

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430192

研究課題名(和文) 発生工学的手法を用いた特別天然記念物「オナガドリ」の保全

研究課題名(英文) Conservation of Onagadori designated as a special natural treasure of Japan by developmental engineering

研究代表者

前田 照夫 (Maeda, Teruo)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：50144895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：特別天然記念物「オナガドリ」の保全のために、オナガドリの精液及び始原生殖細胞の凍結保存を実施した。また、オナガドリ胚盤葉細胞を長期継代培養し、ES細胞の樹立と樹立した細胞の凍結保存を行った。その結果、オナガドリの精液及び始原生殖細胞の凍結保存に成功した。また、オナガドリ受精卵からの胚盤葉細胞の長期継代培養(20世代以上)にも成功し、ES細胞が樹立された。さらに長期継代培養したES細胞を凍結保存した結果、融解後もコロニーを再形成することが確認された。

研究成果の概要(英文)：All over the world, rare or endangered avian strains are becoming highly exposed to risks of epidemics, i.e., avian influenza. The most feasible ex situ management method of avian genetic resources is germline cells cryopreservation. In this study, the preservation of sperm, primordial germ cells (PGC) and embryonic stem (ES) cells from the Onagadori (Japanese extremely long-tailed chicken breed: designated as a special natural treasure of Japan) were conducted.

In this study, the preservation of sperm, PGC and ES cells from the Onagadori was succeeded. This result suggested that sperm, PGC and ES cells will be the candidates as a conservation tool of rare or endangered avian strains.

研究分野：家畜生殖学

キーワード：オナガドリ 精子 始原生殖細胞 ES細胞 凍結保存

1. 研究開始当初の背景

オナガドリは日本鶏の一種であり、その特異性から、特別天然記念物に指定されている(都築, 2006)。現在、オナガドリの飼育数は限られており、鳥インフルエンザ等の感染症が発生すると、絶滅する可能性もあり、オナガドリ遺伝子の保存方法の確立が急務である。遺伝子の保存方法として、精子、卵子あるいは始原生殖細胞 (PGC) 等の生殖細胞や未分化の細胞である受精卵由来の胚盤葉細胞及び胚性幹 (ES) 細胞の凍結保存が考えられる。

遺伝子の保存方法として、最も実現性が高いのは、精子の凍結保存である。しかし、オナガドリにおいて、新鮮精液を用いた人工授精では成功例があるものの、凍結精液を用いた人工授精及びその成功例は報告されていない。また、これまで、オナガドリ精液に関する詳しい研究は行われていないため、凍結保存における具体的な問題点も明らかになっていない。

次に、実現性のある遺伝子の保存方法として、PGC や将来精子や卵子にもなりうる可能性がある ES 細胞の凍結保存も、有効な手段であり、これらの細胞を確実に凍結保存することができれば、生殖系列キメラの作出にも利用できると考えられる。しかし、PGC の凍結保存に関する研究例は少なく、また、オナガドリのような希少家禽の ES 細胞の作出及び凍結保存に関する研究は、全く行われていない。

2. 研究の目的

(1) 初年度 (2013 年度) の研究 (オナガドリ精液の凍結保存に関する研究) では、6 か月間にわたり、オナガドリ精液の性状検査を行い、年齢や季節による変化や、個体ごとの特性について検討した。さらに、精液の質が高い個体からの精液を凍結保存し、人工授精を行うことで、受精卵を得ることを試みた。

(2) 2014 年度の研究 (オナガドリ PGC の凍結保存に関する研究) では、オナガドリの受精卵から、PGC を採取し、凍結保存後の PGC の生存率を観察し、オナガドリの PGC の凍結保存が可能かどうかを検討した。

(3) 最終年度 (2015 年度) の研究 (オナガドリ受精卵からの ES 細胞の樹立及び凍結保存に関する研究) では、オナガドリの ES 細胞の樹立及び凍結保存を検討した。

3. 研究の方法

(1) オナガドリ精液の凍結保存に関する研究

オナガドリの精液性状検査では、年齢の異なるオナガドリ 6 羽を用い、一回当たりの精液量、精子密度、奇形率及び運動性について検査した。授精試験では、精液性状検査で使用したオナガドリの中から精液の質が高い 2 個体を選んで用いた。採取した精液を、凍結保護剤を含む希釈液で 4 倍に希釈し、2 本の

ストローに分けて封入し、液体窒素で凍結した。その後、融解して人工授精を行い、得られた卵を 5 日間孵卵後、割卵し、受精の有無を調べた。実験区として、凍結保護剤としてメチルアセトアミド (以後 MA と略記) を用いる区、グリセロールを用いる区、また、人工授精時に、一回の精液採取で得られた精液の半量を注入する区、全量を濃縮して注入する区の合計 4 区を設定した。また、授精試験の結果とあわせ、受精の有無の原因を探るために、上記の条件で凍結融解した精子の奇形率、運動性も測定した。なお、コントロールとして、横斑プリマスロック (以下、横斑と略記) を用い、同じ条件で実験を行った。

(2) オナガドリ PGC の凍結保存に関する研究

受精卵の採取には黄斑及びオナガドリ種鶏を用い、人工授精によって得られた受精卵を実験に供した。供試胚の採取に際して、Hamburger and Hamilton (1951) の形態的特徴をもとに胚を分類し、ステージ 13 - 16 の胚を実験に供した。孵卵した受精卵の胚の周囲を切り出した後、ダルベッコ PBS (-) を満たした時計皿の中に移し、卵黄を除去した。胚の卵黄動脈を破り、出て来た血液 (PGC を含む血球細胞) を、フィコール MEM により密度勾配遠心法で PGC を単離した。PGC の凍結保存溶液には STEM - CELLBANKER (セルバンカーと略記、タカラバイオ株式会社) を用いた。単離した PGC に、セルバンカーを加え、- 80 の冷凍庫で約 24 時間保存した。その後、トリパンブルー染色により凍結融解前後の PGC の生死判別を行った。凍結融解前後の PGC の生存率を、 $\{ \text{陰性 PGC 数} / \text{観察 PGC 数} (\text{陽性 PGC 数} + \text{陰性 PGC 数}) \} \times 100$ で算出し、両種 (オナガドリと黄斑) の結果を比較した。なお、生存率の有意差検定も行った。

(3) オナガドリ受精卵からの ES 細胞の樹立及び凍結保存に関する研究

本実験では、オナガドリ雄から精液を採取し、雌に人工授精して得られた受精卵を材料として用いた。放卵後の受精卵から回収した胚盤葉細胞を準備しておいたフィーダー細胞上に播種した。なお、対照には横斑から回収した胚を用いた。基本培地には Chicken ES Medium (広大院生物圏科学の免疫研究室が開発した培養液) を使用した。

4. 研究成果

(1) オナガドリ精液の凍結保存に関する研究

精液性状検査の結果、全ての検査項目において、月による値の増減はあるものの、日照時間、気温など季節による変化との関連は見られなかった。従って、オナガドリの精液の質については、季節による変動は少ないものと考えられた。年齢との関連について、若い個体で、奇形率が低く、精子密度及び運動性

が高い傾向がみられ、若い個体の方が精液の質は高いことが確認された(図1)。

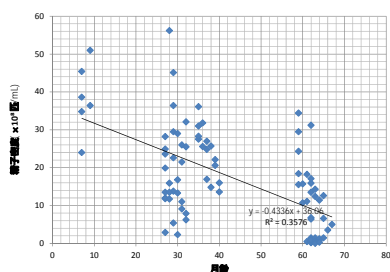


図1. オナガドリの年齢と精子密度との相関

授精試験において、受精卵が得られたのは、横斑精子で、凍結保護剤に MA を用いた区(半量, 全量の両方)のみであり、オナガドリでは受精卵を得ることはできなかった。グリセロール区で受精卵が得られず, MA 区でのみ受精卵が得られたことより、凍結保護剤として MA はグリセロールより有効であることが本実験で確認された。また、横斑で受精卵が得られ、オナガドリで得られなかった理由について考察すると、オナガドリ及び横斑の精子の奇形率・運動性では両者に有意差は認められなかったのに対し、精子密度では、オナガドリが横斑よりも、有意に低い値であった。さらに、オナガドリと横斑の凍結融解後の奇形率、運動性を比較すると、両者に有意差は認められなかったことから、オナガドリと横斑で、受精の有無を分けた要因は、精子数であったと考えられる。今後、凍結保存したオナガドリ精液を用いて受精卵を得るためには、精液の質が高い、若い個体の精液を使用すること、また、精子の濃縮の程度をさらに高めることが必要であると考えられた。

(2) オナガドリ PGC の凍結保存に関する研究

オナガドリと黄斑共に、PGC の採取、凍結保存に成功した。オナガドリ PGC 採取は黄斑に比較して困難であり、得られた PGC 数はオナガドリの方が少なかった。また、凍結融解前の PGC 生存率においては、オナガドリ及び黄斑の両方とも 100% の値を示し、有意差はなかった。一方、凍結融解後の PGC 生存率においては、オナガドリ及び黄斑の値は、それぞれ、5 回の平均値が 66.8% 及び 91.0% であり、オナガドリの方が黄斑に比べ有意に低い値であった(図2)。

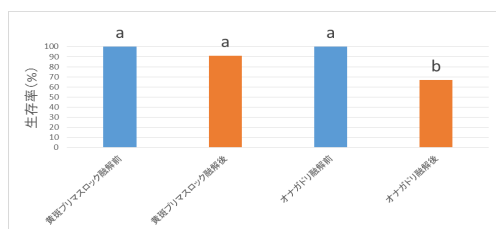


図2. オナガドリPGCと黄斑プリマスロックPGCにおける凍結融解前後の平均生存率の比較
a,b 異なる文字間に有意差有り

これらの結果より、セルバンカーを用いて

PGC の凍結保存が可能であること、また、凍結前の処理において PGC はほとんど死滅しないこと、さらに、オナガドリ PGC は黄斑 PGC に比べて耐凍性が弱いことが明らかになった。今後は、多くの PGC 数を確保するために、より効率的な PGC の採取方法を確立すること、また、セルバンカー以外の凍結保存溶液による生存率も検討する必要がある。さらに、本実験では、凍結保存期間が 24 時間以下の短期間であったため、長期間凍結保存した時の生存率も確認する必要があると考えられた。

(3) オナガドリ受精卵からの ES 細胞の樹立及び凍結保存に関する研究

実験 1 ではニフトリ LIF (chLIF) 添加した培地を用い、オナガドリと横斑プリマスロックの胚盤葉の細胞を培養した結果、初期段階においては未分化の状態に維持されたが、継代培養につれて、分化状態である囊胞性胚様体が出現し、徐々に死滅した。

実験 2 では chLIF, Y-27632 及び U0126 を添加した培地でオナガドリと横斑プリマスロックの胚盤葉細胞を培養した結果、培養したオナガドリの胚盤葉細胞の増殖が良好となり、コロニーの形成もうまくでき、さらに長期・安定的な培養ができた(図3)。

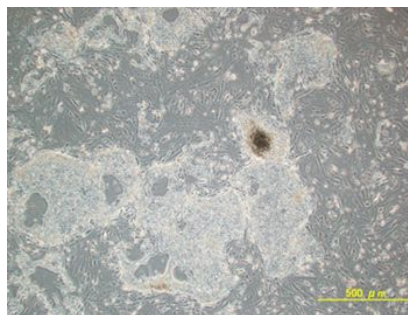


図3. 継代培養後、形成されたコロニー (ES細胞)

実験 3 では chLIF, Y-27632 及び U0126 添加した培地を用い、37 日まで培養したオナガドリと横斑プリマスロックの細胞を凍結保存した。本実験で、セルバンカーを用い、両種の胚盤葉細胞を 4 日間凍結保存した。融解した細胞を再培養した後、ほとんどの細胞が生存し、細胞増殖も良好であり、コロニー形成も保持され、凍結保存前後、細胞の増殖状態がほぼ変わらなかった。

実験 4 では培養 3 日目及び融解後 20 世代まで培養したオナガドリの胚盤葉細胞の多能性マーカー Nanog と生殖系列マーカー Vasa の免疫染色をした。その結果、両種の細胞に Nanog と Vasa の陽性反応が認められ、凍結保存前後のいずれにおいても、細胞が多能性を維持していると考えられた。

これらの結果より、chLIF と阻害剤 Y-27632, U0126 を添加した培地を用いる方法は、オナガドリなどの希少家禽の ES 細胞の樹立に有効な方法であると考えられた。また、本実験では、培養 43 日(20 世代継代培養)の胚盤

葉細胞の多数に Vasa と Nanog 陽性が確認できたことから，培養したオナガドリ胚盤葉細胞が多能性（生殖細胞にもなりうる能力を含む）維持している可能性が高いと考えられた。さらに，凍結保存後の ES 細胞のコロニー形成能は保持されたことから，本実験の ES 細胞の保存方法は有効方法であると考えられた。

本研究においてオナガドリの受精卵から多能性を維持した ES 細胞が樹立できた。また，凍結保存の生存性と ES 細胞再形成も確認できた。従って，胚盤葉細胞と始原生殖細胞の保存とともに ES 細胞の保存も希少家禽の遺伝資源の保護に有効な手段になりうると考えられた。

<引用文献>

都築政起.土佐はニワトリ王国 - 土佐で作られたニワトリ達 - . 土佐史談, 233: 1-25, 2006.

Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morph, 88: 49-92. 1951.

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）

〔学会発表〕(計 1 件)

孫茜・江崎僚・堀内浩幸・前田照夫．オナガドリ胚盤葉細胞からの ES 細胞の樹立と保存に関する研究 .日本家禽学会 2015 秋季大会．酪農学園大学．2015 年 9 月 10 日．

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 照夫 (MAEDA, Teruo)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号：5 0 1 4 4 8 9 5

(2)連携研究者

都築 政起 (TSUDZUKI, Masaoki)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号：7 0 2 1 2 0 5 8

堀内 浩幸 (HORIUCHI, Hiroyuki)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号：8 0 2 4 3 6 0 8

河原 秀久 (KAWAHARA, Hideyuki)
関西大学・化学生命工学部・教授
研究者番号：1 0 2 3 4 1 0 5