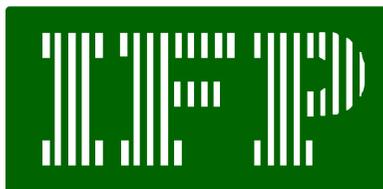


# 家畜体外受精卵生産用無血清培地の開発と製品化

株式会社 機能性ペプチド研究所 研究部

星 宏良(代表)、伊藤 丈洋、山下 祥子

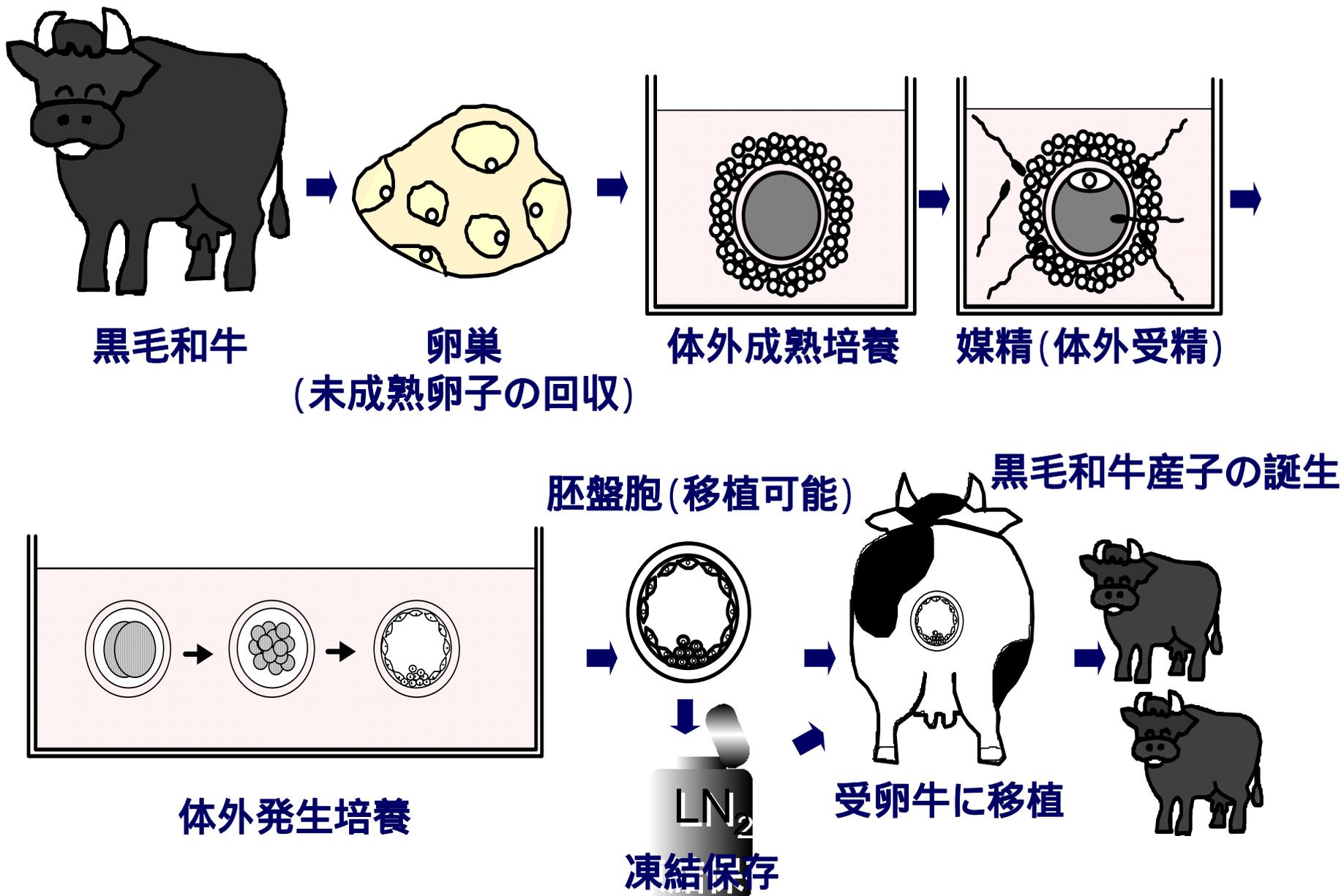


株式会社 **機能性ペプチド研究所**

*Research Institute for the Functional Peptides*

所在地	山形県山形市
設立	1990年2月
資本金	1,000万円
主な株主	日東ベスト(株)、(株)インテリジェント・ コスモス研究機構、 東北電力(株)、東京理化学器械 (株)他11名

# 図1 牛体外受精卵移植技術の概要





2細胞期胚



8-16細胞期胚



胚盤胞  
(移植可能胚)

## 牛体外受精卵移植と体内受精卵移植の比較

	体外受精卵移植	体内受精卵移植
受精卵の生産コスト	高い	低い
凍結保存耐性	低い	高い
受胎率	32% ~ 39%	45% ~ 46%
流産、難産、死産の発生率	高い	低い

《畜産現場からの要望》

-低コストで品質の良い体外受精卵の供給-

# 牛体外受精卵培養システムの現状と無血清培地キットの特徴

## 牛体外受精卵の培養

従来法

血清培地の使用

新規培養システム  
無血清培地

### 問題点

- 血清ロットにより生物活性が変動
- 優良血清ロット選定に多大の労力と時間を要する
- 血清の細菌、ウィルス、マイコプラズマ、異常プリオン等汚染
- 培地調製の手間がかかる

### 長所

- 完全調製済み無血清培地
- 移植可能胚（胚盤胞）生産効率の向上
- 移植可能胚の品質向上（受胎率アップ）



## 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 <sup>1)</sup>	凍結生存率 <sup>2)</sup>
無血清培地 (機能性ペプチド 研究所)	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×100

2) 凍結融解して3日間培養後の生存胚数/胚盤胞数×100

## 無血清培地又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 <sup>1)</sup>	出生率 <sup>2)</sup>	流産率 <sup>3)</sup>	死産率 <sup>4)</sup>
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×100、2) 出生頭数/受胎頭数×100、3) 流産頭数/受胎頭数×100  
4) 死産頭数/受胎頭数×100

## 無血清培地又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		受胎期間(日)
			平均 ± SEM	最小-最大	平均 ± SEM
オ ス	無血清培地 (機能性ペプチド研究所)	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 (機能性ペプチド研究所)	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

# 無血清培地で体外受精に成功

## 低コスト卵生産に一步

宮崎県畜試

【みやまき】宮崎県畜産試験場(高原町)は、無血清培地を用いた体外受精の簡易化法で、子牛の誕生に成功した。特別な施設や高度な技術が必要でなく、一般農家でも利用が可能。しかも低コストで受精卵が生

産できるため、同畜試は「この技術が普及すれば、肉用牛の効率的な大量増殖ができる」と期待している。

同畜試は一九九五年頃から、機能性ペプチド研究所(山形市)と体外受精の簡易化法の試験に着手。同社



体外受精の簡易化法で生まれた子牛と借り腹牛

昨年三月、無血清培地で培養した黒毛和種の受精卵を、同県小林市の牧場の和牛、一代雑種(F1)牛七頭に移植。うち三頭が受胎、このほど雌の子牛二頭が誕生。体重は二十六・、二十二・とほぼ標準で育っている。残る一頭の胎牛からも二月中に子牛が生まれる予定だ。

体外受精の成績は、胚(はい)の盤胞発生率が従来法四〇・九%に対し、無血清培地が三九・三%。受胎率は四二・九%だった。

同畜試畜種部生命工学科は「子牛の誕生で簡易化法の実用性が証明された。培地の使用法も効率的で現場での利用も可能だ」と期待する。

従来の牛の体外受精は、成熟させた卵子を体外で受精させた後、約一週間培養して、移植可能な受精卵をつくる。

が販売する無血清培地キットを用いた体外受精の試験に取り組んでいた。他県ではすでに同キットを使って子牛を誕生させている農場もあるが、公的機関での成功と成績の公表は今回が初めて。同畜試は

# 人工培養液でクローン牛

## 発生率向上研究に有用

### 県農業研究研修センター

新庄市鳥越の県農業研究研修センターは十九日、核移植の技術で、牛の体外受精用の無血清培地を使って、クローン牛を十三日に誕生させることに成功した、と発表した。卵の培養液には、細胞を増やすための因子を含んだ動物血清を加えるため、この培養液の最終的な成分や、その影響がこれまで分かりづらかった。これに対し無血清培地は成分が明確で、培養を阻害すると思われる成分を含まないという利点がある、という。核移植によるクローン牛は同センターで昨年四月に誕生しており、県内二頭目になるが、無血清培地での成功は初めてで、生まれてくる率の向上など今後の研究に役立ちそうだ。

### 動物血清不要で成分が明確

同センター畜産研究部の「ん(合)によると、従来、卵液には、細胞増殖因子を含む開発研究専門員小林正人(さ)を培養するための細胞培養「む血清を五〇程度加えた。



無血清培地を使って誕生したクローン牛＝新庄市鳥越の県農業研究研修センターで

このため、最終的な培養液の成分と、成分が培養にどのような影響を与えているかなどが分かりづらかった。

今回は、機能性ペプチド研究所(山形市下条町)が市販している、牛の体外受精用の無血清培地を使った。含まれている成分がすべて分かるうえ、細胞増殖を阻害すると思われる成分を含まないで培養できた、という。

生まれた子牛は、父母ともに黒毛和種(肉牛)で、体重三六、の雄。自然分娩(ふんべん)で、母子ともに健康だ。第一号は三八、で帝王切開だった。核移植は、分割した受精卵の細胞から取り出した核を、受精していない複数の卵に移植

して、同じ遺伝形質をもった複数の受精卵をつくる技術だ。

卵に精子を授精してできた受精卵(直径〇・一五)の細胞が十六個に分割したところで、針状のガラス製ナイフを遠隔操作してバラバラにした。今年一月二十九日、そのうち十四個の細胞から核を取り出し、未受精卵に移植して、同じ遺伝形質を持つ受精卵をつくった。

このうち八個を二月四日、ホルスタイン種(乳牛)の代理母三頭の子宮に入れたところ、一頭が妊娠し、今回の誕生につながった。また、八個のはいを子宮に入れる前に、残り六個からDNAを抽出し、早くから雌雄を判別することも成功した。

クローン牛に詳しい角田幸雄・近畿大教授(畜産学)は「血清を加えた培地だと、何の成分がどう作用したか分からなくなる。無血清培養に成功したことは、クローン牛の発生率を高める一つの手がかりとして役立つのではないかと話している。

無血清培地 細胞は栄養分だけ与えられても増殖し続けることができず、成長には細胞増殖因子が必要。卵は直径〇・一五と小さいため、ガラス容器内に培養液を水滴状に盛り上げ、

その内部で培養する。この細胞培養液に今までは多くの増殖因子を含む血清を五〇程度加えていたが、代わりに上皮成長因子などを加えて人工的に作った培養液を無血清培地という。

# 牛の受精卵 診断に新技術

## 県試験場とペプチド研

一度に10項目、精度優れ／高い受胎率確保

県農業総合研究センター畜産試験場（新庄市）と機能性ペプチド研究所（山形市）は、一度に牛の受精卵の遺伝子十項目を診断できる技術を開発した。遺伝子判定精度に優れているだけでなく、細胞採取時に受精卵に与えるダメージを抑え、高い受胎率を確保できるのが特徴。すでに県内で診断済みの受精卵から生れた子牛が誕生した。

これまでの細胞採取は、受精卵をメスで切るか、細い管を刺して吸い取る方法が主流。ダメージが大きい上、一度に採取できる細胞数も少ないため、遺伝子十項目しか調べられなかった。

新しい技術は①受精卵を覆っている殻「透明帯」の一部に傷を付け、傷から風船のように飛び出してきた細胞を切り出し②細胞をペプチド研究所が開発した培養液で増殖させる③もの細胞数が多いため、七つの遺伝病、毛色、おいしさに関係する不飽和脂肪酸率、性別の十項目を同時に判別できるようになった。二〇〇三年度から研究を開始し、今年二月に特許出願した。

同畜産試験場によると、この技術は遺伝子判定精度に優れ、診断済み受精卵の受胎率も診断を受けていないものと同様に同等の47%を保てるという。

県は、すでに肉の「おいしさ」に関係する脂肪酸DNAマーカー（配列）を発見しており、新技術と組み合わせ、品質の高い牛肉をつくりだす種雄牛生産の研究を進める。

H15. 6. 12

# A5等級が7割

## 山形の体外受精卵肥育牛 枝肉キロ2000円超す

【山形】山形市の機能性ペプチド研究所が培養した、体外受精卵で生まれた肥育牛の枝肉評価が高まっている。肉質は最高級のA5等級の比率が高くなり、取引価格は人工授精の肥育牛を上回る一頭当たり二千円超、一頭当たりでも百万円を上回る好結果が出た。天童市やJ Aでんとうは、体外受精卵牛を活用した牛肉振興に取り組む考えだ。

山形県やJ Aグループが委託した機能性ペプチド研究所は、優秀な体外受精卵の培養に成功。天童市の支援を受けたJ Aが四年前から体外受精で誕生した子牛を肥育している。体外受精卵牛は順調に育ち、昨年からは食肉市場に上場されている。同研究所の調べによると、これまで出荷した牛は二十頭。枝肉重量は平均四百八十八・五キログラム、価格は一頭当たり二千二百二十円。

一頭当たりの価格は最上級のA5等級の格付けの高で百四十八万九千円、比率は70%と高かった。平均は百三万六千円。そのうち人工授精牛が集まった山形市は、

形牛枝肉共進会等のA5格付け率の44・2%に比べると画期的な数字だ。天童市内の畜産農家は「ほとんどがA5と見做す(BSE)問題があり、一時はどうなるかと心配した。やっと肩の荷が下りた」とほっとした表情だ。

◇ 体外受精卵移植で生まれる肥育牛は年間千頭前後(農水省調べ)。人工授精の肥育牛の二割にも満たないが、十年前の二倍に増えている。東京都中央卸売市場食肉市場や大阪市中央卸売市場南港市場では、定期的に枝肉共進会が開かれる。

# 牛の受精卵生産用培養液

# 韓国へ輸出開始

研究用ペプチド機能性

山形新聞

4/17/03

受胎率  
4割以上

品質の高さに評価

機能性ペプチド研究所（山形市、鈴木俊幸社長）は、韓国の研究機関などに向け、牛の受精卵生産用培養液の輸出を始めた。高い受胎成功率を引き出す品質の良さが評価され、現地で進められている肉牛の対外受精卵移植プロジェクトに採用された。

韓国も日本と同様、安価な輸入牛が出回っており、高級な国産牛の品質、生産量のアップを目指し、研究者らが対外受精卵の移植事業に取り組んでいる。

今回の取引のきっかけは、韓国の研究者が北海道の帯広畜産大に留学した際、研究室で使用していた培養液が機能性ペプチド研究所の製品だったこと。使用した場面十月に韓国内で開か

れた国際シンポジウムで研究者らを前に講演し、自社の培養液について解説。ことし三月になって正式な取引に発展した。

韓国へは受精卵の生産施設になっている大学の研究室や民間の研究所などに商社を通して輸出。この三カ所を拠点に地方の公設試験場など移植事

業者に供給される仕組みだという。

培養液は、対外受精の際に牛の卵巣内の卵母細胞から移植可能な胚（はい）を発生させるためのもの。米国やオーストラリアなどでも製造されているが、韓国の試験ではほかの培養液を使った場合の受胎率が二―三割程度なのに対し、独自の培養成分を取り入れている機能性ペプチド研究所の製品は四割以上だったという。

星所長によると、輸出するのは培養液と付属機器などで、初年度は六百万―一千万円の売り上げを見込んでいる。

## 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)



IFP3456C  
**「エンブリオパック」**  
 非共培養完全セット  
 卵子成熟、共培養用培養液 (IVMD101)  
 媒精液 (IVF100)  
 裸化受精卵培養液 (IVD101)  
 リプロC-1プレート  
 凍結厳禁

**REPRO C-1 PLATE**  
 COLLAGEN (TYPE I) COATED 6 WELL  
 STERILIZED BY IRRADIATION  
 CAT. NO. IFP967C CODE NO.  
 MFG. NO. 707P1031 MFG. DATE  
 IFP Research Institute for the Functional Peptides  
 4-3-32 Simjo Yamagata, 990-0823 Japan

**REPRO C-1 PLATE**  
 COLLAGEN (TYPE I) COATED 6 WELL  
 STERILIZED BY IRRADIATION  
 CAT. NO. IFP967C CODE NO.  
 MFG. NO. 707P1031 MFG. DATE  
 IFP Research Institute for the Functional Peptides  
 4-3-32 Simjo Yamagata, 990-0823 Japan

IFP  
 裸化受精卵培養液  
 IVD-101 10ml  
 Lot. Exp.

IFP  
 卵子成熟、共培養用培養液  
 IVMD-101 25ml  
 Lot. Exp.

IFP  
 媒精液  
 IVF-100 30ml  
 Lot. Exp.

IFP  
 裸化受精卵培養液  
 IVD-101 10ml  
 Lot. Exp.

## ■ウシ体外受精卵作製用培養液

型式	品名	数量	価格
IFP9611	卵子回収液	100mL×5本	¥ 6,000
IFP9620	ウシ胚凍結保存液	100mL×1本	¥ 3,000
IFP9630	媒精液 (IVF100)	30mL×5本	¥15,000
IFP9631	媒精液-Gセット (IVF110S)	媒精液-G 10mL×2本 精子洗浄液10mL×2本	¥12,000
IFP9641	卵子成熟、共培養用培養液 (IVMD101)	25mL×5本	¥20,000
IFP9651	裸化受精卵培養液 (IVD101)	10mL×5本	¥20,000
IFP9660	0.01%コラーゲン溶液 (コート処理液)	100mL×1本	¥ 5,000

※価格に消費税は含まれません。

## ■ウシ体外受精卵作製用培養液キット 「エンブリオパック」

型式	品名	数量	価格
IFP346K	共培養基本セット	IVMD101 (25mL×2本) IVF100 (30mL×2本) コート処理液 (10mL×1)	¥15,000
IFP346C	共培養完全セット	IVMD101 (25mL×2本) IVF100 (30mL×2本) リプロC-1プレート (10枚×2パック)	¥20,000
IFP3456K	非共培養基本セット (裸化受精卵用)	IVMD101 (25mL×2本) IVF100 (30mL×2本) IVD101 (10mL×2本) コート処理液 (10mL×1)	¥25,000
IFP3456C	非共培養完全セット (裸化受精卵用)	IVMD101 (25mL×2本) IVF100 (30mL×2本) IVD101 (10mL×2本) リプロC-1プレート (10枚×2パック)	¥29,000

※価格に消費税は含まれません。

## ■ウシ受精卵培養関連製品

型式	品名	数量	価格
IFP963B	媒精用基本液 (BO液)	100mL×5本	¥ 7,500
IFP966B	裸化卵子培養用基礎培養液	100mL×5本	¥10,000
IFP967C	リプロC-1プレート (コラーゲン処理済み6ウェル培養プレート)	10枚×5パック	¥30,000
IFP970	受精卵培養用精製水	1000mL×1本 1000mL×6本	¥ 5,000 ¥25,000
IFP971	高性能改良199培地 (HP-M199)	100mL×5本	¥ 8,000
IFP972	高性能改良SOF培地 (HP-SOF)	100mL×5本	¥ 6,000
IFP973	無血清培地用添加剤 (BITTα)	1mL×1本 1mL×5本	¥ 6,000 ¥28,000
IFP0120	高性能改良199培地 (ハンクス塩)	500mL×1本	¥ 6,000
IFP0130	細胞融合液 (Zimmerman細胞融合液)	100mL×2本	¥ 5,000

※価格に消費税は含まれません。

## ■ブタ培養胚作製用培養液

型式	品名	数量	価格
IFP0410P	ブタ培養胚発生用培地 (PZM-5)	25mL×3本	¥12,000
IFP0411P	TALP-HEPES液	100mL×2本	¥ 5,000

※価格に消費税は含まれません。

株式会社

機能性ペプチド研究所

*Research Institute for the Functional Peptides*





ご拝聴ありがとうございました