

出國報告（出國類別：研究）

應用人工輔助生殖技術於本土黑豬 保種之研習

服務機關：農業部畜產試驗所南區分所

姓名職稱：曾楷扉助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：113年10月18日-10月31日

報告日期：114年1月10日

目次

摘要.....	3
目的.....	4
過程.....	5
計畫內容.....	6
一、 豬體外生產系統 (porcine <i>in vitro</i> production system) ...	6
二、 公豬副睪採精.....	10
心得與建議	12
參考文獻.....	13
照片紀實.....	14

摘要

本次出國短期研究是前往日本國立研究開發法人農業、食品產業技術綜合研究所（National Agriculture and Food Research Organization, NARO）研習豬隻人工輔助生殖技術如豬胚體外生產系統（*in vitro* production system, IVP）及公豬副睪採精技術，以應用於本土黑豬保種。研習期間在 Kikuchi Kazuhiro 博士及 Sembon Shoichiro 博士的指導下，完成 4 次豬胚體外培養（IVP）操作，分別使用北卡羅來納大學 37（North Carolina State University 37, NCSU-37）與 Porcine Oocyte Medium（POM）兩種培養系統。試驗期間共培養 286 顆卵母細胞，經 46 小時體外成熟（IVM）後，進行體外授精（IVF），使用冷凍解凍的梅山豬副睪精液，精子濃度為 1×10^5 spermatozoa/mL。結果顯示正常受精率為 $51.3 \pm 3.1\%$ ，多精入卵率為 $11.7 \pm 4.5\%$ ；第 6 天囊胚率為 $10.8 \pm 1.7\%$ ，平均囊胚細胞數為 46.7 ± 2.5 個。在 Kikuchi Kazuhiro 博士以書面解說下學習公豬副睪精液採集技術，並了解精液處理與冷凍流程，強調操作環境需維持 37°C ，最終冷凍以一階段冷凍法完成。此外，研習期間與沖繩縣府方交流阿古豬（Agu）保種計畫，針對該豬種繁殖力低的問題討論人工輔助生殖技術的應用。此次為期 14 天的研習，不僅提升豬隻 IVP 與副睪採精技術的實務操作能力，也為返臺後建立及優化相關技術奠定基礎，對未來本土黑豬繁殖研究應用具有重要意義。

目的

依據 108 年 5 月養豬頭數調查結果顯示，黑豬飼養頭數為 69.5 萬頭，占豬隻飼養總頭數 12.7%，相較 104 年 11 月養豬頭數調查結果，黑豬飼養頭數為 82 萬 4 千多頭，占市場豬隻約 15%，黑豬飼養頭數已大幅減少，為避免市場日漸式微，應協助優良黑豬品系進行保種，以提升黑豬產業之競爭力。民間黑豬多為臺灣在地種原或與國外品種雜交所生成的特色化畜產動物，血緣組成多元，遺傳性能較不穩定，未來期應用人工輔助生殖技術於黑豬保種，選育優良黑豬品系並提升繁殖性能。本次赴日本研習胚體外生產系統及公豬副睪採精、精液冷凍技術，以期未來助於我國優良黑豬品系保存及提升繁殖性能。

過程

日期	起訖地點	行程內容
10月18日(五)	臺灣高雄-日本成田國際機場-茨城縣筑波市	去程，至日本國立研究開發法人農業、食品產業技術綜合研究所，生物機能利用研究部報到
10月19日(六) - 10月20日(日)	日本國立研究開發法人 農業、食品產業技術總 合研究所 (NARO)	研習及資料準備
10月21日(一) - 10月25日(五)		執行豬胚體外生產系統及豬隻副睪採精、冷凍等技術交流及研習
10月26日(六) - 10月27日(日)		研習資料整理及討論
10月28日(一) - 10月31日(四)		執行豬胚體外生產系統及豬隻副睪採精、冷凍等技術交流及研習。
10月31日(四)		茨城縣筑波市-日本成田國際機場-臺灣高雄

計畫內容

人工輔助生殖技術（artificial assisted reproduction technology, ART）應用於畜產經濟動物，以保存遺傳物質及提升生殖效率。以豬為例，其胚在生物醫學的應用潛力，受到科學界極大的關注。由於豬的生理狀態與人類相似度高，體外（*in vitro*）及體內（*in vivo*）生產之胚，常常被應用於幹細胞或轉基因動物之生產；其器官亦作為器官異種移植研究的首選。然體外胚之生產，需多種相關技術之搭配才可成就，包括卵母細胞體外成熟（*in vitro* maturation, IVM）、體外授精（*in vitro* fertilization, IVF）及最後的體外培養（*in vitro* culture, IVC）。然豬胚體外生產的關鍵限制因子是在 IVF 階段；儘管此一技術已經發展數十年，但是 IVF 之效率幾乎仍很難達到 50-60%的水平，其容易多精入卵（polyspermy）的情況仍有待解決。人工輔助生殖技術另一發展之重點為生殖細胞冷凍，但豬隻卵母細胞冷凍與牛、羊等其他物種相較，困難許多。已有多種玻璃化冷凍方法嘗試應用於豬成熟卵母細胞冷凍，初見之結果亦顯示其具有相當高之解凍後存活率，但是經過解凍後進行 IVF 及後續 IVC 培養，或是進行單一精子注入之結果顯示，效率均相當低下。其原因為儘管其解凍後存活率高，但豬卵母細胞玻璃化冷凍若在細胞週期中之間期 II（Metaphase II）階段，常在解凍後發現有紡錘體（spindle）異常之情形。Kikuchi Kazuhiro 博士所帶領之研究團隊在豬胚體外生產系統有著相當多的經驗及期刊發表。本次研習目的為赴日本研習豬胚體外生產系統、公豬副睪採精及精液冷凍技術以利日後進行國內優良黑豬保種，希冀前往日本學習嚴謹之標準作業程序規範及技術，汲取相關經驗及方法，盼未來能將該技術應用於相關研究及業界。

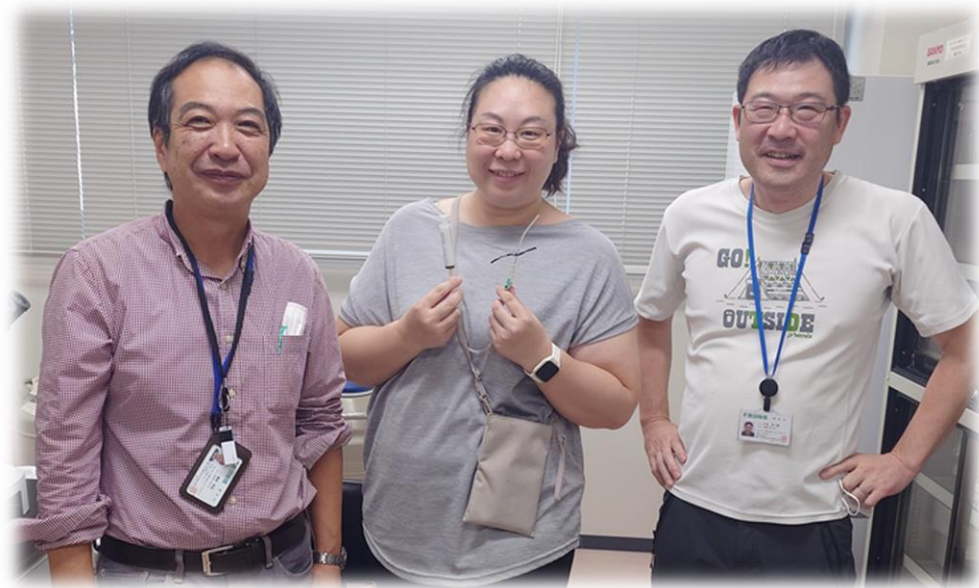


圖 1 左起為 Kikuchi Kazuhiro 博士、筆者及 Sembon Shoichiro 博士，此次研習由兩位博士分別指導。

一、豬體外生產系統（porcine *in vitro* production system）

1. 卵母細胞收集（Oocytes collection）

豬卵巢每星期一及二，由專人自屠宰場收集卵巢，剪除多餘組織後，先以磷酸緩衝液（phosphate buffer solution, PBS）清洗數次，以雙層塑膠

袋包覆後，投入裝有攝氏 37 度溫水之真空保溫水瓶運送至實驗室（圖 2）。卵巢抵達實驗室時，以 PBS 清洗數次後，放入預溫之攝氏 37 度恆溫水浴槽中。再次以剪刀將髓質部之多餘組織切除，並將殘留血液擦拭乾淨，待後續卵母細胞收集使用。收集卵母細胞時，將卵母細胞修整完畢之卵巢以 PBS 沖洗，放置於 6 公分培養皿，以手術刀片劃破或以 18G 針筒直徑 3-6 mm 之濾泡後（圖 3），以吸管將培養皿中收集到含有濾泡液及卵母細胞之液體，移入 15mL 離心管中，靜置 10min，待卵母細胞沉降至底部以利收集（圖 3）。以吸管由 15mL 離心管底部吸出適量液體，放入裝有 5%（v/v） fetal bovine serum（Gibco; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA）、20 mM HEPES（Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan）、及 antibiotics（100 units/ml penicillin G potassium and 0.1 mg/ml streptomycin sulfate）之 NCSU37 培養液的 3.5 公分培養皿中（圖 4），以解剖顯微鏡尋找有卵丘細胞包覆之卵丘-卵母細胞複合體（cumulus-oocyte complexes, COCs）（圖 5）。COCs 以第一階段卵母細胞成熟培養液清洗數次後移入預先於二氧化碳培養箱中平衡之第一階段卵母細胞成熟培養液，進行卵母細胞成熟培養。



圖 2 自屠宰場取回之卵巢。



圖 3 以針筒方式收集豬卵母細胞。



圖 4 沉降之卵母細胞。



圖 5 沉降後含有卵母細胞的培養液。

2. 體外成熟

COCs 收集完畢後，隨即進行 46 小時的體外成熟培養。體外成熟培養分為兩個階段進行。第一階段體外成熟培養時間為 22 小時，培養液以北卡羅來納大學 37 (North Carolina State University 37, NCSU-37) 培養液為基礎，額外添加 1 mM dibutyryl cAMP (dbcAMP)，10 IU/ml eCG (Serotropin; ASKA Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) 及 10 IU/ml hCG (500 units; Puberogen, Novartis Animal Health, Tokyo, Japan)。卵母細胞培養使用 4 well 培養皿 (Nunclon Multidishes, Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)。每個 well 培養液為 500 μ L，內置 50 個 COCs。並置於 5% CO₂、5% O₂ 及 90% N₂ 之氣相條件培養箱，以攝氏 39 度培養。第二階段培養時間為 24 小時，培養液以 NCSU-37 為基礎，不添加賀爾蒙及 dbcAMP。

3. 卵母細胞體外成熟檢測

IVM 結束後，將 COCs 移入 1 mL (含 0.1% (w/v) hyaluronidase) 第二階段 IVM 培養液中 30 秒，輕微吸放以去除卵丘細胞。續以 H33342 或 orcein 進行染色觀察。觀察到第一極體者，則判斷為成熟之卵母細胞。

4. 體外授精

體外授精之精子係以採集自梅山豬副睪之精子，經解凍後做為來源。體外授精培養液成分為 90 mM NaCl、12 mM KCl、25 mM NaHCO₃、0.5 mM NaH₂PO₄、0.5 mM MgSO₄、10 mM sodium lactate、10 mM HEPES、8 mM CaCl₂、2 mM sodium pyruvate、2 mM caffeine 及 5 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Fraction V)。卵母細胞先以 IVF 培養液清洗 3 次後，移入含有 100 μ L IVF 小滴之 3.5 公分培養皿 (需覆蓋礦物油)。每個小滴包含 15-20 個卵母細胞 (5)。來自梅山豬 (Maishan M 26-2) 副睪之冷凍精液，以攝氏 38 度水浴槽進行解凍。解凍後之精液，置入 7

mL 預熱過之 M199 (with Earle's salts, Gibco, pH 7.8) 培養液中。續以 750 x g 進行 2 min 離心。移除上層液，沉澱物以 70 μ L 相同培養液重新懸浮，蓋油後培養 15min。之後將精子移入含有卵母細胞之 IVF 培養小滴 (授精精子之最終濃度為 1×10^5 spermatozoa/ml)。以 5% CO₂、5% O₂ 及 90% N₂ 之氣相條件下，於攝氏 39 度環境培養 5 小時。



圖 6 正在進行授精的卵母細胞。

5.原核觀察

IVF 10 小時後，取出部分卵母細胞，放入 PBS (含 0.32N Polyvinylpyrrolidone) 溶液中清洗數次。取一載玻片，先以凡士林畫上兩個橫條，將卵母細胞滴入兩橫條間，蓋上蓋玻片後輕緩下壓。整個玻片放入 acetic acid : glycerol : water 比列為 1 : 1 : 3 之固定液中，進行 3-4 天固定。固定完成後以 1% orcein 染色，觀察原核情形，正常授精之卵母細胞應有雄及雌 2 個原核，及 2 個極體；若有多個原核，則判定為多精入卵；僅有一個原核則未授精 (圖 7)。

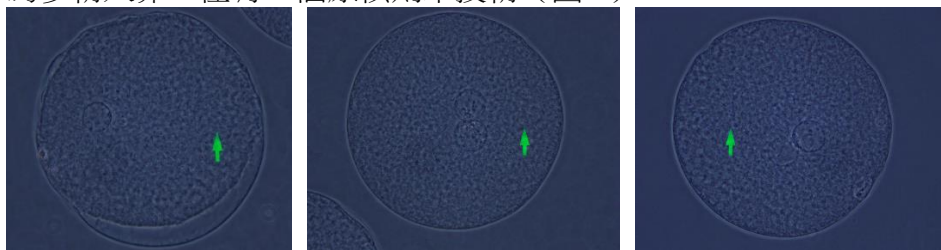


圖 7 原核觀察，左圖僅具單一原核為未受精之卵母細胞；中圖為正常受精之卵母細胞；右圖則為多精入卵之卵母細胞。

6.體外培養

IVC 培養亦分成 2 個階段進行。IVF 當天為第 0 天。0-2 天為第一階段 IVC 培養 (IVC-PyrLac)，3-6 天則為第二階段之培養 (IVC-Glu)。IVF

3 小時後，胚以 IVC-PyrLac 培養液洗滌數次後移入 IVC-PyrLac 培養液中進行培養。胚之培養使用 4 well 培養皿，每 well 含有 500 μ L 培養液，內置 50-100 個胚，並以 5% CO₂，5% O₂ 及 90% N₂ 之氣相條件，於攝氏 38.5 度的環境培養。IVC 培養液之基礎液為 NCSU-37 添加 0.4% (w/v) BSA 及 50 μ M β -mercaptoethanol。IVC 之 2 種操作培養液；IVC-PyrLac 為 IVC 基礎液添加 0.17 mM sodium pyruvate 及 2.73 mM sodium lactate；IVC-Glu 則為 IVC 基礎液添加 5.55 mM glucose。

7. 囊胚觀察

收集 IVC 第 6 天之囊胚觀察是否有成功發育，若要進行胚移置此時即可進行（圖 8）。

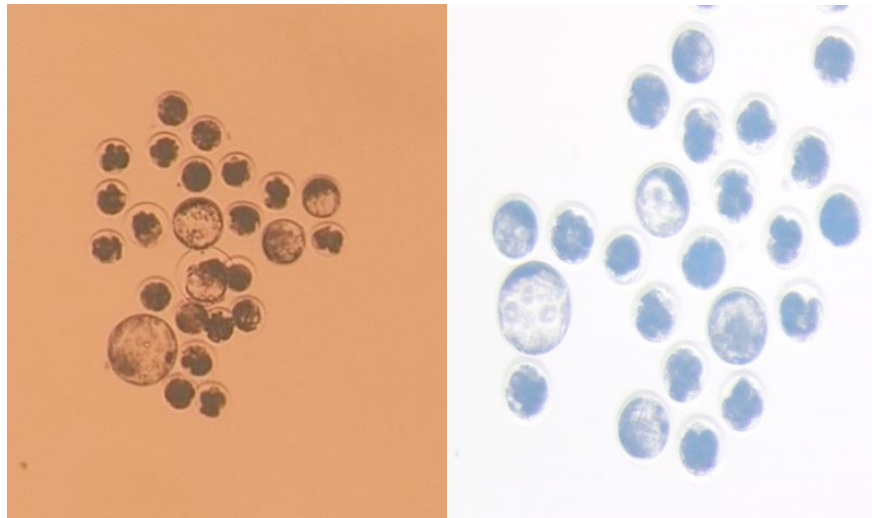


圖 8 發育之囊胚。

二、公豬副睪採精

自活體取下之完整睪丸，以攝氏 37 度保存，運回實驗室。將副睪自睪丸本體完整取下，找出輸精管開口，一端開口接針筒，另一端則接燒杯，收集副睪精子。注入空氣針頭為 18G 平針，需仔細磨平以免傷害輸精管，另針頭插入輸精管後需用綁繩固定，避免後續注入空氣及精液保存液時脫落。收集到之副睪精子，計算濃度後，以 800 x g，在攝氏 15 度下離心 10 min。移除上層液後，續以第一階段稀釋液重新懸浮之，接著移入預冷之攝氏 15 度冷房中，平衡 2-3 小時。之後改變冷房溫度至攝氏 5 度，添加等量之第二階段稀釋液（除含有 6% 甘油外，餘皆同第一階段稀釋液）。添加完畢後，立即裝填入 0.25 mL 法式麥管中，封口後，放置於液態氮液面上 4 公分處 10 min，進行一階段冷凍。冷凍後之麥管先投入液態氮中，再於液態氮液面下操作，裝入麥管杯，最後放置於液態氮桶中儲存。日本因動物疾病控管嚴格，本次研習未能取得新鮮公豬副睪，Kikuchi 博士輔以投影片及發表之國際期刊口頭教學說明（圖 9），後至實驗室以相關器材組和模擬示範（圖 10）。



圖 9 以書面說明教學副睪採精條件。圖 10 以替代器材示範副睪採精。

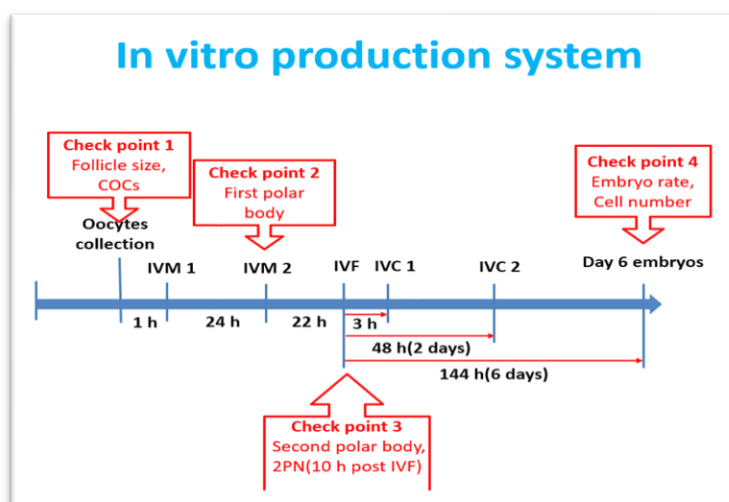


圖 11 體外生產系統（IVP）操作流程圖。

本次研習期間，豬胚體外生產系統試驗共進行 4 次重複試驗（其中第 3.4 次僅進行至體外成熟），共計使用 286 顆卵母細胞。結果顯示，卵母細胞授精後正常受精（monospermy）者有 $50.3 \pm 2.1\%$ 、多精入卵率為 11.7 ± 4.5 、第六天囊胚率為 10.8 ± 1.7 （以所有進行授精之卵母細胞數量計算）。

心得與建議

一、心得

本次的短期研究，首先要感謝農業部國際農業科技政策及人才培育計畫支持，並提供經費。此外感謝了 Kikuchi Kazuhiro 博士的行前聯繫與實驗安排。在日期間，謝謝 Kikuchi Kazuhiro 博士安排的研究行程與教導，及 Sembon Shoichiro 博士親自教導與照顧。

此次赴日本進行為期 14 天的研究，藉由專家示範、經驗即時傳授以及親自實際操作，得到的記憶非常深刻，亦可很清楚比較出與我們現行方法的細微差異如於體外授精時的精液濃度與授精時間。於研習中有疑問時能立即提問並討論，許多操作上意想不到的小細節如於副睪採精時輸精管的撥離手法可能就是影響的關鍵點。另日方在提供相關書面資料時，其研究團隊隨年份新撰不同版本之操作手冊，內含豬胚體外培養系統操作所需器材、藥品及各階段步驟之標準操作流程，每一步驟需培養液藥品之藥品編號、廠牌、添加之比例皆有詳細紀錄，為研究團隊內公開之流通資訊，方便相關人員參考利用。

另關於研究發展，以 Kikuchi Kazuhiro 博士帶領的實驗團隊為例，以豬胚為主題，團隊中成員各自圍繞其主題長年發展細部研究例如冷凍精液製作、授精條件、冷凍條件及未分化卵母細胞凍存等，成就了經驗豐富的豬隻生殖團隊，亦為值得借鏡參考。Kikuchi 博士提醒實驗室中微環境的重要性，在日本時因其實驗室已建立穩定的操作條件，故其團隊的豬胚體外生產率至少都可維持在 40-50% 以上，然返國後，需先測試出適合自身實驗室的操作條件，從卵巢取得至回到實驗室開始進行卵母細胞抽取等，選擇何種培養系統亦須經過測試，選取最符合自身研究環境的培養系統條件，才能確實建立屬於自身實驗室體外生產系統並進一步提升其效能。

返臺後首要之急便是將日本所學，先嘗試複製並建立適用於本土黑豬體外培養系統的標準作業程序，待系統穩定後再依運行結果改進，使其效能可以更加提升。

二、建議

1. 豬胚體外生產系統一批次完整之操作流程需 9 天，建議相關研習人員可申請研習天數至少 21 天，可完整操作 3-4 批次，對於技術研習較為確實完整。



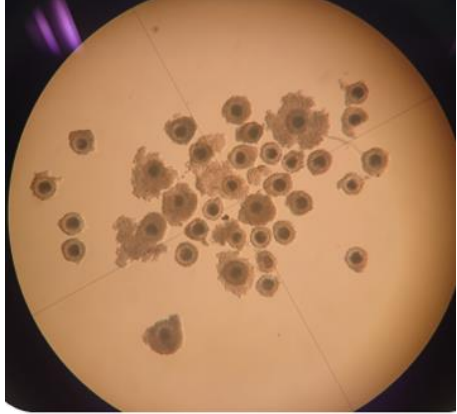

2. 因應日本豬瘟防疫政策，若需要研習如副睪採精等技術所需器官組織，至少需半年的申請準備期，日後若有相關人員欲進行相關研習，建議盡早告知研習單位以便相關程序準備。

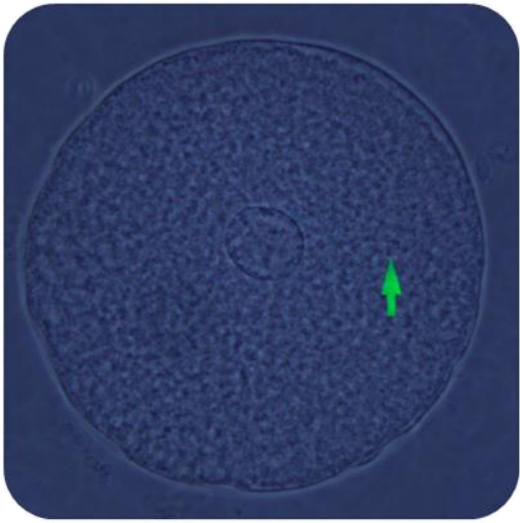
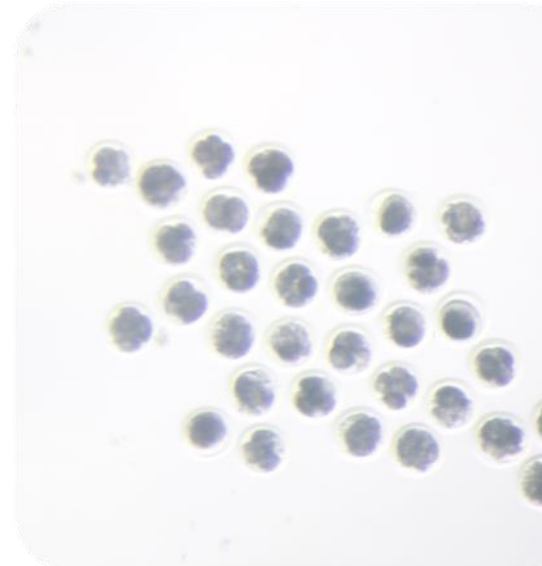
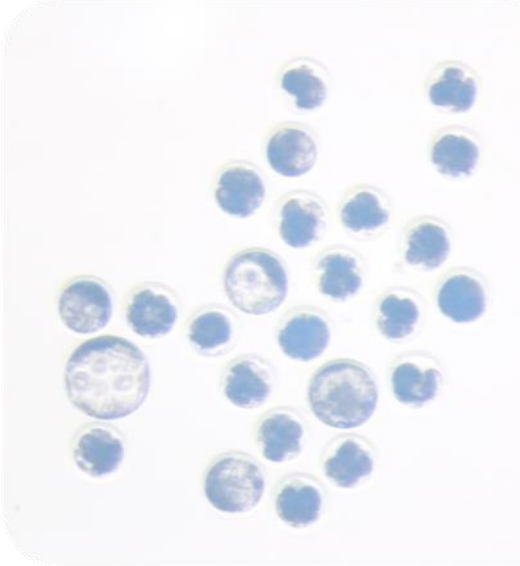

参考文献

- Santos, E. C. da S., T Somfai, R. Appeltant, T. Q. Dang-Nguyen, J. Noguchi, H. Kaneko and K. Jijuchi. 2016. Effects of polyethylene glycol and a synthetic ice blocker during vitrification of immature porcine oocytes on survival and subsequent embryos development. *Anim. Sci. J.* 88(8):1042-1048.
- 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(5):1-9.
- Somfai, T., N Thi Men, J. Noguchi, H. Kaneko, N. Kashiwazaki and K. Kikuchi. 2015. Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens. *J. 5-14 Reprod. Dev.* 61(6):571-579.
- Somfai, T., N. Kashiwazaki, M. Ozawa, M. Nakai, N. Maedomari, J. Noguchi, H. Kaneko, T. Nagai and K. Kikuchi. 2008. Effects of centrifugation treatment before vitrification on the viability of porcine mature oocytes and zygotes produced in vitro. *J. Reprod. Dev.* 54(3):149-155.
- Yoshioka, K., C. Suzuki and A. Onishi. 2008. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *J. Reprod. Dev.* 54(3):208-213.

照片紀實

豬胚體外生產系統

	
<p>1. 取回卵巢，紀錄取得數量與保溫杯內溫度，僅挑選合適濾泡大小的卵巢使用。</p>	<p>2. 以針頭或刀片劃開卵巢收集卵母細胞，僅使用 3-6mm 大小的濾泡。</p>
	
<p>3. 挑選卵丘細胞完整包覆的卵母細胞進行體外成熟。</p>	<p>4. 進行體外授精，授精時間為 5 小時，授精完成後洗去多餘精子並繼續培養</p>

	
<p>5. 原核確認，授精完後挑選同一批次之 5-10% 卵母細胞，進行染色固定 5-6 天後觀察授精結果，並計算多精入卵的百分比。</p>	<p>6. 體外授精 (IVF) 後 24 小時更換配養液，進行囊胚培養。</p>
	
<p>7. 發育成桑葚胚後可進行冷凍或胚移植，此階段亦可進行螢光染色確認囊胚細胞數。</p>	<p>8. 圖左為使用之卵巢，紀錄數量。圖右則一開始即因濾泡大小不優良而廢棄的卵巢。</p>