

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450453

研究課題名(和文) 遺伝的価値のある犬の凍結生殖細胞バンク設立を目的とした犬胚の凍結保存法の確立

研究課題名(英文) Study on the establishment of cryopreservation method of canine embryo for the freeze gamete bank establishment of the hereditary valuable dog

研究代表者

堀 達也 (Hori, Tatsuya)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80277665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：犬凍結胚作成技術はまだ確立されていない。そのため、今回は犬の凍結胚作成技術の確立を主な目的として研究を行った。犬の凍結胚作成方法として、ガラス化法であるCryotop法を用いて行った結果、ガラス化-加温胚を5頭のレシピエント犬に外科的子宮内移植した結果、2頭で妊娠がみられた(受胎率40%)。産子数はどちらも雄1頭で、外観的な異常はみられず、問題なく成長した。以前の研究において、犬胚をグリセリンまたはDMSOを凍結保護物質として緩慢凍結法で作成した犬胚の移植の結果では、全てのもので妊娠が得られなかったため、犬胚の凍結保存としてはCryotop法が最適な方法であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The cryopreservation techniques for canine embryos have not been yet established. Therefore, we studied the establishment of the cryopreservation techniques for canine embryos. Canine embryos vitrified-warmed using the Cryotop method, which was the vitrification method, were surgically transferred into the unilateral uterine horn of recipient bitches. As a result, two of the five bitches that received transferred embryos (morula to early blastocyst stages) vitrified-warmed became pregnant and produced normal pups (conception rates: 40%). All pups were male, no external abnormality was noted, and they developed normally. When canine embryos frozen-thawed using the slow-freezing method with Glycerol or dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant that were transferred as we previously studied, no conception occurred in any of the recipient bitches. It was concluded that the Cryotop method was more appropriate for canine embryo cryopreservation than the slow-freezing method.

研究分野：臨床繁殖学

キーワード：犬 胚 凍結保存 子宮内胚移植 Cryotop法

1. 研究開始当初の背景

世界各国において、盲導犬、介助犬や聴導犬などのアシスタントドッグ(補助犬)の必要数が不足していることは周知の事実である。不足している理由の1つとして、これらの犬を育成するためには、その訓練および飼育方法だけではなく、優秀な系統の遺伝的要因が最も重要な因子であり、国内だけでは繁殖に限界があることが挙げられる。従って、優秀な系統を持つ犬との繁殖を継続的に行うためには、世界的なレベルで優秀な系統を持った犬を登録し管理し、その系統を維持するべく効率よく繁殖を行う必要がある。これらの目的を達するためには、補助犬の繁殖において、現在行われている自然交配だけでなく、精子・卵子(胚)の保存・輸送技術、人工授精、胚移植および体外受精のような人工繁殖補助技術の導入が不可欠であると考えられる。またこれらの繁殖補助技術は、人の疾患モデル(例えば、血友病や筋ジストロフィーなど)となる遺伝的疾患を持つ犬などの遺伝的価値が高い犬の系統を維持・管理していくためにも重要であると考えられる。人工繁殖補助技術の中で、とくに生殖子の凍結保存技術は重要であり、この技術の確立によって、遺伝的に優秀な血統を持った犬の精子や卵子を半永久的に管理することが可能となるだけでなく、世界レベルで精子または受精卵の輸送が可能となり繁殖が行えること、遺伝的価値のある犬が不慮の事故に遭遇し死亡した後も生殖子を回収・保存することによって、死後数十年あとも産子を得ることが可能となる。

近年、犬凍結精液の研究が、飛躍的に発展している。しかしこれに比較して、犬の凍結卵子(胚)の作成技術に関する研究は、他の哺乳動物に比較して非常に遅れているのが現状である。この理由として、犬卵子は他の哺乳動物の卵子に比較して耐凍性が低いため、一般に行われている作成方法(緩慢凍結法)では凍結保存できないことが挙げられる。犬胚には、他の動物に比べて細胞膜を構成するリン脂質とエネルギー源となる中性脂肪が多く蓄積されている。これらの脂肪は、胚を体外での操作や低温感作を加えることにより変性し、胚発生に支障を来す。特に脂肪を構成するトリグリセライドと脂肪酸の割合が高くなることで、胚の耐凍性は著しく低下してしまうため、凍結胚の作成が難しいと考えられている。そのため、凍結胚の胚移植により生まれた子犬の報告はほとんどなく、犬における凍結胚作成技術はまだ確立されていない。しかし、同様に卵黄中の脂質含量の多い動物である豚や猫でも、凍結保存した胚由来の産子を得ることに成功しているため、犬胚でも

最適条件が決定されれば凍結保存は可能であると考えられる。

我々は、将来的には当大学の付属動物医療センター内に凍結生殖子バンクの設立を構想している。これを設立することで、世界レベルで遺伝的価値のある優秀な犬の生殖子が管理できると考える。しかし、遺伝的価値のある犬の生殖子を保存するためには、精子だけでなく卵子(胚)の凍結保存が必要であり、その技術の確立は必須であると考えられる。

2. 研究の目的

今回の研究は、犬の凍結胚作成技術の確立およびその胚移植技術の開発、また効率よく優秀な胚を回収する技術の開発を目的として行った。犬の凍結胚作成方法として、これまで我々が行ってきた研究を基本として、ガラス化法である最少容量冷却法を応用した方法および凍結の支障となっている細胞質内に含まれる脂肪顆粒を除去する方法を併用することによって、胚の凍結後の生存性を飛躍的に高める凍結技術を確立することを目的とした。また、凍結保存技術と同様に胚の移植技術の確立も必要である。これまで行ってきた外科的な胚移植に代わる方法として、臨床的に応用するために内視鏡などを用いた経腔による非外科的な胚移植の技術についても検討した。さらに、効率よく優秀な胚を回収する技術開発として、困難であると考えられている犬の過排卵処置法の開発、発情周期の短縮方法、または生殖器を摘出することなく生体内から効率よく胚を回収する方法の開発なども必要であると考えられるため、これら技術を確立するための研究を行った。

3. 研究の方法

(1) Cryotop®法を用いた犬胚の凍結保存方法の検討

近年、哺乳動物種の胚の凍結保存方法として従来から行われている緩慢凍結法ではなく、ガラス化法という技術が開発されている。そのガラス化法の中でも、「最少容積冷却法」(Minimum volume cooling: MVC)がとくに注目されている。これは、毒性の影響が問題となっている高濃度の凍結保護物質を添加したガラス化保存液を少量(1µl以下)にして胚を液体窒素に投入する冷却法であり、緩慢凍結法に比べて液体の氷晶形成が起りにくいいため、融解後に高い生存性が得られることが報告されている。また、緩慢凍結法のように特別な大型な装置を必要とせず、簡便に胚の凍結を行うことができる方法として知られて

いる。MVC法としては、Cryoroop[®]やCryotop[®] (KITASATO)などの器具を使用した凍結方法があり、他の哺乳動物種では有効な成績が得られている。とくにCryotop[®]法は、牛胚だけでなく、凍結保存がやや困難であると考えられていた哺乳動物の未成熟な卵母細胞の凍結保存や豚胚においても良好な成績が報告されており、期待できる方法であると考えられる。

そこで今回の研究では、このCryotop[®]法を用いて、体内で生産された犬胚の凍結保存を行い、凍結融解胚を外科的に子宮内移植し、産子が得られるかどうかについて検討した。この時、凍結保存する胚として、以前に著者らが行った犬新鮮胚の子宮内移植後に妊娠が得られた8細胞胚～胚盤胞までの発育段階の胚を使用した。

(2)遠心分離によって卵細胞質内の脂肪除去した犬胚の凍結保存方法の検討

凍結胚を作成する場合、卵黄に含まれる脂質含量が多いと、凍結保存による成功率が低くなることが知られている。しかし、脂肪含量が多い胚から、細胞質内脂肪顆粒を除去することにより胚の耐凍性が高まるという報告がある。以前に牛島らが、犬と同様に卵黄中の脂質含量の多い動物であると考えられている豚胚から遠心分離によって脂質を除去する技術を開発した。

そこで、この脂肪除去を犬のMVC法の前処理に取り入れることを試みるための検討を行った。すなわち、遠心分離によって胚細胞質から脂肪顆粒を細胞外へと局在化させ、細胞群と完全に分離した脂肪顆粒をマイクロマニピュレーターで吸引除去することにより、ガラス化保存胚の生存性を犬胚でも相乗的に高めることが可能であるかについて検討した。

(3)犬における発情周期の短縮方法の検討

犬は単発情動物であるために、発情周期が5～12カ月と非常に長い。そのため交配を行ったが不妊であった場合、次の発情まで約半年も待たなければならないことがある。今回のような胚を回収するための実験においても、1年に1回または2回しか胚を回収することができないこととなる。これに対応するために、様々な犬における発情誘起方法が検討されているが、臨床的に用いることができる方法は開発されていない。

黄体退行作用のあるプロスタグランジンF₂ (PGA)を黄体期に投与すると、急激な黄体期の終了により次回発情回帰が早くなることが知られているが、回帰時期には幅が生じるため予測が難しい。また抗プロラクチン剤であるカベルゴリン(CAB)を無発情期に投与すると、無発情期が短縮することが知られており、発情開始日はおおよそ一定にできるが

短縮日数が短いことが知られている。

そこで今回の研究では、PGAであるクロプロステノールとCABを組み合わせて投与することにより、次回発情を早期に回帰させ、かつ発情時期を一定にすることができるかどうかについて検討した。

(4)犬における過排卵誘起処置方法の検討

遺伝的に価値がある犬あるいは希少な犬などが自然繁殖に成功しない場合、これらの犬から受精卵(胚)を回収して、レシピエントとなる雌犬の子宮内に胚移植を行うことで産子を得ることができる。この時、卵管または子宮から胚を確実に回収する場合、犬の解剖学的な特徴から外科的な卵管・子宮の摘出が必要となる。しかし、犬の排卵数は少なく限界がある。しかも犬の過排卵処置に関する報告はほとんどなく、その技術は確立されていない。

そこで今回の研究では、犬の排卵数が決定される前である発情出血開始後2日目にPMSGまたはGnRHを投与して、小卵胞を刺激することで犬の過排卵処置が可能であるかどうかについて検討した。

(5)ファイバースコープを用いた非外科的な胚移植方法の検討

今までの胚移植の方法は、外科的に子宮内に胚を移植する方法が行われている。しかしこの方法では、動物に掛ける負担が多くなると思われる。そこで、ファイバースコープ(内視鏡)を用いて、非外科的な経腔による子宮内胚移植法の技術を確認するための検討を行った。また、この技術を用いて、実際に凍結胚を移植し、受胎の有無を確認することを計画した。

4. 研究成果

(1)Cryotop[®]法を用いた犬胚の凍結保存方法の検討

年齢2.1～6.0歳の7頭のドナー犬の卵管または子宮から、全部で46個の胚が回収された。そのうち、8個(17.4%)は変性胚であった。胚の発育段階は、8細胞期～初期胚盤胞までで、全てをCryotop[®]法にて凍結胚を作成した。

Cryotop[®]法で作製したガラス化-加温胚を2.6～5.2歳の5頭のレシピエント犬に移植した結果、2頭で妊娠がみられた(受胎率40%)。ドナー犬との排卵日の日差は±1日であった。その2頭のうちの、1頭は排卵後65日目に分娩徴候および陣痛が開始されたが胎子は娩出されず、エコー検査にて胎子心拍数が約100回/分に低下していたため、直ちに帝王

切開を実施した。もう1頭は、排卵後64日に自然分娩した。産子数はどちらも雄1頭で、外観的な異常はみられず、問題なく成長した。

妊娠した2頭のうち1頭は、2頭のドナー犬から回収した胚を移植したものであったため、母犬と父犬と生まれた子犬のDNA鑑定を行った。DNA鑑定を行う犬(移植胚の父/母犬および子犬)の口腔粘膜を滅菌スワブで採取し、DNA検査機関であるGenetic Technologies (GTG、オーストラリア)に依頼し、DNAマーカーのDNA配列を照らし合わせ、親子鑑定を行った。DNAマーカーとしては、PEZ01、FHC2054、FHC2010、PEZ05、PEZ20、PEZ12、PEZ03、PEZ06、PEZ08、FHC2079、PEZ16の11種類を用いて行った。その結果、ドナー犬の1頭が子犬の両親であることが証明された。

以前の研究から、犬胚をグリセリンまたはジメチルスルホキシドを凍結保護物質として緩慢凍結法で作成した犬胚を、今回と同様の外科的子宮内授精法で移植を行ったものでは、全てのレシピエント犬で妊娠が得られなかった。この結果からも、犬胚の凍結保存としてはCryotop®法が最適な方法であり、他の哺乳動物の凍結胚の作製に用いられている緩慢凍結法では凍結保存できないことが結論づけられた。また今回の研究から、凍結胚の発育段階としては、桑実胚～初期胚盤胞までの段階が適していることが明らかとなった。

(2)遠心分離によって卵細胞質内の脂肪除去した犬胚の凍結保存方法の検討

自然交配を行い、複数の受精卵(胚)を回収し、遠心分離を行って、胚細胞質から脂肪顆粒を細胞外へと局在化させ、細胞群と完全に分離した脂肪顆粒をマイクロマニピュレーターで吸引除去することを試みた。しかし、犬胚は以前に行った豚胚よりも脂肪顆粒の量が多く、顆粒を除去してしまうと、胚の正常な形態が維持できなかった。そのため、これを凍結保存して、融解後に移植を行っても、着床できないことが想定された。これらの胚については、Cryotop®法で凍結保存を行ったが、妊娠する可能性が低いと考えられたことから、胚移植は行わなかった。

この結果から、犬胚ではマイクロマニピュレーターでの脂肪顆粒の吸引を応用することはやや困難であることが明らかとなったため、その他の方法で凍結保存後の生存率を高める方法の検討が必要であると考えられた。

(3)犬における発情周期の短縮方法の検討

供試動物として、年齢1~6歳の雌犬19頭を使用した。PGA(クロプロステノール、あすか製薬)は5 μ g/kgを皮下投与し、CAB(カ

バサル、キッセイ薬品工業)は5 μ g/kgを1日1回経口投与した。実験は、排卵後30日にPGAを投与し、その2週間後からCABを3週間投与する群(PGA-CAB3W群, n=5) 排卵後30日にPGAを投与し、その3週間後からCABを2週間投与する群(PGA-CAB2W群, n=4) 排卵後86日からCABを3週間投与する群(Control-CAB群, n=5) 排卵後24日にPGAだけを投与する群(Control-PGA群, n=5)の4群で行った。

その結果、PGA-CAB3W群、PGA-CAB2W群およびControl-PGA群では、それぞれの処置前の平均発情周期の長さには有意に短縮した(p<0.01)。それぞれの実験群における発情周期の短縮日数を比較すると、PGA-CAB3W群はControl-CAB群(p<0.01)およびControl-PGA群(p<0.05)よりも有意に短縮が認められたが、PGA-CAB2W群と他の群の間には有意差はみられなかった。しかし、PGA-CAB3W群、PGA-CAB2W群およびControl-CAB群においてCAB投与開始から発情出血開始までの日数には幅がみられ、発情発現を一定にすることはできなかった。また発情前期、発情期および発情出血開始から排卵までの日数について、すべての実験群で処置前と処置後との間で有意差は認められなかった。PGA投与による副作用は投与後~1時間後をピークとして体温低下、流涎、嘔吐、下痢、呼吸速迫などがみられたが、4時間後には消失した。CAB投与による副作用は全く観察されなかった。

以上の結果より、排卵後30日にPGAを投与し、その2週間後からCABを3週間投与することで、PGAまたはCAB単独投与よりも、発情の回帰を早期に起こすことができることが明らかとなった。しかし、誘起した発情の回帰時期を一定にすることはできなかった。

(4)犬における過排卵誘起処置方法の検討

供試犬として、年齢1~6歳の雌ビーグル10頭を使用した。発情出血開始後2日目に、PMSG(セロトロピン、あすか製薬)500IU/頭(n=8)またはGnRH(エストマール注、インターベツト)1 μ g/kg(n=6)の投与をそれぞれ行った。なお、このうち3頭は、別々の発情周期において両ホルモンをそれぞれ投与し、同一個体におけるホルモンの反応性を比較した。PMSG投与群のうち3頭は、排卵後9~10日目に卵巣子宮摘出術を行い、摘出卵巣から左右の黄体数を数えて過排卵の状況を確認した。それ以外の実験犬では、排卵後60日に全身麻酔下で開腹手術を行い、卵巣の黄体数から過排卵の状況を推定した。

その結果、PMSG投与後の排卵数は左右の合計が5~23個、平均11.4 \pm 2.0個であった。GnRH投与後の左右の合計排卵数は7~13個、

平均 9.7 ± 0.8 個であった。これら両ホルモン剤の排卵数の間で有意差はみられなかった。これらの実験犬のうち、以前の排卵数がわかっているものについて各種ホルモン剤の投与前後の黄体数を比較したところ、PMSG 投与群 ($n=5$) では左右の排卵数の合計が 5~23 個、平均 12.2 ± 3.0 個に対して、処置前の左右の合計排卵数は 4~8 個、平均 6.2 ± 0.7 個で、処置後の平均排卵数が有意に増加していることが明らかとなった ($p < 0.05$)。GnRH 投与群 ($n=3$) では、処置後の排卵数は 10~13 個、平均 11.0 ± 0.9 個に対して、処置前の左右の合計排卵数は 5~8 個、平均 6.7 個で、処置後の排卵数の平均は増加していると思われるが両者の間で有意差はみられなかった。また、両ホルモン剤を投与した発情周期における発情出血開始から排卵までの日数を実験前の発情周期における同日数と比較したところ、両者の間に有意差はみられず、ホルモン剤投与による排卵への影響はないことが明らかとなった。

以上のことから、発情出血開始後 2 日目の PMSG または GnRH の 1 回投与によって排卵数が増加することが明らかとなった。そして、GnRH よりも PMSG がより過排卵処置として優れていると思われた。今後、排卵数を増加させるための複数回投与とその排卵への影響、また過排卵処置を行った場合の卵子の受精能などについて、更なる検討が必要であると考えられた。

(5) ファイバースコープを用いた非外科的な胚移植方法の検討

オリンパス製の小動物用内視鏡 (直径 5mm) を用いて、雌犬の膈内および外子宮口の観察を行った。その結果、解剖学的な構造から、黄体期初期 (排卵後 9~10 日) の外子宮口を観察することが難しかった。従って、この技術を用いて凍結融解した胚を移植することはやや困難であると考えられた。ただし、今回使用した供試犬はビーグルだけであったが、もっと大きな犬 (大型犬) では、この技術を使用することは可能ではないかと考えられた。

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 1 件)

Tatsuya Hori, Hitoshi Ushijima, Taku Kimura, Masanori Kobayashi, Eiichi Kawakami and Toshihiko Tsutsui, Intrauterine embryo transfer with canine embryos cryopreserved by the slow freezing and the Cryotop method., J. Vet. Med. Sci., 査読有, Vol.78,

No.7, 2016, in press.
doi: 10.1292/jvms.16-0037

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 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 0 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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 達也 (HORI, Tatsuya)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科・准教授
研究者番号: 80277665

(2) 研究分担者

牛島 仁 (USHIJIMA, Hitoshi)
日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・動物科学科・教授
研究者番号: 10549262

小林正典 (Masanori, KOBAYASHI)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科・講師
研究者番号: 80600428

(3) 連携研究者

()

研究者番号: