

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K15055

研究課題名(和文) 免疫不全動物を用いた卵巣組織移植による初期卵胞から成熟卵子への誘導

研究課題名(英文) Activation of folliculogenesis by xenotransplantation with the immunodeficient animals

研究代表者

藤原 摩耶子 (Fujihara, Mayako)

京都大学・野生動物研究センター・特定准教授

研究者番号：00794504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は希少動物保全のための生殖助成技術の開発を目指し、野生肉食動物のモデルとしてイヌとネコを用いて、免疫不全動物への卵巣組織の移植による原始卵胞の発育誘導法を検討した。イヌの凍結後の卵巣組織を免疫不全ラットへ移植した結果、移植9週間で原始卵胞から二次卵胞まで卵巣組織内の卵胞発育を誘導できることを示すと同時に、卵胞発育能を保持した状態で卵巣組織を凍結保存できたことを示した。この成果の野生動物応用を目指し、野生動物の卵巣組織・卵子を凍結保存する『卵巣バンク』の取り組みも推進している。また、鳥類を対象を拡げ、ニワトリで卵子を保存する凍結保存技術の開発を行い、国内希少鳥類への応用にも取り組んでいる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少動物の保全に生殖助成技術を用いる取り組みはこれまでも行われてきたが、未だ全ての雌の受精能力を保存する方法は確立されていない。本研究は凍結した卵巣内の未成熟な生殖細胞を周辺環境ごと他の動物種体内で体外発育させられることを示すもので、性成熟段階や繁殖周期を問わず、雌の卵巣から体外受精可能な卵子を獲得できることを示唆する。これは、幼弱期に死亡する例の多い野生動物の雌の配偶子も保存・繁殖活用できる可能性を示しており、実際に「卵巣バンク」として国内希少種を含めた野生動物の卵巣組織保存・蓄積にも取り組みも進めており、社会的関心の高い野生動物保全へ貢献する成果である。

研究成果の概要(英文)：Aiming to develop assisted reproductive technologies for the conservation of endangered animals, this study investigated a method for inducing the development of primordial follicles by transplanting ovarian tissue into immunodeficient animals using dogs and cats as models of wild carnivores. As a result of transplanting frozen canine ovarian tissue into immunocompromised rats, we demonstrated that ovarian tissue can induce follicle development from primordial to secondary follicles after 9 weeks of transplantation and that the ovarian tissue can be cryopreserved while retaining follicle development ability. To apply these results to wild animals, we are also promoting the "Ovarian Bank," which cryopreserves ovarian tissue and oocytes from wild animals. In addition, to extend the target species into birds, I have developed a cryopreservation technique to preserve oocytes in chickens, and am working on the application of this technique to endangered avian species in Japan.

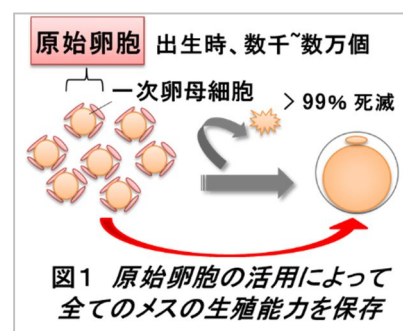
研究分野：保全生殖学

キーワード：卵巣 卵子 卵胞発育 野生動物 移植 保全

1. 研究開始当初の背景

近年生息地の破壊や密猟などで哺乳類の約 20%が絶滅の危機に瀕しており、野生イヌ科動物では 36 種中 6 種、野生ネコ科動物では 37 種中 16 種が国際自然保護連合 (IUCN) によって絶滅危惧種に指定されている¹。希少動物の保全のために、精液の凍結保存、人工授精など繁殖を介助する取り組みはこれまでも行われており、オスの生殖能力を保存する精液凍結技術は様々な動物種で実用化されている。前所属先であり野生動物保全研究の先駆的研究機関であるスミソニアン保全生物学研究所では、精液の凍結保存技術を用いて、17 頭にまで減少した黒脚イタチの個体数増加、生息地への再導入に成功している。一方、卵子の凍結保存は、体外授精及び胚移植などの生殖介助技術と組み合わせることで、産仔作出可能なメスの生殖能力保存技術として多数の動物種で試みられてきた。しかし、マウスやヒト以外の動物種では凍結保存卵子を用いた産仔作出率は未だ低い。また、卵巣から一度に多数の凍結可能な卵子を回収することも困難であり、精液の凍結保存技術のように幅広い動物種での実用化には至っていない。さらに、性成熟以前の希少動物の生殖能力を保全することは不可能である。

出生時より卵巣内に多数存在する初期の卵胞 (原始卵胞) を発育誘導させることができれば、一個体から得られる受精可能な卵子の数は飛躍的に増加し、性成熟段階を問わずメスの生殖能力を保存する画期的な生殖介助技術になる (図 1)。



2. 研究の目的

出生時のメスの卵巣皮質には未熟な卵子が原始卵胞として数千~数万個保存されているが、発育過程で 99%以上が死滅する。卵巣皮質内の原始卵胞を発育誘導することができれば、性成熟段階に関わらず一個体から多数の生殖能力を持った遺伝資源 (卵子) を利用することが可能となる。本研究は、イヌとネコを野生肉食動物のモデル動物として用いて、免疫不全ラットへの卵巣組織の移植による原始卵胞から成熟卵子への発育誘導法の確立を目指すことで、新たな生殖介助技術の開発を試みる。

3. 研究の方法

【移植による発育誘導】

イヌの卵巣を用いた免疫不全ラットへの移植実験では、動物病院で避妊手術の際に切除される卵巣を用いて原始卵胞のある卵巣皮質分を切り出し、免疫不全ラットの皮下への移植を実施した。移植時には血管新生を促進する成長因子を始め、様々な添加物の効果を検証した。移植後、5 週目、9 週目に移植片を回収し、移植前と比較した組織学的解析によって、卵胞発育の有無を検証した。また、凍結後の卵巣組織についても移植を実施し、凍結条件による卵胞発育へ与える影響についても検証するとともに、凍結組織の移植による卵胞の発育誘導の可能性を検討した。

【移植に向けた、多様な野生動物種の卵巣組織の凍結保存と蓄積】

卵巣組織の移植の前段階として、移植による卵胞発育の野生動物保全の実用化において

様々な種で卵巣組織を蓄積する上で必須と考えられる、未熟な卵胞を含んだ卵巣組織の凍結保存法の検討も並行して実施した。当初の予定では、野生肉食動物のモデルとしてイヌとネコを用いる予定にしていたが、対象種を鳥類及び野生動物に広げることで、移植研究の基盤となる多様な種の卵巣組織の凍結保存・蓄積を実施した。

4．研究成果

【移植による発育誘導】

イヌの卵巣を用いた免疫不全ラットへの移植実験では、血管新生を促進する成長因子を利用するとともに、移植組織の定着を促す足場となりうるマトリゲルを用いることで、免疫不全ラットの皮下へ移植後も定着し、生存できることがわかった。凍結後の卵巣組織についても移植を行い、ガラス化凍結法を行った卵巣組織は9週間の移植によって原始卵胞からより発育の進んだ二次卵胞へ発育を誘導することができた。この結果から、この移植法は移植した卵巣組織内で原始卵胞から二次卵胞まで卵胞発育を誘起することが可能であることを示すとともに、ガラス化凍結法で卵胞発育能を保持した状態で卵巣組織を保存できることが分かった(Fujihara et al., 2019)。さらに、凍結後の卵巣組織についても移植を行い、ガラス化凍結法を行った卵巣組織は9週間の移植によって原始卵胞からより発育の進んだ二次卵胞へ発育を誘導することができた。よって、この移植法は移植した卵巣組織内で原始卵胞から二次卵胞まで卵胞発育を誘起することが可能であることを示すとともに、ガラス化凍結法で卵胞発育能を保持した状態で卵巣組織を保存できることが分かった(Fujihara et al., 2019)。

【移植に向けた、多様な種の卵巣組織の凍結保存と蓄積】

この結果を野生動物に応用することを目指し、飼育個体死亡時に卵巣を受け、卵巣組織・卵子を凍結保存する『卵巣バンク』の取り組みを推進している。さらに環境省と連携し、国内希少種で天然記念物のツシマヤマネコについても野生下・飼育下両方で死亡した個体の卵巣を受け入れ、卵子の保存に取り組んでいる。これまでにツシマヤマネコで計31件の提供をはじめ、100件以上の野生動物の死亡個体由来の卵巣を受け入れ、卵巣組織の凍結保存を実施している。そのほとんどで卵巣組織中に原始卵胞や一次卵胞を確認できていることから、これまで卵子を回収できなかった時点で廃棄されていた卵巣のメスの生殖細胞が凍結保存できたことを示している。鳥類にも対象を広げ、ニワトリで卵子を保存する凍結保存技術の開発を行った(Fujihara et al., 2022)、すでにその成果を応用して、ヤンバルクイナ、オジロワシ、タンチョウ等の国内希少鳥類の卵子保存にも取り組みを始めている。今後、本研究で得られた移植研究の成果を希少種以外の野生動物種の卵巣組織へ応用することで、蓄積された野生動物の卵巣組織を用いて未成熟卵胞の発育誘導を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 藤原摩耶子	4. 巻 27 (1)
2. 論文標題 生息域外保全における種の保存：配偶子から個体まで	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ワイルドライフ・フォーラム	6. 最初と最後の頁 6 - 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujihara Mayako, Shiraishi Jun-ichi, Onuma Manabu, Ohta Yoshiyuki, Inoue-Murayama Miho	4. 巻 12
2. 論文標題 Cryopreservation Competence of Chicken Oocytes as a Model of Endangered Wild Birds: Effects of Storage Time and Temperature on the Ovarian Follicle Survival	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 1434 ~ 1434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani12111434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 藤原摩耶子、村山美穂	4. 巻 5 (7)
2. 論文標題 野生動物の保全を目的にしたメス遺伝資源バンクの整備	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 39 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ferraz MAMM, Fujihara M, Nagashima JB, Noonan MJ, Inoue-Murayama M, Songsasen N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Follicular extracellular vesicles enhance meiotic resumption of domestic cat vitrified oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65497-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 藤原摩耶子	4. 巻 1
2. 論文標題 スミソニアン保全生物学研究所での保全繁殖の取り組み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本飼育技術学会 第29回大会会誌	6. 最初と最後の頁 30-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujihara Mayako, Kaneko Takehito, Inoue-Murayama Miho	4. 巻 9
2. 論文標題 Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40711-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 11件)

1. 発表者名 Mayako Fujihara, Kodzue Kinoshita, Hideyuki Ito, Satoshi Kusuda, Ryoma Otsuka, Takehito Kaneko, Takashi Nagamine, Manabu Onuma, Yumiko Nakaya, Takaharu Kawashima, Miho Inoue-Murayama
2. 発表標題 Ex situ conservation of endangered wildlife, Tsushima leopard cats and Okinawa rails, using germ cells.
3. 学会等名 14th Asian society of conservation medicine (ASCM) / 27th Japanese Society of Zoo and Wildlife Medicine (JSZWM) Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayako Fujihara, Miho Inoue-Murayama
2. 発表標題 Vitrification of ovarian tissues and development of primordial follicles by in vitro culture/ xenotransplantation in model animals
3. 学会等名 European Society of Medicine (ESMED) congress 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原摩耶子、村山美穂
2. 発表標題 野生動物保全のための未成熟卵子を用いた新たなメス遺伝資源保存法の探索
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayako Fujihara, Miho Inoue-Murayama
2. 発表標題 Ovarian tissue cryopreservation for female fertility preservation in wild animals
3. 学会等名 13th Asian Society of Conservation Medicine Virtual Conference 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原 摩耶子、村山 美穂
2. 発表標題 イヌとネコの卵巣を用いた未成熟卵子の凍結保存及び発育誘導による新たなメス遺伝資源の保存方法の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 摩耶子、白石 純一、大沼 学、太田 能之、井上 村山 美穂
2. 発表標題 ニワトリの卵巣保存条件が卵子の生存性と遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 第28回日本DNA多型学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 摩耶子
2. 発表標題 動物園動物の配偶子保存の意義と取り組み
3. 学会等名 第25回野生動物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 摩耶子
2. 発表標題 国際的な視野を持った保全活動のために；留学のすすめ
3. 学会等名 第25回野生動物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 摩耶子、村山 美穂
2. 発表標題 メス配偶子保存を目的とした野生動物の卵巣組織凍結保存：2018年度
3. 学会等名 第3回野生動物保全繁殖研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujihara M, Inoue-Murayama M.
2. 発表標題 Cryopreservation of ovarian tissues for female fertility preservation; model studies and application to Tsushima leopard cat.
3. 学会等名 The Second Asian Wildcat Conservation Workshop. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujihara M, Inoue-Murayama M
2. 発表標題 Future of assisted reproductive technologies for wildlife conservation.
3. 学会等名 Asian conference for International Veterinary Students' Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujihara M, Kaneko T, Inoue-Murayama M.
2. 発表標題 The ovarian tissue cryopreservation: A potential resource of female fertility preservation in wild animals.
3. 学会等名 11th International Conference of Asian Society of Conservation Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujihara M, Inoue-Murayama M.
2. 発表標題 Cryopreservation of immature follicles; the new target for female fertility preservation in wild animals.
3. 学会等名 Symposium of Integrative Biology -Biodiversity in Asia- (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujihara M, Songsasen N, Inoue-Murayama M.
2. 発表標題 In vitro development and cryopreservation of immature oocytes within the ovaries for the female fertility preservation in wild felids.
3. 学会等名 The Second Asian Wildcat Conservation Workshop. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujihara M, Inoue-Murayama M.
2. 発表標題 The cryopreservation of immature oocytes as a target for female fertility preservation in wild animals.
3. 学会等名 JSPS Core-to-Core Tropical Biodiversity Program, The 9th International Seminar on Biodiversity and Evolution (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujihara M, Inoue-Murayama M.
2. 発表標題 The ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation in wild animals.
3. 学会等名 JSPS Core-to-Core Tropical Biodiversity Program, The 8th International Seminar on Biodiversity and Evolution (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原摩耶子
2. 発表標題 未成熟卵子を利用した希少動物を保全する新たな生殖介助技術の確立.
3. 学会等名 公益財団法人 山田科学振興財団 2018年度長期間派遣者研究交歓会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原摩耶子, 村山美穂
2. 発表標題 米国スミソニアン保全生物学研究所における野生動物の保全繁殖の取り組み.
3. 学会等名 第2回野生動物保全繁殖研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原摩耶子, 村山美穂
2. 発表標題 メス配偶子保存を目的とした野生動物の卵巣組織凍結保存：2016年度～2017年度
3. 学会等名 第2回野生動物保全繁殖研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原摩耶子
2. 発表標題 スミソニアン保全生物学研究所での保全繁殖の取り組み.
3. 学会等名 第29回日本飼育技術学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原摩耶子, 村山美穂
2. 発表標題 野生動物の卵巣を保存する：希少動物の保全を目指して.
3. 学会等名 2018年度動物園水族館大学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujihara M, Kanako T, Inoue-Murayama M.
2. 発表標題 Cryopreservation and xenotransplantation of primitive oocytes within the ovary for preserving female fertility of endangered animals.
3. 学会等名 The 6th International Seminar on Biodiversity and Evolution-Wildlife Science by New Biologging studies (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原 摩耶子、金子武人、村山美穂
2. 発表標題 野生動物の保全に向けた卵巣保存の取り組み
3. 学会等名 「ず～なんよ。」動物園大学 8. in 安佐
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原 摩耶子、金子武人、村山美穂
2. 発表標題 未成熟卵子の凍結保存及び発育誘導によるメス遺伝資源の新たな保存方法
3. 学会等名 第1回野生動物保全繁殖研究会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 齋藤 慈子、平石 界、久世 濃子、長谷川 真理子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京大学出版会	5. 総ページ数 336
3. 書名 正解は一つじゃない 子育てする動物たち	

1. 著者名 京都大学野生動物研究センター編	4. 発行年 2018年
2. 出版社 京都通信社	5. 総ページ数 175
3. 書名 この画像を表示 野生動物 追いかけて、見つめて知りたいキミのこと	

〔産業財産権〕

〔その他〕

[京都大学野生動物研究センターHP内 メンバー紹介](https://www.wrc.kyoto-u.ac.jp/members/fujiharaM.html)
[京都大学野生動物研究センターHP内 メンバー紹介](https://www.wrc.kyoto-u.ac.jp/members/fujiharaM.html)
[京都大学野生動物研究センターHP内 メンバー紹介](http://www.wrc.kyoto-u.ac.jp/members/fujiharaM.html)
 アムールトラやツシマヤマネコ... 京大が希少動物の卵巣を凍結保存 (毎日新聞電子版)
<https://mainichi.jp/articles/20200330/k00/00m/040/010000c>
 上記英語版 (The Mainichi:Japan Daily News)
<https://mainichi.jp/english/articles/20200410/p2a/00m/0fe/022000c>
 <サイエンスBOX>種の保全 重い責任に身震い (読売新聞電子版)
<https://www.yomiuri.co.jp/local/kansai/feature/C0036729/20200411-0YTAT50017/>
 マレーシアの研究機関、Danau Girang Field CentreのSNSで紹介
https://www.instagram.com/p/CDOXHuiDasb/?utm_source=ig_web_copy_link
 京都大学野生動物研究センターHP内 メンバー紹介
<http://www.wrc.kyoto-u.ac.jp/members/fujiharaM.html>
 京都大学野生動物研究センター 2018年度のニュース
<https://www.wrc.kyoto-u.ac.jp/news/news-2018.html>
 京都大学野生動物研究センター 構成員の紹介 藤原摩耶子
<http://www.wrc.kyoto-u.ac.jp/members/fujiharaM.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	スミソニアン保全生物学研究所		