

《特別研究報告(要約)》

体外生産胚を用いたブタの繁殖技術の効率化に関する研究

中村 嘉之\*

Efficiency of Porcine Reproduction Technology

by Using *in vitro* Produced Embryos

Yoshiyuki NAKAMURA

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

1 体外受精後の培養条件が胚の品質および子豚への発育能力に与える影響

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

体外成熟・体外受精直後に、受胚豚に移植し、5～6日まで体内で培養した移植-体内培養(以下ET-vivo)胚、体外培養液を2種類用いた体外培養方法で、0～2日目まで一般的に培養に使用されるグルコースの代わりに、ピルビン酸ナトリウム(Na-Pyruvate)と乳酸カルシウム(Na-Lactate)を添加した改良型 North Carolina University (NCNU)-37液で培養し、その後グルコースを添加して5～6日まで培養する方法で発育した体外培養(以下、IVC)胚と品質を比較した。その結果、総胚盤胞発生率は、5日目でET-vivoおよびIVCそ

れぞれ20.6%ならびに8.2%で、ET-vivo胚が有意に高く、6日目ではそれぞれ23.8%ならびに21.2%で有意差は認められなかった。また、5日目の早期胚盤胞における細胞数は、ET-vivo胚およびIVC胚で、それぞれ44.6個ならびに21.0個であり、胚盤胞の細胞数は、それぞれ89.2個ならびに21.0個で、有意にET-vivo胚が多く、6日目の胚盤胞においても、それぞれ94.4個ならびに49.9個で、有意にET-vivo胚が多かった。さらに、体外受精直後の体外生産胚(Day = 0)を外科的に受胚豚3頭に移植した場合と、体外受精後に6日間体外で培養した体外生産胚(Day = 6)を受胚豚3頭に外科的に移植(図1)した場合の受胎・分娩率は、それぞれ100%で、子豚への発育率はそれぞれ2.6%ならびに2.1%で有意な差は認められなかった。



図1 体外生産胚の外科的移植

\*品種開発・ブランド育成研究担当

以上のことから、これまで体外培養期間が延長すると胚盤胞発生率が低下し、子豚への発育率が悪くなると報告されていたが、改良 NCSU-37 液を用いた体外培養法は、細胞数が少ないなど品質は劣るが、胚盤胞発生率および子豚への発育能力に影響のない優れた体外培養方法であることを明らかにした (図 2)。



図 2 体外培養 6 日目の体外生産胚から誕生した子豚

## 2 様々な種雄豚の凍結精液を用いた体外受精後の胚品質と媒精条件の検討

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

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

## 3 単為発生胚の品質と凍結保存胚との共移植効果

ブタ単為発生胚 (以下 PA 胚) は、精子と体外受精しないで作製出来るが、体外受精後に体外培養

した IVC 胚との品質を比較した研究は少ない。そこで、卵巣から卵子を採取し、無作為に 2 つに分けて、PA 胚と IVC 胚を作製し、その品質を調査した。また、ガラス化冷却・超低温保存した体内由来の桑実胚 (以下 VM 胚) は、加温後の生存率および産子への発育率の低いことが報告されているため、これらの低発生能胚と PA 胚を共移植することで、受胎・分娩率および産子への発育率を向上させることが可能か調査した。

体外成熟・体外受精後に 6 日間体外培養を行った IVC 区と、電気刺激による人為的活性化処理後に 6 日間体外培養を行い単為発生させた PA 区に分け、両区の胚盤胞発生率、胚の直径、形態学的観察による胚の品質評価コード (国際胚技術学会マニュアルによる Code 1, 2 ならびに 3) および細胞数について調査した。初期胚盤胞の発生率は、IVC 区および PA 区でそれぞれ 8.3% ならびに 11.7% で有意に PA 区が高く、胚盤胞発生率はそれぞれ 8.2% ならびに 8.9% で有意差は認められず、総胚盤胞発生率も 16.6% ならびに 20.5% で有意差は認められなかった。

胚盤胞において、IVC 区と比較して PA 区が有意に Code 1 の割合が高かった (47.9% ならびに 62.8%)。また、胚盤胞の直径において、両区に有意差は認められなかったが、IVC 区および PA 区の細胞数は、初期胚盤胞でそれぞれ 30.4 個ならびに 25.7 個、胚盤胞で 50.2 個ならびに 37.4 個、総胚盤胞で 39.1 個ならびに 30.6 個で、全てにおいて IVC 区の細胞数が PA 胚より多かった。以上により、PA 胚の安定生産が可能であり、IVC 胚と直径が変わらず、形態学的観察による品質評価は優れているが、細胞数が少ないことが明らかになった。

次に、PA 胚の有効活用方法として、耐凍能が低く、加温後の生存性や移植した場合に産子への発育率の低いガラス化冷却・超低温保存した VM 胚と PA 胚の胚盤胞 (以下 PAB) を同時に 10 個ずつ移植 (計 20 個) した区 (VM+PAB 区)、VM 胚のみを 20 個移植した対照区 (VM 区)、それぞれ 5 頭ずつ発情同期化をした受胎豚に移植し、PA 胚の妊娠補助効果について検討した。

その結果、受胎率は、それぞれ 83% (4/5) ならびに 60% (3/5) で、VM 区の 1 頭が 4 頭の子豚を分娩し、

分娩率が 20%(1/5)であった。移植後の平均流産日はそれぞれ 42.5 日および 27.0 日で、VM+PAB 区が VM 区と比較して妊娠期間が長い傾向を示した( $p = 0.08$ )。このことから、PA 胚を共移植することで、分娩まで至らなかったが、受胎率が向上する傾向があり妊娠期間を延長する効果があることが明らかとなった。

#### まとめ

本研究において、体外受精および体外培養系を改良することで、優れた胚の安定生産が可能となった。

体外受精において、射出精子を用いる場合には、受精率や胚盤胞発生率は、採取した種雄ブタの個体により大きく異なることが明らかとなったが、体外受精時の媒精条件(媒精時間、カフェイン濃度ならびに精子濃度)を変えていくことで、胚盤胞発生率を 10%以上改善できることが分かった。このことから、用いる凍結精液の特性に合った媒精条件をその都度ロットごとに見出していくことで、これまで胚盤胞の発生が認められなかった凍結精液においても有効利用が出来る可能性が示唆された。また、これまで多くの研究者が、体外培養環境が胚の品質や子豚への発育率を低下させることを報告しているが、本研究で採用した体外培養方法を用いることで、6 日間体外培養を行っても、胚盤胞発生率や子豚への発育率に影響がないことを明らかにした。

一般的に胚を受胎豚に移植するためには、発情同期化を行い、胚の発育ステージに受胎豚の子宮の状態やホルモンバランスを合わせなければならないため、フィールドでは受胎豚の発情同期化がうまくいかない場合に良く直面する。そのため、せっかく作製した体外生産胚が無駄になるというきわめて残念な結果となる。しかしながら、本手法で作製した胚は体外成熟・体外受精後の 0~6 日まで発育能力を損なわずに移植が可能となるため、受胎豚の選択肢が広がり、有効活用が可能となった。今後、優良遺伝子の導入などフィールドで本技術を活用することで、胚の長距離輸送や複数の受胎豚に期日を隔てた移植が可能になるものと思われる。さらに、この体外培養系を用いて単為発生胚を作製することで、体外受精による精子

の影響を受けずに、安定的な生産が可能であることを明らかにした。

今回、体外培養 6 日目での比較を行ったが、体外培養 7 日目において IVC 胚ではほとんど発生してこないが(2.3%以下)、PA 胚では、8.2%の胚が新たに発生してきたことから(中村ら、未発表)、PA 胚は IVC 胚より長く、大量に活用出来ることが明らかになった。そして、PA 胚の胚盤胞の形態学的な評価は非常に優れていることが判明した。PA 胚は、胚盤胞腔内に変性細胞が IVC 胚より少ないことから、ガラス化保存後の生存性が IVC 胚より高かった(中村ら、未発表)。PA 胚の分裂速度や細胞増殖を向上させて細胞数を増やすことで、さらに耐凍性の高い胚が作製できる可能性が示唆された。

共移植実験では、VM 胚と PA 胚を共移植することで、流産までの妊娠期間が延長し、胚の着床および受胎を補助する可能性が示唆された。PA 胚は、正常受精胚と同様に伸長後、エストロジェンを分泌し、プロスタグランジンの局在を変化させることで、黄体を維持させて受胎を成立させているものと推察できるが、さらなる解析が必要である。

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

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

本報告は、山口大学大学院連合獣医学研究科獣医学専攻で獣医学博士の学位取得した学位論文を抜粋したものであり、詳細については山口大学学術機関リポジトリのウェブ上で閲覧可能である。