

# 生物多様性の保全を目指した希少動物の生殖細胞保存と繁殖技術の開発

高橋 芳幸 [北海道大学大学院獣医学研究科診断治療学講座繁殖学教室／教授]

片桐 成二 [北海道大学大学院獣医学研究科診断治療学講座繁殖学教室／准教授]

坂元 秀行 [登別温泉ケーブル(株)のぼりべつクマ牧場園地部動物課／飼育係長]

福井 大祐 [旭川市旭山動物園飼育展示係／主査]

庫爾班 吐拉克 [中国、新疆農業大学動物科学学院／講師]

## 背景・目的

絶滅の危惧される野生動物種・地域個体群の生物学的・遺伝学的な多様性の保全には生殖細胞保存と繁殖技術の開発が期待されている。我々は道内動物園関係者とともに「希少動物保護増殖技術研究会」を設立し、北海道を含む北方圏の希少野生動物を対象とした技術開発活動を続けている。本研究はその一環として、自然交配のできないアムールトラとエゾヒグマのペアから人工繁殖技術により産子を得るとともに、各種の希少動物の精子・卵子の凍結保存、体外受精、卵巣内原始卵胞の凍結保存と体外発育・成熟培養などの繁殖技術の開発を目的とする。

## 内容・方法

本年度は、以下の動物・生殖細胞を対象に直面する技術の開発を行う。

1. エゾヒグマ：のぼりべつクマ牧場のエゾヒグマの精液を採取・凍結保存するとともに、精液性状、精子の生存性等について解析する。さらに、採取精液を用いて人工授精を行い産子の獲得を目指す。
2. アムールトラ：旭山動物園のアムールトラのペアを対象に精液採取・凍結保存するとともに、雌の血中・糞中ホルモン動態を解析して発情・排卵誘起処置を加え、発情時に人工授精を行い産子の獲得を目指す。また、ネコをモデルにしてネコ科希少動物の体外受精とトラ凍結精子の受精能について検討する。
3. エゾシカ：狩猟および食肉用処理個体の卵巣と精巢の低温保存、凍結精子と卵巣内卵子を用いた体外受精技術について検討する。
4. 各種動物の前胞状卵胞：マウスをモデルに卵巣組織や単離採取した卵胞のガラス化凍結保存法と凍結融解卵胞・卵子の体外発育・成熟培養技術について検討する。

## 結果・成果

1. エゾヒグマ：のぼりべつクマ牧場において繁殖季節（6月～8月）に電気刺激による精液の採取・凍結保存試験（4回）を行うとともに精液採取・凍結成績を分析した結果、精子の生存指数と濃度が正の相関のあること、グリ

セリン・卵黄・トリス・クエン酸・フラクトースを添加した溶液を用いて凍結保存した精子の約50%が運動能を有していることが確認された。また、新鮮精液と凍結保存精液を用いて自然発情の雌グマ2頭に対してhCGを用いて排卵誘起処置を施したのち人工授精を行い、妊娠・分娩の有無を追跡している。

2. アムールトラ：旭山動物園の雄雌ペアを対象に電気刺激による精液採取（11月～2月、3回）と採取精液の凍結保存試験（グリセリン・卵黄・トリス・クエン酸・フラクトース添加溶液使用）を行った。また、これまで雌トライの血中および糞中ホルモン動態を解析し、その結果に基づきeCGとhCGを用いて発情・排卵誘起処置を施したのち発情時に人工授精を行ない、その成果（妊娠・分娩の有無）を追跡している。また、体外受精については、代表者らが開発したウシの体外受精技術を基本にしてネコの卵子と精子（凍結保存）を用いて卵胞内卵子の成熟に必要な培養時間を明らかにするとともに、体外成熟卵子の体外受精・発生培養を行い、約25%の卵子が胚盤胞へ発育することを確認した。また、トライの凍結保存精子がネコの体外成熟卵子に侵入して受精能を有すること、ネコの体外受精技術をトライの体外受精に応用できることが示唆された。

3. エゾシカ：狩猟個体の精巢と食肉用処理個体の卵巣と精巢を用いて、卵巣と精巢の低温保存および精巢上体精子の凍結保存法について検討を行い、採取直後にグリセリン・卵黄・トリス・クエン酸・フラクトースを添加した溶液を用いて凍結保存した精子では80%以上の精子が高い運動性を維持していること、精巢の低温保存日数が長くなると凍結融解後の精子運動性が低下することが判明した。また、卵巣は10～20℃で12時間前後の保存が可能であり、卵胞内卵子の約70%が体外培養により成熟し、凍結保存精子と数日間低温保存した精巢の精子を用いた体外受精（代表者らのウシ体外受精系を基本にした技術）により約60%が受精し、その20%が胚盤胞へ発育することも分かった。

4. 各種動物の前胞状卵胞：マウスの卵巣から単離採取した二次卵胞をエチレンギリコールとスクロースを用いてガラス化保存して融解後の生存性と発育・成熟能を調べた。その結果、ガラス化保存卵胞の約40%が生存・発育し、発育卵胞内卵子の約25%が成熟することが分かった。

## 今後の展望

当面の目標であるアムールトラとエゾヒグマのペアの人工授精、エゾシカの体外受精に成功すれば、絶滅が危惧されるネコ科、クマ科地域個体群、ホッキョクグマ、希少なシラカシ類などへ応用ができる。また、希少動物の精子や卵子の凍結保存、人工授精、体外受精により産子が得られるようになれば、遺伝的多様性を維持する計画的な増殖、絶滅危惧動物の保護増殖が可能になる。さらに、原始卵胞の凍結保存とその培養により、体外で多

数の成熟卵子が作出できるようになれば、希少動物だけでなく、優良家畜の増殖やヒトの生殖医療にも貢献できる。