

## 5. 今後期待される技術開発

## 5. 今後期待される技術開発

今回紹介した方法は、採卵農場、移植農場ともに開腹手術が実施できる施設が必要であり、さらに新鮮胚で輸送するため、胚の輸送範囲が限定される。そのため、牛の胚移植のように凍結胚を国家間で取り引きし、農家の庭先で移植できる技術には至っていない。今後、豚の胚移植を普及させるには以下の技術開発が必要と思われる。

- 1) 胚の長期保存技術の高位安定化
- 2) 非外科的な採卵移植技術（特に非外科的移植技術）の高位安定化
- 3) 同一供胚豚からの連続採卵技術および過剰排卵技術の高位安定化

特に牛のように胚の長期保存技術が確立すれば、胚の輸送範囲が格段に広がる。さらに、採卵直前と採卵1ヶ月後に供胚豚の衛生検査を実施し、この期間、供胚豚が疾病に感染していないことが証明できれば、採取した胚の安全性を保証できると考えている。

そこで、家畜改良センターでは今回の胚輸送に用いている5日目胚のガラス化保存技術の開発に取り組んだので、参考として紹介する。

### 【豚胚の超急速ガラス化保存】

ガラス化保存法の長所は、高濃度の耐凍剤に曝した胚を急速に冷却するため、緩慢凍結法で最も危惧される低温傷害や氷晶による物理的ならびに化学的傷害が生じないことが挙げられる。逆に問題点として胚が高濃度の耐凍剤による化学的毒性とガラス化液への平衡・希釈時の浸透圧ショックに曝されることがあげられる。さらに最近では、従来のガラス化保存法よりもガラス化時の液量を少なくすることで、冷却・融解速度を早くする超急速ガラス化保存法が開発され、その方法の一つであるオープンプルドストロー（OPS）法によって、これまでガラス化保存が困難だった桑実胚や初期胚盤胞においても、細胞内の脂肪滴を処理せずに胚が保存できることが報告<sup>9)</sup>された。

OPS法と同様、超急速ガラス化保存法の1つにマイクロドロプレット法がある。マイクロドロプレット法が、牛未受精卵子の融解後の生存性を高めるのに有効という報告<sup>9)</sup>はあるが、豚胚に応用した例はこれまでなかった。今回、我々は、マイクロドロプレット法を応用して5日目胚（収縮桑実胚～初期胚盤胞）のガラス化保存法の検討を行った。

ホルモン処理後に人工授精した雑種雌豚より、5日目齢の収縮桑実胚～初期胚盤胞を採取し、検卵後直ちにES1、ES2の順に5分間ずつ平衡後、ESPに胚を移し、直ちに少量のガラス化液と共に胚をパスツールピペットに吸った。ガラス化は、家畜改良センター独自の方法で、ピペット先端にガラス化液の小滴を形成した後、液体窒素内にピペットごと胚を直接浸漬させて行った（図1）。融解時は38℃のDS1にガラス化した小滴を投入し、その後、DS1、DS2、DS3、NCSU23の順に5分ずつ希釈した（ES1、ES2、ESP、DS1、DS2、DS3は表1参照）。

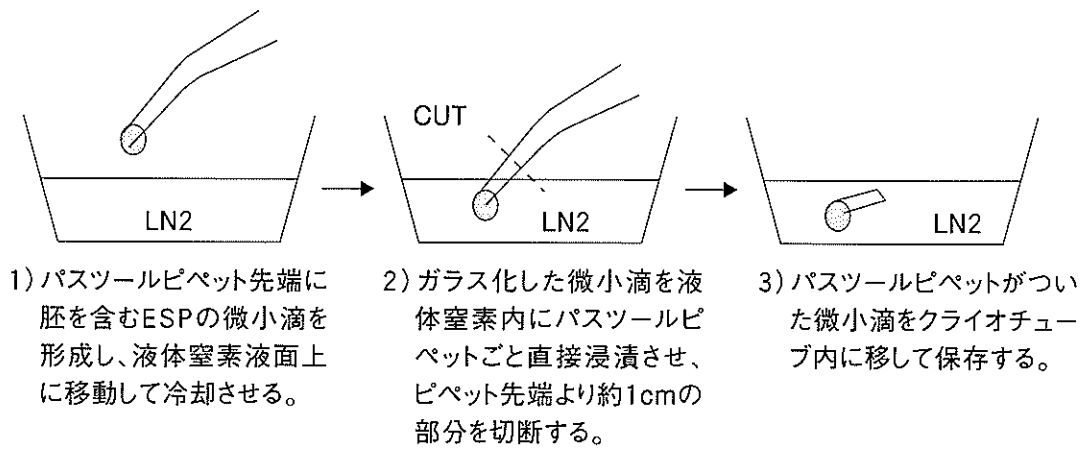


図1 ガラス化保存法

表1. ガラス化液及び融解・希釈液

平衡液及びガラス化液	融解及び希釈液
ES1 (M2 + 10% EG)	DS1 (NCSU23 + 5% EG + 0.6 M Suc)
ES2 (M2 + 10% EG + 0.3 M Suc + 1% PEG)	DS2 (NCSU23 + 2.5% EG + 0.3 M Suc)
ESP (M2 + 40% EG + 0.6 M Suc + 2% PEG)	DS3 (NCSU23 + 0.3 M Suc)
	NCSU23

\*EG : エチレングリコール, Suc : ショ糖, PEG : ポリエチレングリコール

融解後の胚は、5%CO<sub>2</sub>、39℃のインキュベーター内で10%FBS（牛胎子血清）を添加したNCSU23で培養した。その結果、融解した胚23個中、24時間後に21個（91.3%）が胚盤胞以降に発育し、48時間後に14個（60.9%）が脱出胚盤胞まで発育した（表2及び図2）。

## 5. 今後期待される技術開発

表2. ガラス化保存胚の融解後の体外培養成績

	胚数	生存数(個)		脱出胚盤胞数
		24 h 後	48 h 後	48 h 後
MD	23	21 <sup>ab</sup>	16 <sup>cd</sup>	14 <sup>e</sup>
ST	20	14 <sup>a</sup>	10 <sup>c</sup>	4 <sup>f</sup>
Control	20	20 <sup>b</sup>	19 <sup>d</sup>	16 <sup>eg</sup>

\*MD: マイクロドロプレット区, ST: ストロー区, Control: 5日目新鮮胚

\*ガ二乗検定 a-b, e-f ( $p < 0.05$ ), c-d, f-g ( $p < 0.01$ ) に有意差あり

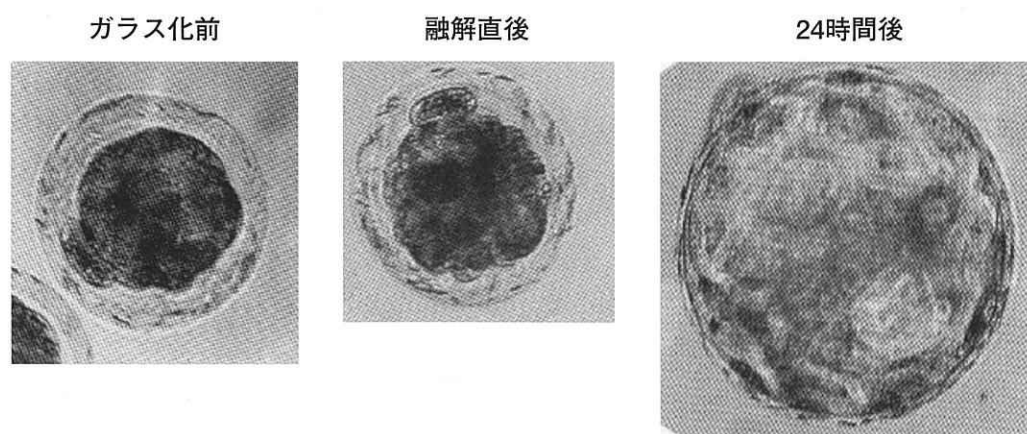


図2 体外培養経過

次に5頭の受胚豚に計171個のガラス化保存胚を融解直後に移植した結果、2頭の受胚豚から17頭の子豚が生まれた(残りの3頭は流産した。表3及び図3)。今回の結果から、細胞内の脂肪滴を除去するなどの前処理を行わなかった5日目胚(収縮桑実胚~初期胚盤胞)でもガラス化保存時にマイクロドロプレット法を用いることでガラス化・融解後に正常な子豚に成長することが明らかになった。

表3. ガラス化保存胚の移植成績

受胚豚 No.	移植胚数	受胎結果	子豚頭数 (子豚生産率)	備考
1	36	+	0 (0)	26日目流産
2	35	+	0 (0)	36日目流産
3	35	+	0 (0)	31日目流産
4	35	+	11 (31.4)	
5	30	+	6 (20.0)	
計	171		17 (9.9)	



図3. ガラス化胚由来産子

