

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292184

研究課題名(和文) ブタ胚の非外科的移植における胚死滅と流産防止による受胎促進技術の開発

研究課題名(英文) Improvement of reproductive efficiency by the prevention of pregnancy loss on non-surgical embryo transfer in pigs

研究代表者

吉岡 耕治 (YOSHIOKA, KOJI)

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・ユニット長

研究者番号：20355192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,600,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ胚の非外科的移植では移植後2～3日目の排卵後6日目以降に胚が死滅する頻度が高いことが判明した。しかし、移植胚と人工授精胚におけるEGF様成長因子および受容体ファミリーの遺伝子発現に差は認められず、胚移植における早期妊娠喪失はこれらの遺伝子発現とは関連していないことが示唆された。アポトーシスを示す細胞の割合は移植胚では人工授精胚に比べ有意に高く、移植胚ではアポトーシスの出現頻度が高いことにより胚死滅が起きていることが示唆された。非外科的移植における移植胚数を増やすことで、受胎成立に必要な生存胚の数が確保され、受胎性が向上するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In porcine non-surgical embryo transfer (ET), the frequency of embryonic mortality increased significantly at 2 or 3 day after ET, which is from 6 days after ovulation. However, since there are no significant differences in mRNA levels of EGF like growth factor and ErbB receptor families between ET embryos and artificially inseminated (AI) embryos, it was suggested that early pregnancy loss was not associated with difference in their gene expression levels. Proportion of apoptotic cells in ET embryos was significantly higher than that in AI embryos. Thus, high incidence of apoptosis may cause embryonic mortality after ET. When 40 blastocysts were transferred non-surgically into recipients, their pregnancy rate was significantly higher compared to when 25 blastocysts were transferred. It may suggest that increased numbers of ET embryos maintain the number of alive embryos required for pregnancy establishment in recipients.

研究分野：獣医学

キーワード：臨床繁殖 ブタ 胚移植 胚死滅

1. 研究開始当初の背景

遺伝的能力に優れた雌畜から受精卵(胚)を取り出し、それらの胚を他の雌畜(代理母)の子宮を借りて一時に多数の子畜を生産することのできる受精卵(胚)移植(ET)は、ウシでは子宮頸管を経由して子宮内へカテーテルなどの器具を挿入することにより、非外科的に採胚および胚移植操作を行う方法が確立されているが、ブタの子宮は長く蛇行しており、子宮頸管はらせん構造を持つため、採胚および胚移植は開腹手術により外科的に行う必要があった。そのため、養豚農家で胚移植によって子ブタを生産するシステムは未だ確立されていない。

体外生産胚の非外科的移植における問題点は、受胎率の低さと分娩率のさらなる低下であり、これらは妊娠鑑定前の胚死滅と妊娠鑑定を行った後の着床完了前の流産に起因すると考えられる。受胎率の向上と流産防止による分娩率および産子数の改善のためには、胚死滅要因の解明と少数生存胚でも妊娠を維持させることが可能な技術の開発が重要である。ブタでは、胚の透明帯からの脱出(孵化)後の伸長から着床にかけて、上皮成長因子(EGF)様成長因子や、それらをリガンドとする ErbB 受容体ファミリーなどの発現が大きく変化することが知られている。体外発生培地の改変は、胚の増殖分化能を向上させることが期待できるが、このように作製した体外生産胚における移植後の生存性や EGF 様成長因子や ErbB 受容体ファミリーなどの着床関連因子の発現が、人工授精後の胚とどの程度異なっているのかは不明である。そのため、胚移植後の胚について、EGF 様成長因子やその受容体の発現動態およびアポトーシスの出現頻度を解析し、胚の死滅時期および要因を精査することは、胚移植の受胎率改善に有効であると考えられる。

ブタにおいて、本来、胚から分泌され、母体の胎子認識機構に關与するエストロジェンを外因性に投与すれば、黄体が退行せずに妊娠黄体のように存続する偽妊娠状態を誘起できる。非外科的胚移植において、胚移植後の持続性エストロジェン(EDP)投与は受胎性の改善、とりわけ流産防止に貢献する可能性がある。

2. 研究の目的

ブタにおける非外科的胚移植技術の高度利用のため、体外生産胚を用いて、移植した胚の死滅が起こりやすい時期と死滅に關与する因子の同定を行い、胚死滅率および流産率の低減による分娩率および産子数の改善を図り、生産現場で活用可能な胚移植技術を開発する。すなわち、移植後の胚死滅が高頻度に起こる時期を特定し、その過程における EGF 様成長因子やその受容体など着床関連因子の発現動態やアポトーシスの出現頻度を解析して、胚死滅要因を明らかにするとともに胚移植後の EDP 投与による流産防止効

果について検証し、ブタ胚の非外科的移植における妊娠成立機構の解明を通じた受胎促進技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

成分既知完全合成培地を用いて食肉処理場由来卵巣から採取したブタ卵子は既報により体外成熟および体外受精を行った¹⁾。体外受精後の胚は卵丘細胞を除去したのち、porcine zygote medium (PZM)-5 で媒精後 5 日目まで培養し、体外生産胚盤胞を作製した²⁾。

(1) 胚の孵化率を向上させることができる血清代替物(KSR)のブタ後期胚の体外発生培地(porcine blastocyst medium; PBM)³⁾への添加が体外培養中の胚の着床関連因子(*FATP4*、*L-CPT1*、*uPA*、*tPA*、*EGF*、*AR*、*HB-EGF*、*EGFR*、*ErbB2*、*ErbB3*、*ErbB4*)の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、それぞれの mRNA を定量的 PCR 法により解析した。

(2) ブタ胚の体外発生培地(PBM)への ErbB3 のリガンドであるニューレグリン添加が、体外受精後 6~7 日目の胚盤胞の生存率、孵化率および細胞数に及ぼす影響を調べた。

(3) 胚移植後の EDP 投与による流産防止効果を検証するに先立ち、人工授精(AI)を施した豚の排卵後 9~12 日目のいずれかに 10 mg EDP を 1 回投与して、分娩成績を調べた。

(4) 体外受精後 5 日目の体外生産胚盤胞 25 個は、子宮深部注入カテーテル⁴⁾を用いて排卵後 4 日目のレシピエントの子宮内へ非外科的に移植した。移植後 1、2、および 3 日目(排卵後 5~7 日目)に子宮灌流により胚を回収した。また、対照として AI を施した同時期の胚も同様に回収した。胚の回収率を算出するとともに、回収した胚は、それぞれの大きさを測定し、EGF 様増殖因子ファミリーおよびその受容体の mRNA 発現量の変化を調べた。

(5) 体外受精後 5 日目の体外生産胚盤胞 25 個は、子宮深部注入カテーテルを用いて排卵後 4 日目のレシピエントの子宮内へ非外科的に移植し、移植後 1 日目に子宮灌流により胚を回収した。対照として AI を施したブタの排卵後 5 日目に子宮灌流により胚を回収した。回収胚の形態は Grade 1~4 に分類した。回収胚はヘキスト、アネキシン V およびヨウ化プロピジウムで蛍光染色し、移植胚のアポトーシスの出現頻度を人工授精胚と比較した。

(6) 体外受精後 5 日目の体外生産胚盤胞 25 あるいは 40 個は、子宮深部注入カテーテルを用いて排卵後 4 日目のレシピエントの子宮内へ移植し、移植胚数による受胎成績の違いを比較した。

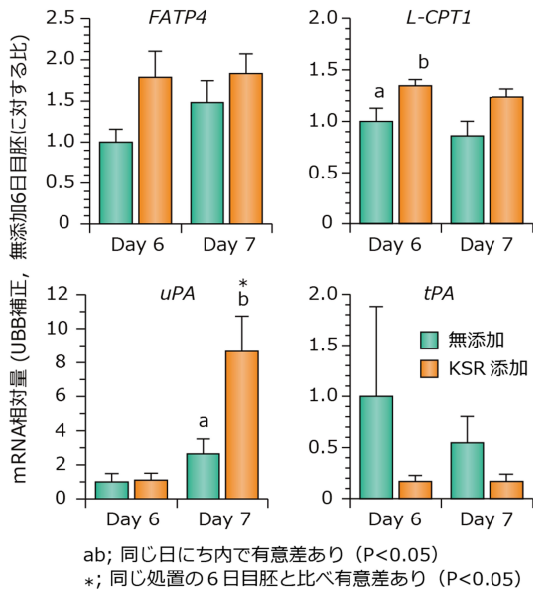


図 1. 媒精後 5 日目から PBM および KSR 添加 PBM で培養した胚盤胞における脂質代謝関連因子およびプラスミノゲン活性化因子の mRNA 発現量

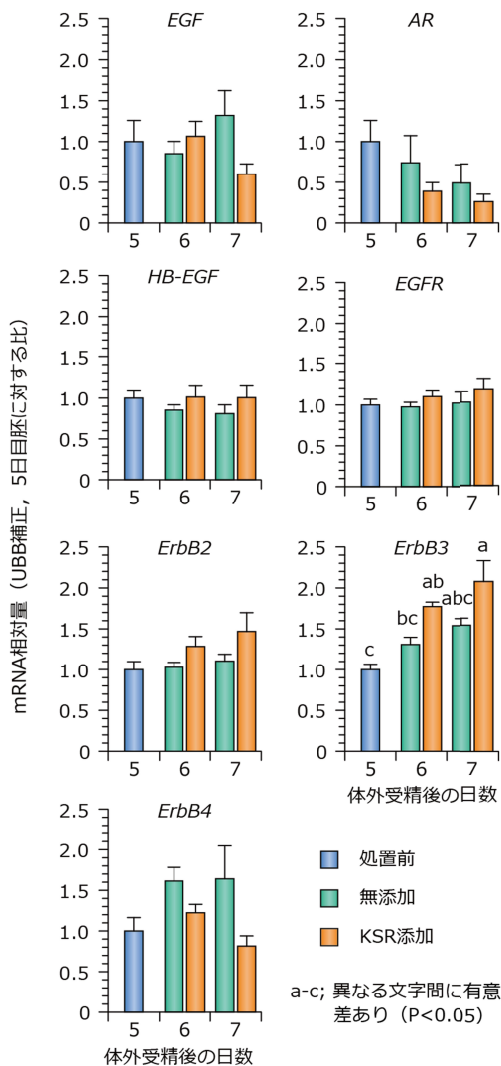


図 2. 媒精後 5 日目から PBM および KSR 添加 PBM で培養した胚盤胞における EGF 様成長因子および受容体の mRNA 発現量

4. 研究成果

(1) 体外受精後 6 日目の *L-CPT1* および体外受精後 7 日目の *uPA* の mRNA 量は、KSR 添加により無添加に比べ高い値を示し、体外発生培地への KSR 添加は、これらの遺伝子発現を増加させることにより胚の孵化を促進している可能性が示唆された (図 1)。体外発生培養における胚盤胞の孵化に伴って *ErbB3* の遺伝子発現量は増加し、KSR を添加して培養した体外受精後 6 および 7 日目胚における *ErbB3* の mRNA 量は、5 日目胚に比べ有意に高値を示した (図 2)。しかし、その他の因子の mRNA 量は差を認めなかった。

(2) 体外生産胚盤胞をニューレグリン添加培地で培養したところ、ニューレグリンは体外培養において胚盤胞の生存性を向上させることが判明した。しかし、孵化率および胚の細胞数に有意な差は認められなかった (図 3)。

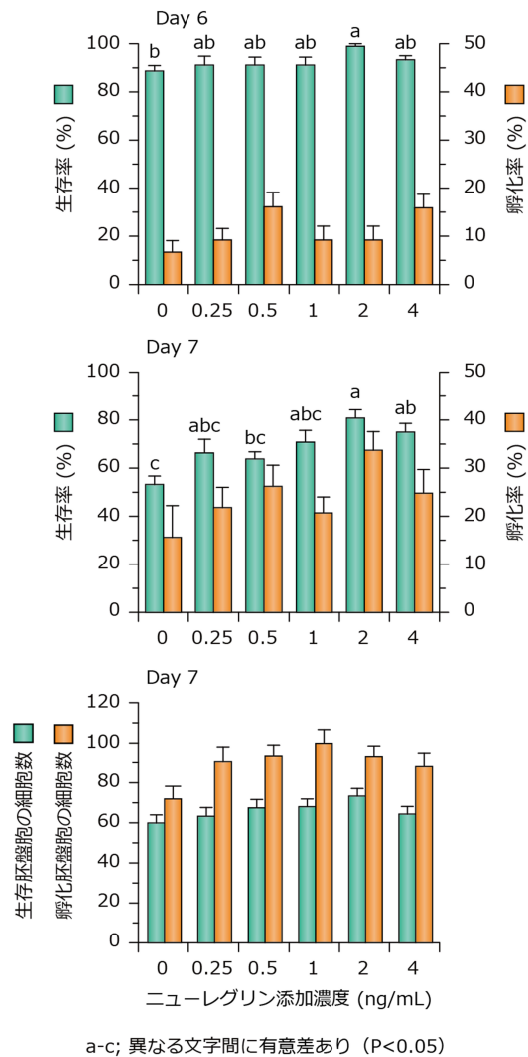


図 3. 媒精後 5 日目からのニューレグリン添加がブタ体外生産胚盤胞の発生に及ぼす影響

(3) 分娩率、妊娠期間、産子数に EDP 処置による有意な差は認められなかった (表 1)。しかし、生存産子の生時体重は排卵後 9 また

は 10 日目に EDP を処置した場合、無処置および排卵後 11 日目に EDP を処置した場合に比べ、有意に小さく、排卵後 9~10 日目の EDP 処置は母体あるいは胎子に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

表 1. 人工授精後の持続性エストロゲン製剤 (EDP) 処置が分娩成績に及ぼす影響

EDP 処置	供試頭数	分娩率 (%)	妊娠期間* (d)	総産子数*	生存産子	
					数*	生時体重* (kg)
無処置	4	100	113.5 [0.3]	8.5 [2.1]	8.5 [2.1]	1.42 ^a [0.06]
排卵後 9 日目	3	100	116.3 [1.3]	8.7 ^s [3.9]	8.7 [3.9]	1.18 ^b [0.04]
排卵後 10 日目	4	75	113.3 [0.9]	11.3 [0.3]	10.7 [0.3]	1.14 ^b [0.05]
排卵後 11 日目	3	100	115.3 [0.3]	5.0 ^s [1.2]	4.7 [1.2]	1.49 ^a [0.11]
排卵後 12 日目	4	100	114.0 [0.7]	10.5 [1.8]	10.3 [1.9]	1.33 ^{ab} [0.04]

* 平均 [SEM].

^s 頭蓋骨形成不全 1 頭.

^{ab} 同一列内の異なる文字間に有意差あり (P<0.05).

(4) ET における排卵後 6 日目の回収胚の割合は AI に比べて有意に低く、7 日目にはさらに低下した。ET における生存胚の割合は AI に比べて有意に低かった (図 4)。また、排卵後 6 日目の ET の生存胚の大きさは、AI に比べて小さく、ET では移植後 2~3 日目に胚が死滅する頻度が高いことが判明した。しかし、移植胚と人工授精胚における EGF 様増殖因子および受容体ファミリーの遺伝子発現に差は認められず、胚移植における低受胎性はこれらの遺伝子発現とは関連していないことが示唆された。

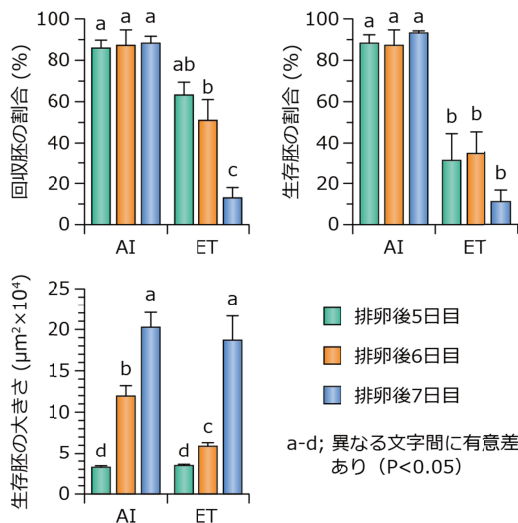


図 4. 人工授精 (AI) あるいは胚移植 (ET) 後の胚の回収成績および生存胚の大きさ

(5) ET における移植後 1 日目 (排卵後 5 日目) の形態が良好 (Grade1 または 2) な胚の割合は、50%であり、AI の 91% に比べて有意に低

かった。胚の総細胞数は、移植胚と人工授精胚で差を認めなかったが、アポトーシスを示す細胞の割合は回収胚全体および形態良好胚のいずれにおいても、移植胚では人工授精胚に比べ有意に高く、移植胚ではアポトーシスの出現頻度が高いことにより胚死滅が起きていることが示唆された。

(6) 移植胚数を 40 個とした場合、受胎率は 25 個に比べ有意に高かった (表 2)。また、一腹あたりの平均産子数は多い傾向が認められ、移植胚数を増やすことにより、受胎成立に必要な生存胚の数が確保され、受胎性が向上するものと考えられた。

表 2. 異なる移植胚数によるがブタ体外生産胚の非外科的移植

移植胚数 [1 頭あたり]	移植頭数	受胎頭数 (%)	分娩頭数 (%)	総産子数	1 頭あたり産子数*	子豚生産効率 (%) ^s
375 [25]	15	5 [†] (33.3) ^a	4 (26.7)	20	5.0 [0.6]	5.3
400 [40]	10	7 ^{††} (70.0) ^b	5 (50.0)	33	7.0 [1.1]	8.8

* 平均 [SEM].

^s 産子数 / 移植胚数 (%). [†] 1 頭流産. ^{††} 1 頭流産.

^{ab} 同一列内の異なる文字間に有意差あり (P<0.05).

< 引用文献 >

Mito T., K. Yoshioka, M. Noguchi, S. Yamashita and H. Hoshi (2013) Recombinant human follicle-stimulating hormone and transforming growth factor- α enhance in vitro maturation of porcine oocytes. Mol. Reprod. Dev. 80: 549-560.

Suzuki C and K. Yoshioka (2006) Effects of amino acid supplements and replacement of polyvinyl alcohol with bovine serum albumin in porcine zygote medium. Reprod. Fertil. Dev. 18: 789-795.

Mito T., K. Yoshioka, S. Yamashita, C. Suzuki, M. Noguchi, and H. Hoshi (2012) Glucose and glycine synergistically enhance in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium. Reprod. Fertil. Dev. 24: 443-450.

Yoshioka K., M. Noguchi and C. Suzuki (2012) Production of piglets from in vitro-produced embryos following non-surgical transfer. Anim. Reprod. Sci. 131: 23-29.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Sakagami N., K. Nishida, K. Misumi, Y. Hirayama, S. Yamashita, H. Hoshi, H. Misawa, K. Akiyama, C. Suzuki and K. Yoshioka (2016) The relationship between oxygen consumption rate and viability of in vivo-derived porcine embryos vitrified by the micro volume air cooling method. Anim. Reprod. Sci. 164: 40-46. (査読有)

Noguchi M, K. Yoshioka, H. Hikono, C. Suzuki and Kikuchi K (2015) Effect of semen extenders on frozen-thawed boar sperm characteristics and distribution in the female genital tract after deep intrauterine insemination in sows. Anim. Reprod. Sci. 163: 164-171. (査読有)

Somfai T., K. Yoshioka, F. Tanihara, H. Kaneko, J. Noguchi, N. Kashiwazaki, T. Nagai and K. Kikuchi (2014) Generation of live piglets from cryopreserved oocytes for the first time using a defined system for in vitro embryo production. PLoS One 9: e97731. (査読有)

Sakurai M., C. Suzuki and K. Yoshioka (2014) Effect of knockout serum replacement supplementation to culture medium on porcine blastocyst development and piglet production. Theriogenology 83: 679-686. (査読有)

吉岡 耕治 (2013) ブタ体外生産胚の移植による子ブタ生産. 日本胚移植学雑誌. 36: 115-121. (査読有)

Mito T., K. Yoshioka, M. Noguchi, S. Yamashita and H. Hoshi (2013) Recombinant human follicle-stimulating hormone and transforming growth factor- α enhance in vitro maturation of porcine oocytes. Mol. Reprod. Dev. 80: 549-560. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

吉岡 耕治 ブタの繁殖技術 ～畜産研究から実験用ブタへの橋渡し～. 第3回日本先進医工学ブタ研究会 2015.10.16 日本大学会館(東京都千代田区)

Yoshioka K. and C. Suzuki. Establishment of practical embryo transfer for fresh or frozen embryos in pigs. NARO International Symposium on Cutting-Edge Reproductive Technologies and Perspectives for their Usage in Swine. 2014.6.7 Tainan (Taiwan).

吉岡 耕治, 櫻井 優広, 野口 倫子, 鈴木 千恵 ブタ体外生産胚の非外科的移植におけるレシピエントへの持続性エストロゲン投与の影響. 第20回日本胚移植研究会、第29回東日本家畜受精卵移植技術研究会、第32回北海道牛受精卵移植研究会合同研究発表大会 2013.8.13 北海道大学(北海道札幌市)

〔図書〕(計2件)

吉岡 耕治 (2014) 家畜人工授精講習会テキスト 第5章2「豚の妊娠と分娩」. 社団法人家畜改良事業団, 社団法人日本家畜人工授精師協会. 260-278.

吉岡 耕治 (2014) 動物臨床繁殖学 第7章「胚移植および関連技術」. 朝倉書店. 127-154.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 耕治 (Yoshioka, Koji)

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 病態研究領域研究領域・ユニット長

研究者番号: 20355192

(2) 研究分担者

鈴木 千恵 (Suzuki, Chie)

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 企画管理部・チーム長

研究者番号: 50414735

(平成27年度まで研究分担者)