

称号及び氏名 博士(獣医学) 辻本 恭典

学位授与の日付 2021年3月31日

論文名 ネコ科動物種の保存に向けた体外受精における新技術の
活用に関する研究

論文審査委員 主査 杉浦 喜久弥
副査 川手 憲俊
副査 松林 誠
副査 鳩谷 晋吾

緒言

近年、環境破壊による生息地の減少や違法な狩猟のため、多くのネコ科動物が絶滅の危機に瀕している。生物の多様性を維持するためには、配偶子の保存や体外胚発生などの生殖補助医療技術を利用して絶滅危惧種を人工的に増やすことが必要である。しかし、絶滅危惧種のネコ科動物では、精巣や卵巣などの研究材料の入手が難しく、絶滅危惧種の生殖補助医療に関する研究は困難である。そこで、身近な動物であるイエネコで研究を行い、その結果をネコ科動物に応用することが行われている。

体外胚発生は、未成熟卵子を成熟卵子に育てる「体外成熟 (in vitro maturation: IVM)」、成熟卵子に雄性配偶子を接続する「体外受精 (in vitro fertilization: IVF)」および受精卵を個体発生可能な胚盤胞期胚までに育てる「体外培養 (in vitro culture: IVC)」の3つの過程から成る。このうち、IVFにおいて、近年受精および精子保存に関する新技術が開発された。そこで本研究では、ネコ科動物種の保存のため、これら新技術を活用し、イエネコの配偶子を用いてIVFにおける問題の解決を試みた。

卵子と精子を共培養して受精させる通常のIVFでは、精巣上体内にある運動性のある成熟精子しか使用できないため、死亡した個体や性成熟していない個体の精巣内にある運動性の無い造精細胞を利用できない。この運動性の問題に関しては、顕微鏡下において卵細胞質内に直接精子を注入するintracytoplasmic sperm injection (ICSI)法によって解消できる。しかしながら、従来のICSI法 (Conventional ICSI法: Conventional法)は、先端が鋭利な微細ピペットを用い、透明帯を破壊して卵子内に精子を注入するため、卵子の損傷が大きく、成熟精子を用いても受精率やその後の胚子形成が低くなるという新たな問題があった。近年開発されたPiezo ICSI法 (Piezo法)は、圧電素子 (piezo electric element)の伸縮を利用して0.1 μm 以下の超微動を微細ピペットに持たせたもので、先が平たんなピペットを用いて透明帯および卵細胞膜をスムーズに貫通させ、先端を卵細胞質に到達できるため、卵子の損傷をきわめて軽減させることができる。さらに、手技が容易であるため、習得に必要な期間が短縮でき、また、安定した受精率が得られる。

一方、配偶子の確保には精子の保存および輸送の簡易化も重要である。現在、液体窒素下で精子を保管する方法が主流であるが、定期的に液体窒素の補充が必要であり、温度変化に弱く輸送するために手間がかかるという問題がある。これに対し、フリーズドライ技術を応用することで解決しようとする試みが行われている。

本研究では、ネコ精巣内造精細胞のPiezo法を用いた体外受精による胚発生およびネコ精子の保存におけるフリーズドライ技術の有効性について検討を行った。

第一章 Piezo法を用いたネコ精子の顕微授精

本章では、ネコの精巣上体 (成熟)精子を用いてPiezo法による胚発生の有効性を検証した。Conventional法による受精では、胚発生を促すために必要なカルシウムの波状性上昇による卵子の活性化が起きにくい。そのため、受精卵を7%エタノールへ浸漬して活性化させる処置が行われており、それによって胚盤胞期胚の発生率が上昇することが報告されている。そこで、Piezo法における卵子活性化処置の必要性も併せて検討した。

雄ネコより摘出された精巣上体から精子を回収し、液体窒素を用いて凍結保存した。次に、雌ネコより摘出された卵巣から未成熟卵子を回収し、28時間IVMした。得られた成熟卵子の卵丘細胞を剥がし、Piezo法により凍結保存精子を成熟卵子内に注入して受精させた。体外受精においては、未受精卵子が単為発生すると報告されており、顕微授精の手技による単為発生を確認するために、精子を用いずに同様の処置を施したsham群をcontrol群とした。すべての受精卵を5% O₂、5% CO₂下で培養し、2日後に卵割率、7日後に桑実胚率、胚盤胞期胚率を比較した。また得られた胚盤胞期胚の質を評価するため、胚盤胞期胚をヘキスト染色し、細胞数を比較した。卵割率および桑実胚発生率はエタノールによる活性化処置群が活性化未処置群と比較して有意に高かった。しかしながら、胚盤胞期胚の発生率は、活性化処置群(9.1±2.8%, n=140)と活性化未処置群(9.2±2.6%, n=124)の間に有意差はなく、活性化の影響は認められなかった。しかし、既報のConventional法での胚盤胞期胚発生率(5.4%)に比べ高い結果となった。さらに、胚盤胞期胚細胞数も活性化処置の影響は認められなかった。また、control群における胚盤胞期胚の形成はなかった。

以上の結果から、Piezo法により卵子活性化処置を行わずにネコ胚盤胞期胚の効率的な作製が可能であることがわかった。

第二章 伸長精子細胞および精巣内精子を用いた顕微授精

造精細胞は精巣内に存在している精母細胞から精巣内精子のことを指し、造精細胞のもつ卵子活性化作用は細胞の種類ごとに異なることが報告されている。そのため、造精細胞を用いた顕微授精を行うには、正確に細胞を判別することが重要とされている。造精細胞の中で伸長精子細胞および精巣内精子は形態で容易に判別可能であり、ウサギやマウスでは成熟精子を用いたICSIと同様の手法で受精卵が作製できると報告されている。そこで、本研究では、ネコの精巣内精子と伸長精子細胞を用いてPiezo法による胚盤胞期胚の作製を試みた。

ネコ精巣を細かく切断して作製した精子懸濁液から精巣内精子および伸長精子細胞を形態により選別した。第一章と同様の手順で準備した成熟卵子内に精巣内精子、伸長精子細胞および成熟精子をPiezo法により注入し、5% O₂、5% CO₂下で培養した。その後、第一章と同様に卵割率、桑実胚率、胚盤胞期胚率および胚盤胞期胚細胞数を比較した。また、7%エタノールによる活性化の影響も検討した。その結果、精巣内精子および伸長精子細胞を注入した卵子の卵割率、桑実胚発生率、胚盤胞期胚発生率および胚盤胞期胚の細胞数は、成熟精子を注入した卵子とほとんど差がなかった。また、活性化処置によって、精巣内精子注入卵子では卵割率が、伸長精子細胞注入卵子では卵割率と桑実胚発生率が有意に上昇していたが、胚盤胞期胚発生率および胚盤胞期胚の細胞数に影響は認められなかった。

以上の結果から、Piezo法によりネコの精巣内精子および伸長精子細胞から胚盤胞期胚を作製することができ、その質も成熟精子と同等であることがわかった。

第三章 フリーズドライ技術を用いたネコ精子の保存

第一節 ネコフリーズドライ精子の DNA 損傷評価

近年、フリーズドライ技術を利用した精子の保存法がマウスやラットで利用されている。フリーズドライ精子は保存時に液体窒素が不要であり、4°Cや室温で保存可能であることが報告されている。また、フリーズドライ精子は常温で航空機による輸送も可能である。一方で、フリーズドライされた精子は保存中に精子内に存在する Ca 依存性エンドヌクレアーゼにより DNA 損傷が発生すると報告されており、この損傷を軽減させるために Ca キレート剤である EDTA や EGTA を含む培地がフリーズドライ精子の保存液に使用されている。そこで、本研究でも Tris-EDTA buffer を用いてネコフリーズドライ精子を作製した。4°Cで1か月保存したフリーズドライ精子に純水を加えて復水後、DNA 損傷をアクリジンオレンジ染色によって評価した。新鮮精子および1か月間液体窒素で凍結保存した精子を同様に染色して比較したところ、フリーズドライ精子の DNA 損傷率は、新鮮精子に比べて有意に高いものの、凍結保存精子と比べて有意な差はなかった。また、形態的な変性もほとんど認められなかった。

以上の結果から、ネコの精子においても、Ca キレート剤を含む buffer を用いてフリーズドライすることにより、精子の DNA を液体窒素下での凍結保存精子と同程度に保持できることが判明した。

第二節 ネコフリーズドライ精子を用いた顕微授精

4°Cで1か月以上保存したネコフリーズドライ精子および精巣上体から回収した新鮮精子を Piezo 法によって成熟卵子内へ注入し、第一章と同様に、卵割率、桑実胚発生率、胚盤胞期胚率および胚盤胞期胚の細胞数を新鮮精子と比較したところ、すべてにおいて有意な差が認められなかった。またフリーズドライ精子が4°Cの保存下で最大何か月保存できるか検討したところ、4°Cで5か月保存したフリーズドライ精子でも Piezo 法によって胚盤胞期胚を形成させることができた。

以上の結果より4°Cで1か月間保存したネコフリーズドライ精子は新鮮精子と同質の胚盤胞期胚を形成できることがわかった。また、ネコフリーズドライ精子は4°Cの保存で5か月間は胚発生能を保つことがわかった。

総括

1. Piezo 法により卵子活性化処置を行わずにネコ胚盤胞期胚の効率的な作製が可能である。
2. Piezo 法によりネコの精巣内精子および伸長精子細胞から成熟精子と同じ質をもつ胚盤胞期胚を作製することができる。
3. Ca キレート剤を含む buffer を用いてフリーズドライすることにより、ネコ精子の DNA を液体窒素下での凍結保存精子と同程度に保持できる。
4. フリーズドライ後4°Cで保存したネコ精子は、1か月後においても新鮮精子と同じ質をもつ胚盤胞期胚を形成でき、5か月間は胚発生能を保つことができる。

審査結果の要旨

近年、環境破壊による生息地の減少や違法な狩猟のため、多くのネコ科動物が絶滅の危機に瀕している。絶滅を防ぎ、生物の多様性を維持するには、生殖補助医療技術によって絶滅危惧種を人工的に増やす必要があり、中でも体外胚発生は非常に有効な手段である。しかし、絶滅危惧種のネコ科動物では、精巣や卵巣などの入手が難しく、研究材料とすることは困難である。そこで、身近な動物であるイエネコの配偶子を用いて研究を行い、その結果をネコ科動物に応用することが行われている。

体外胚発生は、未成熟卵子を成熟卵子に育てる「体外成熟」、成熟卵子に雄性配偶子を接続する「体外受精」、および受精卵を個体発生可能な胚盤胞期胚までに育てる「体外培養」の3つの過程から成る。このうち、体外受精において、受精法および精子保存に関する新技術が近年開発された。卵子と精子を共培養して受精させる通常の体外受精では、精巣上体内にある運動性のある成熟精子しか使用できないため、運動性の無い精巣内の未成熟精子や精細胞を利用できない。この運動性の問題については、顕微鏡下で卵細胞質内に精子を注入する **intracytoplasmic sperm injection (ICSI)** 法によって対応できるが、従来の ICSI 法では、先端が鋭利な微細ピペットを用いて強靱な透明帯を穿通する際に卵子を変形させるなど、卵子に与える損傷が大きかった。近年開発された **Piezo ICSI 法 (Piezo 法)** は、**piezo electric element** の伸縮を利用した **0.1 μm** 以下の超微動によって、透明帯をスムーズに貫通できるため、卵子の損傷をきわめて軽減させることができる。一方、精子の保存については、液体窒素下での凍結保存が主流であるが、定期的に液体窒素の補充が必要であり、温度変化に弱く、輸送において手間がかかるという問題がある。これに対し、フリーズドライ技術を用いることで解決しようとする試みが行われている。そこで本研究では、ネコ科動物種の保存に向け、これら新技術を活用してイエネコの配偶子を用いて体外受精における問題の解決を試みている。

第1章では、**Piezo 法**による体外受精のネコ胚発生への有効性を検証している。従来の ICSI 法では、胚発生を促すために必要なカルシウムの波状性上昇による卵子の活性化が起きにくいいため、受精卵の7%エタノールへの浸漬による活性化処置が必要である。そこで、**Piezo 法**における卵子活性化処置の必要性も併せて検討している。体外成熟卵子に **Piezo 法**によって凍結保存した精子を体外受精した後、体外培養を行ったところ、卵割率および桑実胚発生率は、活性化処置群の方が未処置群よりも有意に高いものの、胚発生の最終段階である胚盤胞期胚の発生率は、活性化処置群 (**9.1 ±2.8%, n=140**) と未処置群 (**9.2 ±2.6%, n=124**) との間に差がなく、**Piezo 法**では受精卵の活性化が必要ないことを認めている。また、本結果は、既報での従来 ICSI 法による胚盤胞期胚発生率 (**5.4%**) に比べて高く、さらに、単為発生も見られていない。以上の結果から、**Piezo 法**による体外受精は、ネコ体外胚発生において非常に有効であることが明らかになってい

る。

第 2 章では、造精細胞を用いた **Piezo** 法による体外受精の胚発生への有効性を検証している。活性化処理または未処理のネコ精巣内未成熟精子および伸長精子細胞を **Piezo** 法により体外成熟卵子に受精させ、同様に成熟精子を受精させたものと胚発生を比較したところ、胚盤胞期胚発生率については、有意な差はなく、胚盤胞期胚の質を示す胚盤胞期胚細胞数については、ほとんど同じであることを認めている。以上の結果から、**Piezo** 法による体外受精は、未成熟個体から採取可能な精巣内の未成熟精子および伸長精子細胞を用いた体外胚発生に有効であることが明らかになっている。

第 3 章では、フリーズドライ技術を用いたネコ精子の保存について検討している。**Ca** 依存性エンドヌクレアーゼによる **DNA** の損傷を軽減するため、**Tris-EDTA buffer** を用いて作製したネコフリーズドライ精子を 4 で 1 か月保存した後、復水して **DNA** 損傷率を調べたところ、新鮮精子に比べて有意に高かったものの、同期間凍結保存した精子に比べて有意差はなく、また形態的な変性もほとんどないことを認めている。このフリーズドライ精子を **Piezo** 法によって体外成熟卵子に受精させ、同様に新鮮成熟精子を受精させた卵子と胚発生を比較したところ、卵割率、桑実胚発生率、胚盤胞期胚率および胚盤胞期胚の細胞数ともに有意差がないことを認めている。さらに、4 で 5 か月保存したフリーズドライ精子でも胚盤胞期胚を形成できることを認め、フリーズドライ法が精子の中長期保存に有効であることを明らかにしている。

以上、本研究の成果は、ネコ科動物種の保存に有用であるだけでなく、繁殖学および生殖医学の新たな展開に資するものであり、よって、本論文の審査ならびに最終試験と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。