国際科学技術共同研究推進事業 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム(SATREPS) 研究領域「生物資源の持続可能な生産・利用に資する研究」

多様性維持が可能な持続的生産システムの構築」

採択年度:平成26年度/研究期間:5年/相手国名:ベトナム

研究課題名「ベトナム在来ブタ資源の遺伝子バンクの設立と

終了報告書

平成27年5月5日から令和2年5月4日まで丁以26年5月1日から令和2年3月31日まで(正式契約移行日 平成27年4月1日)

*1 R/D に基づいた協力期間 (JICA ナレッジサイト等参照) *2 開始日=暫定契約開始日、終了日=JST との正式契約に定めた該年度末

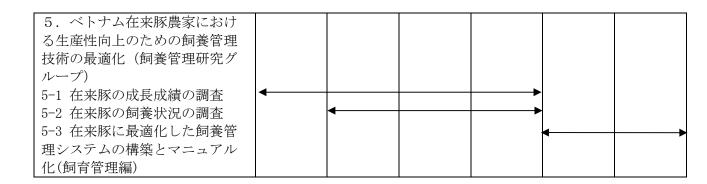
研究代表者: 菊地 和弘 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門・ユニット長

I. 国際共同研究の内容 (公開)

1. 当初の研究計画に対する進捗状況

(1)研究の主なスケジュール(実績)

研究題目・活動	H26年度 (11ヶ月)	H27年度	H28年度	H29年度	H30年度	H31/R1年度 (12ヶ月)
1. ベトナム在来豚の調査と凍結バンク設立、PERV検出系の確立ならびにPERV低コピー豚生産(バンク/育種研究グループ)						
1-1 ベトナム在来豚遺伝資源の 収集(サンプリング) 1-2 ベトナム在来豚の系統解析		-				
1-3 ベトナム在来豚のデータベ ースの構築 1-4 凍結バンク効率化のための		PCR 12.	こる検出			—
精液凍結法の改良 1-5 PERV 遺伝子座位の同定	•		-	NGS による	座位の同定	
1-6 PERV 低コピー豚の DNA 情報 を用いた生産 2. ベトナム在来豚の体外胚生			•	4		
産と卵ならびに胚の超低温保存 技術の高度化(体外胚生産/保存 研究グループ)						
2-1 ベトナム在来豚の体外胚生 産法の確立 2-2 ベトナム在来豚の卵ならび		•	•			
に胚の超低温保存技術の確立 3.ベトナム在来豚由来体細胞						
クローン胚作製技術の開発と効率的胚移植方法の確立(クローン研究グループ)		•				
3-1 体細胞同期化法の検討 3-2 クローン胚培養法の検討 3-3 胚移植法の検討			•	4		•
4. ベトナム在来豚農家における疾病調査(疾病対策研究グループ)						
4-1 農家における疾病調査 4-2 出荷豚の疾病調査 4-3 農家における病原体調査	4	•				
4-4 在来豚に最適化した飼養管理システムの構築とマニュアル化(衛生管理編)						
4-5 PERV低コピー豚輸出のため の衛生管理体制の構築					•	-



(2) 中間評価での指摘事項への対応

評価会後の質問事項とその回答

①研究題目1「ベトナム在来豚の調査と凍結バンク設立、PERV 検出系の確立ならびに PERV フリー豚生産」において、中間報告書(JST に提出)では、「1-6: PERV フリー(低コピー)豚の DNA 情報を用いた生産」と記載されている。PERV フリー(低コピー)は同義とは考えられないが、プロジェクト当初よりこの様な記載としている理由はなにか。5コピーを指標にしている理由も含めてご回答ください。

(回答) プロジェクトの提案ならびに開始当初は PERV「フリー」豚を生産することとし、その旨実行をしてきていますが、コピー数を測定している中で、完全フリーを発掘する事が難しいことが判ってきました。また、西洋種に比べてコピー数が半分~1/3 程度であることも明らかとなっています。実際に、現在タイグエン育種施設で保有している豚の PERV コピー数がおおむね 10 コピーと推定されています。PERV コピー数は基本的にメンデル遺伝すると考えられていますが、交配により親世代よりもコピー数が増加あるいは低下する可能性も考えられます。 JICA の中間評価の過程で PDM の修正を行うことにしましたが、その数値目標としては、各 PERV 座位を PCR 等の簡易な方法により同定することで、現行の 10 コピーに対して半分の5コピーまで低減することとしました。したがいまして、JST の研究題目においても、可能であれば「低コピー豚生産」あるいはこれに類する修正のご検討を御願いしたいと存じます。

②PERV フリーと PERV 低コピーを比較した場合、完全フリーと低コピーで育種上の違いは何か。それぞれのメリットを説明していただきたい。

(回答) 育種選抜により PERV 低コピー個体群から PERV フリー個体を作出することが最終目標ですが、PERV フリー個体が得られれば、PERV フリー個体同士を交配することで、安定して PERV フリー個体の増殖および集団を形成できるようになると期待されます。

③将来期待される臓器移植の器官提供では、完全フリーが絶対条件であると予想されるが、 プロジェクト期間内での到達が仮に「低コピー」に留まる場合、その先に必要な研究は何で、 どのように展開していくつもりか。時間見込みを含めて説明をお願いしたい。

(回答) 評価会議でもご説明させていただいた通り、あと2年弱で交配できる回数は多くて3回程度と想定されます。交配実験は始めたばかりでどのような効率でそれを除去できるかは全く想定できません。これらの交配とその除去の関連を明らかにすることで、完全フリーまでの見込みが明らかになります。具体的には、引き続き、PERV フリー豚作出に向けた育種改良の継続をベトナム側カウンターパートが実施する必要があります。それとともに、日本側においても仮に「低コピー」豚を輸入できた場合は臨床での応用を視野に新たなプロジェクトを開始してさらなるフリー化を目指します。①での記載通り、PERV 座位を PCR 等の簡易な方法により同定することで、親世代よりも PERV コピー数の低い個体を選抜しつづけ

ます。毎世代2コピーずつ低減出来れば、5世代、プロジェクト終了から2-3年で達成できる可能性が考えられます。

④ゲノム編集と比較して交配によるアプローチが優れている点、またゲノム編集を取り入れる予定があればその計画も含めてご説明ください。

(回答) 現在、ゲノム編集は様々な分野の生命科学研究に応用されていますが、農業生産、特に畜産物生産における産業利用に関しては倫理的な観点から、ネガティブな意見が多いです。特に畜産分野では遺伝子組換え生物のみならずクローン動物の産業利用で消費者(ユーザー)の反対意見が多いという状況でした。医療分野おいてゲノム編集動物の利用が受け入れられるかは未知ですが、選抜・育種という安全で安心な手法を用いることで、この懸念が払拭されます。また現在タイグエンに導入した品種の PERV コピー数は約 10 コピーであり、相対的に西洋豚品種あるいはベトナムの他地域の品種よりも低いが、ゲノム編集で配列を除去するのは容易でないと考えられるコピー数であると考えられます。仮にゲノム編集技術を適応しても完全に PERV フリー豚が完成したかどうかを確認する作業が困難であり、生理的に健常な豚が生産できるか不明であります。加えて、除去プロセスにより予期されない副作用についても想定されますが明確になっていません。以上の点から、現状では育種改良による PERV コピー数の低減化を図る方が効果的であると考えています。なお、本プロジェクト終了後に目標とした PERV コピー数が 5 以下まで低減できれば、ゲノム編集による PERV フリー豚作出も現実味をおびますが、安全性の検証が必要なことに加え、倫理的な問題についてはプロジェクト以外で社会的な検討が必要であると考えられます。

中間評価会での質問(要請)

「持続的生産システム」のシステムが含む対象、範囲、要素等を整理し、明確にしていただきたい。

(回答) 持続的生産システムとは、ジーンバンクをコアとしたブタの遺伝資源の保全・利用 システムを想定していました。これには生殖細胞・初期胚のみならず生体での保存も含まれ ます。遺伝資源の保存・利用は、例えば、国の研究機関やオーソライズされた機関が積極的 に行う国家的なプロジェクトが想定されます。いわゆる上から下への育種プロジェクトで、 「フォーマル」と呼ばれるアプローチです。一方で、在来種を中心に農家や地域の共同体に おいて主に生体で脈々と受け継がれているものも含まれます。「インフォーマルもしくはロ ーカル」なアプローチと呼ばれます。ほとんどの場合、上流への動きはありません。このよ うな考え方は植物では想定されていますが、動物(家畜)の場合は全く無いと言えます。こ れらはその立場・立場において独自に行われることが多く、両者が緊密に関係することはこ れまでありませんでした。しかし、仮にこの間にジーンバンクが設定されれば、それを中心 として新たな展望が期待できます。望ましい例としては、在来種が国や地方行政団体の政策 として保全・利用が図られ、農家が協力をします。遺伝資源を保全して利用を明確にすれば ブランド化といってもよいと思います。日本で言えば沖縄のアグーが一つの例になります (ただし保全より利用が先行していました)。問題となるのは、ジーンバンクを運用する資 金が何で運用されるかですが、仮に在来種においてブランド化が成功すれば利用に応じた 収入を得る、あるいは PERV-free 豚が生産され医療分野で活用さればそのロイヤリティー 収入で運用できることも可能かもしれません。 当初は、こういった状況が可能となり遺伝資 源の出し入れという状況が想定され、農家での在来豚の生産体制が滅失することなく、願わ くはその規模が拡大するのではないかと想定しました。持続的な生産システムとはこの事 を指します。残念ながら、現時点ではそこまで大きな構想を持つのは難しいようです。した がって、当面はこのようなジーンバンクのプロジェクトを理解しそれを運用できるシステ ムを国が主導する国家プロジェクトとして位置づける必要があります。この考え方は JICA の中間評価における Recommendation としても提言されています。

(3) プロジェクト開始時の構想からの変更点(該当する場合)

平成 27 年度は初期設定の研究題目・研究グループにて研究を遂行したが、平成 28 年度 に農業生物資源研究所が農研機構に統合され、研究部門の再編が行われたことから、研究題目の再編と研究グループ名を機関ごとの設定から内容に基づく設定とした。この結果、「PERV フリー(低コピー)豚の DNA 情報を用いた生産」については、2-3 から 1-6 へ変更した。ただし、当初より、平成 28 年度からの活動設定のため、影響は全く無かった。

平成 28 年度において、上記研究題目 1 のうち、1-1「ベトナム在来豚遺伝資源の収集(サンプリング)」については、PERV 遺伝子コピー数が少ない(PERV 低コピー)ことが見込まれる集団を含む地域が特定されてきたことから、該当地域における追加のサンプリングを計画し、詳細な解析を実施することにした。そのため、研究活動の期間を平成 29 年度に延長した。それに伴い、前述の 1-6「PERV フリー(低コピー)豚の DNA 情報を用いた生産」の開始を平成 29 年度からに変更した。

平成30年度年次研究計画にて以下の変更・追加を行った。

研究題目1:「ベトナム在来豚の調査と凍結バンク設立、PERV 検出系の確立ならびに PERV フリー豚生産」から「ベトナム在来豚の調査と凍結バンク設立、PERV 検出系の確立ならびに PERV 低コピー豚生産」に変更。

研究題目 1-6:「PERV フリー(低コピー)豚の DNA 情報を用いた生産」から「PERV 低コピー 豚の DNA 情報を用いた生産」へ変更。

研究題目 4-4:「生産性阻害要因のリスク分析」から「在来豚に最適化した飼養管理システムの構築とマニュアル化(衛生管理編)」へ変更。

研究題目 4-5:「PERV 低コビー豚輸出のための衛生管理体制の構築」の追加。

研究題目 5-3:「生産性阻害要因のリスク分析」から「在来豚に最適化した飼養管理システムの構築とマニュアル化(飼育管理編)」へ変更。

平成31年(令和元)度においては以下の変更を行った。

研究題目 1-4:「凍結バンク効率化のための精液凍結法の改良」については平成 30 年度中に プロトコールの作成の見込みが付いたので、平成 30 年度で終了した。

2. プロジェクト成果目標の達成状況とインパクト (公開)

(1) プロジェクト全体

・成果目標の達成状況とインパクト等

プロジェクト開始以来現在(本報告提出時)まで、全体として計画に基づき概ね年次計画 目標を達成していると考えられる。活動に伴い、データの集積が進み、徐々に学会発表、論 文発表、著作物が増えてきている。

研究題目1については、平成27年に在来豚の生息確認とサンプリング・DNA解析を行ったPERVのEnv遺伝子を特異的に検出するリアルタイムPCR解析により遺伝子のコピー数を検出した。ミニブタに対応する精液保存法ではプロトコールを作成し、ジーンバンク用の液体窒素タンク(クライオバンク)を購入して既にベトナム国立畜産研究所に設置した。系統解析の結果から、凍結バンクに凍結精液を保存するブタをリストアップするとともにその方法を策定した。短期研修では計画を若干変更し、長期研修については予定通り受け入れを開始した。PERV低コピー豚集団の開発では、DNA解析の結果から低コピー豚が多く生息する地域(Yen Bai 省)を確認し、二次サンプリングを実施して候補個体の選定を行い、Thai Nguyen 省の導入施設に数頭を導入した。平成28年には、在来豚のDNAを用いた遺伝的系統関係を解析する研究手法、および、PERV遺伝子コピー数の検出方法を構築した。24省から合計1200個体のDNAサンプルを選別し、マイクロサテライトマーカーによる遺伝子型判定を実施した。この解析結果に基づき、凍結バンクに導入する豚の選抜を行った。この系統解析の結果を踏まえて、平成30年度にはLai Chau省、Ha Giang省ならびにLao Cai省の雄豚から、令和元年度にはBinh Thuan、Quang Ngai および Quang Ninh省の雄豚から精液の

採取・凍結を完了した。データベースに関しては、リレーショナルデータベースの構造およびマイクロソフト・アクセスの利用・管理についての研修を実施し、その運用をはじめた。PERV 低コピー豚生産に関する研究は、Yen Bai 省の Ban 種を Thai Nguyen の施設に導入し、基礎世代の交配を行っている。産子の PERV コピー数測定を行い、平成 29 年度以降、PERV コピー数の測定および座位の同定に関しては、PERV コピー数が少ない Yen Bai 省の Ban 種を、Thai Nguyen 農場に導入し、交配を重ねており、概ね初期の目標を達成したと考えられる。

研究題目2では、平成27年度において、Ban種在来豚からの凍結融解した精巣上体精子 で受精卵が得られた。平成 28 年度は、Ban 種の体外成熟卵で体外受精を行い体外胚生産(胚 盤胞)が可能であることが確認された。Ban 種体外生産胚盤胞の作製では、2 種類の体外成熟 培養液を比較したところ、成熟率と体外受精後7日目の胚盤胞発生率は変わらないものの、 胚盤胞の品質(細胞数)は TCM-199 よりも POM で成熟培養した場合のほうが優れているとい う結果が得られた。次に、体外生産された受精卵ならびに胚盤胞を、異なる方法(マイクロ ドロップ法ならびにクライオトップ法)で、ガラス化冷却・超低温保存を行った。胚盤胞と 比べて、受精卵のガラス化冷却が、加温後の胚の品質という観点からより効率的であること が判明した Ban 種と Landrace 種の未成熟卵の脂肪含量について検討したところ、Ban 種卵 で脂肪含量が少ないことが明らかになった。脂肪含量はガラス化冷却の効果に影響をおよ ぼさないという興味深い結果が得られた。平成30年度までに、ベトナム在来豚の体外胚生 産について、Plan of Operation (PO)で設定されたすべての目標を概ね達成した。本年度の 特筆すべきこととしては、ベトナム在来豚の超低温保存を行った卵からは高品質の胚盤胞 が得られたこと、ガラス化冷却によって胚のアポトーシス誘導がなかったこと(胚の品質に は他の何らか要因が存在する可能性が示唆されたこと)、PERV 低コピーの在来豚からのクロ ーン胚が作製できたことが挙げられる。令和元年度はベトナム在来豚の体外生産胚の移植 を行ったが妊娠が確認されず、残りの期間で引き続き産子作製を目指し最終移植実験の結 果待ちである。

研究題目3では、平成27年度は、体細胞クローン胚の作出率の向上、安定化を図る目的で、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤Trichostatin A (TSA)の効果を確認したところ、在来種豚(体細胞)と西洋種豚(レシーピエント卵子)との組合せにおいて系統の異なる体細胞クローン技術への応用が期待できることが示唆された。平成28年度は、短期研修員(2名)を受け入れたことにより、体細胞クローン技術の教授ならびに現地でのクローン胚作製に有効な培養液を選択することができた。平成29年度は、長期研修員(1名)の受入を開始したほか、3機関(生物工学研究所、国立畜産研究所、ベトナム国立農業大学)にて、Ban種由来の凍結保存細胞を西洋種の除核したレシーピエント卵に導入した結果、いずれの機関においてもベトナム在来豚由来の体細胞クローン胚の作出に成功した。平成30年度は、クローン胚の発育能が低い場合を想定し、体細胞にゾウ体細胞を用いたブタとの異種間クローン胚の発育能が低い場合を想定し、体細胞にゾウ体細胞を用いたブタとの異種間クローン胚作出に成功した。またPERVコピー数の低いベトナム在来豚由来体外受精卵からPERV不活化受精卵を作成する方法として、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集法を検討した結果、ガイドRNAの違いが胚発育および編集効率に影響することを明らかにした。

研究題目 4 では、平成 27 年度は、研究題目 5 の Hoa Binh 省の試験農場及びその周辺農家で飼養する在来豚を対象に、疾病調査方法のセットアップを行った。研究題目 5 の早期離乳予備試験の対象農家 4 軒(Hoa Binh 省 Da Bac 地区)において耳票による個体管理を導入し、機能することを確認した。また、予備試験対象農家及びその周辺農家(いずれも Hoa Binh 省 Da Bac 地区)において 3 ヶ月に一度を目安に定期採材を行い、疾病モニタリング予備調査を開始した。さらに出荷サイズの豚を購入して解剖・採材することで疾病調査を開始した。現地調査における採材方法、サンプル処理方法についてカウンターパートであるベトナム国立農業大学の研究者と共有し、最適化を図った。また、PERV 低コピー豚の輸出に向けた検疫施設について、検疫の流れと施設の要件についてカウンターパートとイメージを共有し調査を行った。平成 28 年度は、Hoa Binh省 Da Bac 地区を中心に、衛生面を中心とした飼養管理状況の把握を行い、生産性向上のための農家指導のポイントを抽出した。4 種類の

対象疾病(豚熱(CSF)、口蹄疫(FMD)、豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)、豚サーコウイルス2型(PCV2))について疾病モニタリング(血清サーベイ)を行ったところ、陽性率はCSF(5.5%)、FMD(0%)、PRRS(2.1%)、PCV2(56.0%)となり、日本でも多くの豚が不顕性感染しているPCV2は半数以上の豚が感染しているが特に症状を示していないこと、一方、致死的な症状を示す重要な疾病であるCSFについては散発的な感染がありワクチン接種が強く勧められること、口蹄疫とPRRSについては問題となっていないことが明らかとなった。平成30年から、HoaBinh省DaBac地区CaoSonコミューンにおける小規模養豚農家(後述のモデル農家及び試験農家15戸)での聞き取り調査をもとに疾病発生を含めたおおまかな衛生状態の把握を行った。口蹄疫または豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)の感染は認められないものの、豚熱の感染は散発的に起きていることを明らかにした。なお、豚熱の抗体陽性豚の割合は2015年36%、2016年26%、2017年7%および2018年3%と年々低下しており、プロジェクトで実施しているモデル農家へのワクチン接種をはじめとする飼養衛生管理指導との直接の因果関係はわからないが、地域でのウイルス循環が低下していることが示唆された。

研究題目5では、平成27年度は、現地カウンターパートと協力して、飼料給与実験を行 った。この結果、1か月に近い日齢での離乳が可能で、子豚用市販飼料を給与する手法の方 がはるかに発育が速いことが示された。また、市販サプリメント飼料を混合した飼料を給餌 すると、約1か月齢で自然に離乳した。このことは、哺乳中に十分な泌乳量があったため子 豚の発育速度が速く、1 か月齢に達する前から母乳以外の固形飼料への摂取が始まり、1 か 月齢時点で母乳が不要となる状態となったものと推察される。これらのことから母豚への 飼料給与強化によって哺乳子豚の発育が極めて早まることが示された。平成 28 年度は、飼 料面を中心に飼養管理状況の把握を行い、生産性向上のための農家指導のポイントを抽出 した。平成27年度の試験農家で実証した飼養管理技術を拡大して実証試験を行った。その 結果、平成 28 年試験開始から平成 30 年 3 月時点までに分娩した母豚の実績値では、飼養 技術の導入前に比較し、分娩間隔は228日から175日と約50日間短縮させることができた。 このことは年間の分娩回数が 1.6 回から 2.1 回に 0.5 回増加したことになり、これに分娩 1 回あたりの離乳子豚数を掛け合わせると、年間1母豚当たりの離乳子豚数が約10頭から15 頭へと増加できることを実証した。平成 30 度からは、Cao Son コミューンのモデル農家を 対象とした研修会を2回、Hoa Binh 省の獣医補助員(パラベット)を対象とした指導者研修 (TOT)を2回実施した。新たな5コミューンについては巡回指導を4回実施した。また、コ ミューンごとにモデル農家を集合させた研修を実施した。この際、アフリカ豚熱が発生した ため、農場への疾病侵入防止に向けた農場出入り口周辺の消毒方法の実習を行うなど、状況 に応じた対応をとった。さらに、農家およびパラベットを対象とした教育訓練用資料の編集 作業を合わせて実施し、令和元年度に発行、配布した。Hoa Binh 省としては新技術の普及 に伴った増産が期待できるため、ベトナム在来豚の飼育密度が比較的高い Da Bac 地区のこ れらモデル農家を中心に在来豚肉の銘柄化を目指した生産組合が設立され、その活用が期 待される。

プロジェクト全体のねらい

以下、研究題目1~5を通して、ベトナム在来ブタ資源の遺伝子バンクの設立と多様性維持が可能な持続的生産システムの構築を目指す。

研究題目1では、当初の計画(全体計画)において、ベトナムでの凍結バンクを設立し凍結精液を導入すること、ベトナム在来豚の系統解析、ならびに、データベース構築を行うこと、さらに、PERV コピー数および座位の同定をすることを目標としている。

研究題目2では、在来豚における体外生産胚の作出技術ならびに卵および胚の超低温保存技術の確立を目指し、その指標としては胚移植により産子作製を行うことを目標とする。

研究題目3では、凍結保存した細胞を活用した体細胞クローン技術について、ベトナム在 来豚希少品種に応用することによって、効率的な在来豚の希少品種再生システムを共同開 発する。

研究題目4では、ベトナム在来豚農家における疾病調査を行う。ベトナム在来豚農家にお

ける疾病調査を行い、生産性阻害要因の抽出を行うことで、衛生状態改善のための提言の基礎となる科学的根拠を得ることを目的とする。

研究題目 5 では、ベトナム在来豚農家における生産性向上のための飼養管理技術の最適化を行う。

・地球規模課題解決に資する重要性、科学技術・学術上の独創性・新規性

平成28年度は、研究題目1について、これまでに得られた在来豚の遺伝的類縁関係に関するベトナム側の研究発表(Pham et al., J Anim Breed Genet. 2014:379-386)を参考に、大規模かつ詳細な解析を行った。現存する在来豚集団に関する系統関係を解明することによって、遺伝資源の多様性の維持・保全に関する指針を提示することができるようになり、新たな知見に基づく遺伝子バンクの構築に寄与している。研究題目2~5についても、データの蓄積により、論文作成も進み、いずれの題目においても順調に進んでいる。

平成 29 年度は、研究題目 1 について、これまでに得られた在来豚の遺伝的類縁関係に関して、「Genetic relationships among Vietnamese local pigs investigated using genomewide SNP markers」を Animal Genetics に発表した。プロジェクトにより得られた大規模かつ詳細な解析結果で、現存する在来豚集団に関する系統関係を解明して、ベトナムのブタ遺伝資源の多様性の維持・保全に関する指針を提示することができた。また、この新知見に基づきさらなる解析を行うことで遺伝子バンクの構築に寄与する。当該年度までに、ベトナム側研究チームとの共著の原著論文として、2報(研究題目 1 にて 1報ならびに研究題目 2において 2報)の論文が掲載された。

平成30年度は、同じく共著の原著論文として、研究題目2に関するものが3報の論文が掲載された。

令和元年には、5報(研究題目 1 にて 3報ならびに研究題目 2 において 2 報)の論文が掲載済みもしくは投稿中となっている。

・研究運営体制、日本人人材の育成(若手、グローバル化対応)、人的支援の構築(留学生、研修、若手の育成)等

平成 27 年度は、日本側研究者の活動がベトナムへの専門家派遣に集約する形となった。一方、短期研修のための研究員の招へいが全体で4名に留まり、また長期研修のための研究員(留学生)が平成 28 年度以降となったため、国内における研究推進がやや遅れをとった感があった。平成 28 年度については短期研修のための研究員の招へいに注力した。研究題目 1 では 2 名、研究題目 2 では 1 名、研究題目 3 では 2 名、研究題目 4 では 3 名、研究題目 5 では 6 名、全体で 14 名を受け入れた。長期研修のための研究員(留学生)としては、研究題目 1 ならびに 2 において、平成 28 年 10 月より SATREPS 枠の国費留学生(山口大学大学院獣医学研究科)1 名(修業年限 4 年)を受入れ、農研機構・生物機能利用研究部門において、研究課題「ブタ体外生産胚の効率的利用のための多能性遺伝子発現に関する研究」を行っている(令和 2 年 9 月修了予定)。研究題目 3 に配置予定だった JICA 枠の留学生(長期研修生)については、平成 29 年 4 月より徳島大学博士課程において、研究課題「Cas9/sgRNA 電気穿孔法による遺伝子改変ブタの作出」を行っている(令和 2 年 3 月修了)。なお、平成 29 年度の短期研修は、当初 3 コースの受け入れを予定していたが、研修内容について日越間で再度協議を行ったところ、不要との結論に達したことから取りやめることとした。

平成30年度は、研究題目3において、研究計画では予定されていない点として、JICA/JST 予算以外でもいろいろな可能性を発掘して短期研修生の受入れも行った(研究題目3、徳島 大学)。

一方、日本側の人材育成という観点からは、JST 研究費で雇用しているポスドク研究員1名をはじめ、若手研究員(42歳以下)がこれまでに計10名も参画している。当該ポスドク研究員は実験の実施はもとより、研究のとりまとめとしての論文執筆を進めており、人材育成の一端にも高く貢献したものと考えられる。

(2) 研究題目1:「ベトナム在来豚の調査と凍結バンク設立、PERV 検出系の確立ならびに PERV 低コピー豚生産」(平成27年度以前:「ベトナム在来豚の調査と凍結バンク設立ならびに PERV 検出系の確立」)

バンク/育種研究グループ(平成 27 年度は、生物研グループ)(リーダー: 菊地 和弘)

① 研究題目1の当初の計画(全体計画)に対する成果目標の達成状況とインパクト 平成27度の成果として、ハノイ近郊4省より、合計約500個体の外貌データ、写真データ、GPS情報およびDNAサンプルを採取した。さらにハノイ近郊4省のうち3省で採材した ブタ集団の一部を用いたマイクロサテライト(MS)マーカーによる多型解析の結果は、在来 豚の系統解析が実施可能であることを示した(図1)。さらに、MSマーカー解析と同じブタ集団を対象に行ったPERVのEnv遺伝子のリアルタイムPCR解析により、コピー数の少ない個体が存在しうることが示唆された。ただしPERV内の複数の領域を繰り返し検出する等、検出方法には最適化の余地がある。ブタ精子凍結法については、旧農業生物資源研究所で実施したものと同程度の生存率を持つ凍結精子の作製が可能であった。またベトナム側カウンターパートとともに共通の精子凍結マニュアルを作成し凍結技術の共有に至った。

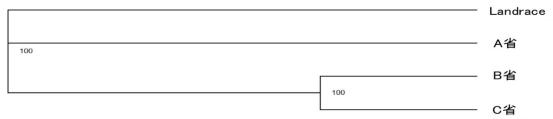


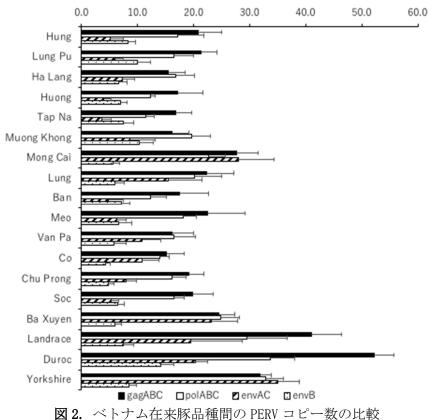
図1. ハノイ近郊3省のベトナム在来豚および日本国内ランドレースの系統樹. 本系統樹はMS解析の結果をもとにNJ法にて作成した(Bootstrap=100)

平成 28 年度の成果として、1) 在来豚の DNA を用いた遺伝的系統関係を解析する研究手法、および、PERV 遺伝子コピー数の検出方法を構築した。在来豚の遺伝的な系統関係を明らかにするため、17 省から合計 1575 個体の DNA サンプルを調製し、マイクロサテライトマーカーによる遺伝子型判定を進展させた。2) データベースに関しては、ベトナムで取得したフィールドデータを持ち込み、短期研修を通じて基本的な構築について日越で確認した。現在はマイクロソフトのアクセスをベースにデータベースを管理しているが、今後はサーバーにて運営するかなどを検討し、ベトナム側の需要を見越した上で発展を目指す。3) 精液の保存については、日本側の専門家が訪越してその手法の最終確認を行った。これをもとに凍結バンクの運用に向けたプロトコールを制定した。さらに、射出精子のみならず、精巣上体精子についても凍結バンクの対象となるため、実際に在来豚(Ban 種)3 頭からの採取・凍結を行った。凍結した精子については今後クライオバンクで保存をする予定である。4) PERV 低コピー豚生産に関する研究は、Thai Nguyen 省の施設の育種繁殖豚舎の建築の遅れがあり、竣工次第(H29 年度秋予定)実施するため、平成 28 年度は実施しなかった。

平成29年度は、詳細なベトナム在来豚の遺伝的系統関係を明らかにするために、17省から合計576個体のDNAサンプルを用いたゲノムワイドSNPマーカーによるジェノタイピングを実施した。また、前年度までに行った一次サンプリングにより候補地となったYen Bai省において平成29年4月に二次サンプリングを実施した。二次サンプリングを実施した約100個体よりThai Nguyen省の育種繁殖豚舎に導入する個体を選択するため、リアルタイムPCR法によりPERVコピー数の同定を行った。Yen Bai省Mu Cang Chai地区の集団が比較的PERVコピーが少なかったため、その集団から雄1頭および雌4頭を選び、Thai Nguyen省の導入豚舎に導入した。さらに、PERVのゲノム上の位置を決定するため、次世代シークエンサー(NGS)を用いた解析に着手した。Thai Nguyen省の施設に導入されたベトナム在来

豚への適応を試みた。なお、育種繁殖用の親豚の必要数を確保するまで二次サンプリングを 行うこととした。

さらに、平成 29 年度においては、在来豚の DNA を用いた遺伝的系統関係を解析する研究 手法、および、PERV 遺伝子コピー数の推定方法を開発した。在来豚の遺伝的な系統関係を 明らかにするため、21 省から合計 1200 個体の DNA サンプルを選別し、MS マーカーによる 遺伝子型判定を実施した。この解析結果に基づき、凍結バンクに導入する豚の選抜を行った。 また、データベースに関しては、昨年度、短期研修で構築したリレーショナルデータベース の構造に基づいて、フィールド調査から得られたベトナム在来豚のデータをマイクロソフ トのアクセスへの入力を進めた。さらに、ベトナム国内においてリレーショナルデータベー スの構造およびマイクロソフト・アクセスの利用・管理についての研修を実施した。今後は、 サーバーにて運営するかなどを検討し、ベトナム側の需要を見越した上で発展を目指こと とした。精液の保存については、前述の遺伝子型判定の結果に基づき平成30年度の早期に 実施することとした。PERV 低コピー豚生産に関する研究は、すでに開発した PERV 遺伝子コ ピー数の測定方法により、1次サンプリングで得られた個体のサンプルを用いた比較解析を 行い、地域間あるいは系統間で PERV 遺伝子コピー数に差異が認められることが明らかとな った(図2)。幾つかの地域において PERV 低コピー個体を検出した。Yen Bai 省の Ban 種(雄 3頭、雌5頭)を Thai Nguyen の検疫豚舎に導入し、基礎世代で5組の交配を行なった。こ れまでに得られた第一世代の子豚を用いた PERV コピー数測定では、両親の PERV コピー数 の平均程度の値を示した。また豚の育種豚舎が 平成29年度10月に完成したため、PERVコ ピー数の低い豚同士の交配を継続していくことで、より PERV コピー数の低い豚の生産を目 指す。さらに、PERV のゲノム上の位置を決定するため、次世代シークエンサー(NGS)を用い た解析に着手した。データベースに登録されている西洋品種(Duroc 種および Landrace 種) およびイノシシの NGS のデータに対して、これまで報告されているヒトゲノム上に存在す る内在性レトロウイルスの挿入箇所を検出する方法を適用したところ、ブタゲノム上にお ける PERV の挿入が推定される箇所が同定された(図 3)。この方法の精度を検証することと した。



- 9 -

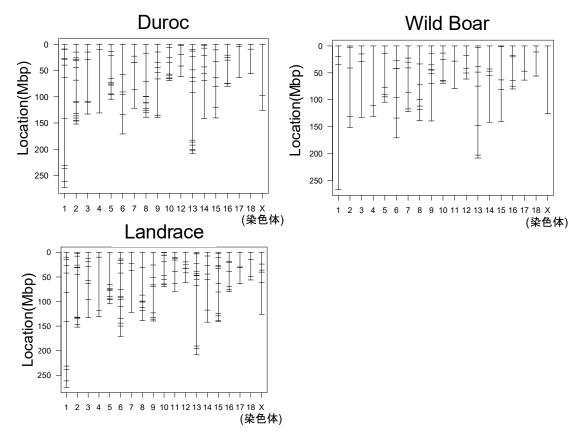


図3. 次世代シークエンサーデータを用いた PERV のゲノム中挿入箇所の推定 西洋種 (Duroc 種および Landrace 種) およびイノシシのゲノム中の PERV 挿入箇所を染 色体ごとに推定した。

平成 30 年度は、ベトナム在来豚の系統解析のため 22 省において分類・同定のためのサンプリングを完了した。最終的に、22 省 32 集団(サンプルした省により同一品種の場合は別の集団と定義した)のベトナム在来豚から合計 2033 頭分のサンプルを採取した。サンプル採取に伴い、あらかじめ策定した入力項目に基づく特性調査のための聞き取りを実施した。データベースの構築のため、ベトナムで取得したフィールドデータはマイクロソフト・アクセスを用いて管理することとした。系統解析に関してはすでに国際学術誌に論文を掲載(Ishihara et al., Animal Genetics 2018)し、さらに、ベトナム研究者を筆頭著者とする論文を当該年度に投稿し令和元年度に掲載された(Ba et al., Animal Science Journal 2020)。データベースに関しても日本人若手研究者による論文を当該年度より準備し令和元年度に投稿した(Ishihara et al., Animal Science Journal 修正原稿査読中)。

在来豚精液の採取・保存については、系統解析の結果を踏まえて、射出精子を凍結バンクの対象として、これまでの遺伝的解析を基に候補品種を選定して、実際に Lai Chau 省 (Muong Te 種)、Ha Giang 省 (Hung 種) ならびに Lao Cai 省 (Den 種) の在来豚各 5 頭、国立畜産研究所・Thai Nguyen 農場による検疫を実施して国立畜産研究所・コンサベーションセンターに搬送し、精液採取のトレーニング後に、採取・凍結を行った。凍結したストローの本数は、それぞれ 2009、2095 ならびに 1225 本であった。

Thai Nguyen 農場では、PERV コピー数の測定および座位の同定に関しては、すでに過年度までにヒト細胞への感染性が確認されている PERV-A および PERV-B に加え、PERV-C を含めて一度に検出できる解析系を開発し、Yen Bai 省に存在する Ban 種の PERV コピー数が他地域の在来ブタ品種より比較的少ないことを明らかにした(平成 30 年度、論文作成。Animal

Science Journal 令和元年度受理済)。この結果に基づき、Yen Bai 省の Ban 種を Thai Nguyen 農場に導入し、新設された育種豚舎にて PERV 低コピー豚の交配を開始した。現在、第2世代の子豚が得られつつあるが、子豚間の PERV コピー数はばらつきが大きい。両親の PERV コピー数を下回るものも存在するため、そのような個体を選抜し、次世代の作出を行っている。さらに、ベトナム在来豚の全ゲノム解読データを用いて、ブタのリファレンスゲノムを対象とした PERV 座位の特定方法を開発した。本成果は令和元年9月の日本畜産学会第126回大会で発表した(図4)。

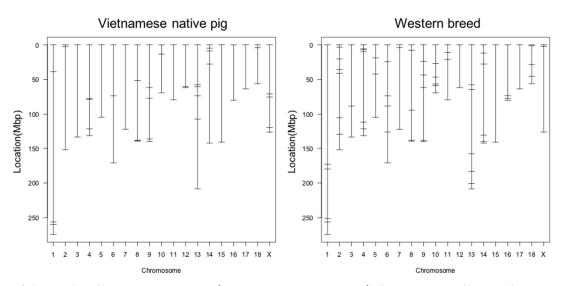


図4. 次世代シークエンサーデータを用いたベトナム在来豚および西洋豚品種の PERV 由来 LTR のゲノム中挿入箇所の推定

令和元年の活動として(本報告提出時点まで)、引き続き Thai Nguyen 農場における育種・繁殖活動を継続している。在来豚精液の採取・保存については、アフリカ豚熱の国内蔓延のため豚の移送ができず、Thai Nguyen 農場による検疫ならびに国立畜産研究所・コンサベーションセンターへの搬送、射出精子の凍結が不可能となった。採取サイトに機器を搬送し現地でミニラボを構築して精子の保存を行うことにした。また、対象も雄豚への採取訓練が不可能となることから、精巣上体精子とすることとした。Binh Thuan省において、Den 種5頭の精巣上体精子を採取し784本の凍結精液ストローを、Quang Ngai省において Kieng Sat種5頭から471本を、Quang Ninh省において Mong Cai種5頭から537本を作製し、国立畜産研究所のクライオバンクに導入した。

②研究題目1のカウンターパートへの技術移転の状況

平成27年2月19日より3月19日までの1か月間、ベトナム側カウンターパートより合計4名(ベトナム国立畜産研究所3名、ベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所1名)の研究員を受け入れ、精子凍結技術、MSマーカーによる系統解析、および、リアルタイムPCRによるPERV検出法について技術習得のための研修を実施した。

平成28年度は、在来豚の系統解析、PERV遺伝子コピー数の検出法、ならびにデータベース構築に関する短期研修を実施し、ベトナム側研究者に対する技術移転を行った。その成果により、系統解析およびPREV遺伝子コピー数の測定がベトナム国立畜産研究所において実施可能となり、データベース構築は今後進展することが期待される。日本人ポスドク研究員1名がベトナム側研究機関と協働して在来豚遺伝資源の収集を推進しており、在来豚DNAを用いた系統解析およびデータベース構築に向けた取り組みに従事した。またこれらの活動に関して、ベトナム側研究員2名(PERV遺伝子座の同定、データベース構築、各1名)を招聘し指導を行った。また、10月よりSATREPS枠の国費留学生(山口大学大学院獣医学研究科)

を受入れ、「ブタ体外生産胚の効率的利用のための多能性遺伝子発現に関する研究」を開始 した。将来修了後に帰国した時、多大な技術移転が期待できる。

平成29年度は、データベース、FISHならびにマイクロサテライトの3コースの短期研修を予定していたが、日越間で協議を行い取りやめることとした。

平成30年度は、昨年度までに行った短期研修や専門家が訪越して行った指導により、在来 豚の系統解析およびPREV遺伝子コピー数の測定はベトナム国立畜産研究所において実施可能となった。データベース構築については、12月にベトナム国立畜産研究所の職員ほかを 対象にワークショップを行い、研修での成果を広めることができた。今後、第2段のワーク ショップも予定されており、今後、運用にむけた進展が期待される。日本人ポスドク研究員 1名がベトナム側研究機関と協働して在来豚遺伝資源の収集を推進しており、在来豚 DNA を 用いた系統解析およびデータベース構築に向けた取り組みに従事している。またこれらの 活動に関して、ベトナム側研究員2名(PERV遺伝子座の同定、データベース構築、各1名) を招聘し指導を行った。なお、SATREPS 枠の国費留学生(山口大学大学院獣医学研究科)を受 入れ、「ブタ体外生産胚の効率的利用のための多能性遺伝子発現に関する研究」を実施中で ある。

精液の保存については、手法の最終確認を行った。これをもとに凍結バンクの運用に向けたプロトコールを制定した。また、データベースの運用に関するワークショップを実施し、今後はサーバーにて運営するかなど、ベトナム側が主体的に運営できるような体制を検討した。PERV コピー数測定に基づく PERV 低コピー豚の育種は、すでにベトナム側カウンターパートが実施する段階に入った。

③研究題目1の当初計画では想定されていなかった新たな展開

本プロジェクト開始当初の平成 27 年度から平成 29 年度にかけて、とりわけ想定されていなかった展開はなかった。

平成 30 年度においては、PERV 低コピー豚育種は、当初 Thai Nguyen 農場の馬舎を改築して実施する予定であったが、既に存在した豚舎に隣接する形で新築の豚舎を設置することができた。元々あった豚舎を検疫豚舎として活用し、さらに新築の豚舎を育種専用としたため、当初の予定(世代あたり 5 ペア)よりも交配の組み合わせを多く(世代あたり 10 ペア)設定できた。

④研究題目1の研究のねらい(参考)

平成27年度においては、ベトナム在来豚の分類・同定および系統解析のためのサンプリングならびに特性調査を実施した。次に、データベースの構築のために、収集した情報の精査および入力を行った。さらに、凍結バンクではベトナム側研究員に凍結法を教授し、本邦の在来豚ならびにベトナムの在来豚で凍結実験を行う。PERV低コピー豚集団の開発では、4種類のPERV(PERV-A、PERV-B、PERV-C、およびPERV-E)のうち、ヒト細胞への感染性が確認されているPERV-AおよびPERV-Bのエンベロープ(Env)遺伝子を特異的に同定するポリメラーゼ連鎖反応(PCR法)に基づく検出方法の最適化を検討した。ゲノムDNAを用いた系統解析については、ベトナム側カウンターパートにおいても実施可能なマイクロサテライト(MS)マーカーを用いた手法について、ベトナム在来豚に適用できるか検討した。

平成 28 年度においては、1) 在来豚の DNA を用いた遺伝的系統関係を解析する研究手法、および、PERV 遺伝子コピー数の検出方法の構築、2) データベースに関しては、基本的なデータベースの構築、3) 精液の保存については、クライオバンク向けのプロトコールを制定、ならびに 4) PERV 低コピー豚生産については、育種繁殖の着手を目指した。

平成 29 年度においては、1) 引き続き詳細なベトナム在来豚の遺伝的系統関係を明らかにすること、特に次世代シークエンサー (NGS) を用いた解析の有用性を検討すること、2) ベトナムにおいてデータベース構築を目指すこと、3) 凍結精液を作製しクライオバンクに保存すること、ならびに 4) 前年度できなかった、PERV 低コピー豚生産について育種繁殖用の基礎豚を導入し着手することを目標とした。

平成 29 年度は、日本が構築したシステムを基にベトナム型凍結バンクを設立し、それを 効率的に運用することを目的とした。

平成30年度については、ベトナムの在来ブタ品種を網羅すべく、広範囲かつ大規模なサンプリングを実現した。その際、地理情報(GPSデータ)、外貌上の特徴(写真データ)、ならびに、農家への聞き取り調査を実施し、これまでにない膨大な量の在来豚に関するデータを収集することができた。さらにゲノムDNAを用いた遺伝的解析により、在来ブタ品種の系統関係を明らかにすることができた。これらの情報は、凍結バンクの利用の観点から、保存サンプルの品種情報を示すことができる有意義なものとした。

⑤研究題目1の研究実施方法(参考)

本プロジェクト開始当初の計画に基づき、ハノイ近郊4省の在来豚について、ベトナム国立畜産研究所の研究者と協議のうえ策定したデータベースの入力項目である毛色、体型、耳の形などの外貌的特徴についてデータ収集を実施した。これらに加え、写真データおよびGPS情報も添付した。データを収集したブタ個体から、順次ゲノムDNAを抽出した。これらDNAサンプルを用いて、系統解析に有用であることが示唆される10座位のMSマーカーによる多型解析を行った。さらに、PERVのEnv遺伝子を特異的に検出するリアルタイムPCR解析により、個体間でのコピー数が比較可能かどうか検討した。また、ブタの精子凍結法については、旧農業生物資源研究所(現農研機構生物機能利用研究部門)にて最適化された方法が、ベトナム国立畜産研究所において在来豚の精子にも適用可能であるか検討した。

上記目標のため、1) ベトナム在来豚の系統解析: 希少遺伝資源の探索調査を実施した。 分類・同定のためのサンプリングならびに特性調査のための聞き取り調査を行った。2) ベトナム在来豚のデータベースの構築: 分類・同定・特性調査のデータベースを構築してシステムの定着化を図った。3) 凍結バンク効率化のための精液凍結法の改良、既存の凍結技術をベトナム在来品種に適用し、より融解後の生存率や高受胎率が望める凍結保存技術に修正した。また、4) PERV 座位の検出方法を確立し、PERV コピー数を検討した。さらに、RERV 低コピー豚を育種・造成するシステムを構築した。

これらの活動を実施することにより、ベトナム全土の在来豚の生息地域である 22 省を対象に、累計 1800 頭を超えるゲノム DNA 抽出用サンプルを採取し、同時に聞き取り調査などに基づく地理情報、外貌上の特徴などを含むフィールドデータの収集も行った。ゲノム DNA を用いて系統解析、PERV コピー数の測定および座位の同定を行った。フィールドデータはデータベース構築に活用した。これらの情報に基づき凍結バンクにて保存対象とする豚の選定を行った。凍結バンクのための精液保存の手法は、これまでに日越共同で策定したプロトコールを基に実施した。

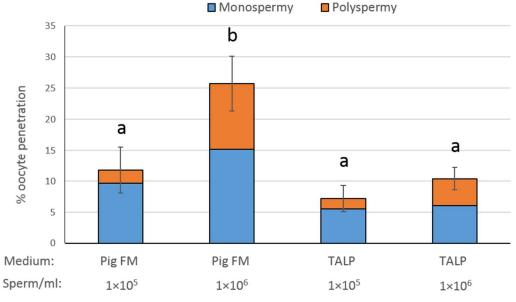
PERV コピー数の測定にはリアルタイム PCR 法を応用した推定法を開発し、PERV 座位に関しても既存の手法を改良した同定法を開発した。現在、これに関しては技術移転が完了し、ベトナム側が主体となって運用を開始している。ベトナム在来豚のうち PERV コピー数が低いことを明らかにした Ban 種を対象に、育種による低コピー豚の作出を実施している。

(3) 研究題目 2:「ベトナム在来豚の体外胚生産と卵ならびに胚の超低温保存技術の高度 化」(平成 27 年度以前:「ベトナム在来豚の体外胚生産と卵ならびに胚の超低温保存技術の 高度化および PERV フリー豚生産」)

体外胚生産/保存研究グループ(平成 27 年度は、畜草研グループ)(リーダー:ソムファイタマス)

- ①研究題目2の当初の計画(全体計画)に対する成果目標の達成状況とインパクト
- 1) ベトナム在来豚の凍結精子を使ったブタ体外胚生産のための体外受精法の最適化 カウンターパート機関としてベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所にて、精子の 凍結保存と体外成熟・受精を実施した。精子としては、Ban 種より得た精巣上体精子を凍結

融解して用いた。卵は入手可能な西洋種から採卵して用いた。このロットの精子に対して、2種の精子濃度と体外受精用培養液を確認した。本実験結果として、Pig FM medium を 1×10⁶ 精子/ml で体外受精を行ったもので精子侵入率が高い結果が得られた(**図 5**)。



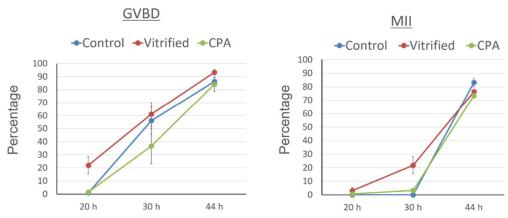
a,b: P<0.05 (ANOVA). 5 replications were performed.

図 5. Ban 種凍結精巣上体精子の体外受精。2種の体外受精液と2ドーズの精子濃度の 影響を検討した。

2) 卵の核ならびに細胞質成熟の進行に及ぼすガラス化冷却の影響

ブタ未成熟卵の超低温保存のためのガラス化冷却法については既に手法を保持している。ガラス化冷却した未成熟卵は、生存していれば対照区ならびに耐凍剤(CPA)処理区と同等に卵核胞崩壊(GVBD)し、第二減数分裂中期(MII)に達した(図6)。しかしながら、加温後の生存性そのものが低く、全体として卵成熟やその後の胚発生が制限されている。そこで、ガラス化冷却された卵の胚発生能を低減させるその要因を解析することにした。すなわち、この要因を排除することで手法の改良が見込まれたためである。卵核胞(GV)期の未成熟卵をガラス化冷却し、成熟培養時の核ならびに細胞質成熟の進行を調べた。ガラス化冷却をすると、(成熟を進行させない作用を示す)dibutyryl cAMPが存在しても核の成熟を誘起した。ガラス化に至らない段階の冷却やCPA処理ではこの効果を引きおこさなかった。一方、ガラス化冷却は、細胞質成熟の一指標とされる細胞質内グルタチオン濃度や代謝の指標であるATP濃度には影響を与えなかった(図7)。以上から、ガラス化により誘起される核の成熟が、胚発生に影響を及ぼす要因であると判断された。

Nuclear progression during IVM

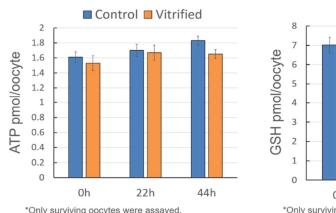


*Only surviving oocytes were assayed.

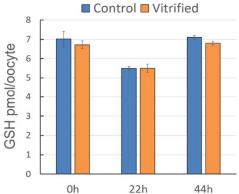
4 replications were performed. a and b in the same category differ significantly.

図 6. 未成熟卵のガラス化処理(Vitrified)による卵成熟の進行。Control: 対照 区、CPA; 耐凍剤)処理区

ATP and GSH levels in oocytes during IVM



*Only surviving oocytes were assayed. 5 replications were performed. Significant difference was not detected between groups at P<0.05.



*Only surviving oocytes were assayed..

3 replications were performed. Significant difference was not detected between groups at P<0.05.

図 7. ガラス化処理区と対照区における成熟培養中の ATP ならびに細胞質内グルタチオン(GSH)濃度の推移

平成28年度では、ベトナム在来豚における未受精卵子ならびに初期胚(精子と卵子を体外受精させて一定期間培養した体外生産胚を想定する)の超低温保存法の確立を目的とした。また、凍結バンクにおいては精子と卵子を別個に保存して必要時にそれぞれを融解・加温することで、目的の形質をもったものから胚を作出することで、次世代の育種・系統造成を可能にする。したがって、本研究においては超低温保存法確立と同時に、ベトナム在来豚において体外で胚を生産するシステムを開発した。

1) ベトナム在来豚の凍結精子を使ったブタ体外胚生産のための体外受精法の最適化 カウンターパート機関のベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所において、在来品 種である Ban から凍結保存精巣上体精子を作製しこれを利用する体外受精(IVF)システムの最適化を行った。この精子を用い、と畜場由来の西洋種である Landrace 種の卵巣から卵を採取して IVF を行った。昨年度は、IVF 時の至適精子濃度が 1×10⁶ 精子/ml、IVF 液としてTALP-PVA よりも Pig FM 液がより優れていることが判明しているが、その条件で IVF を行っても受精率は 30%を下回っていた。そこで、平成 28 年度は、体外受精に先立ち、卵の周囲に存在する卵丘細胞を部分的に除去し卵を裸化し、物理的な障壁を少なくして Ban 種の精子の受精能が向上することを期待した。また、IVF 液に受精能を高めるために加えるカフェインの濃度を通常の 2 mM から 5 mM に、さらに精子と卵子の共培養(媒精)時間を通常の 3 時間から 6 時間に増やしたところ、受精率は有意に増加し 50%を越える値を示した(表 1)。以上のことから、Ban 種の精子の使用条件が整った。すなわち IVF システムの最適化が完了した。本データは論文投稿し掲載済みである。

表 1. カフェイン濃度と卵と精子の共培養時間が、Ban 種の凍結融解精巣上体精子の体外成熟卵への受精に及ぼす影響.

カフェイン 濃度	供培養 時間	総卵数	精子侵入卵数 (%総卵数)	正常受精卵数 (%総卵数)	単精子受精卵数 (% 精子侵入卵)
2 mM 3 h		87	13	13	13
2 IIIVI - 3 II	5 11	01	$(15.2\pm 1.9)^{a}$	(15.2 ± 1.9)	$(100\pm0)^{\mathrm{b}}$
5 mM 3 h	78	21	17	18	
	9 II	10	$(27.0 \pm 3.9)^{ab}$	(21.8 ± 6.4)	$(83.3\pm 9.6)^{ab}$
0 mM	O . M	0.6	25	18	23
2 mM	6 h	96	$(26.6\pm 4.6)^{ab}$	(19.1 ± 3.0)	$(92.5\pm 3.8)^{ab}$
EW	G la	90	47	22	26
5 mM	6 h	80	$(58.8 \pm 10.9)^{b}$	(28.1 ± 8.1)	$(57.3\pm 9.4)^a$

IVF には Pig FM 液を用い、卵丘細胞を部分的に除去した卵を用いた。3 回の反復実験を行った。データは平均±標準誤差で示している。同じ列の a ならびに b の符号のついたデータに有意差あり (P <0.05)。

2) 卵の核ならびに細胞質成熟の進行に及ぼすガラス化冷却の影響

旧農業生物資源研究所の施設において短期研修員とともに、ガラス化前の処理についていくつかの要因を最適化することで、卵の超低温保存のプロトコールを改良した。まず、ガラス液に浸漬する時間を 60 秒よりも短くし、生存性や胚発生に問題ないことを確認した。さらに、通常行うサイトカラシンBにて 40 分間の処理が省略できること、また通常使うウシ血清アルブミンの代わりに、ポリビニルピロリドン(PVP)を使うことで、胚の生産効率を失うことなく、卵の処理を行えることを確認した。さらに、卵を処理する耐凍剤を含んだガラス化液の温度を 25℃で処理することで胚の生産効率がよくなることが明らかになった(表 2)。これらの試薬・手法を採用することで、ガラス化をより安価に、迅速にかつ効率よく胚を生産できることが明らかとなった。本データについても論文投稿し掲載済みである。

表 2. 異なった温度でガラス化冷却した未成熟ブタ卵の生存と胚発生

	処理卵 総数	生存卵数 (%総卵数)	成熟卵数 (% 生存卵 数)	卵割胚数 (%成熟卵 数)	胚盤胞 (%成熟卵 数)
対照区	151	99. 3 ± 0 . 6a	92. 6 ± 0.9^{a}	91. 7 ± 1.3^{a}	73. 6 ± 5.1^{a}
(非ガラス化)					
38℃でガラス化	186	67. 2 ± 7 . 5b	84. 0 ± 2.9^{b}	71. 4 ± 4.0^{b}	$21.4\pm3.0^{\circ}$
25℃でガラス化	191	66. 4 ± 5 . 9b	82. 1 ± 4.0^{b}	75. 2 ± 9.4^{b}	34.4 ± 7.7^{b}

胚の発生は単為発生処理(電気刺激)により確認した。3回の反復実験を行った。データは平均 \pm 標準誤差で示している。同じ列の a, b ならびに c の符号のついたデータに有

意差あり(P < 0.05)。

さらに平成28年度は、ベトナム国立畜産研究所にて、Ban 種未成熟卵のマイクロドロップによるガラス化冷却に着手した。これは、ベトナム在来豚では初めての試みとなる。ガラス化冷却した卵は加温、体外成熟し、凍結融解したBan 種精子と体外受精を行った。加温後の生存性、体外成熟、さらに受精後の胚の発生率を、と畜場由来のLandrace 種の卵と比較した。3回の反復を行ったところ、Ban 種もLandrace 種のどちらも高い生存率を示した(麦3)。また、卵の成熟率や胚の発生率に差がなかった。Ban 種の体外生産胚について、1つだけ胚盤胞に発生した(図8A)が、残りの胚は2-4細胞期で発生が停止した(図8B)。以上の結果により、超低温保存したBan 種の精子ならびに卵から現地のベトナム国立畜産研究所にて在来豚(Ban種)の胚の体外生産に成功した。今後は胚盤胞の発生効率を上げる努力が必要である。本データについても論文投稿し掲載済みである。

表3. 未成熟 Ban 種ならびに Landrace 種卵を用いた卵のガラス化冷却後卵の生存性と胚の発生

	総ガラス 化卵数	生存卵数 (%総卵数)	成熟卵数 (% 生存卵数)	卵割胚数 (% 培養胚数)	胚盤胞 (% 培養胚数)
Ban	201	93. 1 ± 3.4	80. 4 ± 5.1	30.8 ± 7.7	9.4 ± 5.0
Landrace	235	70.7 \pm 16.7	90.0 \pm 1.3	10.3 \pm 6.1	0.79 ± 0.79

データは平均±標準誤差で示している。すべてのデータに有意差なし(P >0.05)。

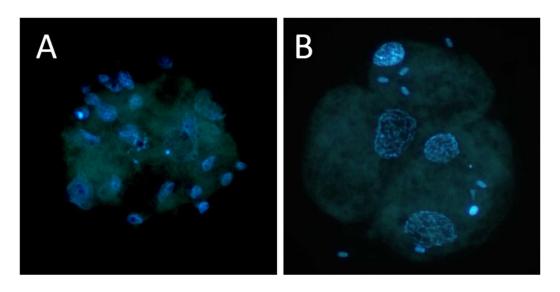


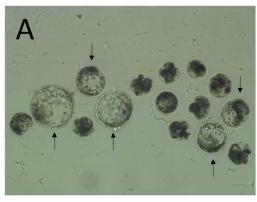
図8. (A)超低温保存した Ban 種精子と卵から体外で生産した胚盤胞期胚(体外受精後6日目)。(B)同じく、4 細胞期で発生停止した胚(6日目)。発生ステージならびに細胞数は Hoechst 33342 にてクロマチン染色した。

平成29年度の成果として、以下が挙げられる。

1) Ban 種体外生産胚盤胞の作製

実験施設において、平成28年度に確立したBan種の凍結精子を使用した体外受精系を使った体外胚生産法を用いて、胚盤胞の作製に成功した。さらに、平成29年6-9月には、ベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所において、Ban種の体外成熟卵をBan種の凍結精子で体外受精を行い、純粋なBan種の胚盤胞の作製(5反復実験)を行った。また、卵の体外成熟に低コストで調整できる培養液(凍結乾燥卵胞液を再構築したTCM-199液)を用いた

ところ、胚盤胞率は市販の培養液 (POM) に比べても遜色ない結果だった(それぞれ、17.3%ならびに22.4%, 表4)。またその形態学的評価(図9)も遜色がなかった。これらの結果から2種類のいずれの成熟培養を用いても成熟率と体外受精後7日目の胚盤胞発生率は変わらないものの、一方で、Ban種の胚盤胞の品質(細胞数)はTCM-199よりもPOMで成熟培養した場合のほうが優れているという結果が得られた。本研究では最終的な目標として、ベトナム在来豚からの配偶子 (卵と精子)を用いて、発生可能な胚をつくり産子の作出を目指すことである。平成28年度はベトナム在来豚からの凍結精子が受精可能であることを示した。本年度は、胚発生の確認とベトナム在来豚からの卵を用いての胚生産の確認を行ったので、胚移植実験を行い、現在、最終移植実験の結果待ちである。



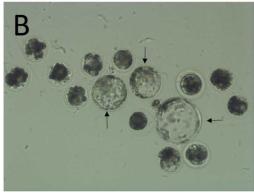


図9. TCM-199 液ベースの低コスト培養液(A)、あるいは市販の POM(B) にて体外成熟を行った卵を用いて体外生産された、体外受精後6月目の Ban 種の胚盤胞(矢印)。

表 4. 2 つの異なる培養液で体外成熟した Ban 種卵の成熟と胚発生能

	_ ,					
成熟培養液	卵数	成熟卵数 (% 生存卵 数)	卵割胚数 (%成熟卵 数)	胚盤胞 (% 培養胚 数)	脱出胚盤 胞率	胚盤胞の細 胞数(発生 培養 7 日 目)
TCM199+pFF	180	67.9 ± 2.5	56.0 \pm 4.1	17. 3 ± 5.2	1. 1 ± 1 . 1	44.6 \pm 5.2
POM+EGF	196	74. 1 ± 3.0	52. 3 ± 4.9	22.7 \pm 5.9	5.0 \pm 1.7	$67.0 \pm 9.5 *$

⁵回の反復実験を行った.データは平均±標準誤差で示している。すべてのデータに有意差なし(*P* >0.05)。*P=0.089。

2) 体外生産された受精卵ならびに胚盤胞のガラス化冷却による超低温保存

農研機構において体外生産された受精卵ならびに胚盤胞を、異なる方法(マイクロドロップ法ならびにクライオトップ法)で、ガラス化冷却・超低温保存を行った。胚盤胞と比べて、受精卵のガラス化冷却が、加温後の胚の品質という観点からより効率的であることが判明した。また、方法の違いによる胚の品質の差は無く、いずれの方法においても効果が認められた(表 5)。この結果を受けて、ベトナム国立畜産研究所の協力のもとベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所において Ban 種の体外受精卵のガラス化冷却・超低温保存実験を実施している。引き続き在来豚での実験を行う。概ね予定通りに進展していると考えられる。

表 5. マイクロドロップ法 (MD)またはクライオトップ法(CT)によりガラス化冷却され	,
た体外生産豚胚盤胞の回収、生存ならびに発生	

実験区	総数	回収数 (総数の%)	生存数 (回収数の%)	胚盤胞数(6 日 目) (総数の%)	胚盤胞の総 細胞数
対照区	145	100 ± 0^{a}	100 ± 0^{a}	34.6 ± 4.3^{a}	46.6±1.9
ガラス化 (MD)区	182	89. 7 ± 0.5^{b}	98. 5 ± 0.7^{ab}	18.9 ± 1.3^{b}	44.4±2.2
ガラス化 (CT)区	144	$100\pm0^{\rm a}$	90. 1 ± 5.8^{b}	19. 1 ± 4.1^{b}	46. 1 ± 6.4

3 反復実験を行った。パーセントは平均 ± 標準誤差で表示している。

a ならびに b: P<0.05 で有意差あり(分散分析ならびに Tukey の多重比較検定による)。

3) Ban 種と Landrace 種の未成熟卵の脂肪含量について

両種の未成熟卵の脂肪含量について検討したところ、Landrace 種卵で脂肪含量が高いことが明らになった(図10)。一方で、Ban 種と Landrace 種卵のガラス化冷却後の生存性は同等であることから(平成27年度報告書を参照のこと)、脂肪含量はガラス化冷却の効果に影響をおよぼさないことが明らかになった。

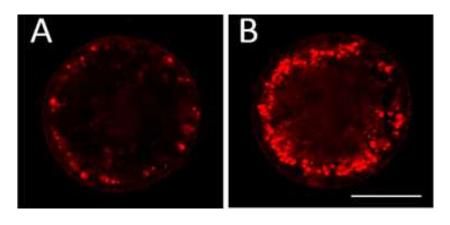


図 10. Ban 種(A)と Landrace 種(B)未成熟卵の、赤道部横断面での細胞内脂肪の分布。 ナイルレッドで染色をして共焦点レーザー顕微鏡で観察した。スケールバー = 50 μm.

平成29年度までに、ベトナム在来豚の体外胚生産について、P0で設定されたすべての目標を達成した。平成30年度は、ベトナム在来豚の卵ならびに胚の超低温保存を実施した。1)Ban種の卵、受精卵のガラス化冷却保存と、それらを使った胚の生産

Ban 種豚の未成熟卵に対するマイクロドロップによるガラス化冷却法をベトナム国立畜産研究所において実施した。ガラス化冷却・加温後の生存卵を、平成 29 年度に実施し得られた結果から上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF)を添加した Porcine Oocyte Medium (POM) [®]培養液にて体外成熟 (in vitro maturation; IVM) を行った。その後、成熟した卵を Ban 種雄豚から作製した凍結保存・融解後の精巣上体精子で体外受精し (Day 0)、続けて 7 日間 PZM5 培養液 (5 日目からは 10%血清を添加)で培養を行った。加温後の Ban 種ならびに Landrace × Landrace 種 (西洋種)の卵の生存率 (それぞれ、93.1 ± 3.4%ならびに 70.7 ± 16.7%)、ならびに体外成熟培養後の核成熟率 (それぞれ、80.4 ± 5.1%ならびに 90.0 ± 1.3%) は有意差がなかった (p > 0.05)。同様に、体外培養を継続して実施した場合、卵割率

(それぞれ、30.8 ± 7.8%ならびに 10.3 ± 6.1%)、ならびに胚盤胞発生率(それぞれ、9.4 ± 5.0% vs. 0.79 ± 0.79%)には有意差がなかった(p > 0.05)。以上の結果より、Ban 種の未成熟卵はガラス化冷却の後でも高い生存率と成熟率を示し、Landrace×Landrace(西洋種)と遜色がないことが明らかとなった。在来豚において、ガラス化冷却保存を行った卵から高品質胚盤胞を得られた初の報告である(図 11)。

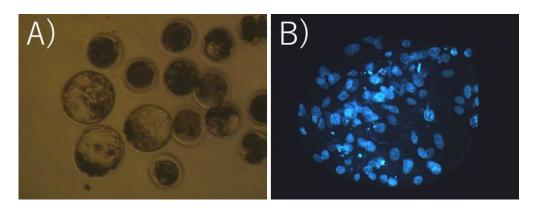


図 11. 未成熟段階でガラス化冷却保存した卵から作製した Day 6 の Ban 種胚(=胚盤胞)(A)。Day 7 における高品質胚盤胞の例、Hoechst 33342 により核を染色した(B)。

本 SATREPS プロジェクトにおいて実施された、Ban 種卵のガラス化冷却に関するこれらの 実験結果は、本年査読有りの雑誌にて出版された(Somfai et al., 2019 Anim Sci J. 2019 Apr 22. doi: 10.1111/asj.13209.)。

さらに、体外成熟と体外受精(非ガラス化のもの)を行って作製した受精卵のいくつかを、昨年度(平成 29 年度)にガラス化冷却保存をおこなった。これらの受精卵を加温して、生存率と発生能を検討したところ、計 223 のガラス化冷却受精卵から 201 個が生存し(92.3 ± 2.3%)、うち 23 個が体外で胚盤胞に発生した(11.9 ± 5.3%)。

これらの活動の結果、Plan of Operation で計画設定した全ての活動について完結できたと考えられる。

2) ガラス化冷却卵におけるアポトーシス現象の解析

ガラス化冷却が卵のその後の生存や胚盤胞期への発生能を低下させることが広く知られている。将来的には、ガラス化冷却卵からの胚発生の改善のためには、発生能を低下させる原因を明らかにする必要がある。候補となる要因の一つとして、ガラス化冷却がアポトーシス現象の引き金となり、結果として胚発生が悪くなることが考えられている。そこで、DNA断片化については TUNEL 染色にて、 カスパーゼ活性については CaspACE[™] FITC-VAD-FMK アッセイキットにて、ホスファチジルセリンの(細胞膜での)露出についてはアネキシン-V 結合アッセイにて、前アポトーシス状態の Bax や CASP3 遺伝子発現についてはmRNA レベルで検出するため RT-qPCR にて、ガラス化冷却卵ならびに体外受精(in vitro fertilization; IVF)後の卵割期の胚についてアッセイを行った。DNA 断片化ならびにカスパーゼ活性については、ガラス化冷却卵、ガラス化冷却を行わない卵ならびに継続培養した胚の間で、有意差がなかった(図 12)。

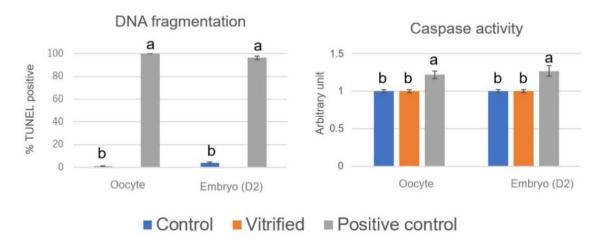


図12. M-II 期卵(IVM後の成熟卵)ならびに IVM、IVF ならびに IVC後の Day 2の初期胚 (卵割胚)におけるアポトーシスマーカー(DNA断片化ならびにカスパーゼ活性)の解析 結果。解析した卵は、GV期にガラス化冷却した卵(Vitrified)、しない卵(Control)を解析に用いた。また、Positive controlとして、Control区から任意に卵を選び、DNase (DNA断片化)ならびにスタウロスポリン(カスパーゼ活性)処理をした卵を用いた。

同様に、ホスファチジルセリンの露出や、前アポトーシス状態に関するmRNA レベルで検出について、IVM 後の卵ならびに初期胚の段階で、ガラス化冷却区と非ガラス化冷却区の間に有意な差がなかった。したがって、これらの結果より、ブタ GV 期卵のガラス化冷却はその後の卵もしくは胚におけるアポトーシスの発生機序の引き金を引くことはないと結論づけた。

3) ベトナム在来豚のクローン胚作製

昨年度は、ベトナム国立畜産研究所ならびにベトナム国立農業大学において、低 PERV コピー数を示す Ban 種豚から体細胞クローンによる胚の生産を行った。ベトナム国立畜産研究所は研究題目1で確認した低 PERV コピー数をしめす数頭の個体から5つの線維芽細胞系列を確立した。

- ベトナム国立農業大学では、卵の IVM の際にホルモン処理を最適化することで、クローン胚盤胞の作製効率を最大化させることを目標にした。異なる 2 つのホルモン処理ならびに 2 つの異なる培養液(TCM199 ならびに POM)にて比較したところ、胚盤胞作製率に差がなかった。この結果より、コストを抑えるため、ホルモンとして PMSG ならびに hCG を IVM の前半(0−22 時間)に加え、EGF を添加しない TCM199 を使用するという簡便な手法が推奨された。
- ベトナム国立畜産研究所では、胚の培養液を最適化してクローン胚盤胞の作製効率を最大化させることを目標にした。PZM3 は血清の添加の有無にかかわらず、NCSU-37 に比べて胚盤胞率が高いという結果が得られた。この結果より、胚の培養液として、血清無添加の PZM3 が推奨された。

なお、ドナーの線維芽細胞とクローン胚の PERV のコピー数の比較については継続して実施している。

4) 産子作製のためのベトナム在来豚の体外生産胚の移植

これまでに、計 292 個の Ban 種の体外生産受精卵(ベトナム国立畜産研究所で 16 個ならびにベトナム国立農業大学では 123 個)を、2 回の移植実験の機会を得て計 4 頭の Landrace 種のレシーピエントに移植した。 現在のところ、残念ながら妊娠維持は確認されていない。その理由は不明だが、レシーピエントの性周期同調のためのホルモン処理に対する反応性

が悪い、または吸入麻酔器が使えなかったため注射麻酔によることによるレシーピエントの状態の不安定性、等が上げられる。来年度は、新規に導入した吸入麻酔システムを用い、 移植実験を繰り返し、産子作製を目指す。

令和元年度は、胚移植実験を継続しておこなっている。計 6 回を実施したが、出産に至っていない。現在、最終移植実験の結果待ちである。

②研究題目2のカウンターパートへの技術移転の状況

平成27年度は、体外胚生産に関するトレーニングを現地(ベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所)で行った。このトレーニングは若手研究員ならびに学生・大学院生を対象として、同機関をはじめベトナム国立畜産研究所とベトナム国立農業大学より、計15名が参加した。また、ベトナム国立畜産研究所の若手研究員を2月から1ヶ月間、短期研修生として招へいし体外胚生産に関する共同研究を実施した。

平成28年度は、「超低温保存」研究分野でベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所より短期研修生1名を1ヶ月間招へいし、共同研究を行った。また、ソムファイリーダーを専門家として4回ほど派遣し、現地でトレーニングを実施することで、これらの研究を実施した。

平成30年度は、ベトナム在来豚の生殖細胞(精子や卵)を用いた体外胚生産技術、未成熟卵や未受精卵の超低温保存技術、さらにはそれらを胚移植して個体生産を可能とする技術の確立を目指した。

平成30年度までに日越で共同実験を繰り返しており、これらを通じて技術移転が完了している。また、胚生産や超低温保存、胚移植に関するプロトコールについては最終版確定の作業を行っている。

③研究題目2の当初計画では想定されていなかった新たな展開期間を通じて特になし。

④研究題目2の研究のねらい(参考)

平成27年度は、ベトナム在来豚における未受精卵子ならびに初期胚(精子と卵子を体外受精させて一定期間培養した体外生産胚を想定する)の超低温保存法の確立を目的とした。また、凍結バンクにおいては精子と卵子を別個に保存して必要時にそれぞれを融解・加温することで、目的の形質を持ったものから胚を作出し、次世代の育種・系統造成を可能にする。したがって、本研究においては超低温保存法確立と同時に、ベトナム在来豚において体外で胚を生産するシステムを開発する。本年度は、短期研修生を招へいした。また、ソムファイリーダーを専門家として派遣し、現地でトレーニングを実施することで、これらの研究を実施した。なお、PERV 低コピー豚生産に関する研究は平成28年度より実施するため、本年度は実施しなかった。

平成28年度は、ベトナム在来豚における未受精卵ならびに初期胚(精子と卵を体外受精させて一定期間培養した体外生産胚を想定する)の超低温保存法の確立を目的とした。

平成29年度以降では、超低温保存した未受精卵ならびに初期胚から高品質な胚を回収し、 可能な限り胚移植を行い、産子作製を目指す。

⑤研究題目2の研究実施方法(参考)

凍結バンクにおいては精子と卵を別個に保存して必要時にそれぞれを融解・加温することで、目的の形質をもったものから胚を作出することで、次世代の育種・系統造成を可能にする。したがって、本研究においては超低温保存法確立と同時に、ベトナム在来豚において体外で胚を生産するシステムを開発する。

胚生産や超低温保存、胚移植に関する実験では、日越共同で作成しているプロトコールにより実施した。

(4) 研究題目 3:「ベトナム在来豚由来体細胞クローン胚作製技術の開発と効率的胚移植 方法の確立」

クローン研究グループ(平成27年度は、徳島大グループ)(リーダー:音井 威重)

① 研究題目3の当初の計画(全体計画)に対する成果目標の達成状況とインパクト 平成27年度の結果として、ドナー細胞としてネコ由来繊維芽細胞を用い、除核ブタ卵母 細胞と融合後、50 nM TSAで24時間処理を行い、その後の異種間での体細胞クローン胚の発育能およびアセチル化状態について検討した。その結果、胚盤胞発生率は、TSA処理区(0.7%)、無処理区(8.0%)となり、アセチル化を示すH3k9値にも差が認められなかった(図13)。このことは、ウシ卵母細胞を用いた異種間での体細胞クローン胚に観察されるTSAの効果がブタにおいて認められず、TSA処理効果はレシーピエント卵子の品種間により異なることが示された。本研究により、在来種豚(体細胞)と西洋種豚(レシーピエント卵子)との組合せにおいて系統の異なる体細胞クローン技術への応用が期待できることが示唆された。今後、在来豚由来の体細胞についての評価と、TSAに代替する物質の検討も必要であることが判明した。

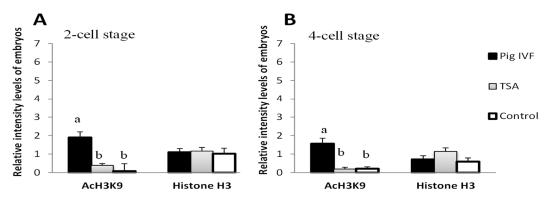


図 13. 異種間での体細胞クローン胚 (A:2 細胞期胚、B:4 細胞期胚) の AchH3k9 と histone H3 レベルにおける Trichostatin A (TSA) の処理効果 (異符号間に有意差あり、P<0.05)

平成 28 年度の成果として、短期研修生 2 名への技術移転の評価を行った。研修生 A による融合胚からの分割率はいずれの培養液 (NCSU37、SOF および PZM5) とも 57%~65%と有意な差はなく、また、胚盤胞発生率も 4.7%~8.4%と差はなかった(図 14)。一方、研修生 B による 2 種類の培養液 (NCSU37 および PZM5) の比較においても、同様に分割率および胚盤胞発生率とも差はなかった。このことから、研修生による体細胞クローン胚の作製が可能であることが示唆された。

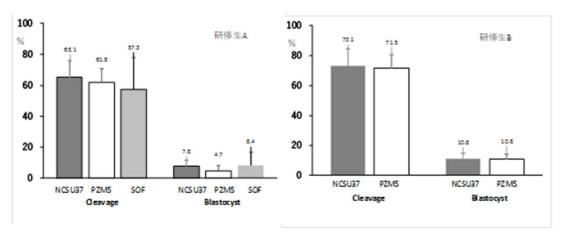


図14. 体細胞クローン胚の発育に及ぼす培養液の影響

また、現地でも体細胞クローン胚が作成可能になるように合成培地の検討を行った。その結果、体外受精胚に用いる NCSU37 培地でも市販の培養液と比較して胚の発育に差がないことを確認した。このことから、現地でも作製可能な NCSU37 培地を用いることにより、研修生による体細胞クローン胚の作製が可能であることが示唆された。

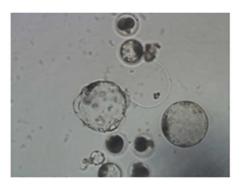


図 15. 在来種由来体細胞クローン胚

平成29年度は、短期研修生2名も帰国し、また機器の準備も整ったため、ベトナム在来 豚由来の体細胞クローン胚の作出を試みた。さらに、当研究室卒業生が帰国し、ベトナム国 立農業大学において機器の準備を含めた体細胞クローン胚(図15)の作出を行った。方法として、ベトナム在来種である Ban 種由来の凍結保存細胞を融解後培養し、その細胞を核として用いた。次に西洋種を主体とした卵巣由来の卵母細胞を除核し、Ban 種由来体細胞を顕微 挿入し融合後の発生能を2か所の研究所(ベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所ならびにベトナム国立畜産研究所)において比較した。その結果、ベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所においては、融合胚の分割率は70~77%、胚盤胞発生率は5~9%であった(図16)。一方、ベトナム国立畜産研究所において、融合胚の分割率は48~66%、胚盤胞発生率は4~11%であった。両研究所において、ベトナム在来豚由来の体細胞クローン胚の作出が可能であることが示された。一方、胚発育について比較すると、ベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所と比較してベトナム国立畜産研究所において、分割率および胚盤胞発生率ともに、ばらつきが認められた。なお、下図には示していないがベトナム国立農業大学においても約16%の胚盤胞発生率が得られた。

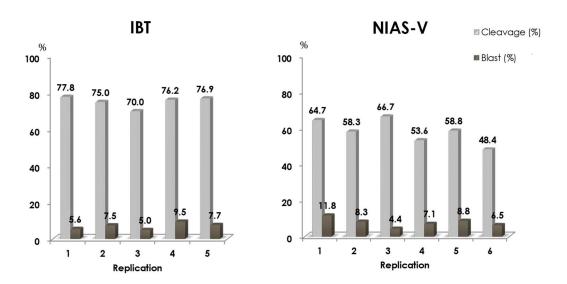


図 16. ベトナム在来 Ban 種由来体細胞を用いたクローン胚の発育 IBT: ベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所、NIAS-V: ベトナム国立畜産研究所

上記のように、3か所の研究所・大学において、ベトナム在来豚由来の体細胞クローン胚の作出が可能であることが確認された。

平成30年度は、ベトナム在来豚由来のドナー細胞でクローン胚の発育能が低い場合を想定し、ドナー細胞として異種であるゾウ由来線維芽細胞を用い、除核ブタ卵母細胞と融合後、異種間での体細胞クローン胚の発育能を検討した。その結果、胚盤胞発生率は、ブタ体細胞由来胚が5.9%、ゾウ体細胞由来胚が4.5%となり差のないことが示された。しかし、発生したゾウ体細胞由来クローン胚において3領域の種特異的プライマーによりPCR解析した結果、ゾウ体細胞由来クローン胚の作出成功例を確認したが(図17)、22例中1例のみ陽性であり、そのほとんどが単為発生胚であることが疑われた。そのため、令和元年度に、除核方法を含め手技の再検討を行った。

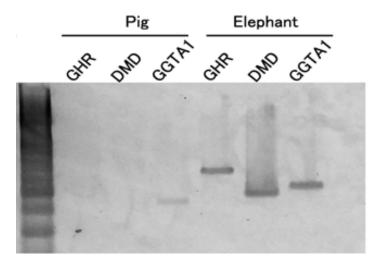


図 17. 除核ブタ卵母細胞とゾウ体細胞を融合後に発育した胚盤胞胚の PCR 解析

さらに、PERV コピー数の低いベトナム在来豚由来の体外受精卵から PERV 不活化受精卵を作成する方法として、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法を検討した。体外受精開始後 13 時間目にエレクトロポレーション法により PERV Pol 遺伝子の標的部位の異なる 5 種類のガイド RNA(gRNA)を用いゲノム編集を行った。ゲノム編集後の胚発育および変異効率を遺伝子解析により比較した。その結果、標的部位により胚発生率が低下することが判明し、さらに発生率の低い gRNA 群は、逆に変異効率が高い値を示した(図 18)。このことから、Pol 遺伝子の一部は胚発生と関連していることが示唆された。

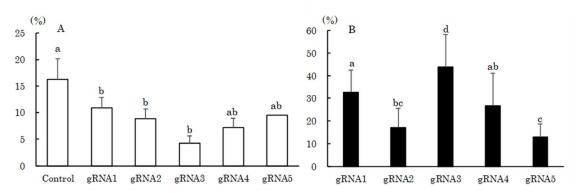


図 18. エレクトロポレーション法による PERV Pol 遺伝子標的部位の異なる gRNA によるゲノム編集後の胚発育 (A、42 個~101 個の受精胚)と変異効率 (B) の比較。変異効率は 2 細胞~8 細胞期の変異胚 (8 個~10 個) における欠失率を示す。

② 研究題目3のカウンターパートへの技術移転の状況

体細胞クローン作製に必要なベトナム側の機器整備を行い(平成28年度完了)、クローニング操作分野では短期研修員(2名・各5ヶ月)の受け入れにより体細胞クローン技術を教授し、本邦の在来豚ならびにベトナムの在来豚を用いた研究を行った。短期研修生2名は目標どおりクローン技術の移転を達成したほか、両名とも、ベトナム在来豚由来の体細胞クローン胚の作出に成功した。

平成29年4月2日からJICAの長期研修員(大学院生)(ベトナム国立農業大学から、3年間・1名)を受け入れ、クローン技術の移転を行っているほか、「Cas9/sgRNA 電気穿孔法による遺伝子改変豚の作出」のタイトルで学位取得のための指導を行っている(令和2年3月修了)。さらに、ベトナム国立農業大学出身の当研究室卒業生が帰国して本事業に参加し、ベトナム在来豚由来の体細胞クローン胚の作出に成功した。

平成30年度から、新たにベトナム国立畜産研究所から大学院生1名(徳島大学同窓会奨学金)を受け入れ、顕微操作およびDNA解析について指導した。

③ 研究題目3の当初計画では想定されていなかった新たな展開期間を通じて特になし。

④ 研究題目3の研究のねらい (参考)

平成27年度は、ベトナム在来豚由来の体細胞クローン胚の作出率の向上、安定化を図る目的で、核移植前後の処理について検討し、体外発生能が低いドナー細胞由来クローン胚の胚盤胞発生能の改善を図った。また、ウシ体細胞核移植において有用である卵活性化開始後のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤Trichostatin A (TSA)等の培地添加を通じて、アセチル化状態の評価を行った。

平成28年度は、クローン胚の培養液について、現地でも作成可能な合成培地(NCSU37およびSOF)と市販(PZM5)の培地を技術習得した研修生2名により検討した。

平成29年度は、ベトナム国立畜産研究所およびベトナム科学技術アカデミー生物工学研究所、およびベトナム国立農業大学にて在来種由来の体細胞を用いた体細胞クローン胚の

作製を行った。

平成30年度は、ベトナム在来豚由来のドナー細胞でクローン胚の発育能が低い場合を想定し、ドナー細胞として異種であるゾウ由来線維芽細胞を用い、異種間での体細胞クローン胚の発育能を検討した。さらに、PERVコピー数の低いベトナム在来豚由来の体外受精卵から PERV 不活化受精卵を作成する方法として、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集法を検討した。

⑤ 研究題目3の研究実施方法 (参考)

保存した細胞等の遺伝資源を再生・活用する方法として体細胞クローン技術がある。本研究では、凍結保存した細胞を活用した体細胞クローン技術について、ベトナム在来希少品種に応用することによって、効率的な希少品種豚再生システムを共同開発する。また、作出した体外受精・クローン胚の効率的な胚移植法についてベトナム在来品種にも適応できる技術を確立する。

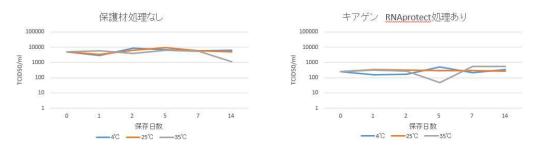
(5) 研究題目4:「ベトナム在来豚農家における疾病調査」 疾病対策研究グループ(平成27年度は、動衛研グループ)(リーダー:大崎慎人)

①研究題目4の当初の計画(全体計画)に対する成果目標の達成状況とインパクト

平成27年度は、研究題目5の早期離乳予備試験の対象農家4軒(Hoa Binh省Da Bac地区)において耳票による個体管理を導入し、機能することを確認した。また、予備試験対象農家及びその周辺農家(いずれもHoa Binh省Da Bac地区)において3ヶ月に一度を目安に定期採材を行い、疾病モニタリング予備調査を開始した。さらに出荷サイズの豚を購入し解剖・採材することで疾病調査を開始した。

平成28年度は、以下の活動を行った。

- 1) 研究題目 5 と共同して、Hoa Binh省 Da Bac 地区において在来豚 (Man 種) を飼育する小規模養豚農家に聞き取り調査を行い、疾病発生状況を含めた大まかな衛生状況の調査を行い、モデル農家 15 戸を選定した。モデル農家を含む調査対象農家の絞り込みを行った。また、疾病モニタリングを開始した。
- 2) ベトナムにおける疾病調査のための検体輸送・処理方法の最適化を行った。対象とする疾病病原体は RNA ウイルスが多いため、PRRS ウイルスを含む実験感染豚の血液検体を用いて、RNA 保護材添加の有無、検体保存温度がリアルタイム PCR によるウイルス RNA 検出に及ぼす影響を検討した。その結果、EDTA 血検体であれば、RNA 保護材の添加は必要なく、輸送温度にかかわらず 7 日間まで良好な RNA 検出が可能であることが判明し、採材後の現地での検体処理を行わなくとも良好な状態で検体をハノイの検査ラボに輸送できることが明らかになった(図 19)。



PRRSV ベトナム株感染14日目の豚から採血し(EDTA血)、リアルタイムPCRによるPRRSV RNA量を測定

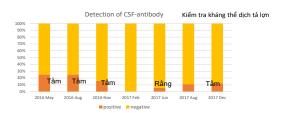
図 19. EDTA 血検体中の PRRS ウイルス RNA 保存試験

RNA 保護材添加は必要なく、保存温度に関わらず7日間まで安定に検体を保存できることが判明した。

3) Hoa Binh 省 Da Bac 地区における養豚農家 1 戸あたりの飼養頭数は少ないため、疾病調査を行う対象をモデル農家から周辺の地域に変更し、年 4 回の定期採材を開始し、一回当たり約 20 頭の豚から血液・糞便検体及びワクチン歴・農家での病豚情報等の疫学情報を収集した。また定期採材時に病豚 1 頭を購入し、現地で解剖・採材し病性鑑定を実施した。

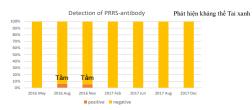
平成 29 年度の成果としては、4 種類の対象疾病(CSF、FMD、PRRS、PCV2)について年 4 回 2 年間の疾病モニタリング (血清サーベイ) の結果が得られた (図 20)。本モニタリングはモデル農家がある Da Bac 地区山岳地帯 Cao Son コミューンの Rang 村及び Tam 村で実施し、野外感染抗体を検出する目的でワクチン未接種豚を飼養する農家 10 軒から各 2 頭を目安に採材した (モデル農家はワクチン接種しているため採材していない)。その結果、陽性率は CSF (5.5%)、FMD (0%),PRRS (2.1%)、PCV2 (56.0%) となり、日本でも多くの豚が不顕性感染している PCV2 は半数以上の豚が感染しているが特に症状を示していないこと、一方致死的な症状を示す重要な疾病である CSF については散発的な感染がありワクチン接種が強く勧められること、口蹄疫と PRRS については問題となっていないことが明らかとなった。

Results of Serosurvey in CaoSon commune (Tam and Rang villege) Classical Swine Fever (CSF) Dich tả lơn



- Sporadic occurance of Classical Swine Fever in the area
 Vaccination is strongly recommended for all pigs

PRRS Tai xanh



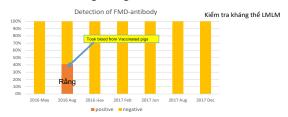
- Rare occurance of infection and not spread in herds PRRS can be considered as not so dangerous disease for native pigs in the area Benefit/Cost for vaccination is considered to be not high for those pigs





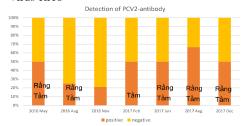


Foot-and-Mouth Diseases Lở mồm long móng



- · No antibody was detected except Vaccine-antibody in Aug 2016
- Vaccination should be done as per regulation of Authorit

Porcine Circo Virus type 2 Virus circo



- Arround 28% of pigs are infected with PCV2 with no symptoms
 Productivity-Loss by PCV2 infection is not clear



図 20. 各種疾病原因ウイルスの血清サーベイ

これらの成績について、29年8月に実施した Training on Trainers で Da bac 地区の獣 医系スタッフに紹介し、推奨される衛生対策について指導を行った。今後は CSF について病 原体遺伝子を検出し、病原体の Circulation について解析を行う予定である。

また、当初平成30~31年度に実施を予定していた「4-4生産性阻害要因のリスク分析」 については、得られた研究成果を社会実装させる道筋を明確にするため「4-4 在来豚に最適 化した飼養管理システムの構築とマニュアル化」に変更し、研究題目5と共同してCao Son コミューンにおける疾病対策に最適化したワクチンプログラムを策定しマニュアルに反映 する。また、研究題目1と共同してPERV低コピー豚の育種を実施しているThai Nguyen省 施設を輸出検疫施設の候補とし、施設の改修・飼養管理マニュアルの改訂を行い衛生管理体 制の構築を行う予定である。

平成 30 年度の成果として、Hoa Binh省 Da Bac 地区 Cao Son コミューンにおける小規模 養豚農家(モデル農家及び試験農家 15 戸)での聞き取り調査をもとに疾病発生を含めたおお まかな衛生状態の把握を行い、同じ集落の小規模農家(ワクチン未使用農家)を対象に年4回 の血清調査を行った(2015年8月~2018年8月の3年間)。4種類のウイルス性疾病(口蹄

疫、豚熱、PRRS、PCV2)の血清検査を行った結果、Cao Son コミューンにおける小規模農家では口蹄疫または PRRS の感染は認められないものの、豚熱の感染は散発的に起きていることを明らかにした。なお、豚熱の抗体陽性豚の割合は 2015 年 36%、2016 年 26%、2017 年 7% および 2018 年 3%と年々低下しており、プロジェクトで実施しているモデル農家へのワクチン接種をはじめとする飼養衛生管理指導との直接の因果関係はわからないが、地域でのウイルス循環が低下していることが示唆された。

また、地域でのウイルスの循環を推定するために、自家消費された豚の扁桃を20検体収集し遺伝子検査を実施したが、これまで豚熱ウイルス遺伝子は検出されていない(図21)。

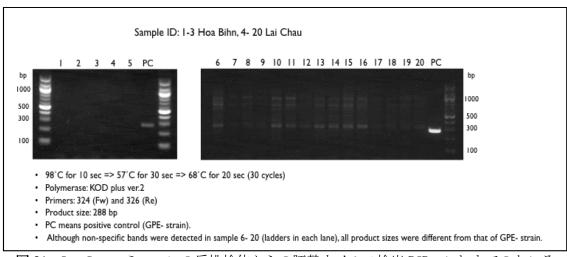


図 21. Cao Son コミューンの扁桃検体からの豚熱ウイルス検出 PCR。これまでのところ遺伝子は検出されていない

さらに、ベトナム国立畜産研究所 Thai Nguyen 省施設においてゲノム中の PERV コピー数を低減させるために育種している Ban 種について、将来的な輸出に向け隔離飼育により高いバイオセキュリティレベルを保つために研究題目 1 と共同して飼養管理マニュアルの改定を行い、年 4 回の抗体検査によるモニタリングを継続すると共に施設周辺地域の小規模農家の衛生実態を把握するため抗体調査を行った(図 22)。



図 22. ベトナム国立畜産研究所 Thai Nguyen 省施設における PERV 低コピー豚育種のための隔離飼育

②研究題目4のカウンターパートへの技術移転の状況

平成28年度にカウンターパート研究者3名を日本に招聘し、疾病診断法に関する短期研修を実施した。平成28年度は、感染症診断分野としてベトナムから短期研究員(3名・各1か月)を受け入れ、ウイルス学、病理学、寄生虫学的診断法の研修を行った。

平成29年8月にベトナム国立農業大学における検査ラボのセットアップが完了し、ハンズオントレーニングを2回実施した結果、カウンターパートが血清検査を自律的に実施可能となった。

平成30年度は、豚熱の遺伝子検査についてベトナム国立農業大学のカウンターパートと 共同で実施した。また、免疫組織染色についてハンズオントレーニングを実施し、体系的な 条件検討を行うためのプロトコールを作成した。

③研究題目4の当初計画では想定されていなかった新たな展開

Hoa Binh省において在来豚は生体でレストラン等へ売買され、と畜場へ出荷することは少ないことが判明したため、平成29年度開始予定のと畜場における疾病調査は平成30年度以降に先送りし、平成29年度は農家における病豚・死亡豚発生時に材料を収集する体制の構築を行うこととした。平成28年度に予定していた供与機材の到着が遅れたため、平成29年度に検査対象を主要な4疾病(口蹄疫、豚熱、PRRS、PCV2)に絞ってベトナム国立農業大学のラボのセットアップを行い、疾病検査体制の構築を行った。

平成30年度は特になし。

平成31年2月にベトナムで初めてのアフリカ豚熱の発生が報告され、その後発生はベトナム全土に広がりつつある。令和元年度については、予定している採材についてアフリカ豚

熱発生地域への立ち入り制限、ベトナム国立畜産研究所 Thai Nguyen 省施設で飼養する PERV 低コピー豚の飼育のためのバイオセキュリティ対策の大幅な引き上げ等を行った。

④研究題目4の研究のねらい (参考)

ベトナムにおいて西洋種を飼育する養豚農家の衛生調査は行われているものの、粗放型 飼育が主体となる在来豚農家の衛生状態についての知見は少ない。本題目では、ベトナム在 来豚農家における疾病調査を行い、生産性阻害要因の抽出を行うことで、衛生状態改善のた めの提言の基礎となる科学的根拠を得ることを目的とする。

⑤研究題目4の研究実施方法(参考)

モデル農家において、個体管理に基づく日齢別の疾病・死亡原因調査を行い、生産性阻害要因を検索する。平成27年度は研究題目5の試験農場及びその周辺農家で飼養する在来豚を対象に、疾病調査方法のセットアップを行った。

平成28年からはモデル農家において、個体管理に基づく日齢別の疾病・死亡原因調査を 行い、大まかな生産性阻害要因を検索する。

(6) 研究題目 5:「ベトナム在来豚農家における生産性向上のための飼養管理技術の最適化」

飼養管理研究グループ(平成 27 年度は、伊藤忠グループ)(リーダー:高橋義典)

① 研究題目5の当初の計画(全体計画)に対する成果目標の達成状況とインパクト 平成27年度の成果として、モデル農家の一つであるTien農場では、母豚死亡というアクシデントの結果ではあるものの1か月離乳が行われた。この離乳子豚を2群に分け、一方に子豚用市販飼料(一般に欧米種の豚に使われ、在来種では使わない)を(試験群)、他方に在来豚に対する慣行飼料を給与(対照群)して比較した。その結果の子豚の体重変化グラフを図23に示す。この中で水色の折れ線グラフは試験区の平均体重の変化を、茶色は対照区のそれを示した。さらに分娩時から慣行飼育が行われたHiep農場の子豚の平均体重のカーブを併せて示した。ここに示すように子豚用市販飼料の給与は慣行飼育に比べはるかに増体速度が速くなることが示され、その体重差は約60日齢以降2倍以上になった。写真(図24)は65日齢の試験群(左)と対照群(右)を示したもので外観的にも明確な差として認めることができた。以上のことからベトナム在来豚においても1か月に近い日齢で離乳が可能で、子豚に対して植物茎葉を主体とした慣行飼料に比較して、子豚用市販飼料を給与する方がはるかに発育が速いことが示された。

子豚への飼料は、離乳前では母乳が主体飼料であることは明らかで、この母乳を多く哺育させるには母豚の泌乳量を増加させることが理に適っている。そこで、授乳母豚に対する給与飼料を植物茎葉主体の慣行飼料に変えて自給穀実に市販サプリメント飼料を混合した飼料を量的にも多く給与した。この試験は当初2か月齢離乳の可能性を探る狙いであったが、実際には約1か月齢で自然に離乳してしまった。このことは哺乳中に十分な泌乳量があっため子豚の発育速度が速く、1か月齢に達する前から母乳以外の固形飼料の摂取が始まり1か月齢時点で母乳が不要となる状態となったものと推察される。子豚の個体別発育カーブをグラフ(図25)に示した。比較対照として前記試験の子豚発育カーブを併せて示した。ここに示すように母豚への飼料給与強化によって哺乳子豚の発育が極めて早まることが示された。さらに母豚は離乳後7日で発情再帰を認めた。すなわち、母豚への飼料給与強化は哺育子豚の発育改善のみならず母豚の繁殖効率改善にも寄与することが認められた。

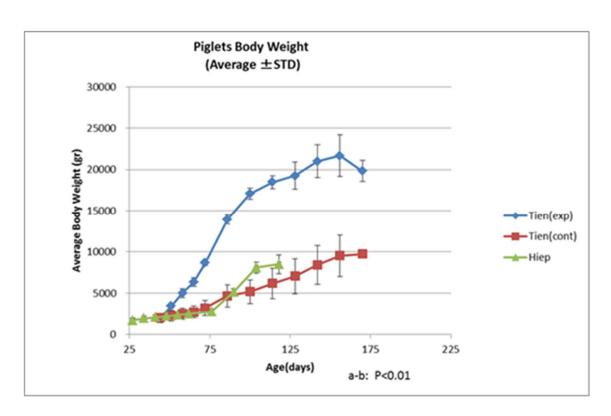


図23. 給与飼料の違いによる子豚の体重変化



図 24. 給与飼料により飼養された豚群 (左: 試験群、右: 対照群)

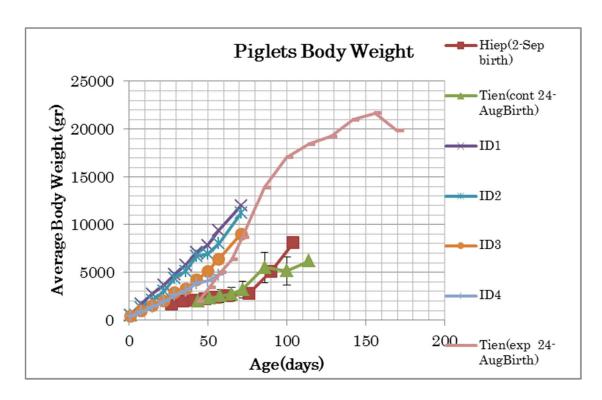


図25. 子豚の個体別の発育カーブ

平成 28 年度の成果として、前年度選定されたモデル農場 15 農家に対し下記技術の定着 を目標に、個別指導、研修会を実施した(図 26)。そのテーマは、1) 授乳期母豚への栄養強 化、2) 分娩房飼育環境整備による子豚発育の改善ならびに3) 1ヶ月早期離乳による繁殖 効率の改善であった。なお、具体的活動として、1)については、母豚へのサプリメントの給 与状況や保育箱の使用状況など、実施率にバラツキが認められる。そこで、在来豚に給与さ れている植物茎葉を中心にした粥状の慣行飼料では明らかに不足しているという観点から、 現地で容易に入手しうるトウモロコシと米ぬかをベースに、さらに蛋白源として市販のサ プリメント飼料を農家の庭先で配合して給与した。これは分娩から離乳までの限定した期 間のみとすることで持続可能な短期間の栄養強化法となり、農家の出費負担にも考慮して 設計し給与した。具体的なデータは集計中であるが、改善が認められている。次年度以降、 個別指導の中で継続して説明し改善を目指す。2)については、子豚専用の哺育箱を供与して 子豚の介護をより綿密にするよう指導した。これにより、子豚にとってより至適温度が確保 でき、必要に応じて加温も可能な「寝床」を提供することが可能である。時として発生する 母豚による子豚の踏み付け事故「圧死」が軽減できる。離乳間近になった子豚に離乳食に相 当する飼料をこの箱内で給与することで母豚に横取りされることなく給与できるメリット がある。さらに、水分摂取については、粥状の飼料のみではなく、飲水装置の導入の可能性 も検討した。3)これらの活動を通じて繁殖効率の向上を目指した。



図 26. Hoa Binh 省 Da Bac 地区における農家を対象とした研修会の風景

平成 29 年度の成果として、前年度のモデル農家 15 戸に対する技術指導はそれまで集団 的に行ってきたことからその理解度や実施状況にばらつきがあることが判明し、平成 29 年 度はより農家との密着度を高めて個別指導を重点的に行うこととした。そのために、15 農 家を全て巡回指導する企画を行った。この中で繁殖記録をしっかりできるようにするため のツールとして繁殖カレンダーを作成して配布した。このカレンダーは、カレンダー本体の ほかに技術的なワンポイントアドバイスを付け加えて理解度を深めるツールとなるよう工 夫した。これまで在来豚の飼育管理において哺育箱の普及が不十分な理由として、豚をほぼ 放牧的に自由行動をさせ、直接的に接触して介護をする習慣がなかったことがあげられる。 すなわち、「飼育管理」する意識が低いように思われる。分娩時の介護の良否は育成率に大 きく影響する。そのためには母豚が人に管理されることに慣れること、人が良好な管理をす ることで一頭でも多く生産できることを知り、そのことを習慣づける必要がある。そのため には分娩時に母豚を分娩枠内に留めて管理することが西洋豚では一般化している。この手 法をベトナム在来豚にも導入すべく、安上がりで農家でも手作り可能な竹製分娩枠の試作 および試用を行っている。また、プロジェクト終了後にも指導した技術が定着するためには 持続可能な仕組みに組み立てなければならない。この観点から市販サプリメント飼料から 農家が最も入手しやすい米ぬかを中心とした飼料設計を行い、その効果を検証する試験を 予定している。また、農家の指導的役割を持つ Hoa Binh 省の職員に対するトレーニング (TOT)を開始した。これらの活動の結果、平成28年の試験開始から平成30年3月時点まで に分娩した母豚の実績値では、飼養技術の導入前に比較し、分娩間隔は 228 日から 175 日 と約50日間短縮させることができた。このことは年間の分娩回数が1.6回から2.1回に 0.5回増加したことになり、これに分娩1回あたりの離乳子豚数を掛け合わせると年間1母 豚当たりの離乳子豚数が約10頭から15頭へと増加できることを実証した(表6)。さらに、 本技術を持続的に維持発展させるため、モデル農家を集めての研修、各モデル農家への巡回 指導、さらに Hoa Binh 省(Sub DAH 職員 2 名)、人工授精センター (職員 2 名)、Da Bac 地区 (各コミューン獣医業従事者計 19 名、人民委員会 1 名、獣医ステーション 2 名)および Cao Son 地区 (職員1名) からの指導者(総計27名)に対する研修 Training on Trainers (TOT) を実施した。モデル農家への巡回指導時には Hoa Binh 省および Da Bac 地区の指導者も同 行し、同行者に対するトレーニングを TOT として合わせて実施した。

表 6 Hoa	Rinh 省 Can	Son 地区の年間 1	丹阪当たりの離到	子豚数(平成 28~30 年)
77 0. 000		2011 NRIV A 2 181 1		

2 0. Hoa Dilli 🗎 Cao	, pour *EE 57 4	1H1 T H->///\	コイニーフマン内に	10 1 11/1/30 (1	177 20	30 -7/
Aggregate ave						
	Delivery Interval (days) Delivery Number of piglets (NP=Neonatal piglets, WP=weaned piglets)			numl annua	nated ber of Il piglet sow	
Data from May2016	-March2018 d	delivery				
			NP	WP	NP	WP
Tam village	177.50	2.06	7.67	6.69	15.78	13.77
Rang village	172.72	2.11	8.81	7.59	18.62	16.05
Cao Son commune 175.47		2.08	8.20	7.15	17.05	14.87
Data from Data cen	bh(2015)					
Aggregated data	228.22	1.60	6.76	6.27	10.81	10.03

前年度までの成果をうけて、平成29年から30年度にかけてカウンターパートであるHoa Binh省 Sub-DAHは、この技術をさらに普及させるために新たに5コミューンを選定、各コ ミューンから 15 農家、合計 75 農家を選定した。この際、それまで技術普及に努めてきた Cao Son コミューンも技術定着を目的に継続して普及活動に加えることになった。したがっ て、合計 90 農家を対象とした技術普及活動を行うことになった。Cao Son コミューンでは 農家訪問、巡回指導を中心とした個別指導であったが、指導対象農家数が増加したため、よ り効率的な指導方法が必要となってきた。生産状況を集約的に収集する方法として各繁殖 母豚の生産記録を農家に記帳させるための「母豚カード」の各農家への配布とスマートフォ ンの写真撮影機能、送信機能を活用したシステムを開発した。すなわち、各コミューンに配 置されているパラベットには、農家に対する生産記録方法の指導と月次にスマートフォン を用いてカードの写真撮影と Da Bac 地区獣医センターへの送信を課し、受信した獣医セン ターではこれを PC の生産記録ファイルに入力、更には日本を含めた関係機関へファイルを 送信することにより農場生産状況の月次での把握が図れるシステムを開発し運用を始めた。 運用開始後約半年間、システムの運用状況を経過観察したが、それまでの現地レポートでは 翻訳作業などでかなり遅れが生じていたが、新システム運用後は月初の数日以内にファイ ルが送信されるようになった(図 27)。農家指導はこのシステムを活用することで遠隔地か らでも可能となり、現地指導でも農家ごとの問題点も事前に把握できるようになったこと から、より効率的な指導が可能となった。



豚舎入口の消毒実習②



入力されたPCファイルデータから得られる情報から農家の生産状況をパラベットと討議、農家指導に活かす。



Muong Chieng コミューン集会所での農家研修

図27. 新たな75農家での実習。PCデータを利用した指導

平成30年度は前年度までの継続としてCao Sonコミューンのモデル農家を対象とした研修会を2回(4、11月)、Hoa Binh省のパラベットを対象とした指導者研修(TOT)を2回(6、10月)実施した。新たな5コミューンについては巡回指導を4回(8、10、11ならびに1月)実施した。また、コミューンごとにモデル農家を集合させた研修を1回(2月)実施した。この研修では基本的に午前中座学、午後実習とした。この時期はベトナムにアフリカ豚熱の侵入が認められ、特に午後の実習では、農場への疾病侵入防止に向けた農場出入り口周辺の消毒方法の実習を行った。実質的には新5コミューンに対する系統だった新技術の解説は初めての機会であった。このため、令和元年5月段階では新規の5コミューンのモデル農家の生産性の向上には至っていない。本年度(平成30年度)に農家およびパラベットを対象とした教育訓練用資料の編集作業を合わせて実施した。次年度中に発行、配布する予定である。なお、Hoa Binh省としては新技術の普及に伴った増産が期待できるため、ベトナム在来豚の飼育密度が比較的高いDa Bac 地区のこれらモデル農家を中心に在来豚肉の銘柄化を目指した生産組合を設立した。

平成30年度までに実施したCao Sonコミューンの15モデル農家の生産成績を新飼養技術導入前後で比較したところ下表に示すように大幅に改善することができた。ここに示すように、繁殖間隔は約2か月弱短縮され、年間分娩回数が0.53回、率にして33%、一母豚当たり年間子豚離乳頭数は4.12頭、39.9%増加させることができた(表7)。これは当初目標の一母豚当たり1頭を大幅に上回る結果となった。これを受けSub-DAH はこの技術のさらなる普及を目指して新たに5コミューンのモデル農家を選定し、普及指導活動を開始した。Sub-DAH では更にプロジェクト終了後のブランド化を目指しCao Sonを含むモデル農家90戸を設立者とした共同組合を設立した。この組合では、2か所(Cao Sonと Muong Chieng)にと畜場を建設することになった(2019年8月現在建設中)。計90戸の農家を効率的に指導するツールとして開発を試みたモニタリングデータ収集システムは、いくつかの問題(農家に生産記録をつける習慣がないこと、未だ陰暦が使われることが多く太陽暦と混乱が起きるなど)があるものの、月次レポートが短期間で送信され、ほぼリアルタイムで農家あるいは母豚状況が把握できるシステムが構築できたものと判断された(図28)。

表 7. プロジェクト前後における年間子豚離乳頭数の向上

				SATREPS	S Project	Impi	roved
Production Index				Before A	After B	Value	Rate(%)
Reproduction Interval of Sow(days)(c)				228.2	171	-57.2	-25.1
Deliver	y times	per ye	ar (365/C=D)	1.6	2.13	0.53	33.1
Numbe	er of wea	aned pi	glets per litter(E)	6.46	6.77	0.31	4.8
Number	of wean	ed pigle	ts per sow per year(D*E)	10.33	14.45	4.12	39.9
Piglet ı	mortality	y rate d	luring lactation (%)	12.27	5.88	-6.39	-52.1
Numbe	r of san	nple		166	26	_	_
	^A)HoaB	inh Pro	ductivity Census Data	in Deceml	ber 2015.		
	B)Weaned from Jan-17 to Aug in the SATREPS PJ						
Repro	duction	interv	al consists of pregnan	cy period(114days),		
	lactati	on per	iod and period from we	aning to n	ext matin	ıg.	

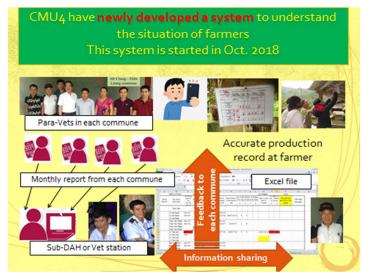
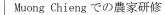


図28. スマートフォンを用いたモニタリングデータ収集システム

平成31年度(令和元年度)には新5コミューンのモデル農家に新飼養技術を実践的に理解 してもらうため、指導内容をマイナーチェンジした内容で研修することとした。このことは 今後農家を直接的に指導するパラベットにも理解しやすいものとなる。本年度は ASF の浸 潤も考慮して農家訪問を最小限に留める意味でも、パラベットへの指導は有効であったと 思われる。農家研修では個別のケーススタディーも行い、マイナーチェンジした内容も理解 し易かったものと思われる。令和元年8月の研修ではコミューンごとに7月~9月分娩予定 の母豚をモニタリングデータから抽出して新飼養技術を適用し、9月末にその結果を報告す るように指導した。9月末には新技術の目標である1カ月離乳の成否が少なくとも7、8月 分娩母豚に対しては判定できることになる。なお、この間に行った農家研修では Da Bac 地 区への ASF の浸潤を受け、石灰のより効果的な散布方法など防疫管理実習を実施した(図 29)。特にトレーニング教材に関してはほぼ編集が完了して配布部数、印刷などを詰め配布 体制が整った。Sub-DAH の責任者とプロジェクト後の体制について面談したところ、2019 年 8 月に開催された 10 か年国家プロジェクトの年次総会「10th Year Meeting of Rural Development for 14 Provinces (2009~2019)」で SATREPS プロジェクトの活動が紹介され たとのこと。このプロジェクトは新たな次の10か年のプロジェクト、農村地帯の生活の質 (QOL) に焦点を当てた国家プロジェクトに引き継がれることになっている。また、Hoa Binh 政府は、「National Program for Lake Tourism for Hoa Binh for 2020-2025」を承認した ところで、これとの共同事業としての潜在資源としての可能性があるとの話であった。





防疫実習デモ(Muong Chieng)



パラベットに対する個別指導

図 29. 指導内容をマイナーチェンジしたモデル農家向け飼養技術講習(令和元年度)

②研究題目5のカウンターパートへの技術移転の状況

平成 27 年度では、カウンターパートへの技術移転は平成 28 年度に実施予定のモデル農 家への展開の中で実施することになる。また、カウンターパートからの研修生への日本国内 での研修を平成 28 年 7 月に実施した。この研修において、日本での養豚技術研修(畜産現場とブランド化研修、6 名・各 1 ヶ月)などにより、繁殖におけるシステム管理の理解度は高まり農家レポートも定期的に届くようになった。しかしながら、その内容に関してはまだまだ不明な点も多く、今後完成度を上げるよう指導する。

平成28年7月に実施した日本での養豚技術研修の後、Hoa Binh省Da Bac 地区、Cao Son コミューンの実験農場での飼養試験、その後のモデル農家選定、モデル農家に対する研修並びに個別指導において当該地区を担当するHoa Binh省Sub-DAHのメンバー並びにDa Bac 地区パラベットを同席させ、TOTとして農家指導並びに飼養管理技術のポイントを逐次指導した。あわせて月次で現場レポートを送付させ、日本側メンバー自身が農家の繁殖豚状況を把握するとともに各農家、母豚個体ごとの問題点の指摘などを行うことで、当該技術のポイントは移転できているものと考える。しかし、今後、更にベトナム側メンバーのみで指導ができるだけの技術移転には及んでいない。また、今後予定されるCao Son コミューン以外のパラベットなどに対しては1回のTOTを行ったのみでほとんど技術移転はできていない。

また、平成28年度に生産性改善のための新飼養技術の普及拡大を図るため、それまでのCao Sonコミューンに加えて新たに5コミューン15モデル農家が選定された。この結果、平成29年度以降では普及対象となる農家数は既存のCao Son15戸を加えて90農家となった。この90農家の現状を効率的に把握するためCao Sonで効果を示した個別の繁殖母豚ごとの生産記録「母豚カード」をスマートフォンの写真撮影送信機能を活用、一括集中的にPCファイルへ入力するシステムを開発し、短時間に90農家のデータを集約するシステムが完成し、関係者に月次でモニタリングデータが送信できるようになった。各コミューンを担当するパラベットとはこのモニタリングデータを通じて各農家への指導要点を示し、プロジェクト終了後を見据えたパラベットによる農家指導が可能となるように指導した。また、パラベットおよび農家向けの指導資料の編集、作成を行い年度中には配布予定である。農家向け研修をコミューンごとに実施した。この中で新飼養技術を短時間で農家にも理解しやすく、実践しやすい方法にアレンジした方法を提示した。モニタリングデータから7~9月に分娩予定の母豚を各パラベットに示し、これの飼養管理を集中的に指導して、その結果を9月末に取りまとめ報告することを求めた。このことから新たな75農家への指導新飼養技術の普及状況を年内には纏める予定である。

③研究題目5の当初計画では想定されていなかった新たな展開

平成27年度については、試験、実証は分娩母子に対して分娩から離乳までの期間に行うことが効果的であることから、計画的に試験、実証するためには繁殖母豚が妊娠していること、いつ分娩するかの推定ができることが必要であるが、この点が甚だ心もとなかった。生産管理を行うための記録などほとんどなかった。また、母豚が突然死亡するなどのアクシデントが非常に多いことも想定外であった。生産管理記録をつけることを習慣づけるため繁殖記録表を作成した。これを繁殖母豚ごとに記録するように指導した。また、死亡事故防止対策として衛生対策プログラムを作成、実施・指導した。

平成28年度では、ベトナム側スタッフで栄養専門家のベトナム国立畜産研究所のメンバーがプロジェクトから外れたことにより、モデル農家への研修や設備計画等に遅滞が生じたが、その後の調整で、ベトナム国立農業大学の専門家2名が参画することになり改善することができた。プロジェクト終了後の状況を考えると、今後は、農家のある地方行政(Hoa Binh省やDa Bac地区)の農業普及担当者が農家指導スキルを高めるように指導者研修で指導していきたい。

研究題目 5 では対象となる農家を管轄するカウンターパートである Hoa Binh 省のプロジェクトへの参画体制が 2017 年夏まで全くなかった。そのため、Hoa Binh 省としてプロジェクトにどのように関わるのか、方針などは平成 30 年に入るまで明らかにされなかった。その後、明らかとなった方針では、Hoa Binh 省 Da Bac 地区 Cao Son コミューンのモデル農家を対象とした技術移転の成果を Cao Son コミューン以外の 5 コミューンに横展開する方針が示され、Hoa Binh 省全域を対象とするものではないことが示された。

平成30年度では、当初の農家対象がCao Sonコミューンのモデル農家15戸から新たに5コミューン、75戸の農家が加わり拡大したこと、ベトナム国にアフリカ豚熱が浸潤したことにより農家との接触が難しくなったことが挙げられる。

④研究題目5の研究のねらい(参考)

平成27年度は、ベトナム在来豚の飼育特性、飼育環境などを把握するとともに生産性改善を視野に入れた予備試験を実施した。生産性改善の狙いを慣行的に哺育期間が6か月としているものを短縮し繁殖母豚の分娩回転を向上するとした。そのための予備試験として1)離乳前の子豚への市販飼料給与(creep feeding)により4ヶ月離乳が可能か否か、さらに2)分娩母豚に給与する飼料を強化(バナナ茎葉など茎葉類を主体とした慣行飼育に対し、自給穀実と市販サプリメント飼料を混合した飼料を給与)することで泌乳量の増加、結果的に哺育子豚の発育促進により2か月離乳が可能か否かを試験した。以上の離乳の早期化により母豚の発情回帰が早まり繁殖効率が向上することを狙いとした。

平成28年度では、ベトナム在来豚の飼育方法は農家毎に違っており、今後ベトナム在来 豚の生産性を向上させる上で現状の飼養成績を把握することは重要である。本項目では、農 家で飼育中の豚、あるいは出荷豚の発育状況、給与されている飼料等を調査し、今後の生産 システムの基礎構築を行う。

平成 29 年度では、モデル農家 15 戸に対する技術指導はそれまで集団的に行ってきたことから、その理解度や実施状況にばらつきがあることが判明し、より農家との密着度を高めて個別指導を重点的に行うこととした。特に、最も栄養要求の高まる授乳期に集中して母豚の栄養強化を図ることで、生産性改善が効果的に図れるかを狙いとした飼養試験を実施したところ、僅かの投資(約 1 ヶ月の母豚への栄養強化)で大幅な生産性改善が見込まれることが明らかとなり、この手法をモデル農家 15 戸に拡大したところ、おおむね良好な改善が確認できた。今後この技術を対象地域に広げ、地域全体のベトナム在来豚の持続可能な生産性向上を図ることが本研究の狙いである。

平成30年度からは、それまでのCao Sonコミューンの成果からカウンターパートであるHoa Binh省Sub-DAHは、Cao Son以外のコミューンにも新飼養技術を普及すべく新たにDa Bac地区の5つのコミューン、各コミューンの15農家、合計75農家を選定し、新飼養技術の普及指導を行うことになった。Cao Sonに対しては新飼養技術の安定的な定着を図ることになった。この技術普及指導を90農家(Cao Sonを含む)に効率よく短期間で行うためには各農家、各繁殖母豚の状況を容易に収集、パソコン処理ができるモニタリングシステムの開発が必要となる。Cao Sonで行なってきた繁殖母豚の生産記録「母豚カード」を新5コミューンのモデル農家にも配布して、記録、記入指導を行い、これをベースにモニタリングシステム開発を行う。これと並行して新5コミューンのモデル農家を巡回して状況把握をするとともに新飼養技術を中心とした指導を行った。

平成31年(令和元年)には、開発したモニタリングシステムを活用して、各コミューンを担当するパラベットに対して各農家、各母豚の状況判断、指導要点などを共有する指導を行う。このことは、プロジェクト終了後にパラベット自身が農家指導できるようにすることも狙いの1つとした。

⑤研究題目5の研究実施方法(参考)

平成27年度は、試験農場として、母豚の分娩予定からデータ収集可能な試験農場3農場 (Tien、Hiep、Nhat)を選定した。Tien 農場では分娩子豚に対して、市販の子豚用配合飼料を哺乳中から給与することで、4か月離乳が可能か否かを確認することを目的として試験開始した。しかし、生後約1か月齢に母豚が急死した。このことは結果的に子豚を強制的に1か月離乳させたことになる。そこで、この子豚11頭を2群に分け、一方に当初予定していた市販の子豚用配合飼料を給与し、他方は当該農家の既存の慣行飼育法で飼育し、両者の子豚の発育を比較検討することにした。一方、Hiep 農場では2頭の母豚がほぼ同時に分娩したので、一方を試験群(市販飼料による creep feeding)、他方を対照群(慣行飼育法)と

した比較試験を行うことにした。しかし、これらの母豚は試験開始前に混合飼育されるようになり、試験、対照の区分ができなくなった。このためこれらを慣行法により飼育させ、子豚に対する市販飼料による発育成績の対照として比較検討した。Tien 農場では上記で使用した母豚のほかにさらに分娩した母豚が発生したため、この母豚に対し、市販のサプリメント飼料に自給のトウモロコシ及び米ぬかを混合した飼料を給与し、子豚の発育を観察するとともに慣行的飼育法による6か月離乳より短い8週齢離乳が可能かの検討を行った。なお、当初、試験農場として予定していたNhat農場の母豚は結果的に妊娠しておらず試験ができなかった。

平成28年度は、ベトナム在来豚農家における生産性技術向上・定着により、農家の収入改善を計り、在来種養豚を安定的に持続させ、種畜の保存を計る。全体研修を通して農家、現地指導員に基本的な養豚技術を習得させ、併行して個別研修、個別訪問・指導を通して個々のモデル農場に合った飼育方法を確立した。

平成 29 年度は、農家を全て巡回指導する企画を行うことにした。記録目的の繁殖カレン ダーを作成・配布し、分娩枠の考案や飼料給餌について指導を行う。

平成 30 年度は、現地農家の飼育方法を大きく変えることなく、生産性向上策を飼育飼養試験によって実証し、その方法を普及した。新 5 コミューンについては現状把握を実施するため 3 回の巡回訪問を行った。また、モニタリングデータ収集を「母豚カードへの記録、記入(農家)」 → 「記録、記入法の指導と月末ごとのスマートフォンでの撮影、送信(パラベット)」 → 「PC エクセルファイルへの入力、送信(Da Bac 獣医ステーション)」 → 「データの解析と指導(日本側専門家)」というシステムを構築し、運用可能かどうか検討した。この際、エクセルファイルの生産データはほとんど翻訳の不要な形式を作成した。この年度以前から指導をしてきた Cao Son コミューンについては技術の定着を目指してモデル農家対象の研修会を実施する。また、6 コミューンのパラベットを対象としたトレーニング(TOT)を実施する。トレーニング教材の内容についての検討会議を 2 回実施した。

平成31年度(令和元年)には、新5コミューンのモデル農家に新飼養技術を導入する指導を行う。本年度はプロジェクト最終年度に当たるため、短期的、効果的指導を要する。このためCao Sonでの経験を活かしてより理解しやすく、実践しやすい内容に改めた研修内容とする。具体的な個別事例を紹介したケーススタディーも取り入れたものにする。トレーニング教材が年度末までに配布できるように、原案をさらに詰める会議を開催した。

Ⅱ. 国際共同研究実施上の課題とそれを克服するための工夫、教訓など(公開)

(1)プロジェクト全体

<u>・プロジェクト全体の現状と課題、相手国側研究機関の状況と問題点、プロジェクト関連</u>分野の現状と課題。

アフリカ豚熱のアウトブレークについて:平成31年2月にベトナムで初めて発生したアフリカ豚熱はその後全土に感染が拡大し、令和元年5月26日現在63の省・直轄市のうち39箇所で確認されており、ベトナムの総飼養頭数の5%にあたる150万頭が殺処分されている。このため、プロジェクトの推進において、①研究題目1で予定している在来豚の凍結バンクへの導入の制限、②研究題目2ならびに3で予定しているBan種卵子の採材が困難になる可能性、③研究課題4で予定している採材についてアフリカ豚熱発生地域への立ち入り制限、④ベトナム国立畜産研究所Thai Nguyen省施設で飼養するPERV低コピー豚の飼育のためのバイオセキュリティ対策の大幅な引き上げ、⑤研究題目5で技術指導・移転を行っているHoa Binh省Da Bac地区Cao Sonコミューンを中心としたモデル農家の、アフリカ豚熱感染により飼養している在来豚の殺処分の可能性、⑥将来日本への輸出を目指してThai Nguyen施設で飼養管理体制を整備しているPERV低コピー在来豚について、日本政府が求める衛生条件がこれまで想定したものより更に高いレベルになることが予想される、等の問題が生じている。これらの案件は制御不能であるが、状況を適切に把握して適切・機

敏に対応する必要がある。

PERV 低コピー豚の輸出について: ベトナムのプロジェクト文書に記載がないとの理由で、本プロジェクト期間内での、PERV 低コピー豚の輸出が難しいとの判断がなされた。当初想定していた目標の一つが達成しえない状況となったが、輸出のための隔離飼育体制の構築についは計画通り進展させており、プロジェクト終了後であっても「いつでも豚の輸出協議を開始できる」という体制をつくる。一方、名古屋議定書関連の政令 59 号への対応(生体輸出の案件)については別途対応(以下)が必要となる。

<u>・各種課題を踏まえ、研究プロジェクトの妥当性・有効性・効率性・インパクト・持続性を</u> 高めるために実際に行った工夫。

Hoa Binh 省におけるブランド化事業:プロジェクト発足当時は、Hoa Binh 省主体でブラン ド化事業を進め日本側は必要に応じて協力を行うことであったが、平成28年11月に開催 された会議で、日本側に主体的にプロジェクトを進めて欲しいこと、さらに JICA に予算措 置をして欲しい旨の提案があった。平成 29 年の 2 月に JICA 代表者も参加して日越間で話 合いがもたれたが、クリアな解決策が見いだせないでおり、継続協議の状況にあった。Hoa Binh 省側から日本側主体でプロジェクトを進めて欲しい旨の要請を受けたが、度重なる協 議の結果、ベトナムに準拠したプロジェクト内容の提示・実行は不可能なこと、具体的な要 望があれば個別に対応できることを提示した。日本側からは、飼養管理技術の重要性等につ いて説くとともに、ブランド化に必要な知識等についての講演会等を開催した。また、ブラ ンド化の礎となるモデル農家での飼養管理技術の普及により、周辺農家への広がりを期待 するとともに、モデル農家がブランド化事業の核となる生産体制構築を期待している。その ような状況のもと、Hoa Binh 省が平成30年からプロジェクト予算を獲得し執行されるに至 った。新たな5コミューン、75農家を対象として在来豚の繁殖豚を各農家に2頭のほか、 長靴、秤、消毒薬、飼料などの資機材を支給するとともに技術普及を目的に Sub-DAH が主催 した研修会などを開催した。また、平成30年8月には、増産した在来豚肉をブランド化し て流通させるため Cao Son コミューンを含めた 90 農家をメンバーとした協同組合が設立さ れた。この協同組合はと畜場の設立やハノイなどの都市部のレストラン向けの在来豚肉の 供給を目論んでいる。現在プロジェクトで行っているモデル農家の成果を省内の他の 5 地 区で実施することとなった。これらの活動の中で、日本側ができることについて協議を行い ながら可能なものについて協力することになる。

生物多様性ならびに ABS に関する取り組みについて: ベトナムにおいて、Law of Biodiversity (2008)、Decree 59 (2017)が発効されており、プロジェクトにおいても収集した遺伝資源の日本への持ち出しはこれらを遵守して実施することが必要である。Decree 59 の発効は 2017 年 7 月であるため、ベトナム側研究者の中での認識は低い。プロジェクトではこれまでのところ、2015 年及び 2017 年に署名した MTA に従って持ち出しを行っている。当面の間、Decree 59、Article 20 に基づき、ベトナム国立畜産研究所が農業農村開発省に申請するため、必要書類を速やかに準備し、手続きを進める。現在日本側(農研機構)からの書類を整えている状態である。

・プロジェクトの自立発展性向上のために、今後相手国(研究機関・研究者)が取り組む必要のある事項。

プロジェクトの持続性について: 昨年度より、プロジェクト終了後の持続性についての議論を日越間で継続してきた。これをうけて、1. ジーンバンクの持続的な活動を目的に、主務省(農業農村開発省)にプロジェクト予算を申請しており、検討されている状況である。また、2. PERV 低コピー豚の育種・繁殖に関する研究や日本への輸出に関しての、継続的な研究予算の獲得が重要となっている。しかしながら、研究資金の潤沢な二カ国間研究課題は限られており、日越双方で自国において可能性のある課題についての獲得を目指す。日本側は科研費等の申請を予定し、ベトナム側では農業農村開発省に申請を行ったところである。

・諸手続の遅延や実施に関する交渉の難航など、進捗の遅れた事例があれば、その内容、解 決プロセス、結果。

機材の免税・供与許可について:平成27年度分の供与機材の免税認可が1年近く遅滞したが、ベトナム政府への現地機関の継続的な働きかけにより開梱・各機関への設置が許可された。その努力の結果、平成28度年の供与機材については遅滞なく設定ができた。平成29年度ならびに30年度分については、同様な事案が発生したが、カウンターパートからの主務省への働きかけ、ならびに日本側からのJICA事務所を通じた働きかけにより令和元年7月に供与が認められた。

ベトナム国立畜産研究所の運営管理体制について: ベトナム側プロジェクト・コーディネーターがベトナム関係機関の調整機能を果たせておらず、またプロジェクト・マネージャーが一時期の間、事実上存在していなかった(平成29年秋季)。プロジェクト・ディレクター(ソン所長)へ直接働きかけて協議を持ち、適切なコーディネーターならびにマネージャーを選任していただき、解決した。

吸入麻酔薬の調達について: 胚移植に係る麻酔薬イソフルラン等の調達が問題となっていた。これらのヒト用の医薬品はベトナム市場で動物用麻酔薬として流通していないことから、農業農村開発省畜産獣医局(MARD-DAH)から動物実験用のための許可を申請したが、最終的には承認が下りなかった。このため、日本から、本プロジェクトのために麻酔薬を搬入・使用するという使用許可を得ることとし、これが承認された。これにより本年度後半より使用が開始された。ただし、プロジェクト終了後には、再び使用できなくなることから持続性について問題が残る。吸入麻酔薬等がないと安全・効率的な実験ができず、また動物福祉の観点からも国際的な基準を満たさず、成果が国際誌に掲載されないという危惧が生じるところであり、恒久的な使用ができるようさらなる働きかけが必要である。

- (2)研究題目 1:「ベトナム在来豚の調査と凍結バンク設立、PERV 検出系の確立ならびに PERV 低コピー豚生産」
- <u>・相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、</u> 今後への活用。

平成 27 年度は、在来豚からのサンプリングを最優先させることが重要であった。DNA 解析の結果により導入豚(地域などの特定)を早急に決定させる。これによりクライオバンクに凍結精液を保存する豚ならびに PERV-free 候補豚が確定できる。これまでの協議で相手方も十分に理解しており、平成 28 年度には優先して活動することが確認された。平成28 年度では、カウンターパート予算の不足から、現地での研究遂行に支障をきたすケースも発生した。実験内容を絞り込み、本当に必要な試薬や消耗品を計上することにより研究を遂行した。

平成28年度においては特に問題はなかった。

平成30年度においては、カウンターパート研究者が異動等により変更となることが数度あり、検討・協議事項を繰り返し説明する必要性が生じることがあったが、日本側として押さえるべきポイントを確実なものとして情報共有したため、大きな問題は生じていない。

- ・類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。 カウンターパート側の体制の変化にも揺らがず、一定の方針に基づき、確固とした対応 をとること、また情報伝達を確実にすることが必要である。
- (3) 研究題目2:「ベトナム在来豚の体外胚生産と卵ならびに胚の超低温保存技術の高度化」

・相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、 今後への活用。

平成27年度では、在来豚からの研究材料、特に卵巣については、と場材料としての可能性が低く、在来豚を扱うレストラン等からの供給が見込まれた。このため、材料入手の可能性を実現化するネットワークを構築することとした。平成28年度では、カウンターパート予算の不足から、現地での研究遂行に支障をきたすケースも発生した。実験内容を絞り込み、本当に必要な試薬や消耗品を計上することにより研究を遂行した。

平成28年度は、前年度においてカウンターパート予算の不足から、現地での研究遂行に支障をきたすケースも発生したが、実験内容を絞り込み、本当に必要な試薬や消耗品を計上することにより研究を遂行した。また、材料として、Ban種の精巣上体(精子)や卵巣(卵)を必要とする。これらは成雌を必要とすることから、3機関で協力して材料を融通するなどの工夫を行っている。

平成29年度については特に問題はなかった。

平成30年度は共同研究策定時には予想も付かなかった課題が発生した(例、吸入麻酔薬)。ベトナム側との情報共有と、上位機関への働きかけを行った。

- ・類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。 期間全体を通じて、特になし。
- (4)研究題目3:「ベトナム在来豚由来体細胞クローン胚作製技術の開発と効率的胚移植方法の確立」
- ・相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、 今後への活用。

平成27年度は、ベトナム出身の大学院生を中心に共同研究およびベトナム側研究担当者の研修受け入れ等の準備を整えた。クローン技術の確実な伝達と、ベトナムでの共同研究課題の遂行可能な環境整備を行うため、受け入れ前の研修者への助言等を行った。

平成28年度は2名の短期研修生を受け入れ、クローン技術の伝達を行った。

平成29年度は、短期研修生(2名)および博士課程卒業生(1名)により、3か所の異なる研究所・大学においてベトナム在来豚由来の体細胞クローン胚を作出することに成功した。また、ベトナム国立農業大学から長期研修員(大学院生)(3年間・1名)を受け入れた。

平成30年度は、さらにベトナム国立畜産研究所から大学院生1名(徳島大学同窓会奨学金)を受け入れ、顕微操作およびDNA解析について指導した。

- ・類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。 期間全体を通じて、特になし。
- (5) 研究題目 4:「ベトナム在来豚農家における疾病調査」
- ・相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、 今後への活用。

平成27年度では、カウンターパートの中でのプロジェクトに関する連絡と意思疎通が十分ではないことがあったため、課題を担当するベトナム側研究者に体制の改善を呼びかけ、意欲的に取り組む若手研究者をFocal Pointと位置づけ、窓口を明確にした。平成29年度では、1)日本国内での短期研修とベトナムにおける定期的なフィールド調査を通じて、カウンターパートであるベトナム国立農業大学のチームと良好な関係を構築できている。一方、供与機器の到着の遅れからベトナムにおける検査機器のセットアップが開始できていないが、平成29年度前半には達成できる見込みである。また、カウンターパート予算の大

幅削減により、試薬・消耗品の現地での調達が制限されたため、検査対象疾病を絞り込むことで現地での研究活動を継続する予定である。また、2) カウンターパート側予算については、様々な問題が発生することがあるので、研究計画策定にあたっては柔軟な対応が取れる計画を作ることが重要と思う。

平成29年度では、日本国内での短期研修とベトナムにおける定期的なフィールド調査を通じて、カウンターパートであるベトナム国立農業大学のチームと良好な関係を構築できた。一方、供与機器の到着の遅れから延期されていたベトナム国立農業大学における検査機器のセットアップも平成29年度前半に完了し、複数回のハンズオントレーニングの実施により、カウンターパートが自律的に血清検査を実施できるようになった。また、カウンターパート予算の大幅削減により、試薬・消耗品の現地での調達が制限されたため、検査対象疾病を絞り込むことで現地での研究活動を継続しているところである。

平成30年5月にベトナム国立農業大学と農研機構動物衛生研究部門の間で動物衛生に関する研究交流協定のMOUを締結し、互いの興味と研究内容を紹介する合同ワークショップをベトナム国立農業大学で開催した。

- ・類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。 期間を通じて、特になし。
- (6) 研究題目 5:「ベトナム在来豚農家における生産性向上のための飼養管理技術の最適化」
- <u>・相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、</u> 今後への活用。

平成27年度では、ベトナム在来豚農家の養豚に対する姿勢、考え方、農家を取り巻く経済的、文化的背景などの理解が不十分であった。日本で良しとされるものが必ずしも現地では良くないことが多いように感じられた。このことは現地農家とカウンターパートの指導者との間でもあるのかもしれない(都会生活者と山岳地帯の農民とのギャップ)。農家、カウンターパート、日本側メンバーの間で十分な意思疎通が必要である。それには言葉の壁を乗り越えることが重要である。三者において、必要であればローカル語通訳を加えて、可能な限り時間をかけてディスカッションを行い、お互いの理解を深めることが重要である。

平成29年度では、現地カウンターパートのみならず、実際データを収集する地域の指導責任者への情報伝達が上手く行かなかった。個別巡回指導を強化し、できるだけ関連している人たちと直接コミュニケーションをとる必要性を感じた。一方で、Hoa Binh省側のプロジェクトへの取り組みがようやく整ってきた段階で対象地域が拡大することとなり、対応可能かが未知数である。Hoa Binh省のメンバーと密に連絡を取り合う必要があるが、英語でのコミュニケーションが難しいこともあり、ベトナム国立畜産研究所やベトナム国立農業大学の職員や学生の協力を得て実施している。今後、生産性改善が定着すると飼育頭数の増加が発生する。しかし、現状農家の保有可能頭数には限界があり、それをどのようにするか、プロジェクト後を見据えた課題であると考えられる。

期間を通じて、相手国研究機関は研究成果を農場現場へ普及することの重要性の認識が不十分であるように感じる。また、地方行政の担当者においても農家の現場へ行くことを嫌う傾向があるように感じられた。農業の現場把握のためには、単に技術の問題のみならず農家の経営や生活環境も理解する必要がある。その点において現地のコミューンに配置されているパラベットは個々の農家の実情を理解しているようであるが、雇用形態や役割がどのようになっているのか、省の行政からは一段低く見られているような様子が窺えた。また、パラベットは獣医補助員という立場か、もしくはワクチン接種などの仕事が中心のようであり、生産技術の指導・普及や営農指導に関してほとんど知識がない状態である。日本の農業改良普及所や家畜保健衛生所のような現場と直結する組織があれば技術普及の効率性が増すと感じられる。プロジェクト終了後も持続的に技術普及がパラベットなどによって担えるよう、組織面、待遇、役割などが明確化されることを期待する。

・類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。 期間を通じて、特になし。

Ⅲ. 社会実装(研究成果の社会還元)(公開)

(1)成果展開事例

• 究題目 1: セミナーなどで、ベトナム研究者に対して本研究で開発した PERV コピー 数測定法、ベトナム豚の系統解析手法、ならびに、育種による PERV 低コピー化につ いて紹介・指導を行っている。

(2)社会実装に向けた取り組み

- 2015年11月25日に「Current Status and Utilization of Vietnam Native Pigs」セミナーをThe 12th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society (ARBS) の pre-conference symposium として実施した。また、ARBS 本体でも口頭発表した。
- プロジェクト期間中に発掘・作出する予定のPERV 低コピー在来豚を円滑に日本に輸出するために、ベトナム側研究者及び行政機関担当が参加するワークショップを平成28年1月にハノイで開催し、日越双方の動物検疫の条件の確認と共有を行い、在来豚の隔離飼育・輸出検疫を行う候補地の選定を行った。
- 本研究成果をインターネット (URL: http://www.jst.go.jp/global/kadai/h2604_vie tnam. html、
- ならびに URL: http://www.jica.go.jp/project/vietnam/033/index.html) で公開した。また、SATREPS ウエブ動画 (URL: https://www.youtube.com/watch?v=_IlxFIIsRrE&index=10&list=PL337ECC44A08FFAA5)でも公開し、一般に情報供与している。
- 得られた成果(特にベトナム在来豚の遺伝解析)について、平成29年3月に開催された 在来家畜研究会の年次大会にて発表し、動物遺伝資源の研究者にプロジェトの紹介を 行い、有意義な意見交換を行った。
- 畜産技術 平成 29 年 1 月号の表紙写真としてベトナム在来豚の写真を提供するとともに、「ベトナムの在来豚遺伝資源保全のための SATREPS の取り組み」という紹介記事を投稿した(平成 29 年 5 月号に掲載)。
- JICAの中間評価に会わせ、平成29年11月6日にScientific Research Report Meeting を開催し、これまでの活動についてその概要を報告するワークショップを開催した。
- 菊地が、平成 29 年 11 月 9 日 Hanoi (Vietnam)で FFTC Seminar on "Boar Semen Application for Pork Quality Improvement"で、「Importance of preservation of gametes and gonadal tissue for porcine genetic resource」の演題名で講演を行った。さらに、谷口が、平成 30 年 3 月 1 に Bangkok (Thailand)で開催された The e-ASIA Joint Research Program Workshop on Agriculture 2018 "Strategy for genetic conservation and utilization of endangered or indigenous/native animal species in Asia"にて、「Establishment of cryo-bank system for Vietnamese native pig resources and sustainable production system to conserve bio-diversity Introducing our recent SATREPS activity」の演題名で講演を行った。これらを通じて、ブタを含む家畜の繁殖・育種、動物遺伝資源に関する研究者にプロジェトの紹介を行い、有意義な意見交換を行った。
- 当 SATREPS 事業で行なっている取り組みについて、e-ASIA Joint Research Program (JST) のシンポジウムにおいて、在来遺伝資源に関するデータベース構築の重要性とデータ共有による利用促進への展望について提言した。

- 本事業で開発した授乳期の飼料給与法が、Hoa Binh 省での在来豚飼育技術指導に応用・ 展開されている。
- 本研究成果は、JST ならびに JICA のホームページで掲載しているが、引き続きベトナムにおいてもインターネット(http://satreps-vnp. vn/en/)で公開するとともに、フェイスブック(https://www.facebook.com/jicanativepig/)にて情報交換をおこなっている。定期的にベトナム語のニュースレターを発行して、広報活動を行っている。
- 「SATREPS プロジェクト成果を活用した SDGs ビジネス化支援プログラム(平成 31 年度)」に応募し、プロジェクト成果を紹介した。
- ・ 在来豚に関する研究者が集まる国際研究集会(第 5 回 Fatty Pig 国際研究集会)にて、 当プロジェクトの成果を 8 題発表した(ポスター8 題からトピック性の高い 3 題を口頭 発表した)。(令和元年 11 月)
- IV. 日本のプレゼンスの向上(公開) 特になし。
- V. 成果発表等【研究開始~現在の全期間】(公開)
- VI. 投入実績【研究開始~現在の全期間】(非公開)
- VII. その他(非公開)

以上

Ⅴ. 成果発表等

- (1)論文発表等【研究開始~現在の全期間】(<mark>公開</mark>)
- ①原著論文(相手国側研究チームとの共著)

年度	著者名,論文名,掲載誌名,出版年,巻数,号数,はじめーおわりのページ	DOIコード	国内誌/ 国際誌の別	発表済 /in press /acceptedの別	特記事項(分野トップレベル雑誌への掲載など、特筆すべき論文の場合、ここに明記ください)
2015	Bui Xuan Nguyen, Kazuhiro Kikuchi, Nguyen Thi Uoc, Thanh Quang Dangnguyen, Nguyen Viet Linh, Nguyen Thi Men, Trung Thanh Nguyen, Takashi Nagai. Production of Ban miniature pig embryos by in vitro fertilization: A comparative study with Landrace. Animal Science Journal, 86, 487-493	10.1111/asj.12317.	国際誌	発表済	
2017	S. Ishihara, A. Arakawa, M. Taniguchi, Q. M. Luu, D. L. Pham, B. V. Nguyen, S. Mikawa, and K. Kikuchi. Genetic relationships among Vietnamese local pigs investigated using genome-wide SNP markers . Reprod. Anim. Gen., 49, 86–89	10.1111/age.12633.	国際誌	発表済	
2018	Nguyen VK, Vu HTT, Nguyen HT, Quan HX, Pham LD, Kikuchi K, Nguyen ST, Somfai T. Comparison of the microdrop and minimum volume cooling methods for vitrification of porcine in vitro-produced zygotes and blastocysts after equilibration in low concentrations of cryoprotectant agents. Journal of Reproduction and Development. 64(5):457-462	10.1262/jrd.2018- 047.	国際誌	発表済	
2018	Linh NV, Somfai T, Nguyen TH, Nhung NT, Hong NT, Dat NT, Thinh NH, Van NK, Quyen DV, Chu HH, Son NT, Kikuchi K. Optimization of the in vitro fertilization protocol for frozen epididymal sperm with low fertilization ability in Ban-A native Vietnamese pigs . Animal Science Jouranl. 89(8):1079-1084.	10.1111/asj.13045.	国際誌	発表済	
2018	Nhung NT, Hong NT, Dat NT, Thinh NH, Somfai T, Kikuchi K, Cuc NTK, Son NT, Quyen DV, Ha CH,Nguyen BX, Linh NV. Effect of culture medium on the development of pig embryos obtained by somatic cell nuclear transfer. Academia Journal of Biology. 40, 101–105.	10.15625/0866- 7160/v40n2se.116 10	国際誌	発表済	
2019	Somfai T, Nguyen VK, Vu HTT, Nguyen HLT, Quan HX, Viet Linh N, Phan SL, Pham LD, Cuc NTK, Kikuchi K. Cryopreservation of immature oocytes of the indigeneous Vietnamese Ban Pig . Animmal Science Jouranl. 2019 Jul;90(7):840–848.	10.1111/asj.13209.	国際誌	発表済	
2019	Ishihara S, Dang-Nguyen TQ, Kikuchi K, Arakawa A, Mikawa S, Osaki M, Otoi T, Luu QM, Nguyen TS, Taniguchi M. Characteristic Features of Porcine Endogenous Retroviruses in Vietnamese Native Pigs . Animal Science Journal	10.1111/asj.13336	国際誌	発表済	
2019	Ba NV, Arakawa A, Ishihara S, Nam LQ, Thuy TTT, Dinh NC, Ninh PH, Cuc NTK, Kikuchi K, Lan PD, Taniguchi M. Evaluation of Genetic Richness among Vietnamese Native Pig Breeds using Microsatellite Markers. Animal Science Journal.	10.1111/asj.13343	国際誌	発表済	
2020	To Nga BT, Tran B, Nguyen L, Osaki M, Kawashima K, Song D, Le VP, Salguero FJ. Clinical and pathological study of the first outbreak cases of African swine fever in Vietnam, 2019. Frontiers in Veterinary Science, section Veterinary Epidemiology and Economics		国際誌	in press	
2020	Ishihara S, Yamasaki F, Ninh PH, Dinh NC, Arakawa A, Taniguchi M, Cuc NTK, Mikawa S, Takeya M, Kikuchi K. The field survey and analysis of the characteristic variation for developing the database of Vietnamese native pig breeds. Animal Science Journal		国際誌	in press	
2020	Nhung NT, Nguyen BX, Viet Linh N, Khanh Van N, Kikuchi K, Hipe NT, Hong NT, Hoang Thinh N, Quyen DV, Chu HH, Kim Cuc NT, Somfai T. Optimization of in vitro embryo production and zygote vitrification for the indigenous Vietnamese Ban pig: the effects of different in vitro oocyte maturation systems . Animal Science Journal		国際誌	in press	

論文数 うち国内誌 うち国際誌 11 件 公開すべきでない論文 0 件

②原著論文(上記①以外)

<u>(2)</u> 原本	皆論文(上記①以外)				
年度	著者名,論文名,掲載誌名,出版年,巻数,号数,はじめーおわりのページ	DOIコード	国内誌/ 国際誌の別	発表済 /in press /acceptedの別	特記事項(分野トップレベル雑誌への掲載など、特筆すべき論文の場合、ここに明記ください)
2015	Do, T.K.L., Shibata, Y., Taniguchi, M., Nii, M., Nguyen, V.T., Tanihara, F., Takagi, M. and Otoi, T. Melatonin supplementation during in vitro maturation and development supports the development of porcine embryos. Reprod. Dom. Anim. 2015, 50, 1054-1058	10.1111/rda.12607	国際誌	発表済	
	Do, T.K.L., Luu, V.V., Morita, Y., Taniguchi, M., Nii, M., Peter, A.T., and Otoi, T. Astaxanthin present in the maturation medium reduces negative effects of heat shock on the developmental competence of porcine oocytes. Reprod. Biol. 2015, 15, 86-93.	10.1016/j.repbio.20 15.01.002.	国際誌	発表済	
2015	Tamás Somfai, Nguyen Thi Men, Junko Noguch, Hiroyuki Kaneko, Naomi Kashiwazaki, Kazuhiro Kikuchi. Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulusenclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens. Journal of Reproduction and Development, 61,571–579	10.1262/jrd.2015– 089	国際誌	発表済	
2016	Santos EC, Somfai T, Appeltant R, Dang-Nguyen TQ, Noguchi J, Kaneko H, Kikuchi K. Effects of polyethylene glycol and a synthetic ice blocker during vitrification of immature porcine oocytes on survival and subsequent embryo development. Anim Sci J., 88, 1042-1048	10.1111/asj.12730	国際誌	発表済	
2016	Appeltant R, Somfai T, Maes D, VAN Soom A, Kikuchi K. Porcine oocyte maturation in vitro: role of cAMP and oocyte-secreted factors - A practical approach. J Reprod Dev. 262(5):439-449.	10.1262/jrd.2016- 016	国際誌	発表済	
2016	Morita, Y., Taniguchi, M., Tanihara, F., Ito, A., Namula, Z., Do, T.K.L., Takagi, M., Takemoto, T. and Otoi, T. The optimal period of Ca-EDTA treatment for parthenogenetic activation of porcine oocytes during maturation culture. J. Vet. Med. Sci. 78, 1019-1023.	10.1292/jvms.15- 0658.	国際誌	発表済	
	Do, T.K.L., Wittayarat, M., Terazono, T., Sato, Y., Taniguchi, M., Tanihara, F., Takemoto, T., Kazuki, Y., Kazuki, K., Oshimura, M. and Otoi, T. Effects of duration of electric pulse on in vitro development of cloned cat embryos with human artificial chromosome vector. Reprod. Dom. Anim., 51, 1039–1043.	10.1111/rda.12766.	国際誌	発表済	
2016	Tanihara, F., Takemoto, T., Kitagawa, E., Rao, S., Do, T.K.L., Onishi, A., Yamashita, Y., Kosugi, C., Suzuki, H., Sembon, S., Suzuki, S., Nakai, M., Hashimoto, M., Yasue, A., Matsuhisa, M., Noji, S., Fujimura, T., Fuchimoto, D., Otoi, T. Somatic cell reprogramming—free generation of genetically modified pigs. Sci. Adv., 2(9), e1600803.	10.1126/sciadv.160 0803.	国際誌	発表済	
2016	Nishio, K., Yamazaki, M., Taniguchi, M., Besshi, K., Morita, F., Kunihara, T., Tanihara, F., Takemoto, T. and Otoi, T. Sensitivity of the meiotic stage to hyperthermia during in vitro maturation of porcine oocytes. Acta Vet. Hung. 65, 115–123, .	10.1556/004.2017. 012.	国際誌	発表済	
2017	Appeltant, R., Somfai, T., Santo,s E.CS, Dang-Nguyen, T.Q., Nagai, T., Kikuchi, K. Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation. Reprod. Fertil. Dev.	10.1071/RD16386.	国際誌	発表済	

2017	Nguyen, V-T., Tanihara, F., Do, T.K.L., Sato, Y., Taniguchi, M., Takagi, M., Nguyen, V.T., and Otoi, T. Chlorogenic acid supplementation during in vitro maturation improves maturation, fertilisation, and developmental competence of porcine oocytes. Reprod. Dom. Anim., 52, 969-975	10.1111/rda.13005.	国際誌	発表済	
2018	石原慎矢、荒川愛作、谷口雅章、菊地和弘,"ベトナム在来豚の多様性の解明に向けた分子遺伝学的解析の動向",動物遺伝育種研究,2019.02,47-,pp.3-10		国内誌	発表済	
2018	Appeltant R, Somfai T, Kikuchi K. Faster, cheaper, defined and efficient vitrification for immature porcine oocytes through modification of exposure time, macromolecule source and temperature . Cryobiology. 85:87-94.	10.1016/j.cryobiol.2 018.09.004.	国際誌	発表済	
2018	Nishio, K., Tanihara, F., Nguyen, V-T., Kunihara, T., Nii, M., Hirata, M., Takemoto, T. and Otoi, T. Effects of voltage strength during electropolation on the development and quality of in vitroproduced porcine embryos. Reprod. Dom. Anim., 53, 313-318, (2018).	10.1111/rda.13106	国際誌	発表済	
2018	Nguyen, V-T., Tanihara, F., Hirata, M., Hirano, T., Nishio, K., Do, T.K.L., Nguyen, V.T., Nii, M. and Otoi, T. Effects of antifreeze protein supplementation on the development of porcine morulae stored at hypothermic temperatures. CryoLetters, 39, 131-136, (2018).		国際誌	発表済	
2018	Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, T.N., Hirano, T., Kunihara, T. and Otoi, T. Effect of ferulic acid supplementation on the developmental competence of porcine embryos during in vitro maturation . J. Vet. Med. Sci., 80, 1007–1011, (2018).	10.1292/jvms.18- 0131	国際誌	発表済	
2018	Nguyen, V-T., Wittayarat, M., Do, T.K.L., Nguyen, V.T., Nii, M., Namula, Z., Kunihara, T., Tanihara, F., Hirata, M. and Otoi, T. Effects of chlorogenic acid (CGA) supplementation during in vitro maturation culture on the development and quality of porcine embryos with electroporation treatment after in vitro fertilization. Anim. Sci. J., 89, 1207-1213, (2018).	10.1111/asj.13049	国際誌	発表済	
2018	Namula, Z., Hirata, M., Wittayarat, M., Tanihara, F., Nguyen, T.N., Hirano, T., Nii, M. and Otoi, T. Effects of chlorogenic acid and caffeic acid on the quality of frozen-thawed boar sperm. Reprod. Dom. Anim., 53, 1600-1604, (2018).	10.1111/rda.13288	国際誌	発表済	
2019	Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, T.N., Le A.Q., Hirano, T. and Otoi T. Effects of the concentration of CRISPR/Cas9 components on genetic mosaicism of cytoplasmic microinjected porcine embryos. J. Reprod. Dev., 65, 209–214, (2019).	10.1262/jrd.2018- 116.	国際誌	発表済	
2019	Tanihara, F., Hirata, M., Iizuka, S., Sairiki, S., Nii, M., Nguyen, T.N., Le A.Q., Hirano, T. and Otoi T. Relationship among ovarian follicular status, developmental competence of oocytes, and anti-Müllerian hormone levels: a comparative study in Japanese wild boar crossbred gilts and Large White gilts. Anim. Sci. J., 90, 712–718, (2019).	10.1111/asj.13200	国際誌	発表済	
2019	Nguyen, T.N., Hirata, M., Tanihara, F., Hirano, T., Le A.Q., Nii, M. and Otoi T. Hypothermic storage of porcine zygotes in serum supplemented with chlorogenic acid. Reprod. Dom. Anim., 54, 750–755, (2019).	10.1111/rda.13417	国際誌	発表済	
2019	Hirata, M., Tanihara, F., Wittayarat, M., Hirano, T., Nguyen, T.N., Le A.Q., Namula, Z., Nii, M. and Otoi, T. Genome mutation after introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system in matured oocytes and putative zygotes. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim., 55, 237–242, (2019).	10.1007/s11626-	国際誌	発表済	
2019	Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, T.N., Le A.Q., Hirano, T., Takemoto, T., Nakai, M., Fuchimoto, D. and Otoi, T. Generation of PDX-1 mutant porcine blastocysts by introducing CRISPR/Cas9-system into porcine zygotes via electroporation. Anim. Sci. J., 90, 55-61, (2019).	10.1111/asj.13129	国際誌	発表済	

2019	Namula, Z., Tanihara, F., Wittayarat, M., Hirata, M., Nguyen, T.N., Hirano, T., Le A.Q., Nii, M. and Otoi, T. Effects of tris (hydroxymethyl) aminomethane on the quality of frozen-thawed boar spermatozoa. Acta Vet. Hung., 67, 106-114, (2019).	10.1556/004.2019. 012.	国際誌	発表済			
2019	Somfai T, Nguyen HT, Nguyen MT,Dand-Nguyen TQ, Kaneko H, Noguchi J, Kikuchi K. Vitrification of porcine cumulus-oocyte complexes at the germinal vesicle stage does not trigger apoptosis in oocytes and early embryos but activates the expression of the antiapoptotic Bcl-XL gene beyond the 4-cell stage. J Reprod Dev. 2020 Apr 10;66(2):115-123.	10.1262/jrd.2019- 094	国際誌	発表済			
2020	Nguyen HT, Thanh Quang Dang-Nguyen TQ, Somfai T, Men NT, Viet Linh N, Nguyen BX, Noguchi J, Kaneko H, Kikuchi K. Selection based on morphological features of porcine embryos produced by in vitro fertilization: Timing of early cleavages and the effect of polyspermy	10.1111/asj.13401	国際誌	発表済			
2020	Nguyen TH, Nguyen TN, Nghiem THL, Dang-Nguyen TQ, Men NT, Viet Linh N, Nguyen BX, Noguchi J, Kaneko H, Kikuchi K. Pluripotency-associated genes reposition during early embryonic developmental stages in pigs. Anim Sci J. 2020;00:e13408.	10.1111/asj.13408	国際誌	発表済			
3 そ の	公開 ○他の著作物(相手国側研究チームとの共著)(総説、書籍など)	論文数 うち国内誌 うち国際誌 すべきでない論文	26	件			
年度	著者名、タイトル、掲載誌名、巻数、号数、頁、年		出版物の 種類	発表済 /in press /acceptedの別	特記事項		
2016	Somfai T, Hirao Y. Synchronization of In Vitro Maturation in Porcine Oocytes. in Banfalvi G. "Cell Cycle Synchronization" (2nd edition, Humana Press). Methods Mol Biol. 1524: 255–264. 2017		単行本(教 科書)	発表済			
4 ₹σ.	公開す つ他の著作物(上記③以外)(総説、書籍など)	著作物数 べきでない著作物		件 件			
年度	著者名,論文名,掲載誌名,出版年,巻数,号数,はじめーおわりのページ		出版物の 種類	発表済 /in press /acceptedの別	特記事項		
	Somfai T, Kikuchi K. Vitrification of porcine oocytes and zygotes in microdrops on a solid metal surface or liquid nitrogen. In Wolkers W "Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols" (Springer), Methods in Molecular Biology, submitted		技術ノート	accepted			
著作物数 1 件 公開すべきでない著作物 0 件 の							
年度	研修コース概要(コース目的、対象、参加資格等)、研修実施数と修了者数	開発したテ	・キスト・マニュ	アル類	特記事項		
2016	モデル農家研修(3回: 2016年10月、12月、2017年3月)	モデル農家研修のた	こめのパワー 7	ポイント資料	15モデル農家対象(疾病対策、 養豚技術、早期離乳による生 産性向上を目的)		
				·			

TOT研修のためのパワーポイント資料

モデル農家研修のためのパワーポイント資料

2017 TOT研修(2017年8月30日) 約30名

2017 モデル農家研修: Productivity Improvement effect and Economic efficiency by SATREPS Project(2017年12月26日),約20名

2017	モデル農家研修: Nutrition and Feeding workshop(2018年2月), 13名	モデル農家研修のためのパワーポイント資料	
2018	カオソンモデル農家研修(2回:2018年4月、11月)対象15農家 新5コミューン農家研修(2019年3月)対象75農家	モデル農家研修のためのパワーポイント資料	
2018	TOT研修(2回:2018年6月、10月)	TOT研修のためのパワーポイント改訂版資料	
2019	新5コミューンのパラベットに対するTOT研修	農家向けハンドブック パラベット向けハンドブック 全農家向けポスター形式指導書	

Ⅴ. 成果発表等

- (2)学会発表【研究開始~現在の全期間】(公開)
- ①学会発表(相手国側研究チームと連名)(国際会議発表及び主要な国内学会発表)

年度	国内/ 国際の別	発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日等	招待講演 /ロ頭発表 /ポスター発表の別
2015	国際学会	Masaaki Taniguchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Luu Quang Minh (National Institute of Animal Science, Hanoi, Vietnam), Shinya Ishihara (National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japan), Kazuhiro Kikuchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Aisaku Arakawa (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Takeshige Otoi (Tokushima University, Tokushima, Japan), Satoshi Mikawa (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan). Investigation of Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) Loci in the Genome of Vietnamese Domestic Pigs. Plant and Animal Geneme Conference XXIV. San Diego, CA, USA January 9–13, 2016	ポスター発表
2015	国際学会	Aisaku Arakawa (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Shinya Ishihara (National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japan), Shihei Touma (Okinawa prefectural Livestock Research Center, Nakijin, Japan), Masaaki Taniguchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Luu Quang Minh (National Institute of Animal Science, Hanoi, Vietnam), Nguyen Van Ba (National Institute of Animal Science, Hanoi, Vietnam), Naohiko Okumura (JATAFF, Tsukuba, Japan), Naotaka Ishiguro (Gifu university, Gifu, Japan), Tomoko Eguchi-Ogawa (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan), Hirotoshi Shimabukuro (Okinawa prefectural Livestock Research Center, Nakijin, Japan), Hirohide Uenishi (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan), Takeshige Otoi (Tokushima University, Tokushima, Japan), Kazuhiro Kikuchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Satoshi Mikawa (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan). Genetic Relationships Among Sus scrofa in East and South-East Asia. Plant and Animal Geneme Conference XXIV. San Diego, CA, USA. January 9-13, 2016	ポスター発表
2016	国際学会	Masaaki Taniguchi (NILGS), Luu Quang Minh (NIAS Vietnam), Aisaku Arakawa (NILGS), Shinya Ishihara (NIAS), Kazuhiro Kikuchi (NIAS), Takeshige Otoi (Tokushima Univ), Satoshi Mikawa (NILGS), Copy number variant analysis of Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) loci in the genome of Vietnamese Native Pigs, International Plant & Animal Genome XXV, San Diego, CA (USA), 16 Jan 2017	ポスター発表
2016	国際学会	Aisaku Arakawa (NILGS), Shinya Ishihara (NIAS), Masaaki Taniguchi (NILGS), Kazuhiro Kikuchi (NIAS), Satoshi Mikawa (NILGS), Genome-wide analysis of genetic introgression on Vietnamese native pigs, International Plant & Animal Genome XXV, San Diego, CA (USA), 16 Jan 2017	ポスター発表
2016	国際学会	Shinya Ishihara(NIAS), Aisaku Arakawa(NILGS), Masaaki Taniguchi(NILGS), Luu Quang Minh(NIAS-Vietnam), Pham Doan Lan(NIAS-Vietnam), Nguyen Van Ba(NIAS-Vietnam), Satoshi Mikawa(NILGS), Nhu Van Thu(NIAS-Vietnam), Kazuhiro Kikuchi(NIAS), Genetic diversity and relationship for Vietnamese native pigs using genome wide SNP markers , 17th AAAP Congress, Fukuoka, Japan, 22 to 25 August 2016	口頭発表
2016	国内学会	石原慎矢(農研機構・生物機能利用)、Luu Quang Minh(NIAS Vietnam)、谷口雅章(農研機構・畜産)、荒川愛作(農研機構・畜産)、音井威重(徳島大学)、菊地和弘(農研機構・生物機能利用)、美川智(農研機構・畜産). ベトナム在来豚品種におけるブタ内在性レトロウイルスのコピー数の比較. 第122回日本畜産学会、神戸、2017年3月28~29日	口頭発表
2017	国際学会	Viet Linh N (VAST, Vietnam), Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Hiep NT (Yamaguchi University), Nhung NT(VAST, Vietnam),Hong NT(VAST, Vietnam), Dat NT(VAST, Vietnam), Van NK (NIAS, VIetnam), Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Optimization of in vitro fertilization parameters for frozen epidydimal spermwith low fertilization ability in a Vietnamese indigenous pig . The Fourth World Congress of Reproductive Biology, Okinawa, Japan, September 27–29, 2017	ポスター発表

2017	国際学会	Van NK (NIAS, Vietnam), ソムファイタマス, Huong VTT (NIAS, Vietnam), Huong NT(NIAS, Vietnam), Huu QX (NIAS, Vietnam), Lan PD (NIAS, Vietnam), Viet Linh N (VAST, Vietnam), Appeltant R (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), 菊地和弘 (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Vitrification of immature oocytes in an indigenous Vietnamese pig breed. The Fourth World Congress of Reproductive Biology, Okinawa, Japan, September 27–29, 2017	ポスター発表
2017	国際学会	Arakawa A (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Ishihara S (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Taniguchi M (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Touma S(Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center), Okumura N(Institute of Japan Association for Techno-innovation in Agriculture, Forestry and Fisheries), Luu QM (National Institute of Animal Science, Vietnam), Nguyen VB (National Institute of Animal Science, Vietnam), Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Mikawa S (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO). Genetic Relationships Among domestic pigs in East Asia and Europe. 4th Fatty Pig, Badajoz, Spain. November 24, 2017.	ポスター発表
2017	国際学会	Masaaki Taniguchi (NILGS), Luu Quang Minh (NIAS Vietnam), Aisaku Arakawa (NILGS), Shinya Ishihara (NIAS), Kazuhiro Kikuchi (NIAS), Takeshige Otoi (Tokushima Univ), Satoshi Mikawa (NILGS), Genomic Characterization of Porcine Endogenous Retroviruses in Vietnamese Native Pigs , 11th World Congress on Genetics Applied Livestock Production, Auckland New Zealand, 10–16 February 2018	ポスター発表
2018	国際学会	Ishihara S, Arakawa A, Taniguchi M, Pham HN, Nguyen CD, Pham DL, Nguyen BV, Ngo TKC, Nguyen TS, Mikawa S, Kikuchi K, Phylogenetic analysis for Vietnamese native pigs using D-loop region on mitochondria DNA , 18th Asian-Australian Animal Production Congress 2018 Programme, 2018.08.	口頭発表
2018	国際学会	Taniguchi M, Arakawa A, Ishihara S, Pham HN, Nguyen BV, Pham DL, Ngo TKC, Nguyen TS, Kikuchi K, Mikawa S, Genetic polymorphisms in MC1R and divergence of coat colors in Vietnamese native pigs , 18th Asian-Australian Animal Production Congress 2018 Programme, 2018.08.	口頭発表
2018	国内学会	石原慎矢、山崎福容、竹谷勝、Pham Hai Ninh、Nguyen Cong Dinh、荒川愛作、谷口雅章、美川智、菊地和弘 ベトナム在来豚品種の遺伝資源の管理を目的としたデータベースの構築 ,日本動物遺伝育種学会第19回大会,2018.09,,pp.16-16	ポスター発表
2018	国内学会	B. T. T. Nga (VNUA), N. T. Lan, N. P. Hưng, DJ. An, S. Choe, K.Kawashima (NIAH), L. V. Phan, Genetic Characterization of Classical Swine Fever Viruses Isolated in the North Vietnam during 2014 – 2016 , 日本豚病研究会、茨城県つくば市、2018.05	口頭発表
2019	国際学会	Taniguchi M, Arakawa A, Ishihara S, Luu QM, Pham DL, Nguyen VB, Nam LQ, Thuy TT, Dnih NC, Ninh PH, Cuc NTK, Kikuchi K, Mikawa S. Genetic analysis on Vietnamese native pigs: variations of coat colour and porcine endogenous retrovirus genes. X International Symposium on Mediterranean Pigs. Firenze, Italy, 10/15~10/19	ポスター発表
2019	国際学会	Taniguchi M, Arakawa A, Ishihara S, Luu QM, Pham DL, Nguyen VB, Nam LQ, Thuy TT, Dnih NC, Ninh PH, Cuc NTK, Kikuchi K, Mikawa S. Genetic analysis on Vietnamese native pigs: variations of coat colour and porcine endogenous retrovirus genes. X International Symposium on Mediterranean Pigs. Firenze, Italy, 10/15~10/19	ポスター発表
2019	国際学会	Nguyen Van Dai, Pham Doan Lan, Tran Toan, Ta Van Can, Masaaki Taniguchi, Shinya Ishihara, Aisaku Arakawa, Makoto Osaki, Nguyen Cong Dinh, Kazuhiro Kikuchi, Ngo Thi Kim Cuc. Study on reducing porcine endogenous retrovirus (PERV) copy number of native pigs bred in Thai Nguyen, Vietnam. 5th Fatty Pig International Conference, Naha, Japan. 11/27~29.	ポスター発表
2019	国際学会	Nguyen Cong Dinh, Pham Hai Ninh, Ha Minh Tuan, Shinya Ishihara, Kazuhiro Kikuchi, Ngo Thi Kim Cuc. The result of field survey of Vietnamese native pig breeds. 5th Fatty Pig International Conference, Naha, Japan. 11/27~29.	ポスター発表
2019	国際学会	Lanh Thi Kim Do, Van Khanh Nguyen, Huong Thi Nguyen, Takeshige Otoi, Long Thanh Su, Lan Doan Pham, Huu Xuan Quan, Ngo Thi Kim Cuc, Kazuhiro Kikuchi, Tamás Somfai. The effects of maturation and culture media on the development of porcine cloned embryos derived from native Vietnamese Ban pigs. 5th Fatty Pig International Conference, Naha, Japan. 11/27~29.	ポスター発表

2019	国際学会	Nhung Thi Nguyen1,2, Viet Linh Nguyen1,2, Hiep Thi Nguyen1,3,4, Hong Thi Nguyen1, Thinh Hoang Nguyen5, Van Khanh Nguyen6, Ngo Thi Kim Cuc6, Son Thanh Nguyen6, Quyen Dong Van1,2, Hoang Ha Chu1,2, Kazuhiro Kikuchi3,4, Tamás Somfai7 Establishment of in vitro embryo production system for Ban pigs 5th Fatty Pig International Conference, Naha, Japan. 11/27~29.	ポスター発表
2019	国際学会	Nguyen Van Ba, Lan Doan Pham, Shinya Ishihara, Le Quang Nam, Tran Thi Thu Thuy, Nguyen Cong Dinh, Pham Hai Ninh, Ngo Thi Kim Cuc, Kazuhiro Kikuchi, Aisaku Arakawa, Masaaki Taniguchi. Assessment of genetic diversity and population structure among twenty-four indigenous Vietnamese pig populations using microsatellite markers. 5th Fatty Pig International Conference, Naha, Japan. 11/27 ² 9.	ポスター発表
2019	国際学会	Bui Thi To Nga, Kenji Kawashima, Kohtaroh Miyazawa, Trinh Dinh Thau, Nguyen Thanh Son, Ngo Thi Kim Cuc, Mitsutaka Ikezawa, Makoto Osaki. Farming condition and diseases in Vietnamese native pig resources: An example in the Man breed. 5th Fatty Pig International Conference, Naha, Japan. 11/27~29.	口頭発表
2019	国際学会	Van Khanh Nguyen, Viet Linh Nguyen, Huong Thi Thu Vu, Quan Xuan Huu, Lan Doan Pham, Ngo Thi Kim Cus, Tamás Somfai, Kazuhiro Kikuchi. Vitrification of in vitro produced zygotes for the gene banking of Vietnamese native pigs. 5th Fatty Pig International Conference, Naha, Japan. 11/27 ² 9.	口頭発表
2019	国際学会	Satoshi Hayashi, Takeshige Otoi, Nguyen X Nam, Luong T Hai, Pham V Thuc, Ngo Thi Kim Cuc, Kazuhiro Kikuchi, Hideki Watanabe, Yoshinori Takahashi Improvement of feeding and production efficacy in Vietnamese native pigs. 5th Fatty Pig International Conference, Naha, Japan. 11/27~29.	口頭発表
		招待講演	0
		口頭発表	8

ポスター発表

②学会発表(上記①以外)(国際会議発表及び主要な国内学会発表)

年度	国内/ 国際の別	発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日等	招待講演 /ロ頭発表 /ポスター発表の別
2015	国内学会	菊地和弘(農業生物資源研究所). ブタにおける生殖工学の現状. 第62回日本実験動物学会総会, 京都, 2015年5月28日	口頭発表
2015	国际子云	Tamás Somfai (NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Japan), Kazuhiro Kikuchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan), Hiroyuki Kaneko (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan), Junko Noguchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan), Nguyen Thi Men (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan), Elisa Carolina Da Silva Santos (NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Japan), Takashi Nagai (Food and Fertilizer Technology Center, Taiwan). Update on the cryopreservation of porcine oocytes. 3rd Fatty Pig Science and Utilization International Conference, Herceghalom, Hungary, November 17–20, 2015	口頭発表
2015		Kazuhiro Kikuchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Takeshige Otoi (Tokudhima university, Japan), Makoto Osaki (National Institute of Animal Health, Japan), Kenji Kawashima (National Institute of Animal Health, Japan), Satoshi Hayashi (Itochu Feed Mills Co., Ltd., Japan), Shunsuke Masazumi (Itochu Feed Mills Co., Ltd., Japan), Hideki Watanabe (Itochu Feed Mills Co., Ltd., Japan), Satoshi Mikawa (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Masaaki Taniguchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Shinya Ishihara (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Thanh Quang Dang-Nguyen (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan), Tamas Somfai (NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Japan), And Naoki Kashiwazaki (Azabu University, Japana). Management and utilization of Vietnamese native pig genetic resources by the SATREPS program. The 12th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society, Hanoi, Vietnam, Novermber 26-29, 2015.	ポスター発表

2015	国際学会	Tamás Somfai (NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Japan), Nguyen Thi Men (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan), Hiroyuki Kaneko (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan), Junko Noguchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan), Seiki Haraguchi (NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Japan), Elisa Caroline da Silva Santos (NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Japan), Takashi Nagai (Food and Fertilizer Technology Center, Taiwan), Kazuhiro Kikuchi (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan). Vitrification at the germinal vesicle stage triggers precocious meiotic resumption but does not affect cytoplasmic maturation in cumulus—enclosed porcine oocytes during in vitro maturation. Reproduction, Fertility and Development 28(2),220 — Proceedings of the The 42th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Louisville, Kentucky, USA, January 23–26, 2016	ポスター発表
2015	国内学会	菊地和弘 (農業生物資源研究所). ブタ遺伝資源の保全と利用の新たな展開について. 日本畜産学会会第121回大会 分野別シンポジウム(形態・生理分野), 東京 2016年3月29日	口頭発表
2016	国際学会	大崎慎人(農研機構動衛研)、Management and Utilization of Vietnamese Native Pig Genetic Resources by the SATREPS Program: from the view of Animal Health、ベトナム農業大学シンポジウム″Solutions to emerging and zoonotic diseases″、ハレイ、25Aug2016 Dr. Makoto Osaki. National Institute of Animal Health of Japan	口頭発表
2016	国際学会	Santos ECS (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Appeltant R (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Dang-Nguyen TQ (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Kaneko H (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Noguchi J (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Nagai T (Headquarter, NARO, Japan), Kikuchi K (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan). The effects of resveratrol during in vitro maturation on the developmental competence of porcine oocytes vitrified at the immature stage. The 43th Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society, Austin, Texas. January 14–17, 2017.	ポスター発表
2016	国際学会	Appeltant R (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Santos ECS (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). The effect of exposure time on the toxicity of vitrification solution on porcine cumulus—oocyte complexes before in vitro maturation. The 43th Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society, Austin, Texas. January 14–17, 2017.	ポスター発表
2016	国際学会	Appeltant R (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). The effects of vitrification at the germinal vesicle stage on transzonal projections and cumulus expansion in porcine cumulus-oocyte complexes. 18th International congress on animal reproduction (ICAR), Tours, France. June 26–30, 2016.	ポスター発表
2016	国際学会	Santos EC (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Appeltant R (National Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Dang-Nguyen TQ (National Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Kikuchi K (National Institute of Agrobiological Sciences, NARO). The effects of polyethylene glycol and a synthetic ice blocker on survival and development of immature porcine oocytes vitrified by the Cryotop method. 18th International congress on animal reproduction (ICAR), Tours, France. June 26–30, 2016.	ポスター発表
2016	国内学会	Santos EC(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Kikuchi K. (Institute of Agrobiological Sciences, NARO) The effects of polyethylene glycol and Supercool X-1000 during the vitrification of immature porcine oocytes. 日本畜産学会第121回大会 •日本獣医生命科学大学 March 27-30, 2016.	ポスター発表
2016	国際学会	Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO). Tips and tricks on how to vitrify oocytes. Cryobiology course, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium. September 20–22, 2016	招待講演
2016	国際学会	Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Cryopreservation of porcine testicular tissue. Cryobiology course, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium. September 20–22, 2016	招待講演

2016	国際学会	Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Cryopreservation of porcine ovarian tissue. Cryobiology course, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium. September 20–22, 2016	招待講演
2016	国際学会	Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO). Embryo selection for cryopreservation. Cryobiology course, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium. September 20–22, 2016	招待講演
2016	国際学会	Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO). Oocyte cryopreservation for gene banking in pigs. The 17th AAAP Animal Science Congress (Symposium 07– Current Status of Animal Biotechnology and the Application for Livestock Production), Kyushu Sangyo University, Fukuoka, Japan. August 24, 2016	招待講演
2016	国際学会	菊地和弘(農研機構・生物機能利用). Tamas Somfai (農研機構・畜産), Nguyen Thi Men(農研機構・生物機能利用). ブタにおける配偶子保存研究の取り組み. Cryopreservation Conference 2017. 岡崎. 2017年11月9日	招待講演
2016	国内学会	石原慎矢 (農研機構・生物機能利用), Luu Quang MInh (ベトナム国立畜産研)・谷口 雅章 (農研機構・畜産), 荒川愛作 (農研機構・畜産), 音井威重(徳島大学), 菊地和弘 (農研機構・生物機能利用), 美川智 (農研機構・畜産). ベトナム在来豚品種におけるブタ内在性レトロウイルスのコピー数の比較. 日本畜産学会第122回大会. 神戸. 2017年3月28日	口頭発表
2016	国内学会	菊地和弘(農研機構・生物機能利用). ベトナムにおけるブタ資源の保全と活用について -SATREPSの取り組み 在来家畜研究会・日本動物遺伝育種学会合同シンポジウム. 神戸. 2017年3月28日	招待講演
2017	国内学会	Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Current status and challenges in the cryopreservation of porcine embryos and oocytes in in vitro embryo production system. 日本畜産学会・日本家禽学会合同公開国際シンポジウム. 伊那. 2017年9月6日	招待講演
2017	国内学会	Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Kaneko H (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Recent progress on pig genetic Resources: Cryopreservation and utilization of gonadal tissue. 日本畜産学会・日本家禽学会合同公開国際シンポジウム. 伊那. 2017年9月6日	招待講演
2017	国際学会	Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Animal genetic resources in Japan, and the management for the preservation and utilization. XI International Sympoium on Genetic Resources for the Americans and the Caribbean. Guadalajara, Mexico. October 18, 2017.	招待講演
2017	国内学会	Somfai T (農研機構・畜産), Kikuchi K (農研機構・生物機能利用). Cryopreservation of embryos and oocytes for gene banking in pigs. Cryopreservation Conference 2017. つくば 2017年11月1日	招待講演
2017	国際学会	Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Appeltant R, E. da Silva Santos EC (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Khanh Van N (National Institute of Animal Science, Vietnam), Kaneko H (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Noguchi J (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Current status of come cryopreservation for gene banking in pigs. 4th Fatty Pig, Badajoz, Spain. November 24, 2017.	招待講演
2017	国際学会	Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Kaneko H (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Recent progress on cryopreservation and utilization of testicular tissues for pig reproduction. 4th Fatty Pig, Badajoz, Spain. November 24, 2017.	口頭発表
2017	国際学会	KikuchiK (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Kaneko H (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Nakai M (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Kashiwazaki N (Azabu University), Nagai T (Headquarter, NARO). Conservation and utilization of porcine gametes and gonadal tissues. The 61h International Symposium of Center for the Animal Bioreactor & Xenotransplantation. Chungju, Korea. December 1, 2017.	招待講演
2017	国際学会	Appeltant R (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Effects of defined equilibration solutions with polyvinyl pyrrolidone and cytochalasin B on post vitrification viability of porcine immature oocytes.10th International Conference on Pig Reproduction, Columbia, Missouri, June 11–14, 2017.	ポスター発表

2017	国際学会	Nishio, K., Tanihara, F., Nguyen, T.V., Kunihara, T. and Otoi, T. Effects of voltage strength on development and quality of electroporated porcine embryos. The 14th Transgenic Technology Meeting, Utah, USA, Abstract in Transgenic Res. 26: 29. Oct 1, 2017.	ポスター発表
2017	国際学会	Tanihara, F., Do, L.T.K., Kunihara, T., Nishio, K., Suzuki, S., Besshi, K., Takemoto, T. and Otoi, T. Generation of TP53-modified pigs by GEEP method: CRISPR/Cas9-mediated gene modification introduced into porcine zygotes by electroporation. The 14th Transgenic Technology Meeting, Utah, USA, Abstract in Transgenic Res. 26: 387. Oct 1, 2017.	ポスター発表
2017	国際学会	Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Yoshioka K (National Institute of Animal Health, NARO), Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Nagai T (Headquarter, NARO). Vitrification of blastocyst stage embryos produced in vitro from porcine oocytes vitrified at the immature stage. The Fourth World Congress of Reproductive Biology, Okinawa, Japan, September 27–29, 2017	ポスター発表
2017	国際学会	Appeltant R (Institute of Agrobiological Sciences, NARO), Somfai T (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO), Kikuchi K (Institute of Agrobiological Sciences, NARO). Treatment with cryoprotectants at 25°C improves post vitrification developmental competence of porcine germinal vesicle stage cumulus-oocytes complexes . The Fourth World Congress of Reproductive Biology, Okinawa, Japan, September 27–29, 2017	ポスター発表
2017	国内学会	荒川愛作 (農研機構・畜産). ゲノム情報からわかるブタの遺伝的多様性. 日本動物遺伝育種学会第18回大会. 神奈川. 2017年 11月12日	招待講演
2018	国際学会	Kikuchi K. International collaboration for conservation and utilization of pig resources-SATREPS activity in Vietnam 13th Asian Reproductive Biotechnology Congress Taipei, Taiwan. May 6, 2018	招待講演
2018	国内学会	菊地和弘 ベトナム在来豚の保存と利用の取り組み(SATREP プロジェクト) 第36回動物生殖工学研究会つくばシンポジウム つくば市 2018年7月28日	招待講演
2018	国際学会	Somfai T, Nguyen VL, Nguyen TH, Nguyen TN, Nguyen TH, Kikuchi K. Comparison of two oocyte maturation media for in vitro production of blastocysts in an indigenous Vietnamese miniature pig. The 13th Asian Reproductive Biotechnology Congress, 3~6 May 2018, Taipei, Taiwan, page 43	口頭発表
2018	国際学会	Somfai T, Nguyen HT, Nguyen TM, Dang-Nguyen TQ, Kaneko H, Noguchi J, Nagai T, Kikuchi K. The effects of E-64 on the developmental competence of porcine oocytes vitrified at the at the germinal vesicle stage. Reprod Fertil Dev. 31(1), 144.	ポスター発表
2018	国際学会	Somfai T, Nagai T, Ratky J, Bodo Sz, Kikuchi K. The importance of ex-situ gene banking in farm animals . 37. Óvári Tudomá nyos Napok, 2018 November 9-10, Mosonmagyarovar, Hungary, page 35	招待講演
2018	国内学会	Linh NV, Somfai T, Nhung NT, Hong NT, Kikuchi K. Improvement of in vitro fertility of frozen Ban sperm . National Conference on Biotechnology 2018, Hanoi, Vietnam, October 26, p1771–1775	口頭発表
2018	国内学会	Le Anh Quynh, Fuminori Tanihara, Maki Hirata, Nguyen Thi Nhien, 平野 隆之 and Takeshige Otoi : Concentration of CRISPR/Cas9 components effects on genetic mosaicism of cytoplasmic microinjected porcine embryos , 第6回日本先進医工学ブタ研究会, Oct. 2018.	口頭発表
2018	国内学会	Nguyen Thi Nhien, Fuminori Tanihara, Maki Hirata, 平野 隆之, Le Anh Quynh, 新居 雅宏 and Takeshige Otoi : Hypothermic storage of porcine zygotes in serum supplemented with chlorogenic acid , 第6回日本先進医工学ブタ研究会, Oct. 2018.	口頭発表
2018	国内学会	平田 真樹, 谷原 史倫, 平野 隆之, Nhien Thi Nguyen, Quynh Anh Le, 新居 雅宏, 音井 威重 : ブタにおける受精前後でのゲノム編集が胚盤胞の変異導入効率に及ぼす影響 , 第6回日本先進医工学ブタ研究会, 2018年10月.	口頭発表

2018	国内学会	谷原 史倫, 平田 真樹, Nguyen Thi Nhien, Le Anh Quynh, 平野 隆之, 竹本 龍也, 中井 美智子, 淵本 大一郎, 音井 威重 : ゲノム編集によるTP53遺伝子改変ブタの作製と表現型の解析, 第6回日本先進医工学ブタ研究会, 2018年10月.	口頭発表
2018	国内学会	平田 真樹, 谷原 史倫, Nguyen Thi Nhien, Namula Zhao, 音井 威重 : ブタ体外受精卵におけるCrispr/Cas9システムを使用したゲノム編集の効率 , 日本ゲノム編集学会 第3回大会, 2018年6月.	ポスター発表
2018	国内学会	谷原 史倫, 平田 真樹, Nhien Thi Nguyen, 平野 隆之, 音井 威重 : ブタ内在性レトロウイルス遺伝子を標的としたゲノム編集が 胚発育能に及ぼす影響, 日本ゲノム編集学会第3回大会, 2018年6月.	ポスター発表
2018	国際学会	Fuminori Tanihara, Tatsuya Takemoto, Maki Hirata, N Nguyen Thi, T Kunihara, R Nishinakamura and Takeshige Otoi: Modification of SALL1 gene via CRISPR/Cas9-mediated gene editing introduced into porcine zygotes by electroporation, KEY Forum: The 3rd International symposium on Stem Cell Traits and Developmental Systems, Jan. 2018.	招待講演
2019	国際学会	Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, T.N., Le A.Q., Hirano, T. and Otoi T. Assessment of PDX-1-deficient pigs generated using the CRISPR/Cas9 system introduced into porcine zygotes via electroporation. The 15th Transgenic Technology Meeting, Kobe, April 2019	ポスター発表
2019	国際学会	Le A.Q., Hirata, M., Tanihara, F., Nguyen, T.N., Hirano, T. and Otoi T. Effect of Cas9 protein levels on genomic mutations using the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system in putative zygotes. The 15th Transgenic Technology Meeting, Kobe, April 2019	ポスター発表
2019	国際学会	Nguyen, T.N., Hirata, M., Tanihara, F., Le A.Q., Hirano, T. and Otoi T. Efficiency of gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) to generate GGTA1-modified pigs. The 15th Transgenic Technology Meeting, Kobe, April 2019	ポスター発表
2019	国際学会	Hirata, M., Tanihara, F., Nguyen, T.N., Le A.Q., Hirano, T. and Otoi T. Effects of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting of porcine endogenous retrovirus on the developmental competence of porcine embryos. The 15th Transgenic Technology Meeting, Kobe, April 2019	ポスター発表
2019	国内学会	石原慎矢,谷口雅章,荒川愛作,美川智,熊谷真彦,菊地和弘. 次世代シークエンスデータを用いたベトナム在来豚におけるブタ内在性レトロウイルス座位の探索.日本畜産学会第126回大会、岩手大学、9/17~9/19	口頭発表
2019	国際学会	Somfai T, Kikuchi K. Vitrification of immature oocytes and zygotes for gene banking in pigs. Thai J Vet Med 2019 49(suppl2):50-53.	招待講演
2019	国際学会	Hiep M, Dang—Nguyen TQ, Somfai T, Men NT, Linh NV, Nguyen BX, Noguchi J, Kaneko H, Kikuchi K. Simple Method to Select High Quality Embryosin Pigs . Thai J Vet Med 2019 49(suppl2):191.	ポスター発表
2019	国内学会	石原慎矢, 荒川愛作, 谷口雅章, 菊地和弘, 西堀正英, 河野友宏, 黒澤弥悦, ニホンイノシシ、リュウキュウイノシシおよびベトナム在来豚の全ゲノムデータを用いた遺伝的背景の検証.日本動物遺伝育種学会第20回大会, 宇都宮大学、11/30~12/1	ポスター発表
2019	国際学会	Somfai T, Nguyen HT, Nguyen MT,Dand-Nguyen TQ, Kaneko H, Noguchi J, Kikuchi K. Vitrification of at the germinal vesicle stage does not trigger apoptosis in porcine oocytes and early embryos . IETS 46th Annual Conference, New York USA. 1/16~19	ポスター発表
2019	国内学会	石原慎矢, Ninh Pham Hai, Dinh Nguyen Cong, 荒川愛作, 谷口雅章, 菊地和弘. ベトナム在来豚品種の外貌的特徴に基づいた 形質データの解析. 日本畜産学会第127回大会、京都大学, 3/25~28 (予定).	口頭発表
		招待講演	19

招待講演19口頭発表14ポスター発表22

V. 成果発表等 (3)特許出願【研究開始~現在の全期間】(公開)

①国内出願

	出願番号	出願日	発明の名称	出願人	知的財産権の種 類、出願国等	相手国側研究メン バーの共同発明者 への参加の有無	登録番号 (未登録は空欄)	登録日 (未登録は空欄)	出願特許の状況	関連する論文の DOI	発明者	発明者 所属機関	関連する外国出願※
No.1													
No.2													
No.3													

0 件 0件

国内特許出願数 公開すべきでない特許出願数

② 从 国 出 顧

<u> </u>	山山限												
	出願番号	出願日	発明の名称	出願人	知的財産権の種 類、出願国等	相手国側研究メン バーの共同発明者 への参加の有無	登録番号 (未登録は空欄)	登録日 (未登録は空欄)	出願特許の状況	関連する論文の DOI	発明者	発明者 所属機関	関連する国内出願※
No.1													
No.2													
No.3												_	

0 件

外国特許出願数 公開すべきでない特許出願数

0 件

V. 成果発表等 (4)受賞等【研究開始~現在の全期間】(<mark>公開</mark>)

①受賞

$\frac{\circ}{\sim}$							
年度	受賞日	賞の名称	業績名等 (「〇〇の開発」など)	受賞者	主催団体	プロジェクトとの関係 (選択)	特記事項

<mark>0</mark>件

②マスコミ(新聞・TV等)報道

年度	掲載日	掲載媒体名	タイトル/見出し等	掲載面	プロジェクトとの関係 (選択)	特記事項
2015	2015/5/2	河北新報	ベトナムの在来ブタを守れ	科学欄		発足当時の紹介記 事、岐阜新聞ほか
2019	2020/3/3	Báo Dân Việt			1.当課題研究の成果である	ベトナム語
2019	2020/3/3	Báo Kinh Tế Đô Thị	JICA、在来ブタ保全の共同		1.当課題研究の成果である	ベトナム語
2019	2020/3/3	Quân đội nhân dân online	研究を報告		1.当課題研究の成果である	ベトナム語
2019	2020/3/5	NNAアジア経済ニュース			1.当課題研究の成果である	日本語
2019	2020/3/22		ベトナムと日本、ベトナム在 来種の豚保全で協力	ジャパンリンク		プロジェクトの紹介 日本語/ベトナム語

<mark>6</mark>件

Ⅴ. 成果発表等

(5)ワークショップ・セミナー・シンポジウム・アウトリーチ等の活動【研究開始~現在の全期間】(公開)

①ワークショップ・セミナー・シンポジウム・アウトリーチ等

年度	開催日	名称	場所 (開催国)	参加人数 (相手国からの招聘者数)	公開/ 非公開の別	概要
2015	2015/11/25	SATREPS SYMPOSIUM "Current Status and Utilization of Vietnamese Native Pigs", organized as a satellite symposium for THE 12th ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASIAN REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGY SOCIET	Hanoi (Vietnam)	100 (0)	公開	ベトナムのハノイにて、本SATREPSプロジェクトの活動の概要とプロジェクトから得られる成果に関するシンポジウムが開催した。私を含め3人の日本人研究者と6人のベトナム側の研究者が発表をした。
2016	2016/2/15	Seminor at Philippine Carabao Center	Murioz (Phrlipiines)	50 (3)	公開	菊地・谷口・荒川が、それぞれAnimal Genetic Resources in Japan and An International Collaboration (A SATREPS Project)、Copy number analysis of Porcine Endogenous RetroVirus (PERV) on Vietnamese native pig breeds、Phylogenetics of Vietnamese Native pigsの演題名で講演を行った。
2016	2016/2/15	Seminor at Central Luzon State University	Murioz (Phrlipiines)	300 (3)	公開	菊地・谷口・荒川が、それぞれAnimal Genetic Resources in Japan and An International Collaboration (A SATREPS Project)、Copy number analysis of Porcine Endogenous RetroVirus (PERV) on Vietnamese native pig breeds、Phylogenetics of Vietnamese Native pigsの演題名で講演を行った。
2016	2016/2/17	Seminor at Nueva Vizcaya State University	Nueva Vizcayaz (Phrlipiines)	250 (3)	公開	菊地・谷口・荒川が、それぞれAnimal Genetic Resources in Japan and An International Collaboration (A SATREPS Project)、Copy number analysis of Porcine Endogenous RetroVirus (PERV) on Vietnamese native pig breeds、Phylogenetics of Vietnamese Native pigsの演題名で講演を行った。
2017	2017/11/6	Scientific Research Report Meeting	Hanoi (Vietnam)	30 (15)	非公開	JICAの中間評価に会わせ、これまでの活動に ついてその概要を報告するワークショップを開 催した。
2017	2017/11/9	FFTC Seminar on "Boar Semen Application for Pork Quality Improvement"	Hanoi (Vietnam)	150 (100)	公開	菊地が、Importance of preservation of gametes and gonadal tissue for porcine genetic resourcesの演題名で講演を行った。

2017	2018/3/1	The e-ASIA Joint Research Program Workshop on Agriculture 2018 "Strategy for genetic conservation and utilization of endangered or indigenous/native animal species in Asia"	Bangkok (Thailand)	200 (0)		谷口が、Establishment of cryo-bank system for Vietnamese native pig resources and sustainable production system to conserve bio-diversity - Introducing our recent SATREPS activityの演題名で講演を行った。
2018	2018/10/12	Joint workshop between VNUA and NIAH/NARO on Animal Health	Hanoi (Vietnam)	50 (0)	公開	大崎ほかが、SATREPS課題で実施中の在来 豚疾病調査結果や、日越研究者による研究成 果の紹介、FAO専門家及びベトナム当局担当 者によるアジアの疾病状況の共有を行った。
2018	2018/12/7	Scientific Research Report Meeting (第2回)	Hanoi (Vietnam)	30 (15)	非公開	これまでの活動についてその概要を報告する ワークショップを開催した。
2019	2019/10/31	Scientific Research Report Meeting (第3回)	Hanoi (Vietnam)	30 (18)	非公開	これまでの活動についてその概要を報告する ワークショップを開催した。
2019	2020/3/3	The Final Dissemination Seminar	Hanoi (Vietnam)	57	公開	これまでの活動についてその概要を報告する セミナーを開催した。

11 件

②合同調整委員会(JCC)開催記録(開催日、議題、出席人数、協議概要等)

年度	開催日	議題	出席人数	概要
2015	2015/11/24	第1回JCC	20	1) プロジェクトの概要・現状・モニタリング/報告機構、2) カウンターパート予算、3) 機材と研修、4) 2016年予定等について協議を行った。
2016	2016/6/3	第2回JCC	30	1) プロジェクトの概要・現状・モニタリング/報告機構、2) カウンターパート予算、3) 機材と研修、4) 2017年予定等について協議を行った。
2017	2017/11/6	第3回JCC	30	1) プロジェクトの概要・現状・モニタリング/報告機構、2) カウンターパート予算、3) 機材と研修、4) 2018年予定、5) JICA中間評価の概要報告、6) PDMの変更等について協議を行った。
2018	2018/6/7	第4回JCC	30	1) プロジェクトの概要・現状・モニタリング/報告機構、2) カウンターパート予算、3) 機材と研修、4) 2019年予定について協議を行った。
2019	2019/10/31	第5回JCC	30	1) プロジェクトの概要・現状・モニタリング/報告機構、2) カウンターパート予算、3) 機材と研修、4) 最終年度ならびに終了後の活動について協議を行った。
2019	2020/3/3	第6回JCC	30	1) プロジェクトの概要・現状・モニタリング/報告機構、2) カウンターパート予算、3) 機材と研修、4) 最終年度ならびに終了後の活動について協議を行った。

JST成果目標シート

研究課題名	ベトナム在来ブタ資源の遺伝子バンクの設立と多様 性維持が可能な持続的生産システムの構築
研究代表者名 (所属機関)	菊地 和弘 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機 構 生物機能利用研究部門 ユニット長)
研究期間	H26 採択(平成26 年5 月1日~令和2 年3 月31日)
相手国名/主 要相手国研究 機関	ベトナム社会主義共和国/ 農業農村開発省畜産研究所 他

付随的成果 日本政府、社 ベトナムのミニブタが利用できる。 会、産業への 再生医療技術への貢献。 香献 科学技術の発 ·未受精卵子凍結法、発情同期化·胚移植法、体細胞 クローン技術確立。 感染症防御・検疫技術、飼養管理技術の普及。 ・遺伝子バンクシステムの各国への普及 知財の獲得、 ・ベトナム在来豚の遺伝的情報の入手・公開。 国際標準化の ・ブタ内在性レトロウイルス低コピーミニブタ系統の優 推進、生物資 先的使用権の確保。 源へのアクセ ス等 参画学生、特別研究員、若手常勤研究員名で原著 世界で活躍で きる日本人人 論文ならびにレビュー等の論文作成、一流誌への掲 材の育成 技術及び人的 外国人大学院生等若手研究者の確保と育成。 ネットワークの 研究員の恒久的なネットワークの確立。 構築

新規卵子超低温保存等、確立技術の特許出願。

・ジーンバンクの保存・評価・導入マニュアル、繁殖技

遺伝資源データベースの確立。

術普及マニュアルなどの発行。

・ウェブサイトにて成果の公開。

成果物(提言

書、論文、プ

ログラム、マ

ニュアル、

データなど)

上位目標

ベトナム在来豚に関わる生物多様性維持システム*が構築される *遺伝資源の追加・配布を含むより発展した保全システム

在来種豚の持続可能な生産が確保され、 特性を有する実験用豚(PERV低コピー豚)を利用できる。

プロジェクト目標

ベトナム優良在来豚を探索・評価し、それを活用するための保全システム**が構築される

