

トウキョウX体外受精卵の非外科的移植技術の確立

[平成 26～30 年度]

鈴木亜由美・椎名浩己・近藤穂高*・吉岡耕治*²・岡田幸之助*³

(畜産技術科・*²動物衛生部門・*³日獣大) *現三宅支庁

【要 約】正常受精率の高い媒精精液の選定および後期発生培地への LR-BSA 添加により品質が向上したトウキョウX移植胚と、同様に作出した交雑種胚との共移植で、2例の受胎・分娩例が得られた。

【目 的】

これまでの研究でトウキョウX体外受精卵の作出条件を検討し、また体内受精卵の凍結保存ならびにその移植による産子生産が実証され、ブタの新たな生産技術が検討されてきた。トウキョウXにおいては体外受精卵を実際に母豚へ移植するには至っておらず、また体内受精卵の移植方法は外科的手法であり、施設や技術を要するため実用的ではない。今回、移植に供する高品質な体外受精卵の安定した発生系を確立することを第一の目標とする。作出した体外受精卵はこれまでの外科的移植に代わり、ブタ受精卵の非外科的移植用を開発されたカテーテルを用いて非外科的に移植し、受胎・分娩を目指す。

【成果の概要】

1. 卵胞切出し法による胚盤胞の発生率と品質向上

トウキョウX体外受精胚を効率的に作出するため、卵母細胞へのダメージが少なく発生率が高いとされる卵胞切出し法を検討した。採取した卵丘-卵母細胞複合体は 40～41 時間体外成熟した後、 $1.7\sim 3.4\times 10^5/\text{mL}$ に調整した凍結-融解精液で 6 時間媒精し、発生培養に供試した。卵子回収液および成熟培養、媒精、発生培地は、(株)ペプチド研究所の製品を用いた。媒精日を発生 0 日目とし、発生 7 日目に実体顕微鏡下で観察し、初期胚盤胞以上のものを採取した (図 1)。これらを 4%パラホルムアルデヒドで固定、蛍光色素 (4',6-diamidino-2-phenylindole) で染色した。蛍光顕微鏡下で細胞数を測定し、20 個以上を胚盤胞として発生率を算出した (図 2)。注射針-注射筒で卵胞から複合体を吸引する方法 (吸引法) と胚盤胞発生率を比較した結果、卵胞切出し法は吸引法よりも発生率が有意に高く、また発生した胚盤胞のうち、拡張胚盤胞の割合も向上した (表 1)。発生した胚盤胞の細胞数は、吸引法では平均 34.0 個に対し、切出し法は 50.2 個だった (表 2)。卵胞切出し法で得られた全胚盤胞の 45.9%が細胞数 50 個以上であり、うち 100 個以上のものも少数ながら観察された (表 2)。

2. 媒精精子数の違いによる胚盤胞発生率の比較

前年の発生試験において、媒精時の精子数と胚盤胞発生率に弱い負の相関 ($r=-0.32$) が認められたため、精子数の違いによる発生率への影響を検討したが、発生が安定せず、再現性はなかった (データ記載なし)。

3. 体外受精卵の発生率向上の検討

これまでのトウキョウX体外受精卵の発生培養条件を見直し、成熟培養時間や媒精時間および精子数を変更した。成熟培養時間はこれまでの 41～42 時間から 44 時間とし、

媒精時の最終精子数は $1 \times 10^5/\text{mL}$ から $1 \times 10^6/\text{mL}$ 、媒精時間を 17～21 時間としたところ、発生開始後 7 日目における胚盤胞発生率は向上したが、胚盤胞の平均細胞数に有意な差はみられなかった (表 3)。一方、これまでは発生開始 5 日目における胚盤胞の発生はごくわずかだったが、今回の培養条件変更により発生率が向上した (データ記載なし)。まだ十分な個数ではないが、卵母細胞を 300 個程度供試すれば、移植 1 回あたりに最低限必要な胚盤胞数 (20 個程度) が作出できると考えられた。

4. 体外受精卵の非外科的移植実証

安定した胚盤胞発生率の培養系が確立されたため、トウキョウ X 体外受精卵を母豚に移植し、受胎・分娩を目指した。トウキョウ X 種雌豚を受卵豚とし、ホルモン製剤の投与により移植日に発情開始 6 日目となるよう調整して、胚日齢 5 日目の胚盤胞 (拡張胚盤胞～初期胚盤胞を含む) を子宮角深部注入カテーテル (匠: 富士平工業) を用いて非外科的に移植した。のべ 5 頭の受卵豚に移植を試みたが、いずれも不受胎だったため、媒精に用いた凍結精液を検証した。その結果、これまで使用していた種雄豚 No. 9389 の凍結精液は正常受精率が低いことが示されたため、他種雄豚の凍結精液を検証し、精子侵入率が高く正常受精率が高い種雄豚 No. 9323 を見出した (表 4)。これまでの移植胚は異常受精が多くを占めていた可能性が示され、これが不受胎の一因と考えられる。このことから、通算 6 回目以降の移植試験では、種雄豚 No. 9323 の凍結精液を用いて作出した体外受精卵を移植したが、受胎には至らなかった。原因追究のため、三元交雑種卵子を用いてトウキョウ X 卵子との精子侵入率および胚盤胞発生率を比較したところ、精子侵入率および正常受精率に差はなかったが、発生した胚盤胞の細胞数は三元交雑種卵子が有意に多いことが共同研究者により示された (表 5)。このことから、トウキョウ X 卵子は他品種よりも発生が遅く、発生能力が低い可能性があると推定された。

5. 共移植によるトウキョウ X 体外受精卵の受胎・分娩

発生能力がより高いと考えられる交雑種由来胚を共移植することにより、トウキョウ X 胚の着床促進を検証した。また移植胚の品質向上を目的に、発生開始 4 日目に Lipid-Rich BSA (ALBUMAX I, Thermo Fisher Scientific, SUZUKI et al. (2016)) を 1 mg/mL 添加した後期発生培地 (PBM: 機能性ペプチド研究所) に卵子を移して 24 時間培養したところ、発生 7 日目胚盤胞の細胞数が有意に増加し、発生率も向上することが確認された (表 6)。トウキョウ X 胚単独、または三元交雑種由来胚との共移植を実施した結果、共移植した 2 例が受胎・分娩に至った (表 7)。このことから、発生能力が高い交雑種由来胚の存在が、トウキョウ X 胚の着床に関与した可能性が高いと考えられる。分娩 2 例の産子は体毛色からトウキョウ X と推定される個体が複数いるが (図 3, 4)、最終的には遺伝子検査により判定する (2019 年実施予定)。一方、着床・受胎への機序は不明であり、解明が必要である。

【残された課題・成果の活用・留意点】

共移植によるトウキョウ X 胚の着床・受胎にかかる機序解明とともに、トウキョウ X 胚の単独移植による受胎・分娩の検証が必要である。また凍結保存した体外受精卵の移植実証により、実用性が高まる。

【具体的データ】

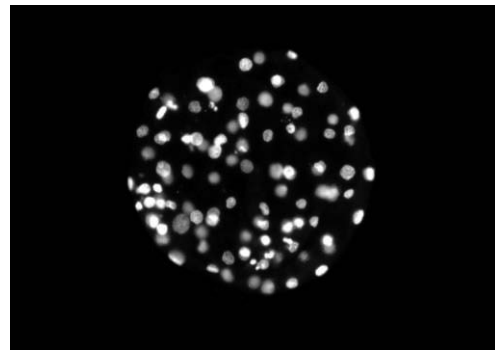
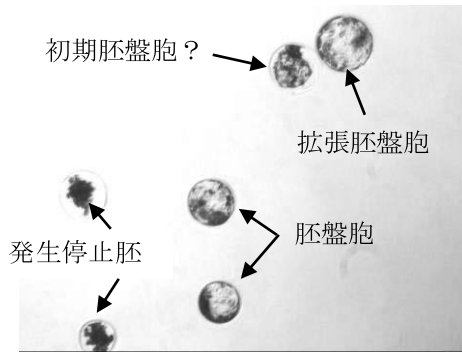


図1 初期胚盤胞～拡張胚盤胞(発生7日目)

図2 蛍光染色した胚盤胞(発生7日目)

表1 卵丘-卵母細胞複合体の採取法の違いによる胚盤胞発生率の比較

採取法	供試卵母細胞数	分割 (%) (発生2日目)	胚盤胞(発生7日目)	
			総合 (%)	拡張 (%)
吸引法	455	215(47.3)	25(5.5)	12(2.6)
卵胞切出し法	463	283(61.1)	46(9.9)	30(6.5)
χ^2 -test		P<0.01	P<0.05	n. s.

n. s. 有意差なし

表2 胚盤胞の細胞数比較

採取法	供試胚盤胞数	平均細胞数*	最大細胞数	細胞数50以上(%)**	細胞数100以上(%)**
吸引法	7	34.0±11.5	53	-	-
卵胞切出し法	87	50.2±23.6	116	40(45.9)	4(4.7)

*平均値±標準偏差 **吸引法は供試数が少ないため算出せず

表3 培養条件の変更による発生率の向上(7日目)

培養方法	成熟培養	媒精時間	最終精子数	供試卵子(個)	胚盤胞(%)	細胞数(個)
旧	41~42	6	1×10 ⁵ /mL	762	16(2.1)	46.8±25.2
新	44	17~21	1×10 ⁶ /mL	1316	106(8.1)	39.9±17.5
χ^2 -test					P<0.01	

表4 媒精精液の比較

種雄豚 No.	供試卵母細胞(個)	侵入率(%)	正常受精率(%)
9389	414	25.0	17.1
9323	1299	48.1	28.6

表5 他品種豚卵子との発生比較(発生6日目)

卵巣由来豚	供試卵母細胞(個)	胚盤胞(%)	細胞数
三元交雑種	130	34(26.2)	39.2±14.0 ^a
トウキョウX	52	12(23.1)	31.5±6.5 ^b

異符号間に有意差あり (P<0.05)

表6 LR-BSA添加による胚盤胞発生率（発生7日目）

区	供試卵母細胞*(個)	胚盤胞(%)	細胞数
LR-BSA添加PBM	82	35(42.7) ^a	65.3±30.8 ^a
PBMのみ	84	9(10.7) ^b	29.9±8.4 ^b

*トウキョウX 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表7 体外受精卵の非外科的移植の結果

移植回	媒精時間	移植胚(個)				発生率(%) (初期胚盤胞含む)	受卵豚の 発情調整	移植後 妊娠 日数	産子 内訳** (頭)
		品種*	初期胚盤胞	胚盤胞	拡張胚盤胞				
1	17.8	X:29	(記録なし)			8.1	偽妊娠法	-	-
2	19.5	X:18	11	6	1	10.6	PGF _{2α} 連続投与法	-	-
3	8.0	X:29	9	16	4	29.3	離乳後発情	-	-
4	8.0	X:20	12	8	0	11.0	離乳後発情	-	-
5	17.0	X:22	5	12	6	15.5	偽妊娠法	-	-
6	6.0	X:34	13	22(拡張胚盤胞含)		19.4	偽妊娠法	-	-
7	6.0	X:32 雑:18	10 4	16 5	6 9	30.2 17.1	離乳後発情	109	X:4, 雑:2 (黒子:1)
8	4.0	X:48	12	17	19	24.9	離乳後発情	-	-
9	4.0	X:26 雑:29	6 6	10 14	10 9	17.7 24.8	離乳後発情	110	X:9 雑:0
10	4.0	X:17	1	10	6	8.6	離乳後発情	-	-
11	4.0	X:22	7	10	5	12.2	離乳後発情	鑑定中	-

*X=トウキョウX, 雑=三元交雑種由来卵にトウキョウX精液を媒精して作出

**体毛から推定



図3 1例目受精卵移植産子



図4 2例目受精卵移植産子

【発表資料】

1. 鈴木亜由美 (2018) 豚の繁殖衛生セミナー通信 44: 32-33