

家畜体外受精卵生産用無血清培地の 開発と製品化

(株)機能性ペプチド研究所 研究部
(代表：星 宏良)

1. 研究開発の背景と経緯

海外からの安い牛肉の大量輸入、乳価の低迷、穀物飼料の高騰など、近年、国内畜産業における生産者の経営環境は、ますます厳しい状況となっている。このような困難な国内畜産業の課題を解決する切り札の1つとして、肉質の良い和牛や泌乳量の多い乳牛を低コストでかつ効率的に生産できる牛体外受精卵移植を活用した先進的繁殖技術が注目されている。

体外受精卵移植技術とは、と畜雌牛から未成熟卵子を採取し、体外培養（試験管内）で成熟・受精・発生させて受精卵を生産し、受卵牛に非外科的に移植する技術（図1）であり、国内では特に乳牛を仮腹にして高級和牛子牛を低コストで効率よく生産する技術として、大きな期待が寄せられている。平成17年度の牛受精卵移植頭数は68,824頭で、そのうち体外受精卵移植頭数は10,726頭と全体の約16%を占めている（農林水産省 全国統計）。

しかし、従来の体外受精卵培養法（血清添加培地を使用）では、移植可能な受精卵の発生効率が悪く、十分な数の受精卵を生産できないといった問題があった。凍結体内受精卵の受胎率が45%以上に対し、体外受精卵の受胎率は35%程度であるという報告（農林水産省 全国統計）があり、また、体内受精卵移植に比べて妊娠中の流産や死産が多い、過発育した子牛の出産による難産や死産のリスクが高いといった問題が指摘され、これまで体外受精卵移植は畜産現場であまり普及が進んでいなかった。

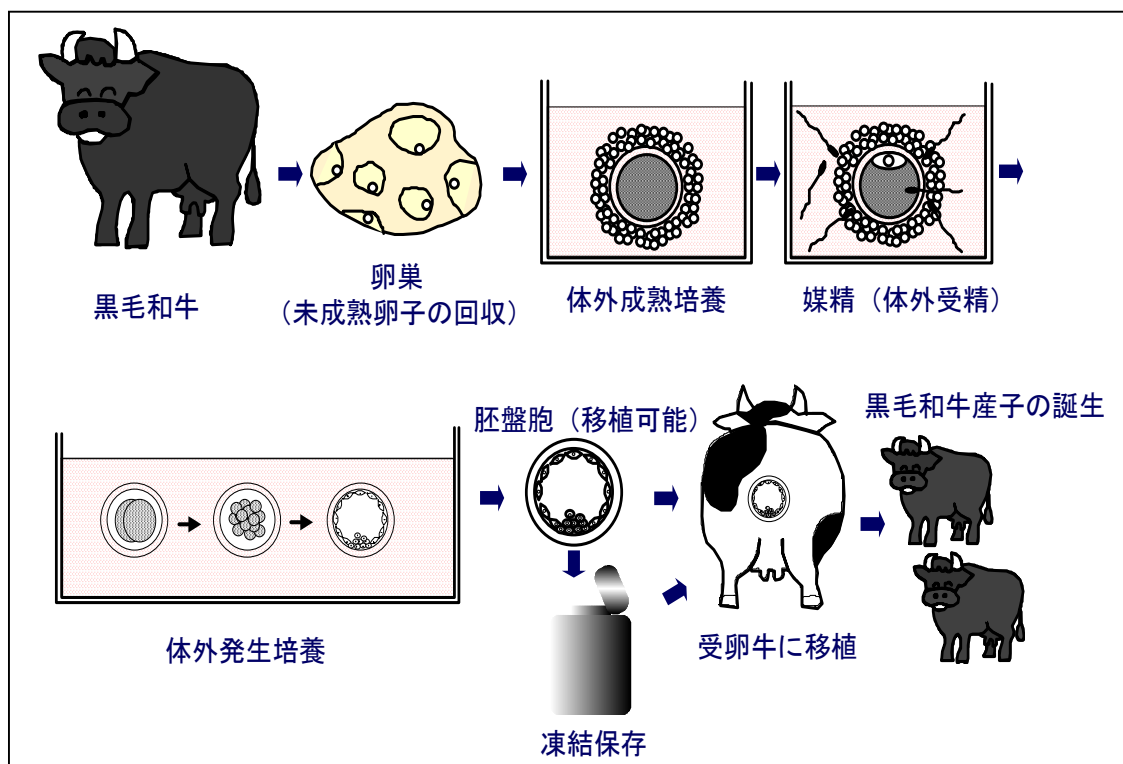


図1. 牛体外受精卵移植技術の概要

こうした原因の1つが体外受精卵の品質にあると考えられ、高品質体外受精卵を効率的に生産する革新的な技術の確立が課題となっていた。

そこで、本研究グループは、高品質な体外受精卵を効率よく生産するために、体外培養に用いる培養液（培地）として、血清を含まない新しいタイプの培地（無血清培地）が有効と考え、この培地の開発と製品化を目指した。その結果、国内で初めてウシ卵子の成熟、受精、受精卵（胚）の発生を効率よく進める新規無血清培地キットの開発及び製品化に成功した。

この新規培地キットで生産した体外受精卵は品質が良く、体外受精卵移植の課題と言われている低受胎率や出産時の高死産率を改善できることを明らかにした。

現在、この革新的培地は、日本国内で唯一市販されている牛体外受精卵生産用培地で、大学、独立行政法人、都道府県等の家畜繁殖研究者のみならず、公的な受精卵供給センター、農協共済診療所や個人開業の獣医、農業法人、飼料・乳業会社等民間企業など畜産現場に直結した技術者にも幅広く受け入れられている。また、研究成果を国際専門誌へ数多く発表したことで、無血清培地キットの存在が海外の研究者・技術者にも知られるようになり、外国（韓国など）にも無血清培地が定期的に輸出され、家畜の改良や増殖、基礎研究の推進など国際的にも大いに貢献を行なっている。

2. 研究開発の概要と成果

と畜された雌牛から採取した卵子を利用して体外受精卵を生産するために、未成熟卵子の体外成熟培養、体外受精、体外受精卵培養といった一連の培養操作が行なわれる。通常これらの培養（卵子成熟培養、受精卵培養）には血清培地が用いられる。

培地に添加する血清としては一般的に胎児ウシ血清が用いられるが、添加する血清ロットの違いにより培地の生物活性がまちまちで、受精卵の生産が安定しない、また、生体材料であるがゆえに細菌、ウイルス、マイコプラズマ、異常プリオンの感染などによるリスクが避けられないといった短所がある。

そこで、本研究グループは、安全でかつ品質の良いウシ体外受精卵を効率的に生産するために、ロットによる変動がない独自の無血清培地の開発および製品化を目指した(図2)。

(1) 卵子成熟用無血清培地の開発と製品化

細胞成長因子として知られる上皮成長因子；EGFファミリー（EGF や TGF- α ）に卵子成熟促進活性を発見し、これらの因子を添加した無血清培地を開発・製品化した。従来の血清培地の卵子成熟率約65%に対して、この無血清培地では70~75%という高い値が得られた。

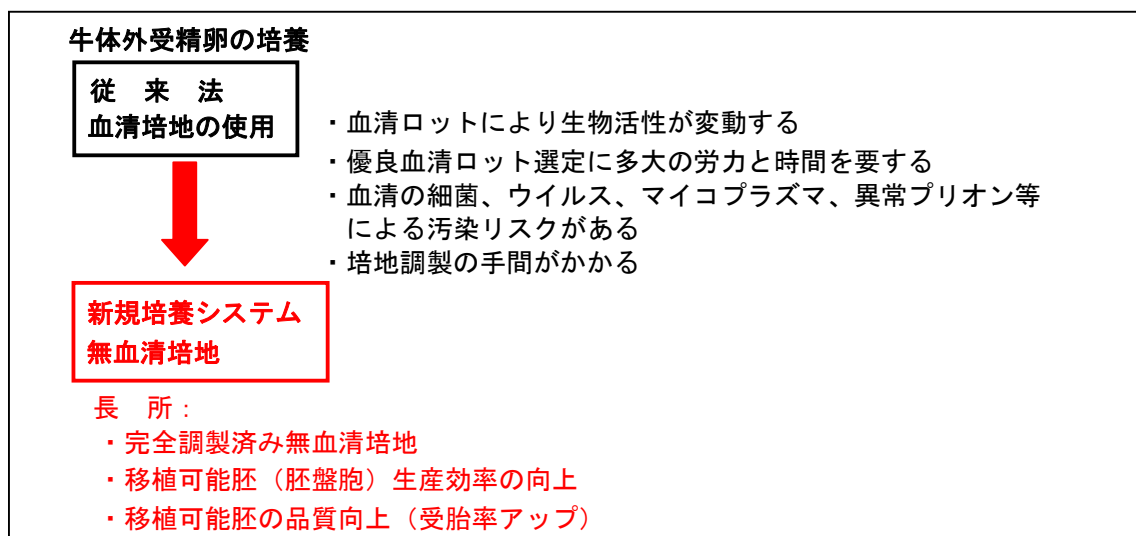


図2. 牛体外受精卵培養システムの現状と無血清培地の特徴

(2) 体外受精効率を向上させる媒精液の開発と製品化

受精促進活性を示す抗酸化剤グルタチオンの添加や新規の卵管由来糖タンパク質（BOGP）を精製、同定し、これらの成分を利用した独自の媒精液を開発・製品化した。従来の媒精液ではほとんど受精できなかった種雄牛精子でも、新規に開発した媒精液を用いると、著しく高い受精能（4.7倍）を示した。

(3) 受精卵発生用無血清培地の開発と製品化

ウシ顆粒膜細胞の培養上清から、胚発生促進活性を有する蛋白質性因子（TIMP-1：

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1) を独自に精製・同定することに成功した。また、細胞成長因子として知られる FGF-2, TGF β -1 に胚発生促進活性のあることを明らかにした。その他に、基本培地の改良 (グルコース濃度の軽減、抗酸化成分の添加)、培養環境の最適化 (低酸素培養など) を組み合わせて、効率的に移植可能受精卵を生産できる無血清培地の開発・製品化に成功した。

(4) 革新的な無血清培地キットの使用により体外受精卵の生産効率および品質が向上

新規無血清培地並びに従来の血清培地で作製した体外受精卵の発生効率、品質の違いを比較検討した。移植可能受精卵の発生率と耐凍能 (凍結融解後の生存率) において、無血清培地で作製した受精卵の方が優れていた (表 1)。異なる培地 (無血清培地と血清培地) で作製した体外受精卵の形態の違いを調べたところ、血清培地では細胞質に過剰の脂質蓄積が観察され、これが耐凍能低下の原因と考えられた。

(5) 無血清培地キットで生産した牛体外受精卵の移植実証試験

新規に開発した無血清培地と従来の血清培地で生産した体外受精卵を受卵牛に移植して受胎率、子牛の出産状況について実証比較試験を行なった。無血清培地の方が、受胎率が高く、分娩直後の子牛の死産率は低いことが判明した (表 2)。また、受卵牛の受胎期間に違いが見られないのに、血清培地で生産した受精卵から生まれた子牛の平均体重はオス、メスともに重く、しかも個体別体重の分布幅が大きかった (表 3)。このことが、出生時の死産率、難産率が高い原因と考えられる。

表 1. 血清培地及び無血清培地で生産したウシ体外受精卵 (胚) の発生能と凍結耐凍能の比較

培地の種類	移植可能胚発生率 ¹⁾	凍結生存率 ²⁾
無血清培地 (機能性ペプチド研)	36.8% (149/405)	66.2% (86/130)
血清培地 (従来培地)	25.1% (56/223)	48.1% (26/54)

1) 移植可能胚数 (胚盤胞数) / 卵子数 \times 100

2) 凍結融解して 3 日間培養後の生存胚数 / 胚盤胞数 \times 100

表 2. 無血清培地または血清培地で生産したウシ体外受精卵の移植実証試験

培地の種類	移植頭数	受胎率 ¹⁾	出生率 ²⁾	流産率 ³⁾	死産率 ⁴⁾
無血清培地 (機能性ペプチド研)	154 頭	39.6% (61/154)	85.2% (52/61)	14.8% (9/61)	4.9% (3/61)
血清培地 (従来培地)	67 頭	32.8% (22/67)	86.4% (19/22)	13.6% (3/22)	13.6% (3/22)

1) 受胎頭数 / 移植頭数 \times 100

2) 出生頭数 / 受胎頭数 \times 100

3) 流産頭数 / 受胎頭数 \times 100

4) 死産頭数 / 受胎頭数 \times 100

表 3. 無血清培地または血清培地で生産したウシ体外受精卵の移植で生まれた子牛の体重と受胎期間の分布

子牛性別	培地の種類	子牛頭数	体重 (kg)		受胎期間 (日)
			平均±SEM	最小-最大	平均±SEM
オス	無血清培地 (機能性ペプチド研)	31 頭	34.0±0.9	23-42	280.0±0.9
	血清培地 (従来培地)	11 頭	37.5±4.1	18-71	281.0±1.8
メス	無血清培地 (機能性ペプチド研)	21 頭	32.1±1.5	18-45	281.0±1.0
	血清培地 (従来培地)	8 頭	36.1±3.5	20-53	280.4±1.8

3. 無血清培地の販売実績と市場占有率

1996 年より無血清培地等の製造と国内での販売を開始、2003 年より海外への定期的な輸出を始め、現在に至っている。表 4 は、最近 3 年間の培地等の販売個数、販売金額、推定市場占有率を示したものである。販売個数、販売金額ともに年々増加傾向にあり、2004 年度を 100% として、2006 年度には、販売数量 (2,350 個) で約 130%、販売金額 (約 3,050 万円) で約 123% の増加となっている。牛体外受精卵培養用培地の国内における他の製造企業はなく、研究技術者が各自調製する培地を含めて全体の市場と想定すると、機能性ペプチド研究所の無血清培地の市場占有率は、32~38% 程度と推定できる。

表 4. 体外受精卵培養用培地等の販売実績状況 (過去 3 年間) と市場占有率

年 度	2004	2005	2006
販売数量	1,802 (100.0%)	2,111 (117.1%)	2,350 (130.4%)
販売金額 (万円)	2,476 (100.0%)	2,745 (110.9%)	3,054 (123.3%)
市場占有率 [*]	32%	35%	38%

注 ; 国内における牛体外受精卵生産用培養液の製造・販売企業は機能性ペプチド研究所のみ。
ここでは各自調製している培地を含めて市場規模を想定し、市場占有率を推定した。

4. 研究開発成果の学術的評価

本研究グループは、卵子の成熟促進因子、受精促進因子、受精卵の発生促進因子などの特定を行い、これらの新知見を総合的に体系化して、きわめて困難とされていた牛体外受精卵培養用無血清培地キットの開発に成功した。開発した無血清培地キットは、卵子成熟、受精、受精卵発生などの分子、細胞レベルの作用機構を解析する基礎研究や、受精卵の遺伝子診断やクローン胚作製、ES 様細胞の樹立などの応用研究に広く利用されている。

これらの成果は、国内特許（4件）の登録、国際的に評価の高い海外専門学術誌（10件）のほか、多数の論文、著書、学会発表、新聞発表として公表されている。また、研究成果に対して、本研究グループの一員である伊藤丈洋は、2001年度に山形県科学技術奨励賞及び日本組織培養学会奨励賞を受賞した。

近年受精卵の体外培養におけるエピジェネティックな変化（インプリンテング遺伝子発現）の解析技術や胚の代謝する微量産物を同定するメタボローム解析技術の進歩が目覚しい。今後これらの先端技術を応用して、さらに安全で品質の高い家畜受精卵用無血清培地（合成培地）の開発と製品化を推進したいと考えている。

5. 国内畜産業の発展に対する貢献

ウシ体外受精卵生産用無血清培地キットは、直接販売の他に大手の販売代理店（和光純薬工業（株）、東京理化器械（株））などを通じて全国に販売されている。

ウシ体外受精卵培養用培地としては、国内で唯一の商品であり、注文から納品まで約5～7日と敏速に入手でき、保存できる期間は製品により異なるが、2～6ヵ月間と長いなど手軽に利用できるという利点がある。このような無血清培地の長所が認知されるようになり、全国110ヵ所以上の家畜受精卵移植の実用化研究機関ならびに供給機関（民間企業、公的機関、大学、農業法人、農業共済診療所、開業獣医）などで利用され、家畜繁殖研究者・技術者への支援を通じて、国内畜産業発展の一翼を担っている。遺伝形質の高い体外受精卵の生産に無血清培地キットが利用され、これらの受精卵移植で高肉質牛を生産する事業が各地で始まっている。その一例として、山形県天童市では、枝肉評価A-5（最高肉質）の山形牛卵子を活用して体外受精卵を生産し、移植して生まれた体外受精卵子牛の肥育後の枝肉評価では、70%以上がA-5評価を受けており、畜産農家の所得向上に大いに寄与している。畜産業に対する貢献と高付加価値新規事業の展開に対して、2005年、山形しあわせ銀行より「しあわせ産業賞」を受賞した。

6. 海外畜産業に対する貢献

近年、ウシ体外受精卵培養用無血清培地キットは海外での人気も上昇しており、2003年より韓国に定期的に輸出するようになってきている。表5で明らかなように、弊社の体外受精卵培養用培地の利用が、韓国の体外受精卵移植頭数の最近の飛躍的な増加を生み出している。また、中国にも無血清培地キットを試験的に輸出を始めており、今後アジアの国々を中心にウシ体外受精卵の生産に対する強力な技術支援となることを確信している。

表5. 韓国における体内及び体外受精卵移植頭数の推移

年度	移植頭数		
	体内受精卵	体外受精卵	総数
1996	961	2,279	3,240
1997	819	4,351	5,170
1998	982	3,179	4,161
1999	308	2,498	2,806
2000	157	2,137	2,294
2001	427	3,625	4,052
2002	543	8,265	8,808
2003	949	16,942	17,891
2004	1,901	25,133	27,034

(大邱大学 鄭然吉博士より提供)

7. 今後の取り組み

ウシ体外受精卵を生産する無血清培地キットを用いることにより、安定して大量の体外受精卵を生産できるようになった。また、従来の血清培地で作製した体外受精卵に比べて、移植後の受胎率、死産率が有意に改善できることを明らかにした。しかし、人工授精や体内受精卵移植における受胎率、正常子牛出産率に比べてまだ十分目標を達成できたとは言いがたい。最近急速に進歩が見られる遺伝子工学やメタボローム解析技術を駆使して、さらに培地の改良を進めたいと考えている。

安全・安心を担保した性能の良い培地を製品化することにより、国内の牛体外受精卵移植が人工授精に変わる新しい繁殖技術として畜産現場で普及するように側面から強力に支援したい。

牛体外受精卵移植技術は、特にアジア諸国における集約的畜産経営に応用が期待できる先端技術と考えている。これまでに韓国に無血清培地キットが輸出され、新しい牛繁殖技術として畜産現場への普及に大いに貢献している。今後中国、タイ、ベトナムなど国民所得の向上に伴い、牛肉や牛乳の消費が急激に増加することが予想され、体外受精卵移植を活用した牛の改良・増産技術が重要視されており、今後は海外でも無血清培地キットの需要も飛躍的に拡大するものと期待している。

添付資料

1 論文発表

- (1) Kobayashi. K., et al., Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J. Reprod. Fertil.* 100: 439-446, 1994.
- (2) Sendai. Y et al., Purification and molecular cloning of bovine specific glycoproteins, *Biol. Reprod.*, 50: 927-934. 1994.
- (3) Abe. H et al., Bovine oviduct-specific glycoprotein is a potential factor for the maintenance of the viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 226-232, 1995.
- (4) Satoh. T et al., Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo. *Biol. Reprod.*, 50: 835-844. 1994.
- (5) Satoh. T et al., Biochemical characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability in vitro. *Biochem. Biophys. Acta.* 1266: 117-123, 1995.
- (6) Yamashita. S et al., A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. *Cytotechnology.* 31: 1-9. 1999.
- (7) Abe. H et al., Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or serum-supplemented medium. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 325-335, 1999.
- (8) Hoshi. H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, 59: 675-685, 2003.
- (9) Hoshi. H. et al., In vitro maturation, fertilization of bovine oocytes and embryo culture in a serum-free medium. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14: 38-42, 2001.
- (10) Itoh. T. et al., Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol. Reprod.* 67: 1099-1105, 2002.

2 特許取得

- (1) 特許第 3427155 号
「精子の生存性・運動性保持剤」、2003 年 5 月 16 日
- (2) 特許第 2006047 号
「牛胚の体外発生方法」、1996 年 1 月 11 日
- (3) 特許第 2959856 号
「牛胚の体外発生方法」、1999 年 7 月 30 日
- (4) 特許第 3771500 号
「無血清培地－無フィーダー細胞系を用いた哺乳動物胚由来未分化細胞の培養及び細胞株樹立方法」、2006 年 2 月 17 日

3 プレス発表

- (1) 「受精率が従来の 5 倍に －牛の体外受精用の媒精液開発－」
機能性ペプチド研究所（日本農業新聞 2001 年 4 月 6 日）
- (2) 「牛の受精卵診断に新技術」
山形県総合研究センター畜産試験場、機能性ペプチド研究所
（山形新聞 2005 年 9 月 23 日）
- (3) 「人工培養液でクローン牛」山形県農業研究研修センター、機能性ペプチド研究所
（朝日新聞山形版 1997 年 11 月 20 日）
- (4) 「無血清培地で体外受精に成功 －低コスト卵生産に一步－」
宮崎畜産試験場、機能性ペプチド研究所（日本農業新聞 1998 年 2 月 12 日）
- (5) 「牛の低ランク受精卵を無血清培養液で優良化」
機能性ペプチド研究所（日本農業新聞 2000 年 10 月 26 日）
- (6) 「A 5 等級が 7 割 －山形の体外受精卵肥育牛－」
機能性ペプチド研究所（日本農業新聞 2003 年 6 月 12 日）
- (7) 「天童牛ブランド化へ －酪農、肥育農家が連携－」
JA てんどう、機能性ペプチド研究所（日本農業新聞 2003 年 8 月 17 日）
- (8) 「韓国へ輸出開始 －牛の受精卵生産用培養液－」
機能性ペプチド研究所（山形新聞 2003 年 6 月 17 日）