

## 野生動物種の人工繁殖技術

黒坂 哲<sup>1</sup>, 安齋 政幸<sup>1</sup>

### 要旨

多くの生物種が絶滅の危機に瀕している現在、生物多様性を維持するための取り組みは急務である。その取り組みとして進められているのが生息地における生息数の確保を目的とした「域内保全」と動物園・水族館などにおける飼育下繁殖技術による「域外保全」である。いずれの場合も個体数と遺伝的多様性の双方の維持あるいは回復が求められており、域外保全においては可能な限り多くの個体に由来する生殖細胞を用いた人工繁殖技術の確立が必要である。本稿では、そのような技術の中で、1) 生殖細胞の保存および人工授精、2) 多能生幹細胞の樹立およびそれ由来の生殖細胞の作製、3) 性周期の予測および妊娠判定について述べる。

**キーワード：**人工繁殖技術、野生動物、遺伝的多様性、域外保全

### はじめに

現在、地球上では多くの動物種が絶滅の危機に瀕しており、生物多様性の維持に向けた取り組みは急務である。その取り組みとして、生息地における生息数の確保を目的とした「域内保全事業」や動物園・水族館などにおける飼育下繁殖技術による「域外保全事業」が進められている<sup>(1,2)</sup>。域外保全事業の中核として野生動物を保有している施設は主に動物園・水族館であるが、飼育個体の高齢化や、「絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約（ワシントン条約）<sup>(3,4,5)</sup>」による取引の規制のために新たな野生個体の導入が困難となっていることなどから、動物園・水族館において個体数を維持することは容易ではないのが現状である。繁殖能力の高い雌雄がいれば個体数の維持は可能であるが、集団が一部の個体の子孫のみで構成され、遺伝的多様性が失われる可能性が高まってしまう。実験動物や家畜と異なり、野生動物の個体数を維持するには遺伝的多様性を保つことが必須の課題であり、施設間で個体を交換するブリーディングローン<sup>(6)</sup>が多くの施設で実施されているが、ブリーディングローンに用いることができる個体数を十分に維持することができるのかという問題は避けられない。また、生殖細胞の採取、特に卵子の採取は侵襲性が高く各個体への負担が大きいことも人工繁殖を困難にしている。回収した生殖細胞の保存についても、各動物種においてその保存方法が確立されておらず、家畜や実験動物分野での技術や条件を基に、手探りでおこなっていることが実情であり、人工繁殖に直結している報告例は未だ少ない。さらに、動物園や水族館等では、個体の高齢化にともなう繁殖能の低下のため生殖細胞の回収が困難となっており、各動物種における初期胚発生、胎子発生の解析は、より一層困難である。このような問題を解決するためには、野生動物由来培養細胞や生殖細胞を十分に研究に活用し、科学的知見に基づく安定した人工繁殖技術を確立することが不可欠であり、これを充実させることが域外保全の発展につながることは自明である。

このような現状を打破するためには、可能な限り多くの個体に由来する生殖細胞を用いた人工繁殖技術の確立が必要であり、本稿ではそのような技術のなかで、1) 生殖細胞の保存および人工授精、2) 多能性

幹細胞の樹立およびそれ由来の生殖細胞の作製、3) 性周期の予測および妊娠判定について紹介する。

### 生殖細胞の保存および人工授精

生殖細胞の凍結保存、人工授精、体外受精、顕微授精は、実験動物や家畜の生産、そしてヒト生殖医療においては確立された人工繁殖技術である。実験動物ではさまざまなマウス系統の保存や輸送が個体ではなく凍結された生殖細胞や胚で実施されることが一般的であり、家畜生産においてはわが国の肉用牛や乳用牛の90%以上が凍結精液を用いて生産されている。また、わが国で2018年に誕生した体外受精児が全出生児の16人に1人にあたる56,979人<sup>(7)</sup>であるように、人工繁殖技術は人間社会にも広く普及している。野生動物種においてもこれらの技術が有効であることは想像に難しくなく、野生動物種における取り組みも報告されてきており<sup>(8)</sup>、今後の研究のさらなる進展が望まれる。

生殖細胞の凍結保存は、精子においては1949年<sup>(9)</sup>、卵子においては1977年<sup>(10)</sup>に初めて成功が報告され、さまざまな改良が重ねられ今日に至っている。現在では、生殖細胞<sup>(11)</sup>および体細胞<sup>(12)</sup>を遺伝資源として凍結保存しておく「Frozen Zoo」がさまざまな動物園・水族館や大学において実施されており、そこから将来個体を再生する構想が考えられている。

人工授精は、採取した精液から清浄な精子懸濁液を調製して子宮内に注入する技術であり、新鮮精液または凍結精液が用いられる。新鮮精液の場合は、精液回収直後に人工授精を実施する必要があるため、雄個体と発情期の雌個体をその場に準備する必要がある。その準備ができるのであれば、雄と雌の相性が悪くない限り自然交配で繁殖させることも可能であると考えられるので、新鮮精液を使用するメリットは小さい。

体外受精は回収した精子と卵子を培養液中で受精させる技術であり、顕微授精は顕微鏡下で精子を卵子に注入して受精させる技術である。これらはヒト、家畜、実験動物では一般的に実施されており、信頼性の高い技術であるが、適用には十分な数の成熟卵子を獲得することが必要である。野生動物種、特に希少種において、体外受精・顕微授精の研究や実用化のために十分な成熟卵子数を獲得することは非常に困難であるため、現時点ではこれらの方法を野生動物種の人工繁殖技術の中心とするのは現実的ではない。

卵子の回収が困難である一方、精子については、射出精子を採取することで非侵襲的に回収することが可能である上、雄個体が健康で生殖能力を有する限りは継続的に回収することが可能である。したがって、可能な限り多くの個体から回収した精子を凍結保存し、遺伝的多様性を考慮して計画的に人工授精を実施することが野生動物種の人工繁殖技術として「即戦力」となるであろう(図1)。

凍結精液を用いた人工授精により遺伝的多様性を保つ試みとして、クロアシイタチの例が挙げられる<sup>(13)</sup>。クロアシイタチは野生の生存数が18匹まで減少したことがある絶滅危惧種であり、そのうちの1頭の凍結精液を用いた人工授精により8頭の個体が得られた。この凍結精液は20年間保存されていたものであるため、当時生存していた個体の遺伝的要素が現在の集団に導入されたことになる。クロアシイタチは生存数が極めて少ないため、生存個体群での遺伝的多様性の維持・回復が急務であり、この成果は域外保全における大きな成果であるといえるが、地域ごとの個体数がある程度維持されている種の場合は、それぞれの個体群内での遺伝的多様性を維持するための計画的な人工授精が必要となる。クロアシイタチについては、最近になって凍結保存体細胞由来のクローン個体の作製が報道された<sup>(14)</sup>。この個体は現存する個体群とは異なる個体群由来の遺伝的背景をもつため、現存個体群の近交化の緩和へ向けた重要なステップである。一方、この個体はフェレットの卵子を用いた異種間核移植により作製されているためにフェレットのミトコンドリアDNAをもち、純粋なクロアシイタチではないという問題点がある。この問題は、後代において

解決できると思われる。精子のミトコンドリアは受精後に排除されるため、異種のミトコンドリア DNA をもつ個体が雄である場合は、その後代は純粋なクロアシイタチとなるであろう。そして、それらの個体の凍結精液を用いた人工授精がその後の個体増産のための強力な技術となる可能性を秘めている。

あらゆる動物種において、可能な限り多くの個体から精液を採取し凍結保存しておくことは、遺伝的多様性を維持した人工繁殖のために必須である。当研究所ではペンギンを対象に精子の凍結保存および人工授精の実用化に向けた研究を進めており、新鮮精液を用いたキングペンギンの人工授精に成功しているほか、簡便で再現性の高い精液凍結保存方法も報告している<sup>(15,16)</sup>。

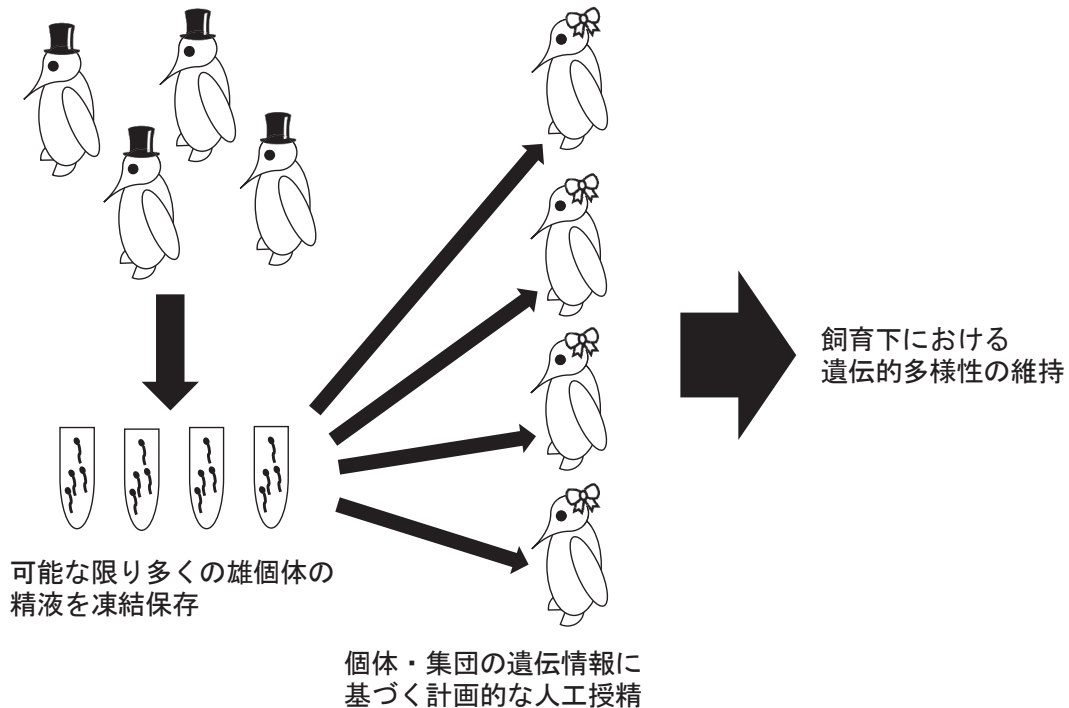


図1. 精子の凍結保存と人工授精による遺伝的多様性の保全

### 多能性幹細胞の樹立およびそれ由来の生殖細胞の作製

先に述べたように、野生動物種においては、精子の採取と比較して、卵子の採取は困難である。したがって、もし卵子を人工的に作製することができれば、体外受精や顕微授精が可能となり、野生動物種の人工繁殖において非常に有効であるといえる。野生動物種における卵子の作製は現時点では実用化を考慮する段階ではないが、マウスにおいて多能性幹細胞からの卵子の体外作製の成功が報告されている<sup>(17)</sup>ことから、理論的にも技術的にも近い将来現実となる可能性は高いと思われる。

卵子の作製には、胚性幹細胞 (ES 細胞) あるいは人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) といった多能性幹細胞の樹立が必要である。ES 細胞は胚盤胞 (着床直前の胚) の内部細胞塊から樹立される多能性幹細胞であるため、将来個体になる可能性のある胚を破壊することになる。また、マウス以外の動物種では ES 細胞の樹立は容易ではない。したがって、貴重な野生動物種の胚を破壊して ES 細胞を樹立するという試みを実施することは現実には難しいであろう。一方、iPS 細胞は体細胞にリプログラミング因子を導入して培養することによって樹立されるため、体細胞さえあればよく、胚を破壊する必要がない。以上の理由から、野生動物種における卵子作製に使用する多能性幹細胞は、原則として iPS 細胞となる。野生動物種においては、

導入したリプログラミング因子の遺伝子がゲノム中に残存することを避けねばならないので、導入遺伝子がゲノム中に残存しないエピソーマルベクター<sup>(18,19)</sup>や piggyBAC<sup>(20,21)</sup>を用いる方法で樹立することになる。これまでに piggyBAC を用いた方法でウシ iPS 細胞の樹立が報告されており<sup>(22)</sup>、この方法の野生動物種への応用が期待される。

iPS 細胞からの卵子作製には、大きく分けて 2 種類のアプローチが考えられる (図 2)。一方は体外で卵子を作製する方法であり、他方は生殖細胞を欠損した動物の体内で iPS 細胞由来の卵子を育てる方法 (生殖細胞補完法) である。体外での卵子の作製は前述のようにマウスで成功が報告されており、その野生動物種への応用である。生殖細胞補完法は、野生動物種の iPS 細胞と、生殖細胞を欠損するよう遺伝子改変されたマウス胚を用いてキメラ胚を作製し、そのキメラ個体の体内での iPS 細胞由来の卵子形成を誘導する方法である。この方法は、多能性幹細胞と特定の臓器を形成できなくなるよう遺伝子改変した動物の胚を組み合わせたキメラ胚由来の個体の体内に多能性幹細胞由来の臓器を作製する方法の応用であり、この方法によってマウス体内でラットの膵臓<sup>(23)</sup>、ラット体内でマウスの腎臓<sup>(24)</sup>が作製されていることから、卵子の形成も将来的には可能となると思われる。生殖細胞欠損マウス胚は、生殖細胞形成に必須な遺伝子 (*Nanos3*<sup>(25)</sup>や *Prdm14*<sup>(26)</sup>) をノックアウトする方法、あるいは細胞の生存に必須な遺伝子を生殖細胞特異的にノックアウトする方法により作製することができる。

卵子の体外作製、生殖細胞補完法のいずれも実験動物以外の動物種で実用化されるには時間がかかると思われるが、生命科学の進展が急速である現在においては、近い将来実用化される技術であると考えてもよいであろう。実際、ミナミシロサイにおいて、経膈採卵により採取した卵子と凍結保存精子を用いた顕微授精により得られた胚盤胞からの ES 細胞の樹立が報告されており<sup>(27)</sup>、野生動物種の人工繁殖技術の研究が多能性幹細胞を用いるレベルまで進んでいるようである。可能な限り多くの個体から採取した体細胞を保存して iPS 細胞樹立に備えておくことが遺伝的多様性の維持に大いに役立つ日は遠くないかもしれない。

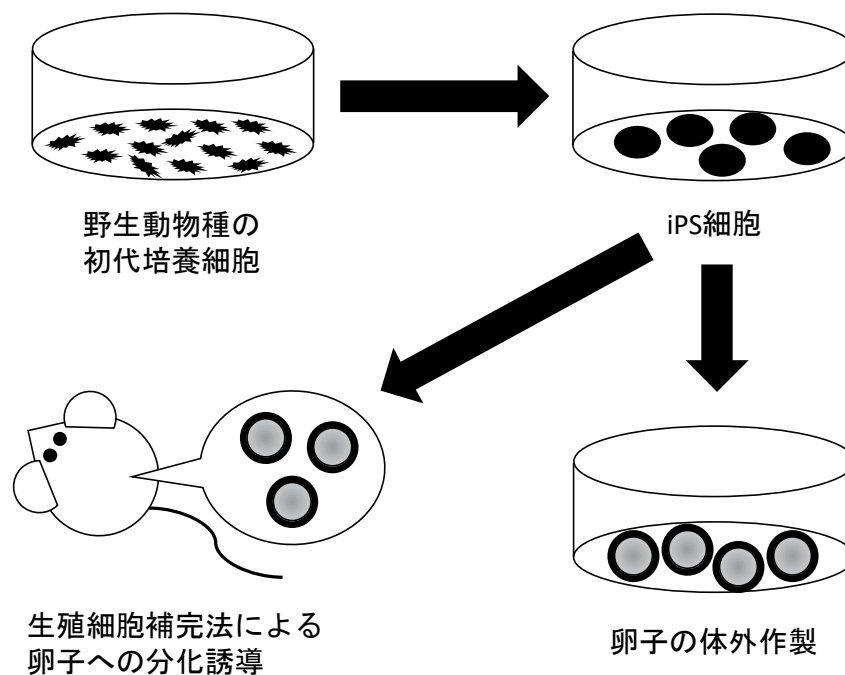


図 2. 多能性幹細胞からの卵子作製



### 性周期の予測および妊娠判定

人工授精や多能性幹細胞からの卵子作製が野生動物種の人工繁殖技術として有効であることは前項まで述べたが、人工授精のタイミング、体外受精や顕微授精で作製した胚の移植のタイミングはいずれも雌の性周期に依存するため、雌の性周期を正確に把握することは必須である。また、正確な妊娠判定は妊娠個体の管理上、非常に重要である。

人工授精は排卵のタイミングに合わせて実施されるので、排卵日の推定が必要となる。実験動物や家畜のようにホルモン注射による性周期の同期化が可能な動物種では人為的に排卵日をコントロールすることが可能であるが、その手法が確立されていない動物種では情動行動の観察、超音波診断装置による卵巣の画像、性周期に関連するホルモンの検出により排卵日を推定することになる。そして妊娠判定においても、排卵日の推定と同様に情動行動の観察、超音波診断装置による子宮の画像、妊娠に関連するホルモンの検出に頼ることになる。

これらの手法には一定の信頼性があるが、今後は分子生物学的な手法も有効になってくるであろう。たとえば、当研究所では血中エクソソームに含まれるマイクロ RNA (miRNA) を網羅的に解析して性周期の予測や妊娠判定を実施する計画を進めており、ウシ血清からの効率的なエクソソーム回収法を報告している<sup>(28)</sup>。エクソソームは脂質二重層の膜をもつ小胞で、内部に核酸やタンパク質を含んでいる。エクソソーム内部の miRNA は疾患のマーカーとなる<sup>(29)</sup>などさまざまな生命現象に関わっているため、性周期のさまざまな時期の血液を採取して内容物を網羅的に解析することによって、性周期の予測に有効なマーカーとなる miRNA が発見される可能性がある。また、妊娠判定においても同様にエクソソーム中の miRNA が有効なマーカーとなる可能性がある。

また、当研究所では、着床から胎盤形成までに起こる脱落膜形成に着目し、そこで重要な働きをする遺伝子である *Esr1* および *Dedd* の定量化による妊娠判定の実用化へ向けての研究を進めている。マウスを用いた研究では、妊娠判定、さらには着床遅延の判定も可能であることが示されている<sup>(30)</sup>。

トランスクリプトームやプロテオームに代表される網羅的解析が主流となっている現在においては、網羅的解析による新規マーカーの同定が性周期の予測や妊娠判定に大きく貢献するであろう。

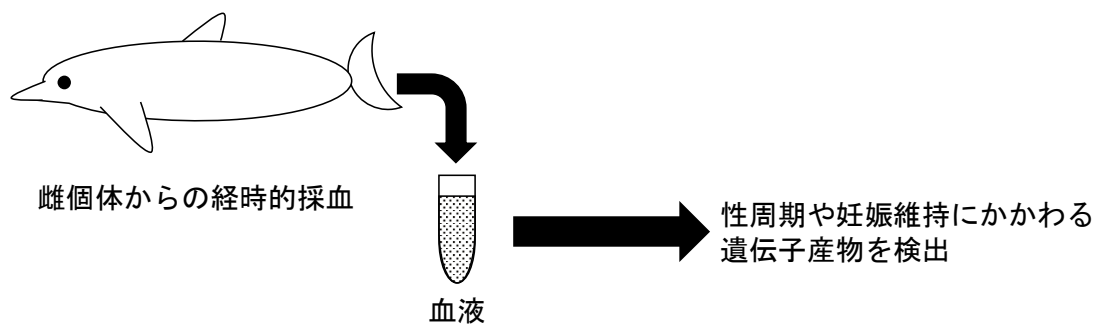


図 3. 血液サンプルを用いた性周期の予測および妊娠判定

### おわりに

本稿では野生動物の域外保全に必要な人工繁殖技術として 3 つの技術を紹介したが、これらにとどまらず、あらゆる人工繁殖技術が遺伝的多様性の維持に貢献することになるであろうことは疑いない。技術の実用化のためには基礎研究が必要であり、野生動物種を対象とした分子生物学的、生殖工学的、細胞生物

学的な研究が広がることが望まれる。野生動物種が基礎研究に用いられる例は多くはないが、その主な理由は試料の入手が困難なためであり、その動物の生理学的特性によるものではない。すなわち、これまで知られていなかっただけで実は基礎研究に適している動物種が存在する可能性がある。さまざまな野生動物種の繁殖生理、配偶子形成、幹細胞生物学に関する基礎研究を進めていくことで、これまで実験動物、家畜、ヒトでは発見できなかった知見が得られ、それを家畜増産や生殖医療に応用していくという従来とは逆の方向を提示する可能性を有していることも野生動物種における研究の魅力である。

大学等の研究機関と動物園・水族館等の施設の密なパートナーシップにより、野生動物種の基礎研究が進み、遺伝的多様性の維持をともなった人工繁殖技術が広く実用化される日を期待したい。

最後になるが、野生動物種の人工繁殖技術に関する共同研究を実施していただいているアドベンチャーワールド、大阪市天王寺動物公園事務所、オキナワマリンリサーチセンター、富山市ファミリーパーク、広島市安佐動物公園、日本ドルフィンセンターに深い謝意を表す。

## 参考文献

- (1) 成島悦雄 (2104) 動物園学入門 (村田浩一、成島悦雄、原久美子・編)、pp. 46-50、朝倉書店
- (2) 中野かおり (2016) 種の保存における動物園の役割、立法と調査 382, 29-37.
- (3) 環境省ホームページ (<https://www.env.go.jp/nature/kisho/global/washington.html>)
- (4) 経済産業省ホームページ  
([https://www.meti.go.jp/policy/external\\_economy/trade\\_control/02\\_exandim/06\\_washington/index.html](https://www.meti.go.jp/policy/external_economy/trade_control/02_exandim/06_washington/index.html))
- (5) 外務省ホームページ (<https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/kankyo/jyoyaku/wasntn.html>)
- (6) 正田陽一 (2104) 動物園学入門 (村田浩一、成島悦雄、原久美子・編)、pp. 74-77、朝倉書店
- (7) 石原理、片桐由起子、桑原章、桑原慶充、左勝則、浜谷敏生、原田美由紀 (2020) 令和元年度倫理委員会登録・調査小委員会報告 (2018年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および2020年7月における登録施設名)、日本産科婦人科学会雑誌 72(10)、1229-1249.
- (8) 福井大祐 (2006) 生物多様性の保全を目指した野生動物の人工繁殖と細胞保存：地球の健康を守るため動物園水族館ができること、日本野生動物医学会誌 11(1)、1-10.
- (9) Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A. S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.
- (10) Whittingham, D. G. (1977) Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at  $-196^{\circ}$  C. *Journal of Reproduction and Fertility* 49, 89-94.
- (11) 福岡敏夫 (1996) 希少動物の配偶子バンク、遺伝 50, 35-39.
- (12) 大沼学、水野恵理子、中島友紀、田島淳史 (2013) 絶滅危惧種の培養細胞および遺伝資源凍結保存とそれらを活用した基礎研究について (動物園との連携事例紹介)、日本野生動物医学会誌 18, 7-10.
- (13) Howard, J. G., Lynch, C., Santymire, R. M., Marinari, P. E., Wildt, D. E. (2016) Recovery of gene diversity using long-term cryopreserved spermatozoa and artificial insemination in the endangered black-footed ferret. *Animal Conservation* 19, 102-111.
- (14) Main, D. (牧野建志(訳)) (2021) 絶滅危惧種クローンイタチのクローン誕生、保護に光、ナショナルジオグラフィックホームページ  
(<https://natgeo.nikkeibp.co.jp/atcl/news/21/022100085/>)

- 
- (15) 安齋政幸、野田義博、東里香、山鹿優真、佐藤翔太、齋藤勝彦、尾崎美樹、安達那央子 (2019) キングペンギン(*Aptenodytes patagonicus*)由来精液のグリセロール不含凍結保存法の開発～凍結融解精子の形態学的考察～、野生動物保全繁殖研究会誌 3, 22-23.
- (16) 安齋政幸、野田義博、石渡俊行、大澤郁朗、東里香、山鹿優真、山崎脩杜、佐藤翔太、齋藤勝彦、尾崎美樹、安達那央子 (2019) キングペンギン(*Aptenodytes patagonicus*)由来精液を用いたグリセロール不含凍結保存法の評価～凍結融解後の精子形態の一考～、第25回日本野生動物医学学会大会要旨集 pp.155.
- (17) Hikabe, O., Hamazaki, N., Nagamatsu, G., Obata, Y., Hirao, Y., Hamada, N., Shimamoto, S., Imamura, T., Nakashima, K., Saitou, M., Hayashi, K. (2016) Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature* 299, 299-303.
- (18) Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., Thomson, J. A. (2009) Human Induced Pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797-801.
- (19) Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H., Yamanaka, S. (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods* 8, 409-412.
- (20) Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H. K., Nagy, A. (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- (21) Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., Woltjen, K. (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775.
- (22) Kawaguchi, T., Tsukiyama, T., Kimura, K., Matsuyama, S., Minami, N., Yamada, M., Imai, H. (2015) Generation of Naïve Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors. *PLoS One* 10, e0135403.
- (23) Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y. S., Usui, J., Knisely, A. S., Hirabayashi, M., Nakauchi, H. (2010) Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 142, 787-799.
- (24) Goto, T., Hara, H., Sanbo, M., Masaki, H., Sato, H., Yamaguchi, T., Hochi, S., Kobayashi, T., Nakauchi, H., Hirabayashi, M. (2019) Generation of pluripotent stem cell-derived mouse kidneys in Sall1-targeted anephric rats. *Nature Communications* 10, 451.
- (25) Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., Saga, Y. (2003) Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301, 1239-1241.
- (26) Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., Saitou, M. (2008) Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nature Genetics*. 40, 1016-1022.

- (27) Hildebrandt, T. B., Hermes, R., Colleoni, S., Diecke, S., Holtze, S., Renfree, M. B., Stejskal, J., Hayashi, K., Drukker, M., Loi, P., Göritz, F., Lazzari, G., Galli, C. (2018) Embryos and embryonic stem cells from the white rhinoceros. *Nature Communications* 9, 2589.
- (28) 笠原喜斗、河野竜平、池上春香、越智浩介、宮本圭、松橋珠子、松本和也 (2020) 牛血清からのエクソソーム回収法の検討、近畿大学先端技術総合研究所紀要 25, 27-34.
- (29) 落谷孝広 (2017) miRNA の最新知識～基礎領域から診断・治療応用まで～、pp. 11-15、医薬ジャーナル社
- (30) 安齋政幸、藤野奈央、堀光一郎、尾崎美樹、野田義博、松本和也 (2021) マウス血清を用いた初期の妊娠維持に必須な *Dedd* 遺伝子の発現解析の一例、近畿大学先端技術総合研究所紀要 26, 11-18.



## 英文抄録

## Artificial Reproductive Techniques in Wild Animal Species

Satoshi Kurosaka<sup>1</sup>, Masayuki Anzai<sup>1</sup>

Conservation of biodiversity is an urgent issue on this planet where many species face to extinction now. The conservation programs ongoing in animals are *in situ* conservation (conservation of ecosystems in the natural habitat to maintain or recover the population of species), and *ex situ* conservation (maintain or recover the population of species outside their natural habitat by artificial reproduction at zoos, aquariums, etc.). In both conservation programs, maintenance or recovery of population and genetic diversity are required, and the establishment of artificial reproduction using the germ cells from as many individuals as possible for successful *ex situ* conservation. Here, we introduce and discuss three potential reproductive techniques to achieve successful *ex situ* conservation, 1) germ cell preservation and artificial insemination, 2) *in vitro* production of germ cells, and 3) prediction of estrus and detection of pregnancy.

**Key words : artificial reproduction, wild animal species, genetic diversity, *ex situ* conservation**

---

1. Institute of Advanced Technology, Kindai University, Wakayama 624-0017, Japan