

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

山口大学大学院連合獣医学研究科

平山 祐理

2021 年 3 月

要旨	P. 4
緒論	P. 7
養豚産業における胚移植に関する最近の動向	P. 7
移植用胚の採取にかかる排卵同期化と非外科的移植における技術的課題	P. 8
研究の目的	P. 10
第1章 エストラジオールプロピオン酸エステル(EDP)投与により偽妊娠誘 起した雌豚の胚採取を目的とした排卵同期化	P. 11
緒言	P. 11
材料および方法	P. 13
結果	P. 16
考察	P. 23
小括	P. 26
第2章 エストラジオール安息香酸塩(EB)またはEDPの投与による雌豚の 短期偽妊娠の誘起と胚採取のための排卵同期化	P. 27
緒言	P. 27
材料および方法	P. 29
結果	P. 31
考察	P. 36
小括	P. 39

第3章 子宮浅部への移植を目的に開発されたカテーテルを用いたブタガラス	
化胚の非外科的移植	P. 41
緒言	P. 41
材料および方法	P. 43
結果	P. 49
考察	P. 60
小括	P. 63
総括	P. 65
謝辞	P. 69
参考文献	P. 71

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 $F_{2\alpha}$ 類縁体(PGF $_{2\alpha}$ 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 ± 1.9 、 12.3 ± 0.9 個、対照区とした人工流産区で 10.8 ± 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PGF $_{2\alpha}$ 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日後に前述の実験と同様にPGF_{2α}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PGF_{2α}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、休薬期間が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、容易に受胎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胎豚 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 ± 0.6 および 3.5 ± 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胎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。

緒論

養豚産業における胚移植に関する最近の動向

1950年に胚移植による最初のブタ産子の誕生が報告(Kvasnitsky 1950)されて以来、ブタにおける胚移植は主に試験研究を目的として実施されてきた(Hancock & Hovell 1962; Polge 1982)。一方、オーエスキー病の制御に胚移植が有効であることが報告され(Bolin et al. 1981; Wrathall 1995)、他の伝染性疾病の制御にも胚移植が有効である可能性が国際胚技術学会により示されたことから、注目されるようになってきた(Subcommittee of the International Embryo Transfer Society 2009)。さらに、実際にオーエスキー病発生農場の清浄化に胚移植が利用された(三角ら 2014)。また、近年ブタ胚のガラス化による超低温保存技術が発達し(Berthelot et al. 2000; Dobrinsky 2002; Ushijima et al. 2004; Fujino et al. 2008; Misumi et al. 2013)、遺伝資源保存の手法として生体ではなく胚を保存することが選択できるようになったこと、さらに移植の機会に合わせて胚を長期に保存しておけるようになったことから胚移植の利便性が飛躍的に向上した。

一方、近年、世界的な感染症の流行が養豚産業界で問題となっており、特に口蹄疫、豚熱、アフリカ豚熱の拡大は多くの国々において養豚産業を脅かしている。わが国でも2010年の口蹄疫、2018年の豚熱の国内への侵入により多くの豚が殺処分され、養豚産業界が受けた衝撃は大きい。さらに、グローバル化に伴い、侵入経路が予測できないことから、これらの疾病については日本だけでなく世界の養豚産業が常に脅かされている。このような情勢に対処するため、貴重・希少な種豚遺伝資源を胚として超低温保存しておくことで遺伝資源の保存を行うこ

との重要性が再認識されている。また、このような疾病の流行下であっても、農場内に新しい種豚を導入する際に胚移植を用いることにより、生体での導入に比べ疾病伝搬リスクを大幅に減少させることが可能であるとの共通認識が醸成されるに至っている。

しかし、胚移植技術を実用技術として養豚産業界で利用するためには、保存に適した発生段階の胚を確実に採取するための供胚豚の効率的な排卵同期化法の確立が必要であり、さらに特別な設備や技術が必要となる外科移植ではなく非外科的に移植できる器具や技術の開発が不可欠となっている。

移植用胚の採取にかかる排卵同期化と非外科的移植における技術的課題

ブタ胚は低温感受性が高いことから超低温保存が難しいとされてきたが、近年発達してきたガラス化技術により超低温保存が可能となった。ガラス化とは、胚を高濃度の凍結保護剤で短時間処理し、直ちに -196°C の液体窒素に投入し超急速冷却保存する方法で、細胞質内部に氷晶を形成せず無結晶のガラス状態にすることで、胚を無傷のまま超低温保存することが可能である。また、これまでの研究により、桑実胚よりも胚盤胞や拡張胚盤胞といった発生の進んだステージの胚の方が、ガラス化後に加温した際の生存率が高いことが知られている(Cuello et al. 2004; Fujino et al. 2008)。このことから、疾病制御に不可欠な無傷の透明帯を持ち、かつ発生の進んだ拡張胚盤胞を高率で採取することが重要であり、このために排卵同期化(以下、同期化)を行う必要が生じる。なお、ブタの挙動や陰部の状態が変化する「発情」を同期化の指標とするのではなく、限られた発生ステージの胚を採取するための「排卵」を同期化するのが、本研究

の目的である。実用的な胚採取にかかる同期化法の条件としては、同期化にかかる労力および経費が少ないこと、同期化の成功率が高いこと、排卵日および胚採取日を任意に設定するための同期化可能範囲が広いこと、動物への負担の少ないこと、および簡単に実施可能であること(動物薬としての入手の簡易さ等)などが挙げられる。しかし、これらを網羅する方法は確立されていない。

ブタにおける非外科的移植は1968年に最初の妊娠例が報告されて以来(Polge & Day 1968)、多くの試みが行われた(Reichenbach et al. 1993; Galvin et al. 1994; Hazeleger & Kemp 1994; Li et al. 1996; Yonemura et al. 1996)。しかしブタの子宮は生来長く曲がりくねっていることから、子宮内に確実に胚を移植し、高い受胎・分娩率が得られる方法の確立は困難であった。しかし近年、子宮深部へ非外科的に胚を移植可能な器具の開発により高い分娩率が得られ(Martinez et al. 2004)、この報告以降、ブタの非外科的移植は子宮深部への移植が一般的となり、受胎・分娩率の向上が実現した(Angel et al. 2014; Martinez et al. 2014)。しかし、この方法は、子宮深部への移植のため挿入長が大きくそのため子宮への侵襲が大きいこと、移植に熟練した技術が必要なこと、さらに移植に多くの胚を必要とする等の問題があった。そのため、近年、衛生的で子宮への侵襲が少ない子宮体部へのガラス化胚移植が行われ子豚が得られた(三角ら 2020)ことから、子宮体部への移植法が注目されている。しかし養豚産業の中で胚移植を実用的に利用するには、移植器の挿入のしやすさ、受胚豚への安全性の面で課題が残った。

研究の目的

本研究の目的は、遺伝資源の保存・再生および疾病伝搬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することである。特に数々の伝染性疾病が世界的に拡大する現在、当技術の需要は非常に高まっている。

このことから第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。

さらに第2章では、胚採取のさらなる効率化を目的とし、偽妊娠期間を短縮する方法を検討した。

最後に第3章では、胚移植を養豚農場で実施するにあたり必要であった簡単かつ安全に胚を非外科的移植可能な器具を開発し、これを用いた超低温保存ブタ胚の移植により効果を検証した。

第1章 エストラジオールプロピオン酸エステル(EDP)投与により偽妊娠誘起した雌豚の胚採取を目的とした排卵同期化

1. 緒言

胚移植技術を用いたブタの疾病制御については、疾病に感染した雌豚から採取した胚をトリプシン処理して受胚豚へ移植することで非感染の子豚が得られることが報告されており (James et al. 1983; Wrathall 1995)、このように適切に病原体、特にウイルスの除去または不活化する処理を行うことで疾病制御に効果があることが国際胚技術学会により周知されている (Stringfellow, 2009)。また、近年、ブタ胚の衛生的な超低温保存法が確立され (Beebe et al. 2011; Men et al. 2011; Misumi et al. 2013)、各種細菌等の病原体が混入している恐れのある液体窒素に胚を接触させないことで胚の清浄性を確保し、胚移植の実用性を高めている。胚を採取するにあたっては、超低温保存に適した発生ステージの胚を計画通りに採取するため、あらかじめ供胚豚に排卵同期化を施す必要がある。これまでに複数の発情または排卵同期化法が報告されている。例えば、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) およびその後の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) の投与によって誘起される人工流産法 (Guthrie & Polge 1978; Love & Grey 1993)、合成プロゲステロンであるアルトレノゲストの特定期間の経口投与 (Martinat-Botte et al. 1985; White et al. 1988) または黄体期の豚への $PGF_{2\alpha}$ の頻回 (6~12回) 投与 (Estill et al. 1993; Iwamura et al. 2001) である。しかし、これらの方法は次に述べる理由から不完全である。人工流産法は、人工授精後 12~40 日という長期間に

わたって $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与による黄体退行とそれに続く排卵時期を調節可能とする、すなわち、同期化の目的において利便性の高さから 1980 年代はじめから使用されてきたが (Polge 1982; Kashiwazaki 1998)、一方で、供胚豚に流産を強要することから動物福祉への配慮が懸念されてきた。また、アルトレノゲストの使用はカナダ、アメリカ、オーストラリアおよび EU など海外では認められているものの日本では承認されていない。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ の 6~12 回の投与は費用、時間および多大な労力を必要とする。これらのことから、効果的にブタ胚を採取できるようにするためには、これらの短所を克服する新規の発情・排卵同期法が必要である。

近年、エストラジオールジプロピオン酸エステル (EDP) の単回投与により機能的な黄体が退行することなく持続する状態、すなわち偽妊娠を誘起することが可能であり、偽妊娠を誘起されたブタに $\text{PGF}_{2\alpha}$ を 2 回投与することによって発情同期化が可能であることが報告された (Noguchi et al. 2010)。EDP は持続性卵胞ホルモン製剤であり、産婦人科領域の治療薬として市販されている。EDP 投与後 20~36 日後の範囲の偽妊娠豚に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を投与することで、5~6 日後に発情が誘起される。つまり、このようにして偽妊娠を誘起することは、費用対効果が高く、労働投入量が少なく、さらに成功率が高い (Noguchi et al. 2010, 2011, 2013)。さらに、妊娠豚において胎子を流産させることがないので動物福祉においても歓迎すべき成果である。しかし、この方法では発情から次の発情までの間隔が約 35~50 日と長いことから (Noguchi et al. 2010, 2011, 2013)、飼養コストがかかることになる。また、EDP 投与後 20 日前に $\text{PGF}_{2\alpha}$ と追加のホルモン処理を行うことで排卵を誘導できるか、また、供胚豚からガラス化に適した発生段階にある胚を採取するためにこの方法を適用できるかどうかを研究した報告

はない。

そこで、この方法の供胚豚への適用の可否および適用可能な偽妊娠期間の範囲を調査することを目的として、偽妊娠後、特定の期間を経た複数の時点でホルモン投与を実施することにより採取された胚と、人工流産後に採取された胚を比較することで、EDP 投与による偽妊娠豚を用いた排卵同期化が胚採取に有用であるかどうかを検討した。

2. 材料および方法

1) 供胚豚

実験は、独立行政法人家畜改良センター動物実験実施規程に基づく動物実験委員会の承認を経て行った。

供胚豚として 40 頭のデュロック種雌豚を用いた(月齢 9~25 の未経産豚 37 頭および 32~43 の経産豚 3 頭)。供胚豚は 1 日 2 回、繁殖豚に必要な量を充足する飼料を給餌され、自由飲水とした。

2) 交配雄豚および精液処理

5 頭のデュロック種雄豚から採取した精液を人工授精に用いた。採取精液はモデナ溶液(Weitze 1991)で精子数 $7 \times 10^7 / \text{ml}$ に希釈し、 15°C で 6~144 時間保存した。1 回の人工授精には上記の希釈精液 80 ml (精子数 = 5.6×10^9) を用いた。

3) 排卵同期化方法

Noguchi et al. (2011) の手法に準じ、30 頭の供胚豚に発情開始日から 10 また

は 11 日目に EDP(オバホルモンデポ、アスカ製薬、東京)20 mg を筋肉内注射した。EDP 投与日を 0 日 (Day 0) として 15、20 または 25 日目のいずれかから 24 時間間隔で 2 回、PGF_{2α} として PGF_{2α} 類縁体であるクロプロステノール 0.276 mg(Planate、MSD アニマルヘルス、東京)(以下、PGF_{2α} 類縁体)を筋肉内投与した(それぞれ D15、D20 および D25 と表記。各 10 頭)。残りの 10 頭には、対照区として既存の方法(Guthrie & Polge 1978; Love & Grey 1993)を用いた。すなわち、発情開始から終了まで 1 日 2 回、合計 2~4 回、2)と同様の精液を用いて人工授精し、初回人工授精から 23~39 日後に PGF_{2α} 類縁体を 2 回投与して流産を誘発させた。その後、すべての供胚豚に 2 回目の PGF_{2α} 類縁体投与と同時に 1,000 IU の eCG(Serotropin ; あすか製薬、東京)を投与し、続いて eCG 投与の 72 時間後に 500 IU の hCG(Puberogen 1,500IU ; Novartis Animal Health、東京)を投与した。hCG 投与後 24、31~41 および 48 時間後に 2)と同様の精液を用いて人工授精を行った(図 1)。

4) 胚採取方法

胚採取は、hCG 投与後 6 または 7 日目に外科的に実施した。供胚豚への麻酔は、ペントバルビタール 1,296 mg(ソムノペンチル ; 共立製薬、東京)の静脈内投与により導入し、3~4%イソフルラン(イソフルラン ; ファイザー、東京)により維持した。完全な透明帯に覆われた胚盤胞の採取に適した採取時期を検証するため、胚採取は hCG 投与後 6 または 7 日目に実施した。hCG 投与後 6 日目の胚採取では、PGF_{2α} 類縁体、eCG および hCG の投与を午前 9 時に、7 日目は午後 4 時に行った。全身麻酔下の供胚豚の正中線を切開し、卵巣と子宮を露出させ、卵巣

上の黄体数を計測した。子宮角の分岐部から約 10 cm のところに小さな切開穴を開け、切開部から挿入したカテーテル(バルーンカテーテル 多孔式 16Fr ; 富士平工業、東京)を介して、子宮内容物を M2 液(Quinn et al. 1982)で灌流し、胚を回収した。灌流は左右の片子宮角ずつ、両方行った。

5) 胚の評価

採取した胚は、国際胚技術学会(Robertson & Nelson 2009; Wright 2009)の基準に従い、品質と発生ステージを評価した。透明帯に精子の付着が見られないものを未受精卵、桑実胚に達していない発生停止胚および退行胚を変性卵に分類した。適切な発生ステージ(桑実胚以上の発生ステージ)かつ形態学的な品質評価で excellent、good(コード 1 : 形状、サイズ、色および密度が均一で不規則性が軽微な胚)または fair(コード 2 : 形状、サイズ、色および密度に中程度の不規則性が見られる胚)と判定された胚を正常とし、これらの胚は発生ステージを統計解析するため、Martinez ら(2014)の方法に従い、品質および発生ステージを次のようにスコア化した。1, 桑実胚; 2, 初期胚盤胞(目に見える胚盤胞腔を持つ初期の胚盤胞); 3, 胚盤胞(よく判別できる胚盤胞腔、内部細胞塊、および完全に識別可能な栄養幕細胞を持つ胚盤胞); 4, 拡張胚盤胞(全体の直径が増加し、透明帯が薄くなった胚盤胞); 5, 脱出中または脱出胚盤胞(透明帯が破れた胚盤胞、または透明帯がない胚盤胞)。これらのスコアは、1 頭の供胚豚から得られたすべての胚をスコア付けして平均化し、供胚豚 1 頭ごとに算出した。

6) ホルモン測定

測定に使用する供胚豚の血液は、2回のPGF_{2α}類縁体投与の直前に頸静脈から約10 ml採取した。血液サンプルは遠心分離により血漿を採取し、分析まで-20℃で保存した。血漿中のプロゲステロンおよびエストラジオール-17β濃度は、Noguchi et al. (2007)の報告に基づき、時間分解蛍光免疫測定法を用いて測定した(DELFI A Estradiol and Progesterone Kits; PerkinElmer America, Massachusetts)。発情がなく、PGF_{2α}類縁体投与直前の血漿中プロゲステロン濃度が1 ng/ml以上であることを偽妊娠と定義した。

7) 統計処理

偽妊娠頭数、卵子/胚採取頭数および正常胚採取頭数はカイ二乗検定を行った。黄体、採取した卵子/胚、正常胚の数、および胚発生ステージスコアは、分散分析(ANOVA)を用いて検定し、有意差が認められた場合にはTukeyの多重検定を行った。プロゲステロンおよびエストラジオール-17βの血漿中濃度は、相互作用を考慮して検定するために反復測定分散分析を行い、有意差が認められた場合にはTukeyの多重検定を行った。すべての統計解析はEasy R(自治医科大学附属さいたま医療センター、<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmedEN.html>、埼玉)を用いて行った(神田2013)。P値が0.05未満だった場合を有意とした。

3. 結果

偽妊娠が誘起されたブタ、卵子/胚を採取できたブタおよび正常胚を採取できたブタの割合は、各実験区間で有意な差は認められなかった。D20区の1頭は黄

体が無く、D25 区の 1 頭は子宮蓄膿症のため卵子・胚が採取できなかった。黄体数および卵子/胚の数は、これらのブタを除いて計数した。また、D15 区の 1 頭および対照区の 2 頭からは正常胚が採取できなかったため、正常胚数のデータからはこれらのブタを除いた。黄体、採取した卵子/胚、および正常胚の数において、実験区間で有意な差は認められなかった(表 1)。

卵子/胚が採取できたブタうち、hCG 投与 6 日後に胚採取した頭数は D15、D20、D25 および対照区でそれぞれ 3、1、3 および 1 頭であり、hCG 投与 7 日後に胚採取した頭数は 5、6、5 および 7 頭であった。hCG 投与 6 日後の胚の発生ステージスコアの統計解析は、データ数が少ないため実施しなかった。7 日後の胚発生ステージは、実験区間で有意な差は認められなかった(図 2)。

2 回の PGF_{2α} 類縁体処理の直前に採取した偽妊娠豚の血漿中プロゲステロンおよびエストラジオール-17β の濃度は、卵子/胚が採取できたブタのみを集計に用いた。2 回目の PGF_{2α} 類縁体投与直前の血漿中プロゲステロンの平均濃度は、1 回目と比較して有意に低かった(P < 0.05)が、偽妊娠を誘起した 3 つの実験区間に有意な差は認められなかった(図 3)。血漿中エストラジオール-17β の平均濃度は、すべての偽妊娠実験区で 1 回目の PGF_{2α} 類縁体投与直前と 2 回目との間で変化が見られなかったが、D15 の血漿中エストラジオール-17β 濃度は 1 回目、2 回目の両方で D25 よりも有意に高かった(図 4)。

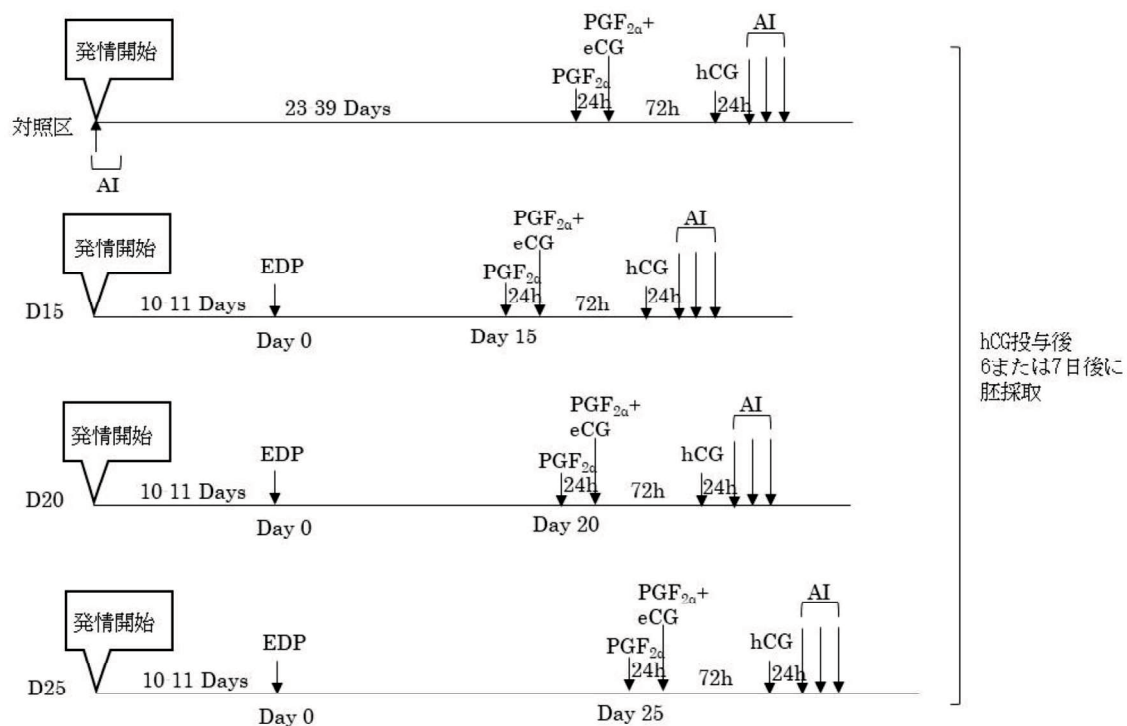


図1. エストラジオールプロピオン酸エステル投与から15、20、および25日後にプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ を投与した実験区および対照区の処置法の要約

EDP: エストラジオールプロピオン酸エステル, $PGF_{2\alpha}$: $PGF_{2\alpha}$ 類縁体としてクロプロステノール

eCG: ウマ血清性ゴナドトロピン, hCG: ヒト絨毛性ゴナドトロピン

AI: 人工授精 D15、D20、およびD25の表記は、それぞれ、偽妊娠誘起後15、20、および25日目に $PGF_{2\alpha}$ 類縁体を投与したことを示す。

EDPは、発情開始から10または11日後に20 mgを投与した。 $PGF_{2\alpha}$ はクロプロステノールとして各0.276 mgを24時間間隔で2回投与した。eCG1,000 IUは2回目の $PGF_{2\alpha}$ 投与と同時に、hCG500 IUはeCG投与から72h後に、それぞれ投与した。人工授精はhCG投与後24、31~41および48時間後にそれぞれ実施した(合計3回)

表 1. EDP 投与実験区および対照区における偽妊娠誘起および胚採取の結果

実験区	頭数	偽妊娠 頭数 (%)	卵子/胚採 取頭数 (%)	正常胚 採取頭数 (%)	黄体数 [†]	卵子/胚数 [†]	正常胚数 [†]
D15	10	9 (90.0)	9 (90.0)	8 (80.0)	15.9±1.0	15.6±1.1	11.9±1.7
D20	10	8 (80.0)	7 (70.0)	7 (70.0)	15.1±1.1	13.4±1.3	9.7±1.9
D25	10	9 (90.0)	8 (80.0)	8 (80.0)	14.9±1.4	14.5±1.2	12.3±0.9
対照区	10	-	10 (100.0)	8 (80.0)	15.3±1.2	14.7±1.3	10.8±2.2

[†]平均 ± 標準誤差

注：国際胚技術学会の基準 (Robertson & Nelson 2009; Wright 2009) に従い、形態学的に優れている (excellent)、良い (good)、または普通 (fair) と評価され、かつ適切な発生段階 (桑実胚以上) の胚を正常胚とした。

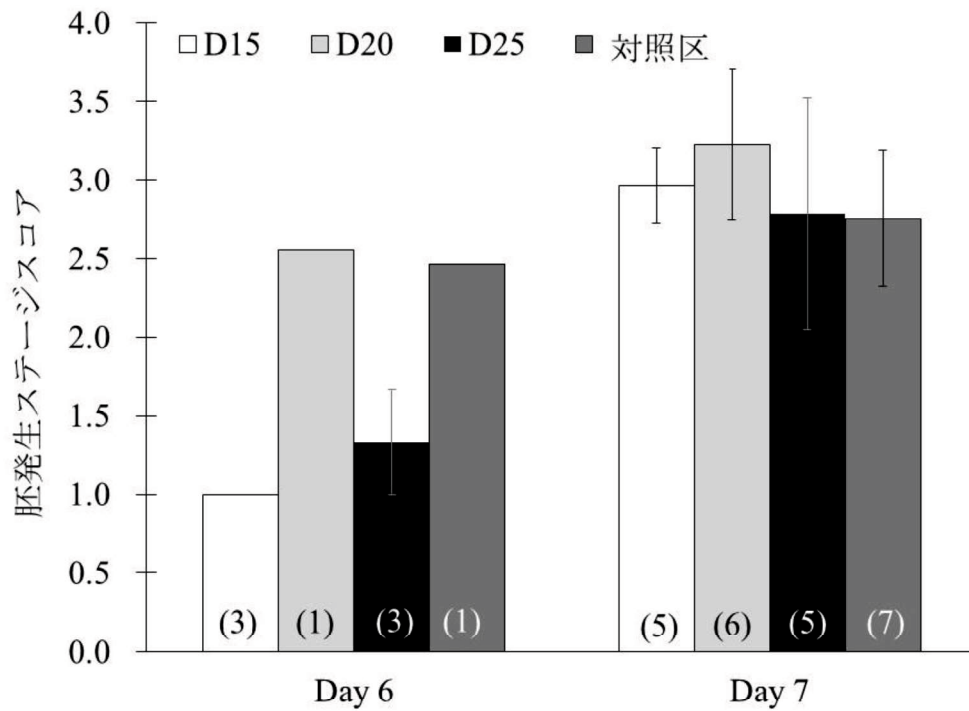


図2. hCG 投与の6日後および7日後に胚採取した各実験区の胚発生ステージスコア

胚は、国際胚技術学会の基準(Robertson & Nelson 2009; Wright 2009)に従い品質評価し、形態学的に優れている(excellent)、良い(good)、または普通(fair)と評価され、かつ適切な発生段階(桑実胚以上)の胚を正常胚とし、胚発生ステージスコアを算出した。発生ステージは以下の分類に従い、1頭の供胚豚から得られたすべての胚をスコア付けして平均化し、供胚豚1頭ごとに算出し、実験区内で平均化した。1, 桑実胚 2, 初期胚盤胞 3, 胚盤胞 4, 拡張胚盤胞 5, 脱出中または脱出胚盤胞

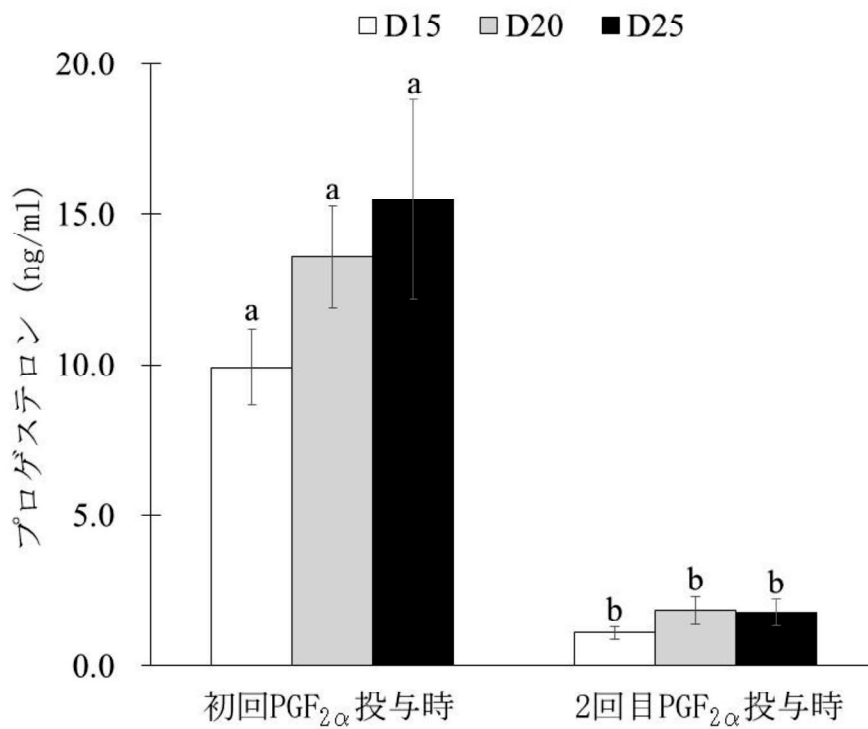


図 3. PGF_{2α} 類縁体投与直前の偽妊娠豚における血漿中プロゲステロン濃度

PGF_{2α} : クロプロステノール

^{a-b} 有意差あり (P < 0.05)

D15、D20 および D25 でそれぞれ 9、7 および 8 頭の供試豚のデータに基づく。

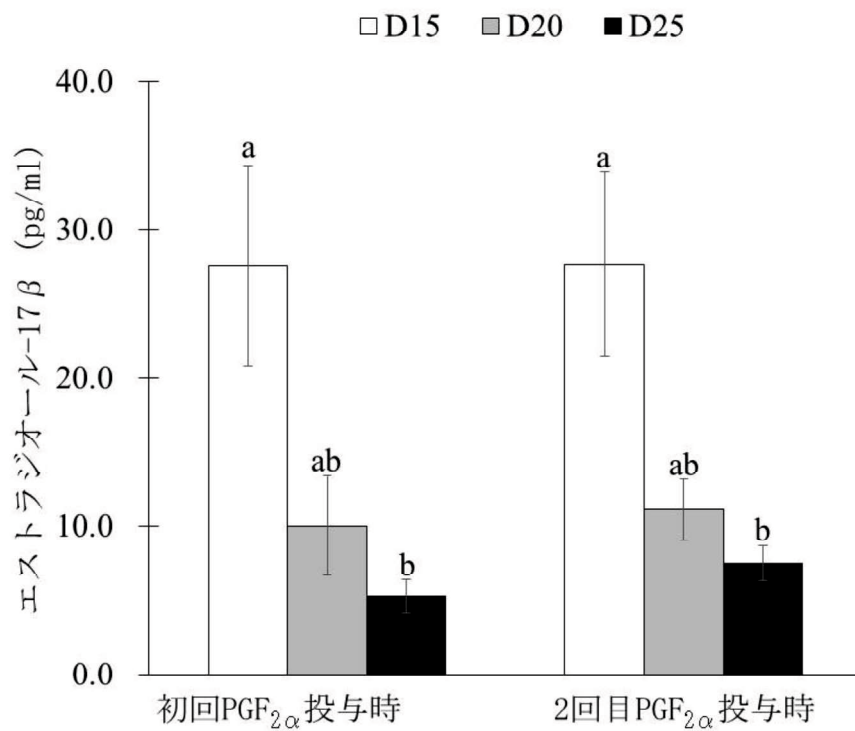


図4. PGF_{2α}類縁体投与直前の偽妊娠豚における血漿中エストラジオール-17β濃度

PGF_{2α}: PGF_{2α}類縁体としてクロプロステノール

^{a,b} 有意差あり (P < 0.05)

D15、D20 および D25 でそれぞれ 9、7 および 8 頭の供試豚のデータに基づく。

4. 考察

本研究は、EDP の単回投与で偽妊娠を誘起したブタに、投与から 15～25 日後に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 類縁体であるクロプロステノールを投与し、続いて eCG と hCG を投与することで高い正常胚採取率と平均して胚盤胞が採取できたことから排卵同期化を誘起できることを示し、本方法が人工流産法と同等の胚採取結果をもたらすことを示した。

ブタの妊娠認識は、妊娠 11～12 および 15～30 日目に胚から分泌されるエストロゲンにより引き起こされる (Spencer et al. 2004)。本研究では、EDP を投与した 30 頭の供胚豚のうち 26 頭 (86.7%) の偽妊娠が成立し、これは以前の研究と同程度であった (Noguchi et al. 2010, 2011)。この偽妊娠誘起率は人工授精による妊娠率 (88.3%) に匹敵するため (一般社団法人日本養豚協会 2020)、この方法は人工流産法と同等の効率で供胚豚に適用することが可能と想定された。本研究では、EDP により偽妊娠誘起されたブタからの正常胚採取率は 72.4～84.8% だった。Smith et al. (1992) は、妊娠および偽妊娠のブタにおいて高濃度の血漿中エストラジオール-17 β が、発情を回帰する能力および黄体形成ホルモンのサージ状分泌を誘起する能力を減少させたことを報告した。D15 区の $\text{PGF}_{2\alpha}$ 類縁体投与前の血漿中エストラジオール-17 β 濃度は 27.6 pg/ml であり、D20 および D25 のそれぞれ 10.0～11.1 および 5.2～7.5 pg/ml よりも有意に高かったが、胚採取結果に有意な差は認められなかった。この理由として、Smith et al. (1992) の報告では $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与時のエストラジオール-17 β 濃度が 75 pg/ml 前後だったのに対し、D15 区では平均 27.6 pg/ml と低かったことが胚採取結果に影響を与えなかったことが示唆された。

ブタ胚のガラス化においては、発生ステージが進行するにつれて加温後の生存率が高くなることが知られている (Cuello et al. 2004; Berthelot et al. 2007; Fujino et al. 2008)。衛生的な胚移植を実施する際は、前述の通り無傷の透明帯に覆われ、かつ発生ステージが進んだ胚盤胞から拡張胚盤胞を採取するため、排卵同期化が必要である。本研究では、hCG 投与 6 日後の胚採取における胚の平均発生ステージスコアは 1.5 であり、桑実胚と初期胚盤胞の間の発生ステージを示しており、前述の報告に照らせば、超低温保存には少し早すぎると考えられた。これらの段階の胚では、細胞質に拡張胚盤胞よりも多くの脂質を含むため、加温後の脂質の過酸化などが要因となり生存率が低くなることが報告されている (Dobrinsky 2002)。本研究における hCG 投与 7 日後に採取した胚の平均発生ステージスコアは 2.93 であり、胚はほぼ胚盤胞に達していた。このことは、供胚豚としての妊娠および偽妊娠豚の両方において、hCG 投与 7 日後の胚採取が、6 日後の採取よりも超低温保存および衛生的な胚移植の面から適していることを示した。

また、hCG 投与 7 日後に採取した胚の発育において実験区間に有意差が認められなかったという事実は、EDP 投与後 15~25 日の偽妊娠豚に $\text{PGF}_2\alpha$ 類縁体を投与する方法は、排卵同期化において人工流産法と同等の効率であることを実証した。このことは、本方法が人工流産法に代わる供胚豚の排卵同期化法として利用できることを示している。

人工流産法を用いると、繁殖能力に影響を与えることなく、人工授精後 12~40 日の長期間にわたって排卵制御を目的とした $\text{PGF}_2\alpha$ あるいはその類縁体の投与日を選択可能である。このことから人工流産法は胚採取にあたって主に使用

されてきた(Misumi et al. 2003, 2013)。近年、Noguchi et al. (2013)は、発情周期の7~11日目にEDPを1回投与し、その20~35日後にPGF_{2α}を投与することで発情を同期化し、養豚農場における集約的な分娩管理を実施できることを報告した。この方法では、発情を制御できる期間は偽妊娠の持続期間に依存する。効率的な胚採取には、発情開始から排卵同期化処理、胚採取までの期間を任意に設定できるようにする必要がある、さらに、胚採取までの期間を短くすることが供胚豚の飼養コストの面から効果的である。本研究では、EDP投与からPGF_{2α}類縁体投与までの偽妊娠期間は15日、20日、25日に設定したが、平均正常胚数は9.7~12.3個と有意な差異は見られず、対照区(人工流産法)で得られた結果である10.8個と同等であった。これらの結果は、EDPの単回投与により偽妊娠を誘起されたブタに、EDP投与から15~25日後にPGF_{2α}類縁体およびそれに続くホルモン処理を実施することにより、胚採取のための利便性の高い排卵同期化を達成できることを実証した。しかし、EDP投与から15および16日後のブタは、高い血漿中エストラジオール-17β濃度を示した(図4)。このことは、EDP投与から15日未満の豚はさらに高いエストラジオール-17β濃度である可能性があり、このことが排卵同期化および胚採取にどのような影響を与えるかは定かではない。従って、発情発見から排卵同期化までの日数の短縮することを目的としたEDP投与から15日未満でPGF_{2α}もしくはその類縁体を投与することによるブタの同期化および胚採取効率について検討し、偽妊娠期間の適用範囲を明らかにするためのさらなる研究が必要である。このことから、次の第2章では当方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。また、本研究では確実に偽妊娠を誘起す

るため、単回投与で長期間の偽妊娠が得られる EDP を選択したが、養豚産業への適用を考慮し、動物用として市販されている安息香酸エストラジオール(EB)を利用する道も第2章で検討することとした。

5. 小括

- ・ EDP による 15～25 日間の偽妊娠誘起と、それに続く $\text{PGF}_{2\alpha}$ 類縁体、eCG、および hCG の投与の組み合わせにより排卵を同期化し、人工流産法と同等の胚採取成績が得られた。このことから当方法は人工流産法に替わる手段となり得る。

- ・ 上記の方法で hCG 投与 7 日後に胚採取すると、平均して胚盤胞の発育ステージの胚を採取可能である。

- ・ 上記の方法は、EDP の単回投与のみで $\text{PGF}_{2\alpha}$ 類縁体に反応する黄体の延長を誘起可能なため、動物福祉に適している。

- ・ EDP 投与から 15 および 16 日後のブタは、高い血漿中エストラジオール- 17β 濃度を示した。従って、EDP 投与から 15 日未満のブタの排卵同期化および胚採取効率について調査し、偽妊娠期間の適用範囲を明らかにするためのさらなる研究が必要である。

第2章 エストラジオール安息香酸塩(EB)またはEDPの投与による雌豚の短期偽妊娠の誘起と胚採取のための排卵同期化

1. 緒言

現在、胚移植技術は実用技術として、農場での利用が可能になっている(Martinez et al. 2015)。一般的に、疾病制御のための胚移植利用の際は、完全な透明帯を有する胚を用いる必要がある(Stringfellow 2009)。また、新鮮胚ではなく超低温保存胚を用いることにより、受胎豚の発情をホルモン処置にて供胎豚に揃える必要が無く、受胎豚への負荷の軽減、経済的な観点、さらには移植日を任意に設定できることから、より実用的な胚移植が可能となる。こういった理由から、胚移植に使用される胚は完全な透明帯を持ち、超低温保存に適した発生ステージにある必要がある。このような胚を高い確率で採取するためには、供胎豚の排卵を同期化させることが不可欠である。

一方、Noguchi et al. (2010, 2013)の報告により、EDPを単回投与することによって偽妊娠が誘起され、このような豚にPGF_{2α}類縁体をEDP投与後20～36日後に投与することで発情同期化がなされ、その後正常に妊娠・分娩することが示された。また、第1章で示したとおり、EDP投与後15～25日の偽妊娠豚にPGF_{2α}類縁体を投与することによって、排卵同期化および超低温保存に適した胚盤胞期の胚の収集が可能であることも確認した。そこで、胚採取を効率的に実施するためには、発情発見から排卵同期化、胚採取までの期間を任意に設定可能とすることがさらに重要となりうる。そのためには、偽妊誘起前の発情発見から排卵同期化までの期間を短縮することが効果的である。例えば、突然の伝染性疾

病流行への対策として遺伝資源を緊急に保存しなければならない場合、できるだけ短い周期で胚を採取することが重要である。また、供胚豚の給餌期間を短縮できるため、経費削減にもつながる。一方、通常の性周期を営む豚において黄体退行開始時の血漿中エストラジオール-17 β (E2)濃度は非常に低いが、EDP を投与した豚は投与後 17 日間、無処置の豚と比較して高い血漿中 E2 濃度を維持することが示されている (Noguchi et al. 2010)。このことは、EDP 投与後 17 日以内に PGF_{2 α} を投与する際、すなわち黄体退行開始時の血漿中 E2 濃度が高いという、通常とは異なる状態となることを示しており、このことが形態的に正常な胚の数や胚の発生段階など、採胚成績にどのような影響を与えるかはこれまでに明らかにされていない。このような観点から、エストロゲン製剤の投与から PGF_{2 α} 投与までの期間の短縮を検討するにあたっては、血漿持続性の短い製剤として EB (Magnusson & Fossum 1992) の使用を検討する必要がある。また、実用的な胚採取のためには市販の動物用製剤を使用することが好ましく、この点で EB は市販されておりこの目的に適している。また、動物福祉や投与にかかる労力および経費を考慮すると、偽妊娠誘起のためのエストロゲン製剤投与の回数は少ないことが望ましい。しかし EB の単回投与後の胚採取および EDP 投与後 15 日未滿に PGF_{2 α} もしくはその類縁体を投与した排卵同期化および胚採取について検討した報告は、私の知る限り無い。一方、EB の単回投与により安定した偽妊娠を維持することは困難であることが報告されており (Geisert et al. 1987)、この方法が排卵同期化や胚採取に安定的に利用できるかどうかには疑問があることから、EB の投与を 1 回ではなく 2 回とした場合の効果についても検証する必要があると考える。

本研究では、血漿中の E2 濃度を調査し、外因性エストロゲン(EB または EDP)の投与から PGF_{2α} 類縁体の投与までの期間を 15 日未満に短縮することにより、移植に適した胚が得られるかどうかを調査することを目的とした。

2. 材料および方法

1) 供胚豚

実験は、独立行政法人家畜改良センター動物実験実施規程に基づく動物実験委員会の承認を経て行った。供胚豚として月齢 8~21 の未経産デュロック種雌豚 40 頭を用いた。供胚豚は 1 日 2 回、繁殖豚に必要な量を充足する飼料を給餌され、自由飲水とした。

2) 交配雄豚および精液処理

4 頭のデュロック種雄豚から採取した精液を用いた。採取精液はモデナ溶液(Weitze 1991)またはヒロスワイン B 液(広島クライオプリザベーションサービス, 広島)を用いて第 1 章と同様に希釈、保存した。

3) 排卵同期化方法

供胚豚は次の 4 つの実験区に各 10 頭ずつ割り当てた(図 5)。外因性エストロゲン製剤を投与した日を Day0 と定義した。

- ① EB10 : 発情開始の 10 または 11 日後に 20 mg の EB(動物用オバホルモン注; あすかアニマルヘルス、東京)を投与し、EB 投与から 10 および 11 日後に 24 時間間隔で 2 回 PGF_{2α} 類縁体を投与した。

- ② EB10×2：発情開始の 10 または 11 日後に 10 mg の EB を投与し、その 4 または 5 日後に再び 10mg の EB を投与。初回 EB 投与から 10 および 11 日後に 24 時間間隔で 2 回 PGF_{2α} 類縁体を投与した。
- ③ EDP10：発情開始の 10 または 11 日後に 20 mg の EDP を投与し、EDP 投与から 10 および 11 日後に 24 時間間隔で 2 回 PGF_{2α} 類縁体を投与した。
- ④ EDP15：発情開始の 10 または 11 日後に 20 mg の EDP を投与し、EDP 投与から 15 および 16 日後に 24 時間間隔で 2 回 PGF_{2α} 類縁体を投与(第 1 章の D15 と同様)し、これを本章における対照区とした。

すべての供胚豚には、2 回目の PGF_{2α} 類縁体と同時に 1,000 IU/頭の eCG を投与し、eCG 投与の 72 時間後に 500 IU の hCG を投与した。hCG 投与後 24、41 および 48 時間後に 2) と同様の精液を用いて人工授精を行った。すべてのホルモン投与は午後 4 時に実施した。

4) 胚採取方法

胚採取は hCG 投与後 7 日目に、第 1 章と同様の手法にて実施した。

5) 胚の評価

第 1 章と同様の手法にて実施した。

6) ホルモン測定

測定に使用する供胚豚の血液は、初回 PGF_{2α} 類縁体投与の直前に頸静脈から採取した。採取した血液サンプルの処理および血漿中プロゲステロンおよびエス

トラジオール-17 β 濃度の測定は、第 1 章と同様の手法にて実施した。

7) 統計処理

卵子/胚採取頭数および正常胚採取頭数はフィッシャーの直接確立検定を行った。黄体数、採取した卵子/胚数、正常胚数および血漿中エストラジオール-17 β の濃度は分散分析 (ANOVA) を用いて検定し、有意差が認められた場合には Tukey の多重検定を行った。胚の発生ステージスコアはクラスカル・ウォリス検定を行った。すべての統計解析は Easy R (自治医科大学附属さいたま医療センター、<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmedEN.html>、埼玉) を用いて行った (神田 2013)。P 値が 0.05 未満だった場合を有意とした。

3. 結果

黄体数、卵子/胚および正常胚数において、実験区間に有意な差は認められなかった (表 2)。EDP15 の 2 頭の卵巢には未発達な小卵胞しか見られず、このうち 1 頭は卵巢が委縮していた。この 2 頭については卵子/胚数および正常胚数の集計から除外した。また、EB10 \times 2 区および EDP10 区のそれぞれ 2 および 1 頭は未受精卵しか採取されなかったため、正常胚の集計から除いた。各実験区の平均胚発生ステージスコアは 3.29~4.03 であり、これは胚が胚盤胞から拡張胚盤胞のステージにあることを意味する。また、実験区間に有意な差は認められなかった。

初回 PGF_{2 α} 投与時の血漿中エストラジオール-17 β 濃度は、EDP10 区は 43.9 \pm 8.6 pg/ml) で、他の 3 つの実験区 (6.2 \pm 1.5、16.6 \pm 4.0、および 14.1 \pm 2.7 pg/ml、それぞれ EB10、EB10 \times 2、および EDP15) よりも有意に高かった (P <

0.05) (图 6)。

表 2. EB または EDP 投与により偽妊娠誘起された未経産豚における胚採取結果

実験区	頭数	卵子/胚採取頭数 (%)	正常胚採取頭数 (%)	黄体数 [†]	卵子/胚数 [†]	正常胚数 [†]	胚発生ステージスコア [‡]
EB10	10	10 (100.0)	10 (100.0)	14.2±1.4	13.4±1.6	13.2±1.6	4.03±0.08
EB10×2	10	10 (100.0)	8 (80.0)	14.3±1.1	13.9±1.0	13.1±1.4	3.29±0.32
EDP10	10	10 (100.0)	9 (90.0)	13.7±1.8	10.9±0.8	10.8±0.8	3.49±0.43
EDP15	10	8 (80.0)	8 (80.0)	13.0±1.8	12.0±1.7	9.8±1.8	3.34±0.35

[†]平均 ± 標準誤差

[‡]hCG 投与後 162～164 時間に各実験区の供胚豚から採取した胚を、国際胚技術学会の基準 (Robertson & Nelson 2009; Wright 2009) に従い品質評価し、形態学的に優れている (excellent)、良い (good)、または普通 (fair) と評価され、かつ適切な発生段階 (桑実胚以上) の胚を正常胚とし、胚発生ステージスコアを算出した。発生ステージは以下の分類に従い、1 頭の供胚豚から得られたすべての胚をスコア付けして平均化し、供胚豚 1 頭ごとに算出し、実験区内で平均化した。1, 桑実胚 2, 初期胚盤胞 3, 胚盤胞 4, 拡張胚盤胞 5, 脱出中または脱出胚盤胞

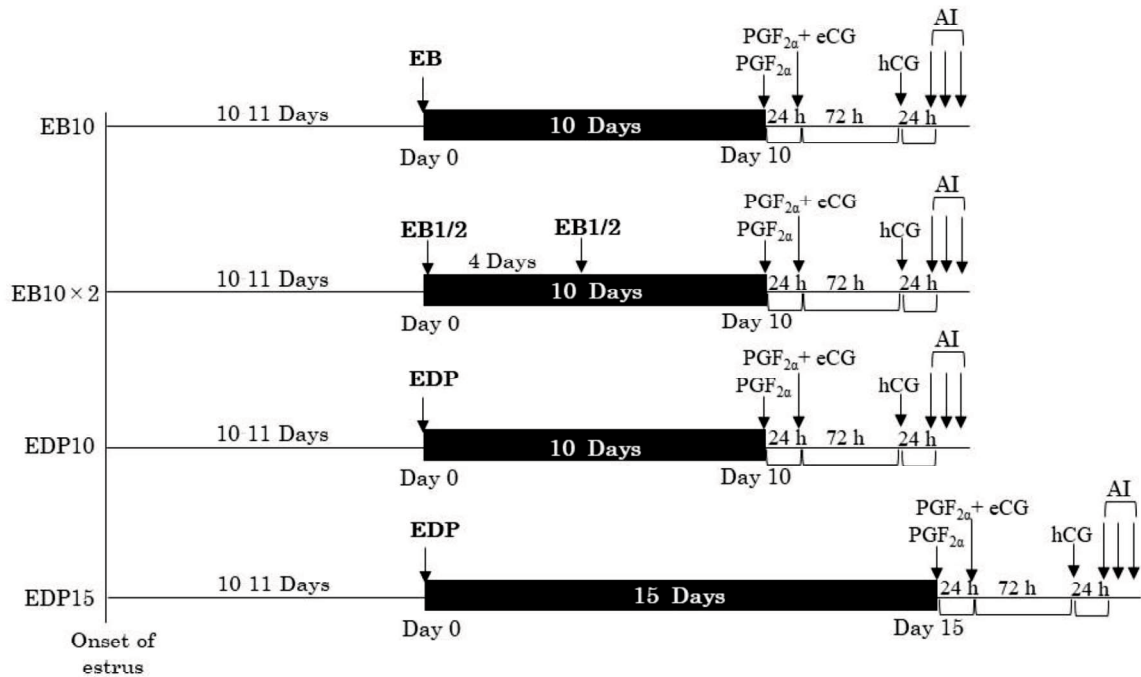


図5. 供胚豚の偽妊娠および黄体退行の誘起に使用した4つの方法の要約

EB: 安息香酸エストラジオール, EDP: エストラジオールプロピオン酸エステル, PGF_{2α}: PGF_{2α}類縁体としてクロプロステノール

EB10、EB10×2、およびEDP10は、初回のエストロゲン製剤投与から10日後にPGF_{2α}を投与、EDP15は15日後にPGF_{2α}を投与した。EBおよびEDPは、発情開始から10または11日後に20 mgを投与した。PGF_{2α}はクロプロステノールとして各0.276 mgを24時間間隔で2回投与した。eCG1,000 IUは2回目のPGF_{2α}投与と同時に、hCG 500 IUはeCG投与から72時間後に、それぞれ投与した。人工授精はhCG投与後24、41および48時間後にそれぞれ実施した(合計3回)

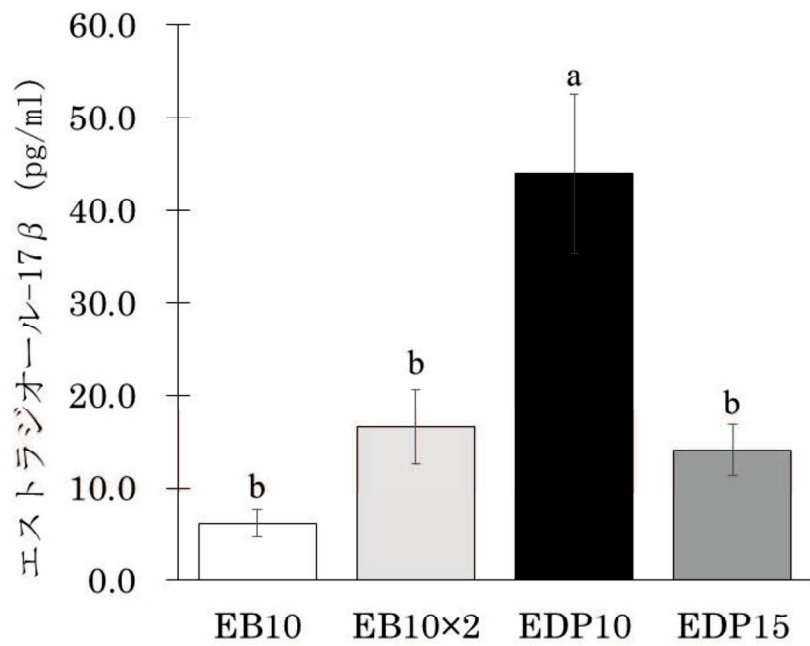


図6. 初回プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 投与直前の偽妊娠豚における血漿中エストラジオール-17 β 濃度

^{a-b} 有意差あり ($P < 0.05$)

EB10、EB10×2、EDP10、およびEDP15 でそれぞれ5、4、5および5頭の供試豚のデータに基づく。

4. 考察

ブタは、妊娠初期、すなわち妊娠 11～12 日および 15～30 日に、胚または胎子から分泌されるエストロゲンの濃度の増加を示し、これが妊娠認識に役割を果たすことが知られている (Spencer et al. 2004)。エストロゲン製剤の投与は、この期間に必要な・十分なエストロゲン濃度を人為的に高めることで、黄体機能を延長する (Guthrie 1975; Geisert et al. 1987; Noguchi et al. 2010)。これを目的として、EDP (Noguchi et al. 2010, 2011, 2013; Hirayama et al. 2019)、EB (Guthrie 1975; Geisert et al. 1987) およびエストラジオール吉草酸エステル (Zavy et al. 1988) が使用された報告がある。この中で、EB は採胚に使用されたという報告があり、EDP は単回投与で確実な偽妊娠が得られることが判明しているため本研究でも効果について確認をおこなったが、エストラジオール吉草酸エステルについては偽妊娠誘起のために 5 回の投与が実施されている上に (Zavy et al. 1988)、動物薬として日本で販売されておらず、実用性に乏しいため、本研究においては対象としなかった。Guthrie (1975) は、5 回の EB 投与で偽妊娠誘起されたブタに、初回 EB 投与から 9～24 日後に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 5 mg を 2 回投与することによって良好な胚採取結果が得られたことを報告した。Geisert et al. (1987) は、発情開始後 9.5～12.5 日の間に 5 mg の EB を単回投与することにより発情の間隔が 28～29 日に延長するが、発情の開始後 11～16 日の間に EB を 4 または 5 回投与した場合、60 日を超えても発情が回帰しなかったことを報告した。これは、5 mg の EB の単回投与は、妊娠認識に必要なエストロゲンのレベルまたは必要な期間を維持するのに不十分で、発情間隔を数日だけ延長できにすぎないことを示唆している。しかし、本研究では、発情の開始から EB に

よる偽妊娠および排卵同期化を経て最初の人工授精までの期間は25～26日であり、Geisert et al. (1987)の報告による28～29日よりも短かった。したがって、EB10 およびEB10×2 では、PGF_{2α} 類縁体投与による黄体退行が、自然な黄体退行より前に誘起された可能性があることが示唆された。さらに、この研究で使った10～20 mg のEBは、以前に報告された量(Geisert et al. 1987)よりもはるかに高用量であり、このことが、安定した偽妊娠誘起と胚採取の成功に貢献した可能性も考えられる。一方、本研究では、EBを2回投与して、確実な偽妊娠誘起を見込んだ実験区(EB10×2)を設けた。しかし正常胚採取率において、この実験区と他の実験区の違いは認められなかった。したがって、偽妊娠期間を10日に設定して胚採取を実施する場合、EBは1回投与するだけで十分であることが判明した。

一方、EDP10における初回PGF_{2α}類縁体投与時の血漿中エストロゲン濃度は、他の実験区より有意に高かった(図6)。Noguchi et al. (2013)は、EDPを投与されたブタは未処理のブタと比較して、投与後17日まで高い血漿中エストラジオール-17β濃度を維持したと報告した。すなわち、この高い血漿持続性は、EDP単回投与による安定した偽妊娠誘起につながることを示唆された。しかし、EB投与後の血漿中エストラジオール-17β濃度は、未処理の対照区と比較して9日後には差が見られなくなることが報告されており、EBが血漿中に短時間しか留まらないことを示唆している(Magnusson & Fossum 1992)。本研究においても、EDP投与10日後の血漿中エストラジオール-17β濃度は、EB区よりも有意に高かった(図6)。この結果からも、EDPがEBよりも血漿中エストラジオール-17β濃度を持続的に保持する効果があることが示唆された。Guthrie (1975)は、EB投

与の翌日に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を投与した場合、4頭中1頭しか発情が回帰しなかったと報告した。Smith et al. (1992)は、血漿中エストラジオール- 17β 濃度が高い妊娠および偽妊娠のブタは、発情回帰能力および LH サージを引き起こす能力が低下することを報告した。これらの報告より、黄体退行前に高い血漿中エストラジオール- 17β 濃度を維持することにより、正常な排卵が抑制され得ることを明らかにしている。しかし、本研究では、EDP10 区の平均正常胚採取数 10.8 個は、他の実験区(EB10 区、EB10×2 区、および EDP15 区のそれぞれ 13.2、13.1 および 9.8 個)と比較して有意差を示さなかった。したがって、本研究において最も高い平均血漿エストラジオール- 17β 濃度であった EDP10 区の 43.9 pg/ml という濃度は、その後の $\text{PGF}_{2\alpha}$ 類縁体、eCG、および hCG 投与の後の排卵同期化および胚採取効率に影響を及ぼさないことが示唆された。ただし、本研究では各実験区で採取された胚の超低温保存後の生存性については明らかにすることができなかったため、血漿中エストラジオール- 17β 濃度と超低温保存および加温後の胚の生存率、およびレシピエントへの移植後の生存率または生存能力との関係を明らかにするには、さらなる研究が必要である。

本研究では、すべての実験区において胚の平均発生ステージとしてはガラス化に適した胚盤胞から拡張胚盤胞の胚を採取することができた。Noguchi et al. (2013)は、EDP 投与により偽妊娠誘起した未経産豚に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を投与すると、64.6%のブタが $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与後 5~6 日の間に発情し、平均は 6.1 日(範囲は 3~14 日)だったことを報告した。また、Guthrie(1975)は、EB 投与により偽妊娠誘起した未経産豚の約 85%が $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与の 4~6 日後に発情を示したと報告している。これらの報告による方法、すなわち $\text{PGF}_{2\alpha}$ のみの投与では偽妊娠豚の発情同期化させ

ることは難しく、発情が回帰するタイミングが大きく変動することが明らかである。したがって、ガラス化保存のための胚採取においては、本研究の方法により排卵同期化を設定するほうが効果的であると思われる。さらに、前述の通り、胚を介した病気の伝搬を防ぐためには、脱出前の無傷の透明帯で覆われている胚を移植に使用する必要がある (Stringfellow 2009)。また、実用的な胚移植に欠かせないブタ胚の超低温保存においては、桑実胚よりも胚盤胞以上の胚を用いるほうが加温後の生存率の点で有利である (Cuello et al. 2004; Fijino et al. 2008)。本研究では、PGF_{2α} 類縁体、eCG および hCG を組み合わせることにより、平均で胚盤胞および拡張胚盤胞という限られた発育ステージの胚を採取することが可能であった。このことは、胚のガラス化および移植には大きなメリットであると評価される。これらの結果は、EDP または EB の投与後 10 日目でも、PGF_{2α} 類縁体とそれに続くホルモン投与により排卵同期化と胚採取が可能なことを示した。

一方、供胚豚を肉として出荷する際、高い血漿中エストロゲンレベルを維持する EDP は、EB よりも休薬期間が長くなり、飼養コストが増加するほか、エストロゲンの肉への残留の可能性に注意を払わなければならない点を考慮する必要がある。現在、EDP 製剤はヒト用のみ販売されているが、EB は動物用製剤として販売されている。このため、EB は獣医師による処方容易で、ブタへの適用に適していると考えられる。

5. 小括

- ・我々の知る限り、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 または EDP 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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。

- ・排卵同期化および胚採取のための偽妊娠誘起として EB を単回投与する方法は、EDP と同等であり、したがって労働やコストを削減し、動物福祉にも適している。

- ・EB は動物用製剤として入手可能であること、休薬期間が EDP より短いと予想されることから、実用的である。

- ・本研究の結果は、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。

第3章 子宮浅部への移植を目的に開発されたカテーテルを用いたブタガラス 化胚の非外科的移植

1. 緒言

胚移植を用いた農場への種豚導入は、生体を農場へ導入する場合と比較して、輸送コストが低く、病気の伝播リスクを最小化することが可能など、いくつかの利点を有する。ブタは、生まれつき長く曲がりくねった子宮を持っているために、胚移植では主に外科的手法が用いられてきた。しかし、外科移植では特別な設備や技術が必要なことから、これらが不要な非外科的な胚移植技術が実用技術として注目されるようになってきた。ブタにおける非外科的移植は1968年に最初の妊娠例が報告されて以来 (Polge & Day 1968)、多くの試みが行われた (Reichenbach et al. 1993; Galvin et al. 1994; Hazeleger & Kemp 1994; Li et al. 1996; Yonemura et al. 1996)。

最近の研究では、ガイドカテーテルに、細くて非常に長い内管を通すことによって子宮深部へ胚を移植する特徴的な器具を用いることにより、移植胚由来の子豚が得られている (Martinez et al. 2004; Nakazawa et al. 2008; Yoshioka et al. 2012)。しかし、これらの移植器具の操作には、ガイドカテーテルに内管を通す際の無菌的な操作など、子宮内感染を避けるために非常に繊細な操作が必要である。さらに、これらの器具は内管が非常に長いため、取り扱いが困難である上、子宮を傷つける可能性が考えられた (三角ら 2020)。このような問題は、養豚農場で胚移植を実施する際の課題であった。

一方、ブタ胚の超低温保存は、胚移植の利便性を向上させ、貴重な遺伝資源の

長期保存を可能にする。胚の超低温保存と非外科的移植技術を組み合わせることにより、胚移植技術の実用性は飛躍的に向上することが期待できる。過去の報告では、ガラス化した後加温したブタ体内由来胚を用いた外科的移植により、55～75%の分娩率が達成された (Berthelot et al. 2000; Cameron et al. 2004; Beebe et al. 2005; Fujino et al. 2008)。さらに、液体窒素を介した病原体による胚への汚染を防ぐため、胚を含むガラス化液を液体窒素に接触させないガラス化工具やその手法が開発されている (Beebe et al. 2011; Men et al. 2011; Misumi et al. 2013)。中でも、Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法は、8～15 個という少数の胚を外科的移植することにより子豚の生産に成功した (Misumi et al. 2013)。一方、非外科的移植を成功させるためには、より多くの胚(40 個程度)が必要とされる (Martinez et al. 2015)。もし、15 個前後の胚による非外科的移植で良好な子豚生産成績が得られるようになれば、養豚産業にとって非常に有益であり、そのためには確実な妊娠と子豚生産を可能にする移植器具の開発が求められている。

近年、三角ら (2020) は、ウシ用に開発され市販されているステンレス製胚移植カテーテルを改良した器具 (モ 4 号; ミサワ医科工業株式会社, 茨城) を用いて MVAC 法でガラス化/加温した胚を子宮深部よりも近位部位に非外科的移植することで、60%の分娩率を達成した。この結果は、子宮の浅い部分である子宮体への移植であっても、ガラス化/加温胚を用いて良好な結果をもたらす可能性があることを示している。しかしこの方法は、非弾性のステンレス製カテーテルを用いるため、挿入する際に受胚豚の子宮頸管や子宮体部を穿孔させる可能性があり、それを避けるための熟練した技術が必要であった。したがって、より挿入が

簡単で受胎豚の生殖器を傷つけにくい安全なカテーテルの開発が求められている。

そこで、子宮浅部(子宮体部から子宮分岐部の部位)への胚移植を容易にするため、外側ガイドカテーテルにインジェクターを取り付けた柔軟性のある非外科的移植用カテーテルを開発することとした。本研究では、この開発した非外科的移植用カテーテルを用い、第1章および第2章で確立した排卵同期化法を含めた方法で採取した胚をMVAC法によりガラス化/加温して移植し、受胎率、分娩率および子豚生産効率等の繁殖成績を、一般的に行われている外科的移植と比較して検証することを目的とした。

2. 材料および方法

1) 動物

実験は、独立行政法人家畜改良センター動物実験実施規程に基づく動物実験委員会もしくは佐賀県畜産試験場動物実験等実施規定の承認を経て行った。供試豚は1日2回、繁殖豚に必要な量を充足する飼料を給餌され、自由飲水とした。

2) 交配雄豚および精液処理

4頭のデュロックまたは大ヨークシャー種雄豚から採取した精液を用いた。採取精液はヒロスワインB液を用いて第1章および2章と同様に希釈、保存した。

3) 供胚豚の排卵同期化と胚採取

供胚豚には、8~50 ケ月齢の 22 頭の雌豚を用いた(デュロック種未経産豚 15 頭、経産豚 1 頭、大ヨークシャー種未経産豚 3 頭および経産豚 3 頭)。効率的な胚採取を実施する計画を立てるため、4 つの方法のいずれかを使用して供胚豚の排卵同期化を行った(図 7a-d)。これらは、以前の研究で高い受胎率が得られたガラス化胚作製のために使用された方法である(三角ら 2020; Misumi et al. unpublished data)。すべての供胚豚は、胚採取の 11 および 10 日前に 24 時間間隔で 2 回 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 類縁体としてクロプロステノール 0.276 mg を投与し、2 回目の $\text{PGF}_{2\alpha}$ 類縁体投与と同時に 1,000 または 1,500 IU の eCG、続けて eCG 投与から 72 時間後に 500 または 750 IU の hCG を投与した。hCG 投与後 24、41 および 48 時間後に 2) の精液を用いて人工授精を行った。すべてのホルモン投与は午後 4 時に実施した。hCG 投与の 7 日後に外科的(n = 20)または屠殺後に(n = 2)胚を採取した。

外科的採胚は、第 1 章と同様の手法にて実施した。ただし、鎮静および導入麻酔は以下の方法で実施した。1 mg の塩酸メデトミジン(ドミツール;日本全薬工業株式会社、福島)および 10 mg のミダゾラム(ドルミカム注射液 10mg; アステラス製薬株式会社、東京)を筋肉内投与して供胚豚を鎮静させた後、チアミラールナトリウム(注射用イソゾール 0.5 g;日医工株式会社、東京)500 mg を静脈内投与して麻酔を導入し、その後 3~4%イソフルラン吸入による維持麻酔を行った。2 頭の供胚豚は承認された実験計画に従ってと殺し、と体から生殖管を直ちに摘出し、外科的採胚と同様の手法で子宮内を灌流した。

4) 胚のガラス化

採取した胚は国際胚技術学会 (Robertson & Nelson 2009; Wright 2009) によって分類された基準に基づいて形態学的に品質および発生ステージを評価した。無傷の透明帯を有し、初期胚盤胞、胚盤胞または拡張胚盤胞に達した 180 個の胚(デュロック種 : n = 126、大ヨークシャー種 : n = 54) をガラス化した。採取時点で桑実胚だった胚は、38.5°C の 5%CO₂ および O₂ 環境下で最大 6 時間培養して胚盤胞に発生させ、ガラス化を行った。

胚盤胞は、Misumi et al. (2013) により報告された Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法を用いてガラス化および加温した。ガラス化および加温に使用したすべての溶液は、ブタ胚ガラス化保存液キット (PEV-SK; 機能性ペプチド研究所、山形) を用いた。平衡液は、ブタ用一次平衡液 (PES-1) と二次平衡液 (PES-2) の 2 種類を使用した。ガラス化液は、ブタ用ガラス化液 (PVS) を使用した。加温と希釈にはブタ加温希釈液 (PWDS) を使用した。すべての溶液は、使用するまでウォーターバスで 45°C に保温した。ガラス化および加温操作は、実体顕微鏡下および 38°C の加温プレート上で行った。ガラス化器具として、V 字に折り目を入れたステンレス鋼の細い薄板を使用した (胚スティック ; ミサワ医科工業、茨城) (図 8)。キャップで密封した 0.25 ml のストローを、予冷のために液体窒素中に垂直に静置した。胚を PES-1 で 5 分間平衡化し、続いて PES-2 で 5 分間平衡化した後、PVS に移した。胚を含む約 1 μl の PVS をガラス化器具の先端に置き、直ちに予冷したストローに挿入し、ガラス化した。胚を PVS に移植してからストローに挿入するまでの時間は 1 分以内とした。胚が入ったストローは液体窒素に浸漬し、移植まで液体窒素タンク内で保存した。

胚の加温および希釈は、次に示す方法で行った。胚が載ったガラス化器具を

0.25 ml のストローから引き出し、器具の先端(胚が載った部分)を、約 4 ml の PWDS を入れた 35 mm のシャーレに直ちに浸し、器具から胚を遊離させた。そのまま PWDS 内で胚を 3 分間希釈した後、20 mM HEPES 緩衝 PBM(Mito et al. 2012) に胚を移した。

5) 非外科的 ET 用に開発されたカテーテルの特徴

子宮浅部への非外科的胚移植用に設計したカテーテルを図 9 に示す(紅 3 号試作品;ミサワ医科工業)。カテーテルはディスプレイで、外側のカテーテル(本研究では「ガイド」とする)と、ガイド内に収容されたスライド可能な内側のチューブ(本研究では「インジェクター」とする)で構成されている、という特色がある。

6) 実験 1 : カテーテル挿入状況の確認

カテーテルの挿入を調査するために、未経産のデュロック種 9 頭および大ヨークシャー種 3 頭(生後 9~16 ヶ月)を供試した。排卵同期化は、3) で述べた方法と同様の手法で実施した(図 7a および c)。hCG 投与後 7 日の供試豚をケージに入れ、約 25°C の部屋に運び入れ、立位での鎮静を導入するためミダゾラム 10 mg を筋肉内投与した(中村ら、未発表データ)。供試豚の会陰部は入念に洗浄した。供試豚が目を閉じる、ぼんやりするといった鎮静の兆候が見られたら、膣鏡を使用してカテーテルの挿入を開始し、子宮頸管に挿入した。そして、インジェクターの挿入に抵抗が無いことを確認しつつ子宮浅部に静かに押し出した。膣鏡の使用開始からインジェクターを挿入し終わるまでの時間を記録した。カテ

ーテル操作の簡便さを評価するために、挿入は熟練した1名のオペレーターと6名の初心者のオペレーターによって行われ、供試豚はその2つのグループにランダムに割り当てられた。本研究では、熟練したオペレーターとは、市販の非外科的胚移植カテーテルを20例以上挿入した経験のある者、初心者のオペレーターとは、人工授精には熟練しているがカテーテルの挿入経験が1例以下の者と定義した。インジェクターを決められた挿入長(ガイド先端から5 cm)まで挿入するために取り付けられた0リングの位置までインジェクターを完全に挿入したら、カテーテルをずれないように供試豚の尾にテープで固定した。次に、3)で述べた外科的採胚と同様の手法(ミダゾラムを除く)で供試豚の生殖器を露出した。生殖器内に挿入されたガイドとインジェクターの先端の位置は視覚的および触診によって確認し、期待される挿入部位である子宮体部への挿入の可否を判定した。さらに、カテーテルを抜去した後、ガイドの先端から陰部の外側に露出した部分までの距離を測定し、カテーテルの挿入深度を確認した。

7) 実験2：胚移植による繁殖成績の確認

作製したカテーテルを用いた非外科的移植と外科的移植を比較するため、ガラス化保存し加温した胚(以下ガラス化加温胚)の移植試験を実施した。未経産のデュロック種8頭、大ヨークシャー種3頭および交雑種(デュロック×大ヨークシャー)1頭(生後8~14ヶ月)を供試した。受胚豚の排卵同期化は、3)で述べた方法(図7d)の人工授精後日数の範囲を少し短縮した方法を用いた。人工授精後21~34日の受胚豚にPGF_{2α}類縁体を投与し、その24時間後に2回目のPGF_{2α}類縁体とともに750 IU eCGを投与し、eCG投与の72時間後に500 IUのhCGを

投与し、hCG 投与後の人工授精は行わなかった。外科的および非外科的移植ともに、hCG 投与の 6 日後に実施した。

非外科的移植における受胚豚準備の準備とカテーテル挿入は、6) で述べた方法と同様に実施した(図 10)。カテーテル挿入にかかった時間として、カテーテル挿入の開始からインジェクター挿入の完了までの時間を測定した。これらの手順は熟練したオペレーターが実施した。インジェクターが完全に挿入された後、ガラス化保存した胚の加温を開始した。加温後、13~16 個の胚を 0.25 ml のストローに封入した。ストロー内の配置を次に示す：20 μ l の移植液、空気、30 μ l の胚を含む移植液、空気、最後に 20 μ l の移植液。2 ml の移植液を入れた 5 ml のシリンジをインジェクターに取り付け、このうちの 1 ml は滅菌フィルターを通してインジェクター内に注入し、移植液を充填した。次に、胚を含む 0.25 ml のストローをインジェクターに接続し、移植液 1 ml が残った 5 ml シリンジをストローの上部に接続した。次に、シリンジの移植液 1 ml を押し出して胚を子宮内に注入した。最後に、1 ml の空気を含む別の 5 ml シリンジに滅菌フィルターを取り付け、シリンジ内の空気をインジェクターに押し出し、カテーテルに残っているすべての移植液を子宮に注入した。その後、カテーテルを抜去し、6) と同様にガイドの先端から陰部の外側に露出した部分までの距離を測定し、カテーテルの挿入深度を確認した。

外科的移植は、3) と同様の手法で麻酔を施し、外科的手法にて受胚豚の生殖管と卵巣を露出させた。ガラス化/加温した 12~16 個の胚を移植液とともにポリプロピレンカテーテル(PP カテーテル猫用 先穴式、富士平工業株式会社、東京)に移し替えた。子宮壁に小さな穴を開け、胚の入ったポリプロピレンカテーテル

を穴から挿入して一方の子宮角(子宮卵管接合部まで約 5 cm)に胚を移植した。

妊娠は、ET の 20 日後に経皮超音波画像診断(HS-101V;本多電子株式会社、愛知県)によって診断した。妊娠豚は分娩させ、分娩率と産子数を記録した。

8) 統計処理

実験 1 におけるガイドおよびインジェクター挿入の成功率、実験 2 における受胎率および子豚生産率は、フィッシャーの直接確立検定を行った。その他のデータはすべてスチューデント t 検定を行った。すべての統計解析は Easy R(自治医科大学付属さいたま医療センター、<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmedEN.html>、埼玉)を用いて行った(神田 2013)。P 値が 0.05 未満だった場合を有意とした。

3. 結果

1) 実験 1

本研究で作製した非外科的胚移植用のカテーテルを用い、熟練したオペレーターと初心者のオペレーターが未経産豚に挿入した結果を表 3 に示した。挿入に必要な時間と挿入の深度は、オペレーターの経験による違いは見られなかった。ほぼすべて(12 頭中 11 頭)の供試豚の子宮浅部にガイドとインジェクターを挿入することが可能であったが、1 頭の供試豚は子宮頸管が固く閉じており、ガイドおよびインジェクターが子宮頸管にとどまっていた。ガイドの先端が子宮体(図 11)(適した挿入場所)に挿入された確率は、熟練者と初心者でそれぞれ 83.3%と 66.7%であった。しかし、初心者では、ガイドの先端が子宮体ではなく

子宮角に近い位置に到達した例が 2 例あった。さらに、熟練者ではガイドが子宮頸管を通過した 5 例のうち 1 例のみインジェクターの子宮体(挿入に適した場所)を通過しており、この 1 例は子宮角分岐部に挿入されていた。これに対して初心者では、6 例中 3 例が子宮体を通過しており、このうち 1 例が子宮角分岐部に、2 例が子宮角に達していた。

2) 実験 2

外科的および非外科的胚移植の間で、産子数と生存産子数に有意な差は認められなかった(表 4)。非外科的胚移植では、6 頭の受胚豚のうち 5 頭が妊娠し、そのうち 4 頭が合計 14 頭の生存産子(受胚豚 1 頭あたり 3.5 ± 1.3 頭)を分娩し(図 12)、死産は 1 頭であった。外科的胚移植では、6 頭の受胚豚のうち 4 頭が妊娠し、4 頭すべてが分娩して合計 23 頭の生存産子(受胚豚 1 頭あたり 5.8 ± 0.6 頭)を得、死産は 2 頭であった。すべての産子は健康で、形態学的または生理学的異常は認められなかった。子豚生産率は、すべての受胚豚に移植した胚数に対する生存産子数の比率で計算し、外科的および非外科的移植における子豚生産率は、それぞれ 25.8%および 15.4%であった($P = 0.098$)。

表 5 にて、非外科的移植用のカテーテルを使用してガラス化/加温した胚を 6 頭の受胚豚に移植した結果の詳細を外科移植と比較して示した。カテーテルの挿入に要した時間は、2:29 から 6:40(平均 $4:17 \pm 0.35$)(分:秒)の範囲であった。受胚豚に挿入したガイドの平均深度は 45.3 ± 1.6 cm であった。妊娠したが分娩に至らなかった 1 頭の受胚豚は、移植後 34 日で流産が確認された。不受胎だった 1 頭の受胚豚は、移植から数日後に陰部から化膿性分泌物が認められた。

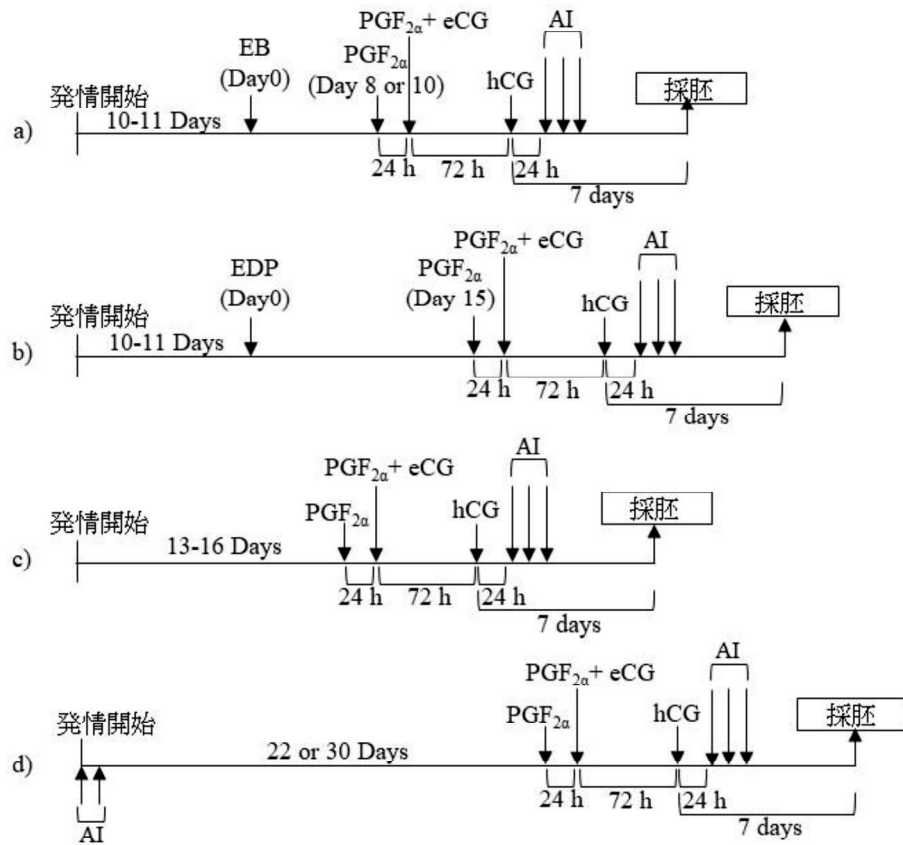


図 7. 供胚豚の排卵同期化に使用した 4 つの方法

a) および b) は、供胚豚にそれぞれ 20 mg の EB または EDP を投与した。c) は、供胚豚の自然発情を利用した。d) は、供胚豚の自然発情の開始から終了まで毎日人工授精を行った。すべての供胚豚は、PGF_{2α} 類縁体 (0.276 mg クロプロステノール) を 2 回、eCG を 1,000 または 1,500 IU、および hCG を 500 または 750 IU 投与された。hCG 投与の 24、41 および 48 時間後に合計 3 回人工授精を行った。

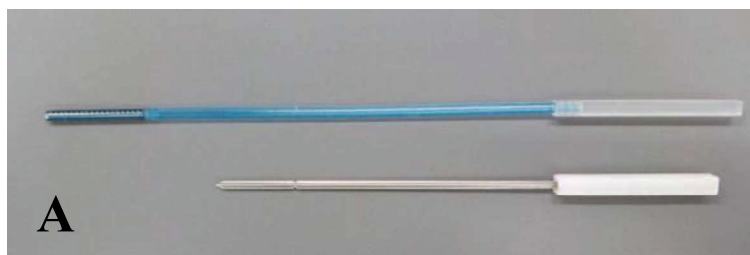


図 8. ガラス化器具(胚スティック)

A: 上の青いストローが胚保存用、下のストローは胚を乗せる
ガラス化器具を収納している。

B: ガラス化器具の先端



図 9. 子宮浅部への非外科的移植用に開発したカテーテル(紅 3 号試作品; ミサワ医科工業)

カテーテルは適度な弾力があり、外側のガイドカテーテルと、その内側に組み込まれた柔らかいインジェクターで構成されている。ガイドの長さは 61.5 cm、コイル状の先端の外径は 8 mm、インジェクターの外径は 2 mm、内径は 1.2 mm である。 図中の「A」は子宮頸管へ挿入時のカテーテルの状態、「B」は胚移植時のカテーテルの状態を示した。胚移植時には、インジェクターが外側のカテーテルの先端から子宮内に 5 cm 突出した。 突出長は、持ち手側のインジェクターに取り付けられた O リングの位置まで挿入することにより 5 cm に制限されている。

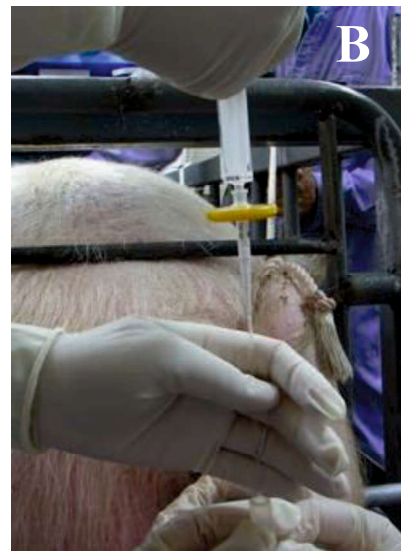
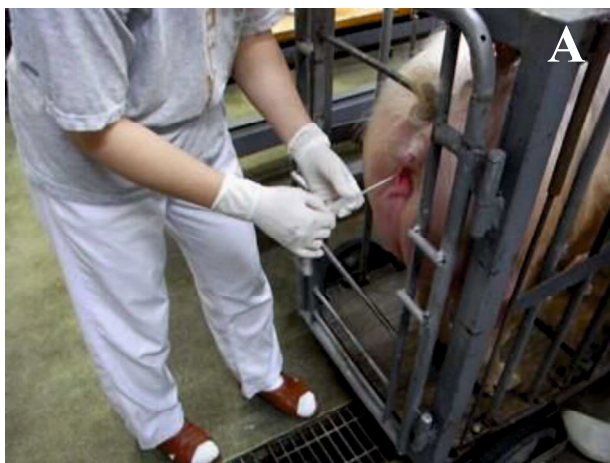


図 10. 本研究で開発したカテーテルを用いた子宮浅部への非外科的移植
A: カテーテル挿入の様子 B: インジェクターに接続した胚入りのストローを、移植液
および空気で子宮内に押し出している。

表 3. 非外科的移植用カテーテルを用いた熟練または初心者のオペレーターによる挿入の結果

オペレーター	供試豚	月齢	挿入に要した時間 (分:秒)	カテーテル挿入深長 (cm)	ガイド先端の正しい位置(子宮体部)への挿入の可否	インジェクター先端の正しい位置(子宮体部)への挿入の可否
熟練者	A	14	5:58	44.5	○	○
	B	11	4:13	39.5	○	○
	C	12	3:45	40.0	○	(子宮角分岐部)
	D	10	2:08	37.0	○	○
	E	9	4:43	44.0	○	○
	F	10	15:45	48.0	子宮頸管 [‡]	—
	平均	11.0 ± 0.7 [†]	4:09 ± 0:38 [†]	41.0 ± 1.4 [†]	83.3% [§]	66.7% [§]
初心者	G	9	2:39	36.5	○	○
	H	12	9:25	52.0	(子宮角)	(子宮角)
	I	16	3:24	41.5	○	○
	J	14	2:40	39.0	○	(子宮角分岐部)
	K	12	2:55	42.5	○	○
	L	13	3:35	52.5	(子宮角分岐部)	(子宮角))
	平均	12.6 ± 1.0 [†]	4:06 ± 1:04 [†]	44.0 ± 2.7 [†]	66.7% [§]	50.0% [§]

[†] 平均 ± SEM

[‡] 子宮頸部が固く閉じていたため、カテーテルを挿入できなかった。

[§] ガイドまたはインジェクターの先端が期待される挿入位置(子宮体部)にあった豚の率。

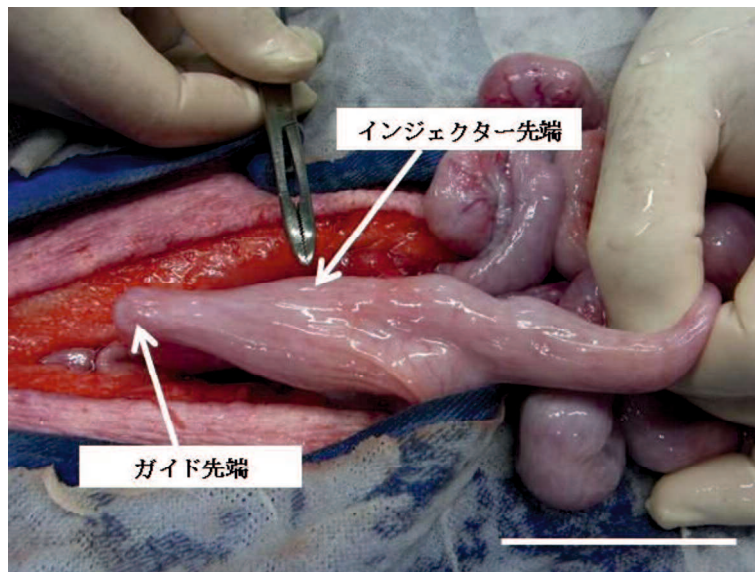


図 11. 供試豚の子宮内に挿入されたガイドおよびインジェクター先端の位置

カテーテルを挿入した供試豚を直ちに麻酔し、開腹して生殖管を露出させ、ガイドおよびインジェクターの挿入状態を確認した。(白線 = 5 cm)

表 4. MVAC 法でガラス化および加温した胚を用いた外科的胚移植および非外科的胚移植の結果

実験区	頭数	移植胚数/ 頭 [†]	受胎 頭数	分娩 頭数	生存産 子数 (死産 頭数)	一腹あたり 産子数 [†]	一腹あたり 生存産子数 [†]	子豚生産率 [‡]
外科	6	14.8 ± 0.7	4	4	23 (2)	6.3 ± 0.9	5.8 ± 0.6	25.8
非外科	6	15.2 ± 0.5	5	4	14 (1)	3.8 ± 1.4	3.5 ± 1.3	15.4

[†]平均±標準誤差

[‡]すべての受胚豚に移植された胚の数に対する生存産子数の比率



図 12. 開発したカテーテルを用いた子宮浅部への非外科的移植により得られた MVAC 法によるガラス化加温胚由来の産子
表 5 の受胚豚 S が分娩した生存産子 7 頭

表 5. 外科的および非外科的胚移植結果の詳細

受胚豚	実験区	移植胚数	受胎	生存産子数		死産頭数
				雄	雌	
M	外科	12	+	2	4	1
N		16	+	4	3	1
O		15	+	2	2	-
P		16	-	-	-	-
Q		16	+	3	3	-
R		14	-	-	-	-
平均		14.8±0.7	66.7%	2.8±0.5	3.0±0.4	1.0
S	非外科	15	+	5	2	-
T		16	+	1	1	-
U		13	+ [†]	-	-	-
V		16	+	2	2	1
W		15	- [‡]	-	-	-
X		16	+	0	1	-
平均		15.2±0.5	83.3%	2.0±1.1	1.5±0.3	

[†]受胎したが分娩に至らなかった受胚豚は、移植後 34 日で流産した。

[‡]受胎しなかった受胚豚は、移植後に陰部から化膿性分泌物が認められた。

4. 考察

本研究では、ブタの子宮浅部への胚移植用に新しく開発したカテーテルの効果を検証した。ブタの非外科的移植は、子宮深部へ胚を移植することによって良好な成績が得られてきた (Martinez et al. 2004; Angel et al. 2014; Martinez et al. 2014; Martinez et al. 2015)。これらの方法で用いられたカテーテルは、外側のガイドカテーテルと、ガイドカテーテルの中に通して使用する柔軟で長い(1.2~1.58 m)インジェクターで構成されており、インジェクターはガイドカテーテルと分離して設計されている。このカテーテルを使用して胚移植を実施する場合、最初にガイドカテーテルをブタの生殖器に挿入し、次にインジェクターをガイドカテーテルに通して深く挿入した。ただし、ガイドカテーテルとインジェクターは分離しているため、インジェクターの挿入には、ガイドカテーテルにインジェクターを通す際の無菌的な操作など、子宮内感染を避けるために非常に繊細な操作が必要であった。また、インジェクターが長いため、取り扱いが困難であった。そこで、本研究では、子宮内汚染を防ぎ、子宮浅部への胚移植を容易にするため、外側のガイドカテーテルとインジェクターを一体化したカテーテルを開発した。実験 1 ではカテーテルの有用性を確認する目的で挿入実験を実施した。次に、実験 2 では、実際にカテーテルを用いてガラス化加温胚の非外科的移植を実施し、ブタで一般的に行われている外科的移植の結果と比較した。

ブタの非外科的移植は、Polge & Day(1968)による最初の報告以来、概ね子宮体への移植技術として研究されてきた。しかし Wallenhorst & Holtz(1999)は、胚の子宮体への外科的移植は、子宮角への移植よりも有意に低い受胎率をもた

らしたと報告し、子宮深部が胚移植に適した位置であったことを報告した。その後、Martinez et al. (2004)が子宮深部への非外科的移植法を開発し、高い分娩率を報告すると、ブタの非外科的移植のスタンダードとして、子宮深部への移植が注目されるようになった。具体的なデータとして、新鮮胚を使用した子宮体への非外科的移植の分娩率は 9.0~64.0%であったが(Reichenbach et al. 1993; Galvin et al. 1994; Hazeleger & Kemp 1994; Li et al. 1996; Yonemura et al. 1996)、子宮深部移植の分娩率は 70.8~92.0%であった(Martinez et al. 2004; Angel et al. 2014; Martinez et al. 2014)。これらの報告により、胚を移植するのに適した子宮内位置は子宮体ではなく子宮深部であることを明確に示唆している。これら知見とは反対に、三角ら(2020)は牛用の胚移植カテーテルを改良した移植器具を用い、ガラス化加温胚を子宮体へ非外科的移植し、子宮深部移植と同等の 60%の分娩率と 17.9%の子豚生産率を得たことを報告した。この結果は、子宮深部が子宮体と比較して胚移植に適していると報告したこれまでの研究成果とは対照的であり、むしろ子宮体への移植という創生期の研究成果を反映するものであった。さらに、本研究では、ガラス化加温胚を子宮浅部に非外科的移植した結果、分娩率は 66.7%、子豚生産率は 15.4%という結果が得られた。過去の研究においては、ガラス化加温胚の非外科的子宮深部移植において 42.9~72.7%の分娩率および 11.0~17.3%の子豚生産率が報告されている(Cuello et al. 2005; Gomis et al. 2012 ; Martinez et al. 2015)。本研究の結果は、三角ら(2020)の結果と類似しているとともに、過去の子宮深部への非外科的移植の結果と同等であった。これらの結果から、子宮浅部への非外科的移植が、繁殖成績の面で子宮深部への移植と遜色ない成果をもたらす可能性がある

ることを示した。この理由として、インジェクターの突出長が 5 cm と短いためカテーテルによる子宮内への侵襲が少なく、感染および子宮への刺激や損傷が起りにくいこと、もしくはカテーテルのインジェクターが非常に柔らかい素材で作られているために子宮への刺激や損傷が少ないこと、あるいはその両方が考えられた。

さらに、Wallenhorst & Holtz (1999) が外科的な胚移植において移植に適した胚の子宮内位置が子宮深部であることを証明したように、三角ら (2020) の報告においても全身麻酔下かつ仰臥位のブタの子宮体へ胚を非外科的に移植しても受胎例は得られなかった。この不一致の理由は、仰臥位や立位など移植時の受胚豚の体位、または全身麻酔の有無にある可能性が考えられる。

本研究では、新しく開発されたカテーテルを使用した非外科的移植を外科的移植と比較した。子豚生産率は外科的移植で 25.8% であり、非外科的移植よりも高い傾向が認められた (15.4%、 $P = 0.098$)。これまでの報告においても同様の傾向が見られている。すなわち、外科的移植の場合、1 頭のレシピエントに約 20～35 個のガラス化加温胚を移植した場合、分娩率は 70.0～83.0% で、子豚生産率は 17.2～20.2% と報告されている (Cameron et al. 2004; Beebe et al. 2005; Fujino et al. 2008; Misumi et al. 2013)。一方、非外科的移植では、分娩率と子豚生産率はそれぞれ 42.9～72.7% と 11.0～17.3% と報告されていることから (Cuello et al. 2005; Gomis et al. 2012; Martinez et al. 2015)、外科的移植は非外科的移植よりも優れていると考察されている。

一方、1 頭の受胚豚あたり 40 個のガラス化加温胚を子宮深部へ非外科的移植した場合、30 個の胚を移植したよりも高い分娩率および子豚生産率が得られる

ことが示された(38.9対72.7%および7.1対17.3%)(Martinez et al. 2015)。この報告から、ガラス化加温胚を用いた子宮深部非外科的移植を実施して良好な結果を得るには、多くの移植胚が必要であると結論づけられる。しかし、本研究における子宮浅部への移植では1頭の受胚豚にわずか13~16個の胚で良好な繁殖成績が得られた。この結果は、受胚豚あたり15~16個のガラス化加温胚を非外科的に子宮浅部に移植して17.9~20.5%の子豚生産率を得た三角ら(2020)の結果と類似していた。したがって、非外科的胚移植では、胚を移植する子宮内の位置を議論するよりも、子宮への侵襲や損傷を避けることが非常に重要である可能性が示唆される。また日本では、農場への種豚導入や遺伝資源の再生のために胚移植を用い、その産子を種豚として利用する場合は日本養豚協会による血統登録制度に準拠する必要がある。1頭の受胚豚に移植する胚は1頭のみのも供胚豚から供給される胚であることが基本である。しかし、1頭の供胚豚から移植を可能とするに十分な胚を収集できるとは限らないため(Ratky et al. 2000)、複数の供胚豚の胚を混合し、1頭の受胚豚への移植に必要な数に充足させて移植に用いることが行われる。そのような場合、毛色により明らかに判別できる場合を除き、産子の血統を明らかにするために必要な遺伝子検査のための余分な労力と費用が必要になる。この研究で実施した方法は、1頭の受胚豚に移植するために必要な胚の数が少ないため、こういった状況を回避することができ、労力やコストの面から有利であると考えられる。

5. 小括

- ・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、簡単に受胎豚へ挿入することが可能である。

- ・この移植用カテーテルを用いて MVAC 法によるガラス化加温胚を移植し、高い分娩率および子豚生産率を達成した。

- ・本研究で実施したガラス化加温胚の非外科的移植法は、胚の長期保存と省力的かつ簡易な胚移植方法を組み合わせたものであり、胚移植技術を養豚産業の現場で実施できる技術に近づけた。

総括

本研究の目的は、遺伝資源の保存・再生および疾病伝搬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することである。特に、グローバル化により豚熱やアフリカ豚熱、口蹄疫などの伝染性疾病が世界的に拡大する中、この技術のニーズは高いと考えられる。そこで、養豚産業で利用しやすい胚移植技術を確立するため、第 1 章では簡易かつ効率的な排卵同期化技術の検討を行った。ブタの排卵同期化法は数多くあるが、簡単でコストがかからず、同期化可能な期間を長く設定できる上、ガラス化による超低温保存を想定した供胚豚へ適用できる方法は無かった。そこで、エストラジオールプロピオン酸エステル (EDP) や安息香酸エストラジオール (EB) といったエストロゲン製剤を投与することで黄体機能を延長させる偽妊娠を利用し、供胚豚の排卵同期化に応用可能か検討した。長期間の偽妊娠を誘起できることが判明している EDP を単回投与し (Noguchi et al. 2010, 2011, 2013)、投与から 15～25 日後に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 類縁体を、続いて eCG と hCG を投与することにより排卵同期化が可能であり、これまで供胚豚の排卵同期化法として使われてきた人工流産法 (Guthrie & Polge 1978; Love & Grey 1993) と同等の採胚成績が得られることが判明した。この方法は EDP の 1 回のみの投与で $\text{PGF}_{2\alpha}$ 類縁体に反応する黄体の延長が可能であることから、労働コストがかからず、動物福祉の観点からも適している。しかし、この方法は発情発見から同期化された発情までの間隔が最低 30 日となり、飼養コストおよび柔軟な採胚計画の設定のためには、より間隔を短くすることが効果的である。また EDP は動物薬として販売されていないといった課題が残った。そこで、第 2 章では、この方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、さらに養豚産業への適用を考慮し、動物用として市販されている EB を利用する方法も検討した。

EDP は持続性が高いことから単回の投与で確実な偽妊娠が得られることが判明しているが (Noguchi et al. 2010)、EB の単回投与では安定した偽妊娠を維持することが困難であることが報告されている (Geisert et al. 1987)。そこで、EB においては 1 回投与と 2 回投与の両方を検討した。この結果、EDP、EB1 回投与および EB2 回投与すべての場合において、投与から 10 日目の PGF_{2α} 類縁体とそれに続くホルモン投与により排卵同期化と胚採取が可能であり、その採胚成績は EDP 投与から 15 日目に PGF_{2α} 類縁体を投与した第 1 章の成績と同等であることを示した。このことから、例えば突然の伝染性疾病流行への対策として遺伝資源を緊急に保存しなければならない場合など、短い周期で胚を採取する際の排卵同期化法として EDP および EB のどちらも利用可能であり、また多数の供胚豚を短い期間に集中して同期化したい場合は長期間の偽妊娠も可能となる EDP を用いることができる。ただし EDP は血漿中の持続性が長いことから食肉への残留に、より注意を払う必要がある。また、EB は動物用製剤として販売されていることから獣医師による処方容易で、ブタへの適用に適していることが考えられる。これらエストロゲン製剤の長所短所を考慮し、養豚現場の状況に合わせた同期化法を選択することで、効率的で利便性の高い胚採取を実現できると考える。

第 3 章では、特別な設備や技術を必要とせず、簡単かつ安全に胚を非外科的に子宮浅部に移植可能な器具を開発し、これを用いたブタガラス化胚の移植に

よりその効果を検証した。ブタは、生まれつき長く曲がりくねった子宮を持って
いるために、胚移植では主に外科的手法が用いられてきた。しかし、外科移植で
は特別な設備や技術が必要なことから、これらが不要な非外科的な胚移植技術
が実用技術として注目されるようになってきた。近年、ガラス化し超低温保存を
行い、加温した胚(以下ガラス化加温胚)を子宮深部へ非外科的に移植すること
により、移植胚由来の子豚が得られている(Cuello et al. 2005; Gomis et al.
2012 ; Martinez et al. 2015)。しかし、これらの移植器具の操作には、子宮内
感染を避けるための非常に繊細な操作が必要である上、器具の管が非常に長く
取り扱いが困難であった。さらに、高い受胎率を得るには数多くの移植胚が必要
であった(Martinez et al. 2015)。こういった問題は、養豚農場で胚移植を実施
する際の致命的な課題であると考えられる。近年、三角ら(2020)は、ウシ用移植
カテーテルを改良した移植器具を用い、ガラス化加温胚を子宮浅部(子宮体部と
子宮分岐部)へ非外科的に移植することで60%の分娩率を達成した。この結果は、
子宮浅部へのガラス化加温胚の移植であっても、良好な成績が得られることを
示している。しかしこの方法で用いた移植器具は非弾性のステンレスで構成さ
れているため、非常に挿入しにくく、また挿入する際に受胎豚の生殖器を穿孔さ
せないための熟練した技術が必要であった。そこで、子宮浅部への胚移植を容易
にするため、外側ガイドカテーテルにインジェクターを取り付けた柔軟性のあ
る非外科的移植用カテーテルを開発し、試作品を用いその効果を挿入試験およ
び移植試験を通じて検証した。この結果、このカテーテルは、移植者に特別なト
レーニングを必要とせず、簡単に受胎豚へ挿入することが可能であり、さらにこ
れを用いたガラス化加温胚の子宮浅部への移植により高い繁殖成績(66.7%の分

娩率と 15.4%の子豚生産率)が得られることが明らかとなった。本研究で実施したガラス化加温胚の非外科的移植法は、胚の長期保存と省力的かつ簡易な胚移植方法を組み合わせたものであり、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。しかし、いまだ実験室で実施しているガラス化胚の加温作業や、低温でコールドショックを起こしやすいブタ胚を季節によって大きく変動する豚舎内温度に曝して非外科的移植を実施しなければならないなど、養豚産業での胚移植の普及には大きな課題が残っている。また、本研究で実証した排卵同期化法は供胚豚への適用のみを検討したところであるが、受胚豚への適用の可否はいまだ不明である。

現在、私たちは温度管理のされた室内で実施しているガラス化胚の加温や非外科的移植を温度管理のされていない生産現場(豚舎の中)で実施できる技術開発を目指している。さらに、本研究で確認した偽妊娠法を受胚豚へ適用し、外科的移植および非外科的移植を実施してその効果を調査しているところである。これらの検討をとおして養豚農家で実施できる胚移植技術が確立できれば、養豚産業への胚移植技術の導入は飛躍的に進み、現在問題となっている種豚導入による疾病伝播のリスクや遺伝資源消失に対する強力な対策となることに貢献すると考える。

謝辞

本研究論文をまとめるにあたり、終始ご指導を賜りました山口大学連合獣医学研究科 高木光博博士に心より感謝申し上げます。

学位論文審査においては、副査としてご指導いただきました、鳥取大学 菱沼貢博士、山口大学 日下部健博士ならびに谷口雅康博士に深謝いたします。

また、論文投稿から本研究論文の執筆まで、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜り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 動物機能利用研究領域 菊地和弘博士に心から感謝しお礼申し上げます。

筆者に、ブタの胚移植技術全般のほかに研究のアイデアをご教示いただき、常に傍で親身にご指導いただきました日本大学生物資源科学部動物資源科学科 三角浩司博士に心から感謝しお礼申し上げます。また、研究の推進にあたって、上司として、常に的確なご指導やご助言を下さり、また格別のご配慮をいただいた石川県立大学生物資源環境学部 橋谷田豊博士に心から感謝しお礼申し上げます。

また、ホルモンアッセイ法および研究内容についてご指導いただ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 病態研究領域 吉岡耕治博士、麻布大学獣医学部 野口倫子博士に心より感謝申し上げます。

今回、非外科的移植カテーテルを開発するにあたり、すばらしいアイデアと技術力でカテーテルを作製していただいた御澤弘靖氏に心から感謝しお礼申し上げます。

また、本研究の移植試験に使用するガラス化保存胚をご提供いただき、非外科的移植カテーテルの開発にご助力いただいた佐賀県畜産試験場 本山佐和子氏に心より感謝申し上げます。

胚移植に関して色々ご助言をいただき、特に非外科的移植時の鎮静剤についてご指導いただいた埼玉県農業技術研究センター中村嘉之博士に心より感謝申し上げます。

学位取得にあたり、上司としてご配慮およびご協力を頂きました家畜改良センター技術統括役 葛谷好弘氏、技術専門役 的場理子博士に心より感謝申し上げます。

本研究に限らず日頃より私と一緒に研究し、苦労を共にしてくださった独立行政法人家畜改良センター宮崎牧場の瀧下梨英氏、家畜改良センター管理課の江川紗智子氏、蓮田安信氏、大石進氏、鈴木聡氏、仁平祐一氏に心より感謝申し上げます。

本稿の一部は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）生物系特定産業技術研究支援センターの革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域プロジェクト）「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」の助成を受けて実施しました。

引用文献

Angel, M. A., Gil, M. A., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gomis, J, Parrilla, I., ... Martinez, E. A. (2014). An earlier uterine environment favors the in vivo development of fresh pig morulae and blastocysts transferred by a nonsurgical deep-uterine method. *The Journal of Reproduction and Development* 60, 371-376.

<https://doi.org/10.1262/jrd.2014-022>

Beebe, L. F. S., Cameron, R. D. A., Blackshaw, A. W., & Keates, H. L. (2005). Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer. *Theriogenology* 64, 879-890.

<https://doi:10.1016/j.theriogenology.2004.12.014>

Beebe, L. F., Bouwman, E. G., Mellfatrik, S. M., & Nottle, M. B. (2011). Piglets produced from in vivo blastocysts vitrified using the Cryologic Vitrification Method (solid surface vitrification) and a sealed storage container. *Theriogenology* 75, 1453-1458. [https://doi:](https://doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.043)

[10.1016/j.theriogenology.2010.11.043](https://doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.043)

Berthelot, F., Martinat-Botte, F., Locatelli, A., Perreau, C., & Terqui, M. (2000). Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 41, 116-124. <https://doi:>

10.1006/cryo.2000.2273

Berthelot, F., Venturi, E., Cognie, J., Furstoss, V., & Martinat-Botte, F. (2007), Development of OPS vitrified pig blastocysts: Effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. *Theriogenology* 68, 178-185.

Bolin, S. R., Runnels, L. J., Sawyer, C. A., Acheron, K. J., & Gustafson, D. P. (1981). Resistance of porcine preimplantation embryos to pseudo-rabies virus. *American journal of Veterinary Research* 42, 1711-1712.

Cameron, R. D. A., Beebe, L. F. S., Blackshaw, A. W., & Keates, H. L. (2004). Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *Theriogenology* 61, 1533-1543. [https://doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.09.003](https://doi:10.1016/j.theriogenology.2003.09.003)

Cuello, C., Gil, M. A., Parrilla, I., Tornel, J., Vazquez, J. M., Roca, J., ... Martinez, E. A. (2004). Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology* 62, 353-361. [https://doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.10.007](https://doi:10.1016/j.theriogenology.2003.10.007)

Cuello, C., Berthelot, F., Martinat-Botte, F., Venturi, E., Guillouet, P., Vazquez, J. M., ... Martinez, E. A. (2005). Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Animal Reproduction Science* 85, 275-286. [https://doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.039](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.039)

Dobrinsky, J. R. (2002). Advancement in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 57, 285-302. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00672-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00672-0)

Estill, C. T., Britt, J. H., & Gadsby, J. E. (1993). Repeated administration of prostaglandin F₂ α during the early luteal phase causes premature luteolysis in the pig. *Biology of Reproduction* 49, 181-185. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.1.181>

Fujino, Y., Kojima, T., Nakamura, Y., Kobayashi, H., Kikuchi, K., & Funahashi, H. (2008). Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 70, 809-817. [https://doi: 10.1016/j.Theriogenology.2008.05.045](https://doi.org/10.1016/j.Theriogenology.2008.05.045)

Galvin, J. M., Killian, D. B., & Stewart, A. N. V. (1994). A procedure

for successful non-surgical embryo transfer in swine. *Theriogenology* 41, 1279–1289. [https://doi: 10.1016/0093-691x\(94\)90486-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90486-3)

Geisert, R. D., Zavy, M. T., Wettemann, R. P., & Biggers, B. G. (1987). Length of pseudopregnancy and pattern of uterine protein release as influenced by time and duration of oestrogen administration in the pig. *Journals of Reproduction and Fertility* 79, 163–172. [https://doi: 10.1530/jrf.0.0790163](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0790163)

Gomis, J., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gil, M. A., Parrilla, I., Angel, M. A., ... Martinez, E. A. (2012). Non-surgical deep intrauterine transfer of super open pulled straw (SOPS)-vitrified porcine embryos: Evaluation of critical step of the procedure. *Theriogenology* 78, 1339–1349. [https://doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.035](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.035)

Guthrie, H. D. (1975). Estrous synchronization and fertility in gilts treated with estradiol-benzoate and prostaglandinF 2α . *Theriogenology* 4, 69–75.

Guthrie, H. D., & Polge, C. (1978). Treatment of pregnant gilts with a prostaglandin analogue, cloprostenol, to control oestrus and fertility. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52, 271–273.

<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0520271>

Hancock, J. L., & Hovell, G. J. R. (1962). Egg transfer in the sow. *Journal of Reproduction and Fertility* 4, 195-201.

Hazeleger, W., & Kemp, B. (1994). Farrowing rate and litter size after transcervical embryo transfer in sows. *Reproduction in Domestic Animals* 29, 481-487.

一般社団法人日本養豚協会. (2020). 繁殖・肥育等の成績(2018年8月1日～2019年7月31日). 養豚農業実態調査報告書(全国集計結果)令和元年度. pp. 20-22. 一般社団法人日本養豚協会, 東京.

Iwamura, S., Yoshioka, K., Suzuki, C., & Kamomae, H. (2001). Control of estrous cycle in pigs. *Journal of Reproduction and Development*, 47, j19-j26. (in Japanese).

James, J. E., James, D. M., Martin, P. A., Reed, D. E., & Davis, D. L. (1983). Embryo transfer for conserving valuable genetic material from swine herds with pseudorabies. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183, 525-528.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZR” (Easy R) for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48, 452-458. advance online publication 3 December 2012; [https://doi:10.1038/bmt.2012.244](https://doi.org/10.1038/bmt.2012.244)

Kashiwazaki, N. (1998). Preparation of the embryo donor. In T. Kojima (Ed.), *Manual on pig embryo transfer procedures*. pp. 22-31. Japan Livestock Technology Association, Fukushima.

Kvasnitsky, A. V. (1950). The research on interbreed ova transfer in pigs. *Socialist Livestock Breeding Journal* Nr 11, 12-15.

Li, J., Rieke, A., Day, B. N., & Prather, R. S. (1996). Technical note: porcine non-surgical embryo transfer. *Journal of Animal Science* 74, 2263-2268. <https://doi.org/10.2527/1996.7492263x>

Love, R. J., & Grey, R. G. (1993). Early abortion of gilts as a way of synchronizing oestrus and improving litter size. *Australian Veterinary Journal* 70, 452. [10.1111/j.1751-0813.1993.tb00849.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1993.tb00849.x)

Magnusson, U., & Fossum C. (1992). Effect of estradiol treatment of gilts on blood mononuclear cell functions in vitro. *American Journal of*

Veterinary Research 53, 1427–1430.

Martinat - Botte, F., Bariteau, F., Badouard, B., & Terqui, M. (1985). Control of pig reproduction in a breeding programme. *Journal of Reproduction and Fertility* Supplement, 33, 211-228.

Martinez, E. A., Caamano, J. N., Gil, M. A., Rieke, A., McCauley, T. C., Cantley, T. C., ... Day, B. N. (2004). Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 61, 137–146. [https://doi:10.1016/s0093-691x\(03\)00190-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00190-0)

Martinez, E. A., Angel, M. A., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gomis, J., Parrilla, I., ... Gil, M. A. (2014). Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24 hour culture in a chemically defined medium. *PLoS One* 9(8), e 104696. [https://doi:10.1371/journal.pone.0104696](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104696)

Martinez, E. A., Martinez, C. A., Nohalez, A., Sanchez-Osorio, J., Vazquez, J. M., Roca, J., ... Cuello, C. et al. (2015). Nonsurgical deep uterine transfer of vitrified, in vivo-derived, porcine embryos is as effective as the default surgical approach. *Scientific Reports* 5:10587. [https://doi:10.1038/srep10587](https://doi.org/10.1038/srep10587)

Men, H., Zhao, C., Si, W., Murphy, C. N., Spate, L., Liu, Y., ... Critser, J. K. (2011). Birth of piglets from in vitro-produced, zona-intact porcine embryos vitrified in a closed system. *Theriogenology* 76, 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.004>

Misumi, K., Suzuki, M., Sato, S., & Saito, N. (2003). Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 60, 253-260. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01364-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01364-x)

Misumi, K., Hirayama, Y., Egawa, S., Yamashita, S., Hoshi, H., & Imai, K. (2013) Successful production of piglets derived from expanded blastocysts vitrified using a micro volume air cooling method without direct exposure to liquid nitrogen. *The Journal of Reproduction and Development* 59, 520-524. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-045>

三角 浩司. 2014. 胚移植を用いた優良豚導入に関する研究. 博士論文. 山口大学大学院連合獣医学研究科. 山口.

三角 浩司, 江川紗智子, 御澤弘靖, 平山祐理 (2020). 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. *日本養豚学会誌* (印刷中)

Mito, T., Yoshioka, K., Yamashita, S., Suzuki, C., Noguchi, M., & Hoshi, H. (2012). Glucose and glycine synergistically enhance the in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium. *Reproduction, Fertility and Development* 24, 443-50. [https://doi:10.1071/RD11197](https://doi.org/10.1071/RD11197)

Nakazawa, Y., Misawa, H., Fujino, Y., Tajima, S., Misumi, K., Ueda, J., ... Kikuchi, K. (2008). Effect of volume of non-surgical embryo transfer medium on ability of porcine embryos to survive to term. *The Journal of Reproduction and Development* 54, 30-34. <https://doi.org/10.1262/jrd.19132>

Noguchi, M., Yoshioka, K., Kaneko, H., Iwamura, S., Takahashi, T., Suzuki, C., ... Itoh, S. (2007). Measurement of porcine luteinizing hormone concentration in blood by time-resolved fluoroimmunoassay. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69, 1291-1294. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.1291>

Noguchi, M., Yoshioka, K., Suzuki, C., Arai, S., Itoh, S., & Wada, Y. (2010). Estrus synchronization with pseudopregnant gilts induced by a single treatment of estradiol dipropionate. *The Journal of Reproduction*

and Development 56, 421-427. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-006T>

Noguchi, M., Yoshioka, K., Suzuki, C., Itoh, S., & Kaneko, H. (2011). An efficient protocol for inducing pseudopregnancy using estradiol dipropionate and follicular development associated with changes in reproductive hormones after prostaglandin F₂α treatment in pseudopregnant sows. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9, 157. <https://doi: 10.1186/1477-7827-9-157>

Noguchi, M., Kashiwai, S., Itoh, S., Okumura, H., Kure, K., Suzuki, C., & Yoshioka, K. (2013). Reproductive hormone profiles in sows on estrus synchronization using estradiol dipropionate and prostaglandin F₂α-analogue and the reproductive performance in female pigs on commercial farms. *The Journal of Veterinary Medical Science* 75(3), 343-348. <https://doi: 10.1292/jvms.12-0022>

Polge, C., & Day, B. N. (1968), Pregnancy following non-surgical egg transfer in pigs. *Veterinary Record* 82, 712.

Polge, C. (1982). Embryo transplantation and preservation. In D. J. A. Cole, & G. R. Foxcroft (Eds.), *Control of Pig Reproduction* (pp. 277-291). London: Butterworth Scientific.

Quinn, P., Barros, C., & Whittingham, G. (1982). Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 66, 161-168. [https://doi: 10.1530/jrf.0.0660161](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0660161)

Ratky, J., Brussow, K. P., Solti, L., Torner, H., & Sarlos, P. (2000). Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a Hungarian native pig breed. *Theriogenology* 56, 969-978. [https://doi: 10.1016/S0093-691X\(01\)00623-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00623-9)

Reichenbach, H. D., Modl, J., & Brem, G. (1993). Piglets born after transcervical transfer of embryos into recipient gilts. *The Veterinary Record* 133, 36-39. [https://doi: 10.1136/vr.133.2.36](https://doi.org/10.1136/vr.133.2.36)

Robertson, I., Nelson, R. E. (2009). Certification and identification of embryos. In: Stringfellow DA, Givens MD (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 4th Edition, pp.86-105. International Embryo Technology Society, Illinois.

Smith, C. A., Almond, G. W., & Esbenshade, K. L. (1992). Effects of exogenous estradiol-17 β on luteinizing hormone, progesterone, and

estradiol-17 β concentrations before and after prostaglandin F2 α -induced termination of pregnancy and pseudopregnancy in gilts. *Journal of Animal Science* 70, 518-524. [https://doi: 10.2527/1992.702518x](https://doi.org/10.2527/1992.702518x)

Spencer, T. E., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., & Bazer, F. W. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science* 82-83, 537-550. [https://doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.014](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.014)

Stringfellow, D. A. (2009). Recommendations for the sanitary handling of in vivo-derived embryos. In: Stringfellow DA, Givens MD (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 4th Edition, pp. 65-68. International Embryo Technology Society, Illinois.

Subcommittee of the International Embryo Transfer & Society Health and Safety Advisory Committee. (2009). Conclusions of the research. In: Stringfellow DA, Givens MD (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 4th Edition, pp. 129-130. International Embryo Technology Society, Illinois.

Ushijima, H., Yoshioka, H., Esaki, R., Takahashi, K., Kuwayama, M., Nakane, T., & Nagashima, H. (2004). Improved survival of vitrified in

vivo-derived porcine embryos. *The Journal of Reproduction and Development* 50, 481-486.

Wallenhorst, S., & Holtz, W. (1999). Transfer of pig embryos to different uterine sites. *Journal of Animal Science* 77, 2327-2329. <https://doi.org/10.2527/1999.7792327x>

Weitze, K. F. (1991). Long-term storage of extended boar semen. In: Johnson LA, Rath D (eds), *Boar Semen Preservation II*, Proceeding second international conference on boar semen preservation, pp. 231-253. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin.

White, K. L., Southern, L. L., Rickords, L. F., & Wood, T. C. (1988). Embryonic development and quality in cycling crossbred gilts following altrenogest synchronization and exogenous gonadotropin administration. *Theriogenology* 29, 326. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90154-9](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90154-9)

Wrathall, A. E. (1995). Embryo transfer and disease transmission in livestock. *Theriogenology* 43, 81-88. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00009-J](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00009-J)

Wright, J. M. (2009). Photographic illustrations of embryo developmental

stage and quality codes. In: Stringfellow DA, Givens MD (eds), Manual of the International Embryo Transfer Society, 4th Edition, pp.141-144. International Embryo Technology Society, Illinois.

Yonemura, I., Fijino, Y., Irie, S., & Miura, Y. (1996). Transcervical transfer of porcine embryos under practical conditions. *The Journal of Reproduction and Development* 42, 89-94. <https://doi.org/10.1262/jrd.42.89>

Yoshioka, K., Noguchi, M., & Suzuki, C. (2012). Production of piglets from in vitro-produced embryos following non-surgical transfer. *Animal Reproduction Science* 131, 23-29. [https://doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.01.018](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.018)

Zavy, M. T., Geisert, R. D., Buchanan, D. S., & Norton, S. A. (1988). Estrogen-induced pseudopregnancy in gilts: Its use in estrus synchronization and subsequent influence on litter response. *Theriogenology* 30, 721-732. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90307-](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90307-X)

X