

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430204

研究課題名(和文) フリーズドライ(凍結乾燥)技術を用いた希少動物精子バンクの構築

研究課題名(英文) Sperm banking of wild animals using freeze-drying technique

研究代表者

金子 武人(Kaneko, Takehito)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：30332878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が開発した冷蔵庫(4℃)で長期保存可能なフリーズドライ精子保存法を用いて希少動物の精子バンク構築のための検討を行った。動物園等から複数の動物種の精巢組織を提供いただき、精子を回収した。精子は、トリス-EDTA保存液に懸濁し、フリーズドライした後、冷蔵庫で保存した。本研究に用いた全ての動物種において、フリーズドライ後の精子は正常な形態を示し、さらに卵子導入後の異常受精は認められなかった。本研究結果から、フリーズドライ精子保存法は希少動物精子の保存に利用できる可能性が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Freeze-dried sperm can be stored for long term at 4 degree C. The aim of this study is establishment of sperm banking for wild animals using freeze-drying technique. In this study, sperm that collected from various wild animals were freeze-dried, and their fertility was examined. Sperm were freeze-dried using Tris-EDTA solution. Freeze-dried sperm were stored at 4 degree C. In this study, all sperm were maintained their fertility. These results showed that the sperm freeze-drying could be applied for preserving sperm of wild animals.

研究分野：実験動物学

キーワード：フリーズドライ 凍結乾燥 配偶子保存

1. 研究開始当初の背景

希少動物の保全において人工繁殖技術は有用な手段であるが、動物園では普及していないのが現状である。これまで、人工繁殖技術に必要な配偶子の保存には液体窒素を用いた凍結保存法が一般的に用いられてきた。しかしながら、凍結保存法は液体窒素の補充や専用保存容器の購入・メンテナンス、輸送のための液体窒素専用容器の購入が必要であり、多くの費用と労力を要する。このため、凍結保存による配偶子保存事業を実施できる施設は限られる。

近年、実験動物や家畜においてフリーズドライ技術を用いた精子保存(フリーズドライ精子保存法)に関する研究が行われている。これまでに、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ウシ、ブタ、サルといった多くの動物種で研究が行われており、マウス、ラット、ウサギ、ハムスターにおいては産子の作出に成功している。フリーズドライした精子は、液体窒素や専用保存容器を必要とせず、冷蔵庫(4)や常温での保存が可能であるため、簡易・低コストの精子保存が実現できる。

研究代表者は、マウス・ラットにおけるフリーズドライ精子保存法の開発を先駆的に行っており、長期間安定的に受精能を保持できる方法の開発に成功している。また、常温で国際航空輸送したフリーズドライ精子からの産子の作出にも成功している。(Kaneko and Serikawa, PLoS ONE 7, e35043, 2012., Kaneko and Serikawa, Cryobiology 64, 211-214, 2012.)。このことから、フリーズドライ精子保存法は配偶子長期保存法として実用可能な段階にあるといえる。

このフリーズドライ精子保存法を希少動物に応用した場合、精子を冷蔵庫で簡易に保存することができるため、希少動物を飼育する動物園などでも個別の保存が可能となる。また、これまでの凍結保存法では、個々の施設での設備整備や液体窒素の取り扱いが困難なため、保存配偶子を特定の施設で集中管理する必要があった。しかしながら、フリーズドライ精子による個別管理の実現により、災害や事故等による遺伝資源喪失のリスクやサンプル移動の手続きに必要な労力を大幅に軽減することができる。

2. 研究の目的

上述のように、フリーズドライ精子保存法はマウスおよびラットにおいて先駆的に開発が行われ、多くの動物種で応用研究がなされている。現在では、冷蔵庫で長期間安定的に受精能を保持できるだけでなく、常温による国際航空輸送も可能な方法として開発に成功しており、実用可能な段

階の技術として成熟している。この方法を希少動物の精子保存に応用した場合、フリーズドライ精子を冷蔵庫で簡易に保存することができるため、動物園などにおいても集中管理をせずに個別の配偶子保存が可能となる。また、フリーズドライ精子による個別管理の実現により、災害や事故等による遺伝資源喪失のリスクやサンプル移動の手続きに必要な労力を大幅に軽減することができる。このことは、動物園において極めて大きなメリットとなる。

そこで本研究では、マウス・ラットで開発されたフリーズドライ精子保存技術を用いて希少動物の精子を保存し、種の保存に向けた新規かつ安全な精子バンクを構築することを目的として、以下の課題について遂行した。

研究期間内に、動物園で飼育している動物および生息域で捕獲された個体から採取した精巣組織および射出精子を提供いただき京都大学に輸送した。精巣組織から採取した精子および射出精子をフリーズドライし、冷蔵庫で一定期間保存した。保存後のフリーズドライ精子の形態学的正常性および卵子導入後の受精能評価を行うことで、希少動物精子におけるフリーズドライ後の品質評価を行った。さらに得られた結果から、希少動物におけるフリーズドライ精子保存法の応用の可能性についての評価を行うことにより、希少動物精子バンクの構築および実現の可能性について検討した。

3. 研究の方法

精巣組織あるいは射出精子は、動物園で飼育されている動物の中で採取可能な個体から採取した。また、救護センターおよび研究機関で保管されている個体より摘出した精巣組織を実験に使用した。

採取した精巣組織および射出精子は、宅配便(4)で京都大学に輸送した。到着後は直ちに精巣組織から精巣上体尾部を摘出し、精子を採取した。採取した精子は、トリス-EDTA 保存液に懸濁した。

精子懸濁液の一部を用いて精子の形態学的正常性を顕微鏡下で確認した。その後、精子懸濁液をフリーズドライ用ガラスアンプルに 100 マイクロリットルずつ導入し、Kaneko らの方法に従ってフリーズドライを行った。フリーズドライが完了したガラスアンプルは、ガスバーナーを用いて密閉した。本研究で用いた全てのフリーズドライ精子は、冷蔵庫(4)で1ヶ月程度保存した。

一定期間保存したフリーズドライ精子は、100 マイクロリットルの純水を用いて復水した。復水後の精子の一部は、形態学的な正常性を顕微鏡下で観察した。精子導

入用の卵子は、妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)およびヒト絨毛性腺刺激ホルモン(hCG)を用いて過剰排卵誘起した成熟雌マウスの卵管より採取した。採取した卵子は、ヒアルロンダーゼを用いて卵丘細胞を剥離し、実験に用いるまで培養液に導入しインキュベーターで保存した。復水後の精子は、マイクロマニピュレーターを用いた顕微授精法により、マウス未受精卵子内に導入した。

精子導入後の卵子は培養液に導入し、インキュベーター内で5時間程度培養した。培養後、精子を導入したマウス卵子は顕微鏡下で前核の出現を確認した。精子由来、卵子由来両方の前核の出現が確認できたものをフリーズドライ後の精子の受精能が保持されていると評価した。

4. 研究成果

本研究では、連携している動物園および研究機関よりチンパンジー、キリン、ジャガー、ケナガネズミ等の精巣組織および射出精子を提供いただいた。精巣組織および射出精子は4℃の温度域で京都大学まで安全に輸送された。輸送における組織の劣化等は確認されなかった。

提供いただいた個体のすべての精巣組織から精子を採取することができた。フリーズドライ前の精子の形態学的な正常性は高く維持されており異常精子の存在は認められなかった。

精子は、Kanekoらの方法によりフリーズドライ用ガラスアンプル内でフリーズドライされ、冷蔵庫で一定期間保存した後に試験に用いた。一定期間保存した後に純水で復水したフリーズドライ精子は、試験したすべての動物種において形態学的な正常性が高く維持されていた(図1)。本研究において、フリーズドライ処理を行ったことにより形態学的な損傷を受けた精子は認められなかった。一部の精子においては、頭部と尾部の切断が認められたが、これは操作過程のピペッティングによる物理的なダメージによるものであると考えられた。

フリーズドライ精子は、純水で復水後にマウス未受精卵子と受精させた。受精後、培養液中で一定時間培養した卵子は、正常な前核を形成しており、精子側、卵子側の両方の前核を確認することができた(図2)。導入した精子により前核の形成に違いが認められたが、異常受精卵は認められなかった。

本研究結果において、試験したすべての動物種の精子において、フリーズドライ後も形態学的な正常性が高く維持されていることが明らかとなった。マウス未受精卵子に導入したフリーズドライ精子は、前核を形成したことから、4℃での保存後も高い受精能を保持していると評価すること

ができる。

本研究結果から、マウス・ラットにおける精子長期保存法に用いられているフリーズドライ精子保存法は、希少動物の精子においても同様に高い受精能を保持できることが明らかとなった。このフリーズドライ精子保存法は、希少動物の配偶子保存に応用するこのできる技術であると評価することができ、本研究成果は希少動物精子バンクの構築に向けた取組みにつながる貴重な成果であると判断できる。

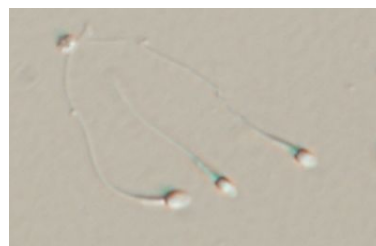


図1：フリーズドライ後、復水したチンパンジー精子



図2：チンパンジーのフリーズドライ精子を導入したマウス卵子

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

【総説】Takehito Kaneko. Sperm freeze-drying and micro-insemination for biobanking and maintenance of genetic diversity in mammals. *Reproduction Fertility and Development*, 査読有, 28(8), 2016, 1079-1087. DOI:10.1071/RD15386.

【総説】Takehito Kaneko. Simple gamete preservation and artificial reproduction of mammals using micro-insemination techniques. *Reproductive Medicine and Biology*, 査読有, 14, 2015, 99-105.

Takehito Kaneko, Hideyuki Ito,

Hidefusa Sakamoto, Manabu Onuma, Miho Inoue-Murayama. Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. PLoS One, 査読有, 9(11), 2014, e113381. DOI:10.1371/journal.pone.0113381.

〔学会発表〕(計16件)

【招待講演】金子武人 フリーズドライによる哺乳動物精子長期保存法の開発とその応用 Cryopreservation Conference 2016 2016年11月10日~11日 愛知

【招待講演】Takehito Kaneko Dry-state preservation of mammalian sperm. Cryobiology course: Cryopreservation of gametes, embryos and stem cells. September 20-22, 2016, Ghent, Belgium.

金子武人 ラットにおける生殖工学技術 第64回千里ライフサイエンス技術講習会 2016年9月1日~2日 大阪

【招待講演】Takehito Kaneko. Latest reproductive technologies in mammals. From Zygote to Blastocyst: Immunosurgery, Stem Cell Derivation and Transgenics. August 18-19, 2016, Cambridge, UK

【招待講演】Takehito Kaneko. Dry-state preservation of mammalian sperm. 42nd Annual Conference of the IETS, CANDES Preconference Symposium, Biomaterials Repositories: The Science and Business of Biobanking. January 23, 2016, Kentucky, USA

鏡味裕、胡桃澤希未、西本優里、仲谷隆馬、金子武人 ニワトリフリーズドライ精子の活用法の検討 日本畜産学会第120回大会 2015年9月11日~12日 北海道

【日本獣医学会獣医繁殖学分会賞受賞演題】辻本恭典、鳩谷晋吾、金子武人、杉浦喜久弥、稲葉俊夫 ネコの未成熟精子およびフリーズドライ精子による顕微授精 第158回日本獣医学会学術集会 2015年9月7日~9日 青森

金子武人、田中優、米澤彩、浅川卓也、鈴木勲 ウシ科動物から採取した精子のフリーズドライおよび凍結保存法の開発 第21回日本野生動物医学学会大会 2015年7月31日~8月2日 北海

道

【招待講演】Takehito Kaneko. The rat gamete preservation. The Fourth Sino-Japan Short Summer Course. July 27-29, 2015, Nanjing, China

【ワークショップ】金子武人 ラットにおける生殖技術の開発と応用 第62回日本実験動物学会総会 2015年5月28日~30日 京都

【招待講演】金子武人 ラットにおける生殖工学技術の展開 第8回ラットリソースリサーチ研究会 2015年1月23日 京都

Takehito Kaneko. Sperm preservation by freeze-drying in endangered animals. 41th Annual conference of the international embryo transfer society. Jan 10-13, 2015, Versailles, France

Takehito Kaneko, Hideyuki Ito, Hidefusa Sakamoto, Manabu Onuma, Miho Murayama. Sperm banking using freeze-drying in endangered animals. Unraveling biodiversity from DNA -From the management of databases to the use of next generation sequencers-. September 19, 2014, Ibaraki, Japan

金子武人、伊藤英之、坂本英房、大沼学、村山美穂 希少動物におけるフリーズドライ精子保存法の確立及び配偶子バンクの設立 第20回日本野生動物医学学会大会 2014年9月16日~19日 つくば

【招待講演】Takehito Kaneko. Preservation of mammalian sperm by freeze-drying. 2014 World Forum on Biology; Joint meeting of the society for in vitro biology and the society for cryobiology. May 31-June 4, 2014, GA, USA

【日本実験動物学会奨励賞受賞講演】金子武人 フリーズドライによるマウス・ラット精子長期保存法の開発と実用化に関する研究 日本実験動物科学技術さっぽろ 2014 2014年5月15日~17日 札幌

〔図書〕(計1件)

Takehito Kaneko. Humana Press, Simple sperm preservation by

freeze-drying for conserving animal strains. Methods in Molecular Biology 1239, Chromosomal Mutagenesis, 2015, 317-329

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

ラット・マウスの生殖学/生殖工学研究のページ

http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/reproduction/home_jp.aspx

受賞

日本実験動物学会奨励賞
日本獣医学会獣医繁殖学分科会長賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子武人 (KANEKO, Takehito)
京都大学大学院医学研究科・特定講師
研究者番号：30332878

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()