

令和元年9月16日現在

機関番号：88003

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18451

研究課題名(和文)胎生サメ類の人工子宮プロジェクト：人工卵殻膜を用いた保育システムの開発

研究課題名(英文)Studies on egg capsule of viviparous shark for the development of artificial uterus

研究代表者

富田 武照 (Tomita, Taketeru)

一般財団法人沖縄美ら島財団(総合研究センター)・総合研究センター 動物研究室・研究員

研究者番号：90774399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はイタチザメの卵殻を調査することによって、以下の三つの点が明らかになった。第一に、卵殻には半透膜としての機能があり、分子量によって透過量が異なることが分かった。第二に、卵殻の微細構造を調査した結果、空隙密度の異なる薄いシートが積層する構造を持っていることがわかった。この構造により、その薄さにかかわらず引張力に対して強い物理特性が達成されていると考えられる。これらの観察により、卵殻は胎仔と母体との物質のやりとりを妨げない一方、ウイルスや細菌の侵入をブロックする「バリア」としての役割を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水族館での大型板鰓類の持続的な展示を達成するために、早産胎仔や摘出胎仔の保育技術の開発は急務である。本研究によって得られた知見は、胎仔の卵殻が哺乳類の胎盤の機能の一部を有していることを意味し、これは哺乳類以外の胎生メカイズムの一端を解明したという点で意義がある。さらに、この卵殻を人工半透膜で置き換えることにより、将来的に水族館における人工保育技術の開発につながる可能性を示唆する点で重要である。

研究成果の概要(英文)：The present study for the first time examined the egg capsule of the viviparous tiger shark to clarify its function. The results of this study were summarized as; 1) the egg capsule has a function as semipermeable membrane. Our experiment showed that the diffusion rate through capsule greatly changed depending on the molecule size. 2) The egg capsule is composed of many thin layers with different densities depending on its depth. This complicated structure may contribute to the high resistance against tensile force. These physical natures suggest that egg capsule allows the free exchange of small molecules, such as oxygen, carbon dioxide, and ammonia, between mother and embryos, but prevent the invasion of bacteria and virus into the egg capsule. These knowledges are useful to develop the technique to maintain the life of premature embryo in artificial environment.

研究分野：研究代表者は機能形態学を専門とし、特に胎生板鰓類の胎仔の生命維持機構について、研究を行っている。

キーワード：胎生 保育器 板鰓類 胎仔 卵殻 半透膜 電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水族館での大型板鰓類(サメ・エイ類)の継続的な展示において、飼育個体の繁殖率の向上は急務である。中でも、水族館で予期せず発生する早期出産や人工摘出によって保護した胎仔の生存率は極めて低く、これらの胎仔を救命する人工保育技術の開発が望まれてきた。哺乳類の人工保育技術の開発は近年急速に進んでいる一方、哺乳類と異なり胎盤を形成しない胎生板鰓類は、胎仔の子宮内での生命維持機構は多くが不明であることが、人工保育技術の開発を妨げてきた。

2. 研究の目的

研究代表者は、哺乳類と板鰓類の大きな違いとして、胎仔が卵殻に包まれていることに着目し、この卵殻の機能を調べることで、人工保育技術の開発に資することを目的とした。さらに、水族館での早産個体を、卵殻の人工代替物で包むことにより、胎仔の生存率の向上を可能にするか検証することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 胎仔の母胎内での卵殻の状態の観察

石垣島等での現地調査により妊娠個体から卵殻のサンプルを入手した。その際に、母胎内から摘出された胎仔とそれを取り囲む卵殻の状態について観察を行った。さらに水族館におけるイタチザメの妊娠個体のエコー検査を行い、子宮内の観察を行った。さらに、水槽内での出産シーンを解析することにより、胎仔が卵殻からハッチアウトするタイミングについて明らかにした。

(2) 卵殻の半透性能の調査

調査には、上記の過程で入手したイタチザメの卵殻サンプルを用いた。卵殻の半透膜としての性能を調査するために、まず半透性を調べるシステムの構築を行った。その上で、分子量の異なる溶液を卵殻に透過させ、透過後の液体を回収して透過前のものと比較することにより透過率の調査を行った。

(3) 卵殻の内部構造の調査

イタチザメの卵殻を電子顕微鏡観察用に固定し、断面の切片を作成後、東京大学海洋研究所の所有する透過型電子顕微鏡にて観察を行った。さらに、物質の透過過程を観察するために、上記のシステムにより微細な金コロイドを透過させ、その後、切片を作成し、断面の観察を行った。また、卵殻を凍結乾燥し、東京大学海洋研究所の所有する走査型電子顕微鏡によって表面および断面の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 胎仔の母胎内での卵殻の状態の観察

母胎内から摘出されたイタチザメの胎仔を調査した結果、妊娠後期(胎仔の全長が50センチメートル以上)になっても胎仔が卵殻によって包まれている様子が観察された。卵殻のすぐ外側は子宮から発達する血管が密に分布する繊維状の組織によって覆われていた。一方、卵殻の内側は粘性の低い液体によって満たされており、胎児はその液体に浮いている状態であった。イタチザメの胎仔は胎盤を持たなかった。これらの結果は、妊娠の全期間にわたって、イタチザメの胎仔が卵殻におおわれていること、さらに胎仔への母体からの栄養供給、胎仔の周囲の液体の塩分濃度調節、胎仔の排泄物の除去など、母体と胎児の間の物質の交換はすべて卵殻を通じて行われていることを示している。

さらに、この結果は、沖縄美ら海水族館におけるイタチザメの妊娠・出産イベントの観察によっても裏付けられた。2017年に沖縄県読谷村にて混獲されたイタチザメが、水族館に搬入後に妊娠していることが発覚した。この妊娠個体の子宮内部をエコーを用いて観察した結果、生存している複数の胎仔と、胎仔が卵殻につつまれたカプセル内にいる様子が明らかとなった。また、同個体の水族館における出産シーンを詳細に解析した結果、胎仔は出産時にはまだ卵殻につつまれており、出産と同時に、あるいは直後に卵殻からハッチアウトする様子が観察された(図1)。つまり、イタチザメの胎仔は妊娠全期間にわたって卵殻につつまれていることが世界で初めて出産イベントからも確かめられた。

この出産イベントにより、予期せぬ発見があった。イタチザメの胎仔のエコー動画を調査した結果、呼吸行動が出産前と出産後で異なることが分かった。つまり、出産前には口腔ポンプ呼吸(口の開け閉めによる鰓呼吸)を行っているのに対し、出産後は遊泳呼吸(遊泳によって口に流れ込んでくる水流を用いた鰓呼吸)を行っていた。さらに、出産後1日の新生個体は、この両方の呼吸行動を交互に行っていた。このように、出産前後で呼吸行動が変化する様子はマンタにおいて過去に知られていたが、本研究により、同様の現象がサメ類で見られることが初めて明らか



図1. 沖縄美ら海水族館でのイタチザメの水槽内出産。卵殻が排出された瞬間の写真。

となった。

(2) 卵殻の半透性能の調査

一般的に膜の半透膜としての性能を調査する場合、まず膜の一方を溶液で満たし、その方向から加圧することで、膜から滲み出てきた溶液を回収するという手法が用いられている。しかし、この手法を卵殻膜に応用する段階で、二つの問題点が明らかとなった。第一に、卵殻が薄いため、片側から加圧すると卵殻が破れてしまうこと。第二に、卵殻が工業規格製品でないため、既存の半透膜を調べる装置に適用できないことである。そのため、卵殻の半透性能を調査する新たなシステムの開発が必要となった。

試行錯誤の結果、以下の方法が有用であることが分かった。まず、卵殻一枚を水中に浮かべた状態で、ガラス繊維製の直径47ミリ円形ろ過フィルターの全面にシワが入らないように密着させる。そして卵殻をろ過フィルターごと、マグネット式のろ過装置に設置する。このろ過装置を吸引ろ過装置に接続し、吸引ろ過を行う(図2)。このシステムの利点は、円形ろ過フィルターを卵殻と重ねることにより、卵殻が破れること防止できること、さらに規格のろ過フィルターを用いることで既存のろ過装置に適用できることである。



図2.卵殻の半透膜性能を調査するための装置。

この方法を用いて、分子量の分かっている物質の透過実験を行った。その結果、分子量の大きいアルブミンでは透過度が、それぞれ約25%であるのに対し、分子量の小さいグルコースと塩化ナトリウム水溶液ではそれぞれ約90%と85%と圧倒的に大きいことが明らかとなった。これは、分子量の違いにより卵殻の半透性能が異なることの証拠である。

一方、一般的に行われる加圧方式に比べて、本研究で用いた吸引方式は、透過後の液体が低圧にさらされるため、蒸発による若干の濃度変化が生じること、さらにアンモニア水のような気体の溶液の場合、吸引ろ過中に気体分子が系外に逃げってしまうことなどの問題が残った。卵殻膜の分画分子量の特定にはさらなるシステムの改良が必要である。

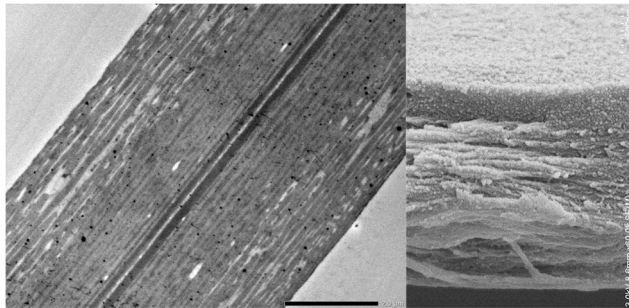


図3.イタチザメの卵殻断面の透過型電子顕微鏡写真(左)と走査型電子顕微鏡写真(右)。内部に密度の異なる積層構造が見られる。

(3) 卵殻の内部構造の調査

卵殻の断面を透過型電子顕微鏡で観察した結果、複雑な内部構造を持つことが分かった(図3左)。卵殻の厚みは5-10マイクロメートル程度であり、約40枚の薄いフィルムが積層している構造をしていた。内部の約20枚の層(内部層)は無構造で密な内部構造をしているのに対し、その外側を挟んでいる約20枚の層(外部層)は、空隙の多い疎な内部構造をしていた。また、表面を構成する層(表面層)は内部層によく似た、無構造で密な内部構造をしていた。興味深いことに、内部層の断面には、まれに楕円の空隙断面が観察され、管状の構造が内部に走行している可能性を示唆された。

半透膜性能を調査するために開発した方法に基づき、卵殻膜に金のコロイド粒子を含む溶液を透過させ、断面を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、金の粒子は卵殻の表面でトラップされ、卵殻の内部には到達しないことが分かった。このことから、卵殻の表面層は物質を透過させにくい構造をしていることを示している。

以上の結果は、走査型電子顕微鏡による観察結果とも整合的である。凍結乾燥した卵殻をピンセットで割き、その断面を走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、外部層は、走行の異なる繊維が織り込まれたような構造をしていることが分かった(図3右)。一方、表面層は内部構造が見られない厚いフィルムであり、表面や内部には穴などは見られないことが分かった。胎生サメ類の卵殻の内部構造を詳細に観察した研究はこれまでになく、重要な成果と言える。

この複雑な内部構造が、卵殻の物理的な強さを生み出している可能性がある。イタチザメの卵殻は、光が透けるほど薄いですが、卵殻の内部に液体をためられるほど引張りに対して強い構造をしている。内部層の空隙の多い構造は、卵殻が曲げられるなどの強い力がかかったときに、伸び縮みするクッションの役割を果たし、一方内部の密な構造は、引っ張りにたいして卵殻が避けるのを防ぐ働きをしている可能性がある。このような異なる物性のものを張り合わせるにより、優れた物理特性を持たせることは工業製品にも見られ、将来的にはイタチザメの卵殻構造を模倣

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

することにより、しなやかさを保ちつつ破れにくい限外ろ過膜の開発などへの応用が期待できる。

(4) 結果から予想される卵殻の機能と、将来への展望

以上の結果にもとづき、胎生サメ類の卵殻の機能について考察を行う。今回研究対象としたイタチザメの胎仔は、胎盤を形成せず、胎仔は子宮の中で浮いた状態で成長する。そのため、胎仔が必要とする酸素や、逆に不要である二酸化炭素やアンモニアはすべて卵殻を通して母体とやりとりされる。イタチザメの卵殻が低分子の物質を透過できるとする今回の研究結果は、この母体との物質のやりとりをするために必要な性質と言える。過去の研究によると、イタチザメは、低分子の栄養物質(物質種は未同定)を子宮表面から供給され、胎仔はその栄養物質を吸収して成長するとされる。これらの低分子の栄養物質も卵殻を透過できると考えられ、今回の実験結果と整合的である。一方、免疫機能が完全には備わっていない胎仔にとって、外部から侵入した細菌やウイルスによる感染は致命的である。このような病原に対して、高分子を透過しない卵殻は、バリアとしての役割を果たすと考えられる。以上のことから、胎生板鰓類の卵殻は、生命活動や成長にとって必要な母体との物質のやりとりを妨げない一方、外部からの病原から胎仔を守る機能を持っていると結論付けられる。

今回の研究では検証できなかったものの、将来的には、今回の研究結果は人工保育技術に応用されることが期待される。半透膜としての性質を持つ卵殻は、工業用に作製された市販の限外ろ過膜で代用できる可能性がある。摘出した胎仔を、卵殻の代わりに人工の限外ろ過膜で作製した袋に収納し、内部を無菌の溶液で満たすことにより、胎仔の死亡要因のひとつである感染症から胎仔を保護できるかもしれない。この技術を実現するためには、本研究を発展させることにより、卵殻膜の分画分子量の決定と、分画分子量の動物種による多様性を明らかにすることが必要不可欠であるが、これは今後の課題と言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Captive Birth of Tiger Shark (*Galeocerdo cuvier*) Reveals a Shift in Respiratory Mode during Parturition Tomita Taketeru, Touma Hideyuki, Murakumo Kiyomi, Yanagisawa Makio, Yano Nagisa, Oka Shin-ichiro, Miyamoto Kei, Hanahara Nozomi, Sato Keiichi COPEIA 106(2) 292-296

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中村 將

ローマ字氏名：Nakamura Masaru

研究協力者氏名：村雲 清美

ローマ字氏名：Murakumo Kiyomi

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。