

はじめに

地球規模での環境破壊により現在多くの野生動物が絶滅の危機に瀕しており、これらの種の保存は我々人類の急務である。このような切迫した状況の中で、我々は、数年前にわが国の複数の動物園や大学、研究機関などと「希少動物人工繁殖研究会（会長：加藤征史郎神戸大学教授）」を結成し、絶滅の危機に立たされた野生動物の人工繁殖のための技術協力や情報交換などの活動を開始した^{1,2)}。

ここでは、野生動物の精子銀行について「希少動物人工繁殖研究会」が実施している「配偶子バンクプロジェクト」の紹介を中心に、主としてチーター(*Acinonyx jubatus*)を例に挙げながら概説する。

1. チーターの現状

陸上で最も早く走る動物として有名なチーターは、この種単独で一属 (*Acinonyx*属) を形成するネコ科の野生動物で、今世紀初頭にはアフリカからインドにかけてのサバンナに10万頭以上が生息していたと推測されている³⁾。しかし、美しい毛皮を目的とした乱獲、また開発や戦争による生息地の環境破壊とそれに伴う餌動物の減少などが原因で生息数は激減し、アジア地域ではほぼ絶滅し、アフリカでもまとまった野生個体群が見られるのは東部と南部の一部の地域のみで、現在の総生息数は約1万頭とみられている⁴⁾。

チーターを含めた野生動物の種の保存は、本来の生息地で行われるのが理想であるが、それが困難な場合、生息地外の動物園などで累代繁殖しながら行う必要がある⁵⁾。チーターの場合、総生息数の1割に当たる約1000頭が、世界の約180の動物園などで現在飼育されており、これらの飼育下個体が種の保存に果たす役割は極めて大きい。チーターの飼育下個体保有数世界第3位のわが国でも、日本動物園水族館協会の種の保存委員会が繁殖推進種に指定し、ブリーディングローンなどの繁殖のための取り組みを積極的に行っている⁶⁾。しかし、チーターはネコ科の野生動物のなかでは飼育下での自然繁殖が特に難しく、そのため繁殖生理の詳細な解明と効率的な人工繁殖技術の確立が切望されている。

2. 精子銀行とは

野生動物の種の保存の場として動物園が担う責務の重大さは上述の通りである。しかし、チーター1種を取り上げても、動物園の限られた飼育スペースで、生息地の自然環境が回復して野生復帰可能となるまで、遺伝的多様性を維持しながら累代繁殖し続けることは至難の業である。だが、もし動物を生体ではなく精子や卵母細胞(卵子)のような配偶子あるいは胚の形で小さな容器に入れ、復元可能な状態で半永久的に保存できれば、飼育スペースの制約の問題は相当解消できる。また飼育にかかる莫大な経費も不要となる。そして、その間に生息地の環境回復を図り、それが実現できた段階で保存しておいた配偶子や胚から生体を作成して野生復帰を行う。このような発想から生まれたのが我々の「配偶子バンクプロジェクト」(精子銀行)であり、欧米ではGenomeまたはGenetic Resource

Bankなどの名称で動物園と研究機関が共同してかなり早くから取り組まれている⁷⁻⁹⁾。

3. 精子銀行の実際

我々の「配偶子バンクプロジェクト」では、まず精子を入手し、その性状の分析と記録を行った後に凍結保存し、将来の利用に備えている。

a. 精子の入手

野生動物でも人に馴れた個体であれば、家畜や家禽で行われている人工膣法や腹部マッサージ法で精液を採取することが可能である。実際、我々もキジ科に属するシロカケイ (Crossoptilon crossoptilon)、アオカケイ (C. auritum)、ヒオドシジュケイ (Tragopan satyra) およびハイイロコクジャク (Polyplectron bicalcaratum) の4種の野生鳥類からは腹部マッサージ法で精液を採取しており、そのうちのシロカケイでは得られた精液を新鮮な状態で人工授精して産子の作出に成功している (福岡ら, 未発表)。またチーターでも、おとなしい個体は馴化が比較的容易であるため、米国のサンディエゴ動物園では精液の採取を人工膣法で行っている^{10,11)}。

しかし、これらはむしろ例外的なケースであり、一般には電気射精法¹²⁾が用いられている。電気射精法では、直腸に電極棒を挿入して適度な電気刺激を与えることにより射精を促す。この方法では、動物側に構造上または機能的な欠陥がない限り理論的にはどの様な個体からも精子の採取が可能であり、遺伝的多様性の維持の点では有用な方法と言える。ただ、通電の度に動物に強度の全身硬直が生じるため、事故の危険性や動物に対するストレスが危惧されている。しかし、米国国立動物園のWildtら¹³⁾は、電気射精中やその前後のチーターの血液中のコルチゾール濃度の変化を調べ、電気射精によるストレスがそれほど大きくないことを明らかにしている。また、我々もこれまでに後述のチーター¹⁴⁾を含むニホンジカ (Cervus nippon)、ニホンザル (Macaca fuscata) およびワオキツネザル (Lemur catta) の4種の哺乳類の雄10個体で電気射精法を20回近く試みているが、一度も事故はなく、後遺症が残ることもなかった。

精子を入手する別の手段として死体から回収する方法もある。この方法は、動物の死後できるだけ早いうちに精巣と精巣上体および精管を摘出し、精巣を細切するか、あるいは精巣上体や精管を灌流して精子を回収するもので、特殊な器具や技能を一切必要とせず、また動物への負担の心配も全く考える必要がなく、直ちに実行可能である。日本動物園水族館年報によれば、1年間にわが国の動物園で死亡する動物 (哺乳類、鳥類、爬虫類および両生類) の数は雌雄併せて約7000個体以上と報告されており (平成5年度¹⁵⁾ および6年度¹⁶⁾)、この方法を全国規模で組織的に行えば、かなりの種類の精子を相当数集めることが可能である。ちなみに、我々はこれまでに関西の4つの動物園で死亡したグラントシマウマ (Equus burchelli boehmi)、グレビーシマウマ (E. grevyi)、アミメキリン (Giraffa camelopardalis reticulata)、マサイキリン (G. c. tippelskirchi)、ボンゴ (Tragelaphus euryceros)、セーブルアンテロープ (Hippotragus niger)、カバ (Hippopotamus amphibius)、カラカル (Felis caracal)、アムールトラ (Panthera tigris altaica)、アカカンガルー (Macropus rufus)、メガネカイマン (Caiman crocodilus) およびミズオオトカゲ (Varanus salvator) の12種18個体の雄動物からこの方法で精子の回収に成功している¹⁷⁾。

b. 精子の性状の分析と記録

野生動物の場合、雌の発情周期や配偶子の性状と言った繁殖生理に関する基礎的な知見がかなり不足している。したがって、入手した配偶子の性状の分析と記録は極めて重要な作業である。また、その分析結果は、配偶子の保存方法や将来産子を作成する場合に用いる人工繁殖技術を選択する際の判断基準にもなる。

精子の場合、性状の分析項目として最低限、精子の形態、精子数または精子濃度、精子運動性および精子生存性を調べる必要がある。また、生体から精液として採取した場合には精液の量も記録する。なお、電気射精法を用いた場合には、精液に尿が混入していないかどうかを確かめるため精液の色や臭い、pHなどにも注意する。さらに、可能であれば精液の化学組成や精子の微細構造なども調べる。なお我々は、受精の際に重要な働きをする精子内小器官で、凍結保存の際に特に損傷を受けやすいことが知られている先体の染色性についても動物種毎に詳細な検討を行っており、チーターでは、ナフトールイエローS・エリスロシンB染色¹⁸⁾が先体染色法として適当であることを見いだしている(楠ら,未発表)。

精子の性状は動物種毎に当然異なるが、野生動物の精子の性状は全般的にみて、家畜化されている動物のものに比べると劣悪である。また、精子の性状は入手方法によっても異なる。特に死体から回収する方法では、死亡時の年齢や死因、また繁殖季節のある動物では死亡時期によって、精子が全く回収されなかったり、回収されても全く運動していなかったり、形態の損傷が著しいことが多い。しかし、たとえ動いていなくとも形態が正常で生きた精子が少数でも入手できれば、卵細胞質に精子を直接注入する顕微授精法¹⁹⁾(ICSI)を適用することによって、産子の作出の可能性は十分考えられるものと我々は確信している。

c. 精子の凍結保存

野生動物の精子の凍結保存については、様々な動物種でかなり古くから試みられている¹²⁾。しかし、材料の入手が困難で十分な研究が行えないことから種毎にオリジナルな方法が開発されているわけではなく、ほとんどの場合、家畜化されている近縁の動物種の方法がそのまま利用されている。我々の「配偶子バンクプロジェクト」でも基本的には、哺乳綱奇蹄目に属する野生動物ではウマの方法を、偶蹄目では家畜ウシの方法を、チーターを含めた食肉目ではイヌやネコの方法を、霊長目ではヒトや実験動物化されているサル類の方法を、また鳥綱や爬虫綱ではニワトリの方法を用いて精子の凍結保存を行っている。これらの方法が各動物種に真に最適か否かについては、後述のように検討の余地のあるところである。しかし、最終的にICSIを適用するのであれば、凍結傷害を受けていない精子が融解後にごく僅かでも得られればよいわけで、動物種毎に完璧な保存法を開発する必要性は少ないと考えられる。

精子の保存方法には、凍結保存のほかにも4～5℃または15℃前後で保存する液状保存がある。精子へのダメージは凍結保存よりも液状保存のほうが小さいが、液状保存の保存期間は1日から長くても2週間以内と極めて短い。上述のように野生動物の精子の性状はあまり良くないので、保存に際してもできるだけダメージの少ない方法が望ましい。したがって、精子をごく近い将来に人工繁殖に供することがわかっている場合には、液状保存で十分である。

4. チーターの電気射精精液の性状と凍結保存の試み¹⁴⁾

姫路セントラルパークで飼育・展示中の雄チーターに全身麻酔を施した後、直腸に直径18mmの環状4極電極棒を肛門から10~15cm挿入して3~4分程度の休憩を2~5回挟みながら5、10または15Vの電圧を1~30秒間隔で1~10秒間通電することを繰り返して射精を誘起した。なお、休憩時間を除く電気刺激の総所要時間は1~12分で、この間に与えた刺激の総回数は8~79回であった。この方法を2~15才の7頭の雄で12回試み、全回で精液が採取された。精液の性状は個体間で、また同一個体でも採取毎にかなりの変動が見られた。得られた精液の総量と精子の総数はそれぞれ0.16~2.15mlと0.9~66.8×10⁶個であった。なお、電気射精法では精液はいくつかの分画として採取され、分画間でも性状には差が見られた。良好な運動性を示す精子を多く含む分画における生存精子率、精子運動性および奇形精子率は、それぞれ59.3~96.7%、10±30++~85+++および40.4~91.8%で、特に奇形精子率の高さが顕著であった。

チーターの電気射精精液の性状については前出の米国国立動物園²⁰⁻²⁴⁾やサンディエゴ動物園²⁵⁾、またカナダのトロント動物園²⁶⁾の研究者らも調べており、我々が調べた個体の精液性状は大体これらの研究者らの報告値の範囲内であった。また、これらの研究者らのいずれもがやはりチーターでは奇形精子率が非常に高いことを指摘している。チーターにおける奇形精子率の高さは、飼育下個体に限ったことではなく、野生個体でも同程度であることが明らかにされており²¹⁾、特に飼育下でのストレスに起因するものではない。チーターは種全体の遺伝的多様性が著しく低く²⁷⁾、血縁関係のない個体間で皮膚移植を行っても拒絶反応が出ないことが報告されており²⁸⁾、奇形精子率の高さの原因も遺伝的多様性の低さにあると考えられている²⁰⁾。また、チーターの精液性状と雄の繁殖性能との関係については、自然な交尾で雌を妊娠させる妊孕能とは特に関係しないとの報告がある²⁵⁾。しかし、精子の体外受精率や体外受精胚の発生率は、精子の奇形率や運動能力によって左右されることも報告されている^{23, 24)}。

チーター精子の凍結保存については、やはり米国国立動物園²⁹⁾やサンディエゴ動物園¹¹⁾の研究者らが家畜やイエネコで行われている方法を用いて試みており、我々もその方法に従って凍結保存を行った。すなわち、チーターの電気射精精液(良好性状分画)を8%グリセリンを含むPDV-62³⁰⁾(20%卵黄および抗生物質添加11%乳糖水溶液)で等倍希釈した後にストローに封入して液体窒素蒸気を用いた簡易凍結法により凍結し、液体窒素中で保存した。そして保存1~195日後に6個体の凍結精子を37℃の温水中で融解して性状を調べた。その結果、融解後の精子の運動性は、採精直後の9割近くまで回復したもののから1割程度しか回復しなかったものまでかなりの個体差が認められた。しかし、先体の損傷の度合いは全頭で高く、採精直後に75.8~95.3%であった正常先体保有精子率が、融解後には8.7~25.0%にまで低下していた。

チーターでは腹腔鏡を利用して子宮内に精子を直接注入する人工授精法³¹⁾で、既に10頭以上の産子が米国の動物園で生まれているが²⁴⁾、いずれも新鮮な精子を用いて得られた成果であり、凍結精子を使用した人工繁殖の成功例はまだ報告されていない。

おわりに

「希少動物人工繁殖研究会」が実施している「配偶子バンクプロジェクト」について概

説したが、本プロジェクトの最終目標は、絶滅の危機にある野生動物種を再び繁栄させることであり、種をただ凍結保存しておくことではない。そしてこの目標の達成には、生息地の自然環境を回復・再生する努力も平行して行ってゆかねばならない。

謝辞

本シンポジウムで紹介した「配偶子バンクプロジェクト」とチーターの研究（「チーター人工繁殖プロジェクト」）は、いずれも「希少動物人工繁殖研究会」の研究プロジェクトの一環として、岐阜大学農学部生物資源生産学科土井守助教授、姫路セントラルパーク、姫路市立動物園、群馬サファリパーク、京都市動物園および神戸市立王子動物園などの協力のもと行われたものである。また「チーター人工繁殖プロジェクト」は文部省科学研究費補助金（研究代表者：加藤征史郎、課題番号07660380）によって実施された。

引用文献

- 1)希少動物人工繁殖研究会: 第2回会議資料集 (1994)
- 2)希少動物人工繁殖研究会: 第3回会議資料集 (1995)
- 3)N.Myers: IUCN Monographs, 4, 1-90 (1975)
- 4)L.Marker-Kraus & D.Kraus: SWARA, Sep.-Oct., 8-12 (1993)
- 5)増井光子: 獣医畜産新報, 48(4), 297-301 (1995)
- 6)三宅 隆: 獣医畜産新報, 48(4), 308-311 (1995)
- 7)The World Zoo Organization & The Captive Breeding Specialist Group of IUCN/SSC: The World Zoo Conservation Strategy, 53-59 (1993)
- 8)D.E.Wildt: Anim.Reprod.Sci., 28, 247-257 (1992)
- 9)L.A.Johnston & R.C.Lacy: Cryobiology, 32, 68-77 (1995)
- 10)N.C.Pratt, B.S.Durrant & M.L.Patton: Biol. Reprod., 46(Suppl. 1), 94 (1992)
- 11)B.S.Durrant, M.L.Patton, N.C.Pratt & K.A.Biery: Biol.Reprod., 46(Suppl.1), 95 (1992)
- 12)P.F.Watson (ed.): Artificial Breeding of Non-Domestic Animals . Academic Press (1972)
- 13)D.E.Wildt, D.Meltzer, P.K.Chakraborty & M.Bush: Biol. Reprod., 30, 665-672 (1984)
- 14)楠 比呂志, 佐藤哲也, 安部智幸, 福重祥一, 坂田学, 佐々木豊, 西角知也, 田崎幸夫, 西田貴久, 長谷隆司, 福岡敏夫, 土井守: J.Reprod.Dev., 41(5), a18 (1995)
- 15)(社)日本動物園水族館協会: 平成5年度日本動物園水族館年報, 219-231 (1994)
- 16)(社)日本動物園水族館協会: 平成6年度日本動物園水族館年報, 133-143 (1995)
- 17)楠 比呂志, 福岡敏夫, 佐藤哲也, 富田隆司, 長谷隆司, 浜 夏樹, 松永雅之, 坂本英房, 帖佐綾子, 小林 桂, 福島護之, 土井 守: 日本畜産学会関西支部報.131, 41(1995)
- 18)J.H.D.Bryan & S.R.Akruk: Stain Technol., 52, 47-51 (1977)
- 19)K.Goto, A.Kinoshita, Y.Takuma & K.Ogawa: Vet.Rec., 127, 517-520 (1990)
- 20)D.E.Wildt, M.Bush, J.G.Howard, S.J.O'Brien, D.Meltzer, A.Van Dyk, H.Ebedes & D.J.Drand: Biol. Reprod., 29, 1019-1025 (1983)

- 21) D.E.Wildt, S.J.O'Brien, J.G.Howard, T.M.Caro, M.E.Rocelke, J.L.Brown & M.Bush: *Biol. Reprod.*, 36, 351-360 (1987)
- 22) D.E.Wildt, L.G.Phillips, L.G.Simmons, P.K.Chakraborty, J.L.Brown, J.G. Howard, A.Teare & M.Bush: *Biol. Reprod.*, 38, 245-255 (1988)
- 23) A.M.Donoghue, J.G.Howard, A.P.Byers, K.L.Goodrowe, M.Bush, E.Blumer, J.Lukas, J.Stover, K.Snodgrass & D.E.Wildt: *Biol.Reprod.*, 46, 1047-1056 (1992)
- 24) T.L.Roth, W.F.Swanson, E.Blumer & D.E.Wildt: *J. Exp. Zool.*, 271, 323-330 (1995)
- 25) D.G.Lindburg, B.S.Durrant, S.E.Millard & J.E.Oosterhuis: *Zoo Biol.*, 12, 97-103 (1993)
- 26) K.L.Goodrowe, G.J.Crawshaw & K.G.Mehren: *J. Zoo Wildl. Med.*, 22(1), 42-48 (1991)
- 27) S.J.O'Brien, D.E.Wildt, D.Goldman, C.R.Merril & M.Bush: *Science*, 221, 459-461 (1983)
- 28) S.J.O'Brien, M.E.Roelke, L.Marker, A.Newman, D.Winkler, L.Colly, J.F.Evermann, M.Bush & D.E.Wildt: *Science*, 227, 1428-1434 (1985)
- 29) D.E.Wildt, M.C.Schiewe, P.M.Schmidt, K.L.Goodrowe, J.G.Howard, L.G.Phillips, J.O'Brien & M.Bush: *Theriogenology*, 25, 33-51 (1986)
- 30) L.A.Johnston, A.M.Donoghue, S.J.O'Brien & D.E.Wildt: *Biol.Reprod.*, 45, 898-906 (1991)
- 31) D.E.Wildt, S.L.Monfort, A.M.Donoghue, L.A.Johnston & J.G.Howard: *Theriogenology*, 37, 161-184 (1992)