

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22311

研究課題名（和文）小型野生ネコの保全を目的とする非侵襲的なドナー細胞の採取とクローン胚作製への応用

研究課題名（英文）Trial of non-invasive picking of donor cells and production of cloned embryos for conservation of small wild cats

研究代表者

宗 知紀（Soh, Tomoki）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：90221340

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は小型野生ネコ保全の手段としての体細胞クローン作製技術を開発するため、その基礎的情報を収集することを目的としている。非侵襲的なドナー細胞の採取のため糞あるいは尿の利用を検討した。ネコの糞及び尿あるいは牛の尿からの体細胞が採取可能であり、2重フィルター法で効率よく得られることが示された。レシピエントとなる卵母細胞は動物病院のネコの避妊手術による廃棄卵巣から得られた。正常で良好な卵母細胞を成熟させ、薬剤処理で容易に除核することが確認できた。コロナ禍のため、ウシ卵巣を代用してマニピュレータ操作の手法を向上することができた。その結果、卵丘細胞をドナー細胞に用いて核移植を行い、卵割まで観察できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繁殖力が衰えた絶滅危惧種の個体数を増やすという点では体細胞クローン動物作製技術が有効である。本研究では絶滅危惧小型野生ネコの繁殖のためドナー細胞を非侵襲的に得られるイエネコの糞から、レシピエントとなる近縁種のイエネコの卵巣を動物病院の廃棄卵巣から採取して体細胞核移植卵作製の可能性を試みた。

その結果、糞由来の体細胞を効率よく単離する方法は2重フィルター法が有効であることと、卵巣から得られる卵丘卵母細胞複合体の選別法及び成熟卵母細胞から効率よく除核する方法を見出した。このことより小型野生ネコから非侵襲的にクローンを作製する糸口が示され、絶滅危惧種の、特に高齢化した個体の増殖に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to collect basic information for developing somatic cell cloning technology as a means of conserving small wild cats. We investigated the use of feces or urine for non-invasive picking of donor cells. It was shown that somatic cells can be collected from feces and urine of cats or from urine of cows and can be obtained efficiently by the double filter method. Recipient oocytes were obtained from neutered discarded ovaries of cats at a veterinary hospital. It was confirmed that normal and good oocytes were matured and easily enucleated by drug treatment. Due to the corona crisis, I was able to improve my manipulator manipulation skills by substituting bovine ovaries. As a result, nuclear transfer was performed using cumulus cells as donor cells, and cleavage was observed.

研究分野：動物繁殖生理

キーワード：核移植胚 非侵襲 糞 フィルター法 除核

1. 研究開始当初の背景

世界には多くの小型の野生ネコが生息しており、そのほとんどの種が希少種であり絶滅の恐れが懸念される絶滅危惧種である。日本では、ベンガルヤマネコの亜種であるツシマヤマネコおよびイリオモテヤマネコの二種の小型野生ネコが棲息しているが、そのどちらも国の天然記念物に指定され、絶滅が危惧されている。生物多様性を守るという観点からも、これらの小型野生ネコの保護と繁殖の取り組みは重要な課題であると考えられる。

絶滅危惧種の人工繁殖では、人工授精や体外受精などすでに家畜で実用化されている技術以外にも、体細胞クローン動物作製技術も応用の試みが進んでいる。この技術は、すでにガウルやピレネーアイベックスなどの絶滅危惧種・絶滅種に応用されており、新たな効果的な人工繁殖技術としての可能性が期待されている。一方で、この技術はレシピエントとなる近縁種の卵子と、目的とする絶滅危惧種のドナー細胞が必要となる。したがって、まず近縁種の卵子を十分に確保する事、及びその生理学的特性・培養方法を理解する事が必要である。ガウルおよびピレネーアイベックスはそれぞれウシおよびヤギの近縁種であり、これらの家畜の体細胞クローン作製技術は確立されているためレシピエントに関する条件はクリアされていた。ネコにおいてもクローン動物は作製されており、十分な卵子の供給が可能であれば小型野生ネコへ応用する事ができると考えられる。

絶滅危惧種の保護として体細胞クローン技術を用いる場合、遺伝情報の多様性という面では有効ではないが、繁殖機会を増やすことで種の維持に寄与するものと考えられる。実際、福岡市動物園で行われているツシマヤマネコの人工繁殖では、平成 21 年以降繁殖しても生育する個体がなく、飼育下個体群の高齢化が進み、新たな飼育下繁殖技術の確立が課題として挙げられている。繁殖適齢を過ぎた個体の細胞をドナー細胞として体細胞クローン胚の作製に用いれば、理論的には半永久的に同一個体の繁殖が可能となり、飼育下個体群の再生及び高齢化回避が可能となる。現在、環境省の絶滅危惧種の保護政策では、体細胞クローン胚作製などの発生工学的技術の導入は取り入れられていないようであるが、その研究の必要が迫られることは論を俟たないものである。

2. 研究の目的

絶滅危惧小型野生ネコの保護と繁殖の取り組みは重要な課題であると考えられる。しかし野生動物をドナーとしてクローン技術を応用する場合、捕まえて体を押さえつけるだけでも死に至る危険性があることから、動物にストレスを与えず、非侵襲的に得られる体細胞を回収する必要がある。近年、尿の中に存在する細胞をドナー細胞として直接クローンマウスを作出する技術が開発された。しかしながら、この技術は野生動物に応用することは難しい。そこで本研究では、非侵襲的でなおかつ野生環境や動物園飼育下で得られるドナー細胞として、今まで全く報告のない糞の表層に付着している体細胞(糞由来細胞)に着目した。また、避妊手術で廃棄される卵巣から得られる卵丘卵母細胞複合体を培養してより多くのレシピエント卵を得る方法を検討する。

本研究は小型野生ネコ保全の手段としての体細胞クローン作製技術を開発するため、イエネコをモデルとして、その基礎的情報を収集することを目的としている。

3. 研究の方法

動物病院でイエネコの避妊手術時に得られる糞と手術後に廃棄される卵巣を材料として、体細胞クローン作製のドナー細胞とレシピエント細胞のモデルに利用できるか、検討した。

【ドナー細胞採取】

- (1)糞表面を PBS/PVA で洗い流し、得られた溶液を遠心分離し、再懸濁させて顕微鏡で観察した。
- (2)得られた糞の凍結切片を作成してヘマトキシリン・エオシン染色を行って観察した。
- (3)糞より抽出した DNA から PCR 法でネコ特異的な配列の増幅を試みた。
- (4)より多くのドナー細胞を採取するため、排泄直後の糞を PBS/PVA 中で緩やかに攪拌し、荒い濾紙でろ過したのち、遠心分離した。沈殿物を再懸濁したのち濃度勾配法 (OptiprepTM法) あるいは 2 重フィルター法 (188 μm 、 70 μm) で細胞を分離して比較した。
- (5)採取した糞由来細胞をトリパンブルーで染色し、生細胞の有無を確認した。
- (6)コロナ禍のため、付属農場で得られるウシの尿を代用できるか検討した。また、得られた細胞を DAPI 染色及び TUNEL 法で核の損傷率を調べた。

【レシピエント卵母細胞】

- (1)避妊手術で得られた卵巣を 4 または 35 で保存し、研究室まで輸送した。その後適切な保存温度を比較した。
- (2)様々な年齢のネコの卵巣から細切法により卵丘卵子複合体を採取し、成熟培地(TCM199 + 10IU / ml hCG, 0.1IU hMG, 1 μ l/ml E2) 中で 24 時間培養 (38 , 5%CO₂) した。
- (3)培養後、卵母細胞が正常に成熟した卵丘卵母細胞複合体から卵丘細胞を除去し、第二減数分裂中期 (M 期) まで到達した卵母細胞に単為発生処理を行った。卵子活性化処理にはストロンチウム法あるいは電気刺激法を行い、活性化率を比較した。
- (4)卵母細胞の卵核崩壊 (GVBD) を阻害する効果があると報告された IBMX を培地に添加して、卵母細胞の培養を試みた。
- (5)単為発生処理 (卵子活性化) 後の除核についてはデメコロシン処理を行った。
- (6)コロナ禍によりネコの卵巣提供が激減したため、購入可能なウシ卵巣を代用して、マニピュレータによる除核の手技の習得に用いた。また、マニピュレータ操作の手技向上の結果を確認するため、ウシ卵丘細胞をドナー細胞として、ウシ卵母細胞除核後核移植を試みた。

4. 研究成果

結果

【ドナー細胞採取】

- (1)糞表面を PBS / PVA で洗い流して得られた沈殿物を調べた結果、糞表面に生きた細胞が存在していることを確認した。
- (2)糞全体を凍結切片にしてヘマトキシリン・エオシンで染色して観察した結果、糞表面に細胞が存在した。
- (3)糞より抽出した DNA からネコ特異的な配列が存在することが確認された。
- (4)排泄直後の糞全体から細胞を採取した場合、濃度勾配法より 2 重フィルター法がはるかに効率が良いことが分かった。糞 1 g 当たり濃度勾配法で平均 329 個、フィルター法で 5210 個であった。
- (5)糞由来細胞をトリパンブルーで染色した結果、染色されない生細胞が観察された。(図 1)
- (6)ネコ体細胞の代用として付属農場で得られるウシ尿由来の体細胞は約 40%に核のダメージがあったが、正常な細胞をドナー細胞に利用できることが示唆された。

【レシピエント卵母細胞】

- (1)動物病院から研究室までの卵巣保存温度は 35 より 4 の条件の方が卵母細胞の成熟率がよかった (48.5% vs 18.5%)。
- (2)様々な年齢のネコの卵巣から得られた卵母細胞の成熟率は、5 カ月齢以上の個体より得られた卵母細胞は、4 ヶ月以下の個体から得られた卵母細胞より高く (68.2% vs 13.5%)、その細胞質の色は黒くかつサイズも大きかった。
- (3)単為発生処理 (卵子活性化) はストロンチウム処理より電気刺激 (200Vx1 回、50Vx3 回、5 回) が効率的であった。
- (4)IBMX を培地に添加して、卵母細胞の培養を試みた結果、成熟率に影響はなかった。
- (5)単為発生処理 (卵子活性化) 後、デメコロシン処理によって第二減数分裂後の核が第二極体とともに細胞膜から突出するので、容易に除核を行えることが確認された。
- (6)ウシ卵丘細胞をドナー細胞として、ウシ卵母細胞除核後核移植を試みた結果、卵割が認められたが、その後の発生は見られなかった。

考察

ドナー細胞について

図 1 に示すように、排泄直後と言う条件ながら、糞より生細胞が得られることが明らかになった。また、時間が経過した糞からは細胞は採取できなかった。したがって、動物園など容易に観察可能な野生ネコが糞を排泄したら可能な限り早く糞を回収し、直ちに細胞を分離採取することが必要となる。さらに、細胞を一つずつ拾い上げる作業が必要であるが、糞由来の細胞は予想より大きく、パストゥールピペットで回収する必要がある。すなわち、マニピュレータ操作で吸引ができないという問題が明らかになり、今後の課題となった。

一方、ウシの尿から得られた体細胞の 40%の核にダメージがあることが示されたので、ネコ糞由来細胞も核のダメージがある可能性が考えられ、DNA の修復処理も検討する必要があるであろう。

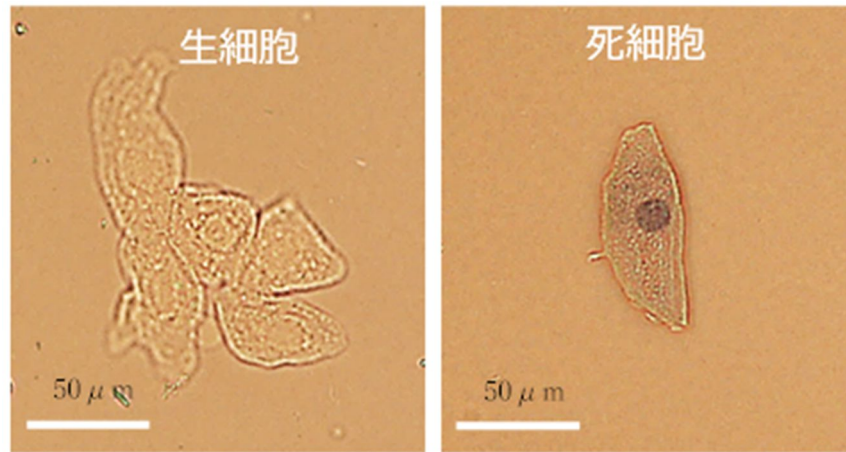


図1 ネコ糞由来細胞のトリパンプルー染色

レシピエント細胞について

動物病院で廃棄されるネコ卵巣より得られる卵丘卵母細胞複合体を成熟培養した結果、成熟率がよいのは生後5カ月齢以上で卵母細胞が大きく、細胞質が黒いものであった。この結果はレシピエント細胞として選抜する条件の重要な指標を示すものである。

卵母細胞の単為発生処理後、デメコロシン処理によって第二減数分裂後の核が第二極体とともに細胞膜から突出するので、容易に除核できることが確認された。この結果は体細胞核移植の効率向上に役立つものである。

総括

飼育下で保護されている絶滅危惧種の群が高齢化により人工繁殖が難しくなる、あるいは単純に個体数を維持する必要がある時、クローン作製技術は有効な手段となる。本研究ではイエネコの糞から細胞を採取して、ドナー体細胞として利用できる可能性を示した。これは野生動物の体細胞を非侵襲的に得て、体細胞クローンを作製する上で重要な基礎的知見であり、今後の応用、発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 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	山内 伸彦 (Yamauchi Nobuhiko) (00363325)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

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