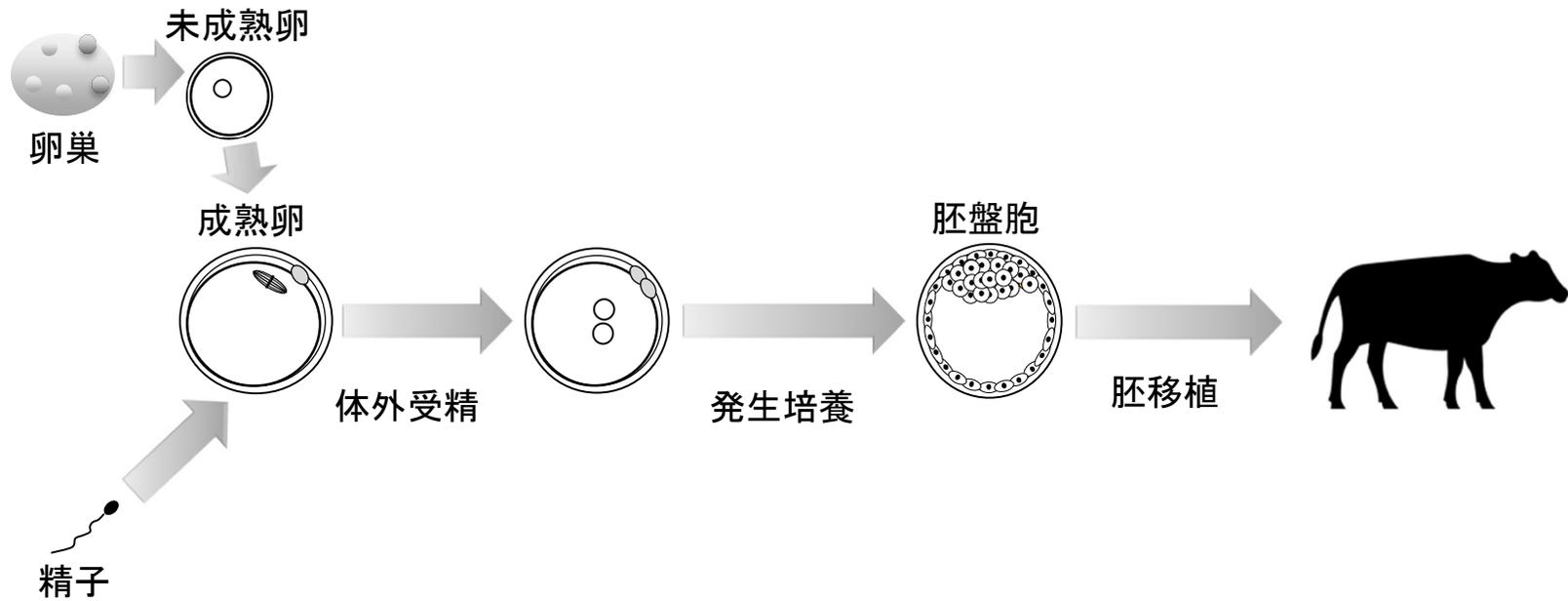


体外における哺乳動物胚 を選別する方法

宇都宮大学 農学部 生物資源科学科
教授 松本 浩道

2023年11月16日

体外受精と胚移植



デザイナー子牛の誕生！

宇都宮大学農学部と栃木県畜産酪農研究センターの共同研究

研究成果の内容

宇都宮大学農学部動物育種繁殖学教室は、平成20～23年度において、「マーカアシスト選抜と先端生殖技術を利用したデザイナーズ家畜の生産」と題して日本学術振興会より科学研究費(総額1,925万円)を得て(基盤研究(B)研究代表者 吉澤緑教授)、栃木県畜産酪農研究センター(杉本俊昭所長)及びおち夢クリニック名古屋(越知正憲院長)との共同研究により遺伝子をデザインされた子牛の生産を試みてきた。昨秋、作出された8個の胚(両親の遺伝子型から、増体が良く柔らかな肉質の牛となるようにデザインされた胚)を受胎雌牛1頭当たり2個、4頭の雌に移植し、そのうち2頭の分娩が予定されていた。



7月21日朝、雄1頭(46Kg)が無事誕生した。26日にも雄1頭が生まれたがこちらは死産であった。

昨年、栃木県畜産酪農センター肉牛飼養研究室で飼養されていた黒毛和種雌牛(宇都宮大学および肉牛飼養研究室が遺伝子分析を担当)が高齢のため屠場に出荷された。この際、採取された卵巣から得た卵胞内卵子と黒毛和種の雄牛の凍結精液(遺伝子分析済)を用いて体外受精により、増体が良く柔らかな肉質の牛となるようデザインされた胚を作出した(宇都宮大学、おち夢クリニック担当)。これらの胚を畜産酪農研究センター本場で飼養している乳牛の受胎雌に移植することにより(センター家畜繁殖研究室担当)、デザイナー子牛が生まれた(添付写真の黒毛和種子牛、ホルスタインは受胎母牛)。

本研究は、あらかじめ目的とする遺伝子の多型分析を行い、遺伝子組成(成長ホルモン遺伝子GH、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子SCD、がん抑制遺伝子TP53などの遺伝子型の組み合わせ)が明らかな卵子と精子を組み合わせることで体外受精することにより、望む形質を持った子牛を効率的に生産しようと企図された。

今回は、高齢雌牛の卵巣を屠場で採取・利用しての子牛生産で、廃用となった老牛の有効活用という側面もある。

今回用いた雌雄では、遺伝子多型を調査した3種類の当該遺伝子(GH, SCD, TP53)のうちの2個(GH, SCD)の組成がヘテロであったため、生まれた子牛の遺伝子型がどのようなものかは、子牛からのサンプル分析によりこれから確定される。子牛は現在、栃木県畜産酪農研究センター芳賀分場(磯 健司分場長)で健康にすくすくと育っている。

なお、今後は同様に遺伝子を解析済みの雌牛および精液から計画的に胚を体外作出し、作出胚の一部を取り出すバイオプシーによる性別判別や胚の凍結保存などの種々の先端生殖技術と遺伝子解析技術を利用して、優れた遺伝形質を有する子牛のより効率的な生産を計画している。

ウシ体外受精卵移植の状態別受胎率の推移 (%)

年度	新鮮 1 卵	凍結 1 卵
昭62		41
昭63		37
平 元		38
平 2		36
平 3		36
平 4		33
平 5		30
平 6		28
平 7		34
平 8		37
平 9	36	32
平10	41	32
平11	39	33
平12	37	35
平13	41	35
平14	42	36
平15	43	37
平16	46	36
平17	41	39
平18	41	38
平19	42	39
平20	42	38
平21	43	36
平22	42	37
平23	44	37
平24	40	39
平25	38	41
平26	41	39
平27	36	37
平均	41	37

ウシ体外受精卵移植による産子数の推移

年度	移植頭数	産子数	産子率
昭62	390	-	-
昭63	1,184	160	14
平元	1,920	475	25
平2	3,916	621	16
平3	4,229	1,147	27
平4	5,102	1,020	20
平5	6,264	1,317	21
平6	6,918	1,107	16
平7	4,642	1,216	26
平8	7,211	1,583	22
平9	9,479	2,123	22
平10	9,328	2,007	22
平11	9,726	2,110	22
平12	11,653	2,351	20
平13	9,774	2,660	27
平14	8,209	1,828	22
平15	7,890	1,757	22
平16	9,525	2,129	22
平17	10,726	2,308	22
平18	12,386	2,680	22
平19	13,204	2,811	21
平20	11,142	3,357	30
平21	9,048	2,403	27
平22	9,503	1,719	18
平23	10,198	2,251	22
平24	11,419	2,056	18
平25	13,472	2,935	22
平26	18,907	3,684	19
平27	23,567	3,715	16
-----	-----	-----	-----
累計	260,932	55,530	21

仕事と不妊治療の 両立支援のために

～働きながら不妊治療を受ける従業員へのご理解をお願いします～

近年の晩婚化等を背景に不妊治療を受ける夫婦が増加しており、働きながら不妊治療を受ける方は増加傾向にあると考えられます。また、厚生労働省が行った調査によると、仕事と不妊治療との両立ができず、16%の方が離職しています。

このように、人材を失うことは、企業にとって大きな損失です。仕事と不妊治療の両立について職場での理解を深め、従業員が働きやすい環境を整えることは、有能な人材の確保という点で企業にもメリットがあるはずです。

このリーフレットは、職場内で不妊治療への理解を深めていただくために、不妊治療の内容や職場での配慮のポイント、仕事と治療の両立に役立つ制度などを紹介するものです。

約**20**人に**1**人

2015年に日本では51,001人が生殖補助医療(体外受精、顕微授精、凍結胚(卵)を用いた治療)により誕生しており、全出生児(1,008,000人)の**5.1%**に当たります。
(生殖補助医療による出生児数 日本産科婦人科学会「ARTデータブック(2015年)」、全出生児数 厚生労働省「平成27年(2015)人口動態統計の年報(推計)」による)

5.5組に**1**組

日本では、実際に不妊の検査や治療を受けたことがある(または現在受けている)夫婦は、全体で**18.2%**、子どものいない夫婦では**28.2%**です。
(国立社会保障人口問題研究所「2015年社会保障人口問題基本調査」による)



- 日本では、実際に不妊の検査や治療を受けたことがある（または現在受けている）夫婦は、全体で18.2%、子どものいない夫婦では28.2%です。これは、夫婦全体の5.5組に1組に当たります。

（国立社会保障・人口問題研究所「2015年社会保障・人口問題基本調査」による）

- 2015年に日本では51,001人が生殖補助医療（体外受精、顕微授精、凍結胚（卵）を用いた治療）により誕生しており、全出生児（1,008,000人）の5.1%で、これは、約20人に1人に当たります。

（生殖補助医療による出生児数: 日本産科婦人科学会「ARTデータブック（2015年）」、
全出生児数: 厚生労働省「平成27（2015）人口動態統計の年間推計」による）

- 不妊の原因は、女性だけにあるわけではありません。男性に原因があることもありますし、検査をしても原因がわからないこともあります。また、女性に原因がなくても、女性の体には、治療に伴う検査や投薬などにより大きな負担がかかります。

西暦	IVF (GIFT,その他を含む)						ICSI (SPLITを含む)					凍結融解胚 (卵)				
	治療周期数	採卵周期数	全凍結周期	移植周期数	妊娠周期数	出生児数	治療周期数	採卵周期数	全凍結周期	移植周期数	妊娠周期数	出生児数	治療周期数	移植周期数	妊娠周期数	出生児数
1985	1,195	1,195		862	64	27										
1986	752	752		556	56	16										
1987	1,503	1,503		1,070	135	54										
1988	1,702	1,702		1,665	257	114										
1989	4,218	3,890		2,968	580	446						184	92	7	3	
1990	7,405	6,892		5,361	1,178	1,031						160	153	17	17	
1991	11,177	10,581		8,473	2,015	1,661						369	352	57	39	
1992	17,404	16,381		12,250	2,702	2,525	963	936		524	42	35	553	530	79	66
1993	21,287	20,345		15,565	3,730	3,334	2,608	2,447		1,271	176	149	681	597	86	71
1994	25,157	24,033		18,690	4,069	3,734	5,510	5,339		4,114	759	698	1,303	1,112	179	144
1995	26,648	24,694		18,905	4,246	3,810	9,820	9,054		7,722	1,732	1,579	1,682	1,426	323	298
1996	27,338	26,385		21,492	4,818	4,436	13,438	13,044		11,269	2,799	2,588	2,900	2,676	449	386
1997	32,247	30,733		24,768	5,730	5,060	16,573	16,376		14,275	3,495	3,249	5,208	4,958	1,086	902
1998	34,929	33,670		27,436	6,255	5,851	18,657	18,266		15,505	3,952	3,701	8,132	7,643	1,748	1,567
1999	36,085	34,290		27,455	6,812	5,870	22,984	22,350		18,592	4,702	4,247	9,950	9,093	2,198	1,812
2000	31,334	29,907		24,447	6,328	5,447	26,712	25,794		21,067	5,240	4,582	11,653	10,719	2,660	2,245
2001	32,676	31,051		25,143	6,749	5,829	30,369	29,309		23,058	5,924	4,862	13,034	11,888	3,080	2,467
2002	34,953	33,849		26,854	7,767	6,443	34,824	33,823		25,866	6,775	5,486	15,887	14,759	4,094	3,299
2003	38,575	36,480		28,214	8,336	6,608	38,871	36,663		27,895	7,506	5,994	24,459	19,641	6,205	4,798
2004	41,619	39,656		29,090	8,542	6,709	44,698	43,628		29,946	7,768	5,921	30,287	24,422	7,606	5,538
2005	42,822	40,471		29,337	8,893	6,706	47,579	45,388		30,983	8,019	5,864	35,069	28,743	9,396	6,542
2006	44,778	42,248		29,440	8,509	6,256	52,539	49,854		32,509	7,904	5,401	42,171	35,804	11,798	7,930
2007	53,873	52,165	7,626	28,228	7,416	5,144	61,813	60,294	11,541	34,032	7,784	5,194	45,478	43,589	13,965	9,257
2008	59,148	57,217	10,139	29,124	6,897	4,664	71,350	69,864	15,390	34,425	7,017	4,615	60,115	57,846	18,597	12,425
2009	63,083	60,754	11,800	28,559	6,891	5,046	76,790	75,340	19,046	35,167	7,330	5,180	73,927	71,367	23,216	16,454
2010	67,714	64,966	13,843	27,905	6,556	4,657	90,677	88,822	24,379	37,172	7,699	5,277	83,770	81,300	27,382	19,011
2011	71,422	68,651	16,202	27,284	6,341	4,546	102,473	100,518	30,773	38,098	7,601	5,415	95,764	92,782	31,721	22,465
2012	82,108	79,434	20,627	29,693	6,703	4,740	125,229	122,962	41,943	40,829	7,947	5,498	119,089	116,176	39,106	27,715
2013	89,950	87,104	25,085	30,164	6,817	4,776	134,871	134,871	49,316	41,150	8,027	5,630	141,335	138,249	45,392	32,148
2014	92,269	89,397	27,624	30,414	6,970	5,025	144,247	141,888	55,851	41,437	8,122	5,702	157,229	153,977	51,458	36,595
2015	93,614	91,079	30,498	28,858	6,478	4,629	155,797	153,639	63,660	41,396	8,169	5,761	174,740	171,495	56,888	40,611
2016	94,566	92,185	34,188	26,182	5,903	4,266	161,262	159,214	70,387	38,315	7,324	5,166	191,962	188,338	62,749	44,678
2017	91,516	89,447	36,441	22,423	5,182	3,731	157,709	155,758	74,200	33,297	6,757	4,826	198,985	195,559	67,255	48,060
2018	92,552	90,376	38,882	20,894	4,755	3,402	158,859	157,026	79,496	29,569	5,886	4,194	203,482	200,050	69,395	49,383
2019	88,074	86,334	40,561	17,345	4,002	2,974	154,824	153,014	83,129	24,490	4,789	3,433	215,203	211,758	74,911	54,188
2020	82,883	81,286	42,530	13,362	3,094	2,282	151,732	150,082	87,697	19,061	3,626	2,596	215,285	211,914	76,196	55,503
2021	88,362	86,901	42,016	13,219	3,115	2,268	170,350	168,659	86,992	19,740	3,875	2,850	239,428	236,211	87,174	64,679

年(西暦)	年(和暦)	治療周期総数	出生児	%	総出生数	出生児の何人に1人?
1985	S60	1,195	27	2.3	1,431,577	53,021.4
1986	S61	752	16	2.1	1,382,946	86,434.1
1987	S62	1,503	54	3.6	1,346,658	24,938.1
1988	S63	1,702	114	6.7	1,314,006	11,526.4
1989	H1	4,402	449	10.2	1,246,802	2,776.8
1990	H2	7,565	1,048	13.9	1,221,585	1,165.6
1991	H3	11,546	1,700	14.7	1,223,245	719.6
1992	H4	18,920	2,626	13.9	1,208,989	460.4
1993	H5	24,576	3,554	14.5	1,188,282	334.4
1994	H6	31,970	4,576	14.3	1,238,328	270.6
1995	H7	38,150	5,687	14.9	1,187,064	208.7
1996	H8	43,676	7,410	17.0	1,206,555	162.8
1997	H9	54,028	9,211	17.0	1,191,665	129.4
1998	H10	61,718	11,119	18.0	1,203,147	108.2
1999	H11	69,019	11,929	17.3	1,177,669	98.7
2000	H12	69,699	12,274	17.6	1,190,547	97.0
2001	H13	76,079	13,158	17.3	1,170,662	89.0
2002	H14	85,664	15,228	17.8	1,153,855	75.8
2003	H15	101,905	17,400	17.1	1,123,610	64.6
2004	H16	116,604	18,168	15.6	1,110,721	61.1
2005	H17	125,470	19,112	15.2	1,062,530	55.6
2006	H18	139,488	19,587	14.0	1,092,674	55.8
2007	H19	161,164	19,595	12.2	1,089,818	55.6
2008	H20	190,613	21,704	11.4	1,091,156	50.3
2009	H21	213,800	26,680	12.5	1,070,035	40.1
2010	H22	242,161	28,945	12.0	1,071,304	37.0
2011	H23	269,659	32,426	12.0	1,050,806	32.4
2012	H24	326,426	37,953	11.6	1,037,231	27.3
2013	H25	368,764	42,554	11.5	1,029,816	24.2
2014	H26	393,745	47,322	12.0	1,003,539	21.2
2015	H27	424,151	51,001	12.0	1,005,677	19.7
2016	H28	447,790	54,110	12.1	976,978	18.1
2017	H29	448,210	56,617	12.6	946,060	16.7
2018	H30	454,893	56,979	12.5	918,400	16.1
2019	R1	458,101	60,598	13.2	865,239	14.3
2020	R2	449,900	60,381	13.4	840,835	13.9
2021	R3	498,140	69,797	14.0	811,622	11.6

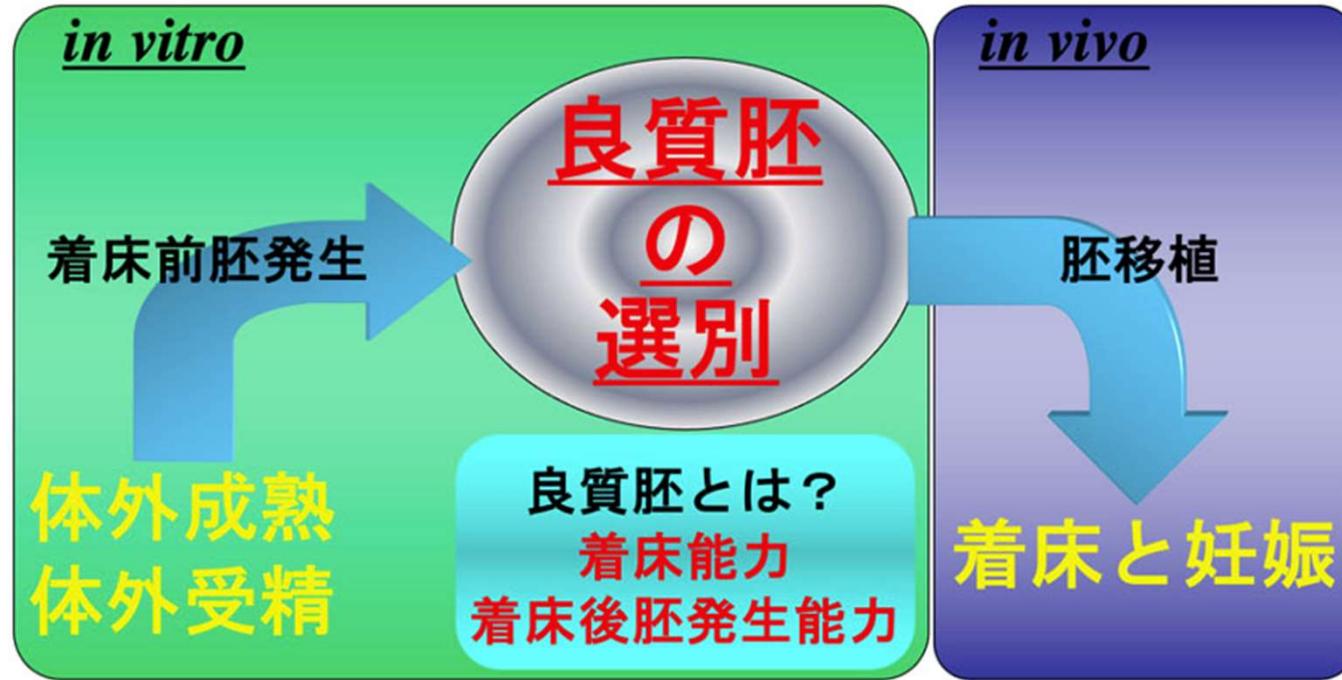
(厚生労働省と日本産科婦人科学会のデータを基に作成)

日本産科婦人科学会の 学会見解に基づく諸登録施設

年度	施設数
2011	588
2012	568
2013	576
2014	593
2015	599
2016	608
2017	605
2018	615
2019	617
2020	621
2021	622
2022	627

(日本産科婦人科学会)

体外受精と胚移植



- ・ 良質胚を子宮に移植しているのに着床率が低い
→ 従来法に加え、新たな評価法が必要

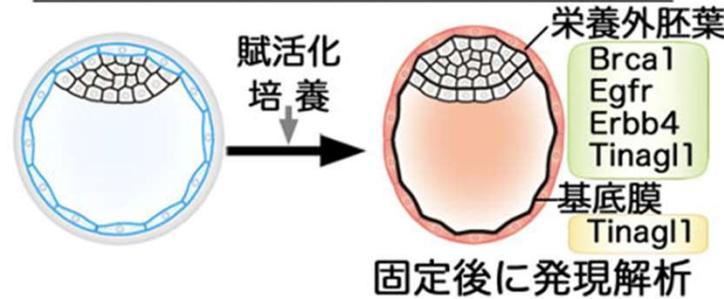


胚の能力を高める培養と直接的評価法の樹立

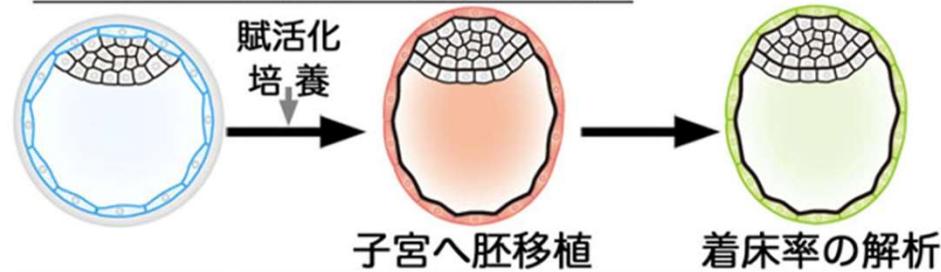
体外受精で得られる胚を子宮に移植し、着床と妊娠の成立後に出産に至ります。胚移植には良質な胚を選別していますが、着床率が低いのが現状です。改善のためには、胚の能力をより高める培養方法および新たな評価方法の樹立が必要です。

A. これまでの間接的方法

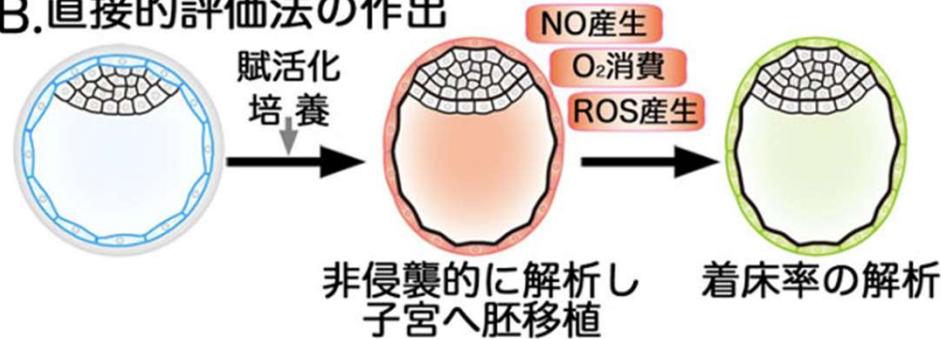
1. 発現と局在の解析で培養系を評価



2. 培養胚を胚移植し着床率を評価



B. 直接的評価法の作出



通常行われている培養液の改善は間接的な手法です。これまでに着床率を改善する培養方法を報告していますが、良好胚と判定された胚を移植しても全ては着床しません。改善のためには、新たな直接的な評価方法の樹立が必要です。

Improvement of implantation potential in mouse blastocysts derived from IVF by combined treatment with prolactin, epidermal growth factor and 4-hydroxyestradiol

Miki Takeuchi^{1,†}, Misato Seki^{1,†}, Etsuko Furukawa¹,
Akihito Takahashi¹, Kyosuke Saito¹, Mitsuru Kobayashi¹,
Kenji Ezoe¹, Emiko Fukui^{1,2}, Midori Yoshizawa^{1,2},
and Hiromichi Matsumoto^{1,2,*}

¹Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Division of Animal Science, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine-Machi, Utsunomiya, Tochigi 321-8505, Japan ²Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, 350 Mine-Machi, Utsunomiya, Tochigi 321-8505, Japan

*Correspondence address. Tel: +81-28-649-5432; Fax: +81-28-649-5431; E-mail address: matsui@cc.utsunomiya-u.ac.jp

Submitted on January 5, 2017; resubmitted on May 30, 2017; editorial decision on June 6, 2017; accepted on June 7, 2017

STUDY QUESTION: Can supplementation of medium with prolactin (PRL), epidermal growth factor (EGF) and 4-hydroxyestradiol (4-OH-E₂) prior to embryo transfer improve implantation potential in mouse blastocysts derived from IVF?

SUMMARY ANSWER: Combined treatment with PRL, EGF and 4-OH-E₂ improves mouse blastocyst implantation rates, while alone, each factor is ineffective.

WHAT IS KNOWN ALREADY: Blastocyst dormancy during delayed implantation caused by ovariectomy is maintained by continued progesterone treatment in mice, and estrogen injection rapidly activates blastocysts to implantation-induced status *in vivo*. While the expression of many proteins is upregulated in implantation-induced blastocysts, selective proteolysis by proteasomes, such as estrogen receptor α (ESR1), occurs in implantation-induced blastocysts to achieve implantation-competent status. It is worth evaluating the proteins expressed during these periods to identify humoral factors that might improve the implantation potential of IVF-derived blastocysts because the poor quality of embryos obtained by IVF is one of the major causes of implantation failure.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: Superovulated oocytes from ICR mice were fertilized with spermatozoa and then cultured *in vitro* in potassium simplex optimized medium (KSOM) without phenol red (KSOM-P) for 90–96 h. Blastocysts were treated with PRL (10 or 20 mIU/mL), EGF (5 or 10 ng/mL) or 4-OH-E₂ (1 or 10 nM) in KSOM-P for 24 h.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: Levels of breast cancer 1 (BRCA1), EGF receptor (EGFR, also known as ERBB1), ERBB4, tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 (TINAGL1) and ESR1 protein were examined with immunohistochemical analysis using immunofluorescence methods and confocal laser scanning microscopy. For embryo transfer, six blastocysts were suspended in HEPES-buffered KSOM-P medium and transferred into the uteri of recipient mice on the morning of Day 4 (0900–1000 h) of pseudopregnancy (Day 1 = vaginal plug). The number of implantation sites was then recorded on Day 6 using the blue dye method.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: PRL, EGF and 4-OH-E₂ each promoted BRCA1 protein level in the trophectoderm (TE). While PRL treatment resulted in an increase in EGFR, EGF increased both EGFR and ERBB4 in the blastocyst TE. TINAGL1 in the TE was enhanced by 4-OH-E₂, which also increased localization of this protein to the basement membrane. Treatment with PRL, EGF or 4-OH-E₂ alone did not improve blastocyst implantation rates. Combined treatment with PRL, EGF and 4-OH-E₂ resulted in increased levels of

Mol Hum Reprod. 23: 557-470, 2017.

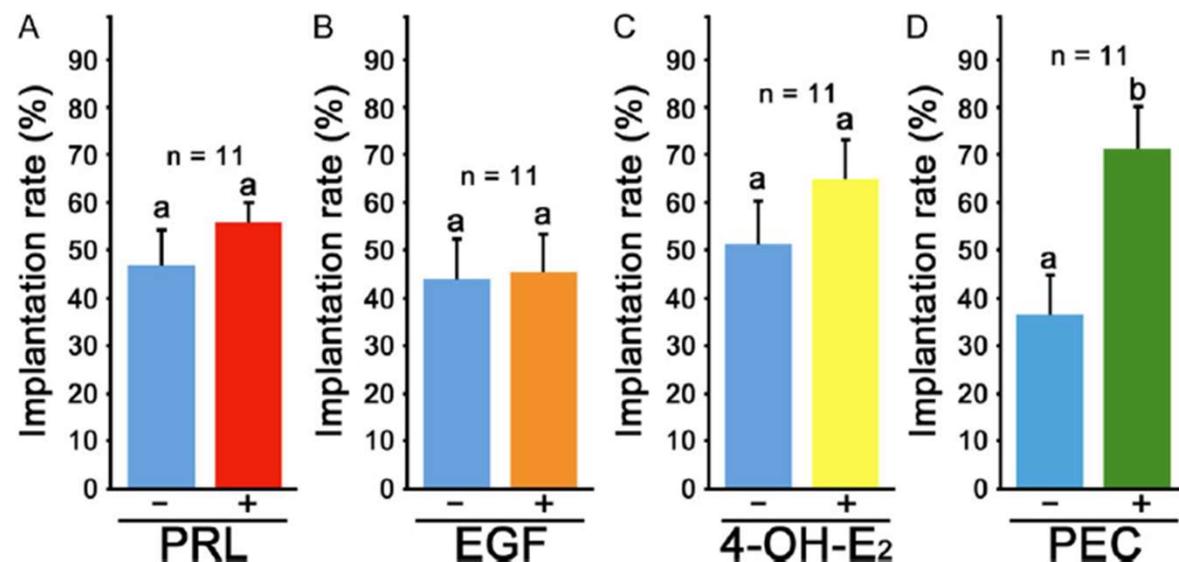
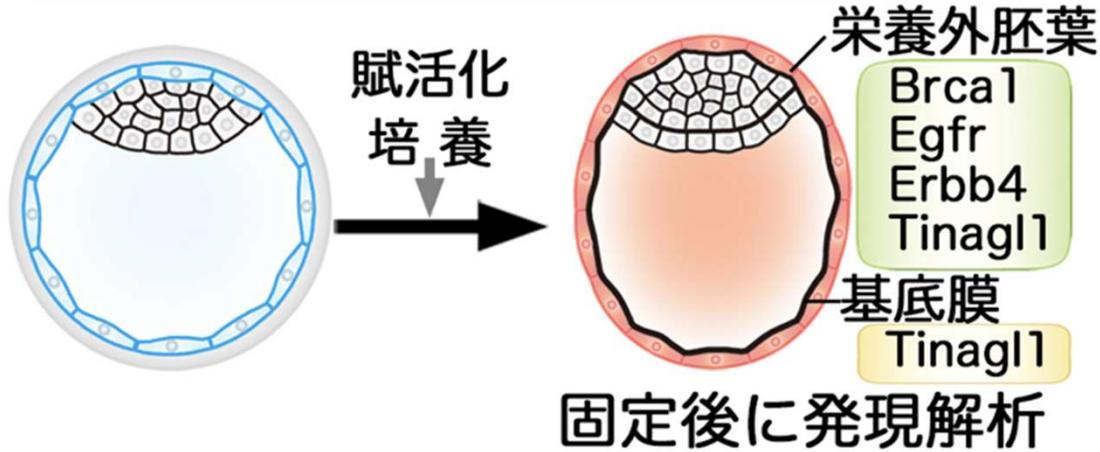
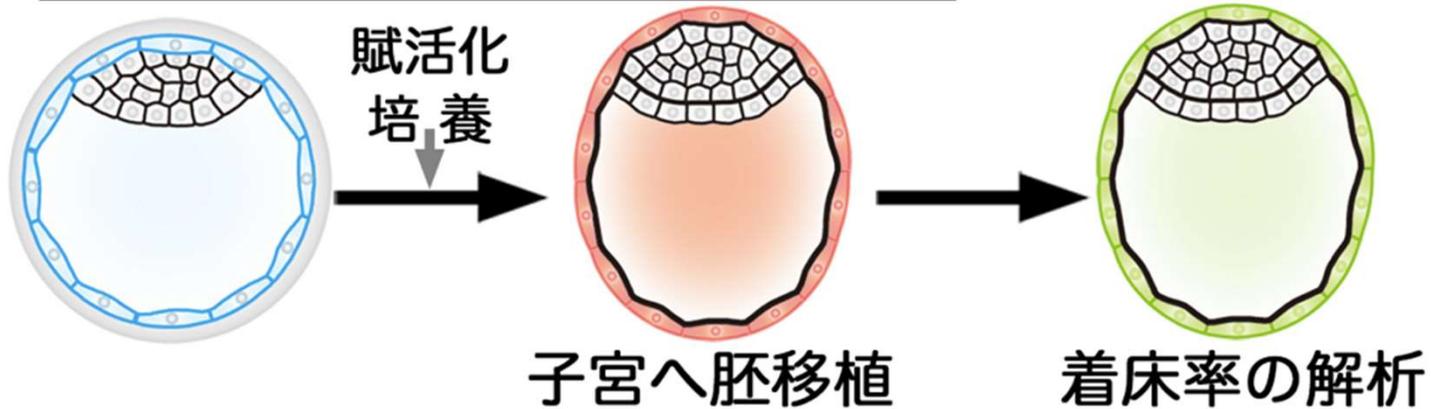


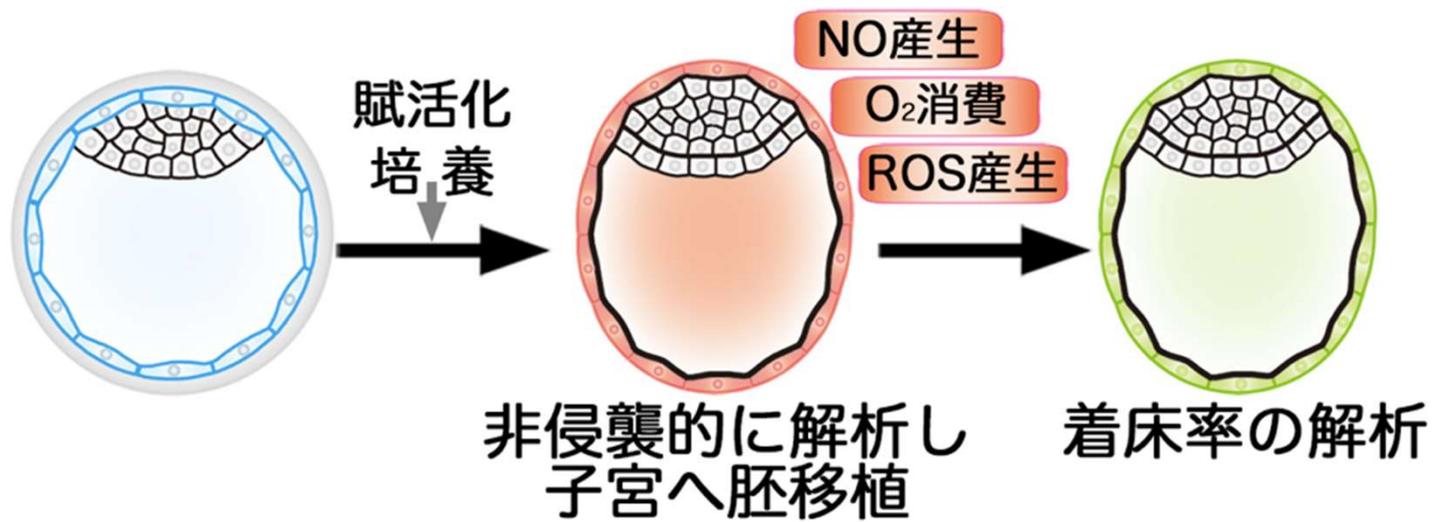
Figure 7 *In vitro* treatment with the combination of PRL, EGF and 4-OH-E₂ results in improved mouse blastocyst implantation rates. Implantation rates after embryo transfer of IVF-derived blastocysts treated with (A) 20 mIU/mL PRL, (B) 10 ng/mL EGF, or (C) 10 nM 4-OH-E₂, and with (D) a combination of these factors (PEC). Six untreated blastocysts (-, control) and six treated blastocysts (+) were transferred into distinct uterine horns in each recipient. The data are mean \pm SEM of the data obtained from 11 independent experiments. Treatment with PRL, EGF or 4-OH-E₂ alone did not improve blastocyst implantation rates (a, $P > 0.05$; A-C), whereas the implantation rates of the PEC-treated blastocysts were significantly higher than those of the control population (a versus b, $P = 0.009$; D). Student's *t* test was used to evaluate differences in implantation rates.

1. 発現と局在の解析で培養系を評価

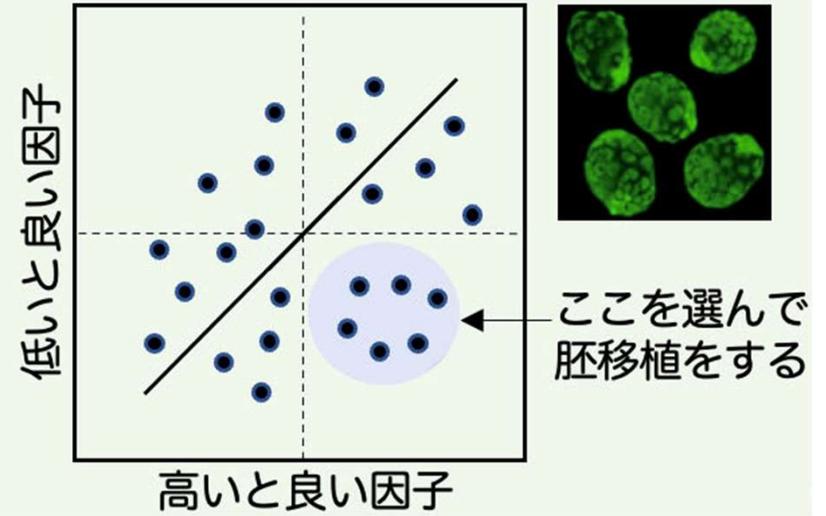


2. 培養胚を胚移植し着床率を評価





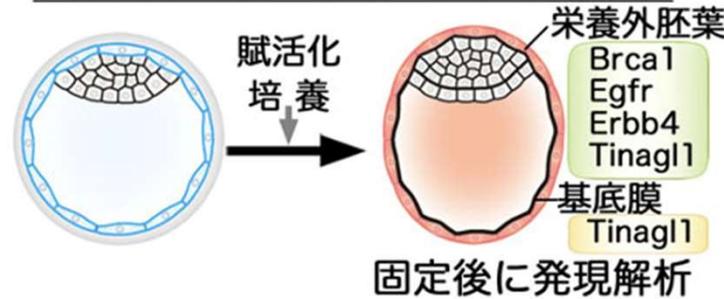
- マウス胚においてアミノ酸が着床率に作用
- 蛍光ライブイメージングアッセイで判定
- ガスバイオロジー因子(NO、O₂、ROS)で評価
- マウスはヒトのモデル動物
- マウス胚の着床様式はヒトに近い



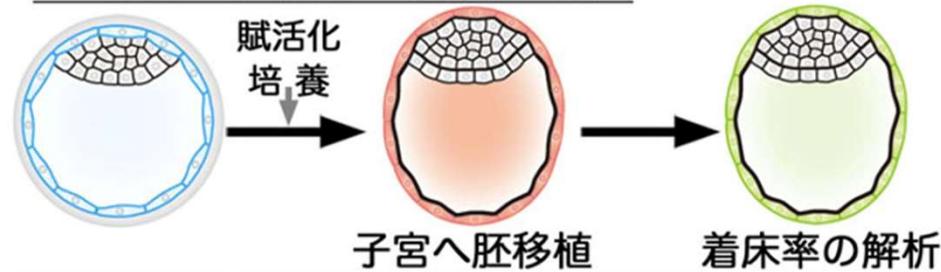
胚の着床様式がヒトに近いマウスを用い、アミノ酸が胚の着床能力に作用することを発見しました。また、一酸化窒素(NO)、酸素(O₂)、活性酸素種(ROS)を蛍光ライブイメージングアッセイで判定する直接評価法を樹立しました。

A. これまでの間接的方法

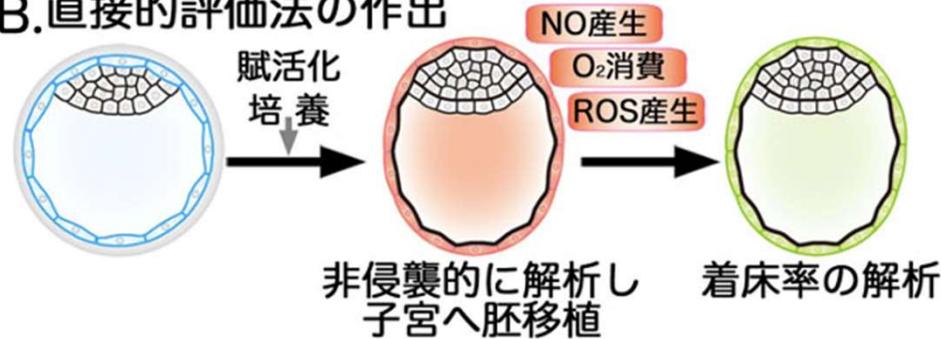
1. 発現と局在の解析で培養系を評価



2. 培養胚を胚移植し着床率を評価



B. 直接的評価法の作出



通常行われている培養液の改善は間接的な手法です。これまでに着床率を改善する培養方法を報告していますが、良好胚と判定された胚を移植しても全ては着床しません。改善のためには、新たな直接的な評価方法の樹立が必要です。

従来技術とその問題点

既に実用化されているものには、

胚移植後に妊娠が成立する効率
および産子に至る率が低い

という問題がある。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、着床率を改良することに成功した。
- 培養法の改良による着床率改善が可能となった（間接法）。
- ガスバイオロジー関連因子をライブアッセイすることで、着床する能力の高い胚を選別できる（直接法）。

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、培養液製造に適用することで市販化のメリットが大きいと考えられる。
- ヒトの生殖補助医療（不妊治療）への適応が期待できる。
- また、畜産分野におけるウシの経済形質改良と生産性向上に展開することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 現在、間接法について着床率の改善が可能などところまで開発済み。しかし、試薬の安定性と取扱いにおいて解決すべき点がある。
- 今後、直接法について実験を重ね、データを取得し、産子獲得に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、直接法の次世代への安全性を保障できるよう技術を確立する必要もあり。

企業への期待

- 未解決の試薬の安定性と取扱いについては、製品化する技術・ノウハウにより克服できると考えている。
- 培養液の製造技術を持つ企業との共同研究を希望。
- また、生殖補助医療に関する技術を開発中の企業、畜産分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 体外における哺乳動物胚を選抜する方法
- 出願番号 : 特開2020-184994
- 出願人 : 国立大学法人宇都宮大学
- 発明者 : 松本浩道

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 体外における哺乳動物胚を選抜する方法
- 出願番号 : 特願2022-88499
- 出願人 : 国立大学法人宇都宮大学
- 発明者 : 松本浩道

お問い合わせ先

宇都宮大学

地域創生推進機構 社会共創促進センター

TEL : 028-649-5502

FAX : 028-649-5497

e-mail uu.cpssc@cc.utsunomiya-u.ac.jp