

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 平山 祐理

題 目：ブタ胚採取のための効率的な排卵同期化および非外科的移植の研究

## 論文要旨：

本研究では、遺伝資源の保存・再生および疾病伝播リスクの少ない種豚流通を可能とするため、胚移植技術を養豚産業で利用可能な実用技術として確立することを目的とし、排卵同期化法ならびに非外科的移植用カテーテルの開発を行った。

まず、第1章では、胚採取にかかる実用的な排卵同期化方法を確立するため、持続性エストラジオール製剤の投与により偽妊娠誘起した豚からの胚採取を目的とした排卵同期化法の有効性を検討した。供胚豚にエストラジオールプロピオン酸エステル(EDP)を単回投与して偽妊娠を誘起し、EDP投与から15、20および25日後にプロスタグランジン F2 $\alpha$ 類縁体(PGF2 $\alpha$ 類縁体)を投与する実験区を設定した。これらの供胚豚にウマ血清性ゴナドトロピン(eCG)およびヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を投与した後に人工授精し、その後に採胚して、従来法である人工流産法による排卵同期化法およびその採胚成績と比較した。この結果、平均正常胚数は実験区で9.7 $\pm$ 1.9、12.3 $\pm$ 0.9個、対照区とした人工流産区で10.8 $\pm$ 2.2個であり、いずれの実験区間にも有意な差は認められなかった。黄体数および胚の発生ステージなど他の採胚成績でも実験区間で有意な差は認められず、このことから本研究による排卵同期化法は人工流産法に替わる手段となり得ることが判明した。この方法は、EDPの単回投与のみでPGF2 $\alpha$ 類縁体に反応する黄体の延長を誘起可能なため、効率がよく、かつ動物福祉に適していると想定された。

次に、第2章では、偽妊娠による採胚法の適用期間を拡大し、より利便性を高めるため、偽妊娠誘起された供胚豚の偽妊娠期間の短縮を検討することとした。供胚豚に安息香酸エストラジオール(EB)を1~2回またはEDPを1回投与して偽妊娠を誘起し、これらのエストロゲン製剤の投与から10日後に先述の実験と同様にPGF2 $\alpha$ 類縁体とそれに続くホルモン投与および人工授精を経て採胚し、EDP投与15日後に同様の処置を経て採胚した実験区と比較した。この結果、黄体数、正常胚数および胚の発生ステージ等の採胚成績において実験区間で有意な差は認められず、このことからEBまたはEDPの投与により偽妊娠誘起されたブタに、これらのエストロゲン製剤の投与から10日後にPGF2 $\alpha$ 類縁体およびそれに続くeCG、およびhCGの投与によって、排卵同期化および胚採取が可能であることを示した。本研究はEBの単回投与によって偽妊娠誘起されたブタからの胚採取に成功した最初の報告である。EBは動物用製剤として入手可能であること、休業期間がEDPより短いと予想されることから、養豚産業における適用に適していると考えられる。以上のことから、本研究の成果は、実用的な排卵同期化法として、養豚産業界における効率的で利便性の高い胚移植を可能にすることを示唆し

(別紙様式第3号)

た。

さらに、第3章では、第1章および第2章で確立された採胚法を用い、さらに簡単かつ安全に胚を非外科的移植することを目的とした。そのため、このことを可能とする新たなカテーテルを開発するとともに、このカテーテルの操作性等を検証するため、非外科的移植器具の操作に熟練しているオペレーターと経験が少なく初心者と想定したオペレーターによる未経産豚への移植カテーテルの挿入試験を実施した。移植カテーテルは、適度なしなりを付与された柔軟な素材で構成され、外管となるガイドカテーテルに内管としての柔らかいインジェクターが内蔵されており、子宮浅部(子宮体部および子宮角分岐部)への移植を目的に作製された。この結果、挿入に要した時間は熟練者と初心者でそれぞれ  $4:09 \pm 0:38$  および  $4:06 \pm 1:04$ (分:秒)であり、オペレーターの経験の有無による違いは見られなかった。このことから、本研究において新しく開発した非外科的胚移植用カテーテルは、移植者に特別なトレーニングを必要とせず、容易に受胚豚へ挿入することが可能であることが判明した。最後に、開発した移植カテーテルの移植成績を検証するため、MVAC法でガラス化保存したブタ胚を受胚豚1頭あたり13~16個移植し、一般的に行われている外科的移植と比較した。この結果、外科的移植、非外科的移植ともに分娩率は66.7%(4/6頭)であり、一腹あたり生存産子数は外科移植、非外科的移植においてそれぞれ  $5.8 \pm 0.6$  および  $3.5 \pm 1.3$  頭、子豚生産率はそれぞれ25.8%および15.4%であった。すべての移植項目において有意差は見られなかった。このことから、開発した移植カテーテルを用いてガラス化保存したブタ胚を子宮浅部へ移植し、高い分娩率及び子豚生産率が得られることが明らかになった。

これらの結果より、本研究で実証した供胚豚の排卵同期化法および開発した非外科的移植用カテーテルによる子宮浅部へのガラス化胚移植法は、胚移植技術を養豚産業の現場で実施できる実用技術とすることに貢献すると考えられる。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	平山 祐理
審査委員	主査：山口大学 教授 高木 光博
	副査：鳥取大学 教授 菱沼 貢
	副査：山口大学 教授 日下部 健
	副査：山口大学 准教授 谷口 雅康
	副査：農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 ユニット長 菊地 和弘
題目	ブタ胚採取のための効率的な排卵同期化および非外科的移植の研究
審査結果の要旨：	
<p>本研究では、遺伝資源の保存・再生および疾病伝播リスクの少ない種豚流通を可能とするため、胚移植技術を養豚産業で利用可能な実用技術の確立を目的とし、排卵同期化法を検証し（第1・2章）、実際に非外科的移植用カテーテルの開発を行い同期化法の効果について検証した（第3章）。</p> <p>まず、第1章では、胚採取にかかる実用的な排卵同期化方法を確立するため、持続性エストラジオール製剤の投与により偽妊娠誘起した豚からの胚採取を目的とした排卵同期化法の有効性を検討した。供胚豚にエストラジオールプロピオン酸エステル(EDP)を単回投与して偽妊娠を誘起し、EDP投与から15、20および25日後にプロスタグランジン F2<math>\alpha</math>類縁体(PGF2<math>\alpha</math>類縁体)を投与する実験区を設定した。これらの供胚豚にウマ血清性ゴナドトロピン(eCG)およびヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を投与した後に人工授精し、その後に採胚して、従来法である人工流産法による排卵同期化法および採胚成績と比較した。この結果、平均正常胚数は実験区で9.7<math>\pm</math>1.9、12.3<math>\pm</math>0.9個、対照区とした人工流産区で10.8<math>\pm</math>2.2個であり、いずれの実験区間にも有意な差は認められなかった。黄体数および胚の発生ステージなど他の採胚成績でも実験区間で有意な差は認められず、このことから本研究による排卵同期化法は人工流産法に替わる手段となり得ることが判明した。この方法は、EDPの単回投与のみでPGF2<math>\alpha</math>類縁体に反応する黄体の延長を誘起可能なため、効率がよく、かつ動物福祉に適していると想定された。</p> <p>次に、第2章では、偽妊娠による採胚法の適用期間を拡大し、より利便性を高めるため、</p>	

2,000字以内

偽妊娠誘起された供胚豚の偽妊娠期間の短縮を検討することとした。供胚豚に安息香酸エストラジオール(EB)を1~2回またはEDPを1回投与して偽妊娠を誘起し、これらのエストロゲン製剤の投与から10日後に先述の実験と同様にPGF2 $\alpha$ 類縁体とそれに続くホルモン投与および人工授精を経て採胚し、EDP投与15日後に同様の処置を経て採胚した実験区と比較した。この結果、黄体数、正常胚数および胚の発生ステージ等の採胚成績において実験区間で有意な差は認められず、このことからEBまたはEDPの投与により偽妊娠誘起されたブタに、これらのエストロゲン製剤の投与から10日後にF2 $\alpha$ 類縁体およびそれに続くeCG、およびhCGの投与によって、排卵同期化および胚採取が可能であることを示した。本研究はEBの単回投与によって偽妊娠誘起されたブタからの胚採取に成功した最初の報告である。EBは動物用製剤として入手可能であること、休業期間がEDPより短いと予想されることから、養豚産業における適用に適していると考えられる。以上のことから、本研究の成果は、実用的な排卵同期化法として、養豚産業界における効率的で利便性の高い胚移植技術を可能にすることを示唆した。

さらに、第3章では、第1章および第2章で確立された採胚法を用い、さらに簡単かつ安全に胚を非外科的移植することを目的とした。そのため、このことを可能とする新たなカテーテルを開発するとともに、このカテーテルの操作性等を検証するため、非外科的移植器具の操作に熟練しているオペレーターと初心者オペレーターによる未經産豚への移植カテーテルの挿入試験を実施した。移植カテーテルは、適度なしなりを付与された柔軟な素材で構成され、外管となるガイドカテーテルに内管としての柔らかいインジェクターが内蔵されており、子宮浅部(子宮体部および子宮角分岐部)への移植を目的に作製された。この結果、挿入に要した時間は熟練者と初心者でそれぞれ4:09  $\pm$  0:38 および4:06  $\pm$  1:04(分:秒)であり、オペレーターの経験の有無による違いは見られなかった。このことから、本研究において新しく開発した非外科的胚移植用カテーテルは、移植者に特別なトレーニングを必要とせず、簡単に受胚豚へ挿入することが可能であることが判明した。最後に、開発した移植カテーテルの移植成績を検証するため、MVAC法でガラス化保存したブタ胚を受胚豚1頭あたり13~16個移植し、一般的に行われている外科的移植と比較した。この結果、外科的移植、非外科的移植ともに分娩率は66.7%(4/6頭)であり、一腹あたり生存産子数は外科的移植、非外科的移植においてそれぞれ5.8 $\pm$ 0.6 および3.5 $\pm$ 1.3頭、子豚生産率はそれぞれ25.8%および15.4%であった。すべての移植項目において有意差は見られなかった。このことから、開発した移植カテーテルを用いてガラス化保存したブタ胚を子宮浅部へ移植し、高い分娩率及び子豚生産率が得られることが明らかになった。

本研究で実証した供胚豚の排卵同期化法および開発した非外科的移植用カテーテルによる子宮浅部へのガラス化胚移植法は、胚移植技術を養豚産業の現場で実施できる実用技術であることが報告された。以上により、本論文は博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしいと判断された。