

## 養豚農場での活用を想定した非外科的胚移植技術の検討

大曲秀明<sup>1)†</sup> 三角浩司<sup>2)</sup> 宮下美保<sup>1)</sup> 永瀨成樹<sup>1)</sup> 山下祥子<sup>3)</sup>星 宏良<sup>3)</sup> 平山祐理<sup>2)</sup> 吉岡耕治<sup>4)</sup>

- 1) 佐賀県畜産試験場 (〒 849-2305 武雄市山内町宮野 23242-2)
- 2) 佃家畜改良センター (〒 961-8511 西白河郡西郷村小田倉字小田倉原 1)
- 3) 株機能性ペプチド研究所 (〒 999-3766 東根市神町西 4-5-1)
- 4) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒 305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2018年7月1日受付・2018年12月7日受理)

## 要 約

胚移植による子豚の生産を養豚農場において実施可能とするため、ガラス化保存胚の加温・希釈後の保温時間及び非外科的胚移植におけるレシピエントの体勢について検討した。ドナー胚としてガラス化保存胚を加温・希釈処理した直後の胚及び同処理後38℃の温湯内で2時間保温した胚を用いた。移植操作時のレシピエントの体勢は、立たせた状態(立位)及び鎮静下で横たわって静止した状態(横臥位)とした。移植は、子宮深部注入カテーテルを用いた非外科的胚移植を計25頭を実施した。その結果、どちらの胚を用いても横臥位でのみ産子が得られた。この結果を受け、佐賀県畜産試験場で加温・希釈処理したガラス化保存胚を、市販の魔法瓶を用いて38℃温湯内で保温した状態で県内の養豚農場2農場に輸送し、農場内で飼養する計10頭のレシピエントを横臥位にして非外科的に移植した。その結果、1頭で受胎を確認したが、分娩には至らなかった。——キーワード：非外科的胚移植，豚，ガラス化保存胚。

-----日獣会誌 72, 285~290 (2019)

一般的な養豚農場では、種豚としておもにデュロック種の雄と、おもにランドレース種と大ヨークシャー種の2元交雑種の雌の種豚を交配することで肉用豚となる3元交雑種の子豚を生産する仕組みが成り立っており、種豚は外部の種豚生産農場から生体の豚個体で導入している。種豚導入のための個体の移動は、導入先の農場への病原体の侵入リスクを伴う。近年では豚流行性下痢(PED)が全国的に流行した例があり、そのリスクは高くなっている。一方で、オーエスキー病に感染した雌豚から胚を回収し、トリプシン処理して非感染雌に胚移植すると、非感染の子豚が得られる [1, 2] ことから、豚の胚移植技術は病原体に汚染された豚群の清浄化に利用されている [3]。また、胚を液体窒素中で保存できれば、遺伝資源として能力の高い血統(種豚)の長期保存が可能になり、さらに保存した胚を専用の容器に入れて輸送することで、優良血統の広域流通も可能となる。

われわれは種豚導入システムとして胚移植技術を活用

することを考え、実際に佃家畜改良センター(福島県)でガラス化保存した種豚由来胚を宅配便で佐賀県畜産試験場に輸送し、胚移植により産子を得ている [4]。しかし、その場合には外科的手法(開腹手術)による胚移植で子豚生産を行っており、一般的な養豚農場で胚移植を実用化させるには、開腹手術によらない非外科的胚移植手法で受胎・分娩させることが必要になる。

外科的胚移植は、開腹手術を行うための特殊な設備や技術が必要であり、一般的には普及していない。一方、開腹手術を行わず、胚を子宮内へ移植する胚移植は、1968年に最初の妊娠例が報告されていたものの [5]、豚の子宮頸管の形状は個体によってさまざまであり、子宮は長く蛇行しているため、非外科的に子宮深部に胚を移植することは困難であるとされていた。Suzukiら [6] は、市販の子宮深部注入人工授精用カテーテルを用いて、体内発育胚、体外培養胚を非外科的に移植し、産子を生産している。また、Yoshiokaら [7] はスパイラ

† 連絡責任者(現所属)：大曲秀明(佐賀県西部家畜保健衛生所)

〒 843-0024 武雄市武雄町富岡 12266

☎ 0954-22-3185 FAX 0954-20-1013

E-mail : oomagari-hideaki@pref.saga.lg.jp

ル型カテーテルである外筒及びポリエチレン製で先端が横穴式の内筒カテーテルからなる非外科的胚移植用子宮深部注入カテーテルを開発し、豚体外生産胚の非外科的移植において、25%の分娩率と平均4.6頭の子豚を得ている。

そこで本報では、種豚導入におけるコスト及び病原体侵入リスクを低減する手段として胚移植技術を活用することを想定し、加温・希釈処理したガラス化保存胚を、胚移植用子宮深部注入カテーテルによって非外科的に移植する技術の生産農場での適用性を検討するため、加温・希釈処理後、数時間経過したガラス化保存胚を用いて非外科的に胚移植を行うとともに、移植時の受胎豚（レシピエント）の体勢について検討した。また、本研究を実施した佐賀県畜産試験場を種豚供給機関及び胚供給機関と想定して、試験場内で加温・希釈処理したガラス化保存胚を県内の養豚農場に輸送し、農場保有のレシピエントに移植して受胎性を調査した。

## 材料及び方法

本研究は、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号、最終改正：平成25年環境省告示第84号）に従い実施した。

**胚の回収：**供胚豚として本研究を実施した佐賀県畜産試験場で飼養するランドレース種雌豚（約7～13カ月齢、体重約110～130kg）を用いた。交配後25～35日の妊娠豚にクロプロステノールNaとして0.562mgのプロスタグランジンF<sub>2α</sub>（PGF<sub>2α</sub>；プラネート、㈱インターベット、東京）を投与し、24時間後にふたたびPGF<sub>2α</sub>を同量投与した。第2回のPGF<sub>2α</sub>投与時に1,500 IU ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG；動物用セロトロピン、あすかアニマルヘルス㈱、東京）を投与し、さらに72時間後に500 IU ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG；動物用プベローゲン1,500単位、日本全薬工業㈱、福島）を投与して、発情及び排卵を誘起した。これらのホルモン製剤はすべて頸部筋肉内に投与した。hCG投与翌日及び翌々日に人工授精を実施した。人工授精に用いた精液は佐賀県畜産試験場で飼養するランドレース種雄豚から採取し、モデナ液で希釈して用いた。hCG投与翌日（＝人工授精実施日）を0日とし、5日後もしくは6日後に外科的手法により両子宮角を、塩化マグネシウム六水和物を0.49mmol/l、塩化カルシウム二水和物を0.68mmol/l及びゲンタマイシンを0.05%（w/v）添加したダルベッコのリン酸緩衝生理食塩液（PBS）50mlで灌流し、胚を回収した。なお回収は、ペントバルビタールナトリウム（ソムノベンチル、10～20mg/kg、共立製薬㈱、東京）の静脈投与により全身麻酔し、イソフルラン（動物用イソフルラン、1.5～3%、㈱インターベット、東京）と酸素を混合したガスの吸入によ

り麻酔状態を維持して実施した。

**胚のガラス化保存：**胚のガラス化保存は Misumi ら [8] の手法に準じた。ガラス化保存に用いる溶液は1次平衡液、2次平衡液、ガラス化保存液の3種類からなり、1次平衡液は基礎培地にエチレングリコール（アムレスコ社、U.S.A.）を1.8mol/lになるように添加した溶液を用い、2次平衡液は基礎培地にそれぞれエチレングリコールを1.8mol/l、トレハロース（トレハ、㈱林原、岡山）を0.3mol/l、ポリエチレングリコール（ポリエチレングリコール#6,000、平均分子量7,400～10,200、ナカライテスク㈱、京都）を1%（w/v）となるように添加した溶液を用いた。基礎培地は、20mmol/l HEPESで緩衝した豚後期胚培養用培地（PBM、㈱機能性ペプチド研究所、山形）を用いた [9]。ガラス化保存液は、基礎培地にエチレングリコールを6.0mol/l、トレハロースを0.6mol/l、ポリエチレングリコールを2%（w/v）となるように添加した溶液を用いた。各溶液は、あらかじめ38℃に保温した。回収した胚は38℃の温度条件下で1次及び2次平衡液にそれぞれ5分間浸して平衡した。胚のガラス化保存は、micro volume air cooling（MVAC）法 [8] により行い、2次平衡後の胚はガラス化保存液中に40秒浸漬したのち、胚スティック（ミサワ医科工業㈱、茨城）に載せて、液体窒素によりあらかじめ冷却したストロー内に封入し、ガラス化保存した。

**胚の加温・希釈：**胚の加温・希釈液は、基礎培地にエチレングリコールを1.8mol/l及びトレハロースを0.3mol/lとなるように添加した溶液を用い、38℃条件下で加温・希釈液中に3分間静置して凍結保護物質を除去した。その後、PBM中に浮遊させ0.25mlストロー（富士平工業㈱、東京）に封入した。

なお、胚のガラス化保存及び加温・希釈で用いた溶液はすべて動物生体材料を含まないものである。

**胚移植：**レシピエントの発情は雄豚の乗駕を許容することを確認して判定した。移植の時期は、乗駕開始日を0日として、雄許容期間が2日間の場合は乗駕許容開始後4日、3日間の場合には乗駕許容開始後5日とした。スパイラルガイドカテーテルと移植用カテーテルからなる子宮深部注入カテーテル（富士平工業㈱、東京）（図1）を用い、胚を封入した0.25mlストローを装着して移植液で押し出すようにして子宮内へ移植した。移植操作時のレシピエントの姿勢については、立たせた状態（立位）（図2A）と豚用鎮静剤のメシル酸マホブラジン製剤20ml（マフロパン1%注射液、共立製薬㈱、東京）を頸部筋肉内に20ml投与し、横たわって静止した状態（横臥位）（図2B）の双方で実施した。妊娠診断は、乗駕許容開始日を0日として、25～30日に超音波診断装置（HS-1500V、富士平工業㈱、東京）を用いて実施した。調査項目は受胎率、分娩率、妊娠期間、試験区毎の

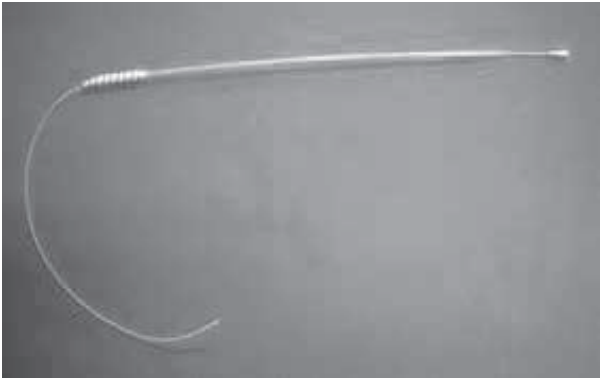


図1 非外科的胚移植子宮深部注入カテーテル



図3 養豚農場での非外科的胚移植



図2 立位 (A) 及び横臥位 (B) での非外科的胚移植



図4 胚の輸送に用いた魔法瓶

総産子数（雌雄別）、一腹産子数及び子豚生産効率（産子数／移植胚数×100）とした。

**ガラス化保存胚の加温と希釈処理後の時間経過並びに移植時のレシピエントの姿勢が胚の受胎性に及ぼす影響 (実験1)：**レシピエントには佐賀県畜産試験場で飼養しているランドレース種及びブランドレース種と大ヨークシャー種の一代交雑種 (LW) の雌豚合計25頭を用いた。レシピエントは立位または横臥位で移植した。レシピエント1頭につき、加温・希釈した11～19個の胚盤胞～拡張胚盤胞期胚を0.25mlストローに封入後、試験区Aではただちに、試験区Bでは38℃の微温湯450mlの入った市販の魔法瓶内に、2時間収納・保温した後に移植し

た。なお0.25mlストローは温湯で濡れないよう、ビニール製の袋で覆った。

**養豚農場における胚移植の実証 (実験2)：**佐賀県畜産試験場において加温・希釈したガラス化保存胚を県内のC農場とD農場の2養豚場まで車両で輸送した。C農場は同試験場から約15kmの距離にあり、母豚400頭を飼育、D農場は同試験場から約20kmの距離にあり、母豚100頭を飼育していた。両農場では飼育する一代交雑種LWの雌豚計10頭 (C農場：8頭、D農場：2頭) について、すべて横臥位にして胚移植を実施した (図3)。移植1回につき、胚盤胞～拡張胚盤胞期胚11～13個を用い移植したが、その場合、加温・希釈胚は実験1の試験区Bと同様の手法で0.25mlストローに封入し魔法瓶に収納・保温し、そのまま農場に輸送して移植に用いた (図4)。

**統計解析：**統計ソフト (Stat View Version5.0, SAS Institute, U.S.A.) を用い、移植胚数については二元配置の分散分析、妊娠期間、総産子数及び生時体重については一元配置の分散分析を行い、危険率5%未満になった場合に有意差があるものとし、さらに多重比較 (Bonferroni/Dunn法) を行った。パーセンテージ値で示した妊娠率、分娩率、子豚生産効率に関してはFisherの

養豚農場での活用を想定した非外科的胚移植技術の検討

表1 ガラス化保存胚の非外科的移植による受胎・分娩成績

試験区分 加温・希釈処理後の移植時期	A		B	
	直 後		2時間保温後	
	立 位	横臥位	立 位	横臥位
移植時の体勢				
移植頭数 (品 種) <sup>*1</sup>	7 LW	10 L, LW	4 LW	4 LW
移植胚数	113 (16.1±2.0 <sup>*2</sup> )	154 (15.4±2.8)	54 (13.5±1.9)	59 (14.8±1.5)
受胎率 (%)	0 <sup>a</sup>	50.0 <sup>b</sup>	0 <sup>ab</sup>	25.0 <sup>ab</sup>
分娩率 (%)	0	30.0	0	25.0
妊娠期間 (日)	— <sup>*3</sup>	115.7±0.6	—	114.0
総産子数	—	8 <sup>*4</sup> (2.7±2.1)	—	4
総産子数(雄:雌)	—	2:6 <sup>*4</sup>	—	3:1
生時体重 (kg)	—	0.93±0.28	—	1.19±0.71
子豚生産効率 <sup>*5</sup> (%)	0 <sup>a</sup>	5.2 <sup>b</sup>	0 <sup>ab</sup>	6.8 <sup>bc</sup>

\*1 LW: ランドレース種と大ヨークシャー種の一代交雑種, L: ランドレース種

\*2 1腹平均±標準偏差

\*3 データなし

\*4 死産3頭を含む

\*5 産子数/移植胚数×100

a, b, c 同一行内の異なる文字間に有意差あり (P<0.05)

表2 養豚農場におけるガラス化保存胚の横臥位での移植による受胎・分娩成績

実施農場	受胚豚の品種	加温・希釈から移植までに要した時間 (分)	移植胚数 (個)	受胎の有無*	分娩の有無*
C	LW	100	19	-	-
C	LW	100	12	-	-
C	LW	75	15	-	-
C	LW	85	14	-	-
D	LW	125	14	-	-
C	LW	90	11	+	-
C	LW	100	15	-	-
C	LW	110	15	-	-
D	LW	110	13	-	-
C	LW	95	13	-	-
合計 (平均±標準偏差)			70 (14.1±2.2)	10.0%	0.0%

\* - : 無し, + : 有り

胚の輸送に要した時間: C農場約30分, D農場約40分

直接確率検定により各試験区間の差異を比較した。

成 績

**実験1:** ガラス化保存胚の非外科的移植による受胎及び分娩成績を表1に示した。両試験区ともに横臥位での移植の場合に産子が得られた。分娩率及び子豚生産効率は、それぞれ試験Aで30.0%及び5.2%、試験Bで25.0%及び6.8%であった。試験区Aでは受胎率と子豚生産効率で立位と横臥位との間に有意な差が認められた。また、試験区Bの横臥位における子豚生産効率は、試験区Aの立位に比べ有意に高かった。その他、両試験区間及び各試験区内の移植姿勢別の比較では、差は認められなかった。

**実験2:** 養豚農場へ実際に胚を輸送して実施した非外

科的移植による受胎・分娩成績を表2に示した。C農場の雌豚1頭で受胎を確認したが、分娩には至らなかった。

考 察

ガラス化保存胚を移植するためには、加温・希釈処理を施すための施設が必要になる。加えて、加温・希釈した胚を確実に子宮内に移植するためには、開腹手術による移植ができる施設も同時に必要となる。われわれは輸送したガラス化保存胚由来産子を得ているが[4]、その報告では開腹手術による胚移植によって子豚を生産した。しかし、外科的胚移植を一般の養豚農場で実施することは現実的ではない。また、ガラス化保存胚の保存溶液に含まれる高濃度の凍結保護物質(エチレングリコール)を除去する作業(加温・希釈処理)についても

養豚農場で実施することは困難なことから、ガラス化保存胚を佐賀県畜産試験場で加温し、胚を保温した状態で養豚農場に持ち込み、子宮深部注入用カテーテルを用いて、農場内の雌豚に非外科的に移植することを想定して本試験を実施した。

佐賀県畜産試験場で加温したガラス化保存胚を県下の養豚農場へ輸送して胚移植を実施する場合、ガラス化保存胚の加温・希釈処理から胚移植を行うまでに時間を要するため、その間に胚の受胎能が損なわれていないか確認する必要がある。そこで実験1では、加温・希釈処理後の時間経過の影響を調べるため、加温・希釈処理後の胚をただちに移植に用いた場合(試験区A)と、養豚農場への胚輸送時に用いる市販の魔法瓶に収納して38℃の微温湯内で2時間保温した後に移植に用いた場合(試験区B)に分けて検討した。また、これまでの佐賀県畜産試験場の雌豚飼養施設(ストール飼育)での非外科的胚移植の実施において、子宮深部注入用カテーテルを挿入する際にレシピエントが前後左右に動いて移植操作に支障をきたすケースもあったことから、移植操作を確実に実施するため、移植前に鎮静剤を投与し、レシピエントを横たわらせて静止させた状態(横臥位)で移植を試みた。その結果、ガラス化保存胚を加温・希釈処理後ただちに移植した試験区Aのみならず、加温・希釈処理後2時間経過したガラス化胚を移植した試験区Bでも産子が得られたことから、胚を養豚農場に輸送してレシピエントに移植することにより産子を得る可能性を示すことができた。また、試験区A及びBともにレシピエントを横臥位にして移植することにより産子が得られたが、立位で移植した場合には受胎せず、産子は得られなかった。この点に関して、横臥位での移植の場合には鎮静剤処置によってレシピエントを不動化することが可能となり、移植操作をスムーズに行えたが、立位での移植では外子宮口から子宮頸管へスパイラルガイドカテーテルを挿入する際にレシピエントが動き、移植をスムーズに行えないことが影響していることが考えられる。このことから、産子を得るためには鎮静剤を投与してレシピエントを不動化することが有効であると考えられた。なお、鎮静剤処置が移植操作時の刺激に対する受胎阻害を緩和している可能性もあることから、今後検討する必要がある。

実験1の結果を踏まえ、実験2では実際に養豚農場に胚を輸送して移植を実施したところ、1頭受胎したものの分娩には至らなかった。実験1で、受胎率・分娩率とも試験区間に有意な差はなかったが、加温・希釈直後のガラス化胚を用いた試験区Aのほうが高い傾向にあったことから、ガラス化保存胚の加温・希釈処理後の生存性に着目し、処理直後の胚と処理後2時間魔法瓶内に収納・保温した胚で体外培養による比較を行った。その結

果、培養48時間後の生存率に差はなかったが、孵卵率は2時間保温胚で低い傾向にあり(未発表)、胚の発生能の低下が示唆された。本試験で用いた魔法瓶内の温湯についても、2時間経過した時点で約2℃の温度低下を確認し、少なくとも温度の低下が胚発生能に影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、胚を輸送する際の車両の振動による影響も考えられることから、今後胚の適切な輸送法についても検討していく必要がある。しかしながら、受胎は確認されたことから、将来的に養豚農場で産子を生産できる可能性は示すことができた。

試験場等で加温したガラス化保存胚を輸送し、養豚農場で産子を生産するためには、まず加温・希釈後の胚の発生能を維持した状態で養豚農場に輸送する必要があると考えられた。今回は温度に着目したが、他の要因についても改めて検討することとしている。また移植操作についても、今回はレシピエントを静止させるために、鎮静作用のある薬剤を投与し、横臥位で移植したが、この場合外陰部と床面の距離が近く、カテーテルが床に触れる等、衛生面での課題が残った。そのため、今後はレシピエントの動きを制御しながら立位の状態でも確実に移植できる手法について検討を重ねることとしている。

本研究は、イノベーション創出基礎的研究推進事業「受精卵移植産業の形成を目指した種豚生産・導入システムの構築」(平成22~24年度)の研究助成を受けた。

本研究を実施するに当たり、豚の飼養管理及び胚の回収・移植作業に御協力頂いた佐賀県畜産試験場の関係者各位に深謝する。

## 引用文献

- [1] James JE, James DM, Martin PA, Reed DE, Davis DL : Embryo transfer for conserving valuable genetic material from swine herds with pseudorabies, J Am Vet Med Assoc, 183, 525-528 (1983)
- [2] Wrathall AE : Embryo transfer and disease transmission in livestock: A review of recent research, Theriogenology, 43, 81-88 (1995)
- [3] 小島敏之 : 豚における繁殖技術研究の最新の動向, All About Swine, 日本SPF研究会, 17, 11-19 (2000)
- [4] 大曲秀明, 三角浩司, 宮下美保, 永渕成樹, 御澤弘靖, 山下祥子, 星 宏良, 平山祐理, 吉岡耕治 : 種豚から個体ごとに採取した胚盤胞期および拡張胚盤胞期ガラス化保存胚の胚移植による子豚生産効率, 日本養豚学会誌, 52, 1-7 (2015)
- [5] Polge C, Day BN : Pregnancy following non-surgical egg transfer in pigs, Vet Rec, 82, 712 (1968)
- [6] Suzuki C, Iwamura S, Yoshioka K : Birth of piglets through the non-surgical transfer of blastocysts produced *in vitro*, J Reprod Develop, 50, 487-491 (2004)
- [7] Yoshioka K, Noguchi M, Suzuki C : Production of piglets from *in vitro*-produced embryos following non-surgical transfer, Anim Reprod Sci, 131, 23-29 (2012)
- [8] Misumi K, Hirayama Y, Egawa S, Yamashita S, Hoshi H, Imai K : Successful production of piglets derived

from expanded blastocysts vitrified using a micro volume air cooling method without direct exposure to liquid nitrogen, *J Reprod Develop*, 59, 520-524 (2013)  
[ 9 ] Mito T, Yoshioka K, Yamashita S, Suzuki C, Noguchi

M, Hoshi H : Glucose and glycine synergistically enhance the in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium, *Reprod Fert Develop*, 24, 443-450 (2012)

---

### Consideration of Non-surgical Embryo Transfer at Pig Farms

Hideaki OMAGARI<sup>1)†</sup>, Koji MISUMI<sup>2)</sup>, Miho MIYASHITA<sup>1)</sup>, Shigeki NAGAFUCHI<sup>1)</sup>,  
Shoko YAMASHITA<sup>3)</sup>, Hiroyoshi HOSHI<sup>3)</sup>, Yuri HIRAYAMA<sup>2)</sup> and Koji YOSHIOKA<sup>4)</sup>

- 1) *Saga Prefectural Livestock Experiment Station, 23242-2 Yamauchichomiyano, Takeo, 849-2305, Japan*
- 2) *National Livestock Breeding Center, 1 Odakurahara, Odakura, Nishigo-mura, Nishishirakawa-gun, 961-8511, Japan*
- 3) *Research Institute for the Functional Peptides, 4-5-1 Kamimachinishi, Higashine, 999-3766, Japan*
- 4) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

#### SUMMARY

To develop a procedure for piglet production by embryo transfer (ET) at pig farms, we examined the effects of (1) the incubation period after the warming of vitrified embryos and (2) the body position of the ET recipients on the pregnancy success rate. For donor embryos, we used vitrified embryos just after warming or incubated at 38 °C for 2 hours after warming. The embryos were transferred non-surgically via a deep intrauterine catheter into the uterus of 25 recipient sows in a standing or lying position. Piglets were born only when the non-surgical ET was performed with the recipient in a lying position, with or without the 2-hour incubation period. Based on these results, vitrified and warmed embryos in a thermos bottle containing water at 38 °C were transported from Saga Prefectural Livestock Experiment Station to two commercial pig farms in Saga Prefecture. The transported embryos were transferred non-surgically to a total of 10 sows in a lying position at farms. As a result, one sow became pregnant but failed to farrow.

— Key words : non-surgical embryo transfer, pig, vitrified embryo.

† Correspondence to (Present address) : Hideaki OMAGARI (Saga Prefectural Western Laboratory for Livestock Health and Sanitation)

12266 Takeochotomioka, Takeo, 843-0024, Japan

TEL 0954-22-3185 FAX 0954-20-1013

E-mail : oomagari-hideaki@pref.saga.lg.jp

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 72, 285 ~ 290 (2019)