

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及び増殖技術に関する研究
③ 家畜繁殖技術の野生動物への応用

研究代表者 農林水産省 畜産試験場 塩谷康生

農林水産省畜産試験場

繁殖部 胎生発育研究室 塩谷康生・細江実佐
繁殖第1研究室 柘田博司・渡辺伸也
生殖細胞移植研究室 富塚常夫・小島敏之・志水学・居在家義昭

農林水産省生物資源研究所

遺伝資源第二部 動物保存研究チーム 居在家義昭・菊池和弘・野口純子

平成5-7年度合計予算額 11,010千円
(平成7年度予算額 3,223千円)

[要旨] 希少野生動物絶滅を阻止するためには、生息域内における保全対策に加え、生息域外で保全し、増殖させることが必要である。家畜における繁殖技術を野生動物の保存と増殖に応用することを検討する。

ニホンシカ(*Cervus nippon*)及びニホンカモシカ(*Capricornis crispus*)の精子を牛精液用保存液で希釈して、5℃に冷却後、0.5mlストローに封入して液体窒素蒸気で凍結した結果、融解後の精子生存性はきわめて良好であった。動物園で死亡したコアラの精巣上体から生存精子が採取できた。

タンマー・ワラビー(*Tanner Wallaby, Macropus eugenii*)の胚の発育休止機構を哺乳動物胚の常温保存に応用する目的で、発育休止期の子宮より採取した子宮内膜細胞上での牛胚盤胞期胚の培養を試みたが、胚の発育休止はみられなかった。

3頭の雌カモシカから卵胞切開法によって計70個(9~41)、その後に細切することによって30個(7~12)の卵子が得られた。卵丘細胞層に囲まれた卵子は50個であり、50個は卵丘細胞層を欠いていた。成熟培養後の検査では成熟率が低かった。牛の体外受精に準じて精子処理を行って媒精した結果、精子侵入卵が得られたが、卵割卵は得られなかった。有害駆除のカモシカの精巣、卵巣を採取して、体外受精が可能であるが、そのためには速やかに体内から卵巣を取り出すことが重要であることが示された。

鶏精子を用いて鳥類精子の凍結用保存液について検討した結果、修正レイク液を用いた場合、グリセリン除去操作を行わなくても高い精子生存率及び受精率が得られた。ヤマドリ精子はレイク液、修正レイク液およびP液を用いた場合、凍結融解2時間後まで精子の正常が比較的良好に保たれた。

[キーワード] 野生動物、精子、卵子、凍結、野鳥

(1) ニホンシカおよびニホンカモシカの精子の凍結

農林水産省畜産試験場繁殖部第1研究室 柘田博司

(現岩手大学農学部)

1. 序

野生動物がある程度の個体数にまで減少すると、種内の遺伝的多様性の低下により生殖障害や生存率の低下が起り、そのことが絶滅を加速している可能性がある。希少野生動物絶滅を阻止するためには、生息域内における保全対策に加え、生息域外で保全し、増殖させることが必要である。家畜では人工授精による増殖技術が発達し、特に牛では1射出精液で100頭以上の雌牛に授精することが可能であり、20年間凍結保存された精液により産子も得られている。家畜におけるこの技術は野生動物の保存と増殖に十分応用できるものと考えられる。

2. 研究目的

ニホンシカ(*Cervus nippon*)は動物園で飼育されており、精液採取に用いることが比較的容易である。またニホンカモシカ(*Capricornis crispus*)は特別天然記念物であるが、生息数調整のために有害駆除されている。また貴重な動物園動物は事故死などの際に有効利用されているとはいえず、焼却されることが多い。これらの死亡個体からの精子の利用法について検討した。

3. 研究方法

ニホンシカの精子はキシラジン麻酔下で電気刺激法により、5頭の雄シカから採取した。電気射精装置は山羊・羊用に試作されたもので、電極プローブは長さ280mm、径22mmで、先方部に4個の電極リング(幅9mm)が19mm間隔で配置されたものである。5~10ボルト、0.05~0.107アンペアの交流を3~5秒づつ5~10秒間隔で通電することによって射精された精液を採取した。採取精液は牛に準じた法に従って検査を行った。

凍結用希釈液には牛精子用に開発した希釈液を用いた(表1)。精液はNF3のA液で第1次希釈を行った後、5℃まで2~3時間を要して冷却した。第1次希釈シカ精液は3時間後にB液で第2次希釈を行った。希釈精液は0.5mlストローに封入して凍結した。凍結は発泡スチロール製の箱(155mm x 245mm x 155mm)で行った。液体窒素を深さ約50mmまで入れ、これにストロー架台を入れて、ストローを横置きに並べた。液体窒素の表面からストローまでの距離は30~40mmとした。蓋をして10分放置後、ストローを液体窒素に浸漬して、凍結を完了した¹⁾。凍結精液の融解は40℃の水中で行った。融解した精液は小試験管に移し、37℃の恒温水槽内で180分培養して、経時的に精子の生存率及び活力を顕微鏡下で観察した。

ニホンカモシカの場合は、捕獲殺後数時間経過した6頭の雄の死体から精巣を採取し、4~5℃で当場の実験室に持ち帰り、精巣上体から灌流することによって、精子を採取した。捕獲から精子の収集までは12~15時間が経過した。採取した精巣上体精子はシカと同様にNF3のA液で第1次希釈し、冷却し、さらに16~18時間後に第2次希釈を行って、シカと同様に凍結した。

動物園動物の材料は死亡後5℃で保存してあったコアラの精巣で、15時間後に横浜市金沢動物園から提供されたものを用いた。実体顕微鏡下でニホンカモシカと同様な方法で精巣上体精子を回収した。凍結に際しては、豚(GLR)、牛(NF3)、鶏(レイク)¹⁾の精子用希釈液で希釈後、0.25mlストローに封入して凍結した。

4. 実験結果

ニホンシカに吹き矢で麻酔剤を打ち込み、捕獲した5頭から電気刺激法により精子採取を試み、3頭から射出精液が得られた。精液は黄色ないし褐色で、0.1~0.3mlであった。凍結前及び凍結・融解後精子生存性は表2に示した。凍結前の精子生存率は50~60%で、活力は+++であった。凍結・融解直後の生存率は35+++から45+++であり、67~70%の回復率であった。融解後37℃保存においては、時間の経過による精子生存性の低下は緩慢であり、凍結精液として利用可能であることが示された。

供試したカモシカの精巣重量は16.3~33.4gで、平均21.6gであり、左右で多少の差がみられた。採取時の精巣上体精子の活力は個体間に著しい違いがみられたのみでなく、同一個体でも左右の精巣上体により著差のある個体が見られた。

凍結・融解後の精子生存性は表3に示した。融解直後の精子生存性は凍結前とほとんど差がなく、耐凍能はきわめて良好であった。37℃保存における生存性の低下も緩やかであった。

死亡したコアラから、15時間後に実体顕微鏡下で精巣上体から精子を灌流採取した。1.5x10⁷/mlの精子浮遊液0.2mlが収集された。精子の生存率は約30%であった。凍結融解後の生存率はいずれの希釈液でも数%であったが、活力はGLRおよびレイクにおいてNF-3よりも良好であった。

5. 考察

表1 NF-3希釈液の組成(100ml中)

試薬類	A	B
クエン酸ナトリウム	1.44g	1.20g
リン酸2ナトリウム	0.17	0.14
リン酸1カリウム	0.04	0.03
酒石酸カリナトリウム	0.08	0.07
ぶどう糖	2.12	1.77
乳糖	0.42	0.35
グリセリン	-	14.0ml
卵黄	15.0ml	15.0ml

表2 ニホンシカ精子の凍結・融解後の生存指数

サンプル No	凍結前	融解後の37℃保存時間(分)				
		0	30	60	120	180
1	60.0	40.0	40.0	26.3	22.5	12.5
2	50.0	35.0	35.0	15.0	15.0	5.0
3	60.0	45.0	35.0	26.3	12.5	5.0
4	50.0	30.6	26.3	9.4	7.5	7.5
5	55.0	30.6	26.3	12.5	12.5	3.8

表3 ニホンカモシカ精子の凍結・融解後の生存指数

サンプル No	凍結前	融解後の37℃保存時間(分)				
		0	30	60	120	180
1	35.0	35.0	26.3	26.3	22.5	7.5
2	35.0	35.0	35.0	35.0	26.3	12.5
3	30.0	30.0	30.0	22.5	15.6	5.0
4	39.4	39.4	30.0	26.3	15.6	10.0
5	30.0	30.0	30.0	22.5	15.6	10.0

ニホンシカの精液は、麻酔下で電気射精装置を利用することによって、個体に障害をあたえることなく容易に採取できた。採取時期の11月は繁殖季節であったが、射精液量は山羊や羊と同様に少なかった。採取時の精子の生存率は60%前後であり、非家畜の精液としては平均的と考えられる。第2次希釈後はグリセリン平衡を行わずに直ちに凍結したが、融解後の精子生存性はきわめて良好であった。このことはニホンシカ精子の場合も牛とまったく同様に、グリセリン平衡時間はほとんど必要ないことを示している。融解後37℃保存時の精子生存性の低下は緩やかであり、ニホンシカの精子は牛精子の凍結法とまったく同じ方法で凍結保存できることが示された。高岸ら²⁾はホンシュウシカの精液を卵黄クエン酸緩衝液で希釈して凍結することにより良好な精子生存性を得ている。

死後数時間経過したカモシカの死体から摘出した精巣を5℃で輸送して、死後15時間前後で採取した精巣上体精子は凍結・融解後も良好な生存性を示した。この結果は死後数時間経過した個体からでも凍結保存可能な精子が得られることを証明している。カモシカの精子は第1次希釈後5℃で16~18時間放置してから第2次希釈を行い、凍結したが、融解後の生存性は良好であった。牛精子を凍結する際に5℃放置時間を18~20時間長くすると、凍結後の精子生存性が向上することが明らかにされている³⁾ことから、同様な現象がカモシカ精子でも起こることが推察される。

凍結後の生存性は良好でなかったが、動物園で死亡した個体から生存精子が得られたことは、今後種の保存や遺伝的多様性の確保に一つの方法を提供したものと考えられる。今回用いた動物の精子は凍結が可能であることが示されたが、それらが個体にまで発生する能力を有しているかは、授精試験を行う必要がある。その点で今回の研究は途中経過的な報告になっており、今後同種の生きている雌動物に授精して個体を得られるかどうかの問題の検討が残された。

6. まとめ

ニホンシカ(*Cervus nippon*)及びニホンカモシカ(*Capricornis crispus*)の精子を牛精液用保存液で希釈して、5℃に冷却後、0.5mlストローに封入して液体窒素蒸気で凍結した結果、融解後の精子生存性はきわめて良好であった。動物園で死亡したコアラの精巣上体から生存精子が採取できた。

7. 本研究により得られた成果

野生動物の精子が家畜と同じ方法で凍結保存できた。

8. 参考文献

- 1) 梶田博司、家畜精子の凍結保存法、農林水産動物遺伝資源の長期保存法マニュアル、農林水産省畜産試験場(編)茨城県荖崎町(1989)
- 2) 高岸聖彦・塚本絵里子・腰本知大・渡辺茂樹・三宅正史・内海恭三・入谷明、野生動物精子の凍結保存、人工授精研究会誌、8:104-106(1986)
- 3) 梶田博司・渡邊伸也、凍結前の5℃保存時間が凍結・融解後の牛精子の生存性に及ぼす影響。繁殖技術研究会誌13:100-104(1991)

国際共同研究等の状況 特になし。

研究発表の状況 塩谷康生・梶田博司・渡邊伸也、ニホンカモシカの体外受精、日本畜産学会第90回大会講要 p.118(1995)

(2) タンマーワラビーの子宮内膜細胞単層上での牛胚の培養

農林水産省畜産試験場繁殖部生殖細胞移植研究室 志水学

1. 序

オーストラリアに棲息するタンマーワラビー(*Tanner Wallaby, Macropus eugenii*)は、有袋類とくにカンガルー類の生殖生理を究明し、その数をコントロールするうえで貴重な生殖内分泌学的なデータを提供している。有袋類の胚を体外で長期保存する試みは、今ま

表1.タンマー・ワラビー子宮内膜細胞上での牛胚の培養

	胚の ステージ	供試 胚数	発育 胚数	退行 胚数
共培養	桑実胚	2	1	1
	胚盤胞期胚	3	2	1
対照	桑実胚	2	1	1
	胚盤胞期胚	3	3	0

で幾度か行われてきたが成功するに至っていない。いっぽうワラビーは腹嚢内に胎子が存在するとき、その吸乳刺激によって胚の発育を単層胚盤胞期で休止させ、長期間子宮内に保持することができる。この発育休止機構を他の哺乳動物の胚に応用できれば、凍結させることなく胚の長期保存が可能になる。

2. 研究目的

タンマーワラビー胚の休止機構に注目して、哺乳動物胚の常温での長期保存の可能性を検討した。

3. 研究方法

実験材料であるタンマー・ワラビーはオーストラリア・ニューキャッスル大学で保有しているコロニーの個体を使用した。胚発育休止期にあるワラビーの子宮より内膜組織を採取し、トリプシン-EDTAで細胞を分離してTCM199+10%FCS内で培養した。これらの細胞を10% DMSO, 10% FCS加TCM199中で凍結し、日本へ持ち帰った。食肉処理場由来の牛卵巣より卵子を採取し、Shioya¹⁾の方法に従って体外受精胚を作成した。Day6およびDay7のウシ桑実期胚、胚盤胞期胚を、TCM199+10%FCS中で単層を形成させたワラビー子宮内膜細胞上で48時間共培養して、胚の発生への影響を調べた。

4. 実験結果

胚発育休止期のタンマー・ワラビーの子宮内膜細胞と共培養した。Day6およびDay7の牛桑実期胚及び胚盤胞期胚において、発育休止を示す胚は得られず、また、48時間後に発育している胚の割合は、共培養していない胚と比べて有意な差は見られなかった(表1)。

5. 考察

タンマー・ワラビーはカンガルーの仲間の中では比較的小型であり、カンガルー類の研究を行う場合、一般的に用いられる動物である。また胚の発育休止機構を解明することは哺乳動物胚の長期保存法を検討する上で非常に有効であると思われる。胚発育休止期のタンマー・ワラビーの子宮内膜細胞と牛胚との共培養では、胚の発育休止は起こらず、単に一緒に培養しただけでは発育休止効果はないことがわかった。タンマー・ワラビーの発育休止・再活性化には子宮内膜より分泌される血小板活性化因子の関与²⁾が示唆されており、胚の発育休止の誘起には、それらの要因も含めて新たな方法を検討していく必要があると考えられる。

6. まとめ

タンマー・ワラビーの胚の発育休止機構を哺乳動物胚の常温保存に応用する目的で、発育休止期の子宮より採取した子宮内膜細胞上での牛桑実期胚および胚盤胞期胚の培養を試みたが、胚の発育休止はみられなかった。

7. 本研究により得られた成果

タンマー・ワラビーのような貴重な動物園動物が家畜の胚研究に利用できる可能性が示された。

8. 参考文献

- 1) SHIOYA, Y、Calf production by in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. JARQ. 26, 287-293, (1993)
- 2) 小島敏之、有袋類タンマーワラビーの胚の in vitro での発育に及ぼす内因性血小板活性化因子の役割、哺乳動物卵子学会誌、11, 95, (1994)

国際共同研究等の状況 個別重要研究で対応。

研究発表の状況 小島敏之、有袋類タンマーワラビーの胚の in vitro での発育に及ぼす内因性血小板活性化因子の役割、哺乳動物卵子学会誌、11, 95, (1994)

(3) ニホンカモシカの体外受精

農林水産省畜産試験場繁殖部胎生発育研究室 塩谷康生

1. 序

野生動物がある程度の個体数にまで減少すると、種内の遺伝的多様性の低下により生殖障害や生存率の低下が起こり、そのことが絶滅を加速している可能性がある。希少野生動物絶滅を阻止するためには、生息域内における保全対策に加え、生息域外で保全し、増殖させることが必要である。

家畜では食肉処理場で処理された牛、豚、緬山羊から卵巣を集め、卵巣にある未成熟卵子を採取して、体外で成熟、受精させ、胚を得て、受精卵移植することにより個体を生産する技術の開発が進んでいる。家畜におけるこれらの技術は繁殖生理や通常の性周期などが明らかでない野生動物の保存と増殖に十分応用できるものと考えられる。

2. 研究目的

有害駆除や突発的な事故で死亡する個体から受精卵を作出する方法として、天然記念物であるニホンカモシカ (*Capricornis crispus*) の摘出した卵巣、精巣から卵子、精子を採取し、利用することを検討した。

3. 研究方法

有害駆除(長野県上松町)される際に、卵巣、精巣を採取して用いた。卵巣は20℃あるいは25℃のリンゲル液にひたして、実験室に持ち返った。メスでもって卵胞を切開し、その内容を修正PBS中に小匙で掻き取って、卵子を採取した(卵胞切開法)。卵胞切開法で採取した後の卵巣はメスで表面を細切して、修正PBS中で洗い、卵子を採取した(細切法)。

卵子は卵丘細胞層の付着状況でA(緊密な卵丘細胞層に囲まれた卵子)、B(卵丘細胞層の一部欠く卵子)、C(卵丘細胞層の無い卵子)、D(卵丘細胞層の膨潤化した卵子)に区分した¹⁾。卵丘細胞層を欠く卵子は透明帯を含む外径によっておおよそ150 μ m以下(小型)と以上(普通)に区分した。

採取卵子は牛の体外受精法¹⁾に従って、25mM HEPES 緩衝TCM199に5%子牛血清、FSH、エストラジオールを添加した培養液で成熟培養した。培養条件は5%炭酸ガス、95%空気の気相で、温度を38.5℃とした。成熟培養は21~23時間行った。なお培養開始時と終了時に一部の卵子は固定、染色し、成熟分裂の状況を調べた。

精子は採取した精巣上体尾部から圧出法により採取し、NF-3で希釈後5℃に保存しておき、16時間後に凍結を行った。

精子の処理は牛の精子処理法に準じた。すなわちおおよそ3000万/0.5mlに希釈した液状精液を10mMカフェイン加B0液(Caff-B0)で希釈し、遠沈(1800rpm 5分間)を2回くりかえして洗浄した。精子数をカウントしてCaff-B0液で1000万/mlに調整後、20mg/ml牛血清加B0液(BSA-B0液)にヘパリン(ノボヘパリン)を5 μ l/ml加えた液(H-BSA-B0)で等量希釈して、15分間後媒精し10時間培養した。

媒精後10時間後で卵子を発生用の培養液(TCM199+CS5%)に移し、発生培養を行った。媒精後9~10時間で一部の卵子の卵丘細胞を除去し、固定、染色し、精子の侵入状況を調べた。

卵割状況は媒精後72時間目に卵丘細胞を除去して調べた。2細胞期以上の胚の割合を卵割率とした。その際に新鮮な培養液に交換した。

4. 実験結果

ニホンカモシカの有害駆除の状況は表1に示した。2回の採材において6頭の雄と3頭の雌が得られた。3頭の雌からの卵子の採取性は表2に示した。3頭の雌カモシカから卵胞切開法によって計70個(9~41)、その後の細切法によって30個(7~12)の卵子が得られた。卵丘細胞に囲まれた卵子は50個であり、50個は卵丘細胞層を欠いていた。そのうち14個は透明帯を含む外径がおおよそ150 μ m以下の小さい卵子であった。

個体A(329)の細切した卵巣から得た成熟培養前の卵子をホールマウント標本にして観察した結果(表3)、普通サイズの直径(透明帯を含む外径がおおよそ150 μ m以上)を持

表1 ニホンカモシカの有害駆除と採材状況

カモシカNo.	性	死亡時刻	採材時刻	精子・卵子採取時間	備考
367	♂	9:30	14:00(4:30)	0:30(1月30日)	媒精用
368	♂	11:00	14:10(3:10)	0:30(1月30日)	
369	♂	13:30	14:15(0:45)	0:40(1月30日)	
329	♀	11:00	17:20(6:20)	0:30(1月30日)	双仔妊娠
378	♀	16:40	18:00(1:20)	1:30(2月20日)	妊娠
394	♀	13:20	16:30(3:10)	2:00(2月20日)	非妊娠(栄養不良)
376	♂	11:00	17:20(6:20)	-----	
395	♂	14:50	16:30(1:40)	-----	
377	♂	12:00	12:30(0:30)	0:40(2月20日)	落下死体

表2 ニホンカモシカ卵巣からの卵子採取

カモシカNo.	採取卵子数			細切後採取卵			
	A	B	C	A	B	C	D
329	8	3	9(5)	0	0	12(4)	
378	23	5	13	0	3	7(2)	1
394	5	2	2	0	0	7(3)	0

() 内は直径の小さい卵子(透明帯を含む外径がおおよそ150 μ m以下)

表 3 成熟培養前と後の成熟分裂検査結果

妊娠カ	時間	小型			普通				
		退行	GV	LD	退行	GV	ED	M I	M II
329	0hr	0	4	0	0	7	1	0	0
	21hr	0	4	1	0	3	1	0	0

表 4 未卵割卵の顕微鏡検査

	時間	小型		普通			
		退行	GV	退行	GV	M I	M II
378	23h	4	0	1	6	4	0
378	31hr	-	-	2	1	2	5
394	23hr	2	1	0	4	0	2
394	31hr	-	-	0	2	1	3

(媒精後の時間)

つ卵子8個のうち7個がGV(卵核胞)期であり、サイズの小さい卵子(透明帯を含む外径がおおよそ $150\mu\text{m}$ 以下)4個はすべてGV期であった。成熟培養21時間後の卵子は普通サイズ4個では3個がGV期、小さいサイズの卵子5個では4個がGV期であり、成熟が大変不良であった。

媒精後10時間で標本作製して精子侵入状況を検査した結果では卵子核の成熟は不良であったが3個中3個とも数個の精子頭部が侵入している多精子侵入卵であった。ここに用いた精子では牛の受精能獲得処理法が有効であることが示された。

媒精後40時間を経過して、卵割卵は出現しなかった。成熟を検査する方法に準じて標本を作成し、検査した結果、8個中6個は精子侵入卵であったが、いずれも精子頭部の膨化はみられなかった。

個体B(378)、C(394)から得た卵子は成熟培養23時間後において、普通サイズ17個では1個が退行卵、10個がGV期、4個がMⅠ(減数分裂第1分裂中期)、2個がMⅡ(減数分裂第2分裂中期)であった。小さいサイズの卵子では7個のうち6個が退行像を示すGV期、1個がGV期であった。媒精後9時間(成熟培養後31時間)で標本作製して精子侵入状況を検査した結果では、卵子核の成熟はBで5/10(50%)、Cで3/6(50%)であったが、明確な精子侵入は認められなかった(表4)。

5. 考察

ニホンカモシカは通常1年1産で、多胎は剖検600例中双胎が3、品胎が1例認められているが、大部分は単胎である。妊娠期間は210-220日で、産子の生時体重は3.4~4kgである。その繁殖開始年齢は1.5才以降で、最長寿命20歳まで続くとされている²⁾。卵巣などの組織学的所見はよく観察されている³⁾が、一般的な繁殖生理は不明な点が多い。今回有害駆除されたニホンカモシカから卵巣と精巣を摘出して、卵子、精子を採取して体外受精を試みた結果、低率であるが精子侵入卵が得られた。野生動物であるニホンカモシカに体外成熟体外受精を応用して、部分的であるが成功した例は初めてと考えられる⁵⁾。

希少種や野生動物の繁殖行動や生殖生理は十分に解明されておらず、これらの動物の性周期の特定の時期に、性腺刺激ホルモンを投与して体内で卵子を成熟させ、受精卵を生産する受精卵移植技術の適用には限界がある。いっぽう哺乳動物の卵子は卵胞から取り出され、体外で好適な条件におかれると自然に減数分裂を再開し、成熟する現象が知られている。この体外で自然に成熟する現象を利用して、成熟後の卵子に受精を引き起こして受精卵を生産するのが、体外成熟体外受精技術である。この技術は対象動物の生殖生理が部分的に不明な場合でも、適用できる可能性が示されている⁴⁾。

体外成熟体外受精技術を確立するためには、卵子と精子の2つの面から研究を進める必要がある。卵子に関しては体外に取り出して培養する場合の条件、すなわち減数分裂を再開するに十分な培養温度、培養液、培養時間を明らかにする必要がある。ある。また精子の場合は卵子に侵入可能とするための受精獲得誘起法の確立が必要である。ニホンカモシカの卵子について今回検討した結果では、牛で用いられている培養温度や培養液で成熟が可能が示された。しかし成熟率は良好でなかった。この理由として駆除される地域が山深く、厳冬期であって、死亡から卵巣摘出まで3時間以上放置されることによる低温の影響が考えられる。牛の実験によれば卵子は5~10℃の低温に2~3時間さらされると、発生能が極度に低下することが知られている⁵⁾。今後このような駆除個体の有効利用のためには死亡直後に体内から卵巣を摘出して、実験に供する必要があることが強く示唆された。

精子については卵子と同じく牛の受精能獲得誘起法が有効なことが示された。しかし侵入精子の頭部膨化が不十分であったことから、今後透明帯除去ハムスター卵子を用いてより最適な精子処理条件を確立する必要がある。また活力不良の精子を利用する方法としての顕微受精などの方法の適用も考えて、研究を展開する必要がある。

(この研究の遂行にあたって長野県上松町役場職員の方々に多大なご協力いただいたことに感謝します。)

6. まとめ

3頭の雌カモシカから卵胞切開法によって計70個(9~41)、その後に細切することによって30個(7~12)の卵子が得られた。卵丘細胞層に囲まれた卵子は50個であり、50個は卵丘細胞層を欠いていた。成熟培養後の検査では成熟率が低かった。牛の体外受精に準じて精子処理を行って媒精した結果、精子侵入卵が得られたが、卵割卵は得られなかった。

7. 本研究により得られた成果

有害駆除のカモシカの精巢、卵巢を採取して、体外受精が可能であるが、そのためには速やかに体内から卵巢を取り出すことが重要であることが示された。

8. 参考文献

- 1) 塩谷康生、実技編、家畜人工授精講習会テキスト(家畜体外受精編)
花田章(編) 日本家畜人工授精師協会、東京(1993)
 - 2) 三浦慎吾、日本産偶蹄類の生活史戦略とその保護管理、現在の哺乳類学、朝日稔・川道武男(編)朝倉書店 東京(1991)
 - 3) Kita, I., Sugimura, M., Suzuki, Y., Tiba, T and Miura, S., Reproduction of female Japanese serow based on the morphology of ovaries and fetus. The biology and management of capricornis and related mountain antelopes, Soma H. (ed) Croom Helm. London. (1987)
 - 4) 塩谷康生・梶田博司・渡邊伸也、ニホンカモシカの体外受精. 日本畜産学会第90回大会講要 p.118 (1995)
 - 5) Wild, DE., Donoghue, AM., Johnston, L. A., Schmidt, P. M & Howard, J., Species and genetic effects on the utility of biotechnology for conservation. Symp. zool. sco. Lond. ;64:45-61. (1992)
 - 6) 安部茂樹・塩谷康生、牛卵巢の輸送温度が体外成熟・体外受精卵子の胚発生に及ぼす影響. 日本畜産学会報 64:32-37. (1993)
- 国際共同研究等の状況 特になし。
研究発表の状況 塩谷康生・梶田博司・渡邊伸也、ニホンカモシカの体外受精. 日本畜産学会第90回大会講要 p.118 (1995)

(4) 鳥類生殖細胞の凍結保存法の開発

農業生物資源研究所遺伝資源第二部・動物保存研究チーム

居在家義昭(現：畜産試験場)、野口純子

1. 序

家畜で確立された繁殖技術を多様な野生動物に適用するためには、それぞれの種に適した方法に改善する必要がある。凍結精液を用いた人工授精は家畜増殖の優れた手法の一つであり、現在、わが国におけるウシの人工授精の普及率は90%以上となっている。一方、家禽の凍結精液の研究もなされており、今日では十種類以上の凍結保存液が開発されるに至っている。凍結融解後の精子生存性から判断すると、渡辺液ならびにレイク液がもっとも適しているとされている。しかし、これらの凍結保存液には15%前後の高濃度のグリセリンが含有されていることから、ステップワイズによるグリセリンの除去なしには受精しない難点がある。

2. 研究目的

野外でグリセリンの除去操作なしに、簡便に鳥類凍結精子を用いた人工授精を行うことを可能にする凍結保存法を開発することを目的として、鶏精子凍結保存液を改変し、これをヤマドリ精子の凍結保存法に適用することを検討した。

3. 研究方法

実験1 鶏精子の凍結

数羽の白色レグホン種の雄から精液採取を行った混合精液を用いた。レイク液ならびにレイク液にラフィノースとトレハロースを添加した修正レイク液(表1)を用いて、グリセリン濃度を10%から0%に変化させたときの、凍結融解後の精子生存性を比較検討した。混合原精液をこれらの凍結用希釈液で5倍に希釈し、0.5mlストローに分注した。これらのストローは発砲スチロール箱を用いた、液体窒素気相中で10分間予備凍結後、液体窒素中で凍結保存した。凍結精液の融解はストローを5℃の氷水中に投入して行い、その後各種グリセリン濃度で凍結保存した精子の生存性を、38℃に保持した加温盤上で直ちに検査した。

次に、レイク液ならびにグリセリン濃度を2%に低下させた修正レイク液で凍結保存した精液を用いて人工授精を行った。レイク液で凍結保存した鶏精液は凍結融解後にグリセリンを25段階で除去し、修正レイク液においては凍結融解後、グリセリンを14段階で除去あるいは除去しないで直ちに人工授精に使用した。人工授精は放卵後の午後3時前後に精液を1羽当たり0.2ml(精子数約6億)頸管深部に注入して行い、その後2~8日目までの卵を採取して、ふ卵10日目に投光検査および卵割検査により受精率を調査した。

実験2 ヤマドリ精子の凍結

埼玉県養鶏試験場で飼育されている雄のヤマドリを実験に供した。数羽のヤマドリから精液採取を行い、混合精液を得た。これらを4種の凍結用希釈液(表1)を用いて希釈し0.25mlストローに分注した。これらのストローは液体窒素気相で10分間予備凍結後、液中に保存した。凍結精液の融解はストローを5℃の氷水中に投入して行った。レイク液による凍結融解精液については、氷冷下でグリセリン不含のレイク液で段階的に希釈した後1500RPMで15分間遠心分離し、回収した精子をグリセリン不含レイク液に再浮遊した。

凍結融解による精子性状の変化を調べる目的で、採取直後、凍結用希釈液にて希釈後、および凍結融解後の精子の運動性と形態的变化を調べた。運動性の評価は、顕微鏡下で観察し精子生存指数により表した。1つの凍結精液のロットについて3回検索し、結果を平均して表した。形態については、塗抹標本を作製しギムザ液で染色後、顕微鏡下(1000倍)で観察し異常の有無を検索した。1標本について100から200の精子を観察し、先体あるいは尾部に異常の認められないものについてその比率を求めた。1つの凍結精液のロットについて3回検索し、正常精子の比率を平均した。

4. 実験結果

実験1

レイク液の組成に準拠しつつ、ラフィノースとトレハロースの糖を加え、グリセリン濃度を段階的に低下させて、急速凍結法による鶏精子の凍結融解後の精子生存性を比較検討した結果は図1に示した。その結果、前者の糖を添加することにより、5%程度までグリセリン濃度を低下させてもレイク液とほぼ同等の精子生存率が得られた。一方、2%にグリセリン濃度を低下させても凍結融解後の精子生存率は平均70%を示したが、2%以下のグリセリン濃度では40%以下($P<0.05$)に低下した。

人工授精に用いた凍結前の精子生存率はいずれも90%以上であった。レイク液を用いた凍結・融解直後の精子生存率は平均90%であったが、グリセリン除去操作後、注入直前には平均70%に低下した。一方、グリセリン濃度が2%である修正レイク液を用いて、凍結融解後にグリセリン除去操作を行わなかったときの精子生存率は平均70%を示した。また、修正レイク液でグリセリン除去の操作を行った精子生存率はさらに10%低下した。運動性についてはレイク液、修正レイク液、修正レイク液でグリセリン除去操作を行ったものの三者に大きな差は認められず、運動性は中程度であった。

人工授精7日間の累計受精率は、レイク液で67%、修正レイク液でグリセリン除去を行ったものが27%、修正レイク液で凍結融解直後に人工授精したもので59%であった(図2)。

実験2

1回の採取で1羽あたり約50 μ lの精液の採取が可能であった。射出精液中の精子濃度は

約21億/mlであり、凍結のために各種希釈液で約4倍に希釈した。

採取直後のヤマドリの精子は活発な運動性を示し、精子生存指数で90以上であった。各凍結用希釈液で希釈した場合の精子生存指数はレイク液で90以上、修正レイク液で40前後、P液で90以上、修正P液で60前後であった。各種希釈液による凍結融解5時間後までの精子性状について図3に示す。レイク液による凍結融解精液の融解直後の精子生存指数は80以上であった。グリセリン除去操作直後には50以下に減少したが、除去後2時間まで40以上を示した。その他の希釈液による融解直後及び2時間後の精子生存指数は、修正レイク液で30および20、P液では20および15、修正P液では15および10以下であった。

各種凍結用希釈液を用いて凍結し、融解直後および2時間後に形態を検索した結果を図4に示す。精液採取直後では85%以上の精子が形態的に正常であった。レイク液及び修正レイク液にて凍結融解した精液では、融解直後で80%以上、融解2時間後でも70%前後が正常であった。一方、P液および修正P液を用いた場合は、先体が細化したものや不整形のもの、あるいは尾部が切れたものなど異常な精子が融解直後から多数認められた。正常な精子はP液の場合、融解直後で20%前後、2時間後で15%であり、修正P液では融解直後で2%であった。

5. 考察

鶏精子の凍結保存には、レイク液¹⁾を用いた急速凍結法が広く行われている。本液を用いた急速凍結法は凍結・融解後の精子の生存性もよく、凍結融解精液を用いたニワトリの人工授精では、累積受精率で70%近くを示す。しかし、レイク液には高濃度のグリセリンが含まれているため、融解後にグリセリン除去を行う必要性があり、その操作中に精子の生存性ならびに受精能が低下する傾向にある。また、グリセリンの除去なしには受精卵を得ることは不可能である。凍結融解後に直ちに人工授精するためには、そのグリセリン濃度が2%以下でなければならないとされている。そこで、レイク液の組成を参考にしながら、耐凍剤としてラフィノースとトレハロースの2種類の糖を添加し、グリセリン濃度を段階的に低下させた凍結希釈液を用いて、精子生存性を比較検討した。その結果、前者の糖を添加することにより、グリセリン濃度を2%に低下させても比較的良好な精子生存性を得られることが明らかとなった。

次に、レイク液で凍結保存した鶏精液は凍結融解後にグリセリンを除去し、修正レイク液においては凍結融解後、グリセリンを除去あるいは除去しないで直ちに人工授精に使用した結果、修正レイク液で融解直後に人工授精を行ってもかなりの受精率が得られることが示された。このことは、冷却遠心機などの特殊な機器を必要とせず、野外で簡便に鳥類の人工授精ができることを示すものである。

さらに家禽精子の凍結法が野生鳥類に応用できるか否かを飼育下にあるヤマドリを用いて検討した。すなわち、レイク液を用いて希釈、凍結した精液について、融解後の精子性状を調べた。さらに、融解後グリセリン除去を行わずに人工授精に用いることができるようグリセリン濃度を抑えた凍結用希釈液および融解後直接人工授精に用いることができる精液希釈液として、全ロシア家畜遺伝資源研究所で用いられているプロタミンとジメチルアセトアミドを含む凍結用精液希釈液についても併せて検討した。その結果、家禽で広く用いられているレイク液を用いた凍結保存をヤマドリ精液にも応用できる可能性が、凍結融解後の精子の性状から示唆された。レイク液、修正レイク液及びP液を用いた場合、融解2時間後まで精子の性状が比較的良好に保たれていたことは、凍結融解精液を用いた人工授精の際に有利である。一方で、希釈液により凍結融解直後の精子性状に差が認められた。こうした差異がそのまま受精能力を示すものではなく、今後これらを人工授精に用いて精子の受精能を評価することが必要である。

ヤマドリではレイク液による凍結保存が運動性、形態の両面で4つの希釈液の中でもっともよい結果であったものの、種による差異を考慮し、他の野生鳥類においても検討する必要がある。また、レイク液を用いた凍結融解後のグリセリン除去作業は煩雑であり、野外での作業に適しているとはいえない。野生動物に畜産の繁殖技術に応用する場合には、こうした点も考慮してそれぞれの種にあった方法を選択する必要がある。

6. まとめ

鶏精子を用いて鳥類精子の凍結用保存液について検討した結果、修正レイク液を用いた場合、グリセリン除去操作を行わなくても高い精子生存率及び受精率が得られた。ヤマドリ精子はレイク液、修正レイク液およびP液を用いた場合、凍結融解2時間後まで精子の正常が比較的良好に保たれた。

7. 本研究により得られた成果

鶏精子用の凍結保存液を改良することによりヤマドリ精子を簡便に凍結保存する技術を開発した。

8. 参考文献

1) Lake, P. E., Observation on freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., Paris 2:1633-1635. (1968):

研究発表の状況 Noguchi, J., Kikuchi, K., Nagai, Y., Shibusawa, N., Noda, J. & Izaike, Y., Application of the freezing method of fowl spermatozoa to the Japanese copper pheasant, *Phasianus soemmerringi* (YAMADORI). The 8th Animal Congress of AAAP (1996).

居在家義昭・永井義隆、ヤマドリ (*Phasianus soemmerringi*) の人工増殖の取り組みについて、日本鳥学会1995年度大会 p. 30 (1995)

石居進・小野珠乙・若林修一・居在家義昭・菊地元史、鳥類の人工繁殖とバイオテクノロジー、日本鳥学会1995年度大会シンポジウム、p. Ⅳ (1995)

表 1 各種凍結保存用希釈液の組成 (100ml中)

	LAKE液	修正 LAKE液	P 液	修正 P 液
Sodium glutamate (g)	1.920	1.920	1.920	1.920
Fructose (g)	0.800	0.800	0.800	0.800
Raffinose (g)	0	0.800	0	0.800
Trehalose (g)	0	0.800	0	0.800
Protamine sulfate (g)	0	0	0.032	0.032
Magnesium acetate (g)	0.080	0.080	0	0
Potassium acetate (g)	0.500	0.500	0.500	0.500
Polyvinyl pyrrolidone (MW. 10,000, g)	0.300	0.300	0.300	0.300
Glycerol (ml)	14.0	2.0	0	0
Dimethyl acetamide (ml)	0	0	6.0	6.0
Penicillin G (IU)	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵
Streptomycin (mg)	100.0	100.0	100.0	100.0
Water (ml)	up to 100	up to 100	up to 100	up to 100

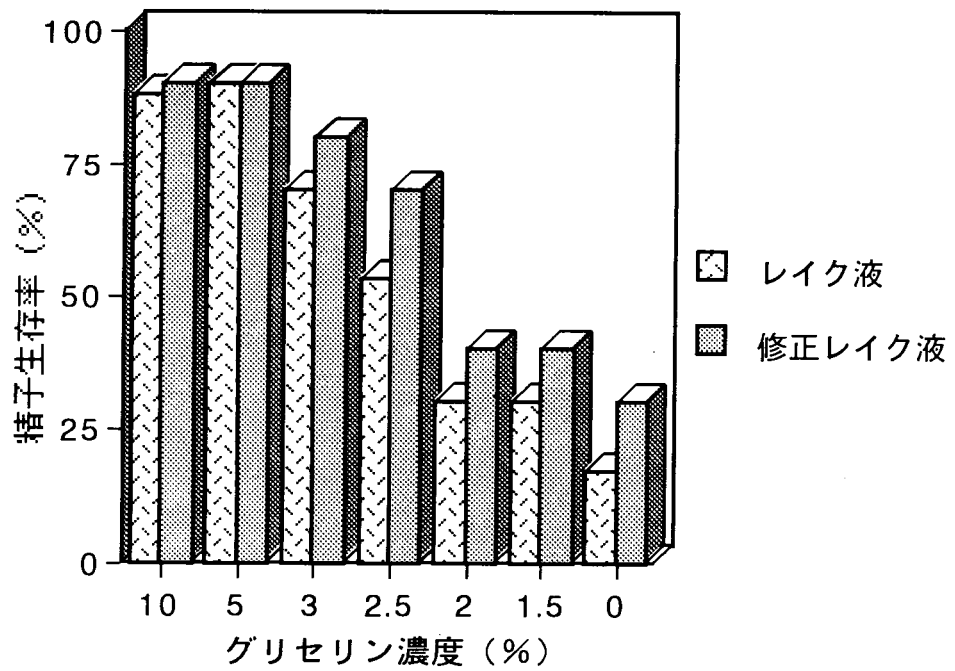


図1.ライク液および修正ライク液のグリセリン濃度と精子生存率

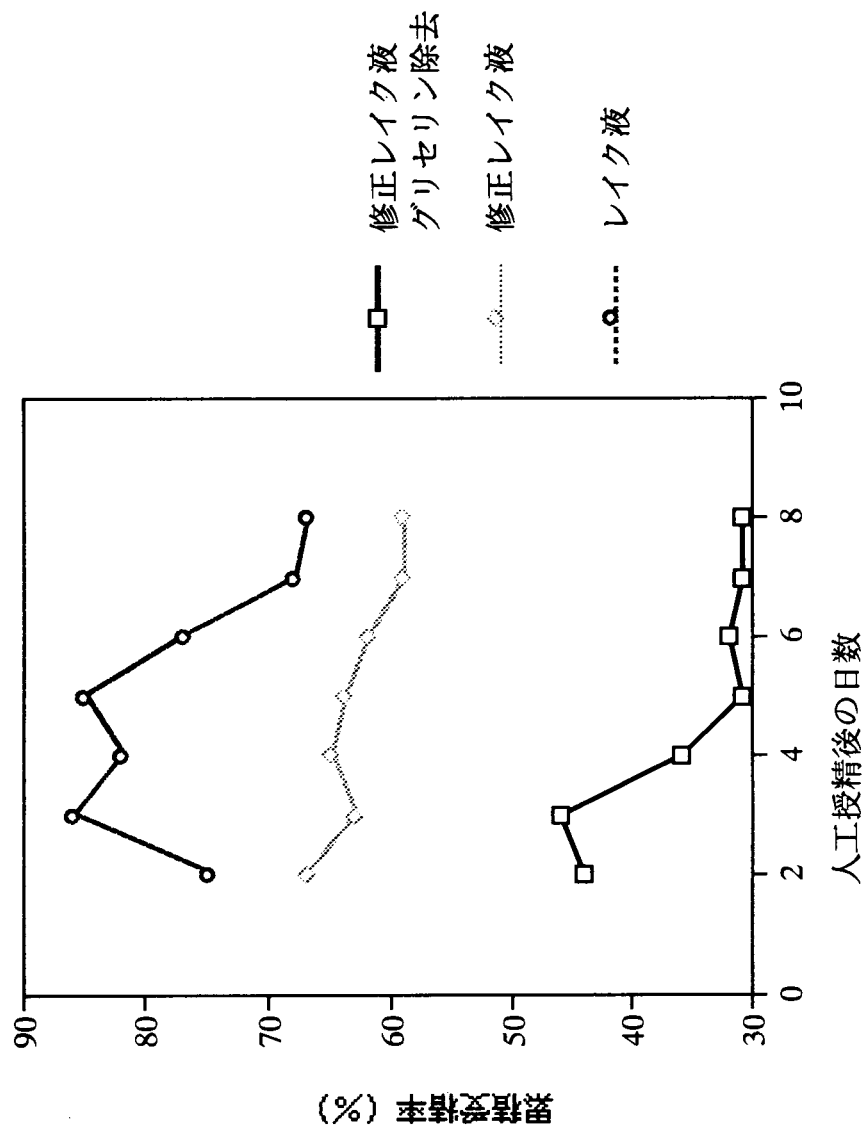


図2.レイク液および修正レイク液を用いた人工授精後の累積受精率の推移

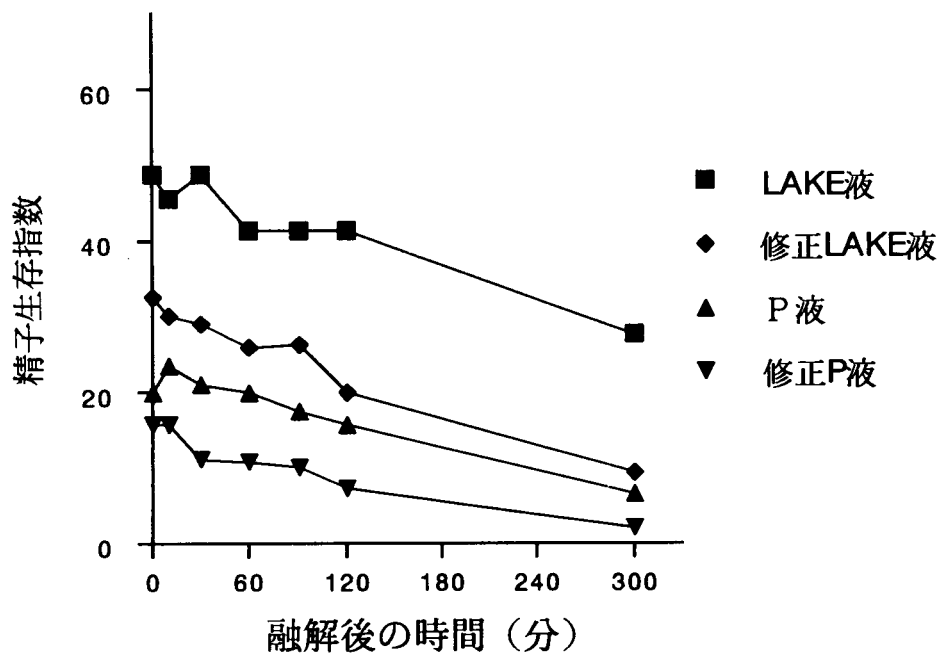


図3. 凍結融解後の精子の運動性の変化

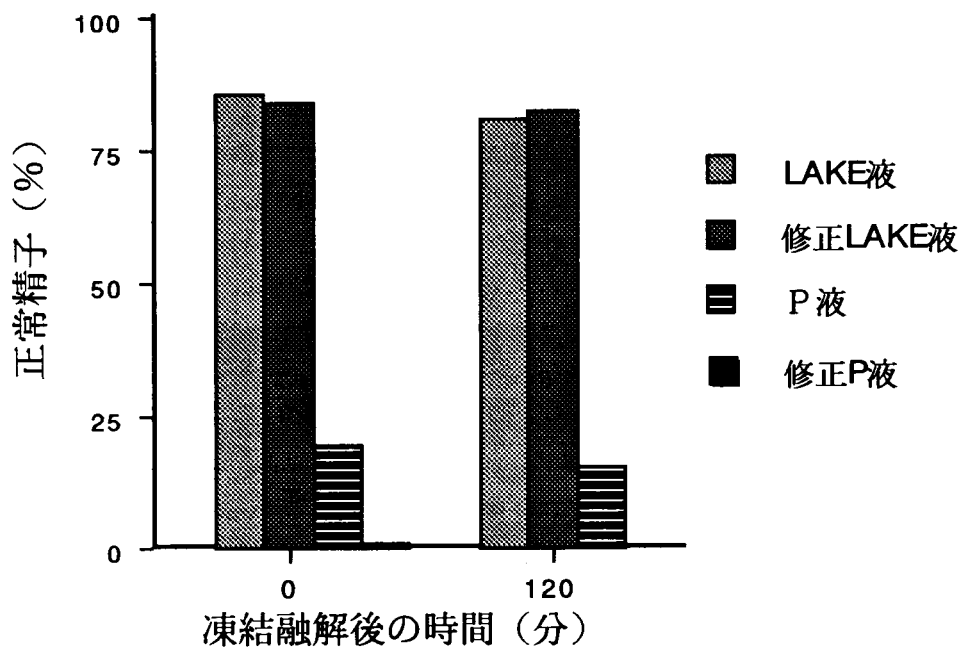


図4. 凍結融解後の形態正常精子数の変化