of recipients	Embryos transferred (per recipient)	Time required for Ns-ET (min)	No. of pregnant recipients (%)	No. of recipients farrowed (%)	No. of piglets	Survival rate to term of transferred embryos ^b (%)	No. of embryos	Viability ^c after 24 h (%)
2-day	11	137 (12.5 ± 0.7)	6.0 ± 0.4	3 (27.3)	3 (27.3)	3,8,8	13.9 ± 6.7	38	30 (78.9 ± 6.1) ^d
1-day	12	140 (11.7 ± 0.4)	6.2 ± 0.4	3 (25.0)	3 (25.0)	4,8,10	15.7 ± 7.1	22	17 (77.3 ± 9.0) ^e
0-day	7	78 (11.1 ± 0.5)	6.8 ± 0.5	0	0	n.d	0.0	18	13 (72.2 ± 9.5) ^f

Means ± SEM.

^aEstrus cycle in recipients were asynchronous delay.

^bCalculated as follows: (number of piglets/number of transferred embryos) × 100

^cBlastocysts showing re-expansion or development to the hatching/hatched blastocyst stages.

^dNine replicated trials were performed for each embryo source.

^eEleven replicated trials were performed for each embryo source.

^fSeven replicated trials were performed for each embryo source.

MVAC: micro volume air cooling

研究 2-2 移植前に行う人工授精 (AI) が受胚豚の繁殖成績に及ぼす影響

1. 目的

研究 2-1 で発生能を確認した V/W 胚を用い、移植胚由来の産子を効率よく生産する技術として、移植前に AI を行った場合の繁殖成績に及ぼす効果について検討した。

2. 材料および方法

1) 供試豚

供胚豚は、8~10 か月齢の未経産雌豚で、D および W と L の一代雑種 (WL) 12 頭を用いた。受胚豚は 13~16 か月齢の経産豚で、D12 頭を使用した。供胚豚への交配用雄豚として、12 か月齢以上の L および D 各 1 頭を用いた。移植前に実施する AI に用いる雄豚には、12 か月齢以上の W および D 各 1 頭を用いた。

2) 試薬

実験に使用した試薬類は、別段の指示がない限り、Sigma-Aldrich (MA, USA) の製品を使用した。

3) 胚の回収方法

研究 2-1 と同様の方法で実施した。

4) 供試胚の評価

研究 2-1 と同様の方法で実施した。

5) 胚のガラス化冷却・加温に使用する各溶液

研究 2-1 と同じ溶液を使用した。

6) MVAC 法によるガラス化冷却保存および保存胚の加温・希釈方法

研究 2 - 1 と同様の方法で実施した。

7) ガラス化冷却・加温胚 (V/W 胚) の非外科的移植

研究 2 - 1 と同様の方法で実施した。

3. 実験区設定

1) AI を行った受胚豚への V/W 胚の非外科的移植実験

あらかじめ AI を行った受胚豚へ 10~15 個の V/W 胚を非外科的移植した場合 (AI/Ns-ET 区) の、胚移植による受胎率、分娩率および産子生産効率に及ぼす効果を検討した。1 頭の供胚豚から採取しガラス化冷却保存した 12~21 個を加温し、10~15 個を無作為に抽出し、発情周期が供胚豚より 2 日遅れた 12 頭の D 経産豚に非外科的移植した (研究 2 - 1 の 2-day 区と同じ条件で移植した)。AI は hCG 投与 24 時間後に 1 回実施した。12 頭のうち 8 頭は D の精液を用いて AI を行い、D 以外の V/W 胚を移植した。残り 4 頭は W の精液を用いて AI を行い、D の V/W 胚を移植した。受胚豚が分娩した場合の由来は子豚の毛色により行った。D 種の精液で AI された受胚豚では、全身が茶色の個体は AI 由来の子豚であり、白またはスポットを有する個体は V/W 胚由来の子豚と判定した。一方、W 種の精液で AI された受胚豚では、全身が茶色の個体は V/W 胚由来の子豚であり、白またはスポットを有する個体は AI 由来の子豚と判定した。また 13~16 か月齢の経産豚 9 頭に、AI/Ns-ET 区で用いた雄豚の精液により AI を実施し、ET は実施しなかった (AI 区)。9 頭のうち 5 頭は D 種の精液で AI し、残り 4 頭は W 種の精液により実施した。

2) 体外培養実験

前述の 1) で非外科的移植に使用しなかった V/W 胚をそれぞれ体外培養し、24 時間後の胚

性存率を調査した。合計 33 個の胚を使用した。

4. 結果

1) AI を行った受胚豚への V/W 胚の非外科的移植実験

移植後、12 頭の受胚豚に子宮内膜炎等の所見は認めなかった。繁殖成績の結果は Table 7、8 および Figure 5 に示した。AI/Ns-ET 区の 12 頭全ての受胚豚が受胎および分娩し、AI 由来子豚と V/W 胚由来子豚を合わせて合計 126 頭生産した (10.5 頭/腹)。126 頭のうち 86 頭は AI 由来の子豚であったが、40 頭は V/W 胚由来子豚であり、12 頭全ての受胚豚から生産された (胚移植による分娩率は 100%)。AI 由来の子豚と V/W 胚由来子豚の生時体重 (平均±標準誤差) は 1.40 ± 0.03 kg と 1.45 ± 0.05 kg であり、有意差を認めなかった。AI に使用した雄の由来 (D と W) について、産子生産効率に差は認められなかった (それぞれ 26.9% および 20.0%)。AI 区では、D の精液で AI した 5 頭は 50 頭の子豚を生産し (10.0 頭/腹)、W の精液で AI した 4 頭は 26 頭の子豚を生産した (6.5 頭/腹)。精液の由来による産子数への影響についての有意差は認められなかった。また、子豚の生時体重は (平均±標準誤差) は、それぞれ 1.33 ± 0.04 kg ならびに 1.35 ± 0.06 kg であり、有意差はなかった。

2) 体外培養実験

V/W 胚の体外培養 24 時間後の生存率は 81.8%であった。

Table 7. Results of non-surgical embryo transfer (Ns-ET) after artificial insemination (AI) or only AI, and in vitro viability of vitrified and warmed embryos by MVAC method

Exp. group	Ns-ET						In vitro culture			
	Total number of recipients	Time required for ET (min)	No. of pregnant recipients (%)	No. of recipients farrowed (%)	Total No. of piglets	No. of recipients producing piglets derived from Ns-ET (%)	No. piglets derived from Ns-ET (%)	Survival rate to term of transferred embryos (%) ^a	No. of embryos after 24 h (%) ^b	Viability ^b
AI/Ns-ET ^c	8	5.9 ± 0.2	8 (100)	8 (100)	92 (11.5 ± 0.5)	8 (100)	32 (4.0 ± 0.8)	26.9±5.5	22	18 (81.8 ± 7.4) ^e
AI ^c	5	n.d	4 (100)	4 (100)	50 (10.0 ± 0.5)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
AI/Ns-ET ^d	4	5.9 ± 0.2	4 (100)	4 (100)	34 (8.5 ± 2.0)	4 (100)	8 (2.0 ± 0.6)	20.0±5.8	11	9 (81.8 ± 1 2.5) ^f
AI ^d	4	n.d	4 (100)	4 (100)	26 (6.5 ± 1.8)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Means ± SEM.

^a Calculated as follows: (number of piglets/number of transferred embryos) × 100

^b Blastocysts showing re-expansion or development to the hatching/hatched blastocyst stages.

^c Inseminated with fixed Duroc semen

^d Inseminated with fixed Large White semen

^e Five replicated trials were performed for each embryo source.

^f Four replicated trials were performed for each embryo source.

Detailed data for AI/Ns-ET are available in Supplemental Table.

MVAC: micro volume air cooling

Table 8. Non-surgical embryo transfer (Ns-ET) of 10 to 15 vitrified/warmed embryos after artificial insemination (AI) and piglet production by MVAC method

Trial No.	No. of embryos	semen for AI	Pregnancy	No. of piglets	No. of piglets derived from Ns-ET	Survival rate to term of transferred embryos (%) ^a
1	15	D	+	11	2	13.3
2	15	D	+	12	2	13.3
3	14	D	+	13	2	14.3
4	15	D	+	13	3	20.0
5	15	D	+	10	4	26.7
6	15	D	+	13	4	26.7
7	15	D	+	10	7	46.7
8	15	D	+	10	8	53.3
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>						
Subtotal	119			92	32	26.9 ± 5.5
<hr/>						
9	10	W	+	9	1	10.0
10	10	W	+	14	1	10.0
11	10	W	+	5	3	30.0
12	10	W	+	6	3	30.0
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>						
Subtotal	40			34	8	20.0 ± 5.8
<hr/>						
Total	159			126	40	25.2 ± 4.1
<hr/>						

Mean ± SEM

^a Calculated as follows: (number of piglets/number of transferred embryos) × 100

MVAC: micro volume air cooling



Figure 5. Piglets and the recipient sow. In this case, piglets derived from AI were wholly brown, whereas those from V/W ExBs were white or spotted.

考察

本章において、MVAC 法により作製された V/W 胚 10～15 個を子宮深部へ非外科的移植し、子豚生産できることが明らかとなった。また移植前に AI を行うことにより、V/W 胚由来産子の分娩率 100%、産子生産効率 25.2%の繁殖成績を獲得し、効率よく、安定して子豚生産できることも明らかにした。Martinez et al. (2015) は V/W 胚の外科的移植において、優れた繁殖成績を得るために必要な胚数は 30 個であり、非外科的移植においては、さらに多数の胚が必要だと述べている。この点において、Gomis et al. (2012) と Martinez et al. (2015) は 40 個の V/W 胚の非外科的移植することにより、優れた繁殖成績を獲得している。しかしながら、1 頭の供胚豚から得られる胚は 1 回の採胚あたり約 20 個であり、40 個もの胚を多数の受胚豚に供給することは、一般的には困難である。そのため、本技術の普及には、できる限り少数の V/W 胚から、優れた繁殖成績の得られる非外科的移植技術が必要である。本研究では V/W 胚 10～15 個の非外科的移植においても、Martinez et al. (2015) が V/W 胚 40 個の非外科的移植で示した分娩率と産子生産効率(それぞれ 72.2%および 17.3%)と同等以上の繁殖成績が得られた。この観点において、以下に列記する通り本研究で示した手法はきわめて有益と考えられる。

まず研究 2-1 において、我々が作製した MVAC 法による V/W 胚の品質を評価した。体外培養 48 時間後の胚生存率と脱出胚盤胞率は、既報 (Misumi et al. 2013; Sakagami et al. 2016) と同等であった。この結果から、MVAC 法による V/W 胚の作製において、本研究において実施した一連の実験においては、技術的な問題はないものと判断した。

次に MVAC 法による V/W 胚 10～15 個を用いて、供胚豚に対し、発情周期が 2 日または 1 日遅れている受胚豚と、同期している受胚豚(それぞれ 2-day 区、1-day 区および 0-day 区)に子宮深部へ非外科的移植を実施した。0-day 区では分娩例が得られなかったが、2-day 区と 1-day 区では、それぞれ 3 頭が分娩し、分娩率はそれぞれ 27.3%および 25.0%であった。第 1 章でも述べたように、胚移植の繁殖成績に影響を及ぼす主要因の 1 つに、受胚豚と供

胚豚間の発情同期差が挙げられる (Angel et al. 2014)。ブタ胚は、体外での胚操作や培養により、発生が一時的に遅延すると考えられている (Almiñana et al. 2010; Blum-Reckow & Holtz 1991; Macharty et al. 1998)。この理由から、移植に供試される胚は、供胚豚よりも発情周期の遅れた子宮内環境に適応すると予測され、体内由来および体外生産による新鮮胚 (胚盤胞) を子宮深部へ非外科的移植する場合でも、受胎率、分娩率および産子生産効率などの繁殖成績は 2-day 区および 1-day 区で優れることが知られている (Angel et al. 2014; Yoshioka et al. 2012)。V/W 胚の非外科的移植において、これまで子豚生産に成功した報告では、1-day 区の受胚豚に移植しており (Cuello et al. 2005; Gomis et al. 2012; Martinez et al. 2015)、MVAC 法による V/W 胚でも、2-day 区および 1-day 区の受胚豚へ外科的移植した場合、優れた繁殖成績が得られている (Misumi et al. 2013; 大曲ら. 2015; Sakagami et al. 2016)。本研究の V/W 胚もまた、Table 5 に示したように、体外培養 48 時間後の脱出胚盤胞率が新鮮胚と比較して有意に低い値 (90.9% および 66.7%) となっており、既報と同様に供胚豚よりも発情周期の遅れた子宮内環境に適応したものと推測された。これらのことから、本研究の MVAC 法による V/W 胚の非外科的移植では、2-day 区または 1-day 区の受胚豚への移植が適当であると示唆された。一方、研究 2-2 では移植前に受胚豚へ AI を実施したが、この場合、AI 由来の体内生産胚が子宮内の着床スペースを占有し、V/W 胚の着床を阻害することが懸念された。前述のとおり V/W 胚の発生は遅延する可能性が高いため、この懸念を払拭するには、移植胚の着床が担保できる一定範囲内で、供胚豚よりも可能な限り発情周期の遅れた受胚豚への移植が有効と考えられた。従って、研究 2-2 では、供胚豚に比べ発情周期の 2 日遅れた受胚豚を供試したところ、受胚豚 12 頭すべてが AI と V/W 由来の両方の子豚を生産した (Table 7 および 8)。しかしながら、研究 2-2 では、他の条件 (例えば供胚豚に対し発情周期が 1 日遅れた受胚豚への移植) を検証していないため、最も優れた繁殖成績の得られる受胚豚の選定には、更なる研究が必要と考えられる。

研究 2-1 では、MVAC 法による V/W 胚 10~15 個を子宮角へ非外科的移植し、子豚生産

できることが明らかとなったが、繁殖成績（分娩率と産子生産効率）は 27.3%および 13.9% であり、同数の V/W 胚を外科的移植した場合（分娩率 75.0%および産子生産効率 35.6%）（大曲ら 2015）に比べ、大幅に低下すると推察された。Martinez et al. (2015) は V/W 胚 30 個を子宮角へ外科的または非外科的移植した場合の繁殖成績を比較したところ、非外科的移植が明らかに下回ることを示した。同様の結果は、新鮮胚や体外生産胚を用いた場合でも認められている（Hazeleger et al. 2000; Martinez et al. 2004; Yoshioka et al. 2012）。非外科移植により繁殖成績が低下する要因はこれまでの研究で明らかにされていないが、おそらく、子宮内に胚を注入する過程で、外科的移植よりも胚を失いやすかったり、操作中に温度変化やカテーテルの性状等、非外科的移植用器具に起因する影響があることも推察され、発生に至る胚数がさらに少なくなる可能性が示唆される。Martinez et al. (2015) は上記の報告において、より多数の V/W 胚（40 個）を非外科的移植することにより、非外科的移植が繁殖成績に及ぼす負の影響を排除することに成功している。一方、本研究の第 1 章において、外科移植前に受胚豚へ AI を実施することにより、移植できる V/W 胚が少なくとも（10 個）、安定して子豚生産できることを示したが、非外科的移植においても同様の効果が期待された。研究 2-2 では、はたして、12 頭の子豚へ移植前に AI を実施し、10~15 個の V/W 胚を非外科的移植したところ、全ての受胚豚が受胎および分娩し、全ての場合で V/W 胚由来子豚を獲得した（分娩率 100%）。V/W 胚による産子生産効率は 25.2%（40 頭/159 個）であった。これらの成績は、大曲ら（2015）が示した MVAC 法による V/W 胚 10~13 個の外科的移植の分娩率と産子生産効率（それぞれ 75.0%および 35.6%）と比較し、産子生産効率はやや劣るものの、分娩率は同等以上と推察された。これらの結果から、移植前に実施する AI は、非外科的移植が繁殖成績に及ぼす負の影響をも排除できることが明らかとなった。

本研究の非外科的移植において、研究 2-1 の 4 頭以外では、カテーテルをスムーズに子宮角へ挿入できた。カテーテルの挿入が困難であったと判断された 4 頭のうち 3 頭は 0-day 区の子豚であり、子豚と発情同期した子豚への非外科的移植は、カテーテル挿

入の操作性に係る点からも不適であるかもしれない。これらの要因解析には、更なる研究が必要である。また、本研究における移植の所要時間は7分以内であり、移植後、操作失宜による子宮蓄膿症などの症状を示す受胚豚も認めなかった。これらのことから、本研究で実施した非外科的移植は、受胚豚に対し、安全かつ負荷をかけにくい手法であることも示された。

第3章 ガラス化冷却・輸送・加温胚の非外科的移植による
一般の養豚農場での子豚生産実証

緒言

第 2 章で述べたとおり、ブタ胚の非外科的移植は、カテーテルを子宮深部に挿入して移植する方法が主流である。この理由は、おそらく、外科的移植における Wallenhorst et al. (1999) の報告に由来しており、子宮体部付近（以下子宮浅部）に移植した場合よりも子宮角先端部へ移植した場合に高い受胎率が得られたためである。これに対し、三角ら (2020) は、ウシ用のカテーテルを改良して用いて子宮浅部へのブタ胚の非外科移植を検証し、V/W 胚の非外科的移植において、子宮角先端へ外科的移植した場合と遜色ない繁殖成績の得られることを明らかにした。また、Hirayama et al. (2020) は子宮浅部への非外科的移植手法をさらに発展させ、専用の移植器具（紅 3 号試作品、ミサワ医科工業、笠間）(Figure 6) を開発した。子宮浅部への非外科的移植は、子宮深部への移植と比べ、短い挿入長でカテーテル先端を移植部位に到達でき、操作が簡易で、受胚豚への負荷も少ないなどのメリットが得られることから、アニマルウェルフェアの観点においても有利な手法と考えられ、今後の利用拡大が見込まれる。

一方、ブタガラス化冷却保存胚の加温・希釈は、通常、顕微鏡下で高度な胚操作技術を用いて行われている。しかしながら、一般の養豚農場では、胚操作に必要な顕微鏡などの機器が備わっていない場合が大多数であるため、農場での ET の実用には、胚操作が不要なガラス化冷却保存胚の加温・希釈法が必須となる。Cuello et al. (2004, 2005) は OPS 法によるガラス化冷却保存胚について、加温・希釈液の入った 1 mL シリンジに OPS を直接挿入し、胚操作を行わないで加温・希釈する手法（以下、ワンステップ法）を開発した。また、ワンステップ法による V/W 胚を非外科的移植して子豚生産にも成功したが、受胎率が低く、再現性に乏しかった (Gomis et al. 2012)。一方、MVAC 法によるガラス化冷却保存胚について、瀧下ら (2019) は、加温・希釈液の入った 5 mL シリンジを使用するワンステップ法を開発した。さらにワンステップ法による V/W 胚を外科的移植し、高い受胎率と 27.5% の産子生産効率を得た (瀧下ら, 2020)。今後は、非外科的移植に適用した場合の検証が急務で

あると報告している。

そこで、本研究では、一般の養豚農場における V/W 胚の非外科的移植の実用を念頭に、上記に示した「子宮浅部への非外科的移植」と「MVAC 法による V/W 胚のワンステップ法による加温・希釈」を組み合わせ、優れた繁殖成績の得られる技術開発に取り組んだ。また、開発した技術を用いて、一般養豚農場での V/W 胚由来の子豚生産を実証するため、実際に生産者が異なる 4 か所の養豚農場へ MVAC 法によるガラス化冷却保存胚を輸送し、農場で加温・希釈した胚 (V/T/W 胚) を子宮浅部へ非外科的移植して、受胚豚の繁殖成績を調査した。なお 4 か所の農場のうち 1 農場では、移植前の受胚豚へ AI を実施し、前章までに開発した技術の有効性も検証した。

研究 3-1 Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法によるガラス化冷却・加温 (V/W) 胚の子宮浅部非外科的移植実験

1. 目的

MVAC 法による V/W 胚の子宮浅部への非外科的移植法において、ガラス化冷却保存胚の加温・希釈をワンステップ法で実施した場合に繁殖成績に及ぼす影響を調査し、研究 3-2 で用いる一般の養豚農場で実施可能な ET 技術体系として供与できるかどうかの検証を行った。

2. 材料および方法

1) 供試豚

供胚豚は、L、W、D および L と W の一代雑種 (LW) で、8~22 か月齢の未経産雌豚 28 頭と、1~8 産の経産豚 12 頭を用いた。受胚豚は L、D および LW で 9~11 か月齢の未経産豚 14 頭と 1~2 産の経産豚 7 頭を使用した。交配用の雄豚には、12 か月齢以上の L、W および D を複数頭使用した。

2) 試薬

実験に使用した試薬類は、別段の指示がない限り、Sigma-Aldrich (MA, USA) の製品を使用した。

3) 胚の回収方法

供胚豚の黄体退行処理は、[1] (Misumi et al. 2013) または[2] (第 2 章、研究 2-1 と同様の方法) で実施した。[1]: 人工受精後 20~40 日目にクロプロステノール 0.562 mg を 24 時間間隔で 2 回筋肉内投与した。[2]: 許容確認後 13~16 日目にクロプロステノール 0.276 mg を 12 時間間隔で 2 回筋肉内投与した。[1]の供胚豚は 2 回目の投与時に、一方、

[2]の供胚豚は2回目の投与24時間後に、1,500 IUのeCGを投与し、さらにその72時間後に排卵誘起の目的で500 IUのhCGを投与した。ホルモン処理した供胚豚に対し、hCG投与24時間後と40~42時間後にAIを2回実施した。AIに用いた精液は、AI実施当日または前日に供試雄豚から採取した。採取した精液は、顕微鏡下で活力等の性状を確認後、モデナ液で 1×10^8 精子/mLに希釈し、使用するまで15°Cの保冷庫内で保存した。1回のAIには希釈精液50 mLを使用した。胚の採取は、hCG投与約160時間後に研究2-1と同様の方法で実施した。

4) 供試胚の評価

採取した胚は、倒立顕微鏡下で透明帯に欠損が認められない胚盤胞から拡張胚盤胞を選択し、実験に供するまで、5%酸素、5%二酸化炭素、38.5°Cのインキュベータ内でPBM (Mito et al. 2015) に保存した。

5) 胚のガラス化冷却・加温に使用する各溶液

研究2-1と同じ溶液を使用した。

6) MVAC法による胚のガラス化冷却保存および保存胚の加温・希釈方法

研究2-1と同様の方法で実施した。

7) ガラス化冷却・加温胚 (V/W胚) の子宮浅部への非外科的移植

受胚豚の発情同期化は、研究2-1と同様の方法で実施した。移植はhCG投与118~144時間後に鎮静下で立位にて実施した。受胚豚の鎮静処理はミタゾラム10 mg (ドルミカム、アステラス製薬、東京) (Nakamura et al. 未公表データ) を移植30分前に筋肉内投与して行った。非外科的移植器具は子宮浅部注入用カテーテル (前述) を使用した。受胚豚の外陰部およびその周辺を洗浄消毒後、外陰部よりカテーテル (全長61.5 cm) をその先端が移

植部位手前に位置するまで挿入し、さらに内管を前方へ 5 cm 押し出して移植部位に到達させ、移植まで維持した。カテーテル挿入完了後、ガラス化冷却保存胚の加温・希釈を実施した。2.5 mL シリンジを用いて 0.25 mL ストローに V/W 胚 14~19 個を封入し、移植に供した。胚を注入する前に、カテーテルは 38°C に保温した 1 mL の HEPES-PBM であらかじめ管内を充填した。カテーテル管内の充填後、胚を封入したストローをカテーテルのストローホルダーに装着し、2.5 mL シリンジ内の HEPES-PBM を押し出すことにより胚を子宮内へ注入した。さらにシリンジ用滅菌フィルターを通して、1 mL 空気を注入し、管内の HEPES-PBM を完全に子宮内へ押し出して移植を完了した。以後、第 1 章と同様に妊娠診断を行った。受胎が確認された受胚豚は、以降の分娩成績の調査（分娩率、胚移植による産子生産効率）に供試した。

8) 統計処理

移植による産子生産効率は、SAS を使用し、一元配置の分散分析で解析した。移植に係るその他のデータはフィッシャーの正確確率検定を行った。有意差水準は $P < 0.05$ と設定した。

3. 実験区設定

1) 子宮浅部注入用カテーテル挿入時の先端部到達位置の検証

子宮浅部注入用カテーテルを外陰部より 40~50 cm 挿入した場合の内管先端の到達位置を、吸入麻酔下で開腹手術により確認した。D 種と L 種の 9~15 か月齢の未経産雌豚 13 頭と 1~5 産の経産豚 7 頭を実験に供し、hCG 投与 5 日または 6 日後に実施した。

2) 発情周期の異なる受胚豚への非外科的移植実験

受胚豚と供胚豚の発情周期差が受胎率、分娩率および産子生産効率に及ぼす影響について調査した。受胚豚には 9 頭の未経産雌豚と 5 頭の経産豚を用いた。1 回の移植において、

複数の供胚豚から得られた 14~18 個のガラス化冷却保存胚を加温し、子宮浅部へ非外科的移植した (Figure 8)。本実験では、合計 225 個の V/W 胚を使用した。非外科的移植は、hCG 投与 5 日および 6 日後の受胚豚に行い、それぞれ 5 頭と 9 頭を供試した。hCG 投与 5 日および 6 日後の受胚豚は供胚豚に対し、発情周期がそれぞれ 2 日および 1 日遅れているため、2-day 区および 1-day 区として試験区を設定した。

3) ワンステップ法で加温・希釈した V/W 胚の非外科的移植実験

ワンステップ法で加温・希釈した V/W 胚を子宮浅部へ非外科的移植した場合の受胎率、分娩率および産子生産効率を調査した。ワンステップ法は瀧下ら (2020) が報告した方法で実施した。3 mL の加温希釈液を入れた 5 mL ディスポーザブルシリンジを 40°C に設定した恒温槽で保温し、胚の付着したデバイスを直接シリンジ内へ挿入して加温・希釈した。一回の移植で加温・希釈に用いるデバイスは最大 2 本とした。加温・希釈後、シリンジを移植器具に装着し、移植に供した。

非外科的移植は、hCG 投与 6 日後の受胚豚に行い、5 頭の未経産雌豚と 2 頭の経産豚を供試した。1 回の移植において、複数の供胚豚から得られた 14~19 個のガラス化冷却保存胚を加温し、合計 110 個を用いた。また、カテーテル挿入から移植完了までの所要時間を測定した。

4. 結果

1) 子宮浅部注入用カテーテル挿入時の先端部到達位置の検証

カテーテルを外陰部より 40~50 cm 挿入した場合の先端部は、未経産豚の 84.6% と経産豚の 71.4% で子宮体またはどちらかの子宮角内に到達していた。経産豚では、子宮角にカテーテル先端部が到達した例を確認できなかった。一方、未経産豚では、23.1% (3/13 頭) が子宮角内へカテーテル先端が到達した (Table 9 および Figure 7)。

2) 発情周期の異なる受胚豚への非外科的移植実験

カテーテル挿入長は 2-day 区と 1-day 区でそれぞれ平均 40.6 cm と 43.6 cm であった。また、移植後、子宮蓄膿症等の所見は認めなかった。繁殖成績は、Table 10 に示した。2-day 区では受胎例が得られなかった。一方、1-day 区では、4 頭の受胚豚が受胎および分娩し、27 頭の子豚を生産した。1-day 区の分娩率は 50.0% (4/8 頭) で、産子生産効率は 21.1% (27 頭/128 個) であった。2 区間に全ての項目で有意差は得られなかった。1-day 区で生産された子豚の生時体重は 1.53 ± 0.06 kg (平均±標準誤差) であった。

3) ワンステップ法で加温・希釈した V/W 胚の非外科的移植実験

カテーテル挿入長は平均 41.3 cm で、移植の所要時間は平均 5 分 42 秒だった。また、移植後、子宮蓄膿症等の所見は認めなかった。繁殖成績は、Table 11 に示した。3 頭の受胚豚が受胎および分娩し 7 頭の子豚を生産した。分娩率は 42.9% (3/7 頭) であったが、産子生産効率は 6.4% (7 頭/110 個) であった。生産された子豚の生時体重は 1.53 ± 0.06 kg (平均±標準誤差) であった。



Figure 6. Catheter used for non-surgical ET into proximal site of uterine. (Kurenai-3 Prototype; Misawa Medical Industry, Kasama, Japan)

A: Default position of inner tube (injector).

B: State advanced injector to deposit embryos.

Table 9. Location of the catheter tip after insertion of 40–50cm anterior to the vulva

Recipient	No. of recipients	Inserted catheter length (mean cm \pm SEM)	The location of catheter tip [#] (%)			
			uterine horn (a)	uterine body (b)	Uterin cervical canal	Corrected position (a plus b)
gilt	13	44.3 \pm 0.9	3 (23.1)	8 (61.5)	2 (15.4)	11 (84.6)
sow	7	45.4 \pm 1.3	0 (0.0)	5 (71.4)	2 (28.6)	5 (71.4)

[#]determined by laparotomy under general anaesthesia.

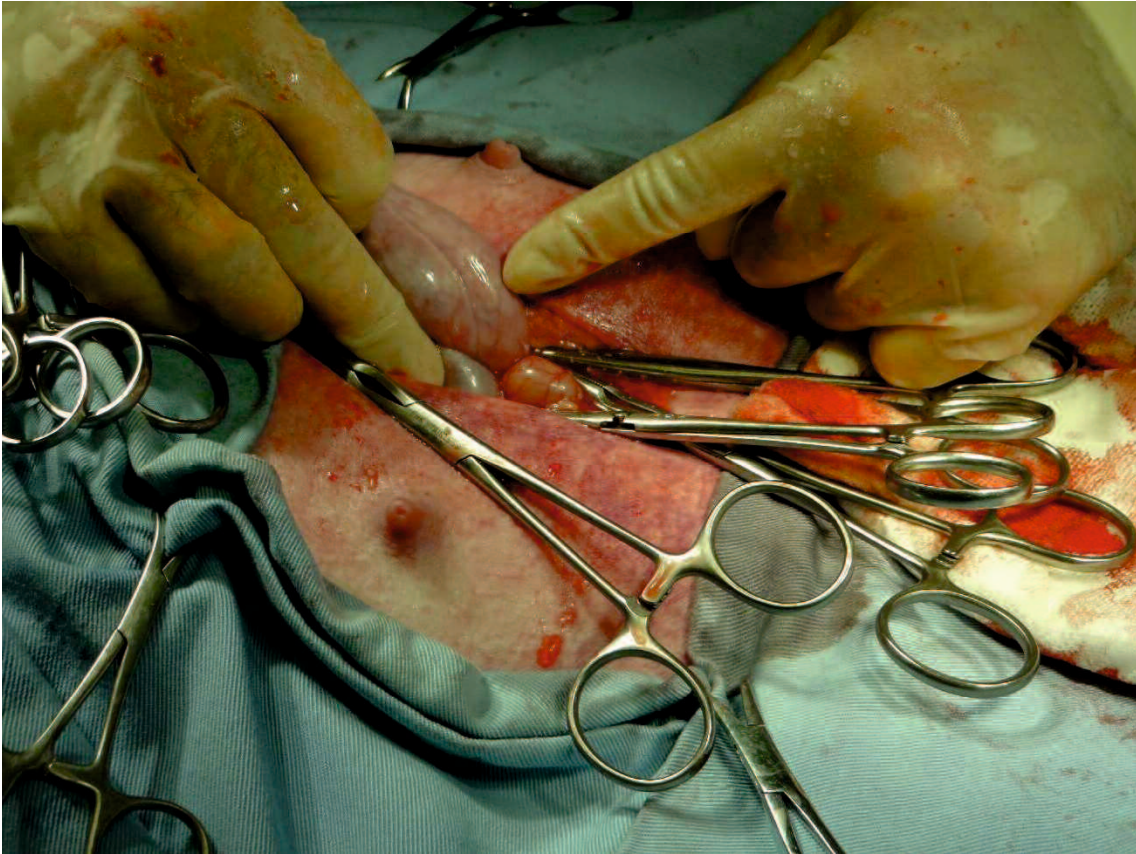


Figure 7. The location of injector tip showed with fingertip.



Figure 8. Non-surgical embryo transfer into proximal intrauterine site.

Table 10. Effect of asynchrony between donor and recipient estrous cycle on reproductive performance after non-surgical transfer (Ns-ET) of vitrified and warmed embryo by MVAC method into proximal site of uterine

Asynchrony between donors and recipients (days) ^a	Total no. of recipients	No. of embryos transferred (mean per recipient)	Inserted catheter length (cm)	No. of pregnant recipients (%)	No. of farrowed recipients (%)	No. [total] of piglets	% survival to term of transferred embryos ^b
2-day	4	64 (16.0 ± 1.1)	40.6 ± 4.1	0 (0.0)	0 (0.0)	n.d	0.0
1-day	8	128 (16.0 ± 0.3)	43.6 ± 2.1	4 (50.0)	4 (50.0)	5,6,8,8 [27]	21.1 ± 8.4

Means ± SEM.

^aEstrus cycle in recipients were asynchronous delay.

^bCalculated as follows: (number of piglets/number of transferred embryos) × 100

MVAC: micro volume air cooling

Table 11. Effect of one-step warming and dilution procedure on reproductive performance after non-surgical transfer (Ns-ET) of vitrified and warmed embryo by MVAC method into proximal site

Number of recipients	No. of embryos transferred per recipient	Time required for Ns-ET (min's'')	Inserted catheter length (cm)	No. of pregnant recipients (%)	No. of farrowed recipients (%)	No. [total] of piglets	% survival to term of transferred embryos ^a
7	110 (15.7 ± 0.6)	5'42'' ± 0'37''	41.3 ± 0.6	3 (42.9)	3 (42.9)	2, 2, 3 [7]	6.4 ± 3.2

Means ± SEM.

^a Calculated as follows: (number of piglets/number of transferred embryos) × 100

MVAC: micro volume air cooling

研究3-2 一般の養豚農場におけるガラス化冷却・輸送・加温（V/T/W）胚の非外科的移植実験

1. 目的

MVAC法により作製したガラス化冷却保存胚を一般の養豚農場へ輸送し、現地でワンステップ法により加温・希釈したV/T/W胚を子宮浅部へ非外科的移植して、研究3-1で確立した胚移植の技術体系による子豚生産実証を行った。また、移植前にAIを行った場合に、受胚豚の繁殖成績に及ぼす効果についても検討した。

2. 材料および方法

1) 供試豚

供胚豚は、L、WおよびDで、8～22か月齢の未経産雌豚16頭を供試した。受胚豚は移植を実施する養豚農場で飼養されているLWで1～6産の経産豚16頭を使用した。移植前に実施するAIで用いる雄豚は、移植を実施する農場で肉豚生産に用いられているDを1頭使用した。

2) 試薬

実験に使用した試薬類は、別段の指示がない限り、Sigma-Aldrich (MA, USA) の製品を使用した。

3) 胚の回収方法

研究3-1と同様の方法により、研究施設で実施した。

4) 供試胚の評価

研究3-1と同様の方法で実施した。

5) 胚のガラス化冷却・加温に使用する各溶液

研究 2-1 と同じ溶液を使用した。

6) MVAC 法によるガラス化冷却保存および保存胚の加温・希釈方法

胚のガラス化冷却操作は、研究施設において研究 2-1 と同様の方法で実施した。一方、保存胚の加温・希釈は、一般の養豚農場へ輸送したガラス化冷却保存胚を研究 3-1 で示したワンステップ法により実施した。

7) ガラス化冷却/輸送/加温胚 (V/T/W 胚) の非外科的移植

受胚豚の発情同期化は、離乳日を調整して行い、以下の[1]または[2]のどちらかの方法で排卵誘起した。[1]: 離乳日に eCG 1,000 IU を投与し、さらにその 72 時間後に 500 IU の hCG を投与した。[2]: 離乳 72 時間後に 1,000 IU の hCG を投与した。移植は hCG 投与 6 日後に、研究 3-1 と同様に、子宮浅部へ非外科的に移植した。移植に使用したガラス化胚は、移植当日、研究施設より 20~70 km 離れた生産者の異なる 4 か所の養豚農場へ、輸送用液体窒素容器 (SC4/2V、Chart biomedical、USA) を用いて輸送した。衛生的な飼養環境の維持された繁殖用ストールまたは単飼豚房を使用し、1 頭の供胚豚から得られた V/T/W 胚 11~20 個を 1 頭の受胚豚へ移植した。合計 251 個の胚を使用した。4 農場のうち 1 か所の農場では、4 頭の受胚豚へ hCG 投与 24 時間後に、農場で飼養する 1 頭の D 雄豚の精液を用いて AI を 1 回実施して、移植に供試した。受胚豚が分娩した場合の由来は研究 2-2 と同様に子豚の毛色により判定した。

8) 遺伝子診断

移植前に AI を実施して移植に供した受胚豚において、生産した子豚の由来が毛色により判定できない場合 (例えば L の V/T/W 胚を移植した場合) は、子豚と両親の組織サンプル

を用いた遺伝子診断により親子判定した。遺伝子診断は、一般社団法人家畜改良事業団（群馬）に依頼した。

9) 統計処理

移植による産子生産効率は、SAS を使用し、一元配置の分散分析で解析した。移植に係るその他のデータはフィッシャーの正確確率検定を行った。有意差水準は $P < 0.05$ と設定した。

3. 実験区設定

1) V/T/W 胚の非外科的移植実験

移植前に AI を実施した 4 頭の受胚豚は AI/Ns-ET 区とし、それ以外の受胚豚 12 頭は non-AI/Ns-ET 区として、2 区間の繁殖成績（受胎率、分娩率、胚移植による産子生産効率）を比較した。

4. 結果

1) V/T/W 胚の非外科的移植実験

移植を実施した 4 農場全てで V/T/W 胚由来の子豚が生産された。繁殖成績は、Table 12 および Figure 9 に示した。non-AI/Ns-ET 区では、合計 12 頭の子豚が生産され、受胎率、分娩率および産子生産効率は、それぞれ 58.3%、33.3% および 6.3% であった。一方、AI/Ns-ET 区では、4 頭中 3 頭が受胎、分娩し、30 頭の子豚を生産した。30 頭の子豚のうち、13 頭が V/T/W 胚由来の子豚であった。AI/Ns-ET 区の移植胚由来産子の受胎率、分娩率と産子生産効率は、それぞれ 75.0%、75.0% および 21.3% であった。胚移植による産子生産効率について、AI/Ns-ET 区は non-AI/Ns-ET 区より高い傾向が認められた ($P=0.051$)。

Table 12. Results of non-surgical embryo transfer (Ns-ET) of vitrified and warmed embryos by MVAC method into proximal site at commercial swine farm

Farm	Experimental group	Total no. of recipients	No. of embryos transferred (mean per recipient)	Inserted catheter length (cm)	Time required for Ns-ET (min's ^a)	No. of pregnant recipients (%)	No. of farrowed recipients (%)	No. [total] of piglets (mean per recipient)	No. of recipients producing piglets derived from ET (%)	No. [total] of piglets derived from ET (mean per recipient)	% survival to term of transferred embryos ^a
1	Non-AI/Ns-ET ^b	6	98 (16.3 ± 0.8)	51.7 ± 1.5	7'12" ± 1'00"	3 (50.0)	2 (33.3)	3,3 [6] (1.0 ± 1.7)	2 (33.3)	3,3 [6] (1.0 ± 1.7)	6.1 ± 3.7
2		4	63 (15.8 ± 1.1)	48.3 ± 1.2	6'06" ± 0'17"	3 (75.0)	1 (25.0)	3 [3] (0.8 ± 0.8)	1 (25.0)	3 [3] (0.8 ± 0.8)	4.8 ± 5.0
3		2	29 (14.5 ± 3.5)	55.0 ± 0.0	6'40" ± 0'20"	1 (50.0)	1 (50.0)	3 [3] (1.5 ± 1.5)	1 (50.0)	3 [3] (1.5 ± 1.5)	10.8 ± 13.6
Subtotal		12	190 (15.8 ± 0.7)	55.0 ± 1.1	6'45" ± 0'29"	7 (58.3)	4 (33.3)	3,3,3,3 [12] (1.0 ± 0.4)	4 (33.3)	3,3,3,3 [12] (1.0 ± 0.4)	6.3 ± 2.6
4	AI/Ns-ET ^c	4	61 (15.3 ± 0.9)	54.0 ± 1.4	8'45" ± 0'35"	3 (75.0)	3 (75.0)	4, 12, 14 [30] (7.5 ± 3.3)	3 (75.0)	2,4,7 [13] (3.3 ± 1.5)	21.3 ± 10.3
Mean ± SEM											

^a Calculated as follows: (number of piglets/number of transferred embryos) × 100

^b Non-AI/Ns-ET: Ns-ET into proximal site

^c AI/Ns-ET: artificial insemination prior to Ns-ET into proximal site

MVAC: micro volume air cooling



Figure 9. Piglets derived from Vitrified/Transfer/Warmed embryos at commercial swine farm.

考察

本章、研究 3-1 では、MVAC 法による V/W 胚を子宮浅部へ非外科的移植した場合、第 2 章における子宮深部への非外科的移植の繁殖成績と遜色ない結果が示された。この結果から、子宮浅部への非外科的移植は、操作の簡便さやアニマルウェルフェアに対する有利性により、子宮深部への非外科的移植に比べてより優れた手法と考えられる。さらに、子宮浅部への非外科的移植では、加温・希釈をワンステップ法で実施した場合でも、子豚生産できることが明らかとなった。また、研究 3-2 では、上記の手法を使用し、一般の養豚農場において、V/T/W 胚の非外科的移植による子豚生産に成功した。本研究の成果により、胚操作に必要な施設や機器を持たない一般の養豚農場においても、ET による子豚生産の実用可能であることが示された。

子宮浅部への非外科的移植は、ごく短いカテーテル挿入長で移植部位に到達できることから、カテーテル挿入操作が容易で、操作失宜による子宮内膜への侵襲リスクも低いことが期待できる (Hirayama et al. 2020)。しかしながら、実用においては、操作失宜による侵襲リスクをさらに低下させ、安全に実施する必要性から、本研究では、まず、目的の移植部位に安全に到達する挿入長の把握に努めた。カテーテル挿入長を 40~50 cm とした場合、経産豚では 71.4% の個体でカテーテル先端が子宮体部に到達したが、約 3 割の個体が子宮頸管を通過していなかった。一方、未経産雌豚では、84.6% が子宮頸管を通過しており、全体の 23.1% はカテーテル先端が子宮角まで到達していた。この結果から、経産豚において、40~50 cm のカテーテル挿入長では、更にカテーテルを前方に挿入できる余地があり、子宮内膜の侵襲リスクは低いものと示唆された。一方、未経産雌豚では、40~50 cm の範囲を超えて挿入する場合、受胚豚への侵襲リスクが高まるため、より慎重な操作が必要と考えられる。

研究 3-1 の実験 2 では、MVAC 法による V/W 胚約 16 個を子宮浅部へ非外科的移植した。本研究では、2-day 区を受胚豚から分娩例は得られなかった。一方、1-day 区では、分娩率

50% (4頭/8頭)、産子生産効率 21.1% (27頭/128個) の繁殖成績が得られた (Table 10)。この結果から、子宮浅部への非外科的移植では、1-day 区の受胚豚への移植が適当であると示唆された。第1章と第2章でも述べたとおり、受胚豚と供胚豚間の発情同期差は、ET の繁殖成績に影響を及ぼす主要因の1つであり、供胚豚よりも発情周期が1~2日遅れた受胚豚で繁殖成績の高いことが知られている (Angel et al. 2014)。第2章において、本研究では子宮深部への V/W 胚の非外科的移植で、2-day 区または 1-day 区の受胚豚への移植が適当と考察した。しかしながら、本章の結果は子宮深部へ非外科的移植した場合といくぶん状況が異なる。通常の繁殖生理において、胚盤胞は繁殖周期の6~7日頃 (1~0-day 区の受胚豚の繁殖周期) まで子宮角先端部に停滞し、以降、子宮体部に向かって下降しながら発育する (Dziuk, 1985)。このことから、胚盤胞の移植では、できる限り子宮角深部へ実施したほうが、移植された胚が子宮内環境に順応しやすいと考えられている (Angel et al. 2014; Martinez et al. 2015)。これに対し、子宮浅部への移植は、胚盤胞にとって子宮内環境が通常の繁殖生理とやや異なると考えられ、移植した V/W 胚が環境に適応できる期間が短くなることも考えられる。これらの点に関しては更に検証を進める必要がある。

上述のとおり、一般の養豚農場では胚操作を実施できない場合が多く、胚移植を実用するために、ワンステップ法は必要不可欠な技術である。本研究で使用されている MVAC 法において、瀧下ら (2020) がワンステップ法を開発し、ワンステップ法による V/W 胚 12~16 個の外科的移植により分娩率 60%、産子生産効率 27.5% の優れた繁殖成績を示した。これに倣い、研究 3-1 の実験 3 では、ワンステップ法による約 16 個の V/W 胚を子宮浅部へ非外科的移植した場合の繁殖成績を調査した。その結果、分娩率は 42.9% (3/7 頭) で、研究 3-1 の実験 2 で実施した通常法の結果 (分娩率 50%) と同等であったが、産子生産効率は 6.4% (7頭/110個) で、研究 2-1 の (21.1%) に比較し著しく低下した。本研究のワンステップ法を用いた非外科移植において、産子生産効率の低下した要因は不明だが、操作手技に係る要因の可能性が考えられる。Gomis et al. (2012) は、superfine-OPS 法によるワンステップ法において、胚を含んだデバイスの先端部を加温・希釈液に沈めるまでの所要

時間を測定し、1.5 秒以上要する場合、V/W 胚の体外培養および移植後の生存性が著しく低下することを示した。本研究においては、デバイスを希釈加温液に投入するまで数秒以内に実施しているが、所要時間と発生の関連性については詳細な調査を実施しておらず、この点に産子生産効率低下の要因があるかもしれない。今後、詳細な検証を行い、手技の改良が必要である。

研究 3-2 では、研究 3-1 で検証した手法を用い、一般の養豚農場において V/T/W 胚からの子豚生産実証に成功した。加えて、生産者の異なる 4 農場全てで子豚生産に成功したことから、技術の普及性についても明らかになった。本研究では、全ての受胚豚に対して、カテーテル挿入をスムーズに実施でき、10 分以内に移植を完了した。また移植後に、子宮蓄膿症等の症状を示す受胚豚は確認されなかった。これらのことから、本研究で用いた移植手法は、安全で、受胚豚への負荷も少ない技術と考えられる。

上記の 4 農場のうち 1 か所の農場では、AI を実施した受胚豚へ非外科的移植を行った。本研究の第 1 章および第 2 章において、移植前に受胚豚へ AI を実施することにより、受胚豚の分娩率を向上させ、結果として産子生産効率を高める効果があることを示した。はたして、本研究においても、同様の効果が発揮されたものと考えられ、移植胚由来子豚の分娩率 75%、産子生産効率 21.3% (13 頭/61 個) の繁殖成績を得た。これらの成績は研究 3-1 の実験 2 で得られた成績と同等であり、本研究で認められたワンステップ法による繁殖性の低下も克服できることが示された。しかしながら、AI 実施後の子宮浅部非外科的移植については、本研究での実施件数が少ないため、今後、データを蓄積し、より正確な検証が必要と思われる。

総 括

本研究は、ETによる子豚生産を一般の養豚農場で実用するための移植技術の開発が目的である。ETの実用には長期保存技術が必要不可欠であり、ブタ胚では、体内生産胚を用いたガラス化冷却法が確立されている。しかしながら、現時点では、体内生産胚を採取するために外科的手術を実施する必要があるとあり、採取できる胚数も限られている。またV/W胚から安定して子豚生産するには、非常に多数の胚(1頭あたり20個以上)が必要となるため、ETの実用に足枷となっていた。このため第1章では、10個のV/W胚でも、外科的移植により、安定して子豚生産できる手法を開発した。本手法は、移植前にAIを実施し、人為的に妊娠成立および維持できる子宮内環境を予め整えた受胚豚に、10個のV/W胚を移植したものであるが、このような子宮内環境下では、V/W胚由来の受胎産物がごく少数であっても、着床から個体発生までの過程がサポートされ、V/W胚からの子豚生産が向上すると考えられる。同様の観点から、人為的に受胚豚の妊娠成立・維持をサポートするいくつかの技術が報告されているが(Fujino et al. 2007; Kawarasaki et al. 2009, 2012; King et al. 2002; Misumi et al. 2003)、本研究で開発した手法は、コスト面やシンプルに効果を発揮できる点で有利である。また第2章、第3章にも関連するが、一般の養豚農場では、受胚豚として、おそらく、通常生産に使用される雌豚が一時的に供与される。本研究の手法は、通常の生産サイクルでAIされた雌豚を受胚豚に活用し、V/W胚由来の子豚と通常生産される子豚を同時に生産できる。このため、農場の生産性を低下させることなく、ETを活用できる点で有効な手法と考えられる。

ETの汎用には外科的移植に代わり非外科的移植の利用が必須である。しかしながら、非外科的移植による繁殖成績は、外科的移植に比べ低いことが知られており(Hazeleger et al. 2000; Martinez et al. 2004, 2015; Yoshioka et al. 2012)、V/W胚の非外科的移植で安定した繁殖成績を得るには、さらに多数の胚が必要となる。このため、第2章では、外科的移植で優れた繁殖成績の得られるMVAC法で作製したV/W胚を用いて、子宮深部への非外科的移植を行い、10~15個のV/W胚からでも子豚生産できることを実証した。さらに第1章で開発した移植前にAIを実施する手法を応用し、高い受胎率と産子生産効率の得られ

る手法へと発展させた。

さらに第3章では、第2章で示したV/W胚の非外科的移植を、全ての養豚農場で実用可能な技術として改良した。その1つの要素が、移植用カテーテルに子宮浅部移植用のカテーテルを使用した点である。子宮浅部への非外科的移植は子宮深部と比較し操作が容易で、子宮内膜損傷など受胚豚への侵襲リスクが低いメリットがあり、アニマルウェルフェア（動物福祉）の考え方にも適応すると考えられるものの、低い繁殖性が懸念され、今日まで注目されてこなかった。本研究で示した結果は、三角ら(2020)やHirayama et al. (2020)の報告と同様、これまでの懸念を払拭するものであり、子宮浅部への非外科的移植の有効性を示した。もう1つは、胚の輸送に係る点である。養豚農場でETを行うには、胚の輸送が必要であり、V/W胚を培養液中に保存して輸送する方法と、ガラス化冷却保存胚を液体窒素中に保存したまま輸送する方法が挙げられる。前者では、加温から移植までの期間が限定されることや、移植直前に受胚豚における要因から移植実施が困難な場合、貴重な胚が無駄になる高いリスクがある。一方、後者では、これらのリスクがないものの、現地でガラス化冷却保存胚の加温を実施する必要がある。そのため、本研究では、顕微鏡等の専用の器具を必要とせず一般の養豚農場で実施可能なMVAC法におけるワンステップ法（瀧下ら、2019、2020）を採用し、非外科的移植に応用できることを明らかにした。さらに上記の手法を組み合わせ、複数の養豚農場において、V/T/W胚からの子豚生産を実証した。また第1章および2章と同様に、移植前に受胚豚へAIを実施することにより、安定したV/T/W胚からの子豚生産が可能になった。これらの成果により、今後は、外科的移植や胚操作に必要な設備や技術を持たない養豚農場でも、胚移植を利用した子豚生産の実用が見込まれる。

本研究におけるETの技術体系では、未解決の要素も残されている。受胚豚と供胚豚の発情周期差と繁殖性の関連性を明らかにし、最も効果的な移植実施時期を把握することは重要である。移植前に実施するAIについては、精漿成分の影響など妊娠成立・維持に関連するメカニズムを明らかにすることにより、手法の有効性を確かなものにできる。また、本研究で認められたワンステップ法による非外科的移植後の繁殖性の低下についても要因を

解明し、手法の改良を進める必要がある。

今日の養豚では、グローバル化の影響を受け、豚熱やアフリカ豚熱など侵入経路の予測できない伝染性疾病に脅かされる状況が継続しており、これらの疾病侵入による貴重な種豚群の消失リスクが高まっている。また一般の養豚農場では、これらのリスクを回避するために、生体による種豚導入を断念する事例も多々発生するようになっている。このような状況を打開するために、ET 技術は有効な手段である。今後も、本研究の成果が様々な活用場面に応用され、技術の普及促進に役立てられるよう尽力するとともに、さらに研究を進め、生産農場での ET 技術実用化を目指す所存である。

謝 辞

本研究論文をまとめるにあたり、ご指導を賜りました山口大学連合獣医学研究科 高木光博博士に心から感謝申し上げます。また、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国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 菊地和弘博士に心から感謝致します。また、御校閲の労をとって下さいました、鳥取大学農学部 共同獣医学科 菱沼貢博士、山口大学連合獣医学研究科 日下部健博士、谷口雅康博士に心から感謝申し上げます。

著者にブタ胚移植技術全般をご教授していただいた元愛知県農業総合試験場の小林章二氏、上田淳一氏に心から感謝申し上げます。

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、様々な助言や、先端技術を教えて頂きました、独立行政法人家畜改良センター 平山祐理氏、瀧下梨英氏、日本大学生物資源学部の三角浩司博士に心より感謝を捧げたいと思います。

本研究実証実験として、ともに研究を進めていただいた佐賀県畜産試験場 本山佐和子氏、脇屋裕一郎博士に心より感謝申し上げます。

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、埼玉県農業技術研究センター 中村嘉之博士に心から感謝申し上げます。

実際のブタの管理、外科移植の補助など多岐にわたって助けて頂きました、愛知県農業総合試験場畜産研究部 大澤啓氏氏、加藤眞也氏、山田道明氏、秋山祐一氏に対し心から感謝致します。また、一緒に研究をしていただいた栗田隆之氏、内倉健造博士、山本るみ子氏に感謝いたします。

本論文に必要なデータを収集するにあたり、農研機構生研支援センターの支援を受けた革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）「超低温保存胚の子宮体部非外科的移植を利用した生産農家への低リスク低コストな高能力種豚導入実証」による助成を受けました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

Almiñana C., Gil M.A., Cuello C., Parrilla I., Caballero I., Sanchez-Osorio J., ... Martinez E.A.

Capability of frozen-thawed boar spermatozoa to sustain pre-implantational embryo development.

Animal Reproduction Science 2010;121:145-151.

Angel M.A., Gil M.A., Cuello C., Sanchez-Osorio J., Gomis J., Parrilla I., ... Martinez E.A. An

earlier uterine environment favors the in vivo development of fresh pig morulae and blastocysts

transferred by a nonsurgical deep-uterine method. *Journal of Reproduction and Development*

2014;60:371-376.

Bazer F.W., Thatcher W.W. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ by the uterine endometrium.

Prostaglandins 1977;14:397-400.

Beebe L.F.S., Cameron R.D., Blackshaw A.W., Higgins A., Nottle M.B. Piglets born from

centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology* 2002;57:2155-2165.

Beebe L.F.S., Cameron R.D., Blackshaw A.W., Keates H.L. Changes to porcine blastocyst

vitrification methods and improved litter size after transfer. *Theriogenology* 2005;64:879-890.

Berthelot F., Martinat-Botté F., Locatelli A., Perreau C., Terqui M. Piglets born after vitrification of

embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 2000;41(2):116-124.

Berthelot F., Martinat-Botté 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.

Berthelot F., Venturi E., Cogne J., Furstoss V., Martinat-Botté F. Development of OPS vitrified pig blastocysts: effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. *Theriogenology* 2007;68:178-185.

Blum-Reckow B., Holtz W. Transfer of porcine embryos after 3 days of in vitro culture. *Journal of Animal Science* 1991;69:3335-3342.

Bortolozzo F.P., Uemoto D.A., Bennemann P.E., Pozzobon M.C., Castagna C.D., Peixoto C.H., ... Wentz I. Influence of time of insemination relative to ovulation and frequency of insemination on gilt fertility. *Theriogenology* 2005;64(9):1956-1962.

Cameron R.D.A., Durack M., Fogarty R., Putra D.K.H., McVeigh J. Practical experience with commercial embryo transfer in pigs. *Australian Veterinary Journal* 1989;66:314-318.

Cameron R.D.A., Beebe L.F.S., Blackshaw A.W., Keates H.L. Farrowing rates and litter size for following transfer of vitrified embryos into commercial swine herd. *Theriogenology* 2004;61:1533-1543.

Chatot C.L., Ziomas C.A., Bavister B.D., Lewis J.L., Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 1989;86:679-688.

Cuello C., Berthelot F., Martinat-Botte F., Guillouet P., Furstoss V., Boisseau C., ... Martinez E.A. Transfer of vitrified blastocysts from one or two superovulated large white hyperprolific donors to meishan recipients: reproductive parameter at day 30 of pregnancy. *Theriogenology* 2004a;61:843-850.

Cuello C., Gil M.A., Parrilla I., Tornel J., Vazquez J.M., Roca J., ... Martinez E.A. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* 2004b;62:1144-1152.

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

Cuello C., Martinez C.A., Nohalez A., Parrilla I., Roca J., Gil M.A., Martinez E.A. Effective vitrification and warming of porcine embryos using a pH-stable, chemically defined medium. *Scientific Reports* 2016;6:33915.

Day B.N. Embryo transfer in swine. *Theriogenology* 1979;11:27-31.

Diehl J.R., Day B.N. Effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on luteal function in swine. *Journal of Animal Science* 1974;39:392-396.

Dobrinsky J.R., Pursel V.G., Long C.R., Johnson L.A. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction* 2000;62:564-570.

Dziuk P. Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. *Journal of Reproduction and Fertility* 1985;33:57-63.

Fujino Y., Nakamura Y., Kobayashi H., Kikuchi K. Relationship between time elapsed after human chorionic gonadotropin administration and developmental stage in porcine embryos collected from prepubertal gilts. *Journal of Reproduction and Development* 2006;52:268 -275.

Fujino Y., Kikuchi K., Nakamura Y., Kobayashi H., Yonemura I., Suzuki M., ... Nagai T. Batchwise assessment of porcine embryos for cryotolerance. *Theriogenology* 2007;67:413-422.

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.

Geisert R.D., Thatcher W.W., Roberts R.M., Bazer F.W. Establishment of pregnancy in the pig: III. Endometrial secretory response to estradiol valerate administered on day 11 of the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 1982;27:957-965.

Gomis J., Cuello C., Sanchez-Osorio J., Gil M.A., Parrilla I., Angel M.A., ... Martinez E.A. Non-surgical deep intrauterine transfer of superfine open pulled straw (SOPS)-vitrified porcine embryos: evaluation of critical steps of the procedure. *Theriogenology* 2012;78:1339-1349.

Hayashi S., Kobayashi K., Mizuno J., Saitoh K., Hirono S. Birth of piglets from frozen embryos. *The Veterinary Record* 1989;125:43-44.

Hazeleger W., Bouwman E.G., Noordhuizen J.P., Kemp B. Effect of superovulation induction on embryonic development on day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 2000;53:1063-1070.

Hirayama Y., Takishita R., Misawa H., Kikuchi K., Misumi K., Egawa S., ... Hashiyada Y. Non-surgical transfer of vitrified porcine embryos using a catheter designed for a proximal site of the uterus. *Animal Science Journal* 2020;91:e13457.

Kashiwazaki N., Ohtani S., Ogawa S. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *The Veterinary Record* 1991;128:256-257.

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.

Kawarasaki T., Enya S., Otsu Y. The effect of estrogen administration during early pregnancy upon the survival of single implanted pig embryos. *Journal of Animal Science* 2012;90:4781-4787.

King T.J., Dobrinsky J.R., Zhu J., Finlayson H.A., Bosma W., Harkness L., ... Wilmut I. Embryo development and establishment of pregnancy after embryo transfer in pigs: coping with limitations in the availability of viable embryos. *Reproduction* 2002;123:507-515.

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

小林章二, 武井真理, 神戸三智雄. 胚のガラス化保存における凍結保護物質・エチレンジリコールの適正濃度. 愛知県農業総合試験場研究報告 2001;33:251-256.

Kvasnitski A.V. Research on interbreed ova transfer in pig. *The Socialist Animal Husbandry Journal* 1950;11:12-15.

Macháty Z., Day B.N., Prather R.S. Development of early porcine embryos in vitro and in vivo. *Biology of Reproduction* 1998;59:451-455.

Martinez E.A., Caamaño J.N., Gil M.A., Rieke A., McCauley T.C., Cantley T.C., ... Day B.N. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 2004;61:137-146.

Martinez E.A., Martinez C.A., Nohalez A., Sanchez-Osorio J., Vazquez J.M., Roca J., ... Cuello C. Nonsurgical deep uterine transfer of vitrified, in vivo-derived, porcine embryos is as effective as the default surgical approach. *Scientific Reports* 2015;5:10587.

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.

Misumi K., Hirayama Y., Egawa S., Yamashita S., Hoshi H., Imai K. Successful production of piglets derived from expanded blastocysts vitrified using a micro volume air cooling method without direct exposure to liquid nitrogen. *Journal of Reproduction and Development* 2013;59:520-524.

三角浩司, 江川紗智子, 御澤弘靖, 平山祐理. ブタガラス化保存胚盤胞を用いた非外科的移植方法の改善. 日本養豚学会会誌, 2020;57:129-137.

Mito T., Yoshioka K., Noguchi M., Yamashita S., Misumi K., Hoshi T., Hoshi H. Birth of piglets from in vitro-produced porcine blastocysts vitrified and warmed in a chemically defined medium. *Theriogenology* 2015;84:1314-1320.

Nakazawa Y., Misawa H., Fujino Y., Tajima S., Misumi K., Ueda J...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.

Noguchi M., Kashiwai S., Itoh S., Okumura H., Kure K., Suzuki T., Yoshioka K. Reproductive hormone profiles in sows on estrus synchronization using estradiol dipropionate and prostaglandin F_{2α}-analogue and the reproductive performance in female pigs on commercial farms. *Journal of Veterinary Medical Science* 2013;75:343-348.

小栗紀彦. 豚胚の移植ならびに保存における最近の進歩. 日本養豚学会会誌 1990;27:80-86.

O'Leary S., Jasper M.J., Robertson S.A., Armstrong D.T. Seminal plasma regulates ovarian progesterone production, leukocyte recruitment and follicular cell responses in the pig. *Reproduction* 2006;132:147-158.

大曲秀明, 三角浩司, 宮下美保, 永渕成樹, 御澤弘靖, 山下祥子, …吉岡耕治. 種豚から
個体ごとに採取した胚盤胞期および拡張胚盤胞期ガラス化保存胚の胚移植による子豚生産
効率. 日本養豚学会会誌 2015;52:1-7.

Polge C., Rowson L.E., Chang M.C. 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.

Polge C., Day B.N. Pregnancy following non-surgical egg transfer in pigs. *The Veterinay Record*
1968;82:712

Pollard J.W., Leibo S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994;41:101–
106.

Pope W.F., Lawyer M.S., Nara B.S., First N.L. Effect of asynchronous super induction on embryo
survival and range of blastocyst development in swine. *Biology of Reproduction* 1986;35:133-137.

Robertson S.A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and
pigs. *Journal of Animal Science* 2007;85:E36-44.

Sakagami N., Nishida K., Misumi K., Hirayama Y., Yamashita S., Hoshi H., … Yoshioka K. The
relationship between oxygen consumption rate and viability of in vivo-derived pig embryos vitrified
by the micro volume air cooling method. *Animal Reproduction Science* 2016;164:40-46.

Soede N.M., Nissen A.K., Kemp B. Timing of insemination relative to ovulation in pigs: effects on sex ratio of offspring. *Theriogenology* 2000;53:1003-1011.

瀧下梨英, 平山祐理, 橋谷田豊. シリンジ内加温・希釈したブタガラス化胚による産子生産. 日本胚移植学会雑誌 2019;41:25-30.

瀧下梨英, 平山祐理, 橋谷田豊. ブタガラス化胚のシリンジ内加温・希釈液の温度および量の検討. 日本養豚学会会誌 2020;57:138-146.

Ushijima H., Yoshioka H., Esaki 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.

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.

Wallenhorst S., Holtz W. Transfer of pig embryos to different uterine sites. *Journal of Animal Science* 1999;77:2327-2329.

Weitze K.F. :1991, Long-term storage of extended boar semen. In Johson, L.A. & Rath, D. (Eds.), Boar Semen Preservation II, *Proceedings Second International Conference on Boar Semen Preservation*. pp.231-253. Berlin and Hamburg: Paul Parey Scientific Publishers.

Wilde M.H., Xie S., Day M.L., Pope W.F. Survival of small and large littermate blastocysts in swine after synchronous and asynchronous transfer procedures. *Theriogenology* 1988;30:1069-1074.