

## 豚胚の簡易移植技術の確立（第2報）

### —豚体外受精胚のガラス化保存法—

渡辺晃行，根本聰実，山口大輔，垂澤圭二郎<sup>1</sup>

Cryopreservation of in Vitro-Produced Pig Embryos by The Vitrification Method

Akiyuki WATANABE, Satomi NEMOTO, Daisuke YAMAGUCHI, Keijiro NIRASAWA

### 要 約

と畜場由来の豚卵巣より未成熟卵子を回収し、体外成熟・体外受精を行なった。5日および6日間体外発生培養を行い胚盤胞を形成したものについてガラス化保存を行った。加温後24時間体外培養を行い生存性を検討した結果、5日よりも6日の胚の生存率が高かった。全細胞数では若干6日目胚の方が多かったが、生存細胞数においてはほとんど差が見られなかった。ただし、同時期の体内発生胚の細胞数に比べ少ないことが示唆された。

キーワード：豚体外受精胚，ガラス化保存

### 緒 言

豚胚の移植は、豚群の清浄化または疾病伝搬を防止しながら新しい血統を導入する場合に有効である。しかし、豚の生体由来胚の移植は、外科的方法による胚の回収と注入を伴うため、術後の癒着等で豚の再利用が非常に困難となっている。手術には専用の設備等が必要なため、胚の広域利用が難しく農家で胚移植を利用することは困難である。また、豚胚は耐凍性が低く凍結融解後の生存性に問題があるため保存しにくい上、また移植の実用化のための研究にはかなりの数の胚を確保する必要がある。最近、屠場材料から低成本・省労力で作製できる体外生産胚の高品質化が確立された。本研究では、この体外生産胚を利用して豚胚の凍結保存方法の検討をおこなった。これをもとに非外科的であり簡易な移植技術の開発と確立を目指す。

### 材料および方法

#### 1. 体外受精卵子の回収および成熟培養

Kikuchi et al (2002)<sup>1)</sup>の方法により体外生産胚を作出した。と畜場にて豚卵巣を探取し35℃に加温

1 現（独）農業技術研究機構 畜産草地研究所

したPBS（-）に入れ、約30分かけて運搬した。研究室に到着後再度PBSにより洗浄し、卵巣門を切開し血液を除去した。シャーレに回収液(TCM199液)と卵巣を入れ手術用メスにより卵胞を切開し卵子を回収液に出し、卵丘細胞が十分に付着した卵丘卵子複合体を回収した。体外成熟培養は4穴シャーレ（約50個/1穴）で行った。成熟培養液は修正NCUS-37で、はじめの20時間をホルモンとdbcAMPを含んだもので、続く24時間はそれらを含まない培養液で成熟培養をおこなった。39℃、5%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の気相条件で行った。

#### 2. 体外受精

体外受精用の精子は液体窒素で保存されている精巣上体精子を使用した。37℃の温水に20秒間浸水させ融解後、10%FCS 加 TCM-199(pH 7.8)で洗浄し、同液で15分間前培養した。受精培養液はPig-FMを使用した。成熟培養後の卵丘卵子複合体を取り出しPig-FMで数回洗浄後、80μlのPig-FMドロップに卵丘卵子複合体を移し(10~20個/1ドロップ)、精子数を調整した精子を1ドロップにつき10μl入れた(最終濃度=1×10<sup>6</sup>/ml)。39℃、5%CO<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>で3時間媒精を行った。

#### 3. 胚の発生培養

体外受精後、発生培養液(NCUS-37 IVC-

Pru+Lac)で洗浄し卵子を裸化後、同液にて38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>の気相条件下で2日間培養した。2日目から5および6日目はNCUS-37 IVC-Gluに入れ、同じ気相条件で培養を行なった。

#### 4. 胚盤胞の凍結・融解

5日ないし6日間体外発生培養した胚盤胞をDinnyes et al (2000)<sup>2)</sup>の手法でガラス化保存を行った。融解は37°C, 0.4MTrisのNCUS-37 IVC-Glu-Hepesで1分, 0.2M, 0.1M, 0.05Mの順に2分間平衡していき、その後37°C, NCUS-37 IVC-Glu-Hepesで24時間培養し生存性を調べた。

#### 結果および考察

ガラス化保存後24時間の培養後の生存性を調べ、ガラス化保存の適期について検討した結果、発生のより進んだ6日目胚の胚盤胞生存率の方が高かった(表1)。しかしながら、胚ごとに全細胞数と生存細胞数を計数したところ、6日のほうが全細胞数はやや多い傾向を示したが、生存細胞数でほとんど差が無かった(表2)。6日目の胚盤胞の全細胞数については、体内発生胚の同時期の細胞数(約70個)比べ少なかった。

これらの結果から、ガラス化保存・加温後の生存性については、実用化に向けてさらなる改良が必要であると考えられた。また体外生産胚の細胞数の少ない点から、体外生産胚の耐凍性についても検討を加える必要がある。

表1 ガラス化保存後24時間の加温後の胚盤胞形成率

	胚数	加温後胚盤胞形成数	割合(%)
5日目胚	62	3	4.84
6日目胚	120	13	10.83

表2 ガラス化保存後24時間の加温後の生存細胞数

(平均±S.E.)

	胚数	全細胞数	生存細胞数	生存細胞割合(%)
5日目胚	57	20.65±1.33	5.21±1.11	20.67±3.52
6日目胚	63	23.35±1.26	5.29±1.05	20.62±3.34

#### 謝 辞

本試験の実施に当たり豚胚体外受精およびガラス化保存法のご指導ならびにご助言をいただいた独立行政法人農業生物資源研究所遺伝資源研究グループ生殖質保全研究チーム菊地和弘主任研究官に深謝いたします。

#### 引用文献

- 1)菊地ら (2002) BIOLOGY OF REPRODUCTION 66, 1033 - 1041
- 2)Andras Dinnyes et al (2000) BIOLOGY OF REPRODUCTION 63, 513-518