

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

公 募 区 分 : 革新型研究開発 (若手枠)

研究実施期間 : 令和3 (2021) 年度 ~ 令和5 (2023) 年度

課 題 番 号 : 【4RF-2101】

体系的番号 : (J P M E E R F 2 0 2 1 4 R 0 1)

研究課題名 : 「オガサワラシジミの再生を目指した凍結卵巣移植法の研究」

Research Title : Study on Cryopreservation of Butterfly Ovary for Future
Utilization of the Cryopreserved Tissues of
Celastrina ogasawaraensis

研究代表者名 : 小長谷 達郎

研究代表機関名 : 奈良教育大学

研 究 領 域 : 自然共生領域

キ ー ワ ー ド : 昆虫、鱗翅目、チョウ、生息域外保全、絶滅危惧種

令和6 (2024) 年5月

目次

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書	1
[課題概要]	3
1. はじめに（研究背景等）	5
2. 研究開発目的	5
3. 研究目標	6
4. 研究開発内容	6
5. 結果及び考察	7
6. 目標の達成状況と環境政策等への貢献	10
(1) 研究目標の達成状況	10
(2) 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献	11
7. 研究成果の発表状況	12
(1) 成果の件数	12
(2) 誌上发表	12
(3) 口頭発表	13
(4) 知的財産権	13
(5) 「国民との科学・技術対話」の実施	13
(6) マスメディア等への公表・報道等	13
(7) 研究成果による受賞	14
(8) その他の成果発表	14
8. 国際共研究等の状況	14
9. 研究者略歴	14
Abstract	15

別紙 公募審査・中間評価等への対応

[課題概要]

<課題情報>

公募区分：	革新型研究開発（若手枠）
研究実施期間：	令和3（2021）年度～令和5（2023）年度
課題番号：	【4RF-2101】
研究課題：	「オガサワラシジミの再生を目指した凍結卵巣移植法の研究」
研究代表者：	小長谷達郎（奈良教育大学、准教授）
重点課題（主）：	【重点課題⑬】生物多様性の保全に資する科学的知見の充実や対策手法の技術開発に向けた研究
重点課題（副）：	非該当
行政要請研究テーマ（行政ニーズ）：	非該当
研究領域：	自然共生領域

<キーワード>

昆虫
鱗翅目
チョウ
生息域外保全
絶滅危惧種

<研究体制>

サブテーマ1「オガサワラシジミの再生を目指した凍結卵巣移植法の研究」				
<サブテーマ1リーダー及び研究分担者>				
機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
奈良教育大学	理科教育講座	准教授	小長谷達郎	

<サブテーマ1研究協力者>

機関名	部署名	役職名	氏名
奈良教育大学	理科教育講座	専門補佐員	丸山海音
奈良教育大学	教育学部	学部生	浦崎琴弓（2023年度）

＜研究経費（間接経費を含む）＞

年度	直接経費	間接経費	経費合計
2021	4,140千円	1,242千円	5,382千円
2022	3,980千円	1,191千円	5,171千円
2023	3,258千円	977千円	4,235千円
合計	11,378千円	3,410千円	14,788千円

＜研究の要約＞

小笠原諸島の昆虫は外来生物の侵入等により危機的な状況にある。オガサワラシジミは、2018年以降の野外での発見がなく、特に深刻な絶滅の危機にある。ただし、オガサワラシジミでは配偶子や幼虫の卵巣などが凍結保存されており、これらを活用すれば新規個体を得られる可能性がある。昆虫類では家畜種のカイコで幼虫の卵巣を用いた凍結保存法が確立されてきた。この方法は、ドナー幼虫からの卵巣摘出・凍結・解凍・レシピエント幼虫への移植から構成され、凍結した未熟卵巣を別個体の体内で発達させ、凍結卵巣由来の卵を得る方法である。オガサワラシジミでは同種の個体を利用できないため、異種の体内で卵を発達させ、顕微授精によって受精させることが必要となる。しかし、狭義のチョウ類では卵巣の凍結保存の実績がなく、異種間移植や顕微授精の研究もない。そこで本研究では、オガサワラシジミの再生を目指した研究の第一歩として、キタキチョウで卵巣凍結保存を実施するとともに、キタキチョウと様々な類縁関係にあるチョウを利用して異種間移植に種間の類縁性が与える影響を調査した。さらに近親交配の進行した系統や衰弱した個体をドナーに用いた実験を実施した。キタキチョウではカイコの手法を調整することで過半数のレシピエントから成熟卵を得るができた。異種間移植でも成熟卵の形成される組合せがいくつかあり、その成否が種間の類縁性で決まるとはいえなかった。近親交配や絶食による衰弱は移植卵巣による成熟卵の形成に大きな影響を与えていなかった。本研究では4種のチョウの卵巣を凍結し、そのいずれもがレシピエント体内で卵黄を蓄積することを確認した。カイコの凍結保存技術は汎用性が高く、オガサワラシジミの再生のみならず、広範な種の生息域外保全に寄与するものと考えられた。他方、異種間移植の成否を決定する要因は不明で、その解明は今後の課題である。

1. はじめに（研究背景等）

小笠原諸島の昆虫は危機的な状況にある。海洋島の小笠原諸島は、東洋のガラパゴスと呼ばれ、独自の進化を遂げた固有の昆虫が多く生息している。その生物学的価値は非常に高い。ところが、小笠原諸島の昆虫は人為的改変や外来生物の侵入、気候変動といった諸問題にさらされてきた。特にこの半世紀の固有種の減少は著しく、その原因として侵略的外来生物であるグリーンアノールの増加が指摘されている（e.g. 荻部, 2009）。昨今もその脅威は衰えておらず、大規模な干ばつと合わさって、小笠原諸島の昆虫に対する大きな打撃になっている（荻部ら, 2019）。

オガサワラシジミは絶滅に瀕した小笠原諸島の昆虫の象徴である。特別天然記念物の本種は、独特な色彩の翅をもつ固有種で、市民の関心も高く、小笠原諸島の昆虫の代表格といえる。かつては小笠原諸島全域に生息していたが、1990年代に父島から姿を消し、最後の生息地であった母島でも2018年を最後に目撃されていない。オガサワラシジミ残された域外飼育個体群も2020年に途絶えたため、再発見がなければ日本で初めて種として絶滅した蝶になってしまう。

凍結保存の研究はオガサワラシジミやその他の絶滅危惧昆虫類の状況を改善する一助になると期待される。昆虫類では家畜種であるカイコにおいて幼虫の卵巣や精子を用いた凍結保存法が確立されてきた（e.g. Mochida et al. 2003; Banno et al. 2013）。この方法では、まずドナーとなる幼虫から卵巣を摘出し、緩慢凍結法により凍結保存し、解凍後にレシピエントと呼ばれる別の幼虫に卵巣を移植する。移植した卵巣内では卵成熟が生じるため、交尾や人工授精による受精や未受精卵の単為発生を誘発することで凍結保存された卵巣由来の個体を得ることができる。同様の手法は大型蛾類であるシンジュサンとエリサン及び甲虫目のナミテントウでも有効性が確認されている（Fukumori et al., 2017; Kawaguchi and Niimi, 2018）。オガサワラシジミでも生息域外飼育個体の配偶子や幼虫の卵巣が凍結保存されているため、これらを活用すれば、オガサワラシジミの新規個体を得られる可能性がある。ただし、オガサワラシジミの場合、凍結保存された細胞から個体を得るには凍結卵巣の異種間移植法の確立と凍結精子の顕微授精法の確立が前提となる。同種の幼虫が現存しない本種では凍結卵巣の成熟を近縁種の幼虫への移植に頼らざるを得ないし、交尾可能な雄を確保できない以上、顕微授精も必須となるためである。ところが、いずれの技術についてもその実現可能性は十分に評価されてこなかった。そこで本研究ではこのうちの卵巣凍結保存に着目した実験をおこなった。

Banno Y et al. 2013. Development of a method for long-term preservation of *Bombyx mori* silkworm strains using frozen ovaries. *Cryobiology*, 66(3), 283-287.

Fukumori H et al. 2017. Long-term preservation of *eri* and *ailanthus* silkworms using frozen gonads. *Cryobiology*, 77, 71-74.

Kawaguchi H, & Niimi T. 2018. A method for cryopreservation of ovaries of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 87(2), 35-44.

荻部治紀. 2009. 小笠原諸島における外来種が固有昆虫類に及ぼす影響とその緩和への方策. *地球環境*, 14(1), 33-38.

荻部治紀, 武田俊介, 筒井浩俊, 永野裕, 小山田佑輔, 戸田光彦. 2019. 小笠原諸島における 2016-2017 年の大干ばつが固有昆虫にもたらした影響: 固有トンボ類, 固有甲虫類, 固有半翅類のモニタリングデータから. *小笠原研究年報*, (42), 31-43.

Mochida Y, Takemura Y, Kanda T, Horie Y. 2003. Fertilized eggs obtained from transplantation of frozen ovaries and parthenogenesis in combination with artificial insemination of frozen semen of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cryobiology* 46:153-160.

2. 研究開発目的

本研究ではオガサワラシジミ再生を最終目的と設定し、その第一段階としてチョウ類における凍結卵巣移植法について研究した。まず、①チョウ類における凍結卵巣移植方法を研究するとともに、②異種間移植の成功率に種間の類縁性が与える影響を調べ、③近交弱勢や卵巣の状態が移植成功率に与える影響を調査した。近交弱勢や卵巣の状態の影響を調べたのは、絶滅危惧種においてはすでに近親交配が進んでいたり、衰弱した個体からしか卵巣を得られなかったりする可能性があるためである。また、理

想的にはオガサワラシジミの近縁種で研究すべきであるが、オガサワラシジミと同属の種はルリシジミとスギタニルリシジミの2種しか日本に生息していない。後者は年に1度しか成虫が出現せず、局所分布するため、研究が難しい。そこで本研究では、実験室で通年飼育できるキタキチョウを主な研究対象とした。本種には国内に複数の近縁種があり、その中には条件によって雑種をつくるほど近縁な種もある。キタキチョウは異種間移植がどれほど系統の離れた種まで可能かを調べるのに適切な研究対象といえる。

この研究は、オガサワラシジミの再生に必要なだけでなく、他の昆虫類の生息域外保全の選択肢を増やすという点でも今後の環境政策に貢献する。受精卵や生殖巣、生殖細胞が凍結保存されていれば、野外で絶滅した種を再生したり、絶滅危惧種の遺伝的多様性を回復したりすることが可能になる。実際、凍結保存は生息域外保全のひとつの選択肢として挙げられてきた。しかし、研究例が少ないためか昆虫類の保全には凍結保存が活用されてこなかった。本研究は実験昆虫で培われてきた凍結保存技術を絶滅危惧種の保全に拡張する試みでもある。

3. 研究目標

全体目標	キタキチョウで凍結卵巣の移植技術を確立するとともに、異種間移植の成功率に種間の類縁性や近交弱勢、卵巣の状態が与える影響を明らかにする。
------	---

サブテーマ1	「オガサワラシジミの再生を目指した凍結卵巣移植法の研究」
サブテーマ1 実施機関	奈良教育大学
サブテーマ1 目標	全体目標と同様

4. 研究開発内容

< 【サブテーマ1】 「オガサワラシジミの再生を目指した凍結卵巣移植法の研究」の研究開発内容 >

本研究では様々な条件でドナーの卵巣をレシピエントに移植する実験をおこなった。レシピエントには氷冷水麻酔を施し、グレース昆虫培地中でレシピエントが元々もつ2個の卵巣のうち、1～2個をドナーの卵巣と交換した。レシピエントは羽化後5～7日で解剖し、移植卵巣の有無と移植卵巣の発達の程度を調査した。移植卵巣の発達は、卵黄蓄積のないもの・絵卵黄蓄積のあるもの・成熟卵を発達させたものの3段階に分けた。なお、本研究では成熟卵を卵殻の形成されたものと定義した。オガサワラシジミの再生においては顕微授精が前提となるため、本研究では羽化したレシピエントが成熟卵をもっていれば移植を成功とみなした。

まず、キタキチョウの非凍結卵巣の同種間移植を試みた。様々な齢期の幼虫をドナー及びレシピエントとし、卵巣摘出や移植の方法について検討した。後述する実験結果に基づき、以降の実験では終齢幼虫にあたる5齢幼虫初期の個体を供試虫とした。また、先行するナミテントウの研究では手術後の幼虫を加湿環境下で保護する(Kawaguchi & Niimi, 2017)。そこでキタキチョウでも同様の処理が必要かを調査するために、手術後1日間の絶食期間中に相対湿度が100%になるように加湿した加湿群と相対湿度を60%に保った非加湿群で羽化率を比較した。

次に、キタキチョウにおいて液体窒素で凍結した卵巣の同種間移植を試みた。凍結方法は緩慢凍結法とし、凍結保護剤に入れた卵巣を凍結用コンテナあるいはプログラムフリーザーを用いて、毎分1℃

ずつ-80℃まで温度を低下させた。その後、サンプルを液体窒素に一度浸漬してから液体窒素タンク中で気相保存した。凍結卵巣は37℃ 2分の湯を用いて解凍した。解凍後の卵巣はグレース昆虫培地で洗浄し、レシピエントへの移植に用いた。羽化したレシピエントを解剖し、移植卵巣の発達の程度を評価した。この時、卵巣の周囲を保護して凍結する方法と摘出した卵巣を直接凍結する方法を比較した。

続いて、凍結卵巣の異種間移植実験を実施した。この実験ではキタキチョウとミナミキチョウ・タイワンキチョウ・モンキチョウ間で凍結卵巣の異種間移植を実施した。ミナミキチョウは、条件によってキタキチョウと雑種形成が可能な姉妹種である（廣木・加藤，2006）。タイワンキチョウはキタキチョウと同じ*Eurema*属で少し系統の離れた種である。モンキチョウはキタキチョウと同じモンキチョウ亜科で別属の種である。ミナミキチョウ・タイワンキチョウ・モンキチョウの5齢幼虫から卵巣を摘出し、キタキチョウと同様の手法で凍結保存し、解凍後にキタキチョウの5齢幼虫に移植した。羽化したレシピエントを解剖し、卵巣の発達の程度を評価した。

最後に悪条件が移植の成功率に与える影響を試験した。近親交配を1～2回経た系統の個体や2～6日間の絶食により衰弱した個体をドナーとし、キタキチョウの5齢幼虫に移植した。これらの条件が異種間移植に与える影響を調べるためにキタキチョウからミナミキチョウへの移植実験も実施した。さらに、オガサワラシジミの飼育集団の過去の標本を解剖し、オスの精子数の推移を調査し、キタキチョウの近交系統と比較した。

廣木眞達・加藤義臣（2006）「キチョウ」2種の間には存在する生殖隔離機構．昆虫と自然，41(5)：9-12
Kawaguchi, H., & Niimi, T. (2018). A method for cryopreservation of ovaries of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. Journal of Insect Biotechnology and Sericology, 87(2), 35-44.

5. 結果及び考察

<【サブテーマ1】「オガサワラシジミの再生を目指した凍結卵巣移植法の研究」結果及び考察>

・手術方法の検討（成果1, 2, 論文投稿中）

キタキチョウの手術適齢期を調査したところ5齢幼虫が適齢期と考えられた（図1）。3齢幼虫は体サイズが小さく手術を実施できなかった。同齢の卵巣を移植した4齢幼虫では羽化率が約1割（ $n = 13$ ）と、5齢幼虫の約6割（ $n = 29$ ）よりもはるかに低かった。この原因は、卵巣移植時の傷の大きさがピンセットの大きさに依存しているため、体サイズの小さい4齢幼虫への負荷が大きかったためと考えられた。

成熟卵を得るという目的ではドナーも5齢幼虫が適齢と考えられた。4齢幼虫をドナーに用いた場合も5齢幼虫をドナーに用いた場合も、羽化後の体内で移植卵巣を発達させたレシピエントが認められた。その割合は4齢幼虫がドナーの場合で羽化個体の約7割（ $n = 7$ ）であったのに対し、5齢幼虫では約5割（ $n = 17$ ）であった。成熟卵形成率は、ドナーが4齢幼虫（ $n = 7$ ）の場合でも5齢幼虫（ $n = 17$ ）の場合でも約1割であった。移植卵巣の発達の程度の差が小さかったため、本研究でのドナーは取り扱いが容易な5齢で十分とみなした。

手術後の個体の保護方法における加湿処理は必ずしも必要ないと考えられた。供試虫の卵巣を1つ除去した実験での羽化率は、非加湿群（ $n = 21$ ）でも加湿群（ $n = 20$ ）でも約6割であった。卵巣を2つ除去した実験では、羽化率が非加湿群で約5割（ $n = 19$ ）、加湿群で約2割（ $n = 11$ ）となり非加湿群の方が高い値を示した。一般化線形モデル（GLM）とバイズ情報量基準（BIC）を用いたモデル選択では、切片項のみを含むモデルが最適モデルであった。このことは加湿処理が羽化率にほとんど影響しないことを示唆している。

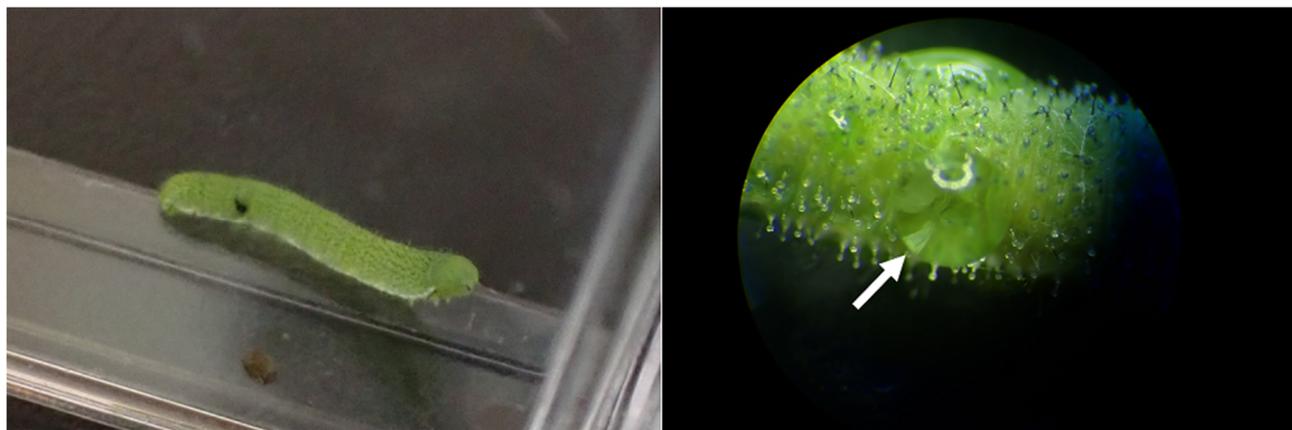


図1 卵巣移植手術を施した後のキタキチョウ5齢幼虫（左）とレシピエントの卵巣摘出の様子（右）。矢印で示した部分に卵巣を確認できる。

・凍結卵巣の同種内移植（成果1, 2, 3, 論文投稿中）

まず、本研究では小型のチョウ類の卵巣は周囲を保護した状態で凍結する必要があると考えられた。カイコと同じように卵巣を直接凍結保護剤に浸漬して凍結した場合は移植の直前の時点で20個の卵巣の半数に目に見える損傷が生じていた。一方、周囲を保護した状態で凍結した場合は移植直前に卵巣を組織から外してもそのような損傷を認めなかった。これはキタキチョウの卵巣が小さいため、凍結や洗浄の際に生じる物理的ダメージに脆弱であるためと考えられた。そこで以降の実験ではすべての卵巣について周囲を保護した条件で凍結した。

本研究は凍結保存したキタキチョウの卵巣が成熟卵を形成することを示した（図2）。移植卵巣はしばしば形態に異常があり、通常は1つの卵巣に4本あるべき卵巣小管の数が減少したり、卵巣小管同士が癒合したりしていた。しかし、そのような場合でも成熟卵が卵巣内に形成されていた。卵巣の形態異常は、非凍結移植の場合もみられたので、凍結による影響よりも移植による物理的ダメージによるものと考えられた。後述するように移植卵巣が消滅する場合もあるものの、移植卵巣が羽化後も保持されていれば、多くの場合卵黄の蓄積が認められた。

凍結卵巣の移植実験ではレシピエントの卵巣を2つともドナーの卵巣と交換することが重要と示唆された。卵巣を1つだけ交換移植した個体では、移植卵巣を発達させた雌は羽化個体の1割未満にすぎなかった（ $n = 35$ ）。卵巣を2つ交換移植した個体では羽化個体の約半数（ $n = 21$ ）が移植卵巣を発達させており、その差は大きかった。GLMとBICを用いたモデル選択でも、卵巣の交換移植数が重要な変数であることが示唆された。



図2 卵殻を有する成熟卵を形成したキタキチョウの凍結卵巣。

・凍結卵巣の異種間移植（成果2, 3）

ミナミキチョウからキタキチョウへの異種間移植実験では移植卵巣内に正常な形態の成熟卵が発育した（図3）。この実験は14個体について実施した。成熟卵の発達は羽化個体のおよそ半数の個体で認められ、キタキチョウの同種間の移植の場合と同等の値であった。

タイワンキチョウからキタキチョウへの異種間移植実験では成熟卵形成が認められなかった。この実験は23個体について実施した。羽化個体の約半数が移植卵巣を発達させ、そのさらに半数で卵黄の蓄積が認められた。しかし、成熟卵形成は認められなかった。

モンキチョウからキタキチョウへの異種間移植では移植卵巣内に成熟卵形成を認めたものの、卵のサイズは明らかに小型であった（図3）。この実験では卵巣を1つ移植したレシピエントが28個体いた。この実験では羽化個体のなかに移植卵巣を有する個体はみられなかった。卵巣を2つ移植したものは9個体で、羽化個体のすべてが移植卵巣を有していた。成熟卵を形成したのはこのうち2個体であった。

これらの結果は、異種間移植が十分に機能する場合のあることと、その成否を決定する要因が類縁性のみでないこと意味している。タイワンキチョウとキタキチョウの間の異種間移植実験では、成熟卵形成に至らなかったものの卵黄の蓄積は生じていた。キタキチョウでは、未交尾メスが羽化後5日以上経過しても成熟卵を発達させない場合が知られており、交尾刺激や幼若ホルモンの濃度上昇が重要という意見もある（Hiroki & Kato, 1996）。タイワンキチョウの卵巣を移植したキタキチョウでも交尾刺激等によって卵巣が発達する余地は残されているといえる。モンキチョウの成熟卵については体外受精や顕微授精の技術が確立されたのちに、その孵化能力を慎重に調査する必要があると考えられた。

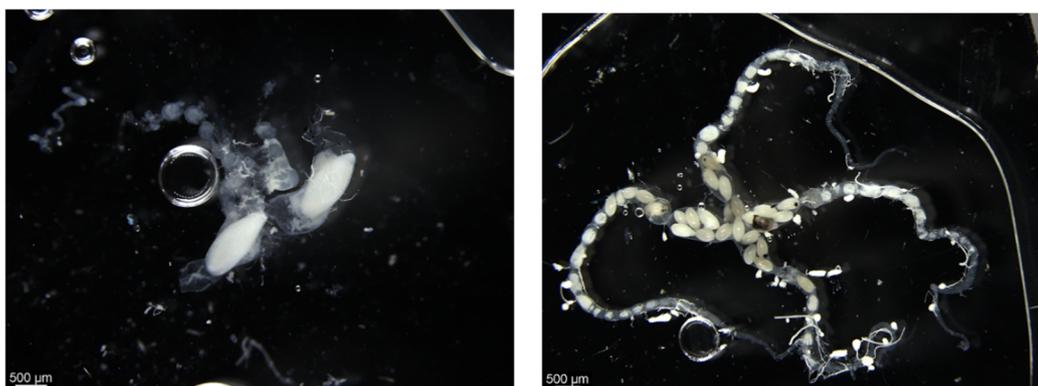


図3 キタキチョウの体内で発達したミナミキチョウ（左）とモンキチョウ（右）の移植卵巣。

・ドナーの近親交配や衰弱が移植に与える影響

近親交配の程度がキタキチョウの種内の凍結卵巣の移植成功率に影響するという証拠は得られなかった。1回近親交配した系統をドナーにする実験は13個体について実施し、羽化個体の約4割が成熟卵形成に至った。一方、2回近親交配した系統をドナーにする実験は2個体しか実施できなかった。これはキタキチョウが想定以上に近親交配に脆弱でほとんどの卵が孵化しなかったためである。しかし、この系統ではすべての個体が成熟卵形成に至った。ほとんどの卵が孵化しなくなる状況に追い込まれた系統でも、健全なレシピエントに卵巣を移植すれば、成熟卵を形成できるのかもしれない。

本研究ではドナーが衰弱していても卵巣の能力は失われまいと考えられた。キタキチョウの5齢幼虫を2・4・6日間絶食させて衰弱したドナーを準備した。これ以上の絶食は困難であった。絶食2日のドナーを用いた実験では13個体に移植を実施し、羽化個体の約4割で成熟卵を認めた。絶食4日のドナーを用いた実験では、21個体について移植を実施し、羽化個体の約6割から成熟卵を観察できた。絶食6日のドナーを用いた実験では22個体に移植を実施した。羽化個体のおよそ半数が成熟卵をもっていた。絶食日数が増えるほど成熟卵形成率が下がる傾向にはないようである。

近親交配や衰弱といった悪条件が異種間移植に与える影響は十分に評価できなかった。本研究では飼育の容易なキタキチョウからミナミキチョウへの移植を試みた。この組み合わせはこれまでの異種間移

植実験で成熟卵が形成されたものと逆の順序となる。ところが、予想と異なり、特段の処理をしていないキタキチョウの凍結卵巣を移植した場合でも、ミナミキチョウの体内では移植卵巣の発達が認められなかった (n = 6)。

オガサワラシジミの生息域外飼育集団では世代を経るごとにオスが保有する精子数が減少していた (成果3, 4, 論文投稿中)。解剖した個体の中には極端に精巣が小型化して精子生産能力をほとんど欠くと思われる個体や実際に保有精子数が0の個体もあった。移植実験に使用したキタキチョウでは近親交配した系統でもこのような極端な表現型は観察されなかった。孵化率や生存率の低下は共通しているものの、近交弱勢の発現の仕方には種差が存在すると示唆された。凍結保存の今後の研究では近交弱勢の発現のパターンにも留意する必要があると考えられた。

・結論

本研究は、カイコの凍結保存法を調整することで、蝶類でも幼虫の卵巣を凍結保存し、成熟卵を得られることを示した。異種間移植でも条件によっては成熟卵が形成された。このことはカイコの凍結保存法の高い汎用性を意味している。異種間移植におけるドナーの近親交配等の影響を十分評価できていないものの、同種内移植ではドナーの近親交配や衰弱が移植に影響するという証拠は得られなかった。

異種間移植の成否を決定する要因の研究は今後の課題である。異種間移植の成否は必ずしも類縁性で決まるのではなく、類縁関係が近くても移植に適さない場合があった。オガサワラシジミの再生には異種間移植の成否を決める要因の解明が必要と考えられた。

Hiroki M, Kato Y. 1996. Age-related sexual receptivity change in virgin females of a butterfly, *Eurema hecabe*. Applied Entomology and Zoology, 31, 455-458.

6. 目標の達成状況と環境政策等への貢献

(1) 研究目標の達成状況

<全体の達成状況> 4. 目標にはやや及ばないが一定の成果をあげた

「オガサワラシジミの再生を目指した凍結卵巣移植法の研究」

全体目標	全体の達成状況
キタキチョウで凍結卵巣の移植技術を確立するとともに、異種間移植の成功率に種間の類縁性や近交弱勢、卵巣の状態が与える影響を明らかにする。	キタキチョウにおける凍結卵巣の移植成功率の高い条件や異種間移植が成功する組合せを見出した (P. 7-9)。同種間移植では近交弱勢や衰弱が大きな影響を与えていないことを明らかにした (P. 9-10)。異種間移植では近交弱勢や衰弱の影響を十分に評価できなかったものの、異種間移植の成否が必ずしも類縁性に依存しないことを示した (P. 9-10)。オガサワラシジミの再生には異種間移植の成否を決める要因の解明が必要と考えられた。

<【サブテーマ1】達成状況> 4. 目標にはやや及ばないが一定の成果をあげた

「オガサワラシジミの再生を目指した凍結卵巣移植法の研究」

サブテーマ1目標	サブテーマ1の達成状況
全体目標と同様 1. キタキチョウでの凍結卵巣の移植技術の確立	1. 目標通りの成果をあげた。カイコの手法をキタキチョウ用に調整することでキタキチョウでも成熟卵が高い確率で形成させる条件を見出した

<p>2. 異種間移植の成功率への類縁性の影響の解明</p> <p>3. 近交弱勢や卵巣の状態が移植に与える影響の解明</p>	<p>(P. 7-10)。5 齢幼虫を用い、周囲の組織ごと卵巣を凍結し、レシピエントの卵巣をすべて交換移植することを発見したことは重要な成果といえる。</p> <p>2. 目標通りの成果をあげた。類縁性に関わらず異種間移植でも卵黄蓄積が認められることを示した (P. 9)。今後の研究が必要であるがモンキチョウとキタキチョウのような別属の種間でも成熟卵形成が生じることを示した (P. 9)。最近縁種間では成熟卵が十分に形成される場合もあった (P. 9)。異種間移植の成否は必ずしもドナー・レシピエント間の類縁性に依存しないといえる。</p> <p>3. 目標にはやや及ばないが一定の成果をあげた。同種移植での検討も元々の計画に含まれており、こちらでは近交弱勢や衰弱が移植成功率に大きな影響を及ぼさないことを示した (P. 9-10)。一方、異種間移植ではキタキチョウからミナミキチョウへの移植が成功せず近交弱勢などの効果を検討できなかった (P. 9-10)。</p>
---	--

(2) 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

<得られた研究成果の学術的意義>

本研究は主に実験昆虫向けに確立されてきた技術を生息域外保全に活用しようという点で独創的である。昆虫の凍結卵巣の移植はカイコやナミテントウにおいて主に研究用の系統維持のために研究が進められてきた。この場合、健康な凍結卵巣を同種の幼虫に移植して成熟させるため、異種間移植の必要性は低く、近交弱勢や衰弱を考慮する必要もない。本研究ではオガサワラシジミで生じた事態を想定し、絶滅危惧種にこの方法を適用するうえで必要となる知見を収集した。これらの知見はこれまでにほとんど例がなく、今後の生息域外保全の研究に波及効果を及ぼすと期待できる。

<環境政策等への貢献に関する成果>

本研究の成果は絶滅危惧チョウ類の生息域外保全に関する新たな補完事業の提案につながるものである。本研究は、キタキチョウ・ミナミキチョウ・タイワンキチョウ・モンキチョウの4種について、少なくとも凍結保存した卵巣が生きており、同種あるいは異種の幼虫への移植によって、卵巣内で卵が生育することを示した。カイコの凍結保存法の汎用性は高く、同様の手法が野生のチョウ類でも多くの種に適用可能と考えられた。生物多様性国家戦略2023-2030では、絶滅危惧種の生息域外保全の手段の一つとして、生殖細胞の保存を進めることが明記されている。昆虫類でも生息域外保全の対象種については生殖細胞の凍結保存の実施を検討する価値がある。

現時点では、野生のチョウ類では、凍結卵巣由来の卵の受精には成功していない。それでも生きた生殖細胞を凍結するメリットは大きく、凍結卵巣を備えておけば、将来的に体外受精等に活用できる可能性がある。個体数の少ない種では世代を経るごとに集団の遺伝的多様性が低下するリスクがあるため、生殖細胞の凍結保存を実施して遺伝的多様性の喪失に備えることは重要である。凍結卵を用いた受精技術が確立した際には、生息域外保全にかかる繁殖施設等の負担やコストの軽減にもつながると考えられる。

7. 研究成果の発表状況

(1) 成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	0
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	0
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	0
口頭発表（学会等・査読なし）：	4
知的財産権：	0
「国民との科学・技術対話」の実施：	1
マスコミ等への公表・報道等：	0
研究成果による受賞：	0
その他の成果発表：	0

(2) 誌上発表

< 査読付き論文 >

成果 番号	【サブテーマ1】の査読付き論文
	特に記載すべき事項はない。

< 査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野） >

成果 番号	【サブテーマ1】の査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）
	特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

成果 番号	【サブテーマ1】のその他誌上発表（査読なし）
	特に記載すべき事項はない。

(3) 口頭発表

<口頭発表（国際学会等・査読付き）>

成果 番号	【サブテーマ1】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
	特に記載すべき事項はない。

<口頭発表（学会等・査読なし）>

成果 番号	【サブテーマ1】の口頭発表（学会等・査読なし）
1	小長谷達郎. 2023. 蝶がいなくなる生理機構と凍結保存. 自然と社会をつなぐ生態学シンポジウム. 高知大学.
2	小長谷達郎. 2023. キタキチョウにおける卵巣凍結保存の試み. 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会.
3	小長谷達郎. 2023. チョウ類における卵巣凍結保存法とその応用を目指して. 日本鱗翅学会第69回大会.
4	中濱直之ら. 2024. 絶滅危惧チョウ類2種の生息域外保全集団における繁殖途絶及び減少プロセス. 第71回日本生態学会大会.

(4) 知的財産権

成果 番号	発明者	出願者	名称	出願以降 の番号	出願 年月日
	特に記載すべき事項はない。				

(5) 「国民との科学・技術対話」の実施

成果 番号	実施 年度	【サブテーマ1】の実施状況
5	2024	三重県環境基礎講座2024「チョウに学ぶ生物多様性」（主催：三重県環境学習情報センター、2024年7月13日、三重県総合文化センター、観客約20名）にて講演予定

(6) マスメディア等への公表・報道等

成果 番号	【サブテーマ1】のメディア報道等
	特に記載すべき事項はない。

(7) 研究成果による受賞

成果 番号	【サブテーマ1】の研究成果による受賞
	特に記載すべき事項はない。

(8) その他の成果発表

成果 番号	【サブテーマ1】のその他の成果発表
	特に記載すべき事項はない。

8. 国際共研究等の状況

<国際共同研究等の概要>

特に記載すべき事項はない。

<相手機関・国・地域名>

機関名	国・地域名（本部所在地等）
特に記載すべき事項はない。	

9. 研究者略歴

<研究代表者略歴>

代表者氏名	略歴（学歴、学位、経歴、現職、研究テーマ等）
小長谷達郎	京都大学理学研究科修了 博士（理学） 日本学術振興会特別研究員（PD）（受入研究機関：基礎生物学研究所）を経て、 現在、奈良教育大学准教授 専門は昆虫の生理生態学

Abstract

[Research Title]

Study on Cryopreservation of Butterfly Ovary for Future Utilization of the Cryopreserved Tissues of *Celastrina ogasawaraensis*

Project Period (FY) :	2021-2023
Principal Investigator :	Konagaya Tatsuro
(PI ORCID) :	ORCID0000-0003-0397-4479
Principal Institution :	Nara University of Education Nara City, Nara, JAPAN Tel: +81 0742-27-9197 E-mail: konagaya.tatsuro.br@cc.nara-edu.ac.jp
Cooperated by :	
Keywords :	Insect, Lepidoptera, Butterfly, Ex situ conservation, Endangered species

[Abstract]

The Ogasawara Holly Blue, *Celastrina ogasawaraensis*, has been considered to have undergone species-level extinction because no wild or reared individuals have been observed since 2020. However, a small number of larval ovaries, eggs, and spermatozoa were cryopreserved from individuals of the breeding population before its extinction. In Lepidoptera, a cryopreservation technique for larval ovaries has been developed in the silkworm, *Bombyx mori*. The technique consists of several steps: removal of larval ovaries from the donors, slow freezing, storage in liquid nitrogen, thawing, transplantation of the ovaries into the recipients, and post-surgery rearing. Then, the cryopreserved ovaries develop mature eggs in the recipients. Therefore, new individuals of *C. ogasawaraensis* might be obtained from the cryopreserved ovaries and spermatozoa if the xenotransplantation technique of cryopreserved ovaries is available for butterfly species. Because few studies have focused on butterfly species in terms of the cryopreservation of ovaries, the present study applied the transplantation of cryopreserved ovaries between individuals in a pierid butterfly *Eurema mandarina* as the first step to our final purpose. Then, xenotransplantation experiments of cryopreserved ovaries were conducted between *E. mandarina* and several other pierid species. The effects of the degree of inbreeding or starvation of the donors on the success of transplantation of cryopreserved ovaries were also investigated. The modified cryopreservation method allowed the recipient females to develop mature eggs in the donor ovaries in *E. mandarina*. Mature eggs were also observed in the xenotransplanted ovaries under specific conditions. The degree of inbreeding and starvation of the donors did not

remarkably affect the development of the donor ovaries in the recipient females. The present study confirms the cryopreservation technique developed in *B. mori* is useful for the ex-situ conservation of butterflies. Future directions of the cryopreservation technique and the conservation of butterflies were discussed.

This research was funded by the Environment Research and Technology Development Fund (ERTDF).

別冊

(参考資料) 公募審査・中間評価等への対応

指摘等	対応状況・非対応理由等
<p>中間発表コメント「極めて実践的で意義ある技術・研究である。準備もステップを踏んでいる。絶滅に瀕しているオガサワラシジミをターゲットにしているが、キチョウでの成果を元に、どの範囲のチョウに应用可能かといった視点で研究をひろげてゆくのもありかと思う。将来、多様な昆虫類の保全に活用できるようになる可能性を秘めており、挑戦的課題ではあるが、是非とも積極的に取り組むことができるとよい。移植実験の結果については、技術的な問題なのか、なんらかのメカニズムが推測できるのか、更なる議論が欲しい。基礎研究としても重要なので、今後、学術的な研究成果の公表を期待する。」</p>	<p>今回の報告書までに受理されなかったが、中間発表後に追加データを取得し、現在、関連論文を2本投稿中である。</p>