

出國報告 (出國類別：研究)

生醫用豬生殖細胞生產系統及冷凍 技術研習

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所

姓名職稱：康定傑助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：106年5月14日至106年6月12日

報告日期：106年8月8日

目 錄

	頁次
壹、摘要 -----	1
貳、目的 -----	5
參、過程 -----	7
肆、心得與建議-----	22

壹、摘要

康定傑助理研究員於民國 106 年 5 月 14 日至 6 月 12 日(共計 30 日)，前往日本茨城縣筑波市的國立研究開發法人農業、食品產業技術總合研究所，生物機能利用研究部，動物機能研究領域之動物生殖機能單位。跟隨 Kikuchi Kazuhiro 博士(首席研究員)及 Tamas Somfai 博士(研究員)，進行豬隻體外生產系統(in vitro production system)、未成熟卵母細胞冷凍(immature oocyte vitrification)及公豬附睪採精技術(epididymis sperm collection)研究。透過 Kikuchi Kazuhiro 博士的安排與規劃，先由實驗室的 Dang Nguyen Quang Thanh 博士、Nguyen Thi Men 博士及 Nguyen Thi Hiep 女士進行操作示範。我們先觀察並記錄方法，緊接著在其監督下，進行實地操作。

豬體外生產系統試驗，總共進行 3 次重複，共使用 346 顆卵母細胞進行體外培養。卵母細胞經過 2 階段，合計 46 小時的體外成熟(in vitro maturation, IVM)培養後，旋即進行體外授精(in vitro fertilization, IVF)。體外授精的精子來源為梅山豬之冷凍解凍(Meishan, M26-2, 5125E)附睪精液。授精精子濃度為 1×10^5 spermatozoa/mL。IVF 後 3 小時，將胚移入第一階段體外培養(in vitro culture, IVC)液中培養，並於 IVF 後 10 小時，使用 1% orcein

染色觀察原核(pronuclear)形成及多精入卵(polyspermy)的情況。試驗結果顯示正常受精率(monospermy)為 $51.3\pm 3.1\%$ ，多精入卵率為 $12.7\pm 3.5\%$ 。IVF 後第 2 天移入第二階段 IVC 培養液中繼續培養，在 IVF 後的第 6 天進行囊胚形成觀察及 Hoechst 33342 染色，計算囊胚細胞數。結果顯示第 6 天囊胚率為 $11.8\pm 1.7\%$ (% cultured)，囊胚細胞數平均為 47.7 ± 2.5 個。

豬隻卵母細胞冷凍技術是由 Tamas Somfai 博士親自指導。豬未成熟卵母細胞經由冷凍解凍後，續進行體外成熟、體外授精及體外培養，最後移植且成功生下小豬的之全世界首例文獻報告，便是出自 Tamas Somfai 博士之手。卵母細胞收集完畢後，直接進行玻璃化冷凍。Tamas Somfai 博士示範了 microdrop 及 cryotop 兩種方式的玻璃化冷凍技術；其中，microdrop 是無載體的玻璃化冷凍方式，而 cryotop 則需要一個特殊載體進行。兩者所使用之冷凍保護劑成分並無差異。本次共使用 330 顆未成熟卵母細胞進行玻璃化冷凍試驗。經玻璃化冷凍後之未成熟卵母細胞，於冷凍 2 天後解凍，並進行後續 IVM 培養。經過 IVM 培養 46 小時後，利用玻尿酸酶將卵丘細胞移除，續進行 fluorescein diacetate (FDA) 染色。FDA 可利用 UV 及 GFP-II 濾鏡(MZ15FA; Leica Micro-system, Heerbrugg, Switzerland)觀察卵母細胞死活，

活細胞在細胞質處，會顯現明亮的綠色螢光，死亡者則無色。
結果顯示，卵母細胞冷凍解凍後之平均存活率為 $87.3\pm 7.5\%$ v.s $87.65\pm 6.2\%$ (microdrop v.s cryotop)。

在日本，要取得成年公豬睪丸機會並不多，本次在 Kikuchi Kazuhiro 博士努力下，取得一對豬睪丸，我們才得以成功學到附睪採精的技術。過程中，操作環境的溫度盡可能須維持在攝氏 37 度。操作時先以手術刀及剪刀將附睪與睪丸分離，將輸精管與附睪間的繫膜剪開，以利精子之收集。再將準備好之 50 mL 離心管接住輸精管端口，另一端接上 18G 平針針頭，以束帶將之束緊，以 50 mL 針筒灌入空氣將精液往輸精管端沖出。隨即將精子移入攝氏 15 度的冷房中平衡 2-3 小時。並調整每劑精子濃度為 250×10^6 spermatozoa 之後，以攝氏 15 度，3000 RPM，10 min 離心。移除上層液後，小心加入第一階段稀釋液(NSF-I)。於攝氏 5 度平衡 2-3 h 後，添加等體積之第二階段稀釋液(含 6% glycerol)，隨即裝填入 0.25 mL straw 中(最終 glycerol 濃度為 3%)，封粉後以一階段冷凍法(液態氮液面上 4 cm，10 min)予以冷凍。總計生產 326 支 0.25 mL 麥管之冷凍精液。

本次赴日本進行為期 30 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。有疑問時及時提問，很多時候真的有豁然開朗的感覺。在此，非常感謝 Kikuchi Kazuhiro 博士、Tamas Somfair 博士及實驗室 Dr. Dang Nguyen Quang Thanh 博士、Nguyen Thi Men 博士及 Nguyen Thi Hiep 女士等人鼎力協助，讓這次赴日的短暫研究能夠有豐碩的成果。返台後首要之急便是將日本所學，先成功複製並建立系統，待系統穩定後再行改進，使其效能可以更加提升。

貳、目的

人工輔助生殖技術(artificial assisted reproduction technology, ART)被應用在畜產經濟動物，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，在科學界受到極大的關注。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；其器官也是作為器官異種移植研究的首選。然而生產體外胚，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)。然而眾所周知，豬隻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，然而豬隻卵母細胞冷凍與牛、羊等其他物種相較，困難許多。已經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。因為儘管其解凍後存活率高，但是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。另外，在冷凍解凍過程中，活性氧(reactive oxygen species)以及溫度變化刺激導致的孤雌激活(parthenogenetic activation)，都會降低卵母細胞授精及後續發育之能力。

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。其中 Tamas Somfair 博士改變冷凍策略及解凍溫度，將細胞週期仍在生原泡時期(germinal vesicle stage, GV stage)的卵母細胞進行玻璃化冷凍，成功避開了紡錘體異常以及 MII 期冷凍容易導致孤雌激活現象的困擾。接著，改以利用攝氏 42 度的溫度進行冷凍卵母細胞解凍，經過後續 IVM、IVF 及 IVC 培養後，其體外生產之豬胚存活率接近 50%。接續進行胚移置(embryos transfer)後更成功產下子代，成為世界首例，相關研究成果已經於 2014 年發表於國際期刊(PLOS one)。

因此，本出國研究計畫最主要目的便是學習豬胚體外成熟系統以及豬卵母細胞冷凍技術；並藉此加強臺日間相關技術之合作交流，期能建立長期合作關係，提升臺灣於相關領域發展之能量。

參、過程

一、研習行程

本次研習行程在前亞太糧肥中心 (FFTC) 副主任 Takashi Nagai 博士協助下取得與 Kikuchi Kazuhiro 博士的聯絡，並成功促成本次短期研究。本次研習行程如表 1。

表 1. 赴日研究行程

Date 日期	City 城市	Location 參訪單位	Study Course 研習內容
5/14	去程：臺灣（小港國際機場）→ 日本（東京成田機場）		
5/15-5/29	Tsukuba 筑波市	National Institute of Agrobiological Sciences 國立農業生物資源 研究所	1. 豬胚體外生產系統 2. 公豬附睪採精
5/29-6/11	Tsukuba 筑波市	National Institute of Agrobiological Sciences 國立農業生物資源 研究所	豬未成熟卵母細胞冷凍 技術
6/12	回程：日本（東京成田機場）→ 臺灣（小港國際機場）		

二、研究重點

(一) 公豬附睪採精及精液冷凍

自活體取下之完整睪丸，以攝氏 37 度保存，運回實驗室(圖一)。將附睪自睪丸本體取下(圖二)，找出輸精管開口，一端開口接針筒，另一端則接燒杯，收集附睪精子。連接完畢，以針筒打入空氣，將附睪內精子推出收集(圖三)。

收集到之附睪精子，計算濃度後，以 $800 \times g$ 在攝氏 15 度下離心 10 分鐘。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 分鐘，進行一階段冷凍(圖四)。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。



圖一 取回之新鮮公豬睪丸。



圖二 將附睪自睪丸本體分離。



圖三 灌入空氣之附睪。



圖四 液態氮液面上 4 公分之一階段冷凍。

(二) 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(圖五)。卵巢抵達實驗室時，以 PBS 清洗數次後(圖六)，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，以手術刀片劃破直徑 3-6 mm 之濾泡後(圖七)，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 10 分鐘，待卵母細胞沉降到底部以利收集(圖八)。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 M199 培養液的 3.5 公分培養皿中(圖九)，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) (圖十)。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。



圖五 自屠宰場送來之卵巢運

輸容器。

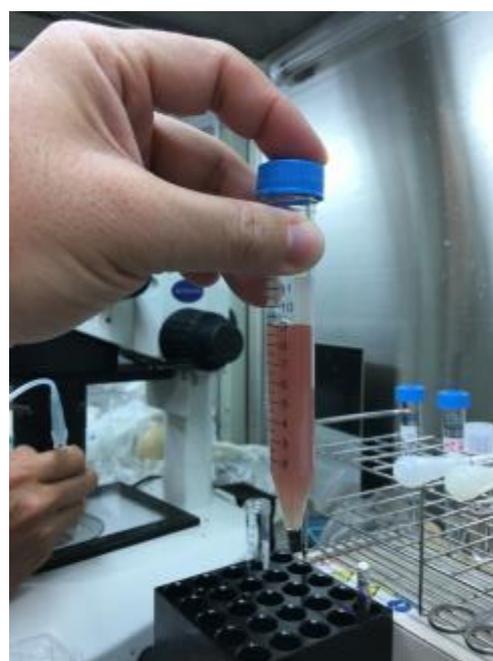


圖六 卵巢清洗。



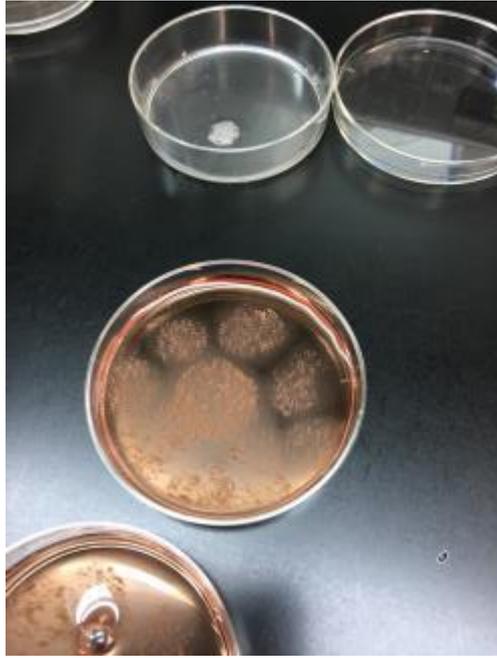
圖七 以手術刀片劃破濾泡收

集卵母細胞。



圖八 等待沉降之卵母細胞及濾

泡液混合液。



圖九 沉降後含有卵母細胞之
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 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附睪之精子，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 μL 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(圖十一)。來自梅山豬(Maishan M 26-2)附睪之冷凍精液(圖十二)，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 分鐘離心。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 15 分鐘。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 3 小時。



圖十一 體外授精小滴。



圖十二 體外授精之公豬附辜
冷凍精液。

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。

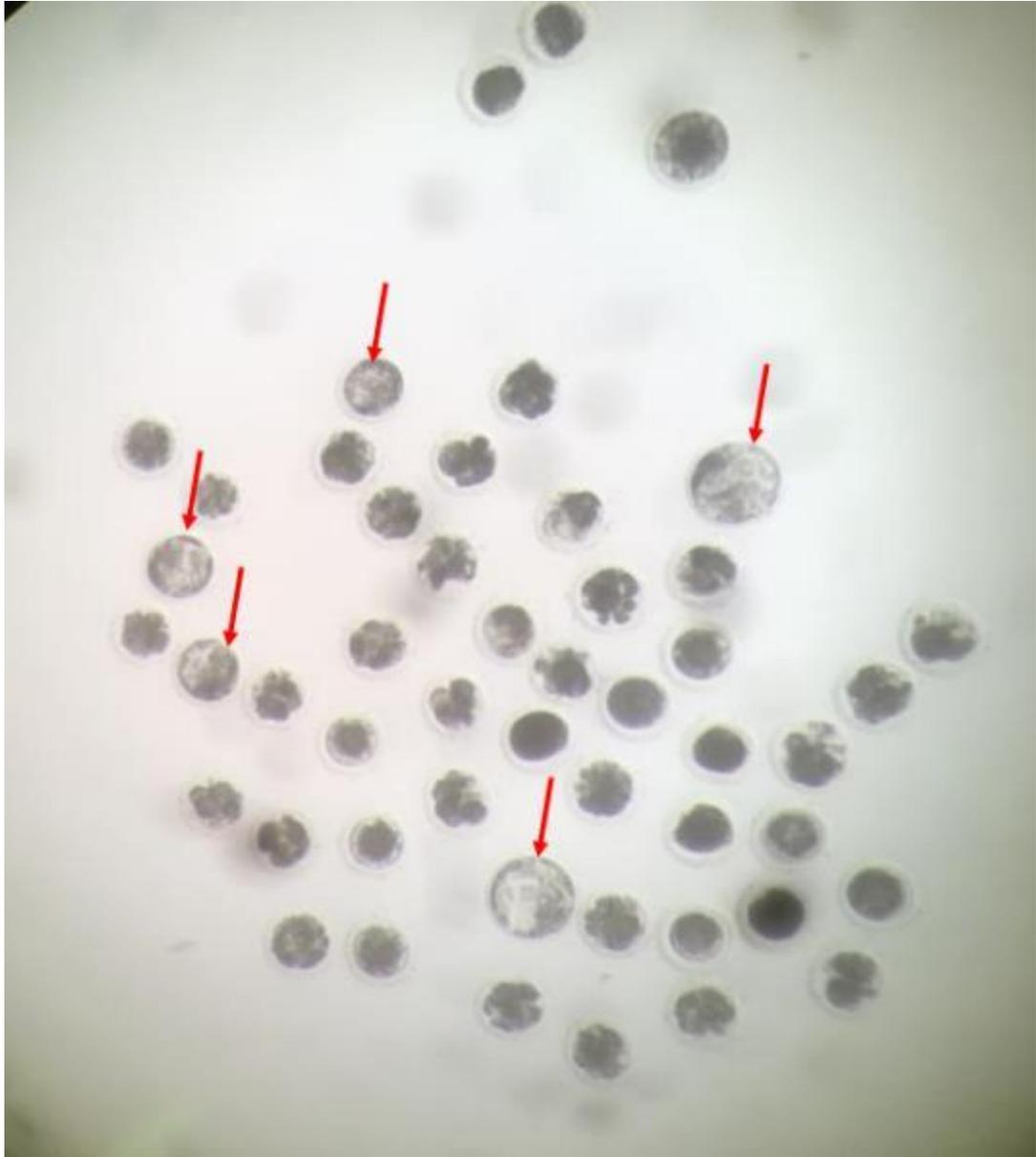
6. 體外培養

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 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。

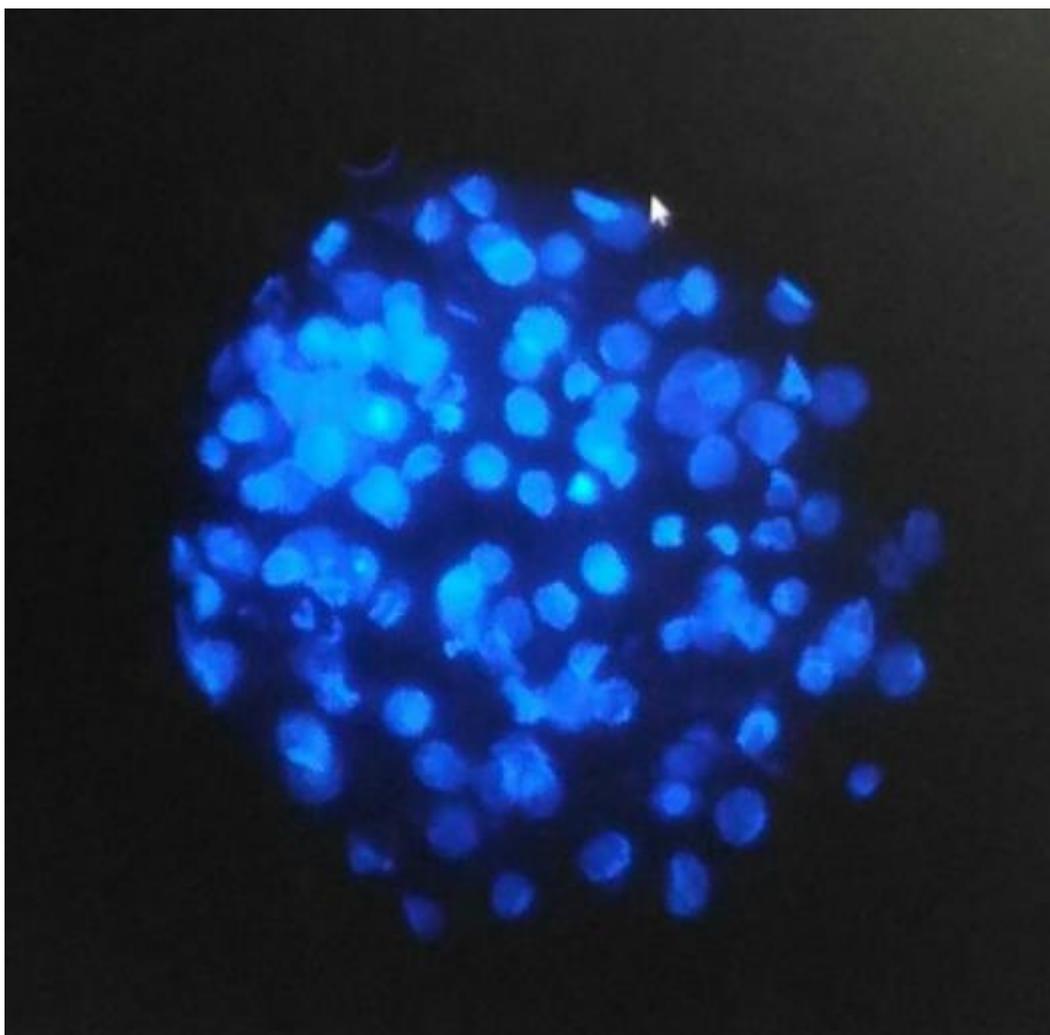
7. 囊胚觀察及囊胚細胞數計算

收集 IVC 第 6 天之囊胚(圖十三)，利用 H33342 染色以進行囊胚細胞數之計算。將囊胚放入 25 μ L/mL 之 H33342(H33342 溶於 99.5% 酒精)洗滌數次後，放入乾淨之 H33342 溶液中，隔夜培

養。將胚取出，滴於載玻片上之甘油小滴中，蓋上蓋玻片，以 330-385 nm 之紫外光進行觀察及細胞數計算(圖十四)。



圖十三 IVC 第六天之囊胚(紅色箭頭)。



圖十四 以 H33342 染色之第 6 天囊胚細胞數。

(三) 豬未成熟卵母細胞冷凍及解凍後死活評估

收集到之 COCs，先以基礎液處理 30 分鐘；再移到含有低濃度之冷凍保護劑(ethylene glycol 及 propylene glycol)之平衡液中，平衡培養 13-15 分鐘，最後移入含高濃度冷凍保護劑(ethylene glycol 及 propylene glycol)之冷凍保護液中，在 30 秒內以 micro drop(圖十五)或 cryotop(圖十六)方法，直接放入液態氮中，進行玻璃化冷凍。以 microdrop 法，進行冷凍時，一次處理 20-30 顆

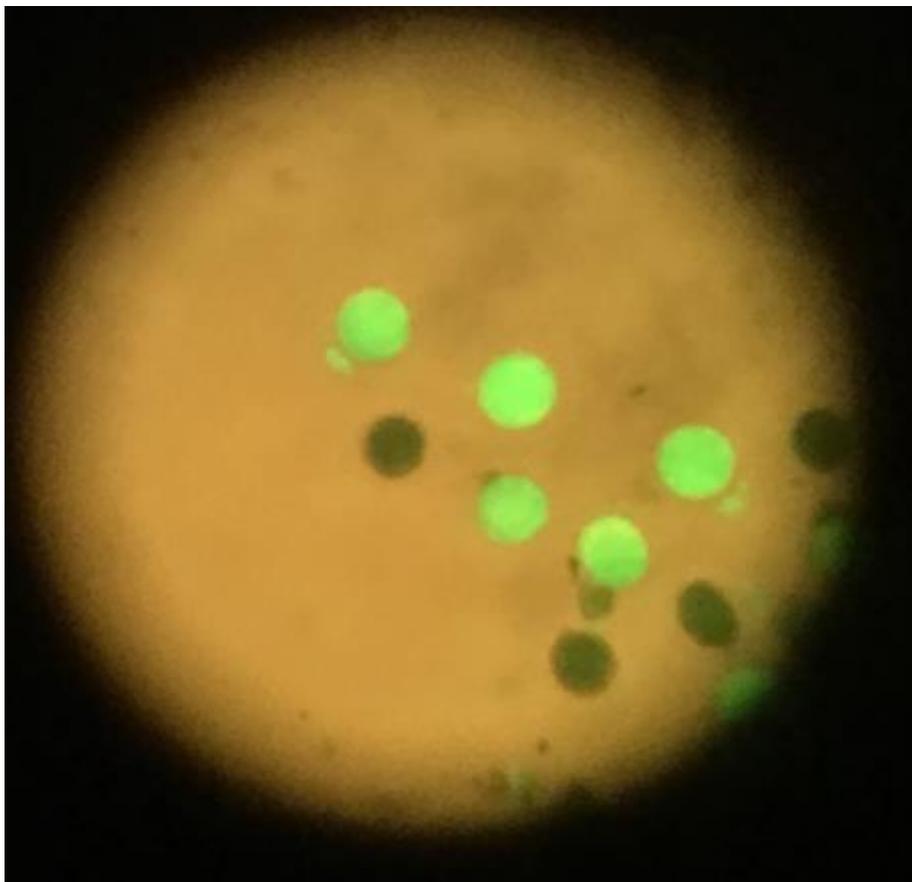
COCs，若採用 cryotop 法，則一個載具放 10 顆 COCs。冷凍解凍後之 COCs，依照正常 IVM 步驟，於 46 小時後，以 fluorescein diacetate (FDA)進行染色，並以紫外光之波長(330-385 nm)進行觀察。FDA 在紫外光激發下會顯現出綠色之螢光，若觀察到之卵母細胞為綠色，則判定為活細胞，死細胞無法被染色。(圖十七)



圖十五 micro drop 方法製作之玻璃化冷凍小滴。



圖十六 Cryotop 載具。



圖十七 FDA 染色。呈現綠色者為活細胞；暗色為走向凋亡之細胞。

(四)研究結果

豬體外生產系統試驗共進行 3 次重複試驗，共計使用 346 顆卵母細胞。結果顯示，卵母細胞授精後正常受精(monospermy)者有 51.3±3.1%、多精入卵率為 12.7±3.5、第六天囊胚率為 11.8±1.7(以所有進行授精之卵母細胞數量計算)及 26.6±3.3(以有卵裂之胚進行計算)，而第 6 天囊胚之細胞數平均為 47.7±2.5(表二)。

豬未成熟卵母細胞玻璃化冷凍則利用 microdrop 及 cryotop 方法進行，分別冷凍了 278 及 136 顆未成熟之卵母細胞。於冷凍 2 天後解凍，並進行後續 IVM 培養。IVM 培養 46 小時後，利用玻尿酸酶將卵丘細胞移除，續進行 fluorescein diacetate (FDA) 染色。結果顯示，利用 microdrop 及 cryotop 方法冷凍並解凍之卵母細胞，其平均存活率分別為 87.3±7.5% v.s 87.65±6.2%(表三)。

表二 豬體外生產系統試驗結果

Total culture	Monospermy (% culture)	Polyspermy (% culture)	Blastocyst (day 6)		Total cells in blastocysts
			(% cultured)	(% cleaved)	
346	154 (51.3±3.1)	38 (12.7±3.5)	41 (11.8±1.7)	41 (26.6±3.3)	47.7±2.5

Three replications were performed.

表三使用不同玻璃化冷凍方法冷凍之豬未成熟卵母細胞經解凍及

IVM 培養後之存活率

	Total vitrification	live(%)	dead(%)
Microdrop	278	244(87.3±7.5)	34(12.7±7.5)
Cryotop	136	122(87.7±6.2)	14(12.4±6.2)

肆、心得與建議

一、本次的短期研究，首先要感謝行政院農業委員會國際農業科技政策及人才培育計畫支持，並提供經費。此外，也感謝前亞太糧肥中心副主任 Takashi Nagai 博士，透過他的幫助，聯繫了 Kikuchi Kazuhiro 博士的研究團隊。在日本期間，謝謝 Kikuchi Kazuhiro 博士安排的研究行程，還有 Tamas Somfai 博士、Dang Nguyen Quang Thanh 博士、Nguyen Thi Men 博士、Nguyen Thi Hiep 女士及 Shinya Ishihhara 先生的教導。

二、位於茨城縣筑波市的國立研究開發法人農業、食品產業技術總合研究所是一個法人機構，其最大的經費來源為日本農林水產省，其中亦有私人公司的資金挹注。日本生醫用產業發展比台灣早，其生醫發展主要是針對其老年化社會所需的醫藥及設備方面進行開發，例如，藥品及組織材料方面，然而其早先所面臨的問題為政府投入之經費不足、產業規模太小等問題。本次前往日本僅就生醫用動物模式開發的議題跟研究室同仁進行討論，並非主要研究之範疇，因而無任何實地參訪之安排。但收集之資料顯示，在生醫模式動物建立方面，主要的發展項目是骨質鬆症、人造關節、心臟瓣膜、糖尿病等模式動物開發，與台灣發展的模式相當。而目前針對生醫產業資金不足問題部分，

日本政府於 2009 年，成立日本官民機構產業革新機構(INCJ)，其資本額是 1,120 億日圓，其中政府出資佔了 1,020 億，其他 100 億為民間資金。該機構針對生醫產業部分亦有大量資助，此一政府結合民間共同出資的模式可為台灣借鏡。

三、此次前往研習之研究單位，國立研究開發法人農業、食品產業技術總合研究所，生物機能利用研究部，動物機能研究領域之動物生殖機能單位，該單位由 Kikuchi Kazuhiro 博士領導。該實驗室主要成員有 5 人。主要以豬為研究之動物。研究期間，觀察到每個人看起來似乎都在做同一件事，但實際深入了解後得知，各自都有研究主題進行著。實驗室成員都非常謙虛，相處間也非常融洽，他們有問必答的態度更讓我感激。研究期間發現，在日本，各個階段的分工其實很詳細也很專業。例如，日本屠宰場的管制非常嚴格，一般人絕對無法擅自進入到屠宰線中。所以，卵巢的摘取會有專人處理及運送，送到實驗室的卵巢都已經過相當的處理，非常乾淨。此外實驗室所生產的囊胚，需要移置時，會有另一個專業的獸醫團隊進行，實驗室的人就負責依照自己的實驗設計，大量生產經各式處理的胚。如此的分工，使得大家可以在自己的領域內更加專精，工作也相對單純，想當然爾，他們研究報告產出也就非常多。這一點相

較與我們目前的情況，從到屠宰場拿卵巢，實驗室胚的生產及試驗處理，甚至到最後移置都需要自己來的差別實在是非常的大。

四、本次赴日本進行為期 30 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。有疑問時及時提問，很多時候真的有豁然開朗的感覺。返台後首要之急便是將日本所學，先成功複製並建立系統，待系統穩定後再行改進，使其效能可以更加提升。