



日本中央競馬会
特別振興資金助成事業

令和7年度JRA畜産振興事業に関する調査研究発表会

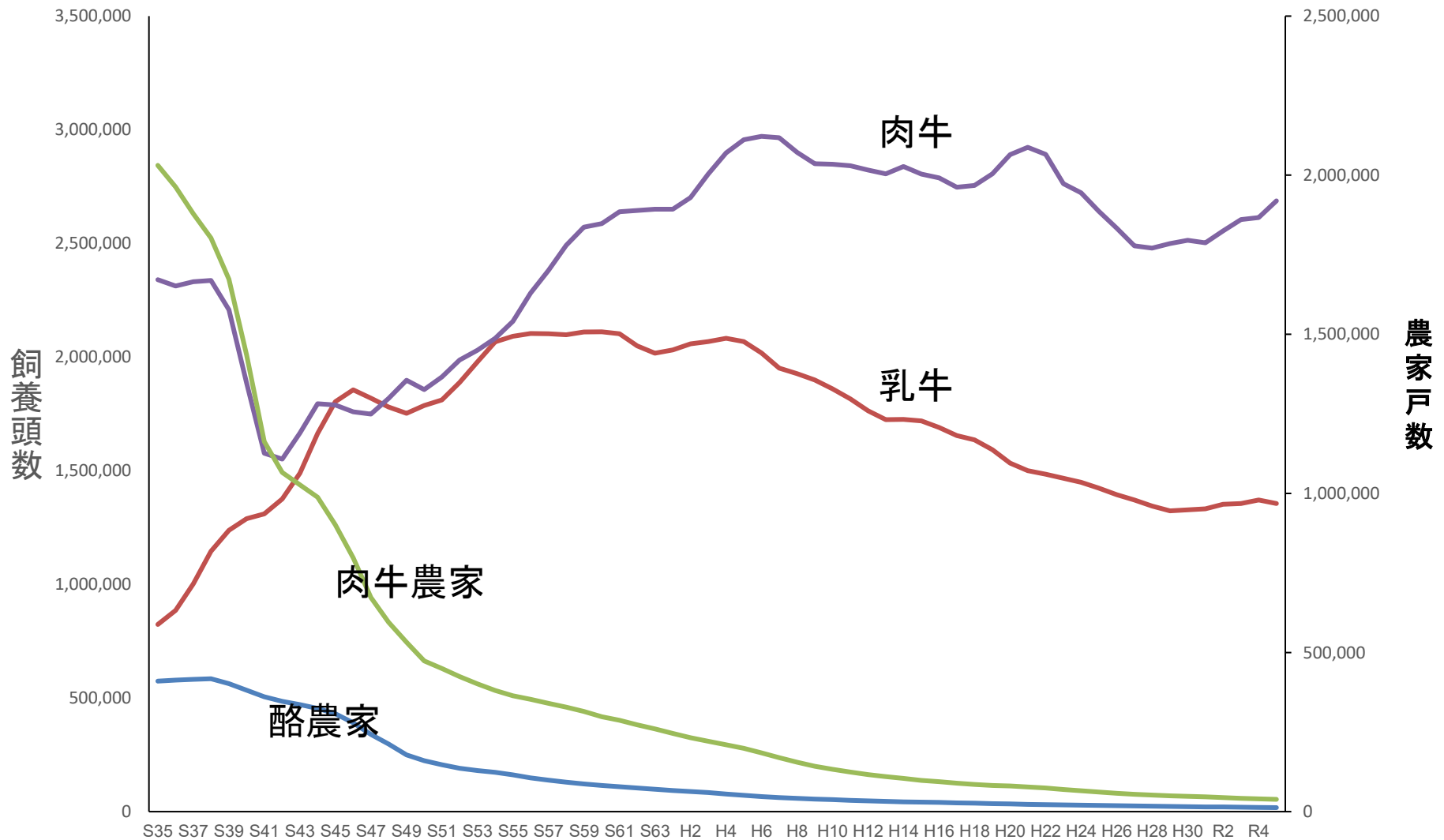
牛着床前子宮内胚情報の直接検出技術の開発と実証

～ 空胎期間短縮に向けた発情回帰前胚シグナルの早期検出 ～

牛子宮内胚情報の直接検出技術開発事業

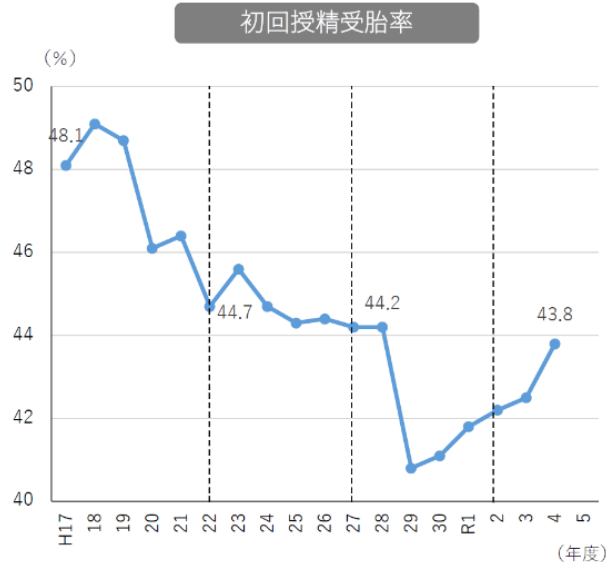
北海道大学 大学院 農学研究院 教授 高橋 昌志

肉用牛、乳用牛頭数と農家戸数 (家畜改良センター牛個体別情報の集計データより)

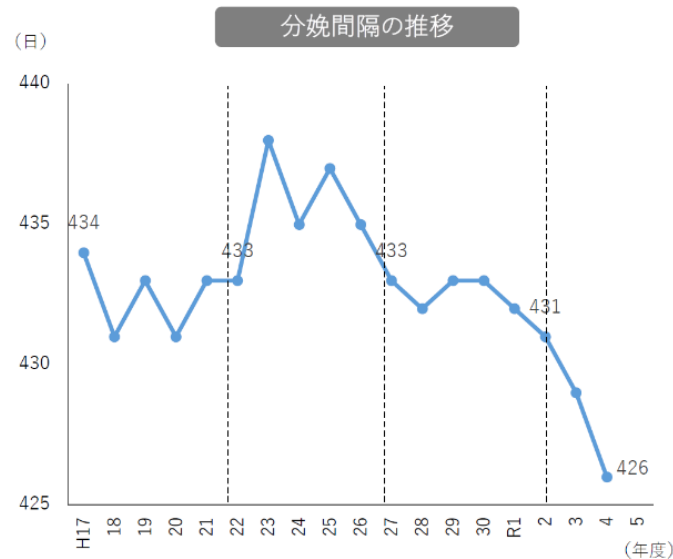


近年の畜産をめぐる情勢(牛の繁殖関連)(農水省資料より)

乳牛

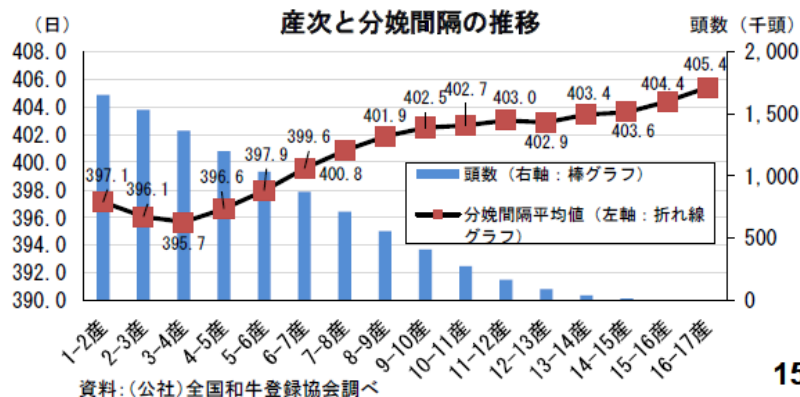
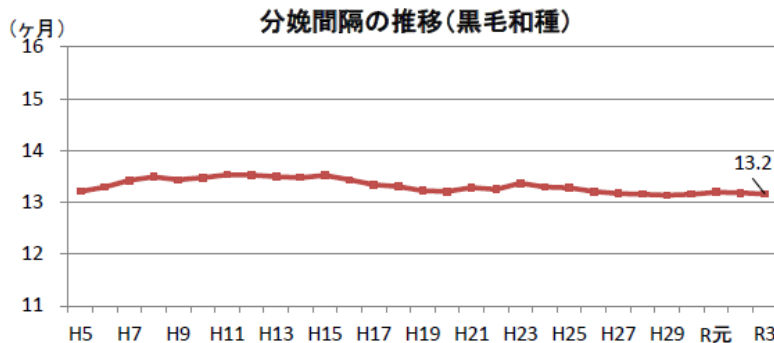


資料：(一社)家畜改良事業団調べ



資料：(一社)家畜改良事業団「乳用牛群能力検定成績のまとめ」

肉牛



夏期高温による受胎率低下
牛肉の海外輸出戦略

- ・受胎率向上
- ・空胎期間短縮

空胎期間の延長により、1頭1日当たり
乳牛: 約700～1,600円(1,200円)
肉牛: 約1200円

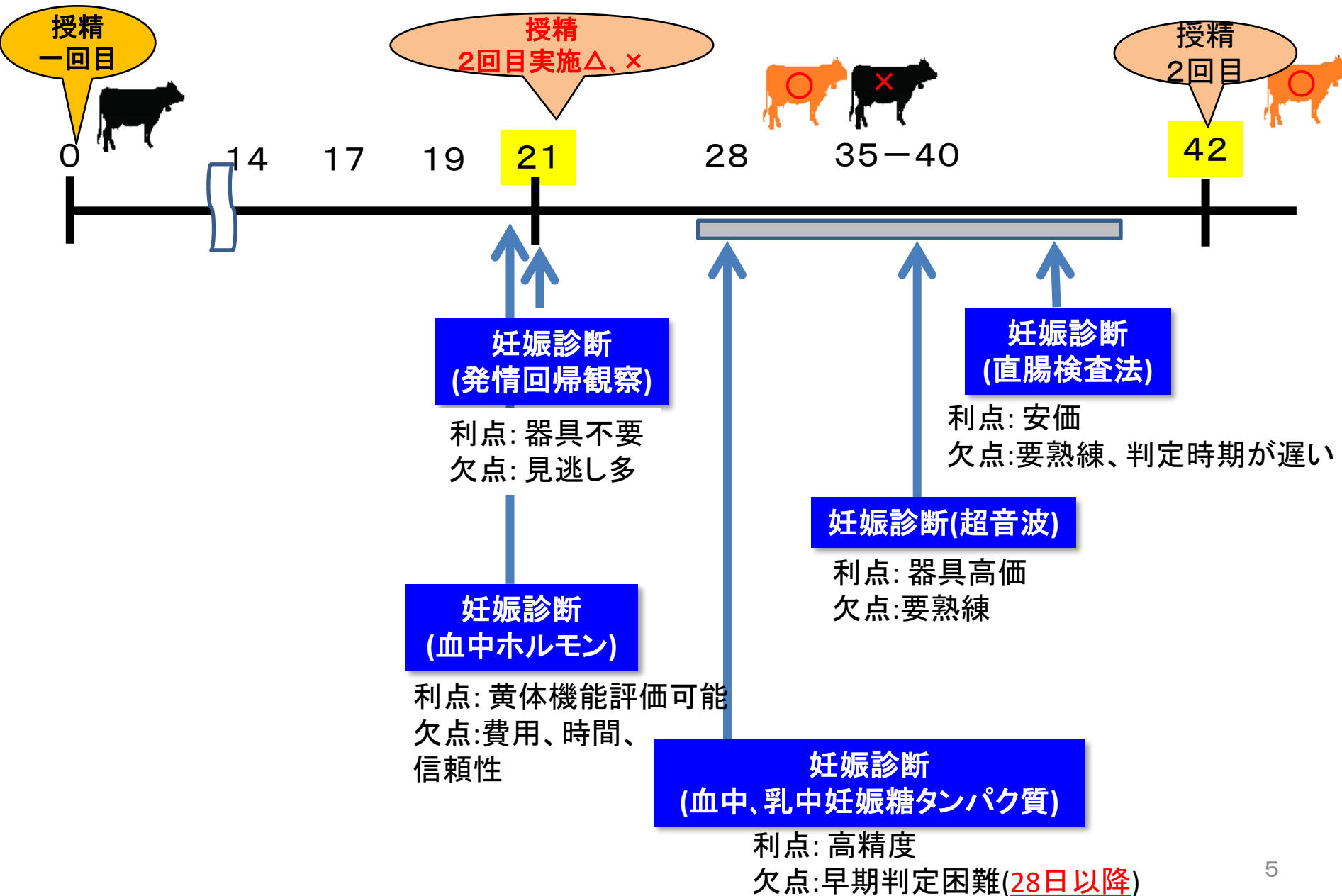
繁殖性の観点から

- ・高受胎人工授精技術(発情・排卵の高精度検出)
- ・受精卵移植
- ・栄養・飼養管理
- ・早期妊娠鑑定 → 不受胎時の迅速次回受胎処置ができ、空胎期間の短縮が可能

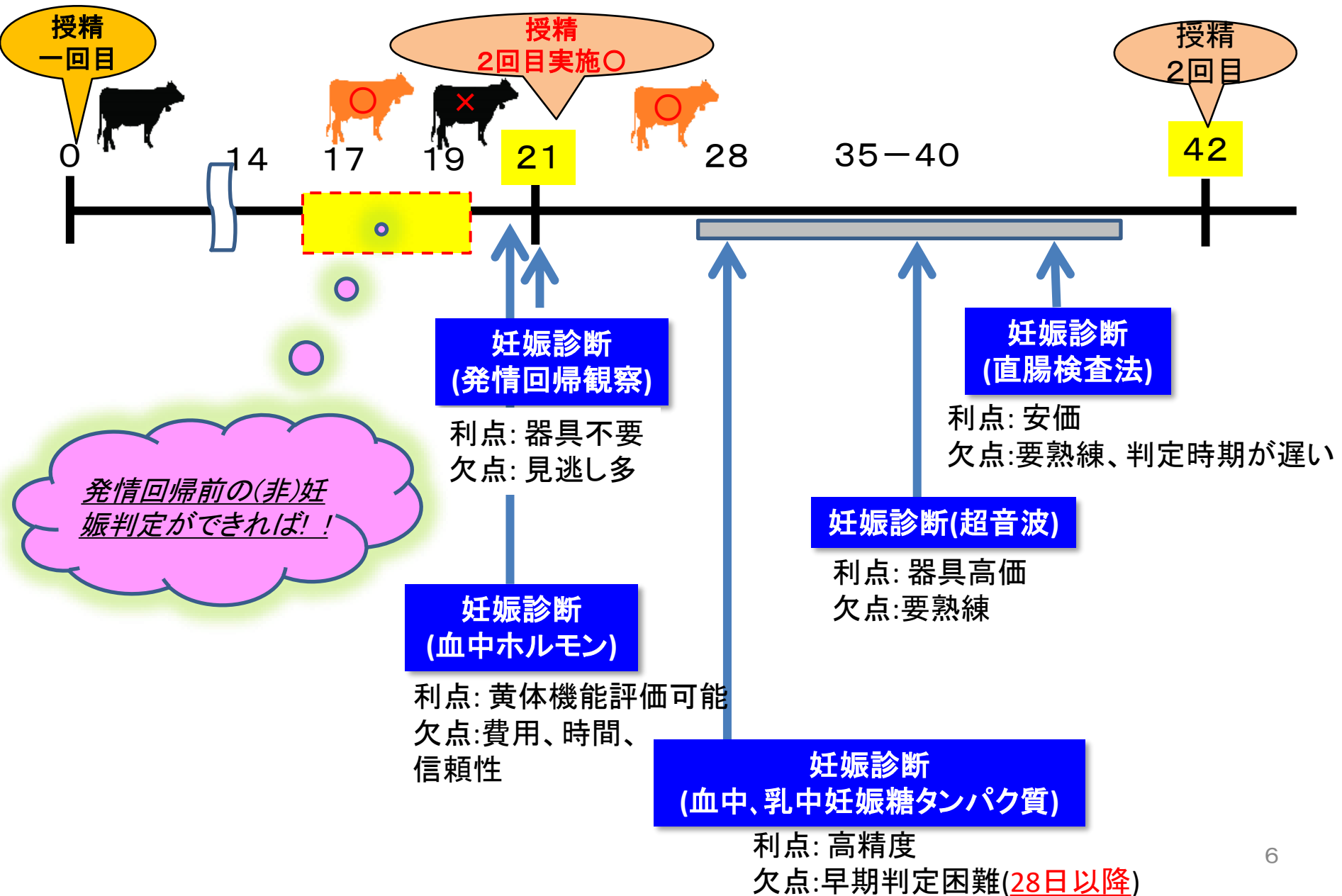
妊娠診断手法に必要なポイント

- 1) 受胎措置後、できるだけ早い時期の判定
- 2) 妊娠、非妊娠結果について85%以上の精度
- 3) 操作が容易で診断結果が明瞭
- 4) 胎子、母体に有害ではない
- 5) 低コスト

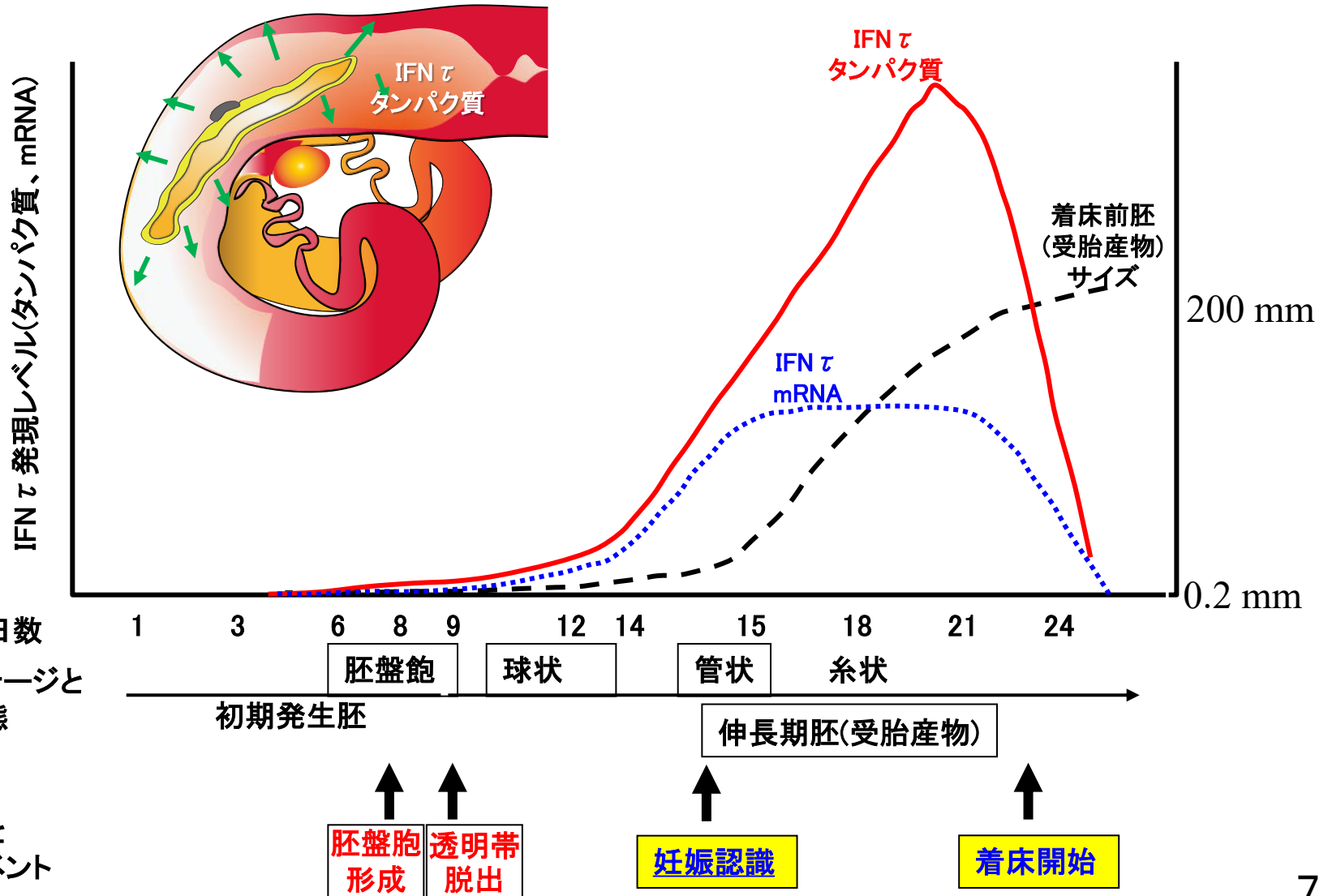
早期妊娠診断技術の現況



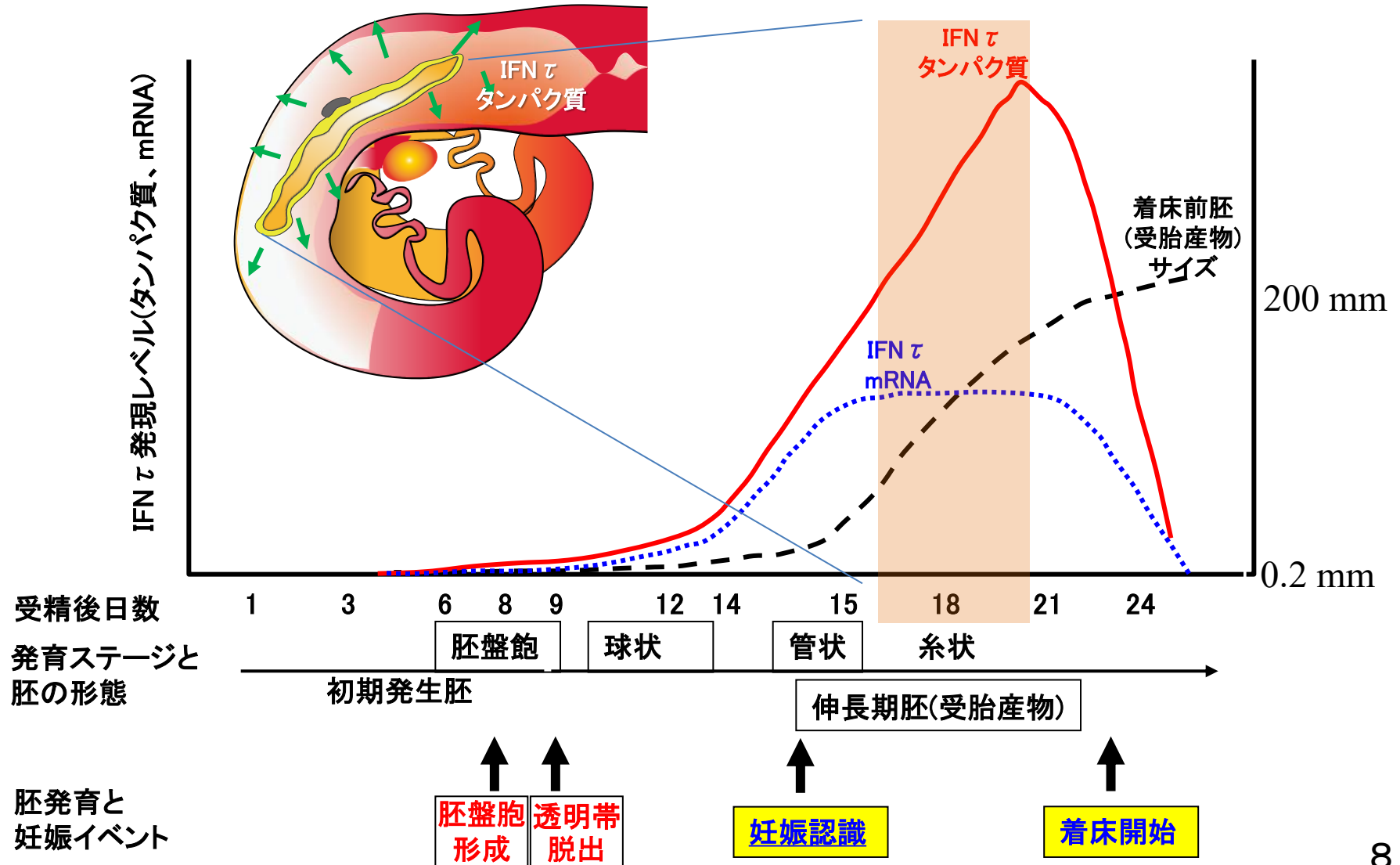
早期妊娠診断技術の現況



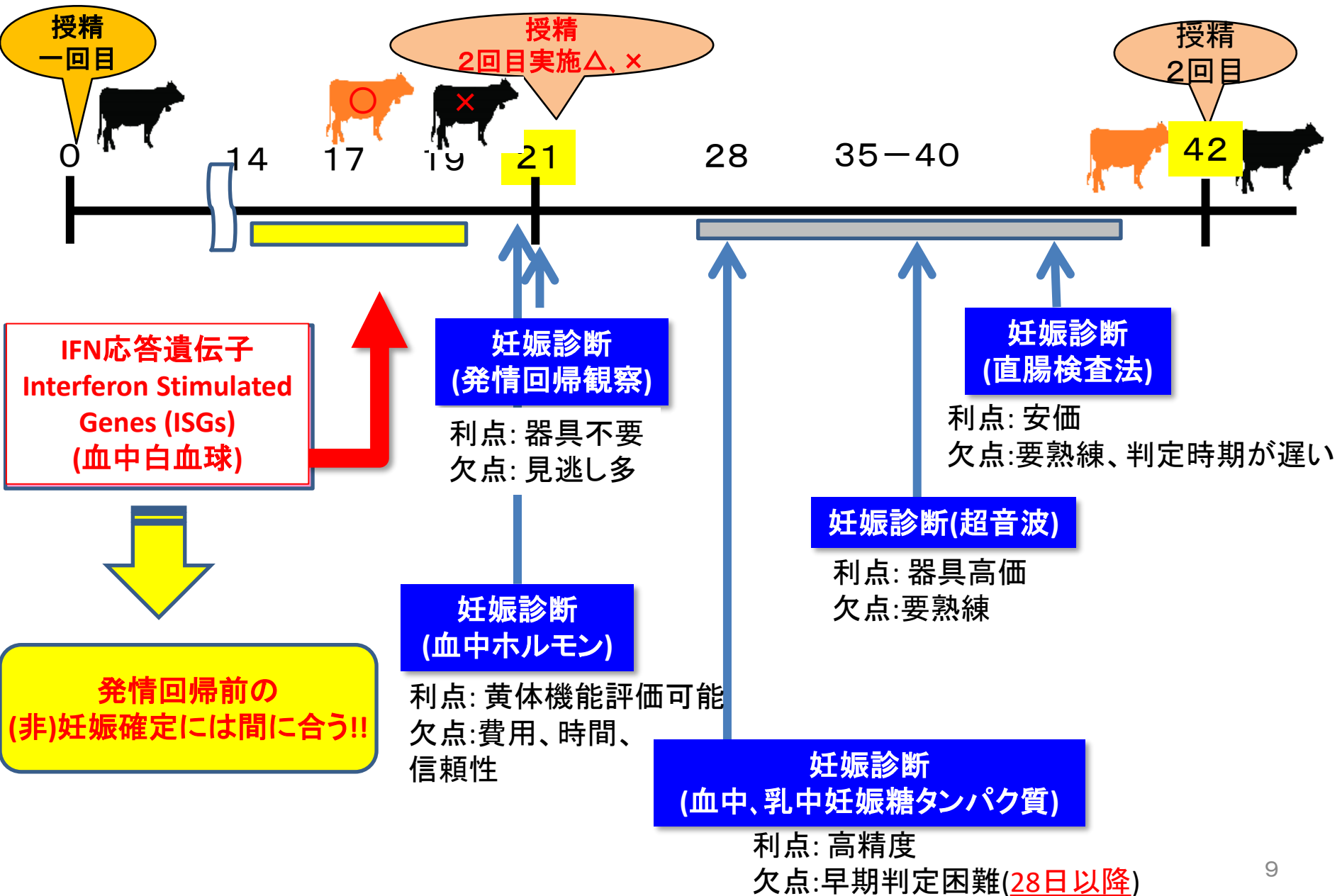
ウシの妊娠過程における胚から産生される因子である インターフェロンIFN τ が関わる妊娠認識と応答機構



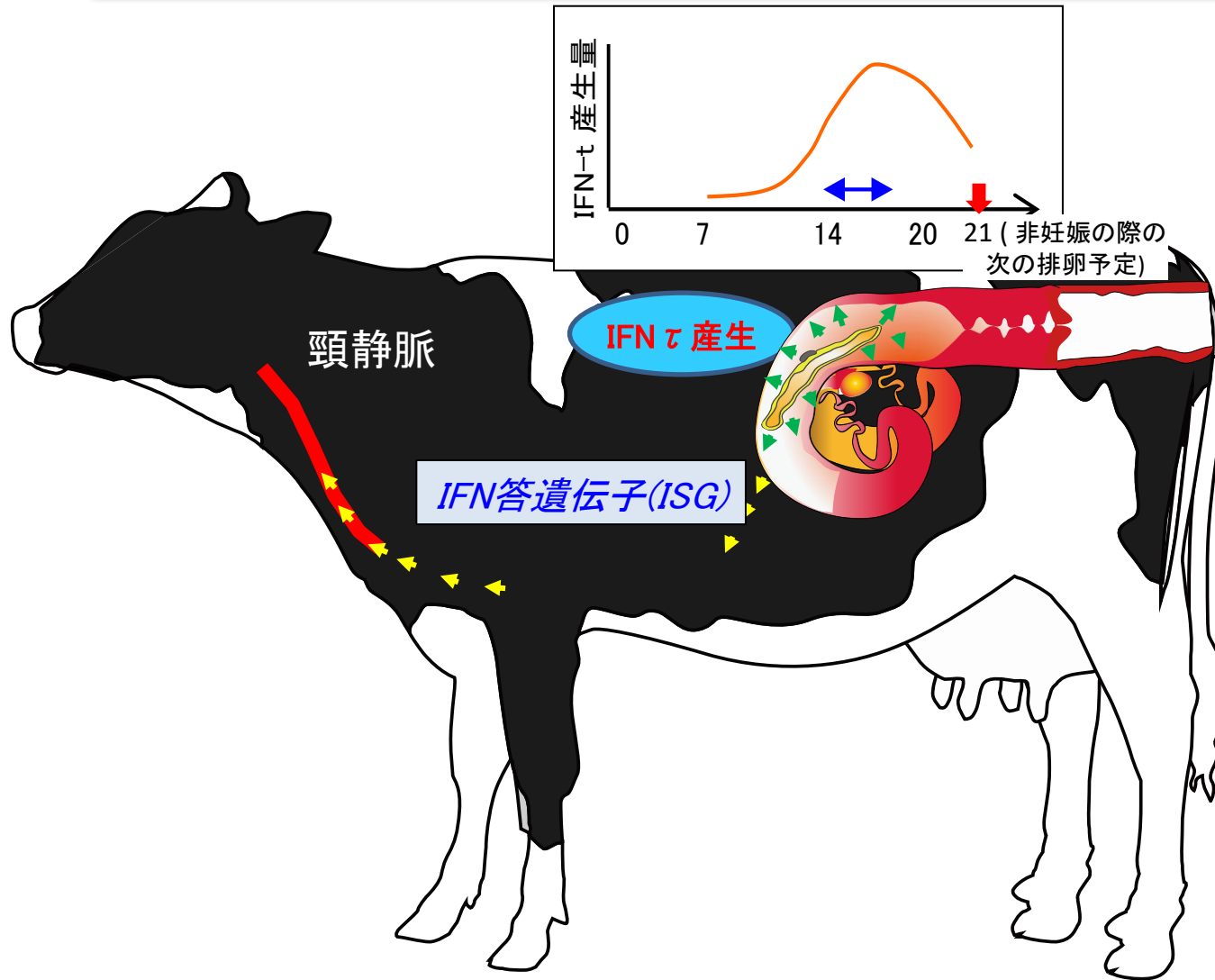
ウシの妊娠過程における胚から産生される因子である インターフェロンIFN τ が関わる妊娠認識と応答機構



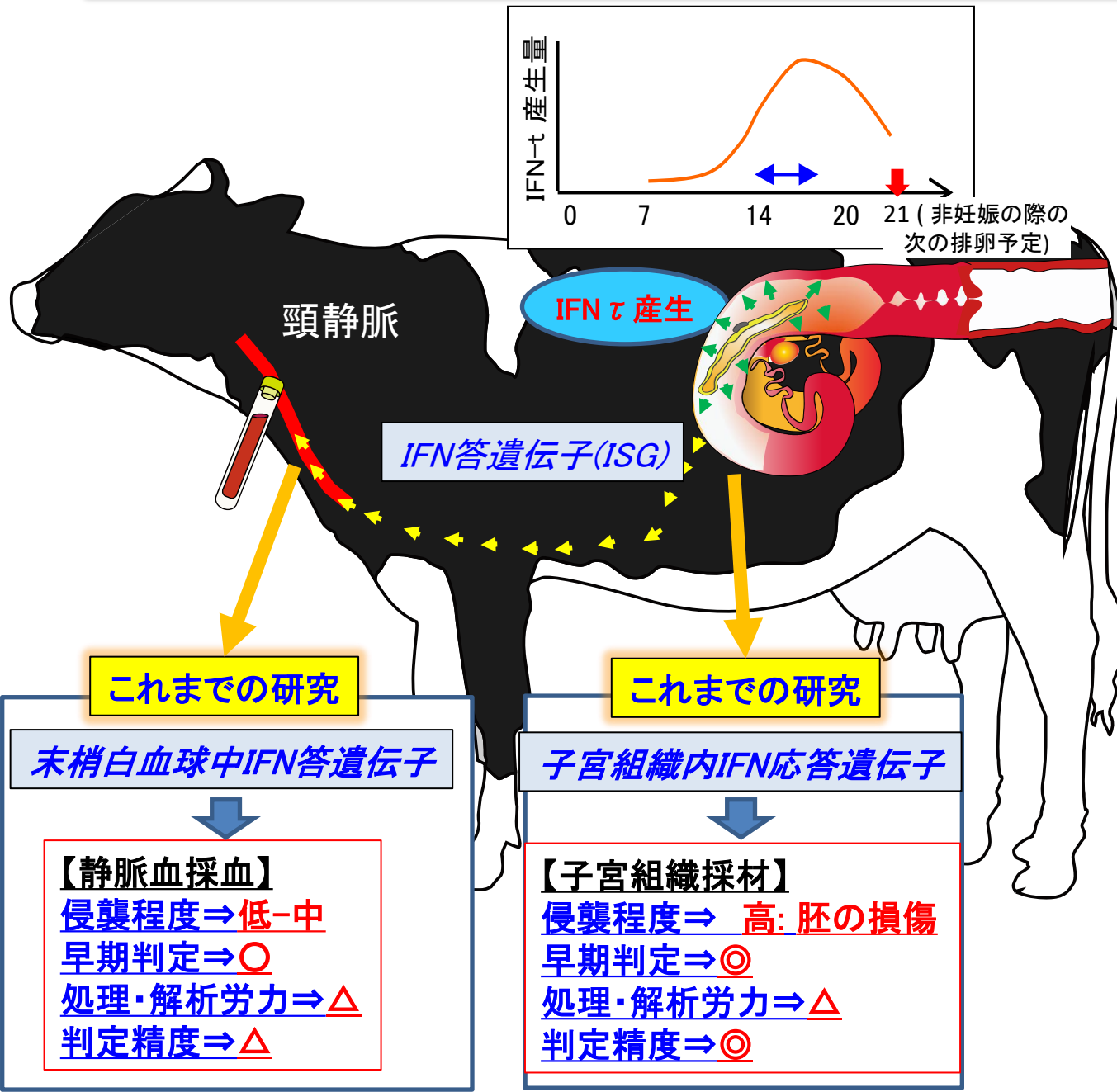
早期妊娠診断技術の現況



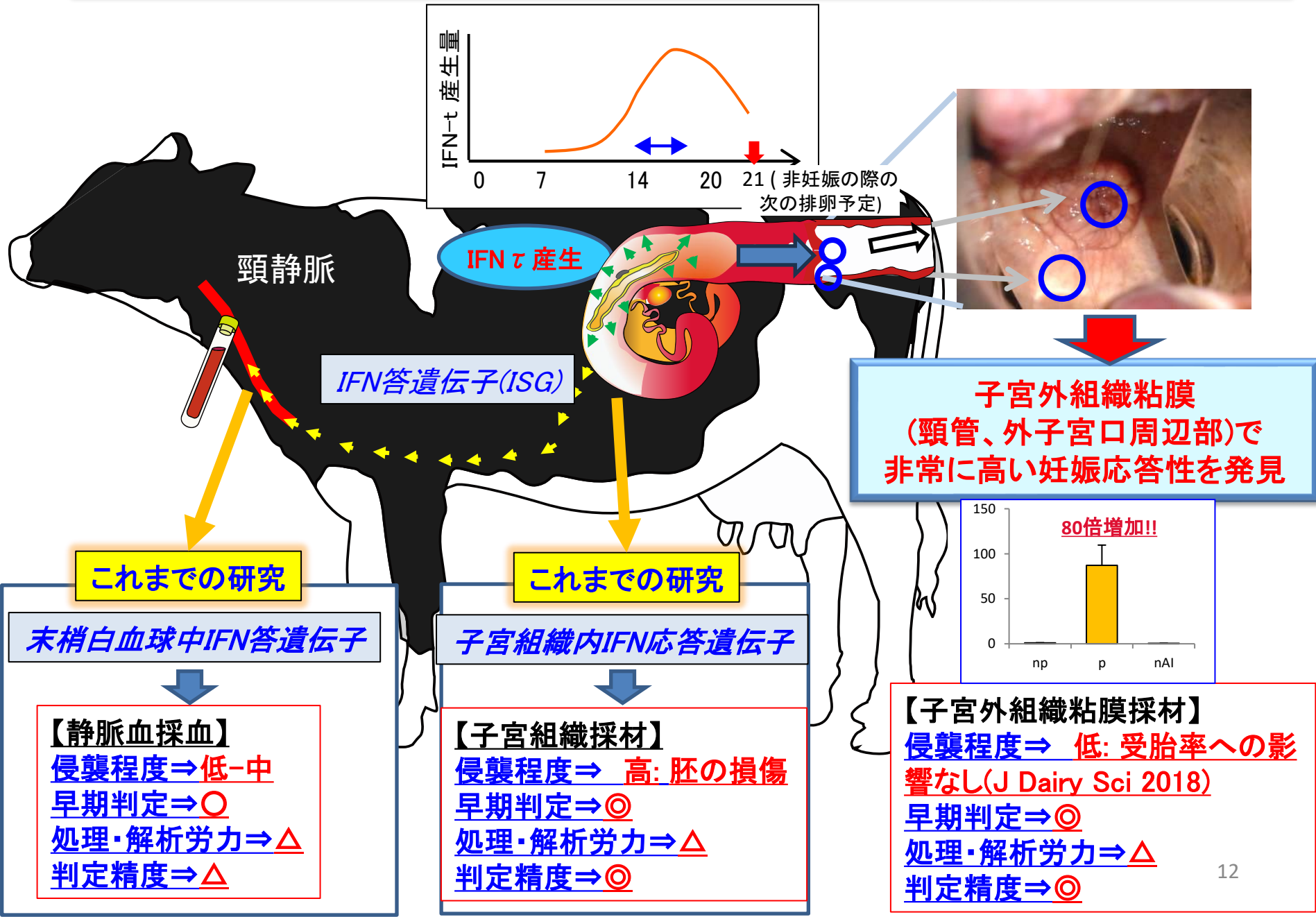
末梢白血球、子宮内膜以外でISG検出できるところはない？



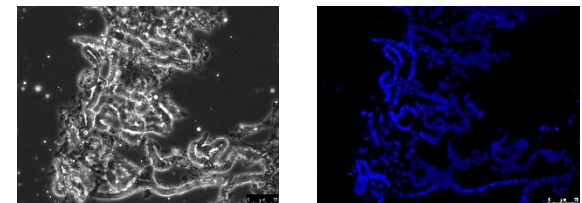
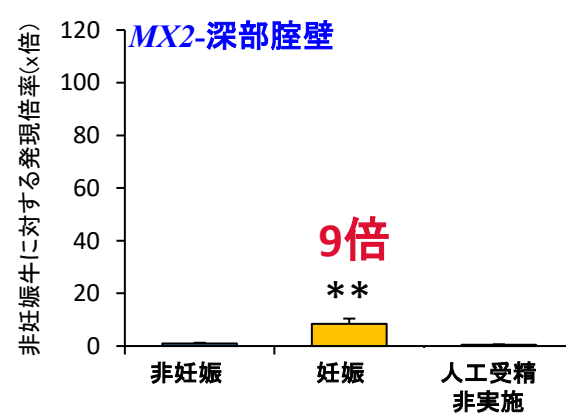
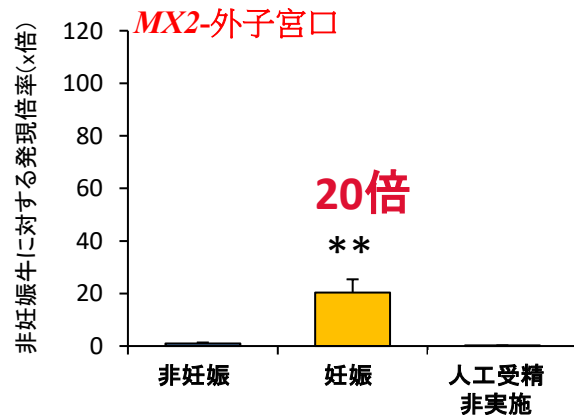
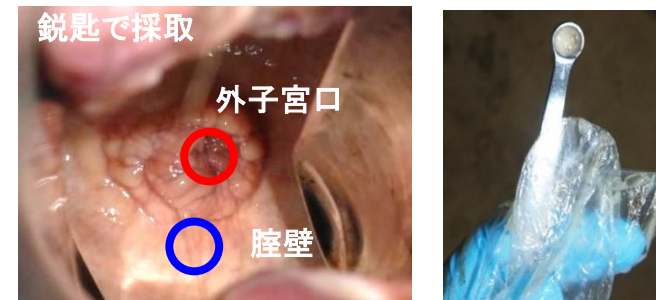
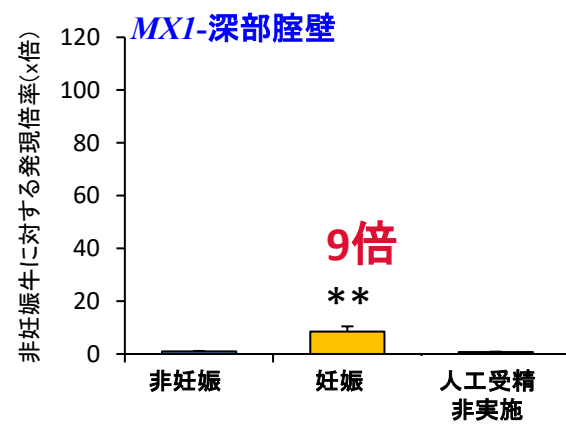
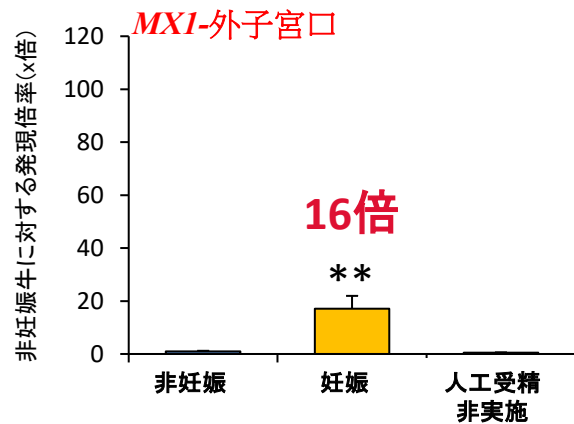
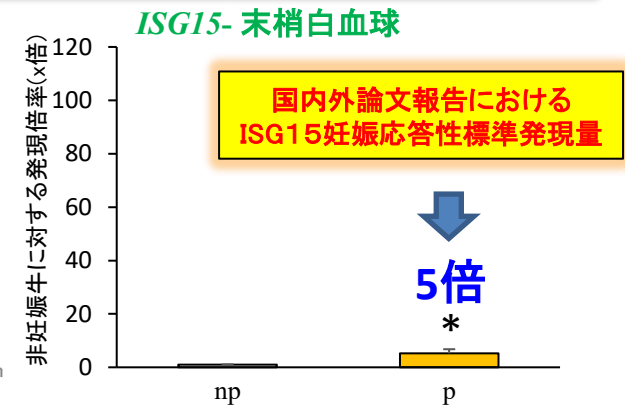
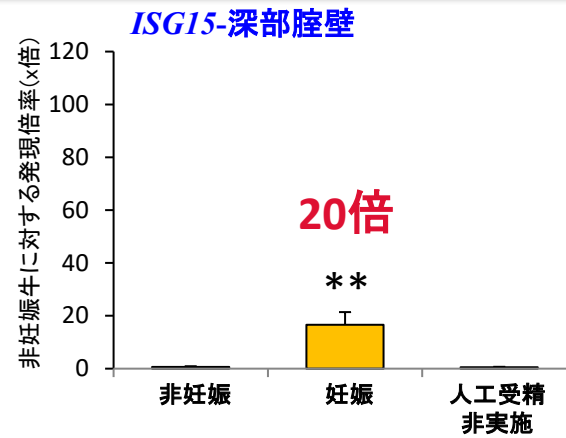
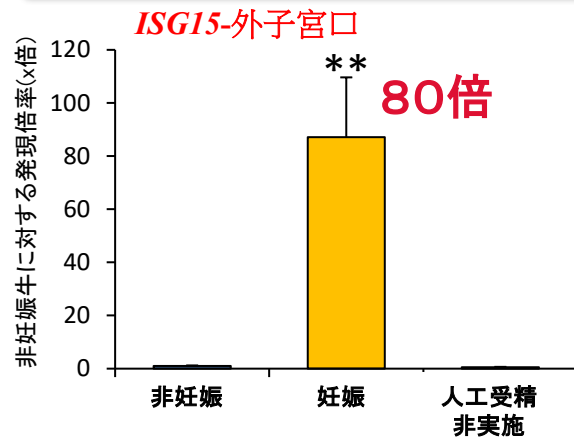
末梢白血球、子宮内膜以外でISG検出できるところはない？



末梢白血球、子宮内膜以外でISG検出できるところはない？



子宮外組織粘膜における妊娠特異的遺伝子発現

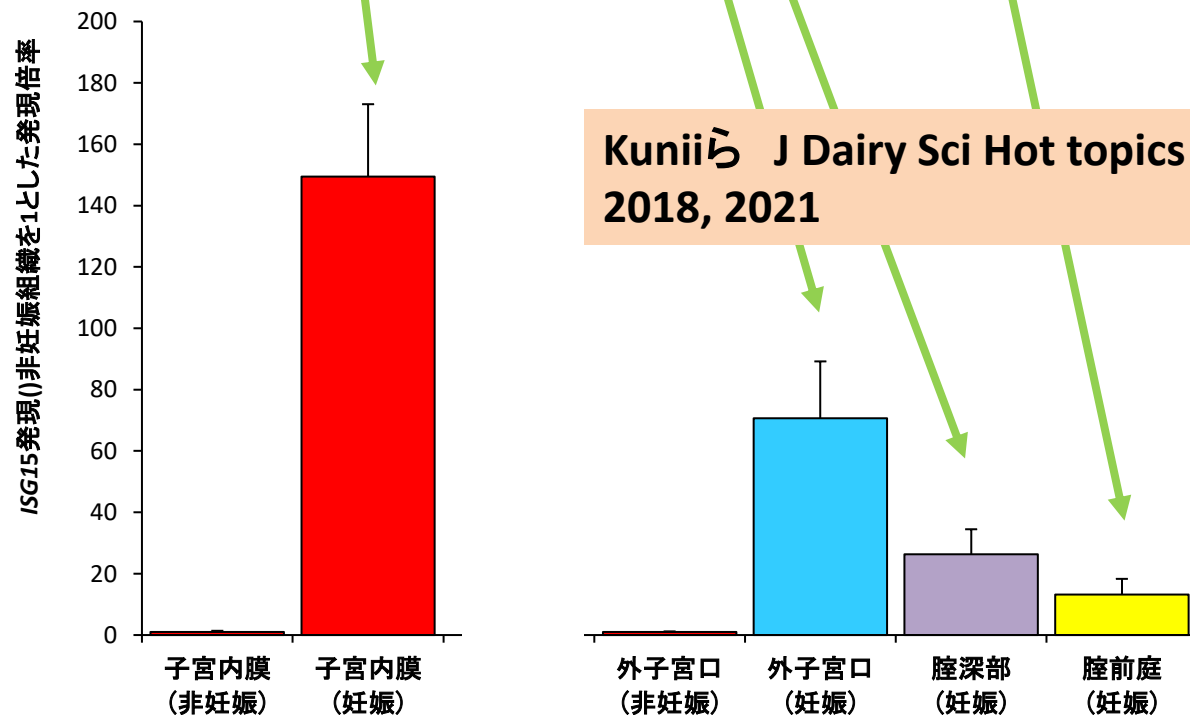
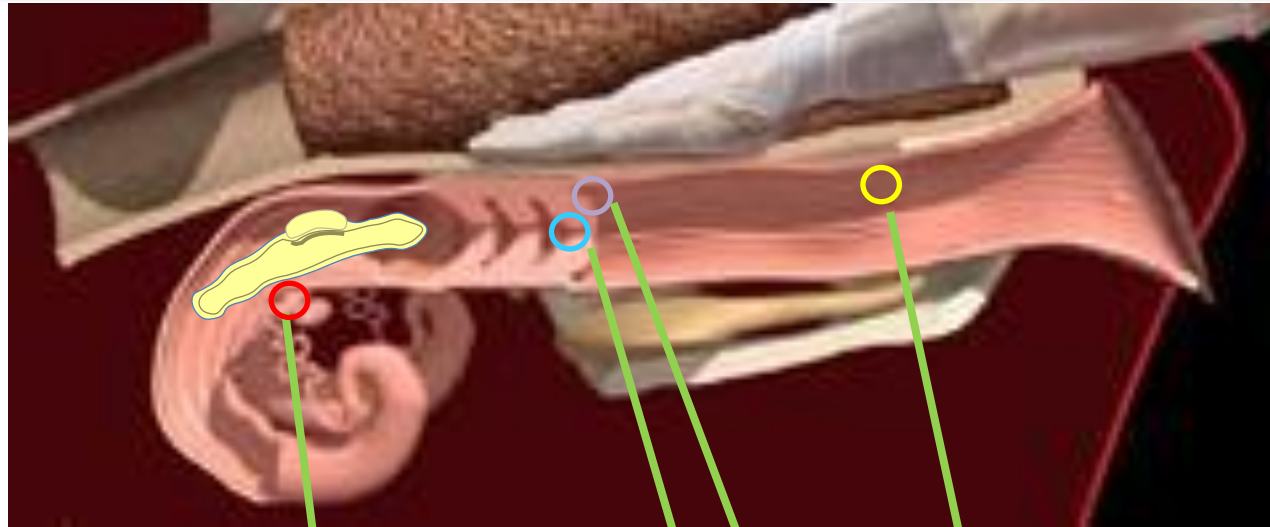


代表的なIFN応答遺伝子
Interferon Stimulated Genes (ISGs)

ISG15, MX1, MX2

J Dairy Sci. Hot topic 2018

妊娠day 18牛におけるISG15遺伝子発現量と子宮からの距離



妊娠17-18日
子宮外組織に
おけるISG15発
現

複数遺伝子を使ったLAMP反応精度の向上

| 単一遺伝子 | 検出閾値時間 (秒) | 正解率 (%) | 判定感度 (%) | 特異度 (%) | 妊娠的中率 (%) | 非妊娠的中率 (%) |
|--------------|---------------|------------|-------------|------------|--------------|---------------|
| <i>ISG15</i> | 2,240 | 66 | 56 | 77 | 73 | 62 |
| <i>IFIT1</i> | 2,690 | 83 | 90 | 75 | 80 | 88 |
| <i>MUC16</i> | 2,880 | 61 | 70 | 52 | 61 | 61 |

複数指標の場合 (70頭でモデル作成、30頭分の未学習データの妊娠成否をLAMP法のデータから予測)

| 組合わせ遺伝子 | 正解率 (%) | 判定感度 (%) | 特異度 (%) | 妊娠 的中率 (%) | 非妊娠 的中率 (%) |
|------------------------------|------------|-------------|------------|------------------|-------------------|
| <i>ISG15 / IFIT1 / MUC16</i> | 83 | 69 | 100 | 100 | 74 |
| <i>IFIT1 / MUC16</i> | 97 | 100 | 93 | 94 | 100 |
| <i>IFIT1 / ISG15</i> | 60 | 50 | 71 | 67 | 56 |
| <i>ISG15 / MUC16</i> | 60 | 50 | 71 | 67 | 56 |

正解率 = $(tn + fn) / (tn + fp + fn + TP)$, 全サンプルのうち、正しく予測できたものの割合

感度 = $tp / (tp + fn)$, 妊娠している牛を正しく妊娠と判断できた割合

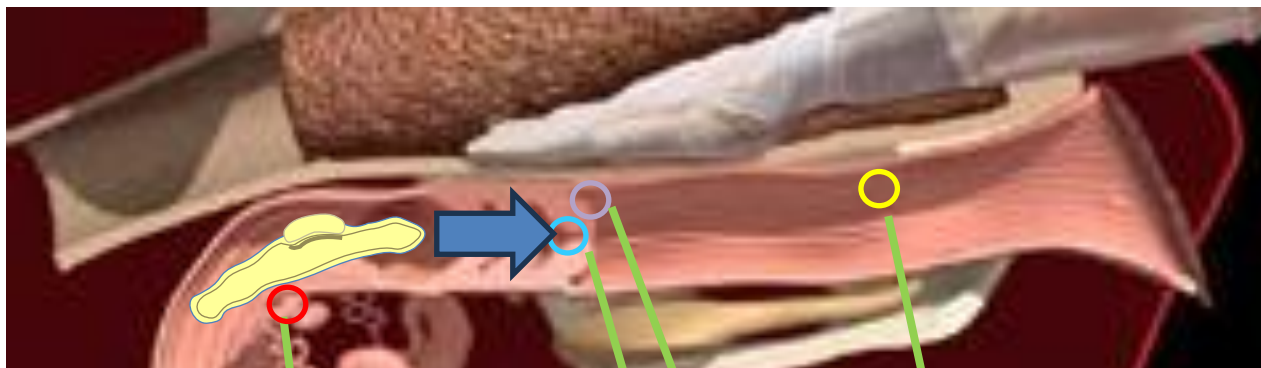
特異度 = $tn / (tn + fp)$, 妊娠していない牛を正しく非妊娠と判断できた割合

妊娠的中率 = $tp / (tp + fp)$, 妊娠と判定したもののうち、本当に妊娠している割合

非妊娠的中率 = $tn / (tn + fn)$, 非妊娠と判定したもののうち、本当に妊娠していない割合

妊娠サンプル: 52頭

非妊娠サンプル: 48頭



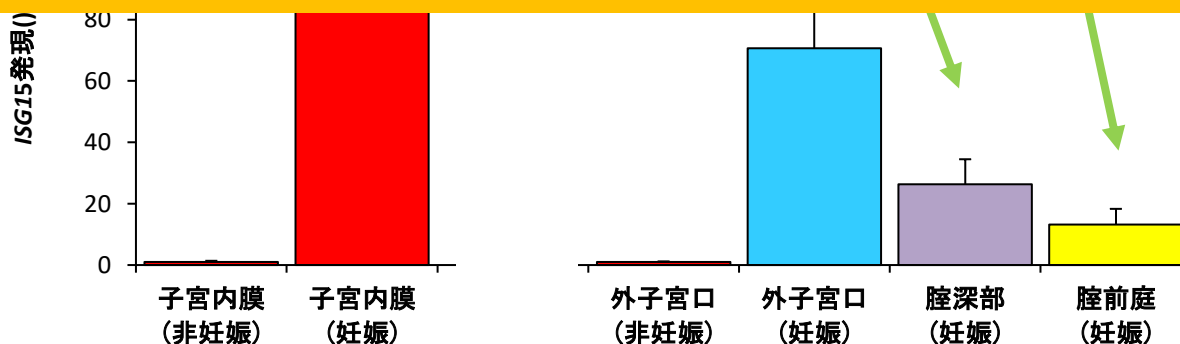
遺伝子発現解析に係る時間と手間、精度が残された課題



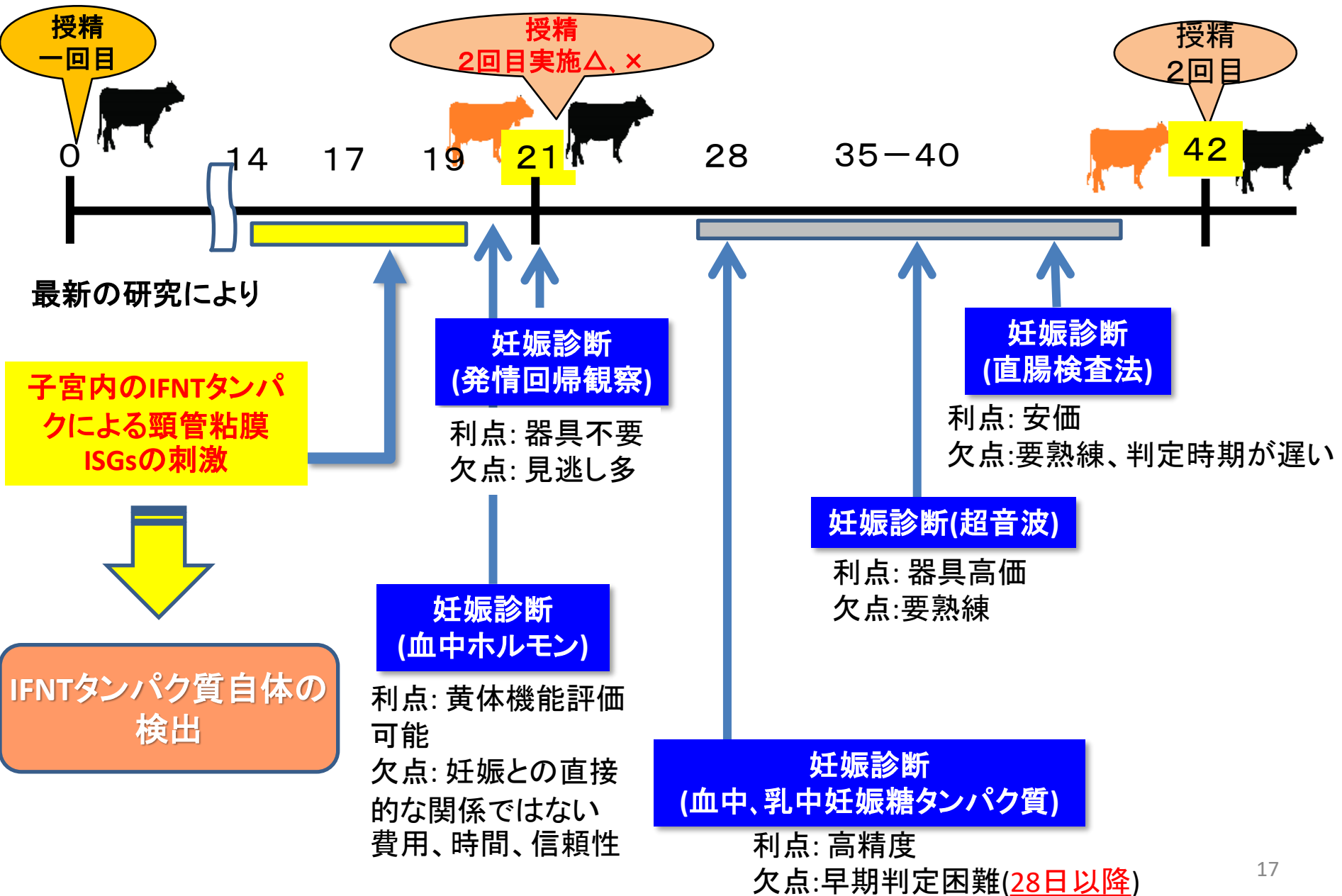
ISG刺激因子としての胚が産生する
IFNTタンパクが関わるのでは?



IFNTの存在確認と直接検出



早期妊娠診断技術の現況



「牛子宮内胚情報の直接検出技術開発事業」の設計



北海道大学

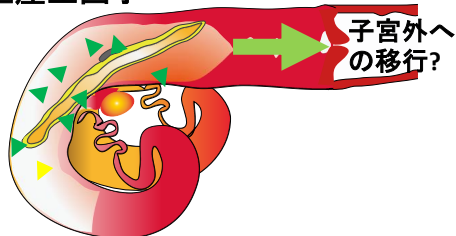
研究実施体制

農学研究院

代表者 高橋昌志

- ・研究統括
- ・子宮内胚産生因子候補の子宮外直接検出系の構築

胚産生因子



胚由来因子候補の決定、直接検出

- ・免疫検出手法の確立(免疫検出系(イムノクロマト, ウェスタンブロット)の確立

- ・頸管粘液中に含まれる胚情報の検出

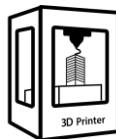


地球環境科学研究院

研究分担者 川口俊一

- ・検体採取・観察等多目的スマートデバイスの構築と検証

3Dプリンタ



多目的スマートデバイス



北海道立総合研究機構

酪農試験場

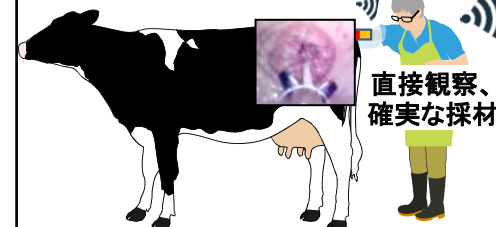
研究分担者 窪 友瑛

道総研

- ・胚産生因子の直接検出と実証

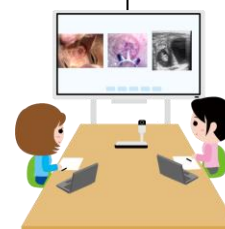
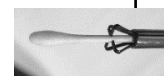


Wifi, 5G



直接観察、
確実な採材

5Gネットワーク等による遠隔画像
観察・共有

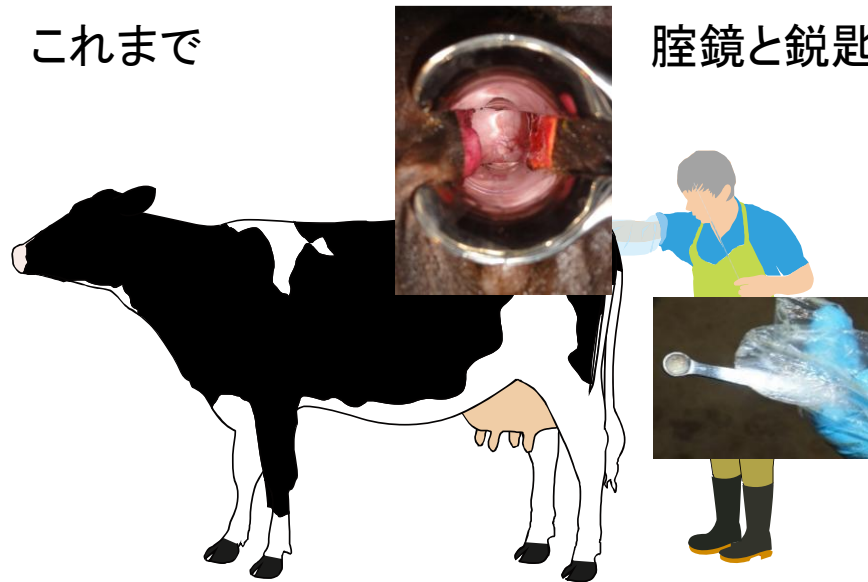


◎妊娠 or 非妊娠?

大家畜生殖器内の可視操作用 多目的デバイス開発

簡易・低侵襲組織採取デバイスの開発事業

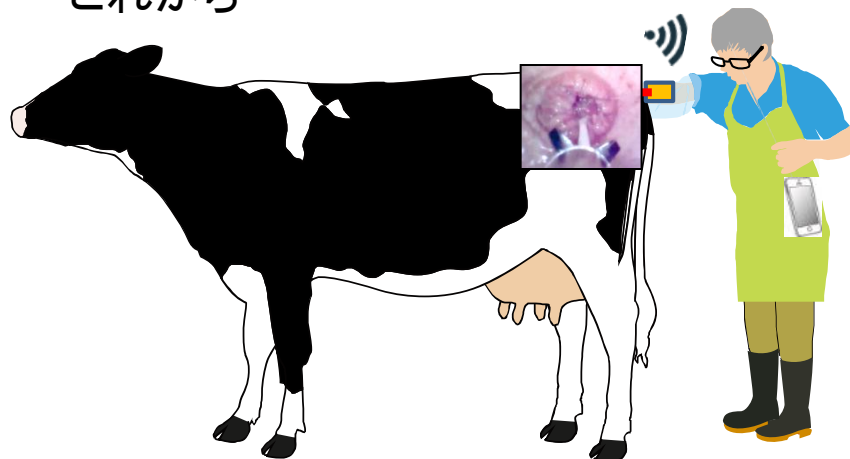
これまで



腔鏡と鋭匙による採材

- 腔鏡挿入によるウシへのストレス
- 固定不安定による腔鏡の落下
- 作業中の排便による腔内汚染
- 血中の因子からの妊娠因子検出の際には獣医師による採血作業が必要

これから



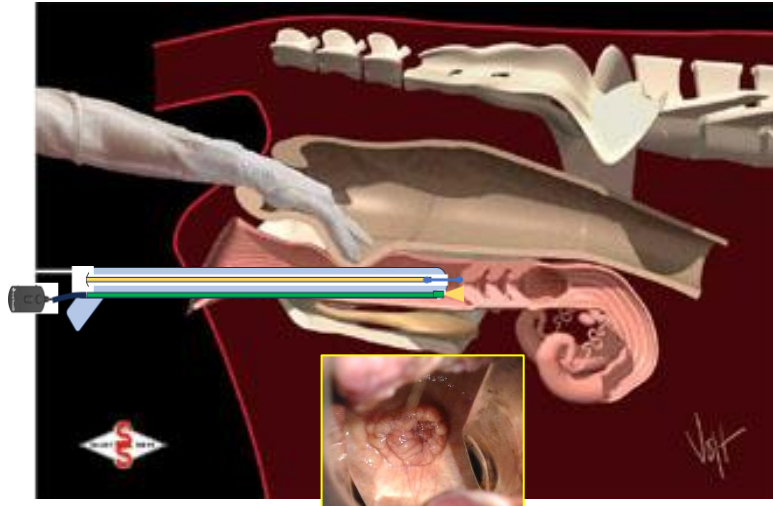
腔内を**直接目視**しながらの採材ができれば、短時間、低ストレス、省力化



保定、除糞、腔鏡挿入を必要とせず、牛のストレスや術者の負担減

大家畜生殖器内の可視操作用多目的デバイス開発のコンセプト

外子宮口の視認と挿入時まで可視的に行い、挿入後の脱着による操作の簡易化



多目的利用が可能

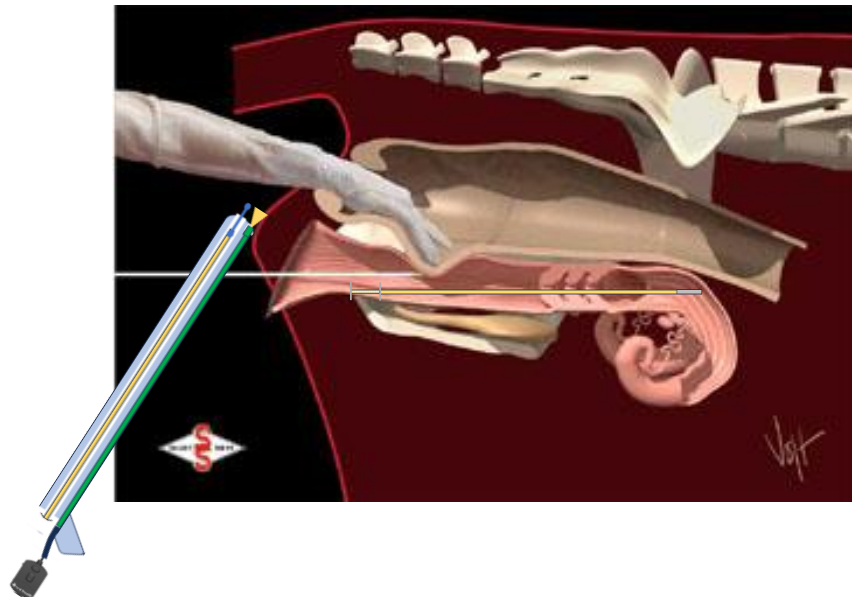
○子宮頸管、子宮内のサンプリング

○人工授精

○性選別精液の深部人工授精

○受精卵回収のためのバルーンカテーテルの
子宮内挿入

○子宮内洗浄

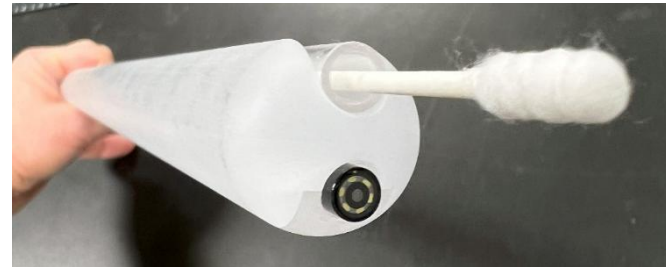


Wifi, 5G



AI/ET/妊娠判定用多目的スマートデバイス開発のコンセプト

1. 注入器等の器具を子宮挿入時まで可視的に行い、挿入後の脱着による操作の多目的化
2. 内視鏡、注入器を脱着可能として使用範囲の多様化
3. 細径、軽量による牛へのストレス軽減
4. 洗浄の容易化



出願国 : 日本
種別 : 特許
出願人 : 国立大学法人北海道大学 他
発明の名称 : 挿入補助装置及び挿入補助システム
出願番号: 2025-020830 出願日 : 2025年 2月12日

腔内拡張処置なしで腔内の鮮明画像の観察とサンプリングが可能

腔内情報の多様かつ詳細な情報観察が可能



尿腔



重複外子宮口



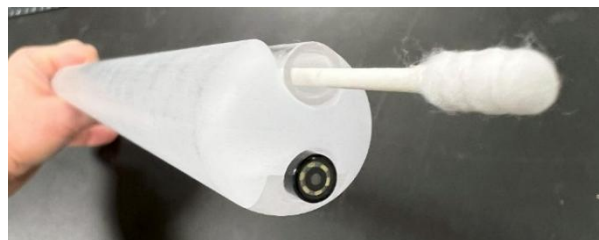
マルチデバイスの試用(頸管粘液サンプリング)

多様なモニターを使用可

スマートグラス

スマートフォン

スカウター



作業中のスマートグラスに投影されている映像



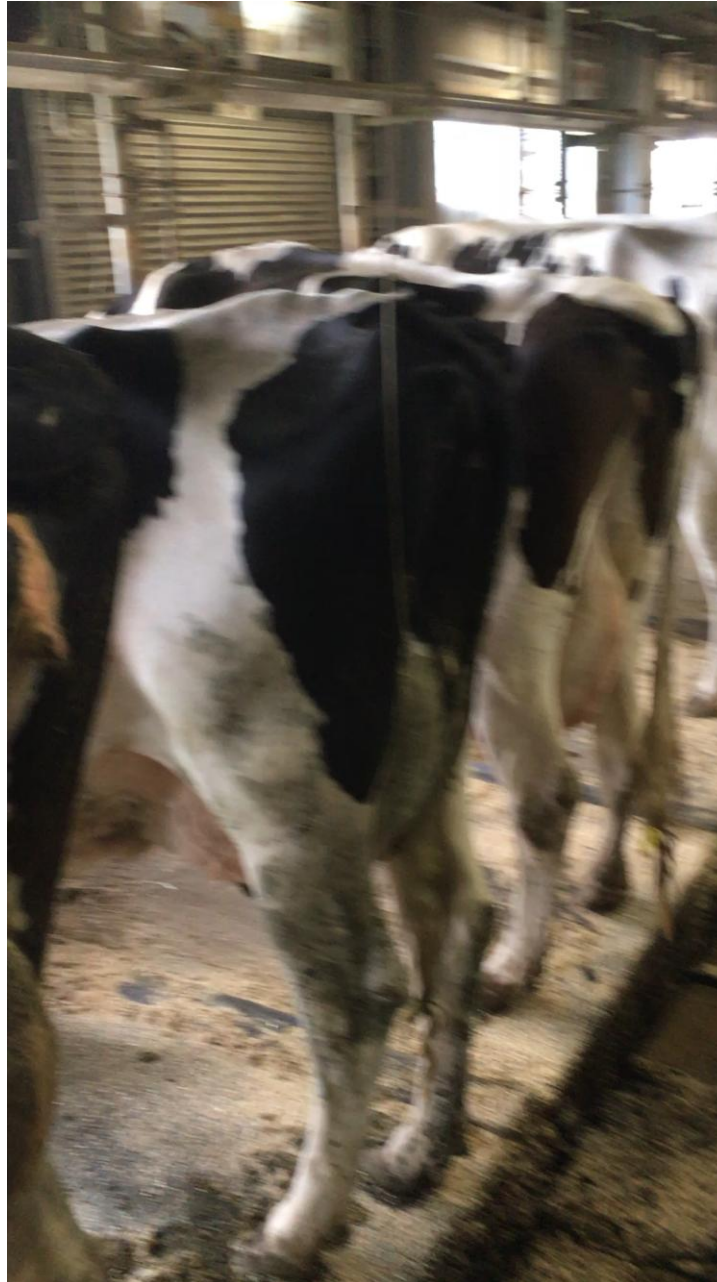
綿棒で10秒のサンプリング!!

学生によるサンプリング

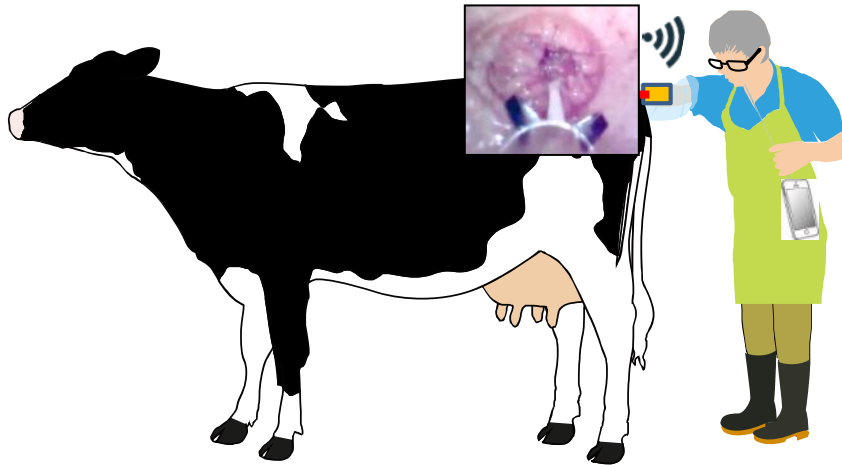


- 牛への低ストレス、全行程5分以内の採材
- カバーの使用により糞による汚染の影響無

マルチデバイスによる頸管粘液サンプリング



本開発デバイスの活用により



腔鏡挿入によるウシへのストレス軽減 ⇒ ◎

固定不安定による腔鏡の落下、作業中の排便による腔内汚染防止 ⇒◎

腔内を直接目視しながらの確実、短時間採材 ⇒ ◎

非獣医師でも作業可能な採血を伴わず外子宮口での粘液採取 ⇒ ◎

低侵襲、簡易迅速採取 ⇒ ◎

子宮内胚産生因子候補の子宮 外直接検出系の構築

子宮内胚産生因子候補の子宮外直接検出系の構築

組換えIFNT2mgの確保とマウスへの免疫
回収リンパ球とマウスミエローマ細胞P3U1との細胞融合

100ハイブリドーマ細胞候補から10クローンを選定
⇒ハイブリドーマ作製
⇒上清中の抗体によるIFNTの検出スクリーニング

5ハイブリドーマ細胞を免疫不全マウスに注入して腹水採取

2ハイブリドーマ細胞由来腹水に高ELISA活性確認

IgG精製

I. イムノクロマト試作

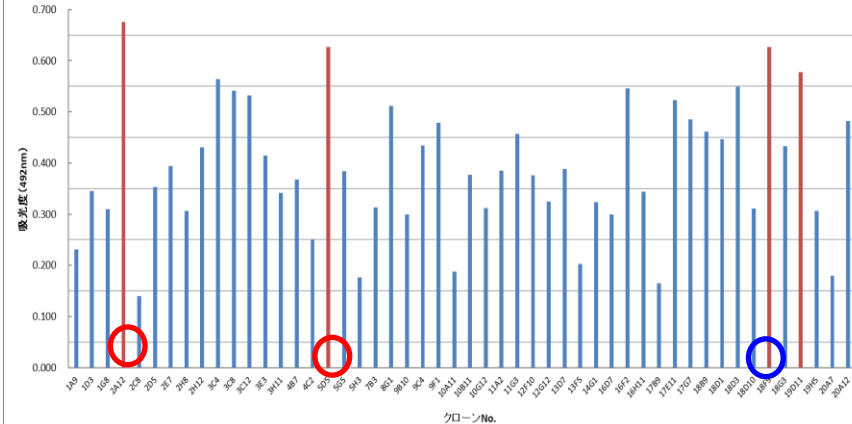
II. ウェスタンブロッティング
による頸管サンプルから
のIFNTタンパク質の検出

① ハーフストリップ(ラボでの評価)

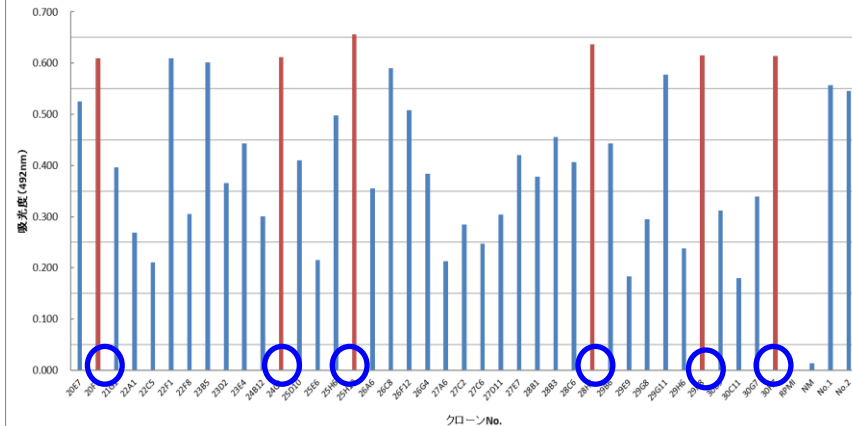
② フルストリップ(現場での評価)



M440 マウスモノクローナル抗体 ELISA 測定結果
1A9～20A12



M440 マウスモノクローナル抗体 ELISA 測定結果
20E7～30H7、コントロール



| | クローンNo. | サブクラス |
|---|---------|---------|
| 1 | 2A12 | IgG2a κ |
| 2 | 5D5 | IgG2a κ |
| 3 | 18F9 | IgG2a κ |
| 4 | 19DII | IgG2b κ |
| 5 | 20FI | IgG2b κ |

| | クローンNo. | サブクラス |
|----|---------|---------|
| 6 | 24GI | IgG2b κ |
| 7 | 25H10 | IgG2b κ |
| 8 | 28H5 | IgG2b κ |
| 9 | 29H8 | IgG2a κ |
| 10 | 30H7 | IgG2a κ |

インターフェロン α モノクローナル抗体二種の樹立と子宮頸管粘液サンプルからのタンパク検出系



1.綿棒を外子宮口1-2cm位置に置き、10秒カウント・回収 ⇒ ~5分/頭

2.綿棒を1.5mlのチューブに入れ保存、解析に使用

3.100-150ulのタンパク処理バッファーで処理-

4.スピンカラムで液を溶出—加熱変性

⇒ ~20分

5.電気泳動 プレキャストゲル、MOPS泳動バッファーを使った
高速泳動システム ⇒ 20分

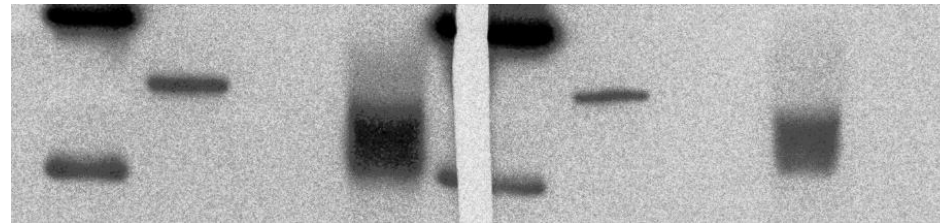
6.転写⇒ 5分

7.抗体処理(特殊ブロッキング液) ⇒ 30分

8. 化学発光検出



~2時間



REC IFNT (2ng)

REC IFNA (2ng)

d18妊娠頸管粘液

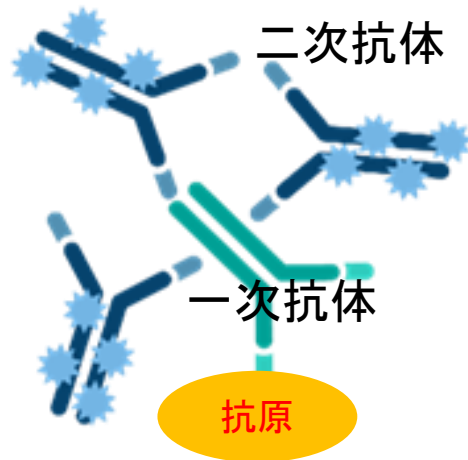
REC IFNT (2ng)

REC IFNA (2ng)

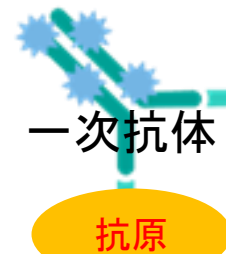
d18妊娠頸管粘液

インターフェロン γ モノクローナル抗体二種の確立と子宮頸管粘液サンプルからの短時間タンパク検出系

HRPを二次抗体に
標識して検出(2ステップ)

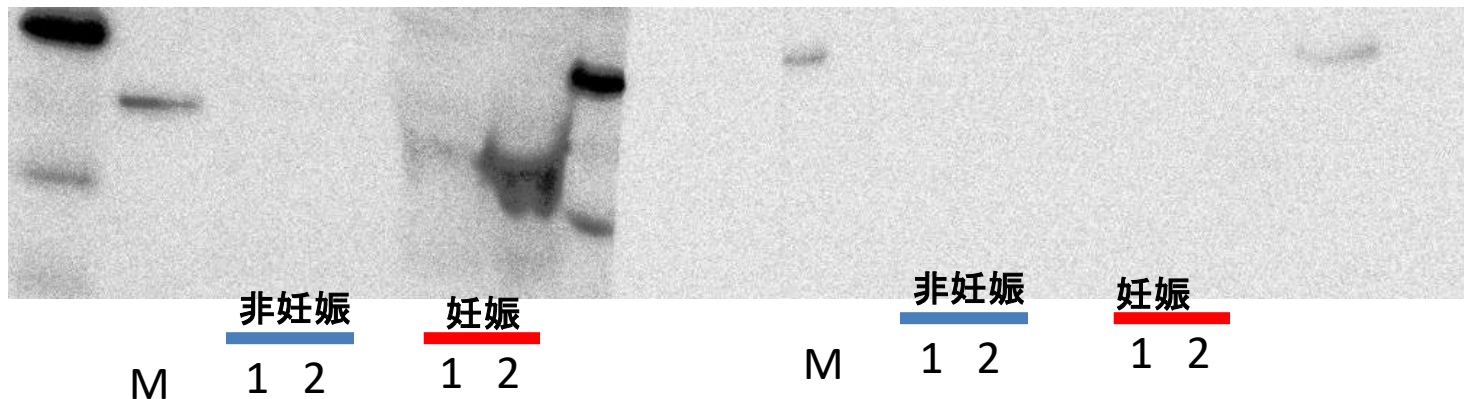


HRPを精製IgGに
直接標識
(1ステップ)



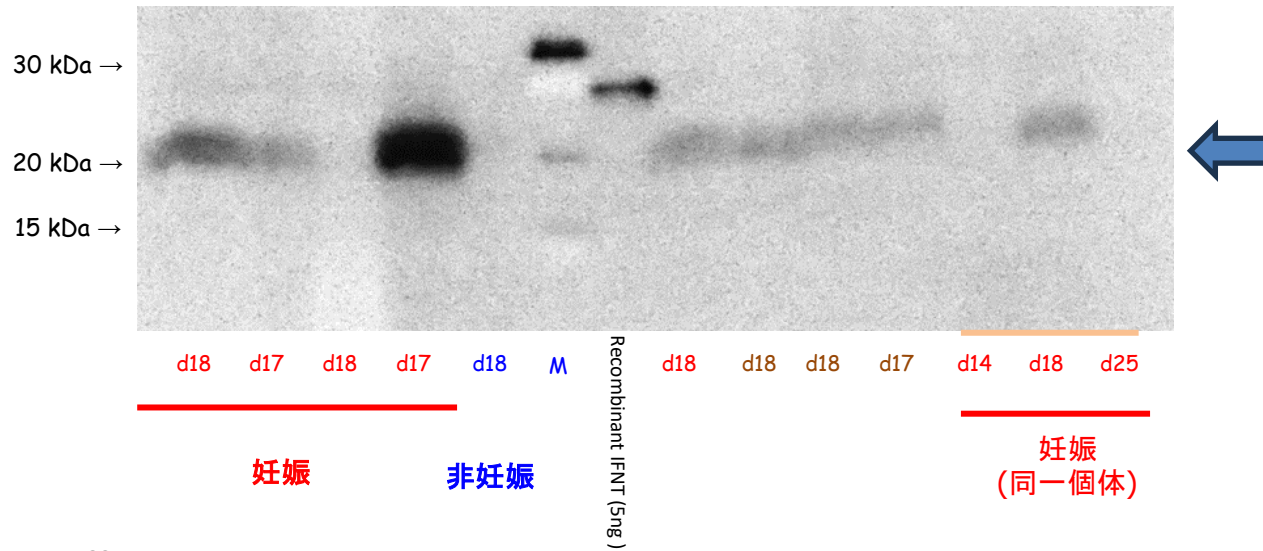
HRP標識IgG 1step
(30分反応)

HRP未標識IgG+HRP標識二次抗体混合
2step(60分反応)

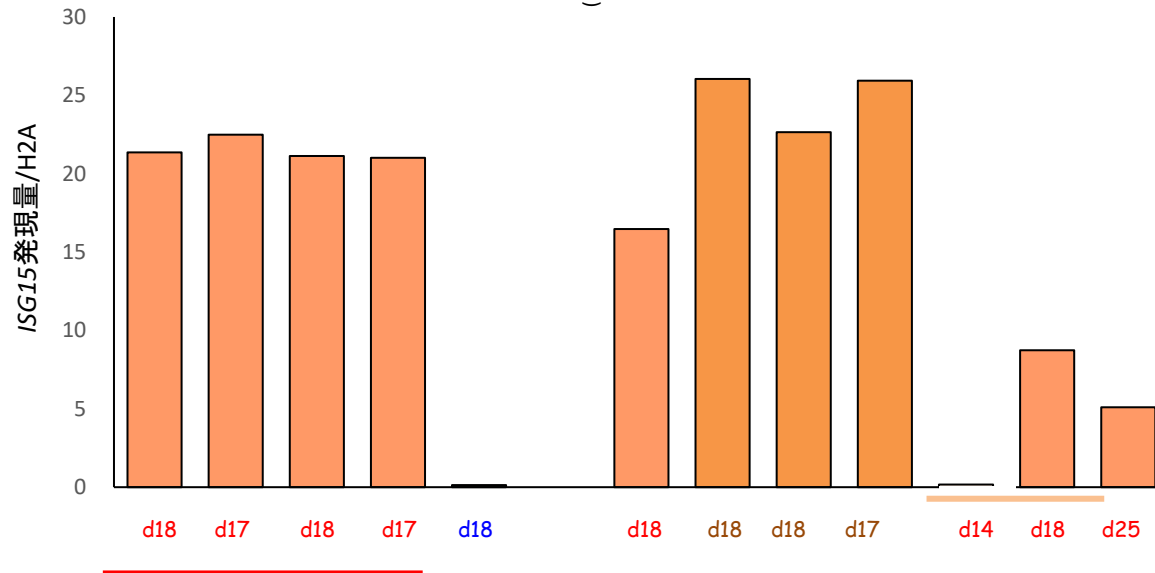


子宮頸管粘液中のインターフェロンタンパク質の検出とISG15遺伝子発現

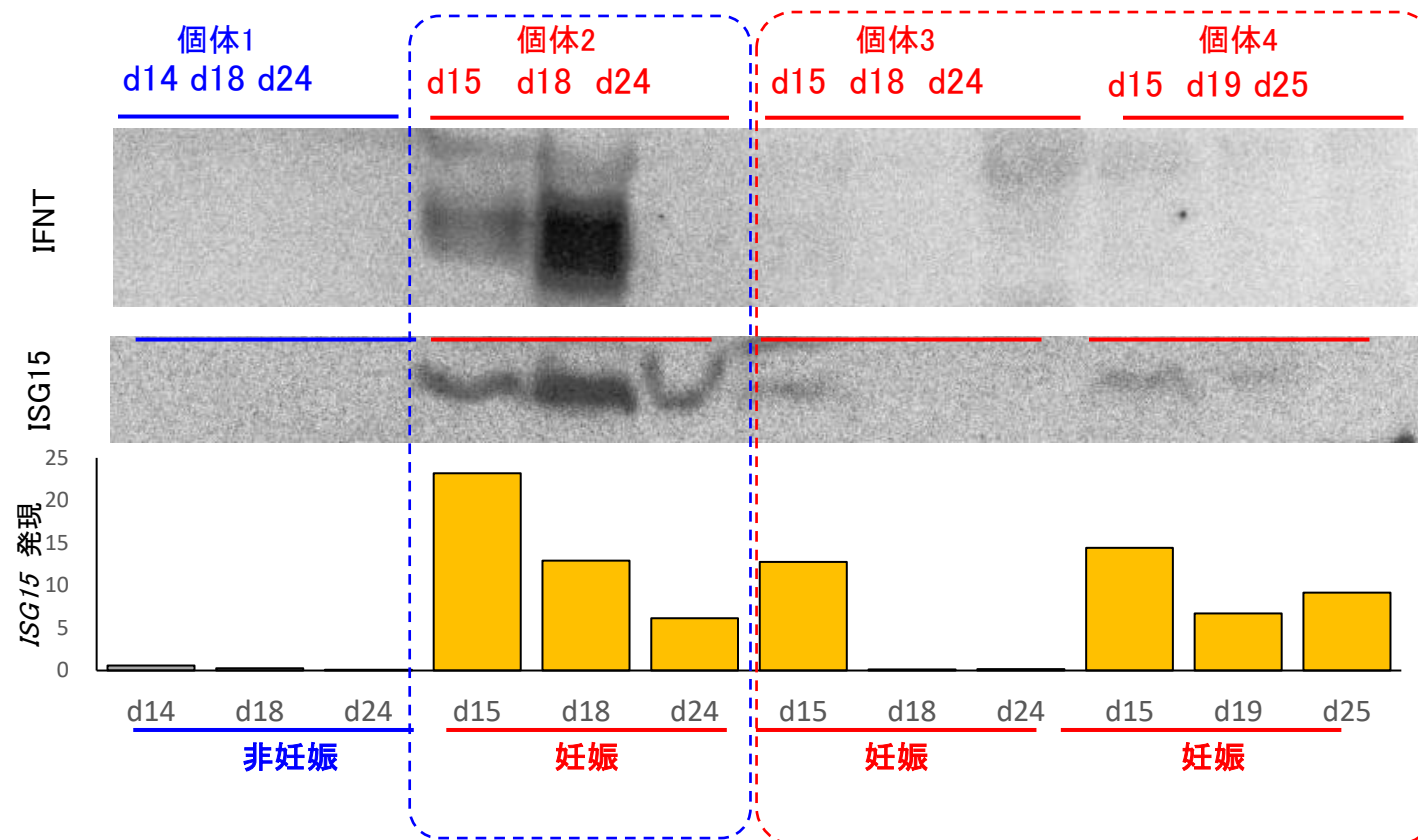
IFNTタンパク質



IFNT応答遺伝子
(ISG15)



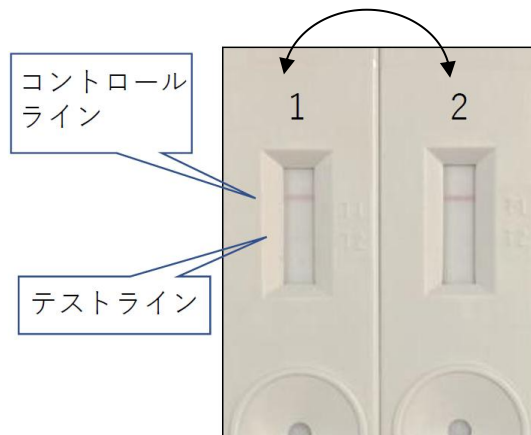
インターフェロン τ モノクローナル抗体の確立と子宮頸管粘液サンプルからの検出



妊娠確定個体によってもIFNTの検出程度に大きな差がある

ISG15遺伝子発現とタンパク質検出とはある程度のマッチするがIFNTタンパクとの関係はばらつく。⇒胚の発生程度に大きなばらつきがある、子宮内の位置も影響？ 頸管まで届くIFNTにも影響している？

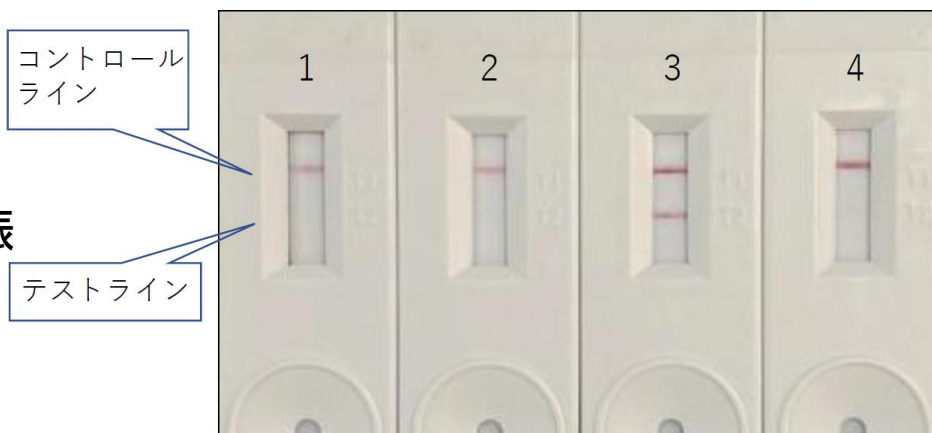
組換えIFNT (抗原に使用)



No. 測定サンプル

- 1. 希釈液のみ
- 2. 標準品 10ng/mL

子宮灌流液 妊娠、非妊娠



No. 測定サンプル

- 1. 陰性サンプル × 2
- 2. 陰性サンプル × 4
- 3. 子宮かん流液 × 2
- 4. 子宮かん流液 × 4

D18 頸管粘液



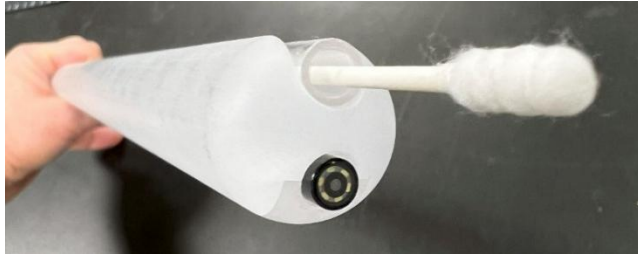
No. 測定サンプル

- 1. P.d18-1 × 2
- 2. P.d18-1 × 4
- 3. P.d18-2 × 2
- 4. P.d18-2 × 4
- 5. NP × 2
- 6. NP × 4



胚産生因子の直接検出と実証

サンプル採取とIFNTのイムノクロマト検出



人工授精

Day 0

Day 14

Day 18

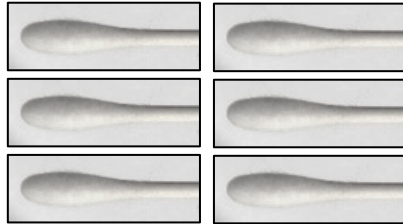
Day 21

Day 24

Day 30, 60

サンプリング

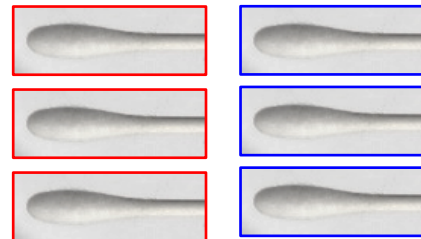
外子宮口に綿棒を10秒間静置



エコーによる妊娠診断

妊娠、非妊娠に区分

Day 14, 18, 24



短時間ウエスタンブロット
検出系の確立

サンプル溶解
熱変性
遠心
電気泳動
転写
検出

3
時間

子宮頸管粘液サンプルからのIFNTタンパク質の検出と妊娠評価

| 指標 | 検査法 | n数 | 精度 | 感度 | 特異度 |
|----------------------|--------|----|----------------|-----------------|----------------|
| IFNT | WB法 | 46 | 89% (41/46) | 75% (9/12) | 94% (32/34) |
| | IC法 | 29 | 45% (13/29) | 60% (3/5) | 42% (10/24) |
| ISG15 | WB法 | 46 | 87% (40/46) | 58% (7/12) | 97% (33/34) |
| 機能性黄体の有無 | 直腸検査 | 46 | 48% (22/46) | 100% (12/12) | 29% (10/34) |
| 血中P4濃度 ^{*1} | ELISA法 | 46 | 41% (19/46) | 100% (12/12) | 21% (7/34) |

* 授精後30日前後における繁殖検診による妊娠診断の結果を基に妊娠牛と非妊娠牛を分類

* 1: 血中P4濃度が1ng/ml以上の牛を妊娠陽性と判断

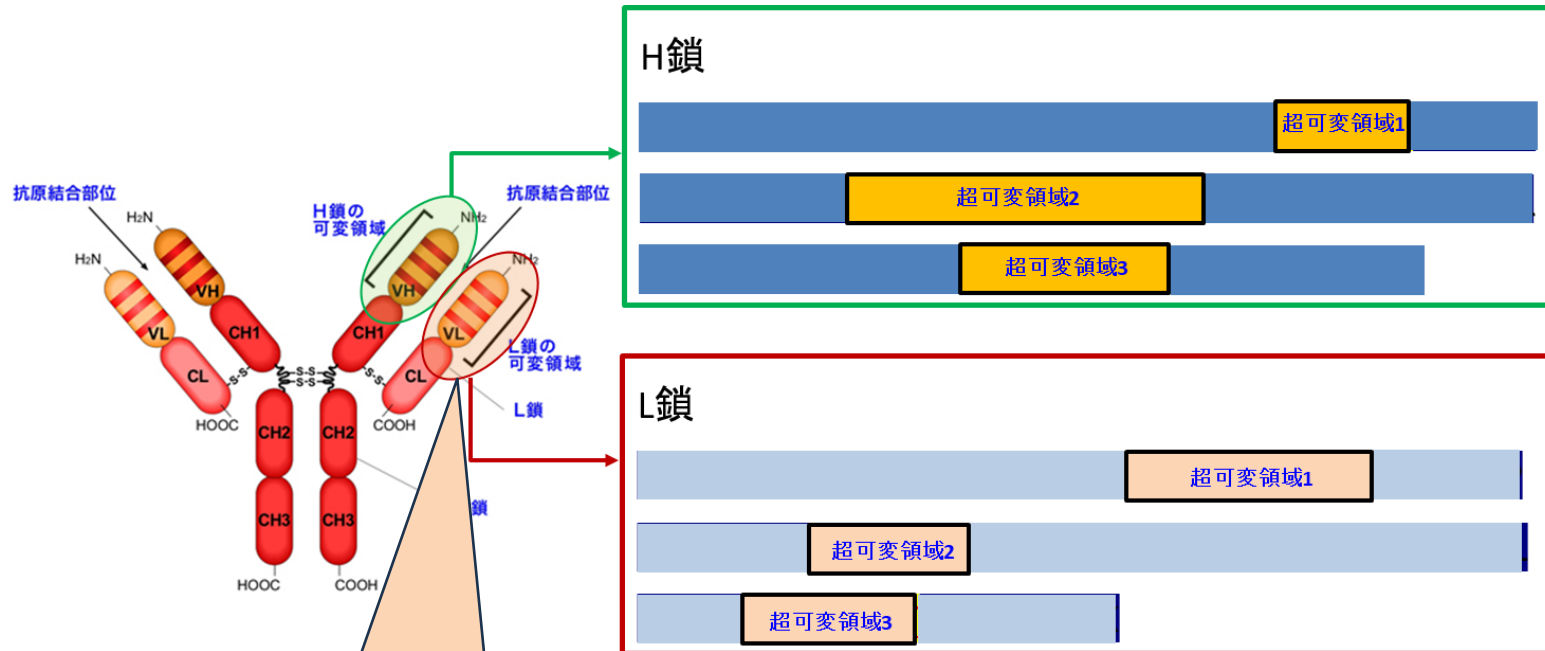
※1)本手法は血液サンプルを使用しないので、採血の必要なし。

2)採材部位が外子宮口であり、通常の人工授精手順でサンプリングが可能

今後の展開

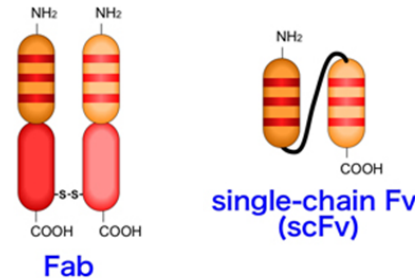
抗IFNTモノクローナル抗体の抗原認識・結合部位の改変、合成による 妊娠判定技術の簡易、高精度化

ハイブリドーマ細胞からのRNAシーケンシングによる超可変領域アミノ酸配列の決定済み



抗原認識特異性を高める分子設計
と組換え抗体体作製

組換えIFNT抗原認識部位による大量生産の可能性



高感度検出系の改良・構築? イムノクロマト、スミアからの検出

- 生殖器内可視操作デバイスの製品化
 - 農場で実証例蓄積、評価、普及
 - AI, ET補助器具としての実用普及
 - AI/ET技術習得用教材
- など