

始原生殖細胞を用いた家禽資源保存法の確立

中村隼明 (広島大学大学院 生物圏科学研究科)

ynsu@hiroshima-u.ac.jp

ニワトリとウズラは、実験動物として古典的に利用されているのみならず、高品質なタンパク質である卵や肉を生産するための産業動物(家禽)として世界中で広く飼育されている。従って、ニワトリとウズラ資源の凍結保存は、実験モデルや産業有用品種のバックアップと、育種改良に不可欠な遺伝的多様性の保全という2つの観点から極めて重要である。しかし家禽では、ほ乳類で確立された精液や胚の凍結保存が技術的に困難であり、主に生体で維持されている。しかし、生体の維持はコストが高く、高病原性鳥インフルエンザ等の感染症の発生によって消失するリスクを抱えている。本稿では、胚発生期に出現する始原生殖細胞 (PGC) を移植して精子と卵へ分化させる借り腹生産技術を利用した家禽資源の凍結保存法および今後の展望について述べる。

はじめに

家禽資源の凍結保存は主要な家畜と比較して大幅に立ち遅れており、基盤技術の開発は早急に対応すべき課題であった。PGCは初期発生で出現する精子と卵の前駆細胞である。鳥類では、胚体外で出現したPGCが血流中を一過的に循環して生殖巣へ移動する¹⁾。先行研究において、PGCを採取し、宿主胚の血流中に移植して、配偶子へ分化させる技法がニワトリで開発された²⁾。この借り腹生産と呼ばれる技術は、家禽資源の凍結保存への応用が期待されてきた。しかし、PGCの採取・凍結保存・移植などの操作の効率と借り腹生産技術を利用した個体復元の効率が低いことや、ニワトリ以外の種への発展性の証明など問題が山積しており、これらが実用化を阻んできた。そこで受賞者は、これらの問題を一つ一つ解決・改善し、実用に手が届くまでに技術体系を纏め上げた。

ニワトリ PGCの採取と移植の最適期

先行研究において、PGCが一過的に血流中を循環する鳥類特有の性質を利用してPGCの採取と移植が行われてきたが、その最適期は分かっていなかった。そこで受賞者は、生殖細胞マーカーであるVasaの発現を利用してニワトリ PGCを単一細胞レベルで可視化し、PGCの胚体外から血管内への移動過程と、血管内から生殖巣への移動過程を詳細かつ定量的な解析にした。その結果、ニワトリ PGCは発生段階 (st) 11から血管内への移動が始まり st.13では全て血流中を循環し、st.15から将来の生殖巣付近への局在が始まり st.17ではほぼ全て局在することを明らかにした³⁾。この結果は、ニワトリ PGCの採取と移植の適期はそれぞれ st.13~14 と st.13~16であると示唆した。

ニワトリ PGCの凍結保存法の改善

先行研究において、凍結保存したニワトリ PGCを宿主胚へ移植することにより機能的な精子と卵へ分化することが示されたが、凍結融解操作に伴う PGCのロスが多かった⁴⁾。そこで受賞者は、ニワトリ PGCの緩慢凍結法に適切な凍結保護液を比較選定した。その結果、移植後の生着能を維持したまま凍結融解後の回収率と生存率が向上したことにより、既法と比較して凍結保存に伴う PGCのロスが低減された⁵⁾。本法は、様々なニワトリ品種のみならず、ウズラやキジ等にも汎用できたことか

ら、これまで受賞者が取り組んできた家禽資源のジーンバンク事業において PGC 凍結保存の標準プロトコルとして利用してきた⁸⁾。

胚を最大限有効活用した PGC 採取法の開発とニワトリ希少品種保存の実践

これまで、ニワトリ PGC を採取・凍結保存する代償として、PGC を採取した胚のロスが伴ってきた。しかし、我が国の在来品種である日本鶏などの希少品種は飼養規模が小さく、年間産卵数が極めて少ないため、得られる受精卵の数が制約される。そこで受賞者は、貴重な受精卵を最大限有効活用するために、血中から PGC を採取・凍結保存し、採血した胚を温存して孵化させる方法を開発した。この方法により、天然記念物である岐阜地鶏の貴重な受精卵 88 個から、PGC 4562 個を採取・凍結保存し、うち 12 羽を正常な繁殖能を有する生体として温存した。続いて、6 ヶ月以上凍結保存した PGC を融解後に宿主胚へ移植することにより、凍結 PGC に由来する精子と卵を産生させることに成功した。また、これらの宿主ニワトリ同士を交配することにより、岐阜地鶏 6 羽を復元することにも成功した (図 1)⁹⁾。



図 1. 借り腹生産技術を用いて復元した岐阜地鶏

宿主ニワトリ (白色: 左および右) 同士の交配によって復元された凍結 PGC 由来の岐阜地鶏 (茶色: 中央)。Nakamura *et al.*: *Reproduction, Fertility and Development* 22(8): (2010) の表紙写真より。

内在性 PGC 除去胚を利用した効率的な個体復元法の開発

これまで、様々な方法によってニワトリ宿主胚の内在性 PGC の除去が試みられた。しかし、効果的な方法がなく、借り腹生産技術を利用してドナー PGC 由来の産仔を効率的に得ることができなかった。そこで受賞者は、X 線照射あるいは薬剤 (ブスルファン) 投与による内在性 PGC 除去法の開発に取り組んできた^{10,11,12,13)}。

PGC が血流中を循環する時期に X 線を照射した結果、照射量依存的に内在性 PGC が除去された。続いて、X 線照射胚 (3 Gy) にドナー PGC を移植して検定交雑した結果、ドナー PGC 由来の産仔の割合は、非照射区と比較して有意に高いことが示された (27.5% vs 5.6%)¹⁰⁾。

ブスルファン投与によるニワトリ PGC の除去に関する報告はこれまでもあったが、薬剤を発生中の胚へ定量的に輸送することができないため、内在性 PGC の除去効果が安定しないという問題があった。そこでまず、発生中のニワトリ胚が卵黄の頂点に位置する性質を利用し、ブスルファンが溶解した低比重の乳化液を調整して卵黄中へ注入することにより、薬剤を胚へ輸送する方法を開発した。初期胚生殖巣における内在性 PGC 数を指標に用いて除去効果を検討した結果、これまでの投与方法と比較して安定的かつ効率的な除去効果が確認された¹¹⁾。一方で、ブスルファンを投与する除去法は、薬剤が残留して後に移植するドナー PGC へ悪影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、初期胚生殖巣に生着したドナー PGC 数を指標に用いて残留効果を検討した結果、孵卵前にブスルファンを投与することで悪影響が最も低減されることが示唆された¹²⁾。本法による PGC 除去効果は濃度依存的であり、100 µg 以上の濃度では内在性 PGC がほぼ完全に除去された。そこで、ブスルファン投与胚

(100 µg) にドナーPGCを移植した宿主ニワトリを検定交雑した結果、ドナーPGC由来の産仔を平均99.5%の割合で得られた¹³⁾。



図2. 内在性PGCの除去による超高率的な個体復元

左図: 正常なニワトリ胚生殖巣(左)とブスルファン投与によって内在性PGCが除去された生殖巣(右)。

右図: ドナーPGC由来の精子と卵だけを産生する宿主ニワトリ(白色: 左および右) 同士の交配によって復元された産仔(黒色: 中央)。

Nakamura *et al.*: *Biology of Reproduction* 83(1): (2010) の表紙写真より。

PGCを用いたウズラ遺伝資源の保存・復元法の開発

ウズラは、実験動物や家禽として重要であるうえ、野生では環境省レッドリストにおいて絶滅危惧Ⅱ類に指定されるなど絶滅が危ぶまれている。しかし、これまではウズラ資源を凍結保存する方法がなく、その技術開発が急務であった。そこで受賞者は、ニワトリで確立したPGCの分離・凍結保存・移植法の発展性を、ウズラを用いて検討した。その結果、凍結保存・融解後のウズラPGCの回収率・生存率・移植後の生着能は、ニワトリと同程度であった。続いて、凍結保存したPGCを移植した結果、宿主ウズラ生殖巣内において機能的な配偶子へ分化した¹⁴⁾。以上の結果から、ウズラ資源の凍結保存を初めて実現した。

おわりに

今現在も多くの家禽資源が消失の危機に曝されている。遺伝資源は、一度損失した場合、再び取り戻すことができない。そのため、現存する家禽から積極的に遺伝資源を収集・凍結保存することは急務である。受賞者はこれまで、農業生物資源ジーンバンク事業(農研機構との共同研究)、比内鶏のPGC凍結保存事業(秋田県および農研機構との共同研究)、広島大学日本鶏資源開発プロジェクトセンターPGC凍結保存事業に取り組み、天然記念物9品種を含むニワトリ19品種とウズラ3系統のPGCを収集・凍結保存してきた^{8,15)}。一方で、PGCを用いた家禽資源保存法は、採取に限界があることが課題であった。最近、ニワトリにおいてPGCの長期培養の成功例が報告されたことにより、*in vitro*でニワトリPGCを無限に増殖できる可能性が示された¹⁶⁾。一方で、PGCの株化効率が低いことや、メスのPGCの長期培養が困難であること、ニワトリ以外の種には適応できないことなど、課題が山積している。そこで現在、これらの課題を解決するために、未分化性を維持した鳥類PGCの長期培養系の樹立に取り組んでいる。また、借り腹生産技術はライチョウ等の絶滅危惧種の保存・個体増殖への応用が期待されている¹⁷⁾。そこで現在、ニワトリに異種の生殖細胞を移植し、機能的な精子と卵を効率的に産生させる技術の開発にも取り組んでいる。

謝辞

本受賞にあたり、公益社団法人日本畜産学会よりご推薦を戴きました。寺田文典理事長をはじめ関係の諸先生方に厚くお礼申し上げます。本研究は、農研機構畜産部門 田上 貴寛 上級研究員ならびに信州大学農学部 鏡味裕 教授をはじめ、諸先生方に終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました。また、家禽 PGC の保存事業では、農研機構生物系特定産業技術研究支援センター 蕪澤圭二郎 研究リーダー、秋田県畜産試験場 力丸宗弘 主任研究員 ならびに広島大学大学院生物圏科学研究科 都築政起 教授の温かいご支援を賜りました。本研究の一部は、日本学術振興会 科学研究費補助金、財団法人信州農林科学振興会 研究助成ならびに日本医療研究開発機構 ナショナルバイオリソースプロジェクト 基盤整備プロジェクトのサポートを受けて実施しました。最後にいつも支えになる家族に心から感謝します。

引用文献

- 1) Nakamura Y., Kagami H., and Tagami T.: *Development, Growth & Differentiation* 55:20-40 (2013).
- 2) Tagami T., Miyahara D., and Nakamura Y.: *Avian Primordial Germ Cells*. In: *Avian Reproduction: From Behavior to Molecules* (Sasanami T. ed.), Springer Singapore, Singapore, 1-18 pp (2017).
- 3) Tajima A., Naito M., Yasuda Y., and Kuwana T.: *Theriogenology* 40:509-519 (1993).
- 4) Nakamura Y., Yamamoto Y., Usui F., Mushika T., Ono T., Setioko A. R., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., and Tagami T.: *Poultry Science* 86:2182-2193 (2007).
- 5) Naito M., Tajima A., Tagami T., Yasuda Y., and Kuwana T.: *Journal of Reproduction and Fertility* 102:321-325 (1994).
- 6) Setioko A. R., Tagami T., Tase H., Nakamura Y., Takeda K., and Nirasawa K.: *Journal of Poultry Science* 44:73-77 (2007).
- 7) Nakamura Y., Usui F., Miyahara D., Mori T., Watanabe H., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., and Tagami T.: *Journal of Poultry Science* 48:57-63 (2011).
- 8) Nakamura Y.: *Journal of Reproduction and Development* 62:431-437 (2016).
- 9) Nakamura Y., Yamamoto Y., Usui F., Atsumi Y., Ito Y., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., and Tagami T.: *Reproduction, Fertility and Development* 20:900-907 (2010).
- 10) Nakamura Y., Usui F., Miyahara D., Mori T., Ono T., Kagami H., Takeda K., Nirasawa K., and Tagami T.: *Journal of Reproduction and Development* 58:432-437 (2012).
- 11) Nakamura Y., Yamamoto Y., Usui F., Atsumi Y., Ito Y., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., and Tagami T.: *Reproduction, Fertility and Development* 20:900-907 (2008).
- 12) Nakamura Y., Usui F., Atsumi Y., Otomo A., Teshima A., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., and Tagami T.: *Journal of Poultry Science* 46:127-135 (2009).
- 13) Nakamura Y., Usui F., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., and Tagami T.: *Biology of Reproduction* 83:130-137 (2010).
- 14) Nakamura Y., Tasai M., Takeda K., Nirasawa K., and Tagami T.: *Journal of Reproduction and Development* 59:580-587 (2013).
- 15) 中村隼明・力丸宗弘・高橋大希・小松恵・高橋利清・田上貴寛: *日本家禽学会誌*, 53: J7-J14 (2016).
- 16) van de Lavoie M. C., Diamond J. H., Leighton P. A., Mather-Love C., Heyer B. S., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L. T., Gessaro T. M., Swanberg S. E., Delany M. E., Etches R. J.: *Nature* 441:766-769 (2006).
- 17) Nakamura Y.: *Avian Biotechnology*. In: *Avian Reproduction: From Behavior to Molecules* (Sasanami T. ed.), Springer Singapore, Singapore, 187-214 pp (2017).