

(5) 中課題「複合技術融合研究」

小課題「体外培養胚の品質評価装置の実用化研究」

研究の背景とねらい

ウシ体外受精卵を始めとする体外培養胚は、医学・畜産等の分野で活発に研究および利用されている。加えて、近年、クローン胚作出技術に対する要求性が高まり、品質の高い体外培養胚を選抜することの重要性が大きくなっている。しかし、従来から行われてきた体外培養胚の品質評価法は主として形態観察によるものであり、熟練を要する上に経験の差による個人差が大きかった。ゆえに、客観的でより簡便な評価法が待たれてきた。本研究は、体外培養胚の品質を無侵襲的に評価する計測技術の確立を目指し、畜産振興に必須であるウシ体外受精卵を測定対象として装置技術の実用化研究に取り組んだ。

共同研究の体制と役割分担(図1)

平成12年度後半より北斗電工(株)と共同研究契約を結び、平成13年度からは機能性ペプチド研究所を加えた3者間での共同研究契約に基づいて、密に連携しながら研究を進めた。役割分担は以下の通りである。

コア研究室：計測技術を開発し、基礎データを収集・検討した。合わせて、共同研究体制を指揮し研究・開発を推進した。

北斗電工株式会社：電気化学顕微鏡の装置技術をベースとして試作機を作製し、製品化に向けた改良を担った。

機能性ペプチド研究所：体外受精卵の作出・培養技術をベースとして、測定用試料を準備すると共に計測データの検討を担った。さらに、装置の開発・改良・製品化の各段階において、ユーザーとしての視点から助言・検証した。

研究の経過

(フェーズI段階)体外培養胚の生理状態を反映すると考えられる計測パラメータに対する種々の計測(電子スピン共鳴測定、蛍光スペクトル観察、電気化学検出)を試みた結果、電気化学顕微鏡を応用した酸素濃度計測によって呼吸量をモニターすることが最も有効であると判断された。体外培養胚の品質と呼吸量の相関を調査することで計測法の有効性を検証すると共に、共同研究企業として北斗電工株式会社を選定した。

(フェーズII段階)平成13年度より機能性ペプチド研究所・北斗電工株式会社との共同研究のもと、複合技術融合グループの研究課題として正式に取り組みを開始した。以降、3者の緊密な連携によって、計測法の装置化を推進した。北斗電工を主体として科学技術振興事業団「独創的研究成果育成事業(平成13年度)」の支援を受け、試作機2機を作製し、これを活用することによって製品化に向けての課題の洗い出しと解決

を図った。同時に、凍結過程での障害評価・クローン胚の計測実施・ウシ体外受精卵の受胎試験などによって、実用性の検証を行うと共に基礎データを集積した。

成果とその意義

(フェーズ)

- i 電気化学顕微鏡装置を応用した哺乳動物胚の無侵襲品質評価法及びその装置は、単一胚ごとの代謝能を数値化可能にした。

(フェーズ)

- i 電気化学顕微鏡原理を応用して、単一のウシ体外受精卵において呼吸量を計測する方法を開発した(図2)。

従来微小電極による酸素濃度測定法を工夫することで、精度よく単一受精卵の呼吸量を計測することを可能にした。[特許出願]

- ii 従来行われていた形態観察による品質評価においてグレードの高い受精卵ほど、呼吸量が多いことを確認した(表1)。

開発した計測法によって、形態観察に代わる客観的評価が可能であることを示した。

- iii 計測時の受精卵固定法を改良し、より無侵襲的で迅速な計測が可能となる測定用セルおよび計測法を考案した(図3)。

新型測定用セルによって計測手順を簡略化すると共に、受精卵当たりの計測時間を約1/5に短縮した。[特許出願]

- iv 試作機(図5)を用いた計測の実施を通して、装置・計測法を改良した。ウシ受精卵呼吸量計測装置(図4)を製品化(北斗電工)すると共に、測定用の周辺技術を整備した。

- v 改良した装置・技術を用いて、ウシ胚の培養技術の改良に取り組んだ受精後早い段階で酸素消費があることを始めて見出した。凍結直前/融解直後の呼吸量が発生能を反映することを明らかにした。クローン胚は通常の体外培養胚に比べて呼吸量が小さい傾向にあることを見出した(農業研究研修センターと共同)。

開発した装置が受精卵・クローン胚培養技術の改良に実際に役立つことを示すと共に、販売において必要となる基礎データを集積した。

- vi 呼吸計測に供した胚を実際に子宮に移植する受胎試験を実施した(JAおきたまと共同)。

今後の研究展開

開発したウシ受精卵呼吸量計測装置は、共同研究体制での話し合い・準備を経て平成

15年夏に生産販売体制を整えた。北斗電工(株)はハードの製造と電極部品の供給を担い、機能性ペプチド研究所は販売体制の整備・計測用液の供給・計測実施例の提供を担っている。共同研究体制を維持し、より実用性の高い測定実施のための改良点検討を行いながら、畜産分野を中心として装置技術の有効性をアピールしている。

今後、共同研究体制をより緊密にして、開発した装置の有効性と信頼性を高めていくことが重要である。引き続き様々な培養条件・発生段階のウシ体外受精卵を計測し、これを基礎データとして品質判定基準を設定する。また、これらの計測実施を通して装置の高性能化を図ると共に、畜産現場での利用が可能な廉価版の開発も遂行していく。

さらに、当装置を用いて、クローン胚の作出技術の向上のための基礎的研究を推進する。加えて、培養細胞のモニタリングおよびヒトの不妊治療への応用も視野に入れ、計測技術の適用範囲を拡大していく予定である。

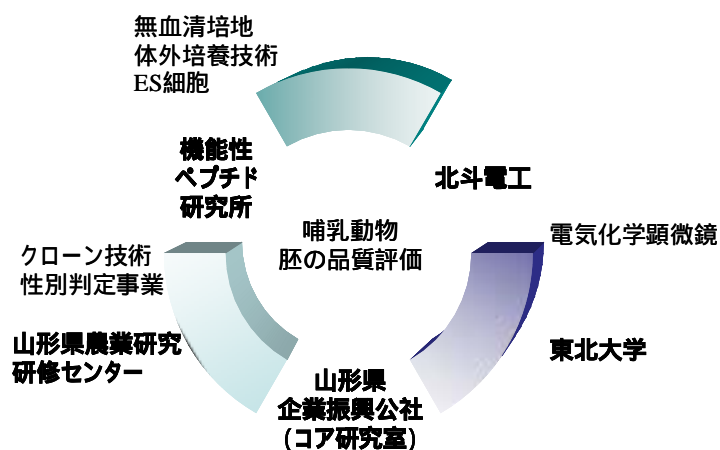


図1 共同研究体制

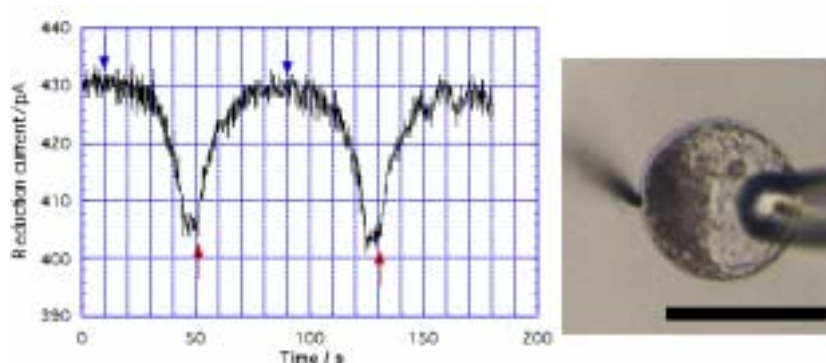


図2 呼吸量計測

表1 ウシ受精卵の形態評価と呼吸活性

受精卵 No.	胚のグレード	半径 (r_s / μm)	呼吸量 ($\times 10^{14}$ / mol s^{-1})
1	A	66	1.499
2	B	70	1.392
3	A	68	1.347
4	A	64	1.220
5	B	62	1.216
6	B	64	1.102
7	A	64	1.096
8	A	64	1.081
9	C	66	1.013
10	C	62	0.996
11	B	68	0.951
12	A	64	0.875

13	B	64	0.790
14	D	64	0.778
15	C	68	0.711
16	A	70	0.644
17	B	64	0.550
18	C	64	0.500
19	D	62	0.221

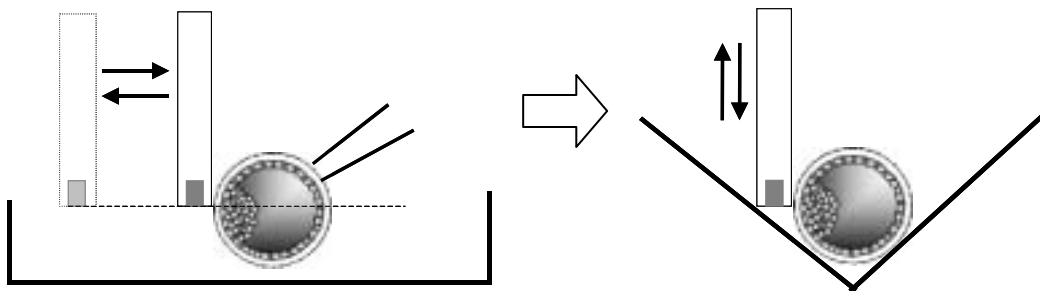


図3 受精卵固定法・計測法の改良



図4 受精卵呼吸測定装置（北斗電工株式会社）

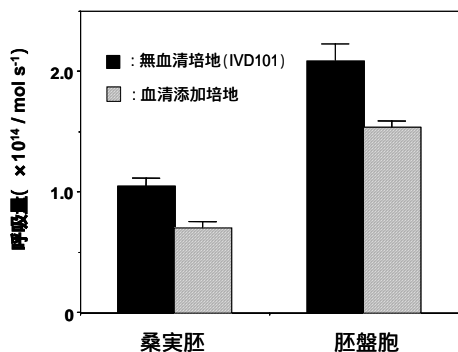


図5 呼吸量で判定した培養液の効果

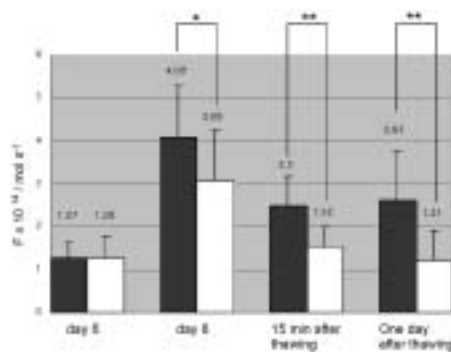


図6 凍結・融解の前後での呼吸量

順調に生育
 生育不良