

希少野生動物の遺伝子工学的増殖による生物（動物）多様性の回復と復元

Restoration of Bio-(Animal-) diversity by Artificial Reproduction of Endangered and/or Extinct Wild Animals using Genetic Engineering and Developmental Biology

藤原 昇
Noboru FUJIHARA

九州大学大学院農学研究院・教授

Professor, School of Agriculture, Graduate School Kyushu University,
Fukuoka 812-8581 Japan

In the present studies, two kinds of endangered wild animals, the giant panda and the crested ibis, were examined for a possibility of increasing the number of individuals in the captivity and/or wild condition. Some of the recently developed biotechnologies were tried to use for this purpose. However, only few results were obtained from the experiments which were carried out in China and Japan. In particular, most interesting findings were the creation of chimeric chicken between peafowl and hens. Another interesting results were also the chimeric birds by the method of cell fusion among poultry breeds by using primordial germ cells or somatic cells. These new findings would be useful for the production of the chimeric animals derived from the panda or crested ibis in the very near future.

1. 研究目的

本研究の目的は、現在、筆者の研究室で行われている生殖生物学に関する基礎的研究を応用して、希少野生動物である「パンダ」と「トキ」の保護と増殖に貢献することができるかどうか、その可能性を追求することである。具体的な研究内容は、次のようなものである。

- ① 鶏始原生殖細胞（PGCs）の胚間移植によるキメラ鶏の作出：白色レグホーン種を主体とした希少家禽あるいは希少野鳥の遺伝子の保存と個体復元を目指して行うものである。
- ② 死亡個体から採取した体細胞の凍結保存と組織養による細胞の増殖と利用：鶏、牛、豚、熊の皮膚組織を採取して、その可能性を追究した。
- ③ 鶏体細胞を利用したキメラ鶏の作出：白色レグホー

ン種とロードアイランドレッド種を利用して、電氣的に融合した細胞を受精卵の胚盤葉下腔に注入してキメラ鶏を作出する技術を開発するものである。

- ④ 異種間キメラ鶏の作出に関する研究：動物園動物（クジャク）を利用して実施した。この場合、細胞融合に際しては、ポリエチレングリコール（PEG）を使用した。

- ⑤ PGCsの体外培養技術の開発：生殖系列キメラ鶏を作出するために、PGCsを体外培養によって増殖させることを目的とした。

- ⑥ 家禽精子の簡易凍結保存技術の開発：将来、「トキ」その他の希少鳥類精子の体外保存を効率的に行うための方法も開発である。

- ⑦ 「パンダ」と「トキ」を利用した実際研究：これまで中国で行われてきた生態観察を中心とした研

究も重要なので、これに関する研究成果も論文として報告する。

2. 研究経過

今回、上記の目的を達成することと、それを利用した「バンダ」や「トキ」の実験ができるか否かの問題があった。中国側が相手では、多くの難題が課せられ、事態はスムーズには進まなかった。しかし、それでもなお、基礎的研究で数多くの新知見を得ることができたのは幸いであった。

その主なものの研究経過を簡単に述べると、以下のようになる。

①我が国の希少家禽の一種である「愛媛地鶏」を使用して、PGCsの胚間移植による研究を行った。この場合、PGCsの性判別を行って、胚間移植が同性の場合と異性の場合を比較して、生殖腺の発育機構の解明に迫った。また、このように処理した鶏（雌雄）が性成熟に達した場合、人工受精を行って、ドナー遺伝子の次世代への伝達についても検討した。

②死亡した個体から組織を採取して、凍結保存し、さらに融解して細胞培養を行って、その細胞を利用した細胞融合について検討した。また、死亡個体が室温状態で、どれくらいの期間放置できるものなのか、その限界を探った。さらに、このようにして採取した細胞を融合したり、あるいはその細胞から除核する方法などについても検討した。

③これには、白色レグホーン種とロードアイランドレッド種を用い、ドナーに白レグ、レシピエントにロードを設定した。体細胞は、成鶏の皮膚から採取した。それらの細胞を培養すると、ほとんどが繊維芽細胞となるが、この細胞を使用した。これには若干の問題もあるが、遺伝子(DNA)には差異がないので、判定には問題ないものと考えられた。

④これが本研究のメインポイントであるが、今のところ順調である。まず、「トキ」の代わりに使用した「クジャク」の細胞は、初期胚(孵卵9日目)の体細胞である。これを分離して培養すると、繊維芽細胞となって増殖する。この細胞をPEGを含む液で培養すると増殖率が向上する。このように処理した細胞を鶏の受精卵(孵卵前)の胚盤葉下腔に注入した後、孵卵を開始した。

⑤これまでの筆者の研究室における予備実験で、ある種の細胞増殖因子あるいは各種の血清、さらには鶏初期胚に出現する生殖三日月環の細胞をフィー

ダー細胞として使用すると、PGCsの増殖率が向上することを確認している。そこで、今回は、これをさらに改良するとともに、体外において、PGCsが機能分化するのではないかと考えて一歩前進した実験を企てた。

⑥家禽の精子を凍結保存する場合、これまでの報告によると、融解後、膣に注入する前に、凍結保護物質を除去する必要がある。これは実用化を考えた場合には、決定的に不利な条件となる。そこで、本方法は、融解後、直接雌の膣内に注入することによって受精させるというもので、まさに画期的である。また、凍結方法も、プログラムフリーザーなどを使用しないで、単にストローを液体窒素上で凍らせ、直ちに液中に投入するもので極めて簡単な方法である。

⑦中国の研究機関で、これまで実施されてきた「バンダ」と「トキ」に関する研究の主なものは、(1)「バンダ」の卵巣卵子の組織構造学的観察と卵子の体外培養、(2)「バンダ」精子の電気的刺激による採取、(3)「バンダ」精子の凍結保存と人工授精、ならびに「トキ」に関しては、(1)人工解卵(孵化)に関する研究、(2)人工飼育・繁殖した「トキ」の野生への復帰、(3)「トキ」の疾病に関する調査研究などである。

3. 研究成果

上記のような実験を展開して得られた成果の一部を紹介すると、

(1) PGCsの胚間移植を行った愛媛地鶏と白色レグホーン種との間でキメラが作出された。しかし、初生雛の外観はほとんど白レグと同じであったが、2~3カ所に黒っぽい斑点が認められた。それ以外は、全く白レグと同じであった。ところが、このキメラ鶏(雌雄)同志の交配(人工授精)によって得られた雛のなかにほとんど愛媛地鶏と同じ羽装をした個体が見られた。これはPGCsの胚間移植によって出来た愛媛地鶏の復元であると認められた。しかし、これも100%地鶏ではなく、限りなくそれに近いものであるということになる。それでも、この方法によって絶滅の危機に曝されている希少家禽を復元できる可能性は示唆されたものと考えている。

(2) 死亡した個体から組織を採取して凍結保存し、融解後それを体外培養して体細胞を得ることが出来た。この場合、鶏では、死亡後、約1週間は、室温

(22~25C)でそのまま放置しても、細胞は生きてることが確認された。さらに、培養細胞を融合させることにも成功した。今回、野生動物として、ヒグマの皮膚組織から細胞を得ることにも成功したので、これは即「パンダ」に応用できるものと思われる。また、牛と豚の皮膚組織から得られた細胞を融合することにも成功したので、今後は、この融合細胞を使用して、キメラ個体ができれば望外である。さらに、この異種間の細胞から、除核を行うことにも成功したので、今後は、このように処理した細胞と核の移植を行ってみたいと考えている。

(3) ついで、同種間(鶏間)での体細胞移植によるキメラ鶏の作出であるが、これにも成功した。この場合、今回の例では、とくに外観と生殖腺の発達が異なっていたのが特徴的である。すなわち、白色と褐色の羽毛を呈したが、鶏冠は雄で、生殖腺は雄(精巢)という個体があった。しかも、その精巢中に雌の遺伝子(W-染色体)が認められた。このことは、この方法でも、生殖腺キメラが作出される可能性を示唆している。もし、この技術が確立されれば、将来的には、異種間においても同様な現象が見られるかもしれないという期待感がある。

(4) 本研究のメインポイントである異種間キメラの作出に成功したのは大きな収穫であった。とくに、染色体数が異なる場合には、生存キメラの作出は難しいと言われてきたので、今回の成功は、これまでの常識を打破するもので、将来への大きな希望を与えたことになる。また、今回も、同種間キメラの場合と同様に体細胞を利用したという点はユニークである。さらに、培養細胞をある種の化学試薬で処理したのも、細胞融合を促進する意味では大きな役割を果たしたことになる。加えて、今回も生殖腺にドナーの遺伝子を取り込まれたのも、今後、野生動物を利用する場合には、大きなメリットになるであろう。今後は、このキメラ鶏同志の交配(人工授精)によってどのような個体が発生するのか興味がある。そして、もし、この方法で、前述した愛媛地鶏の場合と同様に、ドナー個体と同じ個体が復元出来れば、まさに絶滅危惧種の個体復元につながり、今後、飛躍的な発展が期待できる。

(5) これまで、余り成功例のなかったPGCsの体外培養技術の開発であるが、これについても、今回、大きな進展がみられた。すなわち、これまでの方法とは、大きく異なり、フィーダー細胞に、生殖腺の

発達部位である生殖三日月環という組織を利用したことがポイントである。すなわち、生殖腺が分化する直前の組織を利用するのが要点である。したがって、発生の5日目を外すと、その組織の作用は全く認められないと言うほどの厳しさである。しかし、考えてみると、胚の初期発生段階では、微妙な変動が大きくなるポイントになるということも理解できる。さらに、今回の新発見は、このような条件下で、PGCsを培養すると、30日目ごろになると、PGCsを包む細胞塊が形成され、しかも、内部の細胞は全てPGCsという状態になる。ひょっとすると、これから生殖腺が形成されるのではないかとと思われるくらいである。これは、もっと培養条件あるいはその他の条件を整えれば、体外で生殖腺の形成機構がある程度解明できるのではないかとと思われるほどの新発見である。

(6) 今回の手法は、簡単であることがポイントである。これまでの方法は全て、プログラムフリーザーを使用するもので、時間がかかり、しかも野外で簡単に実施できるものではなかった。しかも、とくに中国のように、まだ十分な資材や施設設備の整っていない環境で、精液の凍結保存技術を応用するためには、それにマッチした効率良い方法を考案する必要がある。その意味で、今回開発した簡易凍結保存法は、世界中の至る所で実施可能である。さらに、ドライアイスや超低温フリーザーのような特殊な機器も必要とせず、どこでも入手可能な液体窒素を利用する、この方法は便利なものとなるであろう。また、これまでやっかいな方法とされていた凍結保護剤を除去する必要もなく、融解後直ちに腔内に注入できることが何よりも効果的である。

(7) これまで中国において検討されてきた「パンダ」と「トキ」に関する研究で、とくに注目すべき成果は、(1)「パンダ」の卵巣には、約5%程度で、「1卵胞2卵子」の組織構造が観察されるが、これが「パンダ」の双子生産と関係があるのか否かについては、明確な解答を得ることは出来なかった。しかし、いずれにしても、「パンダ」には、他の家畜とは異なった特殊な卵巣卵子が存在することは確認された。また(2)卵巣卵子の体外培養に関しては、培養液の組成や微量栄養素の含量あるいはビタミンやミネラル含有量に関しても、今後検討すべき点が多くあることが示唆された。したがって、今後の研究に期待がかかっている。(3)「パンダ」

の精液の凍結保存については、これまでの方法である程度、満足できる成果は得ることができた。また、人工授精に関しては問題が多く、とくに受胎率が低いのが課題である。これについては、自然交配においても同様な成績であるので、根本的に「バンド」の繁殖、とりわけ、受精率と受胎率の向上には、科学的に解明すべき多くの問題が残されている。

(4) 「トキ」の人工解卵(孵化)に関しては、解卵3週間は自然の巣の中で、その後人工解卵器で1週間解卵するという折衷案で良好な孵化率を得ることができた。また、(5)人工飼育・繁殖した個体(雌雄)が、本来の解卵・孵化・育雛を行うことが出来るかどうかという課題に関しては、ベストペアーを、他のグループから完全に隔離した状態で飼育することが必要である。この方法だと、立派に子育てができることが確認された。この人工飼育・繁殖条件下で管理された野生動物が野生へ復帰する問題が、最も重要でしかも最も困難な仕事である。もし、これがスムーズに移行できるシステムが開発されたならば、希少野生動物の人工増殖と個体群維持の問題も大きく改善されるものと思われる。

4. 今後の課題と発展

難題の多い中国との共同研究ではあったが、筆者は人間関係を築きながら、ゆっくりと仕事を進めてみた。この間に、徐々にではあるが、事態が好転する兆しが見えてきた。また、一方で、中国の若い研究者を当大学の大学院学生として入学させたり、あるいは中国の中堅研究者に学位(博士)を授与することなどで、ようやくこの国の厚い壁に穴が開きそうになった。筆者は、中国の4つの研究機関から客座教授の称号をいただいたり、また希少野生動物の保護・増殖研究に関する国家プロジェクトの学術検討委員会の委員に任命されるなど、いわば「がんじがらめ」の態ではあるが、それでも所期の目的が達成されれば「よし」としなければなるまい。それにしても、この研究を開始して、早7年が過ぎた。

しかし、「ぶつぶつ」言いながらやってきたこの研究に対して、どうしたことか平成14年度「日本農学賞」と「読売農学賞」が授与された。夢想だにできなかった筆者にとって、これは最高の退官記念であり、また、華々しい第二の人生のスタートでもあった。と同時に、このような研究に対して2年間、温かい研究支援をいただいた「日産科学振興財団」に

対して、心から感謝する次第である。

5. 発表論文リスト

- Arima T, Ebara H and Fujihara N.J. Appl. Anim. Res., 20: 65-72 (2001).
Aritomi S and Fujihara N. Asian J. Androl., 2: 271-275 (2000).
Ebara F and Fujihara N. J. Reprod. Dev., 46: 177-182 (2000).
Ebara F and Fujihara N. J. Appl. Anim. Res., 18: 33-40 (2000).
Ebara F and Fujihara N. J. Reprod. Dev., 46: 73-83 (2000).
Fang GL, Zhou HC, Xi YM, Cao YH, Fu WK, Lu BZ, Nakaya Y and Fujihara N. Jpn. J. Zoo Wildl. Med., 5: 93-97 (2000).
Fujihara N. and Xi YM. Asian-Aus. J. Anim. Sci., 13: 1026-1034 (2000).
Fujihara N, Xi YM and Zhang MJ. J. Appl. Anim. Res., 19: 33-47 (2001).
Fukushima R and Fujihara N. J. Poult. Sci., 38: 152-159 (2001).
Furuta H, Kim KB and Fujihara N. J. Appl. Anim. Res., 17: 209-216 (2000).
Furuta H, Kinoshita K, Maeda Y and Fujihara N. J. Poult. Sci., 38: 302-307 (2001).
Nakaya Y and Fujihara N. J. Mamm. Ova Res., 18: 52-57 (2001).
Toba M, Ebara H, Furuta H, Matsushima Y, Kitagawa Y and Fujihara N. Asian J. Androl., 3: 49-53 (2001).
Xi YM and Fujihara N. Jpn. J. Zoo Wildl. Med., 5: 115-122 (2000).
Xi YM and Fujihara N.J. Appl. Anim. Res., 19: 177-186 (2001).
Xi YM, Ku BZ and Fujihara N. J. Poult. Sci., 38: 213-224 (2001).
Yamaguchi H, Xi YM and Fujihara N. Cytotechnol., 33: 101-108 (2000).
Zhang MJ, Zhang ZH, Hou R, Li GH, Yu JQ, Zhang AZ and Fujihara N. J. Mamm. Ova Res., 18: 48-51 (2001).