

F-3 希少野生動物の遺伝的多様性とその保存に関する研究

(2) 希少野生動物の生息域外保全および増殖技術に関する研究

② 希少野生動物の遺伝子の保存・利用手法の開発

研究代表者：早稲田大学人間総合研究センター研究員・教育学部教授 石居 進

研究者：早稲田大学人間総合研究センター

研究員：石居進、木村一郎、飯野徹雄、並木秀男

客員研究員：菊地元史、浦野明央、小野珠乙、柿沢亮三、金子良則、
佐藤英明、酒泉満、塩谷康生、田辺興記、近辻宏帰、
成島悦雄、藤原昇、米田正明、渡辺信、小野里担、
和田勝、若林修一

研究協力者：居在家義昭、菊地和弘

平成5-7年度合計予算額 21,151千円

(平成7年度予算額 5,854千円)

(要旨) 日本に現存する2羽のトキが死亡した際に、その器官の組織を凍結保存、また細胞を生かしたまま冷凍保存するための準備をととのえた。たまたま中国から借用していた雄のトキおよび日本の雄のトキ、ミドリが死亡したので、その精巣、肝臓、腎臓の細胞、また肝臓、腎臓、胸筋などの組織のを冷凍保存した。鳥の生殖腺の機能を非侵襲的に調べる方法や、ホルモンで鳥に排卵をおこさせる方法を開発した。また、始原生殖細胞の移植によって、生殖腺の種間キメラをつくり、ある種に属する鳥を他の種の個体を用いて再生する方法を検討中である。

キーワード：トキ、細胞、組織、冷凍保存、肝臓、腎臓、生殖腺、ホルモン

1. 研究目的

地球上の長い生命の歴史において、生物は時と共に分化し多様性をましてきた。すなわち、絶滅する種の数を上回る新たな種が生じてきたのである。しかし、現代文明の急速な発達は自然環境に大きな影響を与え、これまでになかったように急速な生物種の絶滅を引き起こしつつある。このようにして、絶滅したり絶滅に瀕している種の中には、人類にとって、学問的に、あるいは実用的に重要な遺伝情報が多数含まれている可能性がある。こういった状況下で、我々がなすべきことは、どうしても絶滅を防ぐことができない種や絶滅の可能性が高いと予想される動物種では、その種に含まれている色々な遺伝情報を保存し、将来の学問的研究や、実際的な応用に備えておくことであろう。日本ではトキがすでに日本産の個体が2頭になってしまっている上に、中国の生存個体数も数十に減少してしまっている。このような状況では、まずはトキの細胞や遺伝

子を保存しておくことは緊急であり、これを行うのが本研究の目的である。

2. 実施状況

2-1 日本産雄のトキ（ミドリ）と中国から借りていた雄のトキ（ロンロン）の細胞、組織の保存

日本に残っているトキ（*Nipponia nippon*）は本研究が発足した平成5年度には2個体であった。そこで我々はこれらの個体が死亡した際にはその細胞や組織を前者は凍結防止剤とともに生きたまま、後者は凍結させて、液体窒素中で保存する計画を立てた。初年度にはトキの仲間の他の種類の個体を用いた予行演習の成果をもとに、そのためのマニュアルを作成した。平成6年度にはたまたま中国から借りていた1対の中国産トキのうちの雄の個体が死亡し、その細胞と組織とを保存した。また、平成7年度には日本最後の雄の個体であるミドリが死亡し、その細胞と組織の保存を行った。以下にその概要を述べる。

ロンロンについては死亡（1994年12月13日午前10時14分）後、ただちに氷で冷やして東京まで運搬し、18時44分から19時21分にかけて精巣、肝臓、腎臓はその1部を切り出して細胞の保存に、胸筋、肝臓、腎臓の1部および脳下垂体は組織の保存に用いた。ミドリについては死亡後、解剖までトキ保護センターの冷蔵庫内に保存した。細胞の保存は肝臓、腎臓、精巣、皮膚について行なった。組織の保存は副腎以外のほとんどすべての臓器について行なった。

ロンロンの細胞の場合は、19時55分頃から作業を開始し、多量のダルベッコ磷酸緩衝液（-）（D-PBS（-））、pH7.4、中で臓器の皮膜ならびに脂肪を取り除いた。その後、眼科鉗で臓器を1~2mm³に細切しながら、臓器内に含まれる血球を除くためにD-PBSで約10回程度洗浄した。表1に示すように、細胞分散用の酵素はD-PBS（-）にトリプシン（シグマ）あるいはコラゲナーゼ（和光純薬）を0.2%濃度になるように溶解後、濾過滅菌したものを用いた。細切した臓器を消化フラスコに移し、肝臓と腎臓はトリプシン溶液、精巣はコラゲナーゼ溶液をそれぞれ200ml消化フラスコに入れ、約32℃で細胞片がほぼ消化されるまでスターラーで攪拌した（表1）。

細胞の分散終了後、ステンレス製メッシュで濾過した細胞懸濁液を、50mlの尖底試験管に分注し、1,000回転で10分間遠心分離した。その後、上清を吸引除去後、10%牛胎仔血清添加D-MEM培養液（ギブコ）（100IU/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシンを含む）を肝臓と腎臓には120ml、精巣には20mlずつ加えた。ピペティングで遠心管底の細胞を均一に懸濁した後、20%DMSO（デメチルスルホオキシド）を含む10%牛胎仔血清添加D-MEM培養液を、前述したそれぞれの臓器ごとの培養液と等量となるように攪拌しながら加えた。

表1 ロンロンの細胞の分散の条件

臓器の種類	重量	細胞分散用酵素	分散処理時間
肝臓	約3g	0.2%トリプシン	4時間
腎臓	約3g	0.2%トリプシン	3時間
精巣	約2g	0.2%コラゲナーゼ	3時間5分

DMSOを添加した細胞懸濁液は、クライオチューブに肝臓と腎臓は1.5ml、精巣は1mlずつ分注し、5℃に冷却した。クライオチューブに分注して5℃に保ったまま、農業生物資源研究所に搬送した。トリパンプルー染色液にて細胞の生存率と細胞数を計測した(表4)。クライオチューブに分注された細胞は専用ラックに収納後、発泡スチロール容器に入れ、-80℃のフリーザーで予備凍結した。約30時間経過後、-196℃の液体窒素容器に入れて永久保存用とした。

ミドリの細胞についてもほぼ同様な方法を用いた。ただミドリの細胞については、推定死亡時間(4月30日5時45分頃)から約9時間経ってから、作業を開始し細胞懸濁液の作製後、直ちに(23時30分)現地(トキ保護センター)で予備凍結(-80℃)を行い、翌日の13時30分に-196℃の液体窒素容器にいれ、後(5月18日)に容器ごと農業生物資源研究所に搬送し、同研究所の大型液体窒素容器に移し保管した(表2)。

表2 液体窒素で保存したロンロンの細胞

臓器名	色別	ケーン数	チューブ数	容量
肝臓	ピンク	16	80	1.5ml
腎臓	黄色	17	84	1.5ml
精巣	水色	4	20	1.0ml

組織保存

ロンロンについては胸筋、肝臓、腎臓については解剖鉢で細片にして、脳下垂体はそのままクライオチューブにいれ、チューブごと液体窒素中で凍結させ、保存した。

またミドリについては胸筋、甲状腺、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、脳下垂体、眼球、舌および気管、脂肪体、血球、脳、腸管、精巣、肺臓、腎臓を細片にして、もしくはそのまま、液体窒素で凍結させ保存した(表3)。また上記の大部分の組織はその小片をホルマリンで固定した。

細胞や組織の保存作業は東京で行ったばあいも、佐渡で行った場合も、一応、順調にいった。動物の死亡後、解剖が始まるまでの時間もほぼ同じ(約9時間)だった。ただ佐渡で作業中に保存して会った培養液が腐敗していることに気がつき、固形のを溶解して使用しようとしたが、トキセンターには充分量の蒸留水が無く、薬局から購入した。保存してある物品については時々検査して、使用可能であることを確かめておく必要がある。

表3 液体窒素で保存したミドリの組織

臓器名	記号	キャニスター番号	ラベルの色	文字の色	チューブ数
消化管	A T	1	黄	黒	20
血球	B C	1	白	緑	2
脂肪体	F T	1	白	緑	1
心臓	H R	2	白	緑	2
肺臓	L N	2	白	黒	7
肝臓	L V	3	青	黒	36
脳下垂体	P T	1	白	赤	1
血漿	P L	2	白	赤	1
甲状腺	T H	2	白	赤	1
精巣	T S	1	白	青	1
脾臓	S P	2	白	青	1
胆嚢	G B	1	白	青	1

2-3 ロンロンおよびミドリの細胞の培養

トキ「ロンロン」の肝臓、腎臓および精巣細胞の細胞株化に向けた基礎資料を得るために継代培養を実施した。

培養条件は、シロトキとショウジョウトキ交雑種の同種臓器細胞の経過をふまえ、培養液は10%牛胎仔血清添加TCM199培養液（ギブコ）に100IU/mlペニシリンならびに0.1mg/mlストレプトマイシンの抗生物質を添加したもので、37℃、炭酸ガス培養器（5%CO₂、95%空気）を用いて継代培養した。凍結前のロンロンの細胞の生存率は表4のようであった。

最初に、12月14日4時に早稲田大学より持ち帰った細胞を新鮮な培養液と交換するために、それぞれの臓器の分散細胞液2mlを15mlの尖底試験管にとり、培養液10mlを添加して混和後、遠心分離して上清を吸引除去し、2mlの培養液を加えて細胞を分散させた。細胞調整後の初代培養は培養表面積が1.9cm²の4ウェルマルチデッシュ（ヌンク）に1ml細胞培養懸濁液/ウェルで開始した。培養液の交換は2~3日間隔で行った。2代目以降の継代培養では原則として、培養表面積が3.8cm²の24マルチウェルデッシュ（コーニング）を用いた。

表4 凍結前のロンロンの細胞の生存率と細胞数

臓器名	細胞生存率 (%)	細胞数 ($\times 10^6/ml$)
肝臓	5.3	8.5
腎臓	6.3	2.5
精巣	4.7	3.5

なお、ウエルの80%以上が増殖した培養細胞で占められた状態をコンフルエントになったと判断し、植え変えを実施した。植え変えに際しては、D-PBS(-)に溶解した0.2%トリプシン溶液を37℃に加熱し、培養液を除去したウエル内に1~2ml加えて10分間炭酸ガス培養器内で保持した。その後底面を軽くピペッティングして底面の細胞を剥離して、尖底試験管に移し、等量の培養液を加えて酵素反応を停止させた。その後常法により遠心分離し、細胞数を調整後、再び適量の培養液を加えて細胞培養を継代した。

肝臓細胞の増殖能は非常に遅く、培養開始日をDay0としてDay5にようやく繊維芽様細胞が増殖を開始し、培養開始後14日目でコンフルエントとなった。2代目は24マルチウェルデッシュュを用い、その8ウェルに細胞を培養液3mlで継代した。3代目以降の継代時からは1ウェルの細胞を4ウェルに継代する方法をとり、他の細胞は凍結保存した。しかしながら、肝臓細胞の増殖能は依然として低く、5代目における増殖能は低く、ネクローシス細胞が見いだされたので、2ウェルの細胞を1ウェルに濃縮し、培養液を交換しながら増殖能を観察したが、増殖は停止したので、培養開始後86日目で継続培養を打ち切った。

腎臓細胞も肝臓細胞と同様にその増殖能は低かった。当初は繊維芽細胞様の細胞が多数を占めていたが、Day14には少なくとも2種類の細胞が混在していることが明らかとなった。腎臓細胞は円形細胞の周囲を繊維芽様細胞が取り囲む形、いわゆるドームを形成して増殖するタイプが多かった。しかし継代培養は5代目までであり、ネクローシスを起こす細胞が多数を占めたので、細胞の濃縮や培養表面積を小さくするなどの手段をこうじた。しかし、それ以上の増殖は認められなかったので、培養開始後90日目で打ち切った。

精巣細胞の増殖能は肝臓や腎臓細胞に比べて非常に高く、Day2で繊維芽様細胞の活発な増殖が認められた。継代培養の間隔も4日前後であり、その生存能は高く保たれていると考えられた。分散した精巣細胞に精子は認められなかった。これは非繁殖季節であったためと思われたが、培養を継代する内に、繊維芽様細胞に軽く付着して生存している細胞が多数認められた。一般的に生殖系列細胞はシャーレ面に付着しないとされているので、これらの細胞はセルトリ細胞、精祖細胞あるいは精母細胞どの精子形成に関与する生殖系列細胞である可能性が非常に高いものと推察された。現在、これらの細胞の分別染色などについて実験を進行中である。しかしながら、鳥類や哺乳動物の体外培養系における精子形成に関する知見は乏しく、とくに減数分裂により精子細胞に至る細胞培養系は確立されていない。しかしながら、精子細胞になれば精子に至らなくても、顕微授精によりマウスなどでも産仔を得ている。そこで、凍結保存してある精巣細胞を用いた詳細な基礎研究が必要であるものと考えられる。

染色体分析

凍結保存した3代目精巢細胞を融解し、前述した24マルチウエルの1ウェルに培養を開始し、3日後に染色体分析用の処置をした。即ち、コルセミドを最終濃度が $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように培養液に添加して、4時間培養した。その後、0.2%トリプシン溶液を加えて細胞を浮遊させ、0.075 KCl溶液で細胞を軽く洗浄し、1,000回転5分の遠心分離を行った。上清を廃棄し、0.075 KCl低調液を2ml加え、15分間静置した。カルノア固定液で細胞を固定し、固定液で洗浄しながら遠沈を3回繰り返した。細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下して染色体を拡散させた。その後ギムザ染色を施して、トキ「ロンロン」の染色体を分析した。

鳥類の染色体は一般に数が多く、多数の微小染色体を含むので、正確な核型分析は困難である。今回作成した染色体標本は $2n = 68$ であり、転座などの染色体異常はとくに認められなかった。ロンロンは雄であることから性染色体は $z z$ であり、6番目に位置していた。

2-4

糞中の性ステロイドホルモンの測定により、卵巣や精巢の活動状況を推定する方法

絶滅に瀕した鳥類を飼育下で繁殖させる際に、それぞれの個体の生殖腺がどのような状態にあるかを知ることは重要である。しかし直接開腹して生殖腺を観察することには問題があり、はばかられることが多い。一般には血液を採取してその中の生殖腺刺激ホルモンや生殖腺から分泌される性ステロイドホルモンの濃度を測定して、生殖腺の状態を推定する方法が用いられている。しかしこれも採血という作業が必要で、鳥にストレスを与えたり、捕獲作業で体に損傷を与える可能性があって、問題がある。このようなことから、我々は非侵襲的な方法で生殖腺の状態を推定する方法の開発を行った。すなわち鳥類は尿を糞と一緒に排泄するので、糞中の性ステロイドホルモンを測定して、生殖腺の状況を推定する方法を開発した。

また我々は同時に、ホルモン投与によって卵巣が退縮している鳥に卵成熟、排卵、産卵をおこさせる方法の開発も行った。以下に上記2つの問題について述べる。

材料としては雌雄の成体のニホンウズラを用いた。飼育は短日（8時間照明16時間暗黒、8L:16D）または長日（14時間照明10時間暗黒、14L:10D）の人工照明下で行い、市販の鶏用の餌と水は常に自由に摂取できるようにした。糞の採取に当たっては床にポリエチレンのシートをひいておいた。

糞中の性ステロイドホルモンを測定するには、糞を水で十分に抽出し、抽出液を試料として放射免疫測定法を用いた。血液中の性ステロイドホルモンも、放射免疫測定法で測定した。血液は翼下静脈から採取し、遠心分離で血漿をとり、それを試料とした。

長日条件で飼育していて、生殖腺が発達している成体の雌雄のニホンウズラの糞と、生殖腺を外科的に切除したニホンウズラの糞とで、その中の発情ホルモン（ $\text{Estradiol-17}\beta$ ）、黄体ホルモン、雄性ホルモンの濃度を比較した。生殖腺を除去すると糞中の性ステロイドホルモン濃度は検出されないか、非常に僅かになる。次に短日条件から長日条件に移した場合には、血

液中の性ステロイドホルモン濃度が上昇するとともに、糞中の濃度も上昇して、血液中の性ステロイドホルモン濃度は、糞中のステロイドホルモン濃度に反映されていることが明らかとなった。また産卵している雌のニホンウズラでは排卵時に糞中の黄体ホルモン濃度が上昇することも確かめられた。

2-5 人為的に排卵・産卵を誘起する方法

野生動物はほとんどの種で、特定の繁殖期が存在し、その時期以外には雌では排卵、ひいては妊娠や産卵がおこることはない。雄でも精子形成や交尾行動は繁殖期でないと行わない。希少動物において、卵や精子を必要なときに採取できればその保存や人工交配に極めて便利になる。哺乳類ではホルモン処理によって排卵をおこさせる方法はほとんどの種で成功していて、実際にも応用されている。

鳥類においては家禽のニワトリやニホンウズラにおいてもホルモンによる排卵誘起は不完全なかたちでしか成功していなかった。すなわち、卵巣が発達した状態のニワトリにホルモン処理で排卵をおこすことはできる。また、非繁殖期の状態（卵巣が小さくなっている）にした卵巣をもつニワトリで、ホルモン処理で卵巣を発達させることはできる。しかし、ホルモン処理で卵巣を発達させて、さらにその個体で排卵をおこさせるには、誰も成功していなかった。

我々は短日状態（24時間周期の人工照明下で飼育し照明している時間が暗黒の時間より短い状態）の雌ウズラを材料として、まず浸透圧ポンプ（動物の体内に入れて、浸透圧によって内容物が定量的に流れ出る装置）を用いてニワトリの脳下垂体抽出物（生殖腺刺激ホルモンを主体とする）を連続的に与えた。すると、雌ウズラの卵巣は発達し、多数の（正常より多い数の）成熟卵が生じた。しかし、排卵はおこらなかった。

そこで、このように浸透圧ポンプによって脳下垂体抽出物を与え、卵巣を発達させた雌ウズラに、さらに同じ脳下垂体抽出物を1日に1回注射した。毎日産卵をしている正常なウズラやニワトリの雌の体内では脳下垂体から生殖腺刺激ホルモンが1日1回、大量にかつ一過的に分泌されていて、それが排卵を引き起こしていることが分かっているので、これを人為的にひきおこした訳である。すると、約50%の雌で排卵、ついで産卵が誘起された。ホルモンを与えなかった対照群の雌ウズラはすべて卵巣が未発達な状態で排卵した個体はなかった。

このような方法でホルモン処理したウズラの雌と正常な雄と交尾させたところ、7個の卵が得られ、それを孵卵器に入れて孵化を試みたところ、2個が孵化し正常な雄が2頭えられた。そのうちの1頭は他の正常な雌と交配させて受精能力があることを確かめた。

このように、この浸透圧ポンプと注射の両方を組み合わせて、ニワトリの生殖腺刺激ホルモンを与えれば、少なくともウズラでは排卵と産卵が誘起できることが明らかとなった。この方法を利用すれば、哺乳類で用いられているように、鳥類でもホルモンで人為的に排卵をおこさせ、その卵を人工繁殖などに用いることが可能であることが明らかとなった。