

IN VITRO PRODUCTION OF PORCINE EMBRYOS AND THEIR CRYOPRESERVATION



**Takashi NAGAI^{1,2}, Tamás SOMFAI³,
Kazuhiro KIKUCHI⁴, Koji YOSHIOKA⁴,
Naomi KASHIWAZAKI⁵**

¹ Food and Fertilizer Technology Center, Taipei, Taiwan

² Seoul National University, Seoul, Korea

³ NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, Japan

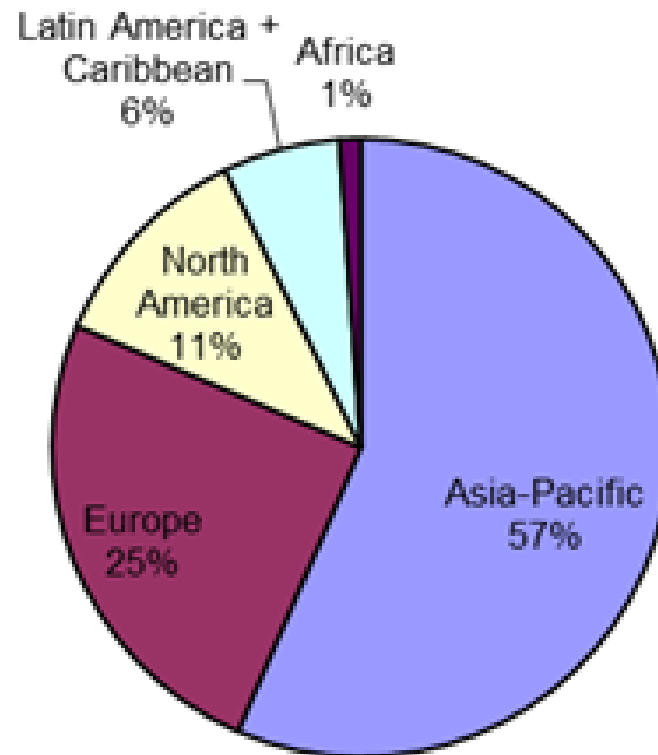
⁴ National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan

⁴ National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japan

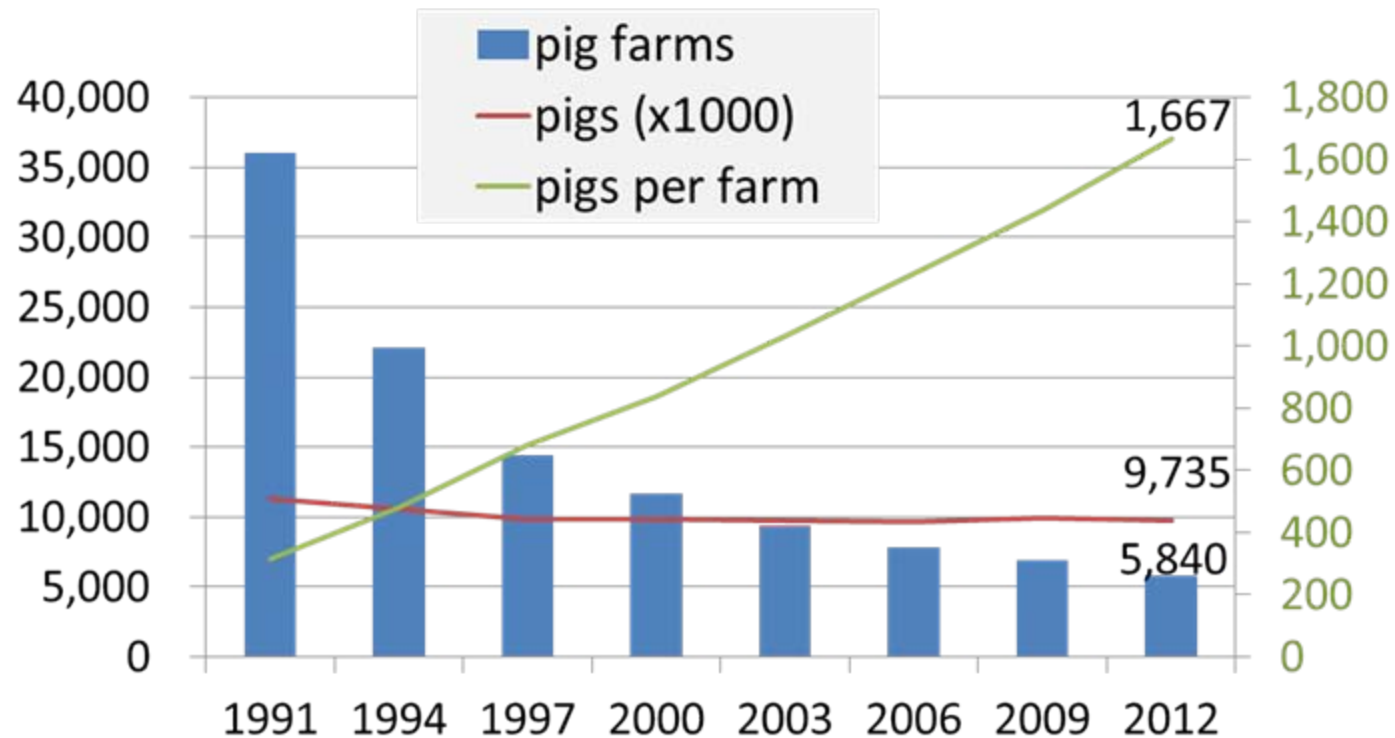
⁵ Azabu University, Sagamihara, Japan



World pork production in 2012 by region

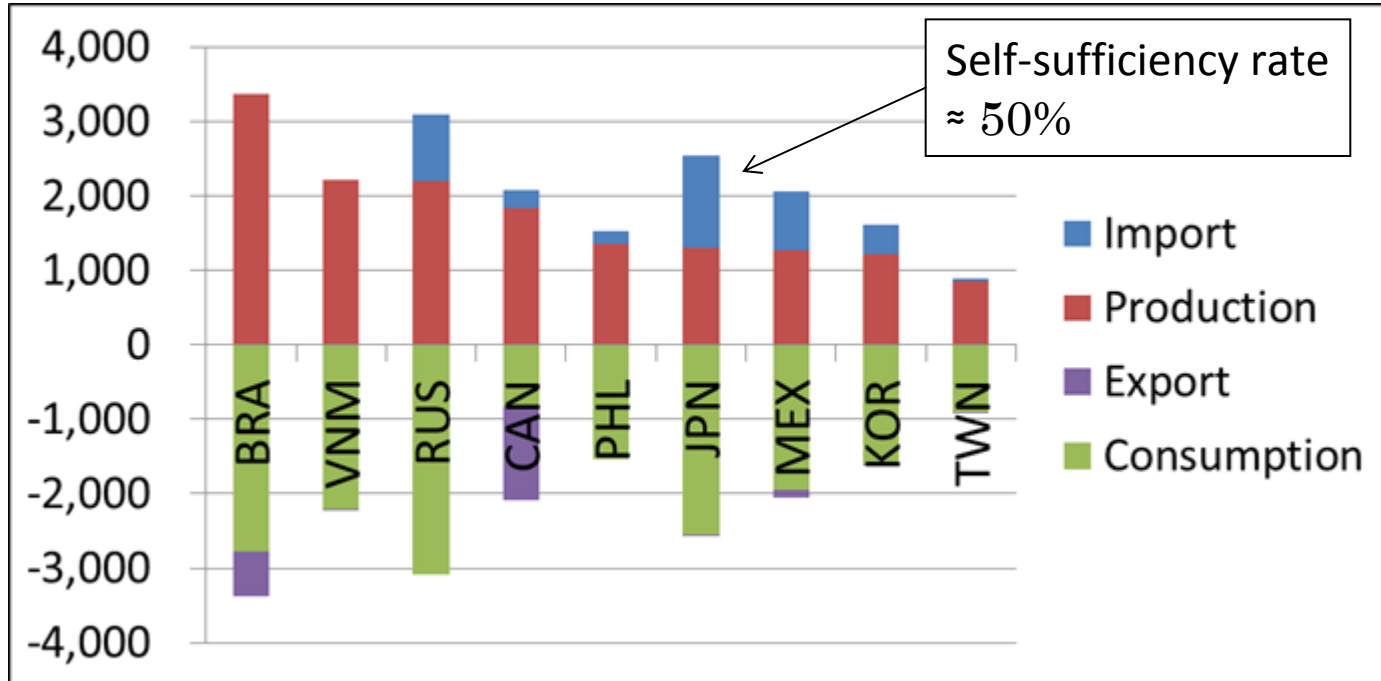


Structure of Pig Farms in Japan



Pork Supply and Demand

Carcass weight, x1000t (2013)



1.3 Mt

Map of Brand Pork (255)

山口県 2
鹿野高原豚
山口高原豚

徳島県 1
阿波ボーク

香川県 1
讃岐夢豚

愛媛県 4
クィンズハイボーク
ネッカリ豚
ふれ愛媛ボーク
ももくり豚

中国・四国

鳥取県 1
鳥取産SPF豚

島根県 2
SPC島根ボーク
ケンボロー 芙蓉ボーク

岡山県 2
おかやま黒豚
星豚

広島県 1
幻霜スペシャルボーク

大分県 1
大分もち豚

熊本県 5
阿蘇高原やまどんボーク
熊本SPF豚
肉熊本きくち黒豚
スーパーボークもっこす
梅肉ボーク

鹿児島県 10
鹿児島O X
かごしま黒豚
九州もち豚
薩摩高原豚
さつま美食豚
純粋黒豚「六白」
茶美豚
天恵美豚
南州ナチュラルボーク
ネオSPF豚

九州・沖縄

福岡県 3
糸島豚
国産もち豚
博多すい〜とん

佐賀県 1
肥前さくらボーク

長崎県 6
雲仙うまか豚「紅葉」
雲仙特選豚 極
MD雲仙クリーンボーク
五島SPF「美豚」
さつま美食豚
長崎うずしおボーク
大西海SPF豚

沖縄県 8
あ〜豚

宮崎県 11
えびの高原極味豚
えびの産豚
尾鈴豚
観音池ボーク
北浦Oh茶豚
霧島黒豚
はざまのきなこ豚
宮崎ハムウボーク
宮崎ハムウボーク
かんしよ豚
麦かめ豚
わかめ豚

その他

伊藤ハム 5
黒匠
伊勢志摩豚
岩手SPF地養豚
みのるさんちの地養豚
宮城地養豚

東海

岐阜県 2
飛騨けんこん・美濃けんこん
美濃ヘルシーボーク

愛知県 9
あかばねボーク
あつみボーク
タイヨーボーク
知多ハッピーボーク
知多豚
デリシャスボーク
トヨタボーク
みかわボーク
やまびこ豚

近畿

京都府 1
京都ぼ〜く

奈良県 1
奈良産豚肉ヤマトボーク

北陸

新潟県 18
朝日豚
越後あじわいボーク
越後もち豚
北越後バイオニアボーク
くびき野黒豚
越乃黄金豚
熱成豚
しるねボーク
つなんボーク

妻有ハーフ健康豚
妻有ハーフふた純生
妻有ボーク
なごみ豚
ニホンカイボーク
八海山麓健康豚
ほくじょうちゃんボーク
深雪餅豚
ヨツパボーク

福井県 1
ふくいボーク

富山県 1
とやまボーク

石川県 1
石川県産豚

北陸

新潟県 18
朝日豚
越後あじわいボーク
越後もち豚
北越後バイオニアボーク
くびき野黒豚
越乃黄金豚
熱成豚
しるねボーク
つなんボーク

妻有ハーフ健康豚
妻有ハーフふた純生
妻有ボーク
なごみ豚
ニホンカイボーク
八海山麓健康豚
ほくじょうちゃんボーク
深雪餅豚
ヨツパボーク

福井県 1
ふくいボーク

富山県 1
とやまボーク

石川県 1
石川県産豚

関東

静岡県 16
朝霧ヨーグルト豚
熱川高原フレッシュボーク
遠州黒豚
遠州の夢の夢ボーク
おらんビッグ
かがわフレッシュボーク
御殿場金華豚
サンサンボーク
とこ豚
富士朝霧高原放牧豚
富士なちゅらるいぼ〜く
ふじのくに「いいきき」ボーク
ふじのくに「HHP」ボーク

山梨県 1
フジザクラボーク

長野県 8
駒ヶ岳山麓豚
純味豚
信州野豚
信州ボークSPF豚
信州ボークみゆき豚
千代福豚
ハヤシファーム豚

東京都 1
TOKYO X

神奈川県 12
飯島さんのふたに
かながわ夢ボーク
さがみあやせボーク
自然派王家
湘南うまか豚
湘南びゅあボーク
湘南ボーク
丹沢高原豚
日本の豚やまと豚
はまぼ〜く
はまぼ〜く
やまゆりボーク

埼玉県 10
キトンボーク
小江戸黒豚
彩の国黒豚
サイボクゴールデンボーク
狭山丘陵ファミリーボーク
スーパーゴールデンボーク
花園黒豚
バルツバイン
幻の肉古代豚
わたしの牧場
彩の国愛彩

千葉県 2
林SPF
房総ボークC

群馬県 28
赤城高原豚
赤城ボーク(上州銘柄豚)
あかぎ愛豚
吾妻高原ボーク
梅の郷上州豚とことん
えはらハーフ豚未来
奥利根もち豚(上州銘柄豚)
かぶちゃん豚
クィーン黒豚
クィーンボーク
黒豚とんころー
群馬 ひらさわ豚
下仁田ボーク
上州いきいきボーク

茨城県 9
奥久慈バイオボーク
キング宝豚
地養豚
シルクボーク
はじめちゃんボーク
美味豚
美明豚
山西牧場
ローズボーク

栃木県 4
黄金豚
とちぎLaLaボーク
那須高原豚
みずほのボーク

北海道

北海道 23
赤井川村産サラタボーク
アグロのSPF豚
浅野農場
内海ヘルシーボーク
SPF海のミネラル豚
サクスス愛産SPF豚
サチク赤豚
知床ボーク
道南アグロ農場産SPF豚
十勝黒豚
十勝清水産SPF豚
十勝野ボーク

どさんこ栄養豚21世紀
中標津ゴールデンボーク
長沼産山中クリーンボーク
名寄鈴ホビッド
ファームSPF豚
びらとりパーチャー
富良野産SPF豚
富良野産ハイコープ豚
北海道産AコープSPF豚
北海道産SPF豚
芽室産SPF豚
若松ボークマン

東北

宮城県 5
北の杜・桃生ボーク
純和豚
志波姫ボーク
みちのくもち豚
宮城野豚

秋田県 3
秋田シルクボーク
あきた美味豚
十和田湖高原ボーク桃豚

岩手県 16
i-coop豚
岩泉龍泉洞黒豚
岩中ボーク
いわて熟成豚
岩手純情豚
北上山麓豚
折爪三元豚「佐助」
コマサSPFボーク
白くすりボーク
館ヶ森高原豚
トキワの豚肉
南部ビューアボーク
南部ロイヤル
日本の豚やまと豚
白金豚
やまゆりボーク

山形県 7
高品質庄内豚
平牧金華豚
平牧三元豚
平牧桃園豚
ヘルシーボーク天元豚
山形コープ豚
米澤豚一番畜ち

福島県 2
日本の豚やまと豚SPF
麓山高原豚

東京都 1
TOKYO X

神奈川県 12
飯島さんのふたに
かながわ夢ボーク
さがみあやせボーク
自然派王家
湘南うまか豚
湘南びゅあボーク
湘南ボーク
丹沢高原豚
日本の豚やまと豚
はまぼ〜く
はまぼ〜く
やまゆりボーク

埼玉県 10
キトンボーク
小江戸黒豚
彩の国黒豚
サイボクゴールデンボーク
狭山丘陵ファミリーボーク
スーパーゴールデンボーク
花園黒豚
バルツバイン
幻の肉古代豚
わたしの牧場
彩の国愛彩

千葉県 2
林SPF
房総ボークC

群馬県 28
赤城高原豚
赤城ボーク(上州銘柄豚)
あかぎ愛豚
吾妻高原ボーク
梅の郷上州豚とことん
えはらハーフ豚未来
奥利根もち豚(上州銘柄豚)
かぶちゃん豚
クィーン黒豚
クィーンボーク
黒豚とんころー
群馬 ひらさわ豚
下仁田ボーク
上州いきいきボーク

茨城県 9
奥久慈バイオボーク
キング宝豚
地養豚
シルクボーク
はじめちゃんボーク
美味豚
美明豚
山西牧場
ローズボーク

栃木県 4
黄金豚
とちぎLaLaボーク
那須高原豚
みずほのボーク

Gene banking in pigs

- Live breeding (nucleus populations) > high cost
- **Cryopreservation** of **embryos** and reproductive cells/tissue; gamete/embryo cryopreservation has been integrated with **in vitro embryo production**



Gene Bank Project of Japan for the preservation of genetic diversity

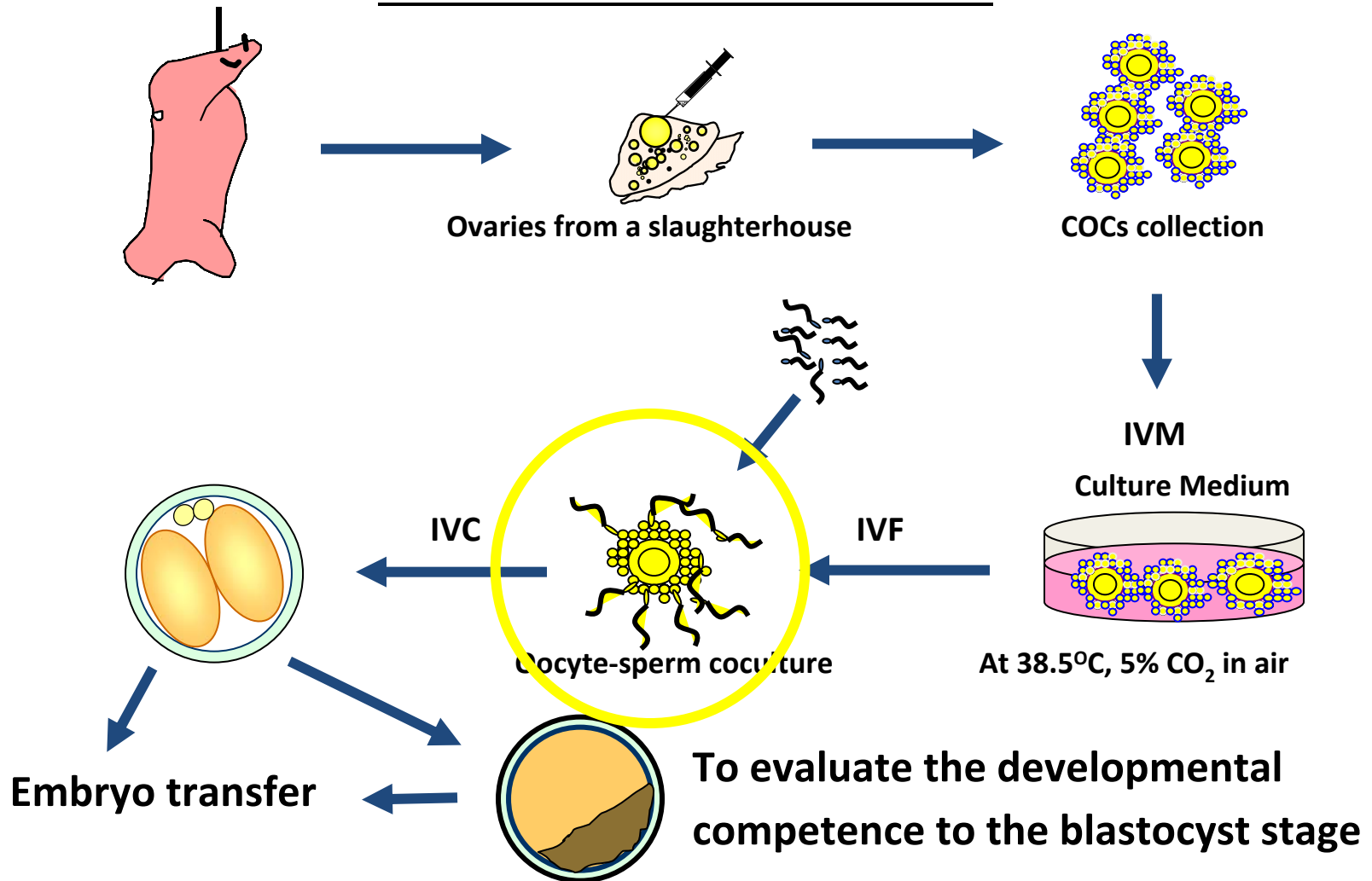
Control: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF)

Central Bank: National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS)

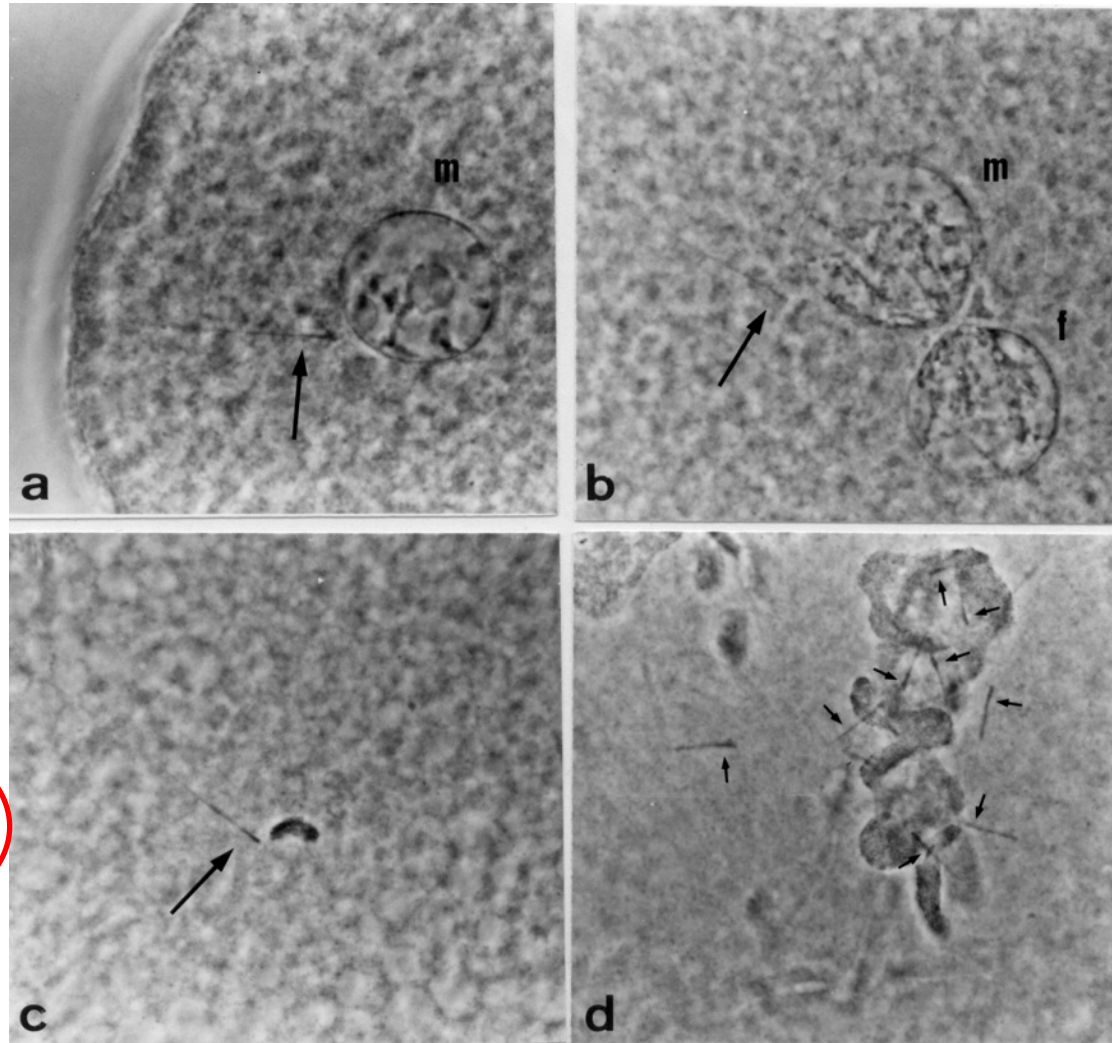
Several sub-banks all over Japan (ie. NILGS)

In vitro production of porcine embryos

Materials and methods



Problems with IVF in pigs



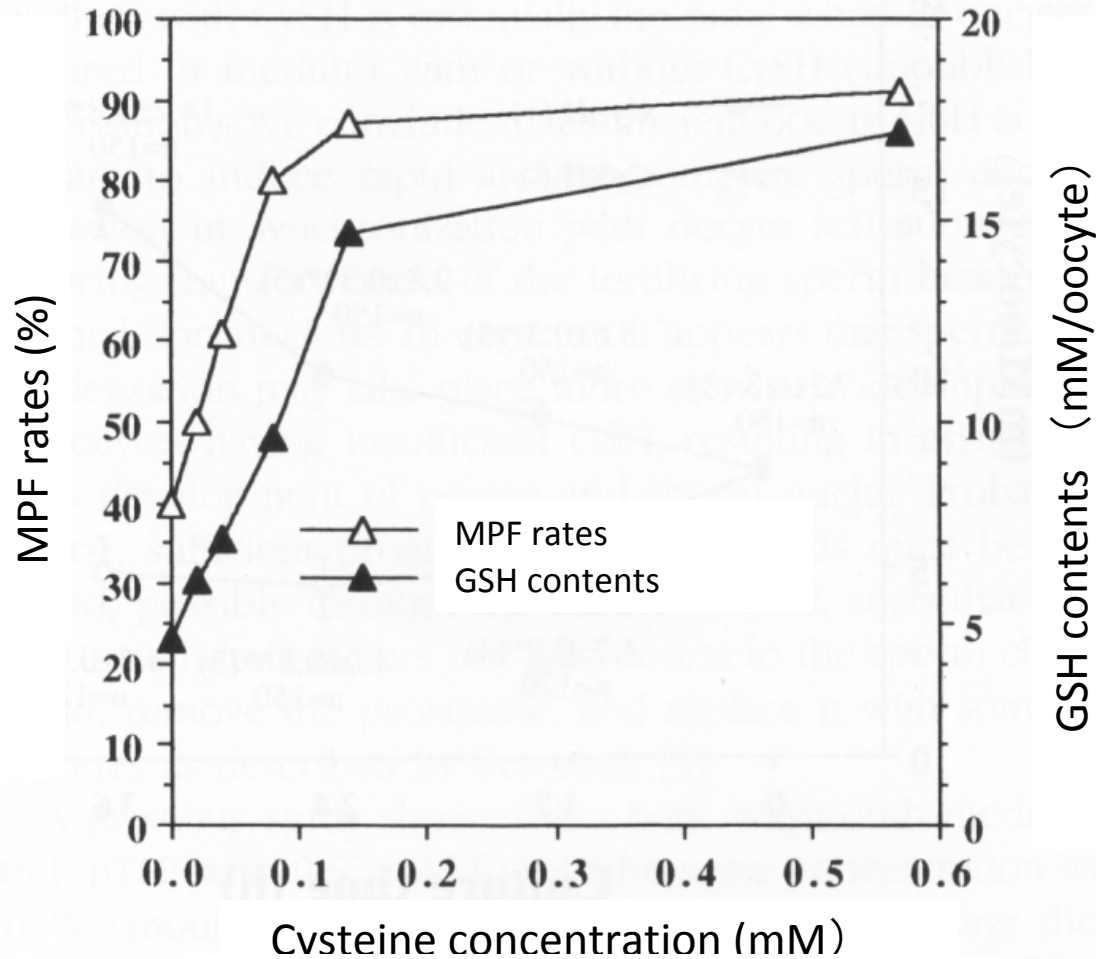
Normal fertilization

~~Polypermic fertilization~~

No male pronucleus formation

m: male pronucleus , f: female pronucleus , → : sperm tails

Effect of cysteine supplementation in IVM medium of porcine oocytes on their glutathione (GSH) contents and male pronucleus formation (MPF) rates





The status of germ cell and embryo cryopreservation in mammals

	Sperm	Embryo	Oocyte	Ovary/ovarian tissue
Mouse	○	○	○	△
Human	○	○	○	△
Cattle	○	○	△	×
Pig	△	△	△	×

○ Routinely performed

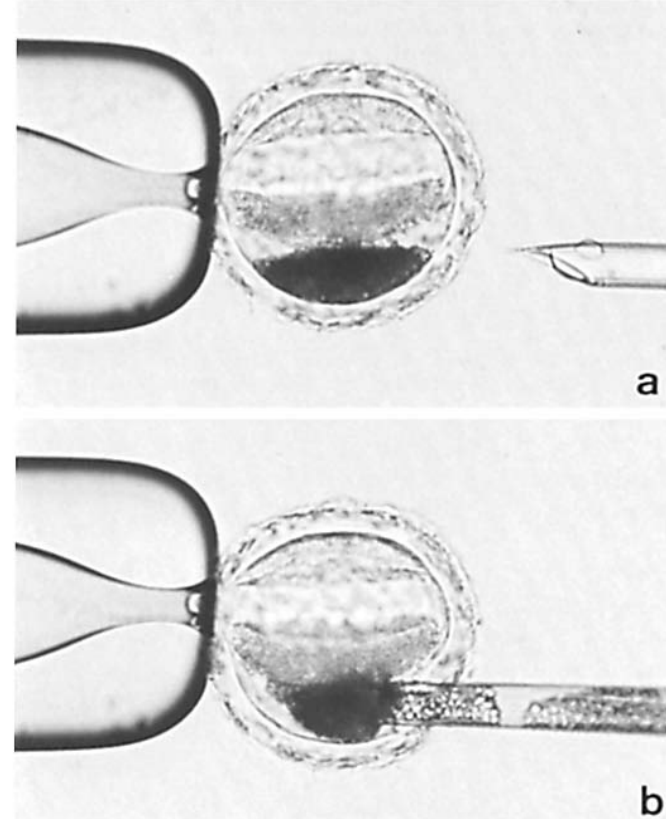
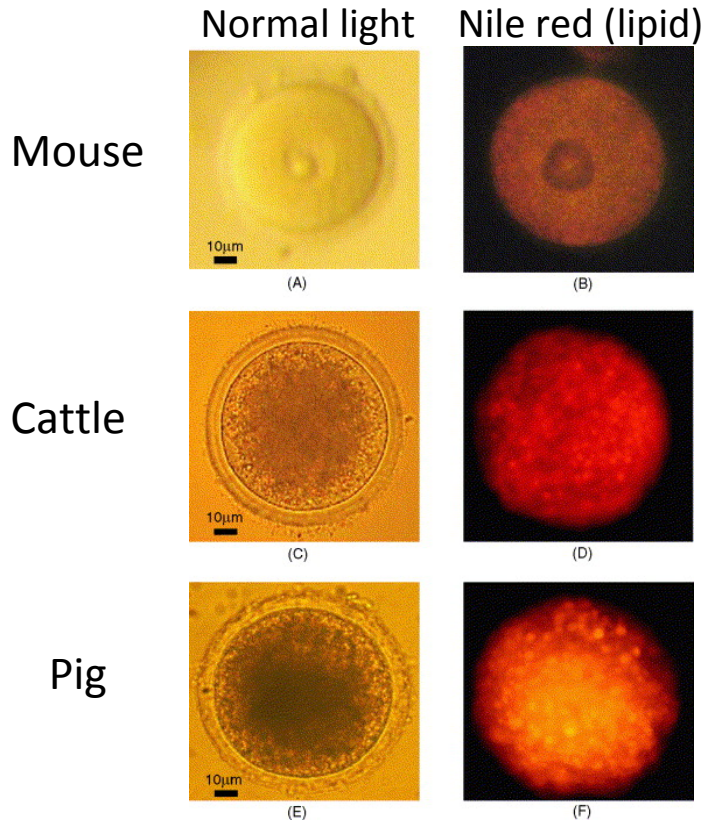
△ Success, but still experimental

× No offspring!

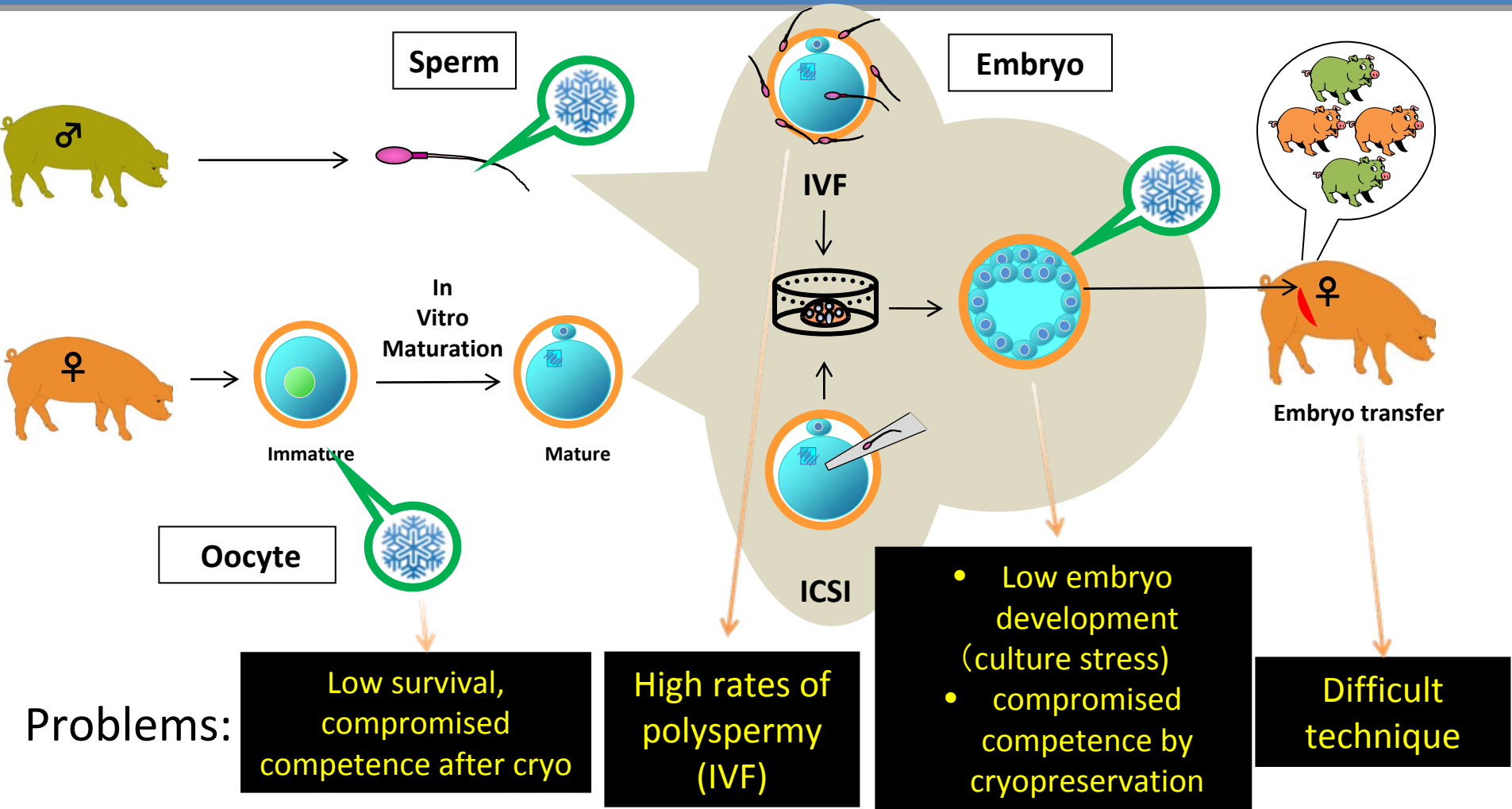
Why are porcine oocytes and embryos so difficult to cryopreserve?

High lipid content in oocytes

Lipid removal from zygotes dramatically improves cooling tolerance of porcine embryos



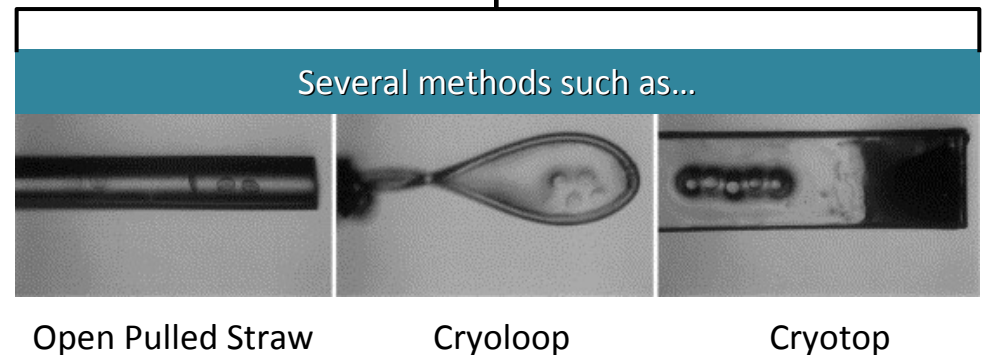
Gamete/embryo cryopreservation integrated with *in vitro* embryo production



Accumulation of different problems reduces efficacy!

Cryopreservation of porcine embryos

- ❑ Equilibrium (slow) freezing or vitrification



- ❑ Developmental stage affects survival
(blastocyst is better than cleavage stage)
- ❑ In vitro produced embryos show limited survival

The history of piglet production from cryopreserved embryos

Year	Embryo source	Embryo stage	Method	Special pre-treatment	Reference
1995	In vivo	2-4 cell	Equilibrium freezing	Delipation	Nagashima <i>et al.</i> (<i>Nature</i> 374:416)
1998	In vivo	Blastocyst	Vitrification (straw)	–	Kobayashi <i>et al.</i> (<i>Cryobiology</i> 36: 20-31)
2000	In vivo	Blastocyst	Vitrification (straw)	Membrane elastication by cytochalasin B	Dobrinsky <i>et al.</i> (<i>Biol Reprod</i> 62: 564-570)
2007	In vitro	4-8 cell	Vitrification (Cryotop)	Delipation	Nagashima <i>et al.</i> (<i>Biol Reprod</i> 76: 900-905)

Solid Surface Vitrification (SSV) for porcine IVP zygotes

Centrifugation (20 min at $10,000 \times g$) of oocytes after 9 h of IVF/IVC and selection of a monospermic zygote

Before

After

nucleolus
precursor
bodies

Equilibration of a group of 100 zygotes
(13-15 min)

- 4% ethylene glycol

Vitrification for a group of 50 zygotes
(30 sec)

- 35% (v/v) ethylene glycol
- 0.3 M trehalose
- 50 mg/ml PVP

Storage
(LN₂ tank)

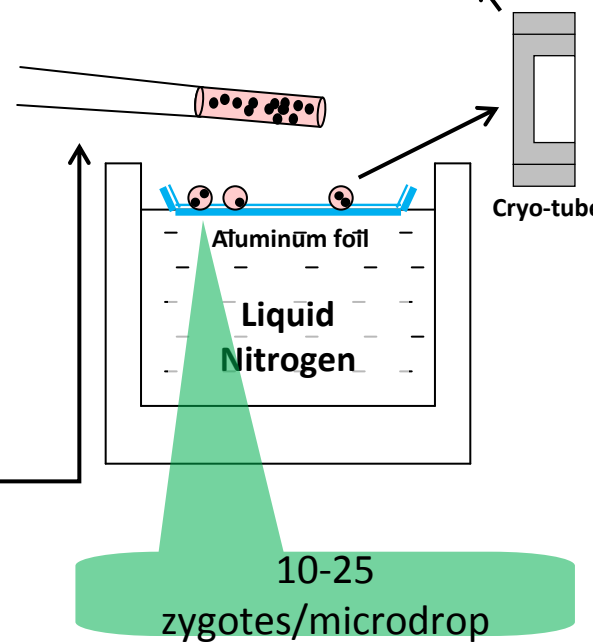


Warming (38.0 °C)

0.4 M trehalose

4-steps dilution

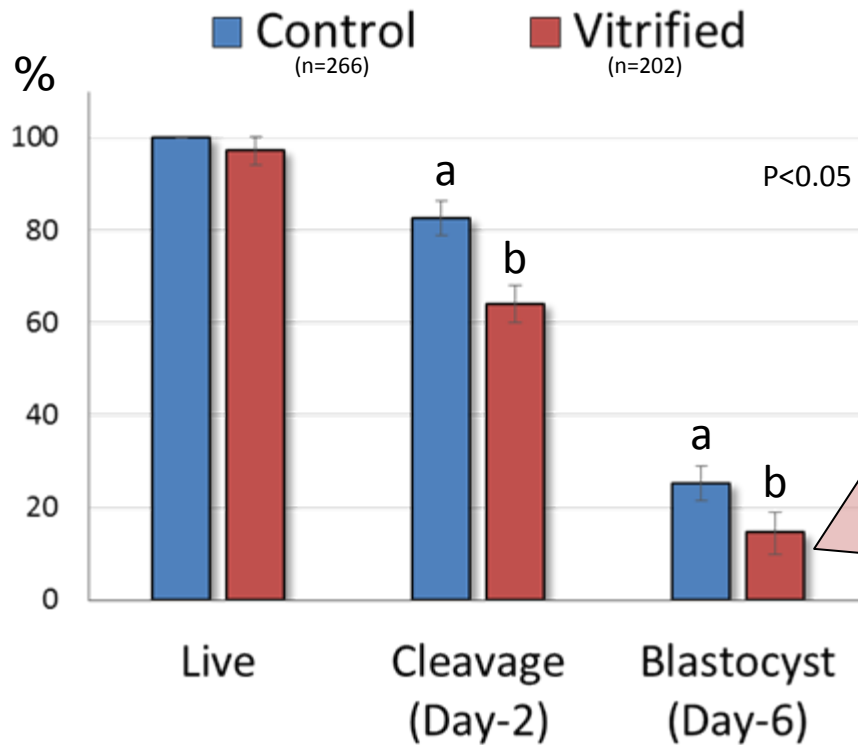
Embryo
culture
or Zygote
transfer



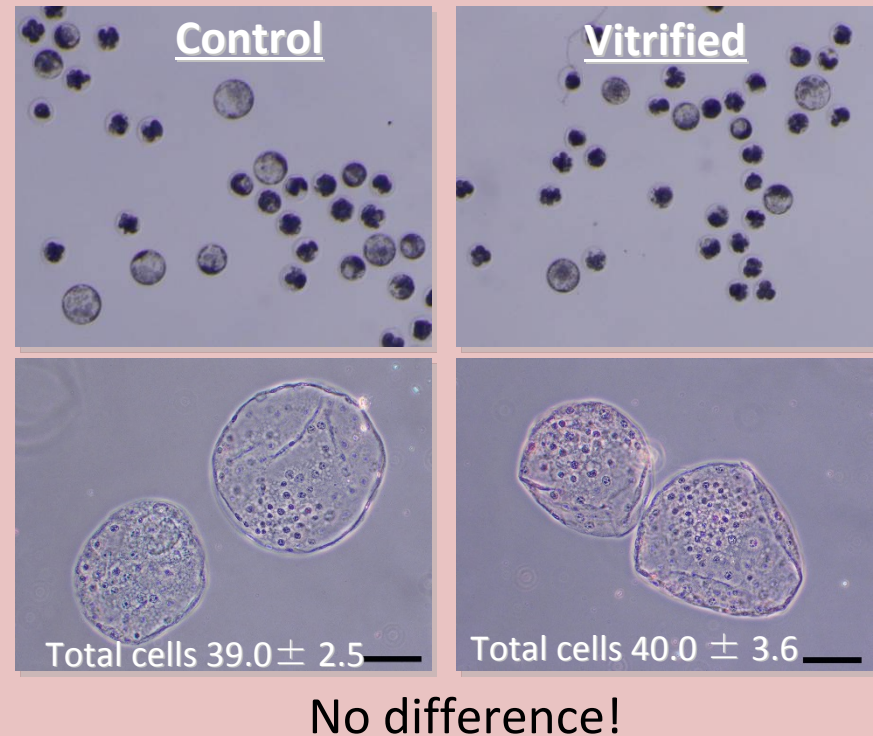
100 zygotes can be vitrified in 20 minutes

In vitro development of zygotes vitrified after 9 h of IVF and IVC

Survival and in vitro development

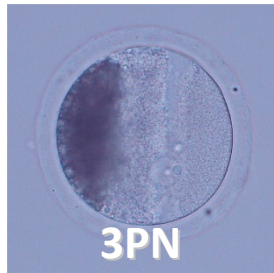
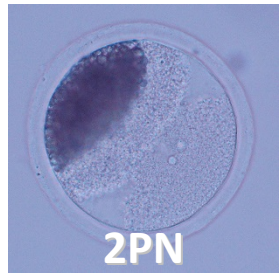


Blastocyst quality (Day 6)

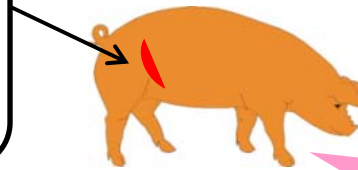


High quality blastocysts from vitrified zygotes

Direct transfer of vitrified/warmed zygotes into recipients



Zygote transfer into
oviduct



(Somfai et al. 2009 Biol Reprod)

Recipient	Zygotes transferred	Pregnancy (days to delivery)	Piglets born (stillborn)	Birth weight (kg)
1	150	+ (112)	5	1.9±0.1
2	150	+ (116)	3 (1)	0.8±0.3
3	150	–	–	N.A.
4	150	–	–	N.A.
5	150	+ (114)	9	1.26 ±0.05

Piglets obtained from cryopreserved IVP embryos without lipid removal for the first time

Cryopreservation of porcine oocytes

- ❑ Gene banking for female individuals
- ❑ Slow freezing does not work, only vitrification works!
- ❑ Important points when choosing the method;
 - ✓ Efficiency (survival)
 - ✓ **Capacity** (number of oocytes/setting)
 - ✓ Speed
 - ✓ Easiness
 - ✓ Cost

The impact of nuclear stage

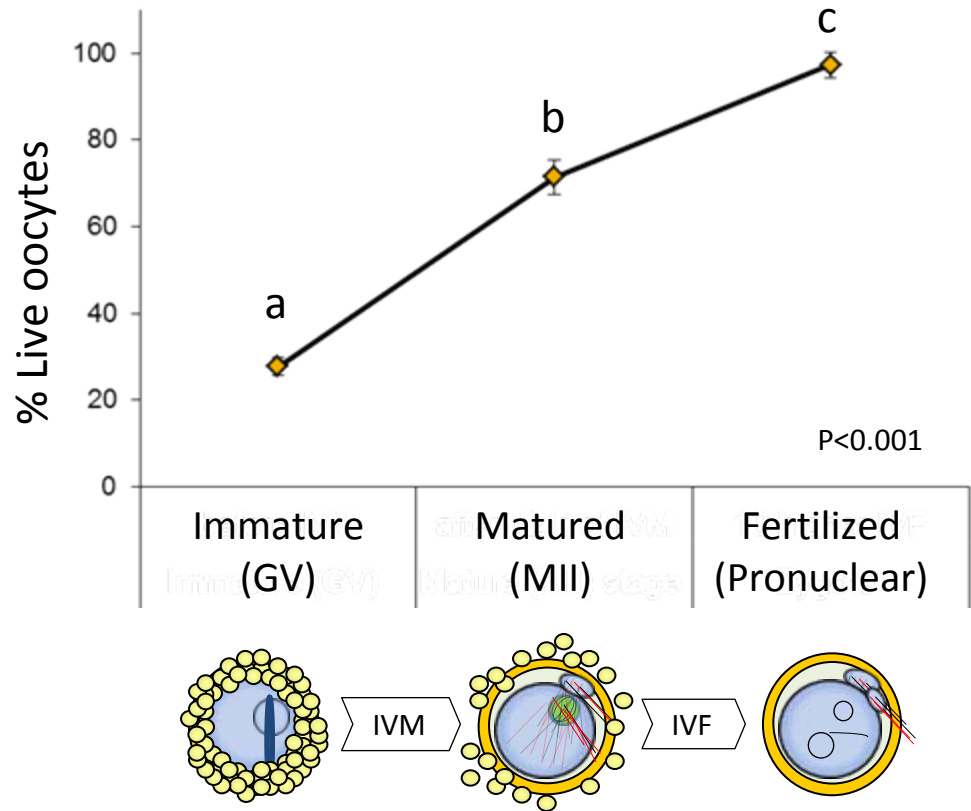
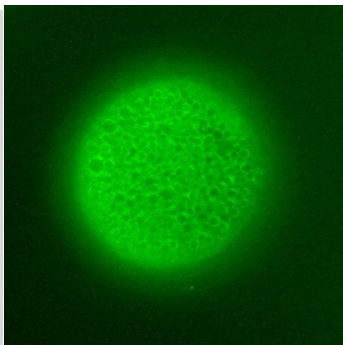
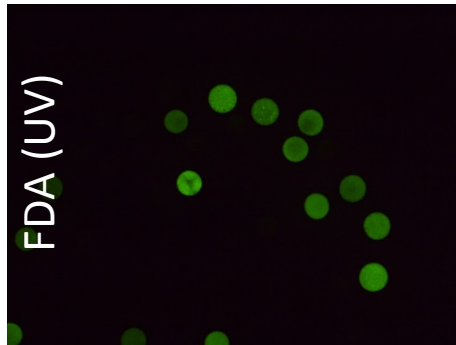
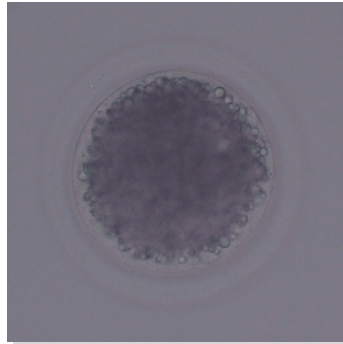
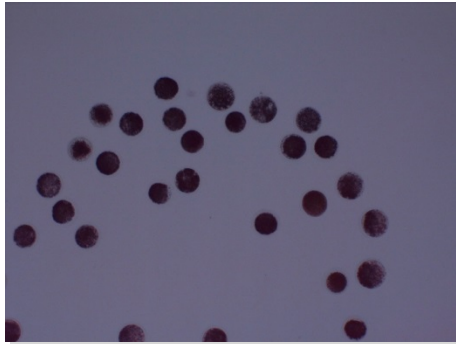
- 1. survival -

Vitrification by SSV in 35% ethylene glycol

Live/dead status

Total

Live



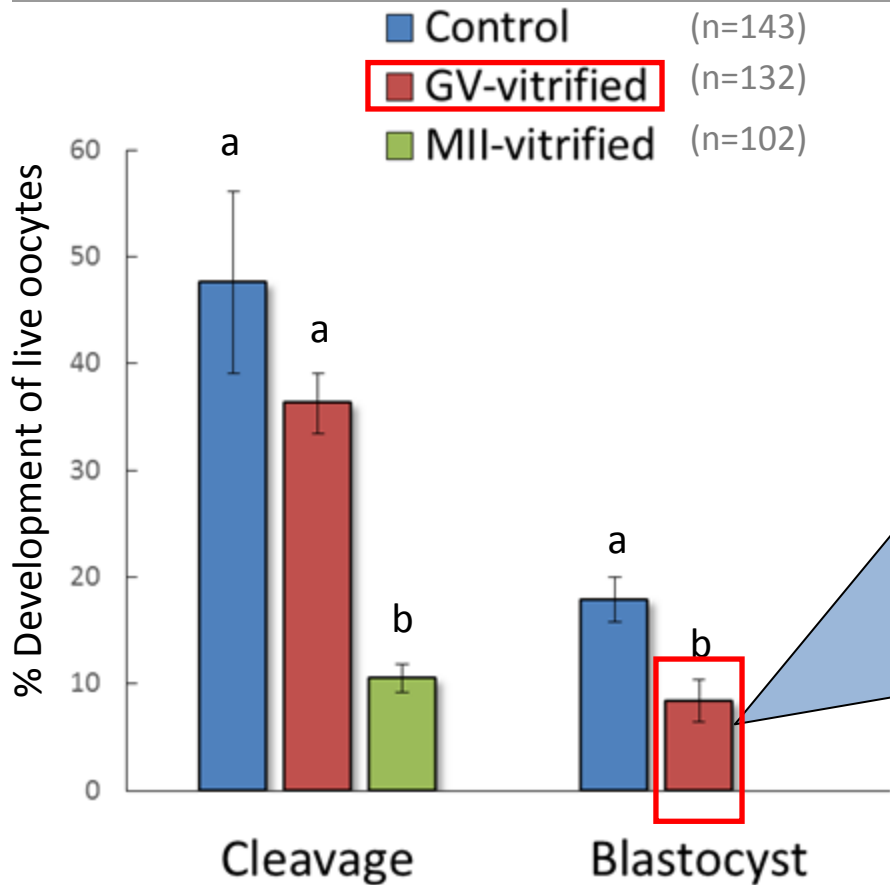
Somfai et al. 2012 J Reprod Dev

Oocyte survival increases by nuclear progression

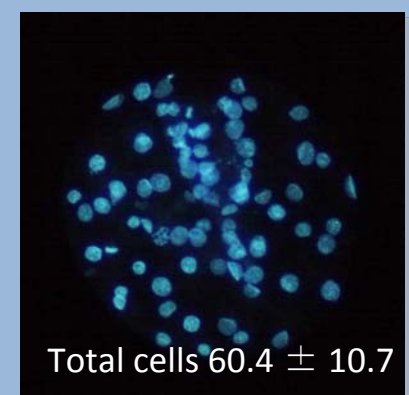
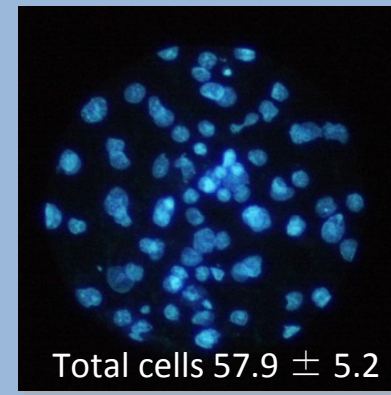
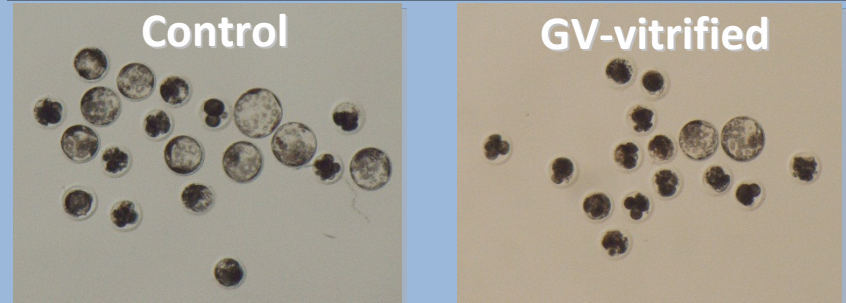
The impact of nuclear stage

- 2. *in vitro* development -

IVF/IVC



Blastocyst quality (Day 7)



No difference!

Egerszegi et al. 2013 Cryobiology

Oocytes vitrified at GV stage have competence to be high quality blastocysts

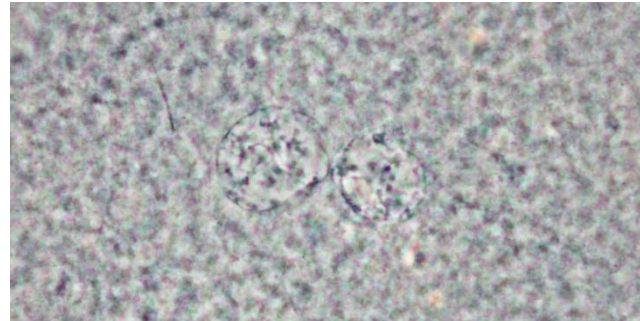
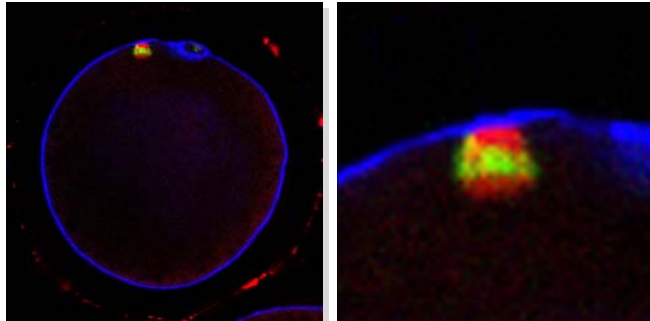
The impact of nuclear stage

- 3. cytoplasmic alterations -

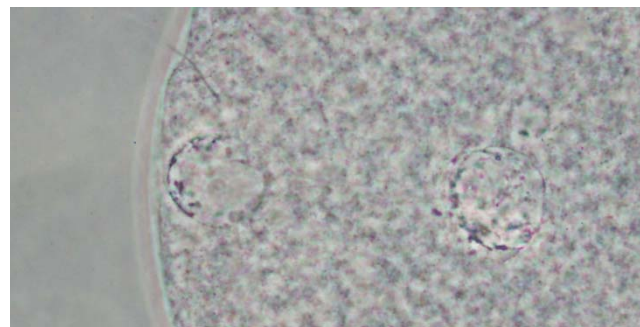
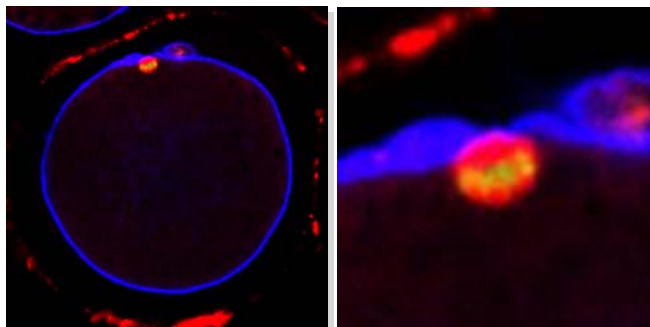
Cytoskeleton (MII)

Pronuclear formation (IVF)

Control

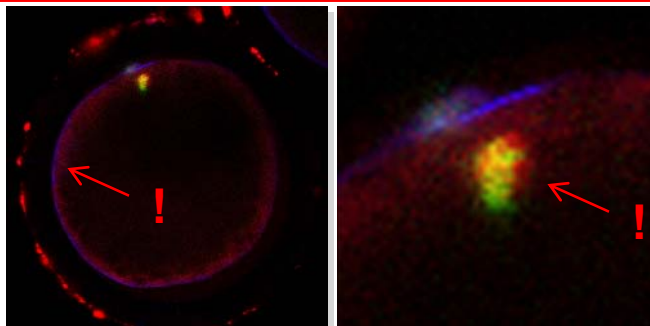


GV-
vitrified



No
difference!

MII-vitrified

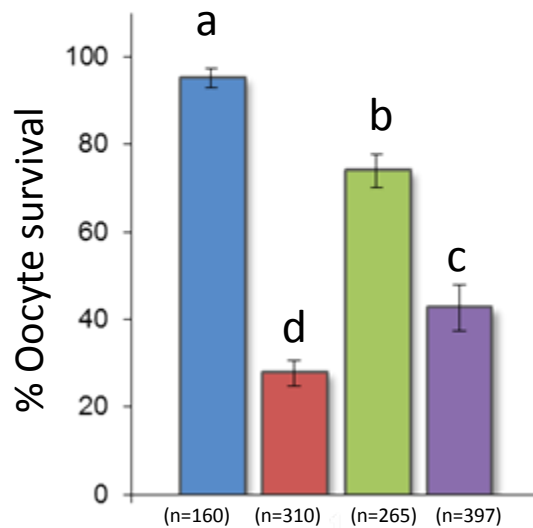


Optimizing the protocol for immature oocytes; - 1. The impact of permeable CPA -

ethylene glycol (EG) vs. propylene glycol (PG)

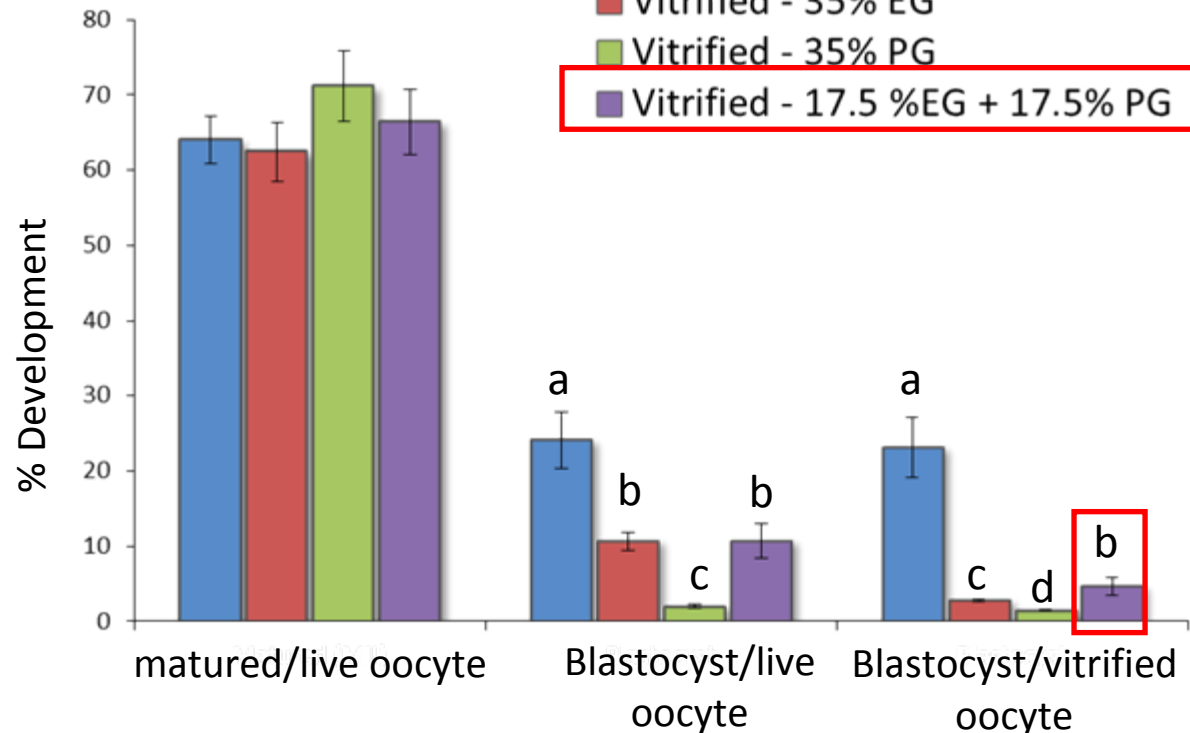
Live/dead status (IVM 44)

- Control
- Vitrified - 35% EG
- Vitrified - 35% PG
- Vitrified - 17.5 %EG + 17.5% PG



Maturation • Embryo development (IVF) • Blastocyst yield

- Control
- Vitrified - 35% EG
- Vitrified - 35% PG
- Vitrified - 17.5 %EG + 17.5% PG



Somfai et al. 2013 J Reprod Dev

The combination of EG and PG is superior to single CPA

Optimizing the protocol for immature oocytes; - 2. the impact of warming temperature -

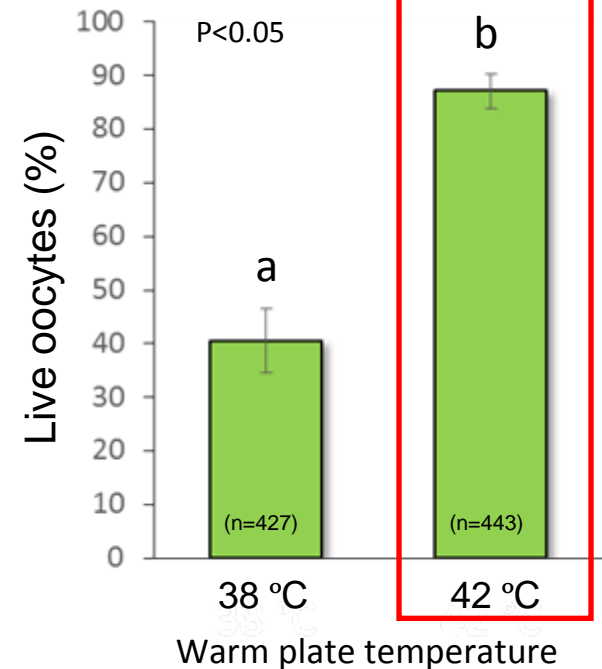
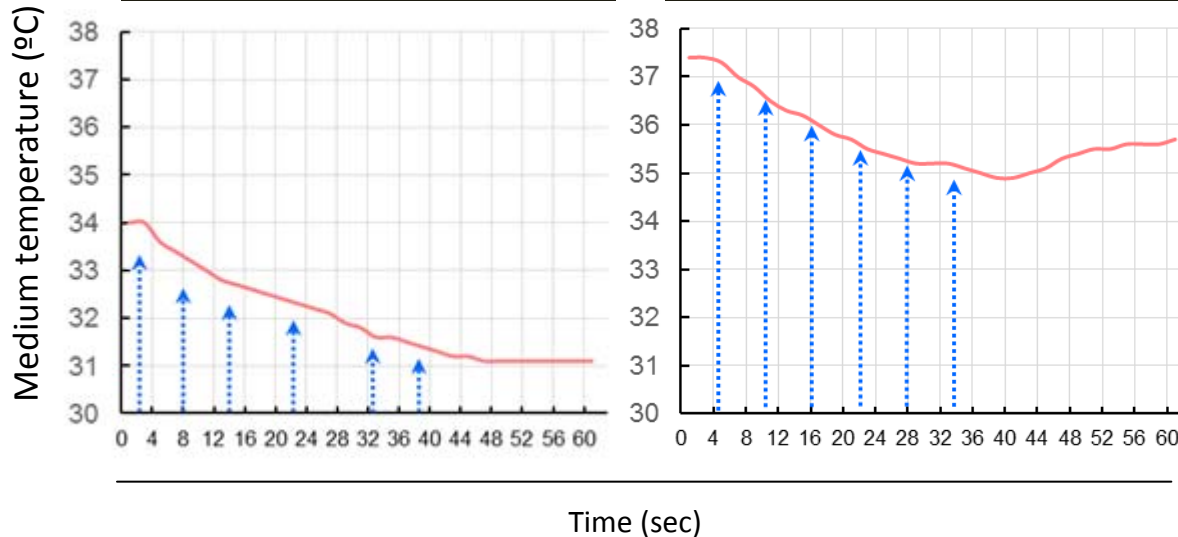
The changes of medium temperature during warming

Survival of vitrified oocytes

←..... Insertion point of a vitrified microdrop

38 °C warm plate

42 °C warm plate

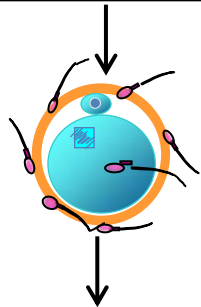


Warming temperature determines survival !

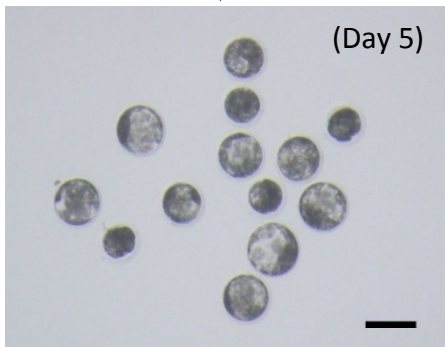
Transfer of embryos produced by IVM/IVF/IVC of vitrified immature oocytes

Warming of vitrified oocytes at 42 °C

IVF, embryo culture (PZM5)

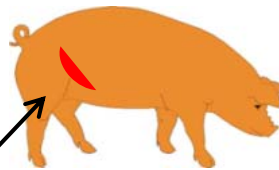


(Day 5)



Enough blastocysts for embryo transfer!

Embryo transfer



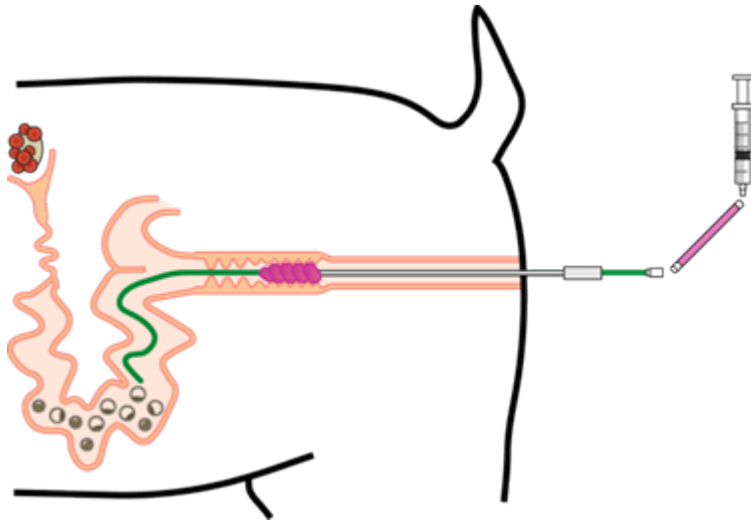
Recipient	Embryos transferred	Embryo stage	Live piglets born	Birth weight (kg)
1	16	Blastocyst	4	1.50±0.04
2	27	Blastocyst	6	1.53±0.06
3	17	Blastocyst	5	1.34±0.2
4	13	Blastocyst	3	1.37±0.04
5	23	Blastocyst + morula	2	1.40±0.0

Somfai et al. 2014 PLOS One

Piglets could be produced from cryopreserved oocytes for the first time !

Non-surgical ET in pigs

Length: 1.2 m, Outer diameter: 3 mm, Working canal: 0.5 mm

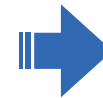
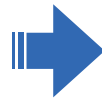
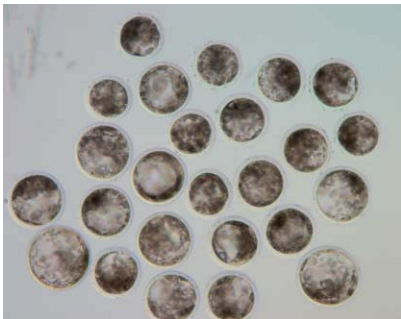


Deep
intrauterine
catheter

Spiral guide spirette

0.25-ml straw

Takumi catheter (Fujihira Industry Co. Ltd)



Pregnancy results after non-surgical ET of pig embryos

Treatment	IVP / fresh	In vivo / fresh	In vivo / vitrified
Blastocysts transferred (per recipient)	1944 (23 –39)	800 (12–23)	459 (10–19)
Recipients	68	47	31
Pregnancy (%)	23 (33.8)	20 (42.6)	12 (38.7)
Farrowing (%)	17 (25.0)	16 (34.0)	9 (29.0)
Piglets born (litter size)	78 (4.6 ± 2.7)	110 (6.9 ± 2.3)	45 (5.0 ± 3.0)
Efficiency of piglet production*	4.0%	13.8%	9.8%

Conclusions

- Vitrification and transfer of pig embryos at the pronuclear stage may be advantageous;
 - 1) selection of monospermic zygotes
 - 2) avoiding the stresses of in vitro culture
 - 3) lipid removal is not necessary
- Porcine oocytes vitrified at the immature stage by an optimized system can serve as potential source for high quality IVP embryos with the capacity to develop to term

Acknowledgements

Thanks for your attention!



NARO



Tamas Somfai
Masaya Geshi
Shinya Watanabe
Satoshi Akagi
Seiki Haraguchi
Yuji Hirao
Thanh Dang-Nguyen



Koji Yoshioka



Kazuhiro Kikuchi
Hiroyuki Kaneko
Junko Noguchi
Michiko Nakai
Nguyen Thi Men



Naomi Kashiwazaki
Makoto Nakada
Naoki Maedomari



András Dinnyés



Heiner Niemann
Dagmar Sage



József Rátky
István Egerszegi

搭車位置
(Xiangshan)

台大醫院 NTU HOSPITAL

2月台
Platform

