博士論文

電気化学的呼吸量測定による豚胚の客観的評価と胚移植による種豚生産システムの開発に関する研究

坂上信忠

平成 28 年 9 月

目　次

はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
第Ⅰ章　我が国の養豚産業の現状・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
第Ⅱ章　豚胚の呼吸量測定による胚の客観的評価法の検討・・・・・・・・・ 5
　第Ⅰ節　緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
　第Ⅱ節　材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
　第Ⅲ節　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
　第Ⅳ節　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14
第Ⅲ章　MVAC 法を用いてガラス化保存した豚体内発育胚の加温後の呼吸量とその後の生存性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17
　第Ⅰ節　緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17
　第Ⅱ節　材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18
　第Ⅲ節　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21
　第Ⅳ節　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・24
第Ⅳ章　豚体内発育胚の輸送方法の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・26
　第Ⅰ節　緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26
　第Ⅱ節　材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27
　第Ⅲ節　結果および考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
第Ⅴ章　種豚を効率的に生産するシステムの開発・・・・・・・・・・・・・41
　第Ⅰ節　緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42
　第Ⅱ節　材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42
　第Ⅲ節　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
　第Ⅳ節　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・48
第Ⅵ章　総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51
参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・55
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・63

はじめに

本論文は、豚胚移植を活用した種豚生産システムを開発することが目的である。そのためにまず、我が国の養豚産業の現状および豚胚移植の現状を挙げ、豚胚における種豚導入の必要性と課題を述べる（第Ⅰ章）。次いで、その課題解決の手法として、受胎率向上をめざし豚胚の品質を電気化学的呼吸量測定により客観的に評価する手法を検討し（第Ⅱ章）、さらに、より安全性の高いガラス化保存法（第Ⅲ章）および輸送法（第Ⅳ章）を評価するために呼吸量測定を活用することを検討し、これらをもとに種豚を効率的に生産するシステムを開発する（第Ⅴ章）。また、当研究対象動物（*Sus scrofa domesticus*）の正式標記和名は「ブタ」であるが、豚肉や種豚などとの統一性を図るために、本論文中では「豚」を使用する。

第Ⅰ章　我が国の養豚産業の現状

農林水産省生産局資料によると、豚肉の生産は農業総産出額のうち畜産の占める割合（30.4%）の約 20.7%、5,367 億円を占めており、ここ数年の食肉消費量（H25 年度 1.672 千トン）は、増加傾向である。また、H25 年度の国民一人あたりの豚肉消費量は 11.8kg となっており、食肉消費量合計の 29.8kg/年の 1/3 を占めている。

需給の推移では、BSE の発生や高病原性鳥インフルエンザの発生に伴う牛肉、鶏肉の代替需要により、平成 16 年までは増加しその後一時減少したが、平成 18 年度からは横ばいで推移している。生産量はやや増加傾向で推移し、自給率は近年、重量ベースで 50%前後、カロリーベースでは 7%前後で推移している。このように豚肉は鶏肉と並んで国民の生活に対して重要な地位を占めている。

また、平成 27 年 10 月にはアトランタ閣僚会合において、環太平洋経済連携協定（TPP）の大筋合意に至っている。現在の豚肉の関税制度は、価格帯別に三つの仕組みがあり、安い肉ほど高い関税がかかり輸入しにくくなっている（差額関税制度）が、TPP 協定発効後は、高価格帯の 4.3%の関税を 2.2%に引き下げ、発効から 10 年目に撤廃することになっている。また、ソーセージなどに使う低価格帯も 1 キロ 482 円の関税が 10 年目に 50 円まで引き下げられることになる。さらに、輸入が急増したときには関税を引き上げる緊急輸入制限（セーフガード）を設定するが、それも 12 年目以降はなくなることから、今後 10 年以内の豚肉を巡る情勢は厳しいものが考えられる。東大鈴木宣弘教授の報告（全国農協中央会委託調査研究）では、TPP の関税撤廃・削減で国内の農林水産物の生産額が一兆円超減るという試算がなされている。またその報告では、豚肉については生産量減少率 70%、減少額 46 百億円と試算されており、今後の動向として、銘柄豚は残るがその他は海外製品に置き換わると予測している。このような情勢を考えると、養豚農家は産地間競争における差別化などを進め、ブ

ランド化を進めるなど、より一層の努力が必要と考えられる。

一方、国内の豚の飼養頭数はここ数年、970 万頭前後で推移しているが、飼養戸数は減少を続け平成 26 年では 5,300 戸となる一方で、一戸当たりの平均飼養頭数は着実に増加し 1,800 頭を超えており、養豚農場が年々大規模化してきていることが伺がえる。

また、国内の豚肉の生産状況を見てみると、一般的な養豚場では、豚肉として出荷される肉豚は子豚を生産するための母豚（種雌豚）と種雄豚を交配して生産される。農林水産省畜産統計によれば、種雌豚は平成 26 年度で全国に約 89 万頭、種雄豚は約 4 万 8 千頭飼育されている。農水省畜産物生産費調査では、平成 24 年の肥育豚 1 頭あたりの生産費は、32,179 円で平成 22 年から配合飼料価格の上昇とともに増加傾向にある。このような背景の中で、養豚農家は収益性を維持するため、さらなる生産コストの削減と高い生産性が得られる経営を展開しなければならない。そのためには、様々な努力が必要と考えるが、その 1 つとして種豚を安定的に導入し活用する技術が必要と考えられる。

現在、肉豚の生産農場では、産肉や繁殖能力に優れた血統の種豚を外部から生体で導入し、種雄豚と種雌豚を交配し生まれた子豚を肥育することにより豚肉の生産を行っている。しかし、生体での種豚の導入は外部からの疾病伝搬や導入豚の馴致失敗などのリスクを伴うことから、胚移植による種豚導入が可能になれば、そのリスクを大幅に軽減することが可能と考えられる。そのためこれまでに世界中の多くの研究者が豚胚移植について研究を進めてきたが、豚は子宮角が長く、胚の採取は外科的な手法が必要であるため、外科手術が可能な限定された施設でしか胚採取を行うことができない。つまり、生産現場で豚胚移植を行うためには、採取した胚を農場に輸送して同期化した受胚豚に移植する手法をとるか、または一度超低温保存した後に加温して生産現場に輸送して移植する必要がある。さらに豚胚は輸送や低温に感受性が高いため、輸送や凍結が困難であることも問題となっている。

以上の状況を勘案すると、豚胚による種豚導入システムを開発することができれば、大きな経済効果が期待できると考えられる。そこで本研究ではまず、豚胚の受胎率を向上させるため、豚胚の品質を呼吸量測定により客観的に評価する手法を検討し、さらに、より安全性の高いガラス化保存法および輸送法について呼吸量を測定することで検討し、これらをもとに種豚を効率的に生産するシステムを開発することとした。

第Ⅱ章　豚胚の呼吸量測定による胚の客観的評価法の検討

第Ⅰ節　緒論

胚の品質を的確に評価することは、移植胚の選別や移植後の胚の受胎率の向上にきわめて重要である。現在、胚の品質評価は、主に形態観察により行われているが、この方法は観察者の主観により判定結果が影響を受ける可能性がある。一方、胚品質の客観的評価として、生存細胞の識別[1]、ブドウ糖の取り込み[2]、炭酸ガス発生量[3]等の代謝活性や、胚の酸素消費量の測定による方法が報告されている[4-7]。しかし、これらの方法は、単一胚の測定が困難なことや、胚を薬品等で処理するため、胚の生存や発育に悪影響を与える可能性がある。

ミトコンドリアは酸化的リン酸化反応（呼吸）により酸素を消費し、細胞活動に必要なエネルギー（ATP）を産生していることから、細胞呼吸活性は胚の品質評価の有力な指標になると考えられる[8]。最近、ミトコンドリアによる呼吸（酸素消費）を指標とする胚の品質評価法がいくつか報告されている[8-14]。さらにウシでは、胚の呼吸量がその後の生存率や受胎率と関連していることが報告[10,12,13]されている。しかし豚胚の呼吸量を測定して[15-17]その後の生存性を調査した報告[15,16]は少ない。

ミトコンドリアは、胚発生過程において機能成熟に伴う形態変化を示す[18]。ウシ胚では、ミトコンドリアは桑実胚から胚盤胞にかけて顕著な形態的発達（クリステの拡張）を示すことが報告されている[18]。また、呼吸活性はミトコンドリアの発達に対応した変化をすることも明らかになっている[10-13,15-17]が、胚の品質を評価するためにどの時点での測定が最も有効であるかは特定されてない。Lopes ら[13,14]は、ウシ体外生産胚において、2 時間毎に胚の呼吸量を測定し、呼吸量が桑実胚まで低く推移し、そこから拡張胚盤胞になるまでの過程で急激に増加することを報告している。Shiku ら[9]はウシ体外生産胚に

おいて桑実胚の呼吸量を測定し、その後の透明帯からの脱出を確認したところ、桑実胚で呼吸量が 0.5（$\times.5^{-14}$ mol s^{-1}）以上の胚では脱出率が 68%（13/19）であり、0.5 以下の胚の 0%（0/9）と比較して高いことを報告しており、桑実胚での呼吸量の評価も可能なことが示唆される。しかしながら豚体内発育胚においては、呼吸量とその後の培養についての報告は未だ無い。

そこで本試験では、後期桑実胚から拡張胚盤胞までの豚体内発育胚の呼吸量を測定し、呼吸量と胚の発育段階、細胞数との関係および培養後の発育性、受胎性との関係について調査し、呼吸量による胚の客観的評価について検討した。

第Ⅱ節　材料および方法

供胚豚および胚回収法

実験は、神奈川県畜産技術センター動物実験規定に基づく動物実験委員会の承認を経て行った。また、使用薬剤については、国産のものは省略した。

供胚豚は、25 頭の春機発動前の豚（大ヨークシャー種、中ヨークシャー種、ランドレース種）を用いた。胚の回収は既報[15,19]を若干修正して行った。すなわち、供胚豚の耳根部に eCG（ピーメックス, 三共製薬）1,500 単位を筋肉内注射し、72 時間後に hCG（プベローゲン, 三共）500 単位を筋肉内注射することによって過剰排卵処置を施した。供胚豚への人工授精は、hCG 投与翌日の午後と翌々日の午前中に行い、最初の人工授精後 5 日目もしくは 6 日目の午前中にイソフルラン（4～5%）吸入麻酔下で開腹手術を施し、子宮角内を豚卵子・胚回収液[20]（POE-CM, 株式会社機能性ペプチド研究所）で灌流して胚を回収した。これらの胚は試験開始まで豚発生用培地（PZM-5, 機能性ペプチド研）を用い[21]、5%CO_2、5%O_2、38.5℃で保存した。

形態的評価

胚は倒立顕微鏡下（倍率200 倍）で観察し、正常胚および変性胚、未受精卵

に区分した。正常胚はさらに発育段階および変性細胞の割合等の形態的評価による品質判定を行い、顕微鏡用デジタルカメラおよび付属ソフト（DXM1200F およびACT-1, ニコン）で胚直径を測定し、IETS マニュアル[22]に基づく Code 1の胚を試験に供した。

呼吸量の測定

胚の呼吸量は受精卵呼吸測定装置（HV-405, 機能性ペプチド研）により Abe ら[14,18]の方法に準じて測定した。測定液（ERAM-2, 機能性ペプチド研）で満たした測定プレート（RAP-1, 機能性ペプチド研）内の円錐形ウェルの底部に胚を静置した後、白金微小電極を胚近傍に移動した。白金微小電極を、酸素が還元可能な-0.6 V *vs* Ag/AgCl に電位を保持した後、移動速度 30.0 µm/sec、走査距離 160 µm の条件に設定し、コンピューター制御により胚近傍の異なる 2 箇所を白金微小電極で Z 軸（上下）方向に自動的に走査し呼吸量（酸素消費量）を測定した。胚の呼吸量の算出は球面拡散理論式[9]に基づき、専用の解析ソフトを用いて行った。個々の胚の測定時間は約 1 分である。

細胞数の計測

一部の胚は Thouas ら[23]の方法により内細胞塊（ICM）と栄養外胚葉（TE）の膜透過性の違いを利用して細胞を染め分けた。0.2 %（v/v） Triton X-100 と 0.1 mg/ml propidium iodide（P4170, Sigma, USA）を含む PBS-PVA に60秒間静置した。次に、25 µg/ml bisbenzimide（Hoechst 33342, Calbiochem, San Diego, USA）を添加したエタノールに移し、4 ℃に少なくとも3時間遮光保存して固定と染色を行った。染色後、胚を退色防止剤（SlowFade S2828, Invitrogen, USA）で数回洗浄し、スライドガラスへ載せ、カバーガラスで封入した。染色した胚の観察は蛍光倒立顕微鏡（TE-300, ニコン）により実施した。U 励起波長のフィルター（365 nm の励起波長、400 nm のバリアフィルター）

で観察し、青色（bisbenzimide）で染まったICMの核と、ピンク色（propidium iodide）に染まったTEの核数をそれぞれ計数した。

実験計画

試験１： 豚体内発育胚の呼吸量と発育段階および細胞数との関係

人工授精後5日目の後期桑実胚（D5CM：n=29）および人工授精後6日目の胚(D6胚, 初期胚盤胞; n=8, 胚盤胞; n=27, 拡張胚盤胞; n=39）の呼吸量を測定し、形態的評価と呼吸量との関係を調査した。別のD6の胚盤胞（D6BL）26個は呼吸量を測定したのちに細胞数を計数し、呼吸活性として100細胞あたりの呼吸量を算出した（呼吸活性＝呼吸量÷細胞数×100）。

試験２ :豚体内発育胚の培養後の呼吸量と細胞数

D6BL（n=36）を二つのグループに分け、20個の胚は呼吸量を測定後、すぐに細胞数を計数し、残り16個の胚は、呼吸量測定後、リプロプレートと豚後期胚培養用培地[24]（PBM, （株）機能性ペプチド研）を用いて個別に低酸素培養し、24時間後にその細胞数を計数した。

試験3 :豚体内発育胚の呼吸量とその後の発育性

D5CM 33個とD6BL 38個の呼吸量を測定し、リプロプレートとPBMを用いてD5CM は48時間、D6BLは24時間、個別に低酸素培養し透明帯からの脱出状況を観察した。

統計処理

データの統計処理は、コンピューター統計処理ソフトSPSS（SPSS 16.0J .User's　Guide, SPSS Inc. Tokyo）を用いた。胚の呼吸量は、一元配置分

散分析による検定後に Tukey の HSD 法により多重比較を行った。細胞数と呼吸量の相関については、ピアソンの相関係数を利用した。危険率5%（$P<0.05$）未満を有意差ありと判定した。また、透明帯から脱出した胚と脱出しなかった胚の呼吸量を説明変数とし、線形判別関数により判別確率のクロス表により判別率を算出した。

第Ⅲ節　結果

試験1 :豚体内発育胚の呼吸量と発育段階および細胞数との関係

採取した D5CM（n=29）の呼吸量（酸素消費量：$\times 10^{-14}$ mol s^{-1}）は0.58±0.03であった。D6胚の呼吸量は、初期胚盤胞（EB, n=8）で0.56±0.13、胚盤胞（BL, n=27）で0.87±0.60、拡張胚盤胞（EXB, n=39）で1.13±0.07と胚の発育の進行に従って高まり（図１）、D6胚の EXB の呼吸量は、EB と比較して有意に高かった。また、各発育段階の胚の直径を見ると、D6胚において発育段階に応じて胚直径が有意に大きくなった（図２）。

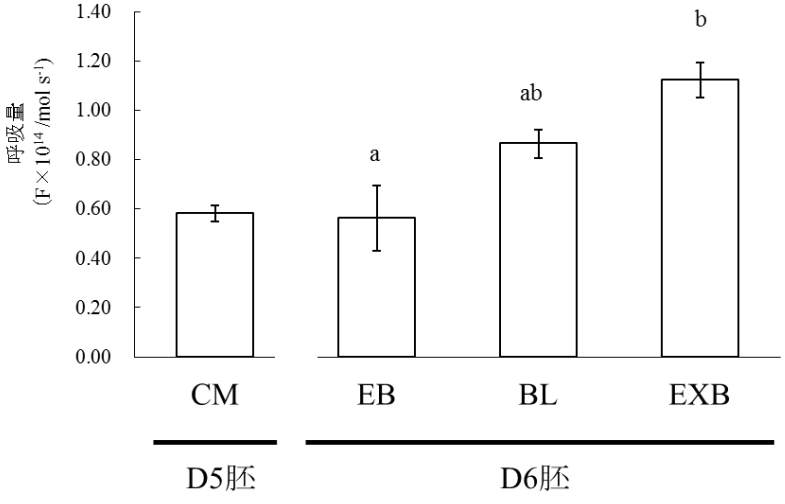

図１　豚体内発育胚の発育段階別の呼吸量

a,b：異符号間に有意差有り　（$P<0.05$）

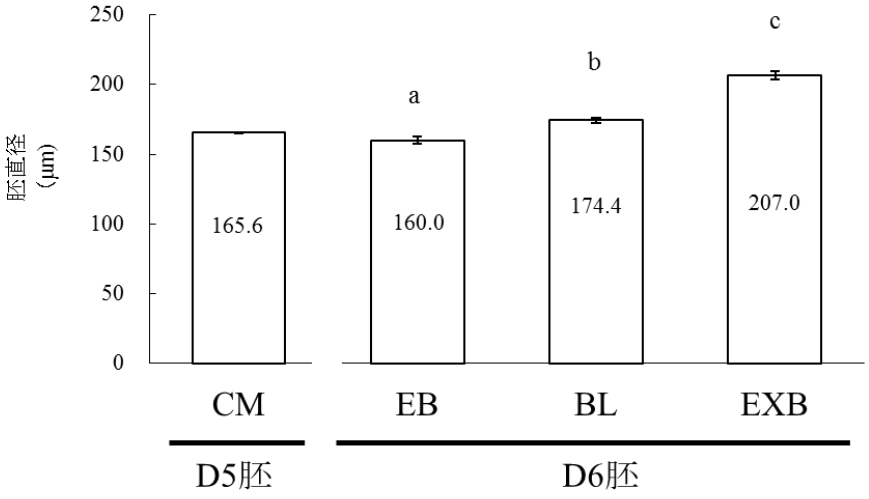

図２　豚体内生産胚の発育段階別の胚直径
a-c 異符号間に有意差有り　（P<0.05）

D6BL の呼吸量と ICM 細胞数、TE 細胞数、総細胞数（Total 細胞数）との関係を図３に示した。胚の呼吸量が高い胚ほど細胞数が多くなり、胚の呼吸量と細胞数との間に正の相関が認められた（ICM 細胞数；P<0.05, r=0.429、TE 細胞数；P<0.001, r=0.783、Total 細胞数；P<0.001, r=0.769、図３、表１）。さらに、呼吸量と胚直径において、有意な相関が認められた（表１）。

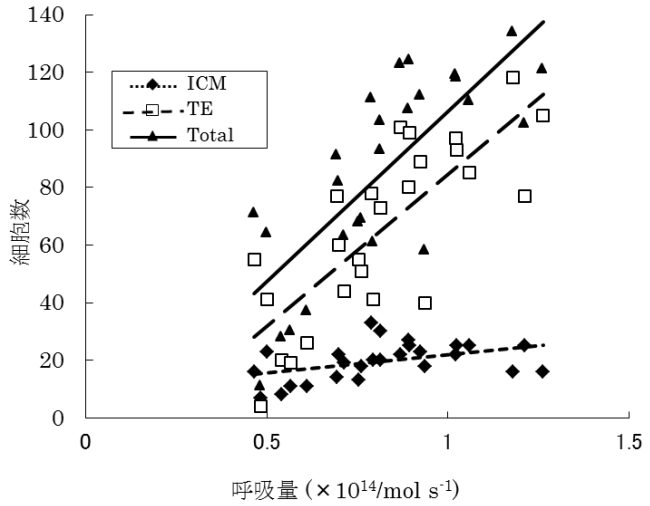

図３　人工授精後6日目に採取した胚盤胞の呼吸量と細胞数との関係
◆は内細胞塊（ICM）、□は栄養外胚葉（TE）、▲は総細胞数（Total）を示す
（ICM細胞数:p<0.05, r=0.429, TE細胞数:p<0.001, r=0.783, Total細胞数:P<0.001, r=0.769）

表１　D6BL の呼吸量と細胞数、呼吸活性との相関（n=26）

	胚直径	呼吸量	ICM 細胞数	TE 細胞数	Total 細胞数	呼吸活性
胚直径	1					
呼吸量	0.809 ***	1				
ICM細胞数	0.506 **	0.429 *	1			
TE細胞数	0.918 ***	0.783 ***	0.577 **	1		
Total細胞数	0.902 ***	0.769 ***	0.697 ***	0.988 ***	1	
呼吸活性	-0.532 **	-0.371	-0.631 **	-0.681 ***	-0.718 ***	1

*：P<0.05、　**：P<0.01、　***：P<0.001
ICM: 内細胞塊、TE: 栄養外胚葉

試験２ :豚体内発育胚の培養前後の呼吸量と細胞数

D6BL の24時間培養後の呼吸量（2.58±0.32）および100細胞当たりの呼吸量である呼吸活性（2.23±0.33）は、培養前（それぞれ0.85±0.04、0.93±0.05）と比較して有意な増加が認められ（図４）、ICM、TE、Total 細胞数でも有意な増加が認められた（図５）。

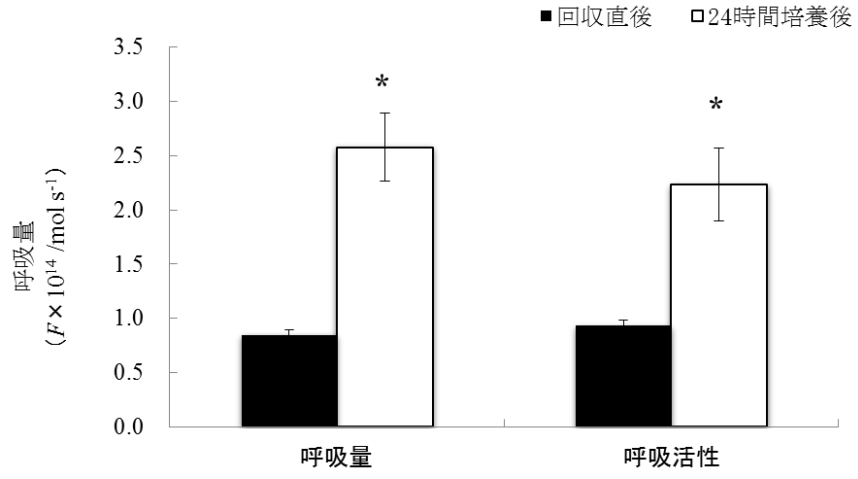

図４　D6BLと24時間培養後の呼吸量および呼吸活性
（100細胞当たりの呼吸量）
＊：D6BL と有意差有り　（P<0.05）

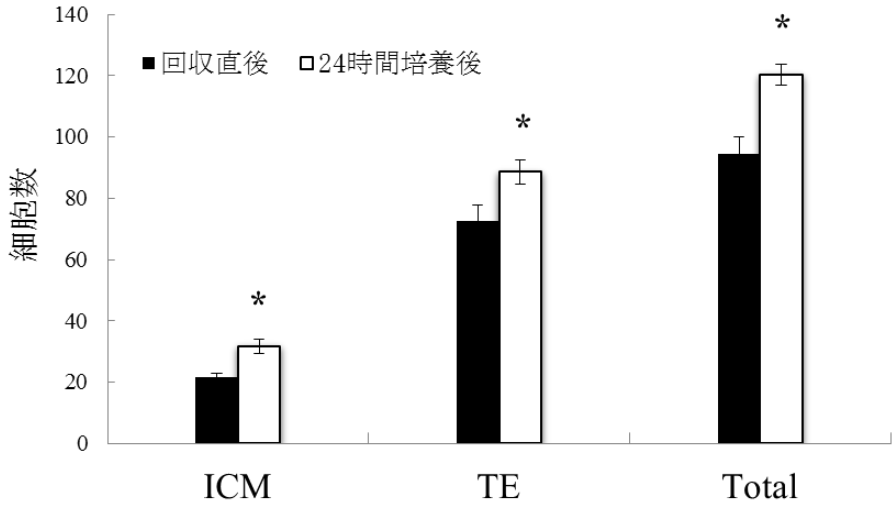

図５　D6BLと24時間培養後の胚の細胞数の比較
＊：D6BLと有意差有り　（P<0.05）

試験1においてD6BLの呼吸量と呼吸活性との間には相関は認められなかった（表１）が、D6BLの24時間培養後の呼吸量と呼吸活性との間には有意な相関が認められた（表２）。

表２　D6BLの24時間培養後の呼吸量と細胞数、呼吸活性との相関（n=16）

	呼吸量	ICM細胞数	TE細胞数	Total細胞数	呼吸活性
呼吸量	1				
ICM細胞数	0.232	1			
TE細胞数	-0.506 *	-0.536 *	1		
Total細胞数	-0.440	0.050	0.817 ***	1	
呼吸活性	0.974 ***	0.220	-0.638 **	-0.605 *	1

*：P<0.05、　**：P<0.01、　***：P<0.001
ICM: 内細胞塊、TE: 栄養外胚葉

試験3:豚体内発育胚の呼吸量とその後の発育性

D5CMおよびD6BLの透明帯脱出別呼吸量を表３に示した。D5CMでは、PBMで48時間培養した後に透明帯から脱出した胚の培養前の呼吸量（0.60±0.04）は、脱出しなかった胚の呼吸量（0.50±0.04）と比較して高い傾向があり（P=0.08）、D6BLでは、24時間培養後の脱出胚の培養前の呼吸量（1.05±0.09）は、非脱出胚の呼吸量（0.77±0.05）より有意に高かった（P<0.05）。

表３　人工授精後５日目および６日目に採取した胚の透明帯脱出別呼吸量

供試胚	透明帯からの脱出[c]	検査胚数	呼吸量（$\times 10^{-14}$ mol s^{-1}）*
D5CM	非脱出	17	0.50±0.04 [a]
	脱　出	16	0.60±0.04 [b]
	合　計	33	0.55±0.03
D6BL	非脱出	16	0.77±0.05 [A]
	脱　出	22	1.05±0.09 [B]
	合　計	38	0.93±0.06

*：平均値±標準誤差

[a,b]：P=0.08, [A,B]：P<0.05

[C]：D5CMは48時間、D6BLはPBMで24時間培養後に透明帯脱出を確認した

D5CM、D6BL でそれぞれ、透明帯から脱出した胚と脱出しなかった胚の呼吸量を説明変数とし、線形判別関数により判別確率を算出した結果（表４）、D5CM では、非脱出と予測した胚（呼吸量<0.56）で実際に脱出しなかったものが12個（63.2%）で、脱出したものが7個（36.8%）、脱出と予測した胚で脱出しなかった胚は5個（35.7%）、予測どおり脱出した胚は9個（64.3%）となり、判別確率は63.6%（21/33胚）であった。同様に、D6BL では、非脱出と予測した胚（呼吸量<0.91）で非脱出だった胚は12個（60.0%）で、脱出胚が8個（40.0%）、脱出と予測した胚で非脱出胚は4個（22.2%）、脱出した胚は14個（77.8%）となり、判別確率は68.4%（26/38胚）であった。

表４　採取した D5CM、D6BL 胚の呼吸量を説明変数として判別関数で予測した場合の透明帯脱出別胚数およびその割合と判別確率

採取胚(胚数)	予測(胚数)	胚数（%）		判別確率
		予測外	予測的中	
D5CM (33)	非脱出 (19)	7 (36.8)	12 (63.2)	63.6%
	脱　出 (14)	5 (35.7)	9 (64.3)	
D6BL (38)	非脱出 (20)	8 (40.0)	12 (60.0)	68.4%
	脱　出 (18)	4 (22.2)	14 (77.8)	

第Ⅳ節　考察

本試験において、D6 胚の EXB の呼吸量が EB と比較して有意に高いことが確認され、胚の発育段階に応じて呼吸量が高くなったことから、呼吸量は形態的分類を反映していることが伺えた。ウシ体内発育胚においては、胚盤胞の呼吸量は後期桑実胚と比較して有意に高くなることが報告されている[10,12]が、豚でも同様の結果であった。今回の結果を考慮すると、D6 胚では個々の呼吸量の差が大きく判定はしやすいが、採取胚のステージにばらつきがあり、単純に呼吸量で比較することができない。さらに防疫上の観点から、透明帯が確実に存在する時期を考慮すると、移植胚の呼吸量を測定する場合は D5 胚の方がよいと考えられた。

また、D6BL の呼吸量と Total 細胞数、TE 細胞数との間に正の相関が認められたことから、D6BL の呼吸量を測定することによって Total 細胞数、特に TE 細胞数が推定できる可能性が示唆された。杉村ら[16]は核移植胚において呼吸量の低い胚は、脱出率が低く、それは TE 細胞数が少なくアポトーシス細胞が多いためだと考察している。これらのことから、呼吸量は無侵襲で細胞数による胚品質の評価を示す新たな指標として活用できる可能性が示唆された。

本試験では、D5CM および D6BL において、培養後に透明帯から脱出した胚の培養前の呼吸量は、非脱出胚のものより高い傾向が認められた。Shiku[9]らもウシ体外生産胚において桑実胚の呼吸量を測定し、その後の透明帯からの脱出を確認したところ、桑実胚で呼吸量が 0.5 以上の胚では脱出率が 68%（13/19）であり、0.5 以下の胚の 0%（0/9）と比較して高いことを報告している。これらのことから、豚胚においても CM や BL ステージで呼吸量が高い胚は、その後の発育性も高いと考えられた。また、脱出胚と非脱出胚の培養前の呼吸量を説明変数とし、線形判別関数により判別率を算出したところ、D5CM で 63.6%、D6BL で 68.4%であった。このことから D5CM や D6BL で呼吸量 0.56 または 0.91 を指標として選別すれば、脱出胚を判定できる可能性が示唆された。

ウシ体外生産胚では、胚直径の大きい胚は、より高い呼吸量を示すことが報告されており[12]、本試験においても豚体内生産胚の直径は発育段階に応じて有意に大きくなり、ウシ胚と同様の結果が得られた。さらに呼吸量と胚直径に有意な相関が認められたことから胚直径は胚の品質と関連がある可能性が示唆された。

結論として、豚体内発育胚の呼吸量を測定したところ、呼吸量は胚の発育段階に応じて高くなることや細胞数と相関があること、呼吸量を指標として選別することで脱出胚を選別することが可能であることが明らかになった。

【小括】

豚体内発育胚の受胎率を高めるために、胚の呼吸量を測定することによって胚の客観的評価を行い、呼吸量がその後の胚の発育性に与える影響について検討したところ、次の成績を得た。

1. 人工授精後 5 日目に採取した後期桑実胚（D5CM)の呼吸量（酸素消費量：$\times 10^{-14}$ mol s^{-1})は 0.58 であり、6 日目の胚の呼吸量は初期胚盤胞が 0.56、胚盤胞が 0.87、拡張胚盤胞が 1.13 と発育段階に応じて増加し、拡張胚盤胞の呼吸量は初期胚盤胞と比較して有意に増加した（$P<0.05$)。
2. 人工授精後 6 日目の胚盤胞（D6BL）の呼吸量を測定し細胞数を計数したところ、呼吸量と栄養膜細胞数、総細胞数との間に有意な相関が認められた（$P<0.001$)。
3. 採取した胚について培養後に透明帯からの脱出を確認したところ、脱出胚の培養前の呼吸量 1.05 は、非脱出胚の 0.77 と比較して有意に高かった。
4. D5CM と D6BL 胚の採取直後の呼吸量を説明変数とし、線形判別関数により得られた呼吸量の境界値 0.56、0.91 を元に脱出の有無を判別したところ、正しく判別された胚は D5CM で 33 個中 21 個（63.6%)、D6BL で 38 個中 26 個（68.4%）であった。

５．　以上の成績より、豚体内発育胚の呼吸量を測定し、境界値を求めてそれにより胚を選別することで胚の発育性を 60%以上の確率で判別することが可能であることが明らかとなった。

第Ⅲ章　MVAC 法を用いてガラス化保存した豚体内発育胚の加温後の呼吸量とその後の生存性

第Ⅰ節　緒論

豚は子宮角が長く、胚の採取は外科的な手法が必要であるため、外科手術が可能な限定された施設でしか胚採取を行うことができず、生産現場で豚胚移植を行うためには、採取した胚を農場に輸送して同期化した受胚豚に移植する新鮮胚移植以外は、一度超低温保存した後に加温して移植する必要がある。しかし豚胚は低温にきわめて感受性が高い[25,26]ことから、緩慢凍結法を用いて保存した場合では、子豚の生産効率が低いことが報告[27–29]されている。それを改善するため、Nagashima ら[30]は豚胚の脂肪滴を除去した後に緩慢凍結法で保存し、融解後に移植して産子を得ることに成功している。また、比較的低温に強いと言われている脱出胚を用いて緩慢凍結を行い、子豚の生産に成功したという報告[28,29]もある。

一方でここ数年、ガラス化保存法によって子豚を生産することが可能となってきた。特に超急速ガラス化保存法である最小容量法(MVC)法[31,32]、open pulled straw (OPS) 法[33]、superfine open pulled straw (SOPS) 法[34]、microdroplet 法[35]、metal mesh vitrification (MMV) 法[36,37]、Hallo Fiver 法[38]では、高い胚生存性や産子を得たという報告がある。しかし、これらは、直接液体窒素に触れるガラス化保存法であるため、防疫上の問題点が懸念される。液体窒素に触れないガラス化保存法としては、ストローを用いたガラス化保存法[39]や、micro volume air cooling (MVAC) 法[40]が報告されている。とくに MVAC 法は血清等の動物由来成分を用いないガラス化保存液を使用していることから豚胚の保存には最適だと考えられる。

そこで本試験では、MVAC 法を用いてガラス化保存した豚体内発育胚の加温後の呼吸量とその後の生存性を調査し、呼吸量によってガラス化加温胚の評価

が可能かを検討した。

第Ⅱ節　材料と方法

供胚豚および胚回収法

供胚豚は、16 頭の春機発動前の豚（ランドレースと大ヨークシャー種およびその交雑種）を用いた。胚の回収は既報[15,19]を若干修正して行った。すなわち、eCG（ピーメックス, 三共）1,500 単位と hCG（プベローゲン, 三共）500 単位を用いて過剰排卵処置を施し、最初の人工授精後 5 日目もしくは 6 日目の午前中に開腹手術により、子宮角内を POE-CM [20]（機能性ペプチド研）で灌流して胚を回収した。これらの胚は試験開始まで豚発生用培地（PZM-5, 機能性ペプチド研）を用い[21]、5%CO_2、5%O_2、38.5℃で保存した。

形態的評価

供試した胚の判定は倒立顕微鏡下（倍率 200 倍）で行い、正常胚および変性胚、未受精卵に区分した。正常胚はさらに発育段階および変性細胞の割合等の形態的評価による品質判定を行った。本試験では、IETS マニュアル[22]に基づく Code 1 の胚を試験に供した。

呼吸量の測定

胚の呼吸量は受精卵呼吸測定装置（HV-405, 機能性ペプチド研）により Abe ら[14,18]の方法に準じて測定した。胚の呼吸量の算出は球面拡散理論式[9]に基づき、専用の解析ソフトを用いて行った。

ガラス化保存および加温法

ガラス化保存は、三角ら[40]の報告に従い、湾曲したステンレス板を加工した胚スティック（ミサワ医科工業(株)、図６）を使用して行った。すなわち胚を

1.8 M エチレングリコール（EG）、20 mM ヘペス添加豚後期発生用培地（PBM、機能性ペプチド研）で 5 分静置した後、1.8M EG、0.3M トレハロースを添加した 20 mM ヘペス添加 PBM で 5 分間平衡し、その後、ガラス化保存液（6 M EG、0.6 M トレハロースおよび 2%ポリエチレングリコールを添加した 20 mM ヘペス添加 PBM）に移し、1 分以内に胚スティック上にのせ、液体窒素中であらかじめ冷却しておいた空のストロー内に挿入しガラス化保存した。

加温は、45℃のウォータバスであらかじめ温めておいた 1.8 M EG、0.3 M トレハロースを添加した 20 mM ヘペス添加 PBM 液を 35 mm ペトリディッシュに入れ、その中へ胚スティックを直接投入することにより行った。そのまま 3 分静置し、その後 PBM 液で 3 回洗浄し、同液で 30 分間 5%CO_2、5%O_2、38.5℃で静置した。

図 6　MVAC 法で使用したガラス化保存器具（胚スティック）

細胞数の計測

ガラス化保存した胚の生存性の比較は、Saha and Suzuki の方法[41]によって行った。すなわち、呼吸量を測定した胚は、38.5 ℃に加温した 20% FCS 加 TCM199 で洗浄後、以下の染色液で 30 分培養することで生存細胞と死滅細胞を

二重染色した。染色液は 10 µg/ml bisbenzimide (Hoechst 33342; Calbiochem, San Diego、USA)、10 µg/ml propidium iodide (P4170, Sigma、USA) を添加した TCM199 を用いた。染色後、20% CS 加 TCM199 で胚を洗浄後、スライドグラスに少量の 20% CS 加 TCM199 とともに乗せ、カバーガラスでカバーした。染色した胚の観察は蛍光装置を接続した倒立顕微鏡により実施した。U 励起波長のフィルター(365 nm の励起波長、400 nm のバリアフィルター)で観察し、青色（bisbenzimide）で染まった核は生存細胞、ピンク色（propidium iodide）で染まった核は死滅細胞としてカウントした。

実験計画

試験４ :ガラス化保存した豚体内発育胚の加温後の呼吸量とその後の生存性

回収した豚体内発育胚 60 胚をガラス化保存した。

胚は、加温後 30 分経過時に呼吸量を測定後、PBM で 48 時間、5%CO_2、5%O_2、38.5 ℃湿潤環境下で培養し、24 時間後の胞胚腔の再形成および 48 時間後の透明帯からの脱出状況を調査した。

対照としてガラス化保存しない採取直後の胚（非ガラス化区、n=38）を 48 時間同様に培養し、生存性と透明帯脱出状況を調査した。そして、胚の生存、死滅および透明帯脱出率の有無により胚の呼吸量の平均値を説明変数とし、線形判別関数により判別関数を求めた。求めた判別関数により、判別確率のクロス表により判別率を算出した。

試験５ :ガラス化保存した豚体内発育胚の加温後の呼吸量と細胞数

試験 4 と同様にガラス化保存した豚体内発育胚（46 胚）について、呼吸量と細胞数との関係を調査するため、ガラス化保存前後の呼吸量を測定後に核染色を行い、生存細胞と死滅細胞を計数した。

統計処理

データの統計処理は、コンピューター統計処理ソフト SPSS（SPSS 11.5J .User's　Guide, SPSS Inc. Tokyo）を用いた。胚の呼吸量については、一元配置の分散分析による検定後に Tukey の HSD 法により多重比較を行った。細胞数と呼吸量の相関については、ピアソンの相関係数を利用した。生存率、透明帯脱出率はフィッシャーの直接確率またはピアソンのカイ二乗検定を用いて検定し、危険率 5%（$P<0.05$）未満を有意差ありと判定した。

第Ⅲ節　結果

試験４ :ガラス化保存した豚体内発育胚の加温後の呼吸量とその後の生存性

MVAC 法でガラス化保存した胚の生存性を表５、図７に示した。ガラス化保存胚の加温後の生存率は 85.0%であり、非ガラス化区（92.1%）と差を認めなかったが、透明帯脱出率は、非ガラス化区と比較して低い傾向であった（$P=0.08$）。加温後の呼吸量（0.69±0.04）は、保存前の呼吸量（0.79±0.08）と比較して差が認められなかった（図８）。ガラス化保存した胚の呼吸量を加温後に測定し、24 時間培養後に生存性を調査したところ、生存した胚の加温後の呼吸量は、0.75 であり、死滅した胚の呼吸量 0.33 と比較して有意に高い結果となった（表６）。さらに 48 時間培養後の透明帯脱出率を調査したところ、脱出した胚の加温後の呼吸量は、0.88 であり、脱出しなかった胚の呼吸量 0.53 と比較して有意に高い結果となった（表６）。

表５　MVAC法でガラス化保存した胚の加温後の生存性

試験区	検査胚数	生存胚数（%）	透明帯脱出胚数（%）
MVAC	60	51 (85.0)	27 (45.0)
非ガラス化	38	35 (92.1)	24 (63.2)

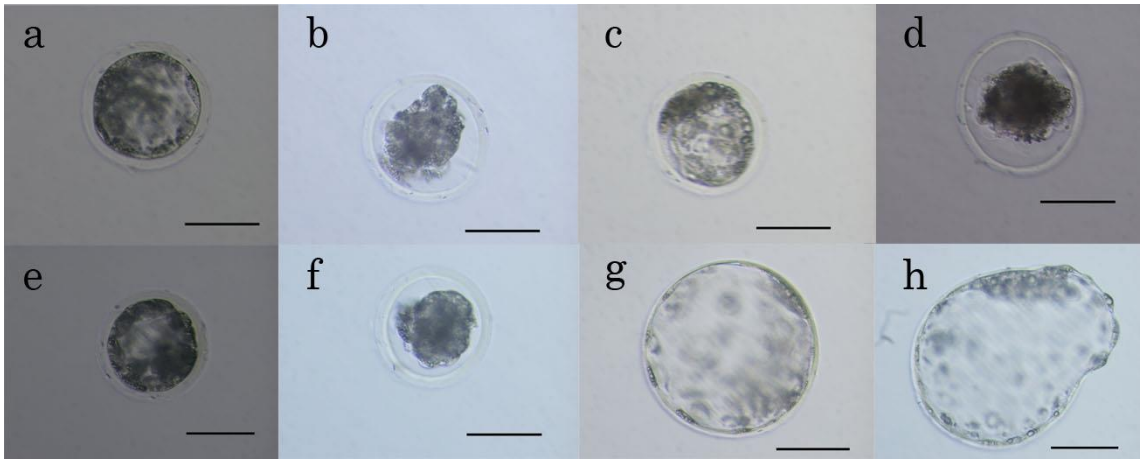

図７　MVAC 法でガラス化保存した豚体内生産胚の保存前後の形態

ガラス化保存前の胚（a、e）、呼吸量測定時の加温 30 分後の胚（b、f）、24 時間培養後の胚（c、g）、呼吸量が高い胚（d）と呼吸量が低い胚（h）の 48 時間培養後の形態
バーは 100μm。

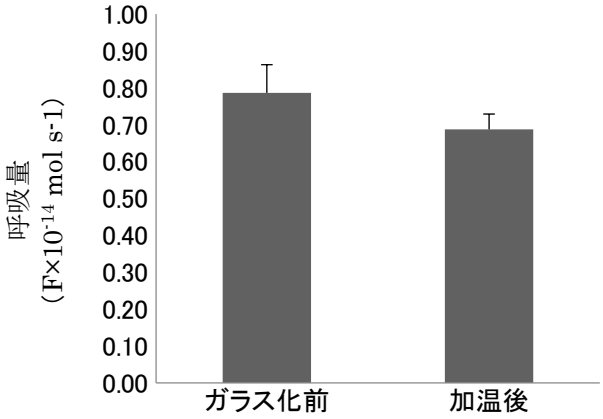

図８　ガラス化保存前後の豚体内生産胚の呼吸量

表６　ガラス化保存した胚盤胞の加温後の生存胚および死滅胚の呼吸量

培養時間		供試胚数	割 合	呼 吸 量 (F x 10^{-14} mol s^{-1})*
24h	生存	51	85.0%	0.75±0.04[a]
	死滅	9	15.0%	0.33±0.05[b]
48h	脱出	27	45.0%	0.88±0.06[a]
	非脱出	33	55.0%	0.53±0.04[b]
	計	60	―	0.69±0.05

*：呼吸量は加温後30分に測定した（平均値±標準誤差）

[a,b]：異符号間に有意差有り（P<0.05）

また、生存した胚と死滅した胚の呼吸量から線形判別関数により判別関数を求め、判別確率のクロス表により確認した結果、判別率は 75.0%であり、同様に透明帯脱出率に関して判別確率を確認したところ、判別率は 70.0%であった（表７）。

表７　ガラス化加温後の胚の呼吸量を説明変数として判別関数で予測した場合の生存死滅別、透明帯脱出別胚数およびその割合と判別確率

培養時間（胚数）	予測（胚数）	胚数（%）		判別確率
		予測外	予測的中	
24h (60)	生存 (40)	2 (5.0)	38 (95.0)	75.0%
	死滅 (20)	13 (65.0)	7 (35.0)	
48h (60)	脱出 (23)	7 (30.4)	16 (69.6)	70.0%
	非脱出 (37)	11 (29.7)	26 (70.3)	

試験 5:ガラス化保存した豚体内発育胚の加温後の呼吸量と細胞数

ガラス化保存後の胚の呼吸量を測定したところ、その平均値は 0.78±0.05であり、生存細胞と死滅細胞を計数したところ、生存細胞数、死滅細胞数、死滅-生存細胞数比率はそれぞれ、53.5±3.2 個、4.6±1.1 個、0.11±0.03%であった。また、呼吸量と生存細胞数との間に正の相関が認められた（$P<0.01$, $r=0.538$、図９）。

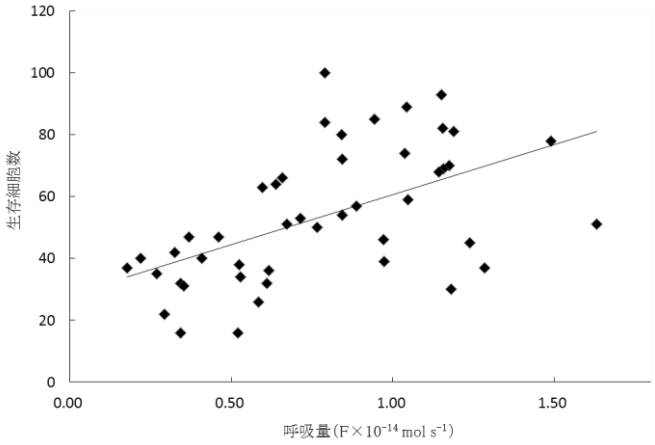

図９　ガラス化保存した豚体内発育胚の加温後の呼吸量と生存細胞との相関
加温後の胚の呼吸量と生存細胞数との間に正の相関が認められた（$P<0.01$, $r=0.538$）

第Ⅳ節　考察

試験 4 では、24 時間培養後に生存した胚では、加温直後の呼吸量は死滅した胚のものより有意に高い結果であり、同様に培養 48 時間後に透明帯から脱出した胚の加温直後の平均呼吸量は、非脱出胚のものより有意に高かった。生存または死滅した胚の呼吸量および脱出胚と非脱出胚の培養前の呼吸量を説明変数とし、線形判別関数を求めて判定した呼吸量はそれぞれ0.47および0.69であり、これに基づいて判別確率のクロス表により確認したところ、判別率は 75.0%および 70.0%であった。この生存性に対する判別率の 75.0%という数字は、ガラス化保存胚の加温後の胚の生存率が 85.0%であることを考えると、それほど有効ではないと考えられる。しかし、透明帯脱出率については、判別率が 70.0%と実際の胚の脱出率 45.0%より高いことから、カラス化胚の加温後の胚の発育性を検討するのに呼吸量を使用することは非常に効果的であると考えられた。

第Ⅱ章では、豚の新鮮体内生産胚において、呼吸量が高い胚が低い胚より透明帯脱出率が高いことが明らかになっており[42]、Shiku[9]らもウシ体外生産胚において桑実胚の呼吸量を測定し、その後の透明帯からの脱出を確認したところ、桑実胚で呼吸量が 0.5 以上の胚では脱出率が 68%であり、0.5 以下の胚の 0%と比較して高いことを報告している。これらのことから、豚ガラス化保存胚においても加温後の呼吸量が高い胚は、その後の生存性や透明帯脱出率も高いと考えられた。

本実験において透明帯脱出率は、新鮮胚と比較するとガラス保存胚で減少することが認められたが、加温後の呼吸量や 24 時間培養後の生存性は、新鮮胚と MVAC 法でガラス化保存した胚では有意な差は認められず、MVAC 法での生存率は 85.0%であった。この数値は、最小容量法(MVC)法[32]の 74.2%（23/31）や MMV 法[37]の 84.4%（27/32）と同等の数値であったが、OPS 法[33]の 90.9%（50/55）や microdroplet 法[35]の 95.2%（20/21）より若干低い数値であった。しかし、MVAC 法は血清を用いない化学的合成ガラス化保存液を用いて液体窒

素に直性接しない保存方法であることから、防疫上リスクが低い保存法であり、豚胚の保存には非常に有効であると考えられた。

試験 5 では、加温後の豚胚の呼吸量と生存細胞との関係を調査したところ、加温後の胚の呼吸量と生存細胞数との間に正の相関が認められ、呼吸量が高い胚ほど生存細胞が多いことが示唆された。これらのことから呼吸量によってガラス化保存後の胚の生存細胞数が推定できる可能性が示唆された。

以上の結果から、MVAC 法は保存前後の呼吸量が有意に低下しない保存法であることが明らかになり、豚胚のガラス化保存に適した手法であると考えられた。また、培養後に透明帯から脱出した胚の加温直後の呼吸量は、透明帯から脱出しなかった胚のものと比較して高く、加温後にその呼吸量を測定することで、その後の胚の生存性を評価できる可能性が示唆された。

【小括】

豚体内発育胚のガラス化加温後の受胎率を高めるために、血清等の動物由来成分を含まないガラス化保存液と液体窒素に直接接しない手法で超低温保存する MVAC 法を用いて保存した胚を、呼吸量で選別することが可能か検討したところ、次の成績を得た。

1. MVAC 法は生存率 85.0%、透明帯脱出率 45.0%と既報と同等の保存法である上に血清を用いず液体窒素に接触しないガラス化保存法で豚胚の保存に有効であった。
2. 線形判別関数により得られた呼吸量の境界値 0.69 を元にガラス化加温胚を選別することで脱出胚を 70%予測することが可能であった。
3. ガラス化保存後の胚の呼吸量を測定し、生存細胞と死滅細胞を分染したところ、呼吸量と生存細胞数との間に有意な相関が認められた（$P<0.01$）。

第Ⅳ章　豚体内発育胚の輸送方法の検討

第Ⅰ節　緒論

現在、肉豚の生産農場では、産肉や繁殖能力に優れた血統の種豚を外部から生体で導入し、種雄豚と種雌豚を交配し生まれた子豚を肥育することにより豚肉の生産を行っている。しかし、生体での種豚の導入は外部からの疾病伝搬や導入豚の馴致失敗などのリスクを伴うことから、胚移植による種豚導入が可能になれば、そのリスクを大幅に軽減することが可能と考えられる。

豚は多胎動物であるため子宮角が長い。よって一般的には豚胚は外科的に子宮を灌流して回収する。そのため生産農場での胚の採取は困難であり、外科的手術の設備が整った施設から新鮮胚または凍結胚を輸送しなければ胚移植を行うことができない。新鮮胚の輸送に関しては、ウシ胚[43,44]やヒト胚[45]を輸送して発育性を確認、または移植後に受胎している報告はあるが、豚では新鮮胚を長距離輸送後に非外科的に移植して分娩に至った報告は少なく、受胎率も輸送せずに非外科的に移植したものより低いことが報告されている[46]。Nakane ら[46]は、輸送した豚体外生産胚を使って非外科的に移植したところ非輸送胚と比較して受胎率が低いことを報告している。Ozawa ら[47]はガス平衡した培養液とともに豚体外生産胚をグラスチューブに入れ媒精後 6 日間、2 日おきに培地交換を行い大気下で培養した場合、培養液の pH や浸透圧が低下したことが、胚盤胞発生率や作出された胚の細胞数が少ない原因ではないかと推察している。これらのことから輸送時の培養液が胚の発育性に影響を与えているのではないかと考えられる。

また、輸送中の振動が胚に与える影響については報告が少ない。Lewis[48]らは低い振動が細胞骨格を分裂させると言っており、Vanderbarg[49]らは、胚の遺伝因子の形態を変えて悪影響を与えているのが振動ではないかと仮説を立てている。胚を輸送する際には、どのような力が輸送器にかかるのかも検討する

必要がある。

我々は、庫内の温度（38℃）と炭酸ガス濃度（５％）を維持することが可能で、ストローまたはサンプリングチューブに充填した胚を輸送可能な輸送器を試作した。この輸送器の特徴は、炭酸ガス濃度と温度を約 120 時間まで維持することが可能で、安全で簡単に胚の輸送ができることであり、生産現場での豚胚移植に適していると考えられる。

また近年、Mito ら[24]は、豚卵管液の組成を基にした成分既知培地 PZM-5[21]をベースに、エネルギー源としてグルコース、抗酸化物質であるグルタチオンを構成するアミノ酸の一つであるグリシンを添加した PBM を用いて媒精後 5 日目以降の桑実胚を培養したところ、PZM-5 と比較して有意に胚盤胞発生率、細胞数、ATP 含量が増えると報告している。

そこで、新鮮胚やガラス化加温後の胚を目的地まで輸送するためのシステムの開発を目指し、輸送に使用する保存容器や振動の影響を調査し、さらに PBM と試作した輸送器を用いて豚体内生産胚を輸送し、その後の発育能について検討した。

第Ⅱ節　材料および方法

供胚豚および胚回収法

供胚豚は、春機発動前の豚（大ヨークシャー種、中ヨークシャー種、ランドレース種）を用いた。胚の回収は既報[15,19]を若干修正して行った。供胚豚は最初の人工授精後 5 日目もしくは 6 日目の午前中にイソフルラン（4～5%）吸入麻酔下で開腹手術を施し、子宮角内を POE-CM[20]（機能性ペプチド研）で灌流して胚を回収した。これらの胚は試験開始まで PZM-5[21]（機能性ペプチド研）を用い、5%CO_2、5%O_2、38.5℃で保存した。

形態的評価

胚は倒立顕微鏡下（倍率200 倍）で観察し、正常胚および変性胚、未受精卵に区分した。正常胚はさらに発育段階および変性細胞の割合等の形態的評価による品質判定を行い、IETS マニュアル[22]に基づく Code 1の胚を試験に供した。

呼吸量の測定

胚の呼吸量は受精卵呼吸測定装置（HV-405, 機能性ペプチド研）により Abe ら[14,18]の方法に準じて測定した。胚の呼吸量の算出は球面拡散理論式[9]に基づき、専用の解析ソフトを用いて行った。

輸送器の試作

輸送器は、リチウムイオン電池を使用し、48 時間以上温度を 38℃に維持できるようにした(図 10、a)。胚を入れる容器をストローと 1.5ml チューブで想定し、アタッチメントを用いてストローなら 10 本(図 10、b)、1.5ml チューブなら 8 本(図 10、c) 固定できるようにした。また、アタッチメントはアルミニウムの密封式の箱に固定できるようにし、ガス濃度調整剤とミリ Q 水を含ませた脱脂綿を使用して炭酸ガス濃度を 5%、湿潤環境が維持できるようにした。

図 10　試作した輸送器
a:リチウムイオン電池を用いることで 48 時間以上温度維持が可能。b: ストローアタッチメント、10 本輸送可能。c: チューブアタッチメント、8 本輸送可能

細胞数の計測

一部の胚は既報[41]に従い生存細胞と死滅細胞を染め分けた。

実験計画

試験６ :輸送に使用する保存容器が豚体内発育胚に与える影響

市販の輸送器を用いて、庫内の温度変化や輸送する際の胚の保存容器について検討した。発泡スチロールと38℃で保温した保温材を組み合わせた輸送（図11 A）と、市販の輸送器3台（X 社 : バッテリー加温式、Y 社 : 保温材式、Z 社 : 保温材式、図11 B,C,D）の庫内の温度変化を温度データロガー（サーモクロン SL : KN ラボラトリーズ、分解能 0.1℃（図11 A 中矢印）を使用して測定した。

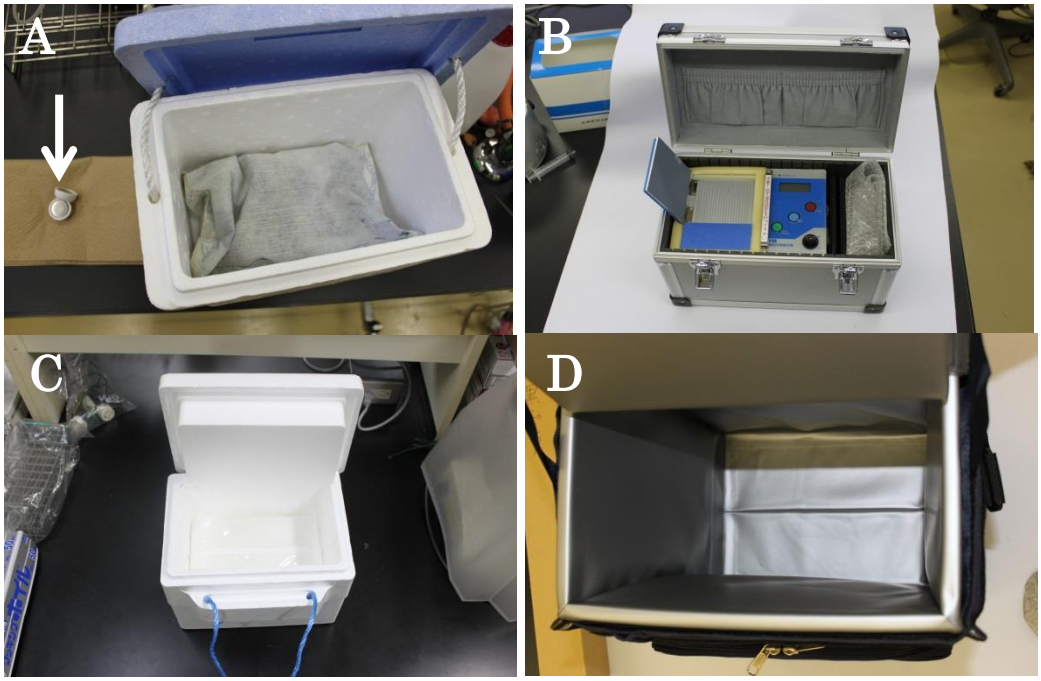

図11　発泡スチロール（A）と温度データロガー（A 中矢印）および市販の輸送器（X 社 : B、Y 社 : C、Z 社 : D）

次に、胚を輸送する際の保存容器の適性について、プラスチックストローとサンプリングチューブを用いて検討した。

人工授精後5日目の胚（n=60）の呼吸量を測定し、3区に分け、1つは対照と

してシャーレ内のドロップに入れ、他の2区はPBMとともに1本につき5個ずつ、市販の0.25mlのストローAおよびB（図11）に詰めた。48時間、市販の輸送器内で静置後、生存率、透明帯脱出率を調査し再度呼吸量を測定した。実験は4回繰り返した。また、使用したストローは、フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）（IRT-7000、日本分光株式会社、日本）を用いてその材質を調査した。

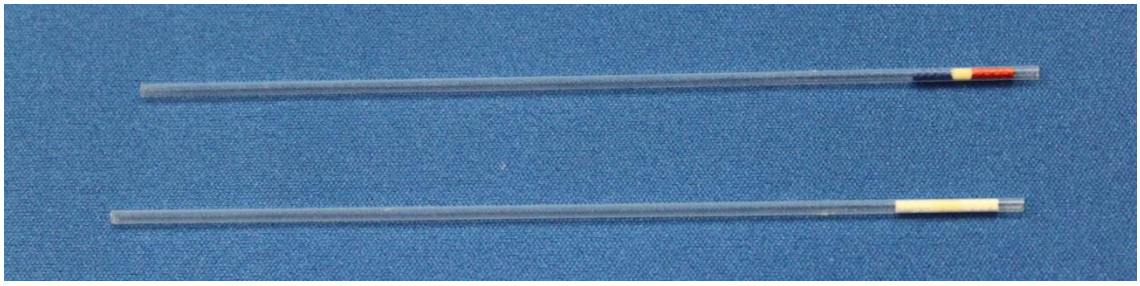

図11　2種のストロー（上：A、下：B）

次に、市販2種のポリプロピレン製サンプリングチューブA,Bを用い、人工授精後5日目の胚（n=28）を7個ずつPBMとともに入れ、24時間マルチガスインキュベーターで培養した後に生存率、透明帯脱出率を調査した。

また対照区として、人工授精後5日目の後期桑実胚および人工授精後6日目の胚盤胞期胚を、シャーレ内のPBMドロップに入れマルチガスインキュベーターで静置培養し、生存率および透明帯脱出率を比較した。

試験７：振動が豚体内発育胚に与える影響

人工授精後5日目の胚（n=29）は呼吸量を測定し、試験6に使用した0.25mlストローAにPBMとともに1個/10 µl になるように4～6個封入し，38.5 ℃に設定した輸送器（富士平工業製）内に保持した。予め、データステーション（ONO SOKKI社製、図13 A,B）と3軸加速度ピックアップ（PCB社製、図13 C）を用い、実際に高速道路を時速80 kmで走行した際のディーゼル貨物自動車の荷台中央の振動を測定後、加速度パワースペクトル密度に変換して周波数振動

解析（fast fourier transform）を行い、輸送時の振動波形データを設定した。振動区は振動試験機（IMV VS-2000-140T、図13 D）に輸送器をのせ、先述の振動波形データに基づき20時間の振動負荷を与えた。静置区は振動を与えず20時間静置した。各区の胚の生存率，呼吸量を調査し，細胞数を計数した。

図13　データステーション（A、B）、3軸加速度ピックアップ（C）および振動試験機（D）

試験８ :ストローおよびサンプリングチューブで輸送後の豚体内発育胚の発育能

胚をPBMとともに0.25 mlストローAに1個/10 µlになるように密封して輸送した区を密封区、市販のポリプロピレン製サンプリングチューブに入れ、ガス濃度調整剤を使用して、炭酸ガス濃度を５％に調整して輸送した区をガス濃度調整区とした。両区ともに試作した輸送器に胚を入れ、神奈川県海老名市から山形県山形市に輸送した。輸送中の振動調査は、小型輸送用三次元加速度センサー（G-MEN DRα：株式会社スリック製、図14）を用い、輸送器底面に固定

して X 軸、Y 軸、Z 軸の加速度を測定した。輸送器内の胚直下の温度は、温度データーロガー（サーモクロン SL：KN ラボラトリーズ）を使用して測定した。輸送胚の客観的な評価を行うため、輸送前後で胚の呼吸量を測定した。輸送後に呼吸量を測定した胚は、PBM 区で48時間、低酸素条件下で培養を行い、生存率、透明帯脱出率を調査した。

図14　三次元加速度センサー

統計処理

データの統計処理は、コンピューター統計処理ソフト SPSS（SPSS 16.0J .User's　Guide, SPSS Inc. Tokyo）を用いた。胚の呼吸量は、一元配置分散分析による検定後に Tukey の HSD 法により多重比較を行った。細胞数は予め対数変換を行った。生存率および透明帯脱出率の比較は、フィッシャーの直接確率法で行った。危険率5%（$P<0.05$）未満を有意差ありと判定した。

第Ⅲ節　結果および考察

試験６ :輸送に使用する保存容器が豚体内発育胚に与える影響

市販の輸送器の温度変化を測定したところ、いずれの輸送器も外気温の変化

にかかわらず、30 ℃以上を維持できることが明らかとなったが、発泡スチロールと保温剤方式では３時間以上の温度維持は困難であり、（図15A）市販輸送器についても35℃以上を維持できる時間は、バッテリー加温式のＸ社は35時間と長時間の維持が可能であったが、保温材式のＹ社、Ｚ社については6～12時間とばらつきがあることが明らかとなった（図15 B）。これらのことから、豚胚を宅配便等の利用を想定して輸送すると仮定すると、北海道から九州まで輸送することも考え、一昼夜輸送可能な輸送器が必要で有り、そのためには外部電源が不要で、48時間以上38 ℃を維持できるバッテリー式輸送器が適していると考えられた。

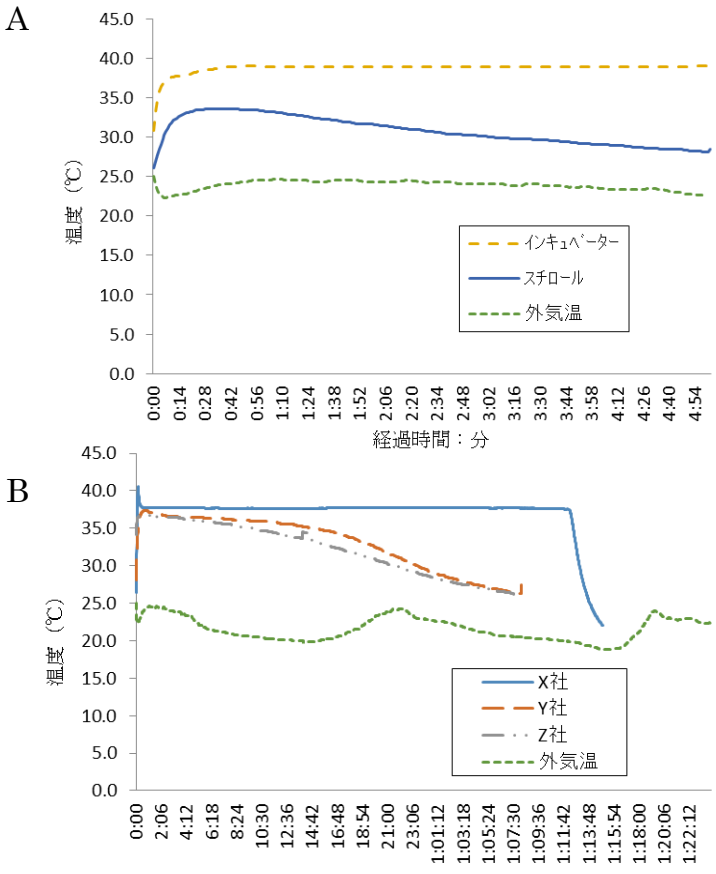

図15　市販輸送器の温度変化

A：インキュベーター、発泡スチロールと保温材の組み合わせの比較、
B：市販3社（X 社、Y 社、Z 社）の輸送器内温度変化

ついで、ストローAとストローBの2種のストローでD5胚を市販の培養器で48

時間培養したところ、培養前後の胚の呼吸量は、各区で有意差は認められなかったが、ストローA、B区の胚の生存率がシャーレ内で培養する対照区に比べ有意に低く（表８）、透明帯脱出率については、ストローB区が対照区に比べ有意に低かった。

表８　２種のストローとシャーレ培養における胚の生存性と呼吸量の変化

試験区	供試胚数 (供試回数)	生存 胚数(%)	透明帯脱出 胚数(%)	呼吸量($F\times10^{-14}$ mol s^{-1}) *	
				培養前	培養後
ストローA区	20（4)	14(70.0)^{a}	14(70.0)^{ab}	1.16±0.10^{A}	1.55±0.15^{B}
ストローB区	20（4)	12(60.0)^{a}	8(40.0)^{a}	1.11±0.08^{A}	1.39±0.07^{B}
対照区(シャーレ培養)	20（4)	20(100)^{b}	17(85.0)^{b}	1.11±0.06^{A}	1.41±0.09^{B}

*；平均値±標準誤差
^{ab} 同一列内の異なる文字間に有意差有り(P<0.05)
^{AB} 同一行内の異なる文字間に有意差有り(P<0.05)

2種のストローの材質をFT-IRで調べたところ(図13)、ストローAはポリエチレンテレフタレート（PET）、ストローBは塩化ビニル（PVC）であることがわかった。また、ストローBには塩化ビニルの材質を柔らかくするため可塑剤が使われている可能性が分析によって明らかになった。

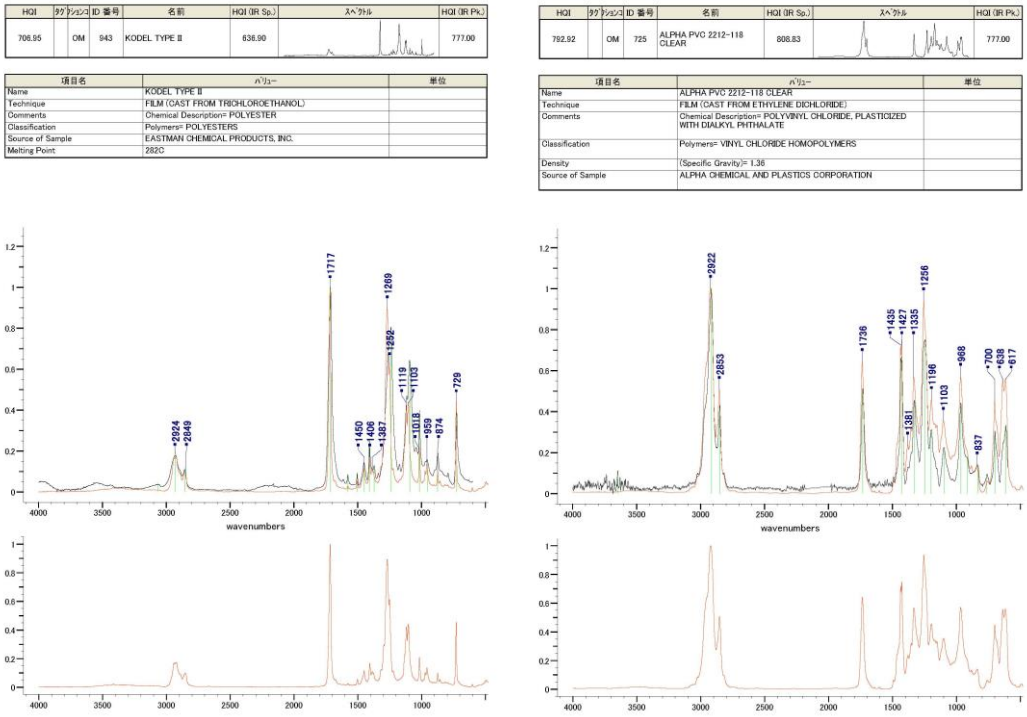

図16　FT-IRによる2種のストローの分析結果

データーベースよりAの材質がPET、Bの材質がPVCであることがわかった。

次に、市販2種のポリプロピレン製サンプリングチューブで48時間、D5CM胚を培養して比較したところ、チューブA区では胚の生存率が100%、透明帯脱出率が57.1%であったのに対し、チューブB区では、すべての胚が死滅した（表９）。

表９　２種のチューブ内に保存した胚の生存性

試験区	供試胚数 (供試回数)	生存胚数 （%）	透明帯脱出胚数 （%）
A区	14 (2)	14(100)[a]	8(57.1)[a]
B区	14 (2)	0(0)[b]	0(0)[b]

[ab] 同一列内の異なる文字間に有意差有り(P<0.05)

チューブBの胚がすべて死滅した原因は明らかではないが、チューブBは成長因子等が吸着しないように特殊な加工が施されたチューブであったことが原因かもしれない。この点についてはさらなる検討が必要と考えられた。

以上の結果から、輸送に使用する胚の容器の素材によって生存性に差があることが明らかになり、容器の選択も重要であると考えられた。

一方、試作した輸送器による胚の培養成績をマルチガスインキュベーターと比較したところ、D5CM、D6BL のいずれも培養後の生存率および透明帯脱出率に差は認められなかった（表 10）。このことから、試作した輸送器は、胚の発育能に影響を及ぼすことはなく、豚胚の輸送に利用可能であると考えられた。

表 10　試作した輸送器とインキュベーターでの胚の培養成績の比較

胚日齢	試験区	供試胚数	生存胚数(%)	透明帯脱出胚数(%)
D5CM	輸送器	49	45(91.8)	22(44.9)
	シャーレ	43	42(79.7)	19(44.2)
D6BL	輸送器	20	17(85.0)	15(80.0)
	シャーレ	38	35(92.1)	24(63.2)

輸送器：試作した輸送器での培養、シャーレ：インキュベーター内での培養

試験７ :振動が豚体内発育胚に与える影響

貨物自動車荷台中央で測定した加速度パワースペクトル密度（PSD）を図17に示す。3回の測定値はほぼ同様の結果であった。

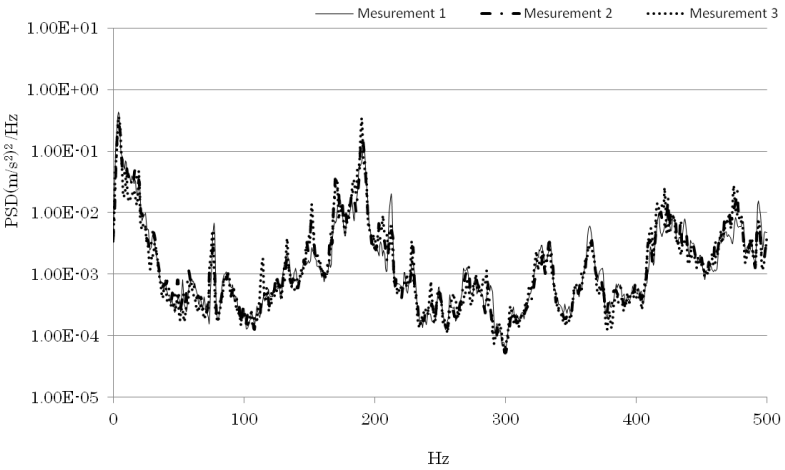

図17　貨物自動車の荷台に取り付けた加速度計による加速度パワースペクトル密度

得られた PSD の平均値を基にして振動を再現し振動負荷を20時間与えたところ、胚の生存率は振動区，静置区でそれぞれ88.6%，92.0%，呼吸量は0.90，1.05，生存細胞数は，63.3，68.8と両区に差は認められなかった(表11)。

表 11　20 時間振動負荷を与えた豚体内発育胚の発育性と呼吸量および細胞数

	供試	生存胚	呼吸量（$F\times10^{-14}$ mol s^{-1}）*		細胞数*	
	胚数	（%）	採胚直後	20 時間後	生存	死滅
振動区	35	31 (88.6)	0.84±0.05	0.90±0.08	63.3±0.0	2.3±0.0
静置区	25	23 (92.0)	0.84±0.05	1.05±0.09	68.8±0.0	2.2±0.0

*：平均値±標準誤差

我々は、振動が胚の発育性に対して何らかの悪影響を与えているのではないかと考えたが、表 11 の結果を見ると振動区は静置区と比較して生存率、呼吸量、生存細胞数に有意な差は認められず、貨物自動車の振動波形データに基づく振

動負荷は豚胚の生存性に影響を及ぼさないと考えられた。この結果は過去のMizobe らの報告[50]でも同様の結果が得られており、彼らはミニチュアピッグの単位発生胚に機械的な振動を与えた場合とそうでない場合で発生率に違いがなかったと述べている。本試験では、貨物自動車の振動を元に試験を行ったことから、貨物自動車での輸送は、輸送後の胚の生存性に悪影響を及ぼさないと考えられた。

試験８ :ストローおよびサンプリングチューブで輸送後の豚体内発育胚の発育能

神奈川県海老名市から山形県山形市までの平均輸送時間は21.9±0.3時間（平均値±標準誤差、n=4）で、輸送距離は357 kmであった。輸送中の加速度は図18に示すとおりで、各軸の加速度（絶対値）の最大値はX軸116.6 m/s²、Y軸117.6 m/s²、Z軸119.6 m/s²であった。X軸とY軸が同じような動きであるのに対し、Z軸は細かな加速が観察され、常に上下に振動していることが伺えた。また、宅配業者のHPで時刻を確認したところ、集積ポイントに届けられた時間で大きくX,Y,Z軸の加速が観察されたことから、集積ポイントで輸送器が上下左右に大きく動かされたことが伺えた。一方で、輸送器内のストロー直下の温度は37.9～39.0 ℃と大きな変化はなかった。

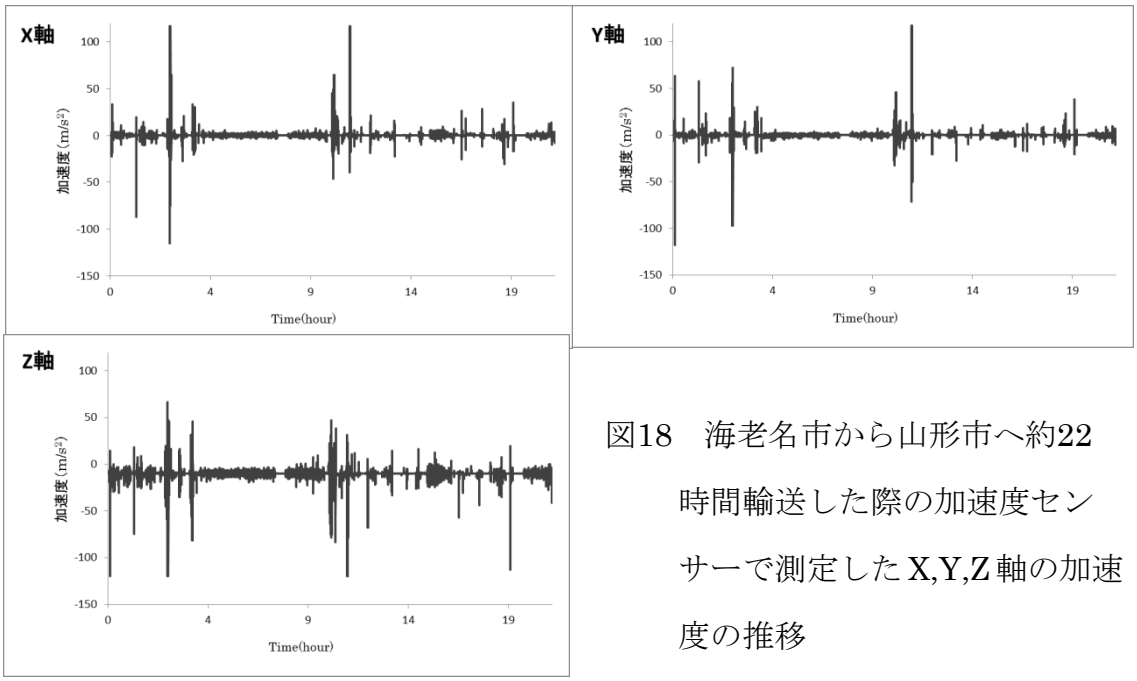

図18　海老名市から山形市へ約22時間輸送した際の加速度センサーで測定したX,Y,Z軸の加速度の推移

ストローで密封して輸送した場合の胚の生存率は77.4%と非輸送区の97.5%と比較して有意に低い値であった。一方、ガス濃度を調整して輸送した胚の生存率は100%で、輸送しない場合（97.5%）と同等の成績であった。また、透明帯脱出胚率も密封区は29.0%とガス濃度調整区の57.9%と比較して有意に低かったが、ガス濃度調整区は非輸送区（47.5%）と同等であった（表12）。

表 12　ストローやサンプリングチューブで輸送した場合と輸送せず培養した場合の豚体内生産胚の発育性と呼吸量の比較

試験区	供試胚数	呼吸量 ($F\times10^{-14}$ mol s^{-1}) *		到着直後の生存胚数 (%)	48 時間後透明帯脱出胚数(%)
		輸送前	到着直後		
密封区（ストローでの輸送）	31	0.49±0.02	0.56±0.05	24(77.4[a])	9(29.0[a])
ガス濃度調整区（チューブでの輸送）	19	0.47±0.04	0.43±0.05	19(100[b])	11(57.9[b])
非輸送区（培養器）	40			39(97.5[b])	19(47.5[ab])

*:平均値±標準誤差

[a,b]：異符号間に有意差有り（P<0.05）

試験7の表11の結果では、道路を輸送中の振動を再現して振動負荷を与えた場合には生存率、呼吸量、細胞数に差は認められなかった。しかし、実際に宅配便で輸送した場合は、密封区で有意に生存率、透明帯脱出率が低下した。この原因は明らかではないが、宅配便は、途中の集荷ポイントで荷物を振り分けるために、大きな加速度がXYZ軸でそれぞれかかっていることが図18からも推察される。これが実際に輸送した場合に、透明帯脱出率が低下した原因である可能性が考えられた。

また、炭酸ガス濃度を調節できない状態では、おそらく培養液の pH が低下したか、もしくは粘凋性などの物理的作用が輸送中の胚の発育性に何らかの影響を与えているのではないかと考えられた。Ozawa[47]らは、培養液の pH や浸透圧が低下し、胚盤胞発生率や作出された胚の細胞数が少ないと報告している。本実験でも、密封したストローで輸送したことから、長距離輸送中に pH や浸透圧が低下した可能性も考えられたが、この部分については、更なる検討が必要と考えられた。

結論として、炭酸ガス濃度 5%、温度 38℃を維持可能な豚胚専用輸送器と化学的合成培地である PBM を用いて輸送した豚体内発育胚は低酸素培養器と同等の生存率、透明帯脱出率が得られることが明らかとなった。また、この輸送器が 38 ℃、５％CO_2 濃度を 7 日間維持できることから、地震などで電源の中断が生じた場合の臨時のインキュベーターの役割も果たすことが可能であることも明らかとなった。

【小括】

振動が豚体内生産胚に与える影響と化学的合成培地と試作した輸送器で輸送した場合の発育性を検討したところ、次の成績を得た。

１．　D5CM 胚をストローに入れ、振動試験機で 20 時間振動負荷を与えたところ、振動負荷を与えない区と同等の生存率であった。

２．　ストロー内に胚を密封した密封区とガス濃度調整区を、輸送せず低酸素培養器で培養した非輸送区と比較したところ、ガス濃度調整区では、非輸送区と同等の生存率（輸送区 100%、非輸送区 97.4%）、透明帯脱出率（輸送区 57.9%、非輸送区 47.5%）が確認された。

３．　試作したガス濃度調整剤を利用した輸送器で輸送すれば、無血清培地で豚胚を輸送し、インキュベーターと同等の生存率を得ることができることが明らかとなった。

第Ⅴ章　種豚を効率的に生産するシステムの開発

第Ⅰ節　緒論

一般的に我が国における豚肉の生産は、種雄豚と種雌豚の交配により生まれた子豚を肥育することにより行われている。産肉能力や繁殖能力の優れた血統の種豚の導入は、効率的な豚肉生産を実現するばかりでなく、様々な国際情勢下での競争力強化や豚肉の安定供給にも多くの影響を与えると考えられる。養豚生産現場において、胚移植技術を実用化できれば、種豚を生体（豚個体）で農場へ導入する場合に比べ、胚として導入して農場で種豚を生産することが可能となるので、病気を農場内へ持ち込むリスクも極めて低くなる。

そこで、一般の養豚農家において実施可能な非外科的胚移植技術を応用し、電気化学的呼吸量測定による胚の品質評価法と、ガラス化保存技術や胚の輸送技術を組み合わせた種豚生産システムを検討した。

第Ⅱ節　材料と方法

供胚豚および胚回収法

供胚豚は、春機発動前の豚（大ヨークシャー種、中ヨークシャー種およびランドレース種）を用いた。胚の回収は既報[15,19]を若干修正して行った。供胚豚は最初の人工授精後 5 日目もしくは 6 日目の午前中にイソフルラン（4～5%）吸入麻酔下で開腹手術を施し、子宮角内を POE-CM[20]（機能性ペプチド研）で灌流して胚を回収した。これらの胚は試験開始まで PZM-5[21]または PBM[24]（機能性ペプチド研）を用い、5%CO_2、5%O_2、38.5 ℃で保存した。

形態的評価

胚は倒立顕微鏡下（倍率200 倍）で観察し、正常胚および変性胚、未受精卵に区分した。正常胚はさらに発育段階および変性細胞の割合等の形態的評価に

よる品質判定を行い、IETS マニュアル[22]に基づく Code 1の胚を試験に供した。

呼吸量の測定

胚の呼吸量は受精卵呼吸測定装置（HV-405, 機能性ペプチド研）により Abe ら[14,18]の方法に準じて測定した。胚の呼吸量の算出は球面拡散理論式[9]に基づき、専用の解析ソフトを用いて行った。

ガラス化保存および加温法

ガラス化保存は、三角ら[40]の報告に従い、胚スティック（ミサワ医科工業(株)）を使用して行った。すなわち 20 mM ヘペス添加 PBM を基本液に用い、胚を 1.8 M EG 添加基本液で 5 分静置した後、1.8 M EG、0.3 M トレハロース添加基本液で 5 分間平衡し、その後、ガラス化保存液（6 M EG、0.6 M トレハロースおよび 2%ポリエチレングリコール添加基本液）に移し、1 分以内に胚スティック上にのせ、液体窒素中であらかじめ冷却しておいた空のストロー内に挿入しガラス化保存した。

加温は、45 ℃のウォータバスであらかじめ温めておいた 1.8 M EG、0.3 M トレハロース添加基本液を 35 mm ペトリディッシュに入れ、その中へ胚スティックを直接投入することにより行った。そのまま 3 分静置し、その後 PBM で 3 回洗浄し、同液で 30 分間 5%CO_2、5%O_2、38.5 ℃で静置した。

輸送器

輸送器には、1.5 ml チューブを輸送できるアタッチメントを取り付け、ガス濃度調整剤とミリ Q 水を含ませた脱脂綿を使用して炭酸ガス濃度を 5%、湿潤環境が維持できるようにした。

非外科的移植法

移植は、吉岡ら[51]の報告を修正し、受胚豚を移植用ストール（富士平工業(株)、図19上）に入れ、移植液の逆流を防止する目的で頭部が低くなる状態（前傾約15度）に保定したのち、子宮内深部注入器（匠カテーテル、富士平工業(株)、図19下）を用いて行った。PBM で満たした内筒を外筒内に通して子宮角深部へ可能な限り挿入した。後端部に移植胚を充填したストローを装着し、綿栓部をストローカッターで切り取り、シリンジを装着した後、1 ml の PBM で押し出しながらストロー内容液を子宮角内へ注入した。受胎確認は妊娠35日目に超音波画像診断装置で行い、胎水および胎子の確認により妊娠と判定した。また、分娩後は、産子数を調査した。

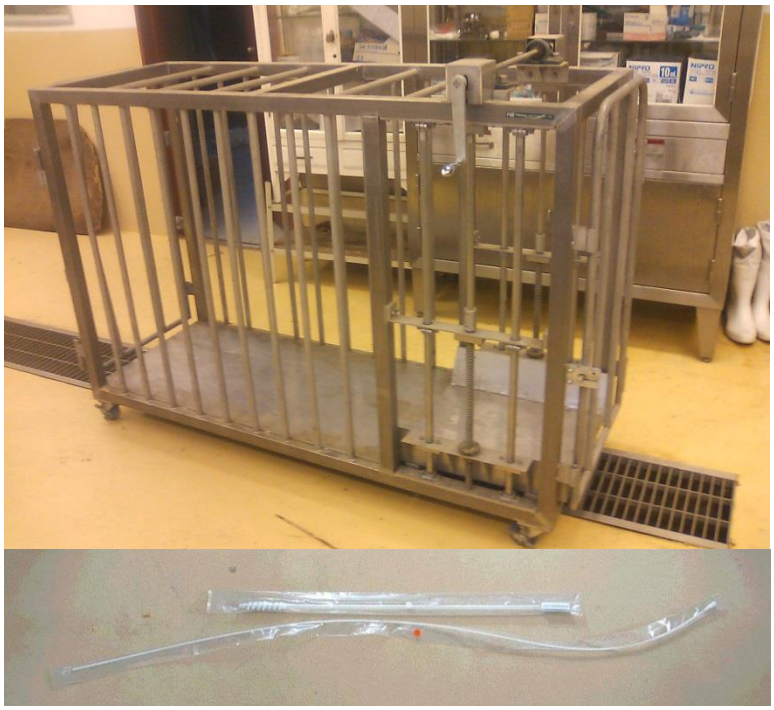

図19　移植用ストール(上)と子宮深部注入器（下）

実験計画

試験９ :豚体内発育胚の呼吸量と受胎性

呼吸量を測定した後、呼吸量の値から高呼吸量区および低呼吸量区に分別し、1頭の経産受胚豚に対して13～15個の胚を非外科的に移植して受胎性を検討し

た。移植胚はD5CM胚またはEB胚とし、受胚豚は、大ヨークシャー種、ランドレース種およびバークシャー腫の経産豚11頭（平均月齢30.0±3.0カ月：平均値±標準誤差)を用いた。離乳翌日の午前中にeCG 1,000 単位を筋肉内投与し、72時間後にhCG 500単位を筋肉内に投与してhCG投与翌日を0日目として4日目に非外科的に移植を行った。

試験１０ :豚体内発育胚のガラス化加温後の呼吸量と受胎性

MVAC法を用いてガラス化保存した胚盤胞および拡張胚盤胞29胚について、呼吸量を測定した後に、外科的に移植して受胎性を検討した。供胚豚は、大ヨークシャー種、ランドレース種およびその交雑種の経産豚2頭を用いた。試験9と同様に同期化した受胚豚に、hCG投与後4日目に移植を行った。

試験１１ :豚体内発育胚の輸送後の呼吸量と受胎性

新鮮胚の移植については、D5CM胚52個を試作した輸送器で輸送し、到着後の胚の呼吸量を測定した後、試験 9 と同様に同期化した受胚豚 1 頭に対して 9～15 個の胚を非外科的に移植して受胎性を検討した。ガラス化保存胚については、胚盤胞および拡張胚盤胞56胚をガラス化保存し、加温後に輸送して非外科的に移植して受胎性を検討した。受胚豚はランドレース種の経産豚7頭を用いた。試験9と同様に同期化した受胚豚に、hCG投与後5日目に移植を行った。

また、輸送に用いた培地は一時的に-30 ℃で保存後 DNA を抽出し、PCR を用いて既報に基づき PRRS[52]、PCV2[53]およびオーエスキー病ウィルス[54]の検出を行った。

統計処理

データの統計処理は、コンピューター統計処理ソフトSPSS（SPSS 16.0J .User's　Guide, SPSS Inc. Tokyo）を用いた。胚の呼吸量は、一元配置分

散分析による検定後に Tukey の HSD 法により多重比較を行った。受胎率の比較は、Fisher の直接確率法で行った。危険率5%（P<0.05）未満を有意差ありと判定した。

第Ⅲ節　結果

試験９ :豚体内発育胚の呼吸量と受胎性

非外科的胚移植の受胎成績を表 13 に示した。11 頭の受胚豚に 13～15 胚ずつ移植した結果、呼吸量が 0.59 より低い胚を移植した低呼吸量区では受胎が確認されなかったが、呼吸量が 0.59 より高い胚を移植した高呼吸量区では 7 頭中 3 頭が受胎した。娩出された子豚の産子数は、20 頭で平均体重は 1.7±0.1 kg、妊娠期間は 117.3 日、奇形等は認められなかった。

表13　呼吸量で分類した胚の受胎性および分娩成績

試験区	移植頭数(胚数)	移植胚の平均呼吸量（$\times 10^{-14}$ mol s^{-1}）*	受胎頭数（%）	分娩頭数	産子数（雄:雌）	移植した胚に対する産子率
高呼吸量	7(118)	0.89±0.03 [a]	3	3	20(12:8)	16.9%
低呼吸量	4(58)	0.52±0.02 [b]	0	0	0	0%
計	11(176)	0.77±0.03	3	3	20(12:8)	11.4%

*　：平均値 ±標準誤差.

[a-b]：P<0.05　異符号間に有意差有り

試験１０ :豚体内発育胚のガラス化加温後の呼吸量と受胎性

MVAC 法でガラス化保存した胚の加温後の呼吸量を測定したところ平均呼吸量は0.96でいずれも高かった（表14）。これを2頭に外科的に移植したところ2頭とも受胎し、子豚12頭が得られた（図20）。

表14　ガラス化加温胚の呼吸量、受胎性および分娩成績

受胚豚	移植胚数	移植胚の平均呼吸量（$\times 10^{-14}$ mol s^{-1}）*	受胎頭数	産子数（雄：雌）	移植した胚に対する産子率
WL1549	14	0.99±0.06	1	8(6:2)	57.1%
L671	15	0.93±0.05	1	4(2:2)	26.7%
計	29	0.96±0.04	2	12(8:4)	41.4%

*　：平均値± 標準誤差

図20　ガラス化保存後に呼吸量を測定し移植して生まれた産子

試験１１　:豚体内発育胚の輸送後の呼吸量と受胎性

新鮮胚を輸送後に15、15、13、9個に分け4頭の受胚豚に非外科的に移植したところ、受胎例は得られなかった（表15）。しかし、平均呼吸量の高い胚を移植したL1263においては、発情回帰日数が33日とわずかな延長が認められた。次にガラス化加温胚を輸送し、15、19、20個に分け、3頭の受胚豚に移植したところ、平均呼吸量が高い胚を移植した受胚豚1頭で受胎が確認された（表16）。

表15　呼吸量で分類した新鮮胚の輸送後の受胎性および分娩成績

供胚豚	受胚豚	輸送胚数	移植胚の平均呼吸量（$\times 10^{-14}$ mol s^{-1}）*	発情回帰日数	受胎頭数
D9019	L257	15	2.28±0.08 [a]	33	不受胎
D9019	L652	15	1.25±0.10 [b]	21	不受胎
D9019	L2110	13	0.68±0.03 [c]	20	不受胎
D9023	L848	9	0.73±0.05 [c]	21	不受胎
計		52	1.25±0.10	24	

* ：平均値±標準誤差

[a-c]：P<0.05　同一列内の異符号間に有意差有り

表16　呼吸量で分類したガラス化加温胚の輸送後の受胎性および分娩成績

供胚豚	受胚豚	輸送胚数	生存胚数(%)	移植胚の平均呼吸量（$\times 10^{-14}$ mol s^{-1}）*	受胎頭数
D9021	L1944	15	15(100)	1.56±0.15 [a]	受胎[†]
D9018	L1494	20	19(95.0)	0.57±0.06 [b]	不受胎
D9062	L1263	21	20(95.2)	1.10±0.08 [c]	不受胎
計		56	54(96.4)	1.07±0.07	

* ：平均値 ± 標準誤差　[†]：移植後 45 日目に流産（胎子数＝４）

[a-c]：P<0.05　同一列内の異符号間に有意差有り

また、輸送後に使用した培地のPRRS、PCV2、オーエスキー病ウィルスを調査したところ、いずれも検出されなかった。

第Ⅳ節　考察

第Ⅱ章第Ⅲ節の試験３の結果より（表３、４）、CM においても呼吸量を測定することで高い生存性を示す胚を選別できる可能性が示唆されたことから、移植試験は、後期桑実胚から初期胚盤胞の呼吸量を測定して行った。表 13 に示すように本試験全体での受胎率は 27.3%であり、これは子宮内深部注入カテーテルを用いた非外科的移植による Yonemura ら[55]の 64%や Cuello ら[34]の 47.6%には劣るものの、Li ら[56]の 31.3%、Suzuki ら[57]の 16.7%、Yoshioka ら[51] の 29.5%等の過去の報告と同等のものであった。

呼吸量の低い胚を移植した区では非外科的胚移植による受胎が確認されなかったが、呼吸量の高い胚を移植した区では、3 頭が受胎した。Renard ら[2]は、脱出後のウシ体内生産胚を約 20 時間体外で培養し、グルコースの取り込み量を調べた後に受胚牛に移植した結果、胚の形態に差が認められなくても、グルコースの取り込みが認められた胚は認められなかった胚より受胎率が有意に高かったと報告している。これらのことから、呼吸量の高い胚を移植することでより高い受胎率が得られる可能性が示唆された。

次に MVAC 法でガラス化保存した胚の加温後の呼吸量を測定したところ、平均呼吸量は 0.96 でいずれも高く、これを 2 頭に外科的に移植したところ、2 頭とも受胎し、子豚 12 頭が得られた。今回使用した MVAC 法は、非常に生存率が高いため、加温後の呼吸量は全体的に高かったことから、低呼吸量区を設定することができなかったが、加温後に呼吸量を測定して子豚が得られたのは、世界で初めてであり、実際に正常な子豚が得られることが明らかとなった。

最後に、新鮮胚およびガラス化加温胚を輸送して移植を行った。新鮮胚を輸送後に４頭の受胚豚に非外科的に移植したところ､受胎例は得られなかったが、ガラス化加温胚を輸送し、3 頭の受胚豚に移植したところ、平均呼吸量が高い胚を移植した受胚豚 1 頭で受胎が確認された。このことから、試作した輸送器による胚の輸送は問題ないことが明らかとなった。

以上の結果から、電気化学的呼吸量測定による胚の品質評価法と、ガラス化保存技術や新鮮胚の輸送技術を組み合わせたシステムで受胎例が得られ、本システムが有効に活用できる種豚生産システムであることが明らかとなった。

【小括】

呼吸量を測定した胚をガラス化加温後や輸送後に移植して受胎性を検討したところ、次の成績を得た。

1．　呼吸量が 0.59 より高い胚を非外科的に移植したところ、７頭中３頭が受胎した。

2．　MVAC 法を用いてガラス化加温後に呼吸量を測定したところ、平均呼吸量は 0.96 高く、その胚を 2 頭の受胚豚に外科的に移植したところ、2 頭とも受胎し 12 頭の子豚が得られた。

3．　試作したガス濃度調整剤を利用した輸送器で新鮮胚、ガラス化加温胚を輸送して非外科的に移植したところ、新鮮胚では受胎例が得られなかったが、ガラス化加温輸送胚を移植した 3 頭中 1 頭で受胎が確認された。

4．　以上のことから、胚を呼吸量で選別して移植することで高い受胎率が得られ、試作した輸送器で輸送した後でも受胎することが確認された。

第Ⅶ章　総括

現在、肉豚の生産農場では、産肉や繁殖能力に優れた血統の種豚を外部から生体で導入し、種雄豚と種雌豚を交配し生まれた子豚を肥育することにより豚肉の生産を行っている。しかし、生体での種豚の導入は外部からの疾病伝搬や導入豚の馴致失敗などのリスクを伴うことから、胚移植による種豚導入が可能になれば、そのリスクを大幅に軽減することが可能と考えられる。

一方で、豚は子宮角が長く、胚の採取は外科的な手法が必要であるため、外科手術が可能な限定された施設でしか胚採取を行うことができず、生産現場で豚胚移植を行うためには、採取した胚を農場に輸送して同期化した受胚豚に移植する新鮮胚移植以外は、一度超低温保存した後に加温して移植する必要がある。

そこでこれらの課題解決の手法として、受胎率向上をめざし豚胚の品質を電気化学的呼吸量測定により客観的に評価する手法の検討を行い、さらに、より生存性が高く疾病伝搬のリスクの低い Micro Volume Air Cooling (MVAC)法によるガラス化保存法を用いて超低温保存胚の移植手法を確立する一方で、生産現場へ胚を輸送するための輸送方法を検討し、これらをもとに種豚を効率的に生産するシステムを開発した。

１　豚胚の呼吸量測定による胚の客観的評価法の検討

はじめに、豚体内発育胚の呼吸量と胚の発育段階、細胞数および培養後の発育性との関係を調査し、呼吸量の測定による胚の客観的評価の有用性について検討した。人工授精後 5 日目に採取した後期桑実胚（D5CM)の呼吸量（酸素消費量:$\times 10^{-14}$ mol s^{-1}) は 0.58 であり、6 日目の胚の呼吸量は初期胚盤胞が 0.56、胚盤胞が 0.87、拡張胚盤胞が 1.13 と発育段階に応じて増加し、拡張胚盤胞の呼吸量は初期胚盤胞と比較して有意に増加した（$P<0.05$)。次に、人工授精後 6 日

目の胚盤胞（D6BL）の呼吸量を測定し細胞数を計数したところ、呼吸量と栄養外胚葉細胞数、総細胞数との間に有意な相関が認められた（P<0.001、それぞれr=0.783、0.769）。また、D5CM を豚後期胚培養用培地で 48 時間培養した後の透明帯からの脱出を確認したところ、脱出した胚の培養前の呼吸量（1.05）は、非脱出胚（0.77）のものと比較して有意に高かった。D5CM と D6BL 胚の採取直後の呼吸量を説明変数とし、線形判別関数により得られた呼吸量の境界値0.56、0.91 を元に脱出の有無を判別したところ、正しく判別された胚は D5CM で 33 個中 21 個（63.6%）、D6BL で 38 個中 26 個（68.4%）であった。これらのことから、豚体内発育胚の呼吸量を測定して選別することで 60%以上の胚の発育性を判別することが可能であり、胚を客観的に評価できる可能性が示唆された。

２　MVAC 法を用いてガラス化保存した豚体内発育胚の加温後の呼吸量とその後の生存性

次に血清等の動物由来成分を含まないガラス化保存液と液体窒素に直接接しない手法で超低温保存する MVAC 法を用いて保存した胚を、呼吸量で選別することが可能か検討を行った。胚盤胞期胚を MVAC 法でガラス化保存した。加温後の胚の呼吸量を測定し、培養後の発育性を調査したところ、生存率は 85%、透明帯脱出率は 45%であった。48 時間培養後に透明帯から脱出した胚の加温直後の呼吸量は 0.88 で、非脱出胚の 0.53 より有意に高い値であった。線形判別関数により判別確率を算出して得られた呼吸量の境界値 0.69 を元に脱出の有無を判別したところ、正しく判別された胚は 60 個中 42 個で、判別率は 70%であった。また、ガラス化保存後の胚の呼吸量を測定し、生存細胞と死滅細胞を染め分けたところ、呼吸量と生存細胞数との間に有意な相関が認められた（P<0.01）。これらのことから、ガラス化保存した胚を加温後にその呼吸量を測定することでその後の胚の発育性を評価できる可能性が示唆された。

３　豚体内発育胚の輸送方法の検討

振動が豚体内生産胚に与える影響と化学的合成培地と試作した輸送器で輸送した場合の発育性を調査した。D5CM 胚をストローに入れ、振動試験機で 20 時間振動負荷を与えたところ、振動を与えない区と同等の生存率であった。次にストロー内に胚を密封した密封区と、炭酸ガス濃度 5%、温度 38 ℃を維持可能な試作輸送器で輸送したガス濃度調整区を、輸送せず低酸素培養器で培養した非輸送区と比較した。密封区とガス濃度調整区の胚は宅配便で約 22 時間輸送した。その結果、ガス濃度調整区では、非輸送区と同等の生存率（輸送区 100%、非輸送区 97.4%）、透明帯脱出率（輸送区 57.9%、非輸送区 47.5%）が確認された。これらのことから、試作した輸送器で輸送した豚胚は、輸送しない場合と同等の発育性を示すことが明らかとなった。

４　種豚を効率的に生産するシステムの開発

最後に、呼吸量を利用した種豚生産システムを検討した。人工授精後 5 日目に採取した胚を、経産豚 11 頭に非外科的に移植（1 頭あたり 13～21 個）したところ、呼吸量が 0.59 より低い胚を移植した 4 頭の受胚豚では受胎が確認されなかったが、呼吸量が 0.59 より高い胚を移植した 7 頭のうち 3 頭が受胎し 20 頭の子豚が得られた。次に MVAC 法でガラス化保存した胚の加温後の呼吸量を測定したところ平均呼吸量は 0.96 でいずれも高かった。これを 2 頭に外科的に移植したところ 2 頭とも受胎し、子豚 12 頭が得られた。最後に、新鮮胚およびガラス化加温胚を輸送して移植を行った。新鮮胚を輸送後に 9、13、15、15 個に分け 4 頭の受胚豚に非外科的に移植したところ、受胎例は得られなかったが、ガラス化加温胚を輸送し、15、19、20 個に分け、3 頭の受胚豚に移植したところ、平均呼吸量が高い胚を移植した受胚豚 1 頭で受胎が確認された。

本稿は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）生

物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業（発展型研究一般枠）の助成を受けて、研究代表者の農研機構動物衛生研究所と独立行政法人家畜改良センター、株式会社機能性ペプチド研究所、佐賀県畜産試験場と共同で行った研究のうち神奈川県畜産技術センターでの成績をとりまとめたものである。本試験を通して、家畜改良センターから系統豚ユメサクラのガラス化保存胚を神奈川県で移植し子豚が得られ、現在ではその後代を継続して種豚として使用している（図 21）。

図 21　ガラス化保存後に移植して生まれたユメサクラ(上)と
その後の後代(下の写真の子豚)

以上の結果から、電気化学的呼吸量測定による胚の品質評価法と、ガラス化保存技術や新鮮胚の輸送技術を組み合わせたシステムで受胎例が得られ、有効に活用できる種豚生産システムを確立した。

参考文献

[1] Schilling E, Döpke HH. A rapid diagnostic test for the viability of early cattle and rabbit embryos using diacetyl-fluorescin. Naturwissenschaften 1978;65:658–9. doi:10.1007/BF00401916.

[2] Renard JP, Philippon A, Menezo Y. In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. J Reprod Fertil 1980;58:161–4. doi:10.1530/jrf.0.0580161.

[3] Brinster RL. Carbon dioxide production from glucose by the preimplantation mouse embryo. Exp Cell Res 1967;47:271–7. doi:10.1016/0014-4827(68)90126-2.

[4] Mills RM, Brinster RL. Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. Exp Cell Res 1967;47:337–44. doi:10.1016/0014-4827(67)90236-4.

[5] Magnusson C, Hillensjö T, Hamberger L, Nilsson L. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. Hum Reprod 1986;1:183–4.

[6] Overstrom EW, Duby RT, Dobrinsky J, Roche JF, Boland MP. Viability and oxidative metabolism of the bovine blastocyst. Theriogenology 1992;37:269. doi:10.1016/0093-691X(92)90338-R.

[7] Houghton FD, Thompson J, Kennedy C, Leese H. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. Mol Reprod Dev 1996;44:476–85.

[8] Lopes AS, Wrenzycki C, Ramsing NB, Herrmann D, Niemann H, Løvendahl P, et al. Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. Theriogenology 2007;68:223–36. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.055.

[9] Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, Matsue T, Abe H, Hoshi H, et al. Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. Anal Chem 2001;73:3751–8. doi:10.1021/ac010339j.

[10] Sakagami N, Akiyama K, Nakazawa Y. The relationship between oxygen consumption rate and pregnancy rate of bovine embryos. Reprod Fertil Dev 2007;19:225. doi:10.1071/RDv19n1Ab216.

[11] Lopes AS, Larsen LH, Ramsing NB, Løvendahl P, Räty M, Peippo J, et al. Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. Reproduction 2005;130:669–79. doi:10.1530/rep.1.00703.

[12] Lopes AS, Madsen SE, Ramsing NB, Løvendahl P, Greve T, Callesen H. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. Hum Reprod 2007;22:558–66. doi:10.1093/humrep/del404.

[13] Lopes AS, Greve T, Callesen H. Quantification of embryo quality by respirometry. Theriogenology 2007;67:21–31. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.026.

[14] Abe H, Shiku H, Aoyagi S, Hoshi H. In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. J Mamm Ova Res 2004;21:22–30. doi:10.1274/jmor.21.22.

[15] Sakagami N, Yamamoto T, Akiyama K, Nakazawa Y, Kojima N, Nishida K, et al. Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films. J Reprod Dev 2010;56:279–84.

[16] Sugimura S, Yokoo M, Yamanaka K, Kawahara M, Moriyasu S, Wakai T, et al. Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos. Cell Reprogram 2010;12:463–74. doi:10.1089/cell.2009.0111.

[17] Sturmey RG, Leese HJ. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. Reproduction 2003;126:197–204. doi:10.1530/rep.0.1260197.

[18] Abe H, Matsuzaki S, Hoshi H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. Theriogenology 2002;57:1273–83. doi:10.1016/S0093-691X(02)00634-9.

[19] Nakazawa Y, Misawa H, Fujino Y, Tajima S, Misumi K, Ueda J, et al. Effect of volume of non-surgical embryo transfer medium on ability of porcine embryos to survive to term. J Reprod Dev 2008;54:30–4. doi:10.1262/jrd.19132.

[20] Yoshioka K, Suzuki C, Onishi A. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. J Reprod Dev 2008;54:208–13. doi:10.1262/jrd.20001.

[21] Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM-K, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. Biol Reprod 2002;66:112–9. doi:10.1095/biolreprod66.1.112.

[22] Stringfellow DA, Seidel SM. Manual of International Embryo Transfer Society (IETS). 1998.

[23] Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod Biomed Online 2001;3:25–9. doi:10.1016/S1472-6483(10)61960-8.

[24] Mito T, Yoshioka K, Yamashita S, Suzuki C, Noguchi M, Hoshi H. Glucose and glycine synergistically enhance the in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium. Reprod Fertil Dev 2012;24:443–50. doi:10.1071/RD11197.

[25] Polge C, Wilmut I, Rowson LE. The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. Cryobiology 1974;11:560. doi:10.1016/0011-2240(74)90195-3.

[26] Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. Theriogenology 1994;41:101–6. doi:10.1016/S0093-691X(05)80054-8.

[27] Kashiwazaki N, Ohtani S, Miyamoto K OS. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196 degrees C. Vet Rec 1991;128:256–7.

[28] Fujino Y, Ujisato Y, Endo K, Tomizuka T, Kojima T, Oguri N. Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos. Cryobiology 1993;30:299–305.

[29] Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Nottle MB. Improved survival of porcine hatched blastocysts cryopreserved with glycerol and sucrose. J Reprod Dev 1995;41:165–70. doi:10.1262/jrd.41.165.

[30] Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman R, Grupen C, Seamark R, Nottle M. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. Biol Reprod 1994;51:618–22.

[31] Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, et al. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. Biol Reprod 2004;71:432–7. doi:10.1095/biolreprod.103.026542.

[32] Ushijima H, Yoshioka H, Esaki R, Takahashi K, Kuwayama M, Nakane T, et al. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. J Reprod Dev 2004;50:481–6. doi:10.1262/jrd.50.481.

[33] Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J, et al. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. Theriogenology 2004;62:1144–52. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.12.018.

[34] Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Parrilla I, Angel MA, et al. Non-surgical deep intrauterine transfer of superfine open pulled straw (SOPS)-vitrified porcine embryos: evaluation of critical steps of the procedure.

Theriogenology 2012;78:1339–49. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.035.

[35] Misumi K, Suzuki M, Sato S, Saito N. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. Theriogenology 2003;60:253–60. doi:10.1016/S0093-691X(02)01364-X.

[36] Fujino Y, Nakamura Y, Kobayashi H, Nakano S, Suzuki C, Yoshioka K. Viability of porcine embryosvitrified by the metal mesh vitrification method after surgical or non-surgical transfer. Reprod Fertil Dev 2007;19:221–2.

[37] Fujino Y, Kojima T, Nakamura Y, Kobayashi H, Kikuchi K, Funahashi H. Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. Theriogenology 2008;70:809–17. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.05.045.

[38] Maehara M, Matsunari H, Honda K, Nakano K, Takeuchi Y, Kanai T, et al. Hollow fiber vitrification provides a novel method for cryopreserving in vitro maturation/fertilization-derived porcine embryos. Biol Reprod 2012;87:1–8. doi:10.1095/biolreprod.112.100339.

[39] Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M, Leibo SP. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. Cryobiology 1998;36:20–31.

[40] Misumi K, Hirayama Y, Egawa S, Yamashita S, Hoshi H, Imai K. Successful production of piglets derived from expanded blastocysts vitrified using a micro volume air cooling method without direct exposure to liquid nitrogen. J Reprod Dev 2013;59:520–4. doi:10.1262/jrd.2013-045.

[41] Saha S, Suzuki T. Vitrification of in vitro produced bovine embryos at different ages using one- and three-step addition of cryoprotective additives. Reprod Fertil Dev 1997;9:741–6. doi:10.1071/R97024.

[42] Sakagami N, Nishida K, Akiyama K, Abe H, Hoshi H, Suzuki C, et al. Relationships between oxygen consumption rate, viability, and subsequent development of in vivo–derived porcine embryos. Theriogenology 2015;83:14–20. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.06.027.

[43] Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. The submarine incubation system, a new tool for in vitro embryo culture: A technique report. Theriogenology 1997;48:1379–85. doi:10.1016/S0093-691X(97)00379-8.

[44] Takahashi H, Kuwayama M, Hamano S, Takahashi M, Okano A, Kadokawa H, et al. Effect of B-mercaptoethanol on thee viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos during long-distance transportation in plastic straws. Theriogenology 1996;46:1009–15. doi:10.1016/S0093-691X(96)00265-8.

[45] Langley M, Marek D, Cieslak J, Masciangelo C, Doody KM, Doody KJ. Successful Day 5 embryo transfer and pregnancies resulting after transport of embryos by air for biopsy and genetic analysis. J Assist Reprod Genet 2001;18:330–5. doi:10.1023/A:1016624419635.

[46] Nakane T, Suzuki C, Y K, Nakano S, Yoshioka K. Birth of piglets through non-surgical transfer of in vitro produced embryos following transportation. Proceeding 4th Congr Asian Pig Vet Soc 2009:182.

[47] Ozawa M, Nagai T, Kaneko H, Noguchi J, Ohnuma K, Kikuchi K. Successful pig embryonic development in vitro outside a CO2 gas-regulated incubator: Effects of pH and osmolality. Theriogenology 2006;65:860–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.06.012.

[48] Lewis ML, Cubano L a, Zhao B, Dinh HK, Pabalan JG, Piepmeier EH, et al. cDNA microarray reveals altered cytoskeletal gene expression in space-flown leukemic T

lymphocytes (Jurkat). FASEB J 2001;15:1783–5. doi:10.1096/fj.00-0820fje.

[49] Vandenberg LN, Stevenson C, Levin M. Low frequency vibrations induce malformations in two aquatic species in a frequency-, waveform-, and direction-specific manner. PLoS One 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0051473.

[50] Mizobe Y, Yoshida M, Miyoshi K. Enhancement of cytoplasmic maturation of in vitro-matured pig oocytes by mechanical vibration. J Reprod Dev 2010;56:285–90. doi:10.1262/jrd.09-142A.

[51] Yoshioka K, Noguchi M, Suzuki C. Production of piglets from in vitro-produced embryos following non-surgical transfer. Anim Reprod Sci 2012;131:23–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.01.018.

[52] Kono Y, Kanno T, Shimizu M, Yamada S, Ohashi S, Nakamine M SJ. Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. J Vet Med Sci 1996;58:941–6.

[53] Kawashima K, Tsunemitsu H, Horino R, Katsuda K, Shoji T, Onodera T, et al. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Japan: Clinical manifestation of the diseased pigs, experimental infectio of porcine circovirus type 2 (PCV2), and epidemiological investigations of PCV2 and PMWS. Bull Nstl Inst Anim Heal 2003;109:9–16.

[54] Wheeler J, Osorio F. Investigation of sites of pseudorabies virus latency, using polymerase chain reaction. Am J Vet Res 1991;52:1799–803.

[55] Yonemura I, Fujino Y, Irie S, Miura Y. Transcervical transfer of porcine embryos under practical conditions. J Reprod Dev 1996;42:89–94. doi:10.1262/jrd.42.89.

[56] Li J, Rieke A, Day BN, Prather RS. Technical Note: Porcine non-surgical embryo transfer. J Anim Sci 1996;74:2263–8.

[57] Suzuki C, Iwamura S, Yoshioka K. Birth of piglets through the non-surgical transfer of blastocysts produced in vitro. J Reprod Dev 2004;50:487–91. doi:10.1262/jrd.50.487.

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始、ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました岡山大学大学院環境生命科学研究科教授 舟橋弘晃博士、木村康二博士、並びに若井拓哉博士に深甚なる謝意を表します。また、論文投稿に際して御指導を戴きました国立研究開発法人 農業･食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 吉岡耕治博士、鈴木千恵博士ならびに山形大学大学院理工学研究科教授 阿部宏之博士に深甚なる謝意を表します。 さらに本研究の実施に当たり、御指導と御鞭撻を賜りました家畜改良センター宮崎牧場　三角浩司氏（当時家畜改良センター技術第一課）、家畜改良センター技術第一課 平山祐理氏、株式会社機能性ペプチド研究所　星宏良博士、山下祥子博士、水戸友美氏、星 翼氏、佐賀県畜産課の大曲秀明氏（当時佐賀県畜産試験場）に心より感謝いたします。

そして、神奈川県畜産技術センターの秋山 清博士には研究対象家畜が異なるにもかかわらず終始ご教示、ご鞭撻を頂き、時には精神的な支えにもなって頂きました。また、西田浩司氏には、忙しい業務の合間を縫って受胚豚の同期化のための投薬に休日出勤してご協力頂き、私がインフルエンザで倒れた際には胚を振動試験機にかける作業を行って頂きました。心からお礼申し上げます。

さらに、輸送液中のウィルス検出については神奈川県環境農政局畜産課　英俊正氏(当時県央家畜保健衛生所)、神奈川県県央家畜保健衛生所 高山 環氏に、業務ご多忙の中ご協力頂きました。深く感謝いたします。

博士課程への挑戦および本研究の推進において、様々なご配慮頂きました、歴代の神奈川県畜産技術センター所長である藤村信雄氏、小島信男氏、白銀敏晴氏、丹波義影氏、吉田昌司氏、竹本佳正氏、さらには企画研究課の養豚グループの諸氏に対しても深く感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行および論文の作成に当たり、論文検索などの手伝いをしてくれた長女の雪乃、資料の整理をしてくれた長男 柊吾、温かい目で見守ってくれた両親、日々の生活や健康面において陰になり日向になり支えてくれた細君 晶子にこの場を借りて感謝の意を表します。