

豚胚の凍結保存について

農林水産省家畜改良センター
生産技術調整官 小島敏之

はじめに

今、地球生態系の破壊が急速に進行している。われわれ人類に与えられた緊急の課題は、この破壊をいかに食い止め、対処するかということである。この破壊によって多くの動物遺伝資源、とくに野生動物が絶滅の危機に瀕している。野生動物以外でも、経済性に劣る在来品種や利用されなくなった改良品種などのいわゆる農林水産動物遺伝資源が著しい減少を示し、地球上から消滅する危険が増大している。

絶滅した動物を再び作り出すことは不可能なので、将来生じるかも知れない需要のために貴重な動物遺伝資源は確保し保護ならびに保存していかなければならない。ここで言う動物遺伝資源の保存(preservation)とは、「個体および集団の維持を目的とし、その進化に関する変化に対応する維持を含まない計画および施策」を指し、英語のconservationとは区別する。

動物遺伝資源の保存が叫ばれるようになった背景には、いくつかの動物種で胚の凍結保存が確実な技術として確立していたことが挙げられる。遺伝子の保存という意味では、生殖細胞(n)、胚(2n)あるいは個体のどのレベルにおいても有効性は同様であるが、保存中の遺伝的变化や疾病・事故による損耗ならびに保存にかかる経費面を考慮すると個体レベルの生体保存よりも生殖細胞や胚の凍結保存の方が優れている。しかし、個体レベルでの生体保存は、とくに胚の凍結保存技術が確立していない動物種においてはやはり考慮に入れておかなければならない。また、必要とする動物集団を再生する効率の面からも、このような動物種においては個体レベルでの保存が必須である。

現在、身近な農用動物の中では豚がこれに該当する。一方、凍結保存の利点を考えたとき、やはり豚についても生殖細胞のうち特に卵子(精液については、技術的には豚でもほぼ実用化の域に達している)あるいは胚での凍結保存を確立するための技術開発を進めて行く必要がある。ここでは、豚胚の凍結保存に関する研究の現状を紹介するとともに、問題点を拾い出し、今後の展開に触れたい。

1. 豚胚の凍結保存研究の歴史

ソ連の研究者によって1951年に豚の胚移植の最初の成功例が報告されて以来、豚の繁殖生理を研究する手段として胚移植技術は利用されてきたが、多胎で妊娠期間が比較的短い豚では、妊娠期間が長い単胎動物である牛ほどには胚移植技術に実用的価値が認められずに近年まできた。しかし、防疫を特に重要視する養豚産業においては、新しい遺伝形質を導入する際に疾病の伝播を完全に遮断することが必要であるので、その胚移植に関する研究が再び最近盛んに行われるようになってきた。ただし、豚胚の凍結保存技術が未だ確立していないことが大きな要因となり、未だに牛における胚移植ほど実用的利用価値は高くない。

豚胚は低温感受性が非常に高く、従来は+15℃以下の温度に曝されるとその生存性が著しく損われると言われていた。しかし、当研究室(農林水産省畜産試験場)で-5℃ま

で冷却された豚胚の体外培養による生存性が示されたのに続き、+11℃に冷却された豚胚から生存胎児が得られたこと、-35℃まで冷却された豚胚より正常な子豚が発育したことがわが国の他研究機関から相次いで報告された。さらに、液体窒素中で凍結保存された豚胚から子豚が発育したことが、当研究室の他、これもわが国の企業の研究機関より報告された（後述）。しかし、その凍結融解後の生存率は著しく低く、再現性も含めて今後解決されるべき多くの問題点を抱えていた。

拙文「豚の繁殖技術開発の現状、とくに豚胚の凍結保存技術の開発について」が日本養豚学会誌に掲載されて間もない1995年7月5日に全農飼料畜産中央研究所（茨城県つくば市）から豚凍結受精卵のダイレクト法（融解後、胚から耐凍剤を除去する操作なしで耐凍剤とともに胚を移植する方法）では世界で最初に子豚（デュロック種）の生産に成功という発表があった。わが国では農水省畜試（1989年6月）、全農（1990年4月）、昭和産業（1990年8月）、全農（1991年9月）の報告に続いて5例目である。しかも、今回は3頭が分娩し（うち2頭がダイレクト法）、うち1頭は50%の移植胚生存率であった。世界的に見ても（公表されているもの）、現在オーストラリアに研究のため滞在中の長嶋比呂志博士が後述する独創的な方法で子豚生産に成功した1例があるだけであり、今回の全農の成功例はわが国の豚胚凍結保存技術の水準の高さを改めて示したものとして歓迎される。

2. 豚胚の凍結保存技術の確立を阻害している生物学的要因

近年、豚、とくにミニチュア豚が医学用の実験動物として再評価され、各種遺伝子の導入による疾患モデル豚の作出、ヒトへの臓器移植のための臓器供給動物としての利用などに応用されようとしており、豚胚を研究対象とする研究者の数が増加することが予想されるので、今後豚胚の凍結保存研究は今までにない速度で進展するものと期待される。この稿では、今までに得られている成果から豚胚の凍結保存技術の確立を阻害している生物学的要因および今後研究を進めるにあたって考慮すべき技術的要因をまとめてみた。

まず、今まで豚胚の凍結保存の成功率が極端に低いことの原因として提示されている仮説のいくつかを紹介する。これらは、最近の報告および筆者が所属していた研究室で得られた成果に基づいている。第1に、豚胚の凍結保存研究が開始された頃から言われていたことであるが、それは豚胚の細胞質中に多量に存在する脂肪顆粒に起因しているというものである。長嶋ら(1994)は、豚前核期卵にサイトカラシン処理ならびに遠心処理を施し脂肪顆粒を偏在させ、マイクロマニピュレーターでその脂肪顆粒を除去した結果、耐低温性を向上させることに成功している。これは、脂肪顆粒の存在自体による欠点を解消しただけでなく、蓄積脂肪含量が減少することによって細胞膜の脂肪酸組成が変化した可能性を示唆している。彼らは、この方法により脂肪顆粒を除去した2～4細胞期胚を凍結融解し移植後に子豚を得ている(1995)。第2に、豚胚が15℃を境にして急激に生存性を喪失するのは、胚細胞膜ならびに細胞内小器官の膜のリン脂質2重層を構成する脂肪酸組成に起因しているというものである。Youngsら(1994)は、少し発育段階が進んだ豚胚の脂肪酸組成を分析し、不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸の構成比率を報告した。しかし、対照（すでに凍結保存が成功している動物種の胚）がないこと、および実際に凍結保存の研究に用いられる発育段階の胚ではないことから、結論を下すには証拠が不足している。ただ、実際の胚を用いてこれを証明するには脂肪酸組成分析のために膨大な胚数が必要であり、事実上

直接的証明は困難である。筆者らは、恒温動物においては食餌性に生体膜の脂肪酸組成を変換することが可能であるとの仮説に基づいて、供胚豚に毎日給与する飼料の一部を高度不飽和脂肪酸に置換した結果、その豚由来の胚は凍結融解直後の細胞数を指標とした場合、対照豚から採取した胚のそれよりも有意に多いことを示した(1994)。ただし、今のところこの試みは凍結融解胚の移植による受胎に結びついていない(妊娠25日齢で流産胎子確認)。やはり低温に感作されることにより誘発される致命的な傷害として、チューブリン(重合して細胞骨格繊維である微小管を形成する)の脱重合による細胞骨格(細胞質中に見られるタンパク質繊維群)の崩壊現象が考えられる。豚胚でこれが低温感受性が極度に高いことの主因とする実験的証明はないが、第3の原因として可能性は否定できない。また、東京農大の岩崎ら(1994)は豚凍結融解胚の染色標本を作製する際に、豚胚は牛胚に比べて内部細胞塊(胎子組織に発生する細胞群)の細胞間結合が脆弱であることを見いだした。筆者らが豚胚の凍結保存研究に着手した頃に比較すると、凍結融解後の体外での生存性は顕著に改善されている。しかしながら、それにも拘わらず移植後の受胎成績が極端に低い理由として、内部細胞塊の細胞間結合の脆弱化が第4の原因として説得力を持ってくる。農林水産省畜産試験場育種部資源開発研究室長の花田博文博士の御協力を得て、低温感作胚の染色体分析を行なった結果、染色体の数的および構造的異常は認めることができなかった(未発表)。したがって、不受胎の原因が低温感作による染色体への影響である可能性は非常に小さいことが推察されるが、低温感作が染色体の数的および構造異常を起こさないとはこの小規模な実験だけでは結論できない。

3. 今後研究を進めるにあたって考慮すべき技術的要因

次いで、豚胚の凍結保存研究および他の動物胚の凍結保存研究において得られた知見から、今後豚胚の凍結保存に関する研究を進めるに際して考慮すべき事柄を挙げる。まず、豚胚は他の動物胚と同様に胚の発育段階により凍結融解後の生存性が大きく影響されることである。すなわち、拡張胚盤胞から脱出した直後の胚盤胞が比較的耐低温性および耐凍性が高い。今まで、わが国で -196°C に凍結された豚胚から産子が得られた5例ともすべて拡張胚盤胞か脱出胚盤胞が用いられた。脱出胚盤胞では、緩速冷却法を用いた場合には直径 $300\mu\text{m}$ 以下の胚が、急速冷却法を用いた場合には $400\mu\text{m}$ 以下の胚が耐凍性において優れていることが報告されている。閉鎖群に疾病の伝播を遮断しつつ新しい遺伝形質を導入する手段として胚移植を利用することを想定すれば、透明帯に覆われている発育ステージ、すなわち拡張胚盤胞での保存が望ましい。第2に、すでに述べたように、豚胚は低温感受性が非常に高く 15°C を境にして急激に生存性が失われることである。したがって、緩速冷却法により凍結する場合には植氷の時点ですでに凍結融解の全行程で被る傷害のほとんどすべてを被っている(山形大学・岩崎ら1995)。それゆえ、この豚胚特有の高い低温感受性を制御する技術が必要となってくる。この低温傷害の本態は、生体膜リン脂質2重層の相転移および側方相分離などによる生体膜の不可逆的な構造変化が原因となって膜機能を喪失するためと考えられている。第3には、採卵から凍結処理を開始するまでの培養時間が一定時間以上長くなると融解後の生存性が急激に低下することである。これは、豚胚の体外培養系の完成度が牛胚ほど高くないことが原因である。採卵時に、耐低温

性および耐凍性を有する発育段階に達していない場合には体外培養を余儀なくされることから、常時凍結に最適な発育段階の胚を採取することが実験の効率を上げるためにも必要になるが、雌豚の生殖生理の特徴から解決はそう簡単ではない。第4に、豚胚の凍結保存に最適な耐凍剤は必ずしも決定されているとは言えないことである。今まで成功している例ではグリセロールが主に用いられたが(先述した長嶋らの方法では、プロピレングリコールが用いられた)、成功率を上げるために最適な耐凍剤の選択は欠かすことはできない。高濃度の耐凍剤を使用する急速冷却法ないしガラス化保存法では、エチレングリコールが比較的豚胚に対して毒性が少ないことがわかっている(吉野ら, 1993; 小林ら, 1995)。緩速冷却法で用いる濃度でもエチレングリコールが比較的豚胚の細胞膜透過性が高いことが判明しているが、最適かどうかの判断はまだされていない。新素材の発掘を含めて検討が必要である。第5に、凍結融解後の耐凍剤の除去過程が生存性に影響を及ぼすことがわかっている。すなわち、耐凍剤の除去過程を徐々にすることにより凍結融解のストレスを受けた胚の浸透圧ショックをできるだけ和らげれば、少なくとも凍結融解後の体外での培養期間中の生存性は改善される。ダイレクト法は、耐凍剤の除去過程で起きる人為的な操作ミス回避の意味において優れた方法である。第6に、体外培養期間中の培養条件あるいは凍結媒液の組成が凍結融解後の生存性に影響することである。これは、第3番目にあげた項目と矛盾するようであるが、とくに体外培養の培養液中あるいは凍結媒液中に細胞膜の脂肪酸に影響を及ぼすと予想される物質の添加は有効であるとの知見が得られている。この例として、凍結媒液の高分子成分として血清よりも牛血清アルブミンが優れていること(豚胚;長嶋ら,1992)、および培養液へのリノール酸アルブミン(牛体外受精胚;今井ら,1994)や脂肪酸の過酸化防止剤等(マウス胚;Tarin and Trounson, 1993)の添加が凍結融解後の生存性を向上させる点で有効であることが報告されている。

農林水産省畜産局、家畜改良センター、農林水産省畜産試験場および各都道府県畜産試験場等の豚胚移植関係者で構成する「豚新技術開発研究会」の豚胚の凍結保存分科会は、低温感受性制御技術開発グループと急速冷却法開発グループに分れている。低温感受性制御技術の開発が必要なことは今まで述べてきた内容から理解していただけたと思うが、最後に急速冷却法の開発をもうひとつの柱とした理由を以下に述べる。過去の哺乳動物胚の凍結保存技術開発の歴史を振り返ると、まず緩速冷却法により成功例が得られ、次いで急速冷却法での成功例が報告されるようになってきた。しかし、近年とくに急速冷却法は低温生物学および低温物理学の進展とともに技術の簡易化のみならず安定化が図られ、信頼性のある技術として確立されつつある。また、急速冷却法には、緩速冷却法と比べていくつかの長所がある。それらは、危険温度域と言われる低温域を速やかに通過すること、またとくにガラス化保存法の場合には、細胞内外に形成される氷晶による物理化学的な傷害を回避することが可能なこと、塩の濃縮による傷害は緩速冷却法よりも少ないことなどである。したがって、高濃度で用いても毒性が少ない耐凍剤を使用すれば、低温感受性が極度に高い豚胚には適した冷却方法と言えるかも知れない。さらに、緩速冷却法では豚胚にとって最適な冷却速度、予備凍結温度等の条件を決定するのに多大な時間と胚を必要とするが、急速冷却法では最適な耐凍剤の選択ならびに平衡条件の検討にかかる労力を差し引いても、より少ない時間でより多くの胚を使用して試験することができると思われる。ま

た、すでに述べた仮説のうちのどれかは急速冷却法の採用により解決されるかも知れない。最後に、胚の耐低温性および耐凍性に品種間差が存在するかどうかについては、今後詳細な検討が必要であると思われる。

おわりに

現在、豚胚の凍結保存に関してはわが国が世界をリードする態勢にあり、今後は実用技術とするために再現性と効率を向上させることがわれわれの責務である。