

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08115

研究課題名(和文) 遺伝的価値の高い犬の生殖子の有効利用を目的とした体外授精および顕微授精技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of in vitro fertilization and intra-cytoplasmic sperm injection techniques for effective use of gametes of dogs with high genetic value

研究代表者

堀 達也 (Hori, Tatsuya)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：80277665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：犬では顕微授精(ICSI)技術の確立は行われていない。そこで、犬におけるICSI技術の確立を目的とした研究の1つとして、異なる保存処理を行った犬精子(新鮮精子、凍結精子および長期低温保存精子)を使用し、その後の雄性前核および雌性前核の形成率を観察することで、保存精子の違いが正常受胎率(または胚発生率)に影響を及ぼすかどうかについての検討を行った。ただし、現在までに犬卵母細胞の体外培養技術が確立されていないことから、今回は犬の卵母細胞の形態によく似ている豚卵母細胞を使用して実験を行った。その結果、ICSIにおいて注入する犬精子は保存の違いによって、その後の胚発生に差が生じないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で得られた成果は、犬の繁殖に導入すべき体外受精や顕微授精などの繁殖補助技術の確立に役立つものと考えられる。これらの技術は、凍結生殖子(精子や卵子)バンクの設立とともに、遺伝的に優秀な価値のある犬精子や胚(卵子)を有効利用することが可能となり、これを管理することで補助犬の繁殖において世界レベルで様々な社会的貢献が得られることと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) technology has not yet been established in dogs. Therefore, as one of the studies aimed at establishing the ICSI technology in dogs, we used dog sperm that had been subjected to different preservation treatments (fresh sperm, frozen sperm and long-term cooled sperm), and then used male and female pronucleus. By observing the formation rate of nuclei, it was examined whether the difference in stored sperm affects the normal conception rate (or embryonic development rate). However, since the in vitro culture technology of dog oocytes has not been established so far, this time we conducted experiments using pig oocytes that closely resemble the morphology of dog oocytes. As a result, it was suggested that the dog spermatozoa injected in ICSI did not show any difference in the embryonic development after that due to the difference of preservation.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：犬 体外受精(IVF) 顕微授精 細胞質内精子注入(ICSI) 豚卵母細胞 雄性前核発生率 凍結精液 体外成熟培養

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

世界各国において、盲導犬、介助犬および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。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として考えられ、国内だけの繁殖では限界があることが、必要数が不足している理由の1つとして挙げられる。そこで、優秀な系統を持つ犬との繁殖を効率よく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・管理し、自然交配による繁殖だけでなく、精子・卵子(胚)の保存・輸送技術、人工授精、胚移植、体外受精のような繁殖補助技術を繁殖に導入することが不可欠であると考えられる。これら繁殖補助技術の確立は、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のような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と考えられる。

繁殖補助技術の中でも、生殖子(精子および卵子)を有効利用する技術は特に重要である。その理由として、補助犬では訓練前に精巣または卵巣摘出術が行われており、これらの生殖腺に含まれている生殖子は捨てられてしまっているのが現状である。したがって、訓練が終わって補助犬として十分に活躍した犬の系統を後につなぐことができないのである。しかし、これら生殖腺から生殖子を回収し、最終的に凍結保存することが可能となれば、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。また、これら技術の確立によって、遺伝的価値のある犬の精子または受精卵の輸送が可能となり、世界的なレベルで繁殖を行うことができるようになることや、これらの犬が不慮の事故に遭遇し死亡した後でも生殖子を回収・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のである。

我々はこれまで、犬の繁殖(生理)に関する多くの研究を行い、犬の繁殖補助技術に関する研究、とくに犬凍結精液の作製法の確立および人工授精法に関する研究、犬胚の凍結保存技術に関する研究を行って、様々な論文を報告してきた。

しかし、様々な繁殖補助技術のうち、犬では体外授精や顕微授精の技術の確立がまだ行われていない。最近、犬の体外受精によって産子を得たという世界初の報告(Nagashima, J.B., PLoS One, 2015)がなされたが、この研究に用いられた卵子は全て体内から回収された成熟卵子のみであり、卵巣から回収された未成熟卵子から体外成熟培養を得て体外受精が行われたものではなかった。すなわち、本来の未成熟卵子からの体外授精による犬の産子はまだ得られていないのが現状である。前述したように、補助犬の系統維持を目的として生殖子を有効利用するためには、訓練前の若齢期に摘出された卵巣から回収した未成熟卵子を用いた体外授精および顕微授精技術を確立させることが不可欠である。また、これらの研究に我々が行ってきたこれまでの多くの研究技術を応用して、体外受精および顕微授精胚の凍結保存、凍結した未成熟卵子からの体外受精、新鮮精液だけでなく凍結精液を用いた体外授精・顕微授精技術の確立をできると考えている。また我々は、将来的に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。これを成功させるためには、卵巣から回収した未成熟卵子の凍結保存技術の確立は必須であり、その後の体外受精および顕微授精の技術確立が不可欠であると考えている。

2. 研究の目的

体外受精および顕微授精技術は、産業動物や実験動物では実用的な繁殖補助技術として利用されているが、犬ではまだこれらの技術が確立していない。そこで、これまで我々が行ってきた犬体外受精および体外培養に関する研究を基本として、これに最新の研究報告からの体外受精技術および他の動物で行われているような方法を導入し、犬での技術確立を目指すことを計画した。また、卵巣からの卵子の有効利用の1つとして、これまであまり犬では行われていなかった顕微授精技術に関しても技術確立を目指すことを計画した。そして、これまで行ってきた胚の凍結保存技術をこれらの研究に導入して、これらの作成した胚の凍結保存を行い、遺伝的価値の高い犬の生殖子の保存を行うことを目的とした。これらの技術を確立することによって、遺伝的に高い犬の生殖子を有効利用することができ、系統を考えた繁殖を行うことが可能となる。またさらに、これらの胚を移植する方法に関して、これまで行ってきた外科的な胚移植方法に代わる方法として、臨床的に応用することを目的として、犬に与えるストレスが少ない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を確立するための研究を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣から回収した成熟卵子の体外培養および体外受精の検討

摘出された卵巣から回収した卵子は未成熟な状態の卵子であるため、体外受精を行うために

は体外にて培養し成熟させなくてはならない。しかし、犬においてこれらの体外成熟培養技術はまだ確立されておらず、未成熟卵子を成熟させることは難しい。そこで研究の始めとして、体外培養法としてこれまでに犬において報告された研究を基本として、成熟率の良い体外培養方法を検討した。体外培養方法として、犬卵子と形態学的に類似していると思われる豚卵子の体外成熟培養方法 (Yoshioka, K., J. Reprod. Dev., 2011) に注目し、この方法を用いて犬卵子の体外成熟培養を行った。また体外成熟培養が成功したときには、雄ビーグルの精子を用いて体外受精を行った。そして体外受精胚において8細胞期まで分割がみられた場合、その時にタイミング良くレシピエントとなる犬が存在する場合には外科的子宮内胚移植を行い、受胎するかどうかを検討し、レシピエント犬がいない場合は、凍結保存を行うこととした。

実験に使用する卵巣は、本学の動物医療センターおよび一般の動物病院から提供してもらったものを使用した。様々な年齢、発情周期にあることが予想され、卵巣から回収された卵子のうち体外培養にて成熟を完了するものは、ある程度発育したグレードの高いものが良いことが知られているため、グレードの高い卵子を中心に実験を進めた。なお、体外培養により卵子が成熟したかどうかについては、酢酸オルセイン染色を用いて核の成熟段階から確認した。

(2) 卵巣からの未成熟卵子の新しい回収方法の検討

これまで犬卵巣からの未成熟卵子の回収方法として、他の動物で行われているように切り刻み法で行っていた。この方法は外科用メスを用いて卵巣を切り刻み、卵胞から放出された卵子を回収する方法である。しかし、この方法では血液が混じってしまうことで卵子の成熟率に影響を与える可能性があること、また成熟状況がさまざまな卵母細胞が回収できるが、成熟度の低い卵母細胞は培養しても成熟しないため使用できないなども問題点として挙げられた。そこで新しい卵母細胞の回収方法として、顕微鏡下で外科用メスを使用して卵胞を1つずつ切出し、健常卵胞のみを摘出する卵胞切出し法について検討した。

(3) 新しい受精卵(胚)の凍結方法の検討

これまで犬受精卵(胚)の凍結保存方法はCryotop法で行っており、正常な産子を得ることに成功している (Hori, T., J. Vet. Med. Sci., 2016)。最近、同じ会社にてさらに凍結融解後の成績が良好になると考えられる新しい凍結方法であるCryotech法が開発された。この方法を用いた牛胚の凍結保存においては、融解胚の生存率および胚移植後の受胎率が高率であった。そこで、犬胚の凍結保存後の成績を向上させることを目的として、この方法を検討することとした。なお凍結胚においては、まず交配を行った犬から回収した胚を用いて行い、その後、体外受精または顕微授精にて分割がみられた8細胞期以降の胚について行うこととした。

(4) マイクロマニピュレーターを用いた顕微授精技術の確立に関する研究：異種間顕微授精後の雌雄前核形成による種々の処理精子の受精能の判定

卵巣から回収した卵子を有効利用する方法として、顕微授精(細胞質内精子注入法: ICSI)は、1匹の精子を用いて授精させることができるため、非常に有効な繁殖補助技術であると考えられる。ICSIは多くの動物で検討されており正常な産子を得ることに成功しているが、犬ではまだこの技術の確立は行われていない。そこで、犬のICSI技術の確立を目的とした予備的な研究の1つとして、異なる保存処理を行った犬精子を使用してICSIを実施し、その後の雄性前核および雌性前核の形成率を観察することで、保存精子の違いが正常受胎率(または胚発生率)に影響を及ぼすかどうかについての検討を行った。ただし、現在までに犬卵母細胞の体外培養技術が確立されていないことから、今回は犬の卵母細胞の形態に類似している豚卵母細胞を使用して実験を行った。

(5) 小動物用内視鏡を用いた非外科的な胚移植方法の検討

これまでの胚移植法は、確実に子宮内に移植することを目的として外科的な開腹手術によって行ってきたが、犬に手術や麻酔によるストレスを与えてしまうことが問題となっていた。以前にビーグルを用いて、小動物内視鏡(オリンパス製、内視鏡の直径8mm)を用いて腔内を観察したが、子宮内にカテーテルを挿入できたものは少なかった。しかし、最近において小動物内視鏡を用いたビーグルの人工授精の報告も行われていること (Hayashi, K., J. Vet. Med. Sci., 2015)、今回の対象となる補助犬は比較的大型犬が多いことから、小動物内視鏡を用いた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ことは可能であると考えられる。そこでこの技術を用いて、体外受精または顕微授精によって得られた胚または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) 卵巣から回収した成熟卵子の体外培養および体外受精の検討

犬卵子に近いと考えられる（卵黄中の脂肪が犬と同じように多い）豚卵子で行われた体外成熟培養方法を応用するため、犬卵子の体外成熟培養方法に高性能ブタ卵子成熟用基本培地（HP-POM）を使用して5%CO₂インキュベーター内で約48時間、卵子の体外培養を行った。その結果、体外受精率は従来行っていたTCM199を用いた体外成熟培養とほぼ同様で、10～20%と低いままであった。しかし、卵丘細胞が膨隆しているものがみられ、一部成熟過程にあるのではないかと考えられた。そこで体外成熟を行った卵子のうち一部の卵子においては体外受精を行ったが、第2極体を放出したのもも分割がみられたものもなかった。

そこで、この体外成熟率をさらに高める方法を確立することが必要であると考え、HP-POM培地に添加する性ホルモン性製剤について検討し直すことを考えた。そこで、HP-POM培地に添加するホルモン剤としてFSHおよびLHの有無と投与量について検討した。また未成熟卵子にもグレードが存在しており、グレードの低い未成熟卵子については培養を行っても成熟しないと考えられた。そのため、できるだけ成熟する可能性が高い卵子だけを回収して、成熟培養を行った。しかし、卵子の体外成熟率はやはり10～20%の範囲内であり、体外成熟率を改善することはできなかった。

上記の結果、体外受精後に8細胞期まで発育した胚が得られなかったため、体外受精胚の凍結保存および胚移植を検討することはできなかった。

(2) 卵巣からの未成熟卵子の新しい回収方法の検討

卵胞切出し法は、これまで牛や豚において使用されている方法であり、この方法で回収した卵子の体外成熟率は高率であることが知られている。ただし卵胞内で卵丘に付着している卵子は成熟率が高いが、浮遊している卵母細胞は成熟率が低いことが明らかとなっている。そのため、卵胞切り出し法を用いて浮遊していない犬未成熟卵子だけを回収して、体外成熟培養を行った。しかしその結果、犬卵巣は豚卵巣よりも小さく、卵胞を回収することが比較的難しいこと、手に入る卵巣が様々な発情周期であり黄体が存在する卵巣は使用することが難しいため、研究期間中に体外成熟率を比較した結果を出すことができなかった。

(3) 新しい受精卵（胚）の凍結方法の検討

交配適期に雄ビーグルと交配を行った雌ビーグル犬5頭において、排卵後9～11日目に卵管および子宮摘出術を実施して、灌流法によって胚を回収した。その結果、各実験犬から1～9個、合計31個の胚が回収された。胚の発育段階は、8細胞期～胚盤胞であった。なお変性胚の割合は、25.8%（8/31）であった。変性せず、正常と考えられる23個の胚をCryotech法にて凍結保存を行った。しかし、研究期間内に融解試験および胚移植試験を行うことができなかったため、これらの結果については明らかにできなかった。

(4) マイクロマニピュレーターを用いた顕微授精技術の確立に関する研究：異種間顕微授精後の雌雄前核形成による種々の処理精子の受精能の判定

豚卵巣から卵母細胞-卵丘細胞複合体を採取し44～48時間、5%CO₂インキュベーター内でHP-POMを用いて体外成熟培養を行った。精液は、雄ビーグル犬2頭から用手法によって採取したものを使用した。実験群として新鮮精液（新鮮精子群）、射出精液を卵黄トリス・フルクトース・クエン酸液（EYT-FC）で希釈し、7日間4℃で保存した低温保存精子（低温保存精子群）、EYT-FCを用いて作成した凍結保存して融解した精子（凍結融解精子群）を設定した。なお、低温保存精子および凍結融解精子に関してはEYT-FCが含まれているため、実験に使用する前にPercoll処理を行ってEYT-FC成分を除去した。また、上記の実験群の他に、注入刺激のみ行うSham群を設定した。ICSIは、倒立顕微鏡にマイクロマニピュレーターおよびピエゾドライブユニットを搭載したものを使用して行った。そして、ICSI後、ブタ胚発生用培地（PZM-5）を用いて上記と同様の培養を約18時間行った。その後、固定および染色を行い、核相の観察を行った。

その結果、新鮮精子群、凍結融解精子群、低温保存精子群で注入に成功した卵母細胞数はそれぞれ36個、20個、23個で、そのうち精子の活性として正常に受精した卵母細胞の割合はそれぞれ21個（58%）、11個（55%）、13個（56%）で、精子の違いによる成功率（雄性前核形成率）には差はみられなかった。また注入操作のみを行ったSham群で単為発生を行った割合は5%と有意に低値を示したため、精子を注入するときの刺激がその後の発生に関して影響した可能性は低いと考えられた。

今回の実験から、ICSIにおいて注入する犬精子は保存の違いによって、その後胚発生に差が生じないことが示唆された。また、豚成熟卵子に豚精子を用いてICSIを行った他の研究における成功率（分割率）と比較すると、今回の成績はほぼ同様であった。すなわち、今回の豚卵母細胞を用いて行ったものでも犬精子の受精能を評価できていることが示唆された。今後は犬の体外成熟卵子でも同様の実験を行い、同様の結果が得られるかを明らかにすることが必要である

と考えられた。

(5) 小動物用内視鏡を用いた非外科的な胚移植方法の検討

上記に記載したとおり、今回の研究期間中に胚移植を行うことができなかったが、発情期中の雌ビーグル犬を用いて、以前に使用した小動物内視鏡ではなく、新しい小動物内視鏡（オリンパス製産科用硬性鏡）を用いた腔内の観察および子宮内へのカテーテルの挿入ができるかどうかについて検討を行った。その結果、犬の外子宮口の解剖学的構造が見えにくいことと、操作技術が未熟であるため時間がかかったが、子宮頸管を通して子宮内にカテーテルを挿入することは可能であった。以前用いた小動物内視鏡よりは子宮内への挿入が可能であると考えられた。したがって、今回の技術を用いれば、体外受精または顕微授精によって得られた胚または凍結胚を移植することも可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	岡田 幸之助 (Okada Kounosuke) (60445830)	日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授 (32669)	