

学位論文題名

Cryopreservation of Semen and Assessment
of Female Endocrine Status
by Fecal Steroid Hormone Measurement in Hokkaido
Brown Bears (*Ursus arctos yesoensis*)

(エゾヒグマの精液の採取と凍結保存ならびに
糞中ステロイドホルモン測定による雌の内分泌動態評価)

学位論文内容の要旨

近年、絶滅危惧動物の増殖および遺伝子資源保存のため、人工授精、体外受精および胚移植といった繁殖技術が活用されている。人工授精で産子を得るには、それぞれの動物に適した精液の採取・保存法を開発するとともに発情や排卵といった雌の繁殖生理を明らかにする必要がある。本研究は、ヒグマの人工授精に必要な精液の採取・保存法を開発するとともに、糞中ステロイドホルモン測定法を用いて雌の発情周期および排卵様式を解明する目的で行った。

まずはじめに、精液の採取および凍結保存を検討した。塩酸チレタミンー塩酸ゾラゼパム混合薬を用いて不動化した後、電気刺激法を用いて10頭（試験回数21回）のうち6頭（14回）から精液を採取できた。採取された精液量、精子濃度および運動精子の割合は、それぞれ平均2.7 ml、 4.7×10^8 個/ml、80%であった。また、電気刺激法を用いて採取した精液をウシ精液の凍結保存に用いられる卵黄添加トリス緩衝液を用いて凍結した。その結果、融解後の運動精子の割合は43%に低下した。しかし、1回の採精で得られた精液当たりの前進運動を示す精子の数（ 1.8×10^8 個）は子宮内人工授精により雌を受胎させるのに十分と考えられ、ウシ用精液希釈液を用いてヒグマ精液を凍結保存できることが分かった。

ついで、非侵襲的に雌ヒグマの内分泌動態を推定するため糞中ステロイドホルモン濃度測定法を開発し、雌の発情周期および排卵様式を調べた。プロジェ

ステロンについては、同一個体から同じ時期に採取した血液と糞中濃度に相関がみられ、糞を材料として体内動態を推定できることが分かった。一方、エストラジオール 17 β については、血液と糞中濃度に相関がみられなかった。そこで、エストラジオール 17 β をヒグマに静脈内投与し、血中濃度の上昇から糞中濃度の上昇までに要する時間および糞に含まれるエストラジオール代謝産物の種類を調べた。その結果、投与後約 25 時間目に糞中エストラジオール 17 β 濃度の上昇がみられ、糞中にはエストラジオール 17 β と抱合型エストラジオール 17 β が多く含まれていることが分かった。従って、糞中のエストラジオール 17 β および抱合型エストラジオール 17 β を測定し、エストラジオール 17 β の排泄に要する時間（約 25 時間）を考慮すれば、糞を材料として血中エストラジオール 17 β 動態を推定できることも分かった。

さらに、雄と交配した雌（分娩を確認）および雌のみの群で飼育した非交配雌について繁殖期（5～7 月）の糞中ステロイドホルモン動態および発情徴候を調べた。乗駕許容行動から判断した発情期は 14～36 日であった。交配/妊娠雌および非交配雌のいずれにおいても、糞中エストラジオール 17 β 濃度は発情期に高く、プロジェステロン濃度は発情休止期に高かった。また非交配雌について糞中ステロイドホルモン濃度の周年変化を調べた。その結果、糞中エストラジオール 17 β 濃度は 5 月から 6 月下旬にかけて次第に上昇し、6 月下旬あるいは 7 月上旬に一過性の上昇がみられた。外陰部の腫脹は 5 月から糞中エストラジオール 17 β の一過性上昇まで持続し、その後消失した。糞中プロジェステロン濃度は、7 月下旬に上昇した後 11 月まで高値で推移し、12 月に最高値を示した。翌年 1 月には超音波により卵巣に黄体の存在が確認された。従って、繁殖期には排卵を伴わない発情が持続し、交尾刺激がなくても排卵および黄体形成の起こることが分かった。

以上のように、ヒグマ精液の採取および凍結に初めて成功した。また、糞中ステロイドホルモン濃度測定法を開発し内分泌動態をモニターすることによって、雌ヒグマでは繁殖期には排卵を伴わない発情が持続し、交尾刺激のない場合も排卵の起こることも分かった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 教 授 大 泰 司 紀 之
副 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 助 教 授 片 桐 成 二

学 位 論 文 題 名

Cryopreservation of Semen and Assessment of Female Endocrine Status by Fecal Steroid Hormone Measurement in Hokkaido Brown Bears (*Ursus arctos yesoensis*)

(エゾヒグマの精液の採取と凍結保存ならびに
糞中ステロイドホルモン測定による雌の内分泌動態評価)

申請者は、クマの人工授精技術の確立に向けて飼育下のエゾヒグマを用い、精液の採取と凍結法および雌の発情周期と排卵様式を検討した。

まず、全身麻酔を施した雄ヒグマから電気射精法により高い運動精子率を有する精液を採取することに成功した。また、電気射精法により採取した精液を卵黄添加トリス緩衝液を用いて緩慢凍結保存する方法を検討し、子宮内人工授精が可能な凍結精液を作製できた。ついで、雌の内分泌動態、とくに卵巢活動を推定するため、糞中プロジェステロン (P_4) およびエストラジオール (E_2) の酵素免疫測定法を開発した。また、 E_2 については血液から糞への移行に要する時間と E_2 代謝産物の変動を明らかにし、糞中の非抱合型および抱合型のエストラジオール濃度を測定し、移行に要する時間を考慮すると血中 E_2 濃度変化がより正確に推定できる可能性を示した。さらに、糞中ステロイドホルモンと発情徴候 (外陰部および性行動) の変化から発情周期と排卵様式を検討した。その結果、妊娠の有無に拘わらず、5月~6月には発情発現と高い E_2 濃度の持続、6月下旬~7月上旬には一過性の E_2 濃度の上昇とこれにつづく発情徴候の消退、 E_2 濃度の低下および P_4 濃度の上昇が観察された。さらに、非交配雌での黄体の存在を確認し、飼育下のヒグマでは交尾刺激のない場合にも排卵と黄体形成の起こることを明らかにした。

以上のように申請者は、ヒグマの人工授精技術の確立に必要な精液の採取と凍結保存法を検討し、凍結精液の生産を可能にした。また、飼育下の雌ヒグマでは排卵を伴わない発情が繁殖季節に持続し、交尾刺激のない場合にも排卵と黄体形成の起こることを示した。よって、審査員一同は申請者が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有すると認めた。