

豚胚の体外培養用完全合成培地の開発

生産病研究部 臨床繁殖研究室長

吉岡 耕治

YOSHIOKA, Koji

卵巣から採取した卵子を体外で成熟・受精・培養して受精卵（胚）を作出（体外生産）し、代理母の子宮へ移植（胚移植）して産子を得る技術は、品種改良や優良家畜の増産、慢性疾病の清浄化等に大きく貢献する。また、新たな遺伝形質を持つ個体の導入に際しても、生体ではなく胚で輸送することが可能なことから、輸送コストの低減ばかりでなく、感染症伝播の防除にも有効である。

今から6年前、動衛研（当時の家衛試）を主査として、「植物・動物・昆虫を用いた有用物質生産系の確立」（動植物工場プロ）がスタートした。牛では、雌畜の卵巣から採取した卵子を用いて体外受精で作出した胚を、開腹手術することなく腔を経由して非外科的に子宮へ移植・受胎させる技術がほぼ確立され、一部では、実用化されている。しかし、卵巣から得られた未成熟卵子から胚盤胞へ発生する割合は30～40%程度に過ぎず、さらに豚では、体外生産した胚は低品質で、体外生産胚盤胞の移植による産子の誕生は報告されていなかった。一方、体細胞クローン技術の開発などにより、異種移植用臓器や医療実験用として遺伝子組換え豚の利用が期待されており、豚を対象にその周辺技術胚の体外生産法の開発が急務となっていた。

すでに、体外成熟・体外受精した直後の胚の移植により子豚が得られることは、報告されており、こうした胚が産子への発生能を保持していることは知られていた。そのため、体外生産において最も改善すべきポイントは、胚の体外培養法であると考えられた。そこで、体外培養の環境を体内（すなわち卵管内）環境に近づけることを考慮し、無機イオンやエネルギー基質の濃度を豚卵管液の濃度に類似させ、各種アミノ酸を添加した培地（PZM）を考案し、豚胚の体外培養法を検討した。

まず、過排卵・人工授精により作出した豚1細胞期胚（体内受精卵）をPZMで培養すると、胚盤胞および孵化胚盤胞への発生率ならびに胚の細胞数は、従来豚胚の体外培養に用いられている培地に比べ向上した。また、培地中の高分子物質をポリビニルアルコールとしたPZM（化学的組成の明らかな完全合成培地）で培養すると、胚の総細胞数は体内発生した胚に比べると少なかったものの、内部細胞塊（将来胎子になる部分）細胞数と総細胞数の比は、体内発生した胚と同様で、培養した胚が一定の品質を保持していることが判明した。そこで、PZMで4日間培養した胚盤胞を受胎豚へ移植したところ、6頭中5頭が妊娠・分娩した。分娩率、産子数、産子の生時体重は、体内発生胚を移植した場合と同様で、PZMで培養した胚は、その後の発生能に悪影響を及ぼすことなく、正常な産子へ発育することが明らかとなった。

豚胚の体外生産におけるもう一つの問題は、体外受精時の多精子受精である。この多精子受精は、受精に必要な現象である精子の先体反応が、体外操作、培養条件により同時多発的に過剰に起きてしまうことが一因であると考えられていた。もちろん多精子受精により多倍体になった胚は、基本的には個体へ発育しないので、体外生産胚から子豚を得るためには、できるだけ多精子受精の割合を低くする必要がある。胚の体外生産への化学的組成の明らかな完全合成培地の適用は、受精や発生における生理機構の解明に有効であるほか、生体由来の因子を含まないので病原体などの未知因子が混入する可能性が低く、また実験の再現性を高める効果が期待できる。さらに、受精では血清アルブミンなどのタンパク質は、自発的な先体反応（精子の細胞膜と先体外膜が部分的に融合して胞状化し、卵子への侵入に必要な



酵素が先体から放出される現象。通常、受精能を獲得した精子が卵子の透明帯に達すると起こる)を起こすことが知られており、これを含まない完全合成培地では、結果的に精子の先体反応の前段階である受精能獲得をコントロールできる可能性がある。そこで、PZMをもとにアミノ酸を除去した体外受精用培地PGMを考案して、完全合成培地による豚体外受精・体外培養系について検討した。PGMに精子の受精能獲得あるいは受精後の胚発生能に影響を及ぼす物質として、テオフィリン、アデノシンおよびシステインを添加して体外受精すると、安定した正常受精率が得られ、30%程度の胚盤胞への発生率が得られるようになった。また、体外生産した胚盤胞を受胎雌に外科的に移植すると、移植した4頭全てが妊娠・分娩し、化学的組成の明らかな培地で体外受精・体外培養して得られた胚盤胞は、産子へ発生する能力をもつことが判明した(図)。

さらに、体外生産胚を市販の子宮角深部注入用人工授精カテーテルを応用し、膣を経由して非外科的に6頭の雌豚に移植した結果、1頭の雌豚が妊娠し、子豚7頭を分娩した。

豚胚の体外培養用培地PZMは、(株)機能性ペプチド研究所から販売されており、体細胞クローンによる遺伝子組換え豚の作出を行っている機関などで使用されている。また、体外生産胚の非外科的移植による生産技術は、と畜由来卵子が使用できることから胚の生産コストの低減につながり、開腹手術の必要がないことから受胎豚への負担が軽く、生産現場での実施も可能となり、養豚業への貢献が期待される。しかし体外生産・非外科的胚移植による受胎成績は低く、実用化には体外生産法や移植法、受胎豚の条件など、受胎率と産子数の向上を目指した検討と改善が必要である。

動植物工場プロは平成16年度で終了するが、幸い平成16年度から開始のアグリバイオ実用化・産業化研究の1課題として豚胚の体外生産と非外科的移植の実用化に取り組むこととなり、豚胚の体外生産のキット化と非外科的移植器具の製品化を図っている。原材料のコストダウンなど、これまでとは少し違った形でのアプローチも必要になるが、何とかルーチンに使用できる技術として後に残るものを目指したい。



図 体外生産胚(上)及びそれらの胚の外科的移植により生まれた子豚(下)