

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06415

研究課題名（和文）クマ科動物における人工授精技術開発 - 臨床繁殖学的手法による動物園動物の繁殖支援 -

研究課題名（英文）Development of artificial insemination protocol in bear species:
Therigenological support in zoo animals.

研究代表者

柳川 洋二郎（Yanagawa, Yojiro）

北海道大学・獣医学研究院・助教

研究者番号：20609656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではホッキョクグマやヒグマなどのクマ科動物の飼育下繁殖を促進するために雄の造精能力評価基準や雌の卵胞発育パターンと発情様式を明らかにした。また雌性生殖器官の詳細構造から人工授精に必要な器具や方法なども明らかにし、排卵誘起方法も確立した。さらに着床遅延中の妊娠診断に血中遺伝子がマーカーとなる可能性を示唆した。加えて複数の動物園に協力することで動物園動物に対する繁殖生理の解明や臨床繁殖学的なアプローチの普及を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クマ科の多くが絶滅危惧種であり、人工授精が可能となれば個体数を増やすことのみならず、これまで産子を得ることがなかった個体を繁殖計画に供することができ遺伝的多様性の維持へも寄与できる。またホッキョクグマは地球温暖化の影響による絶滅危惧種としても注目されているため、本研究が動物園および野外における保全に与える影響は大きく、臨床繁殖学的支援を受け入れる素地を作ることが可能である。

研究成果の概要（英文）：To enhance captive breeding in polar bears and brown bears, we established spermatogenesis index in males and elucidated follicular development pattern and estrus type in females. Also we determined tools and methods after detail examination of female reproductive organs, and developed ovulation induction method. Further, genetic examination in peripheral blood was suggested as marker for pregnancy during delayed implantation. In addition, I spread and shared therigenological approach for zoo animal during collaboration with several zoo.

研究分野：繁殖学

キーワード：ホッキョクグマ ヒグマ 動物園 人工授精

1. 研究開始当初の背景

動物園は種および遺伝資源のストックとして機能することが望まれている。しかし、飼育下で交配による自然繁殖がうまく行かず飼育頭数が減少している種が数多く存在する。ホッキョクグマは飼育頭数が北米において30年間で減少し、日本では50頭程度を維持してはいるが高齢化により今後減少することが推測されている(図1)。動物園動物において自然繁殖が成立しない状況に対しホルモン投与による発情誘起や、人工授精などの臨床繁殖学的手法により産子を得ようという試みが欧米を中心に広まり、成功例が報告されているが、成功率は低く再現性がないことが問題となっている。

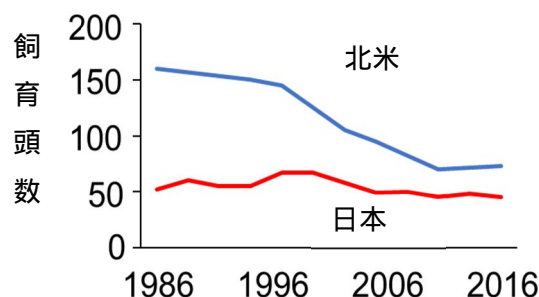


図1: ホッキョクグマの飼育頭数の推移

産業動物や伴侶動物においては、種の繁殖生理を理解したうえで個体の繁殖学的状態を把握し、適切な処置が施されている。一方動物園動物においては、対象個体の繁殖学的状態が不明なまま実施したり、そもそも過去の報告での個体の状態が不明であったりすることが再現を困難にしている。さらに対象種のホルモン動態や卵巣動態(卵巣内の卵胞や黄体の発達退行の様子)などの繁殖生理学的情報が欠如していることも問題である。海外では繁殖生理から臨床繁殖と段階を経ることで成功している例が報告されているが、日本では積極的な対策には主に「(日本で)前例がない」という理由で消極的な傾向にある。

我々はこれまでにホッキョクグマおよびこのモデル動物としてヒグマを対象として繁殖生理学および臨床繁殖学の視点から研究を進めてきた。雄においては妊孕性の有無によって採取できる精子数に差があることが示唆されたが、実施数が少ないため評価基準が不明であった。また雌ヒグマにおいては繁殖期初期には排卵可能な卵胞がないが、繁殖期後半に一部の卵胞が選抜されていることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的の一つはホッキョクグマおよびヒグマにおいて繁殖生理の一端を明らかにし人工授精により産子を得ることであり、雄については精液採取の実施数を増やし、雄の繁殖性評価に役立つデータを収集する。また人工授精をより確実に成功させるために、子宮内授精方法の検討、卵胞発育パターンの解明と排卵誘起方法の開発、さらに妊娠診断につながる着床遅延個体の評価方法の検討を行う。もう一つの目的は動物園において臨床繁殖学的手法の普及啓発をすることであり、そのために他種において研究の依頼・可能性があった場合にはこれについても実施する。

3. 研究の方法

ホッキョクグマの雄については性成熟の有無にかかわらず、精液を採取し年齢や繁殖性に伴う採取精子数のデータを集積した。また、ヒグマおよびホッキョクグマの雌性生殖器内の構造を明らかにするために死亡個体から採取した子宮を用い、CTおよびMRIにより撮影し、その結果をもとに同子宮を用いて人工授精に適した器具や方法について検討した。さらに、卵胞の発達パターンや発情様式を明らかにする雌ヒグマにおいて繁殖期前から繁殖期終了後まで経時的に超音波診断装置を用いて卵巣を観察した。これにあわせて、排卵可能卵胞サイズおよび排卵誘起法を明らかにするために様々な卵胞サイズにおいて性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)を複数用量で投与した。加えて、交配雌および非交配雌から経時的に血液を採取し妊娠の有無に伴う血液中を検出できる遺伝子の解析を行った。

動物園における臨床繁殖学の普及啓発に対しては質問・依頼を受けたものについてすべて対応し、現地にも赴き検査や処置などを行った。

4. 研究成果

ホッキョクグマの雄において繁殖性が証明されている個体では繁殖期には一度の麻酔下における精液採取では数億個の精子が採取できた。一方で交尾はするものの繁殖に至っていない個体では数億個を採取できる個体もいれば数百万個しか精子が採取できない個体があり、前者の場合は不妊の原因が雄側にある可能性があると考えられた。また、亜成獣時には数百万個しか精子が採取できなかった個体においては、成獣となり繁殖適齢期まで成長した際に再度精液採取

したところ数億個の精子が採取できた。そのため、ホッキョクグマにおいて精液採取した際に精子数として一億個以上が繁殖性のある個体の指標となりうる可能性が示唆された。

ヒグマおよびホッキョクグマにおける死亡個体から採取した雌性生殖器のCTおよびMRI画像より、ヒグマおよびホッキョクグマにおいては膣と子宮を隔てる子宮頸管の腔側の開口部である

外子宮口が腹側方向に向かって開口して、尾側から見ると約30°程度背側に向けて開口していた。また、子宮頸管内にさらに1-2枚の嚢が発達していることが明らかとなった(図2)。このことから人工授精を実施するための動物の姿勢は仰臥位が適切であることが分かった。ヒグマの雌の卵胞は繁殖期初期には発達退行を繰り返すものの直径約6mm程度までしか大きくならないが、繁殖期後半になると1-3個の卵胞のみ選抜され直径6mm以上のサイズとなり、他の卵胞は退行していた。また、卵胞の発育速度は発達退行を繰り返す時期においては一日0.13mm程度であるが、選抜される卵胞は0.21mm程度であることが分かった。さらに、直径8mm(8-11mm)を超える卵胞にGnRH製剤であるプセレリンを20μgないし40μg投与したところ、いずれのサイズ、用量でも排卵したため、ヒグマの卵胞は直径8mmで排卵可能であり、20μgで排卵誘起が可能であることが明らかになった。なお繁殖期以降は新たな卵胞の発達が確認できなかったため、ヒグマは一年に一度発情する単発情の動物であることが明らかとなった。さらに着床遅延に対するマーカー候補を検索では、分娩個体と非分娩個体における着床遅延時期における血中遺伝子発現に差がある可能性が示唆された。

さらに各動物園からの依頼により繁殖が成功しない動物種における雄の造精能力評価(アフリカゾウ、ユキヒョウ、スマトラトラ、マレーグマ)や雌の生殖器検査(ブチハイエナ、スマトラトラ、チンパンジー)などの検査を行った。またアフリカゾウ、スマトラトラ、ツシマヤマネコなどにおいて精液採取と凍結保存を実施した。さらにチーター、ウンピョウ、ツシマヤマネコなどでは人工授精を行い、ツシマヤマネコについては妊娠出産に至った。この人工授精はア動物園獣医師主導で行い、自身は専門知識を基にしたサポートを行った。



図2:ヒグマ雌性生殖器のMRI画像

矢印:外子宮口

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Torii Y, Matsumoto N, Sakamoto H, Nagano M, Katagiri S, Yanagawa Y	4. 巻 66
2. 論文標題 Monitoring follicular dynamics to determine estrus type and timing of ovulation induction in captive brown bears (<i>Ursus arctos</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 563-570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 柳川洋二郎	4. 巻 -
2. 論文標題 動物園における人工繁殖学総論	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本飼育技術学会誌	6. 最初と最後の頁 5-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Torii Yoshiko, Matsumoto Naoya, Sakamoto Hideyuki, Nagano Masashi, Katagiri Seiji, Yanagawa Yojiro	4. 巻 140
2. 論文標題 Monitoring follicular dynamics using ultrasonography in captive brown bears (<i>Ursus arctos</i>) during the breeding season	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2019.08.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takaesu N, Minami M*, NaganoM, Kaneko A, Indo Y, Imai H, Hirai H, Sashika M, Shimozuru M, Okamoto M, Katagiri S, Tsubota T, Yanagawa Y	4. 巻 70
2. 論文標題 Ovulatory follicle size investigated by ultrasonography and single artificial insemination with ovulation induction in the Japanese macaque (<i>Macaca fuscata</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 5-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14943/jjvr.70.1.5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TAKAESU Noboru, KANNO Chihiro, SUGIMOTO Kosuke, NAGANO Masashi, KANEKO Akihisa, INDO Yoriko, IMAI Hiroo, HIRAI Hirohisa, OKAMOTO Munehiro, SASHIKA Mariko, SHIMOZURU Michito, KATAGIRI Seiji, TSUBOTA Toshio, YANAGAWA Yojiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Semen collection by urethral catheterization and electro-ejaculation with different voltages, and the effect of holding temperature and cooling rate before cryopreservation on semen quality in the Japanese macaque (<i>Macaca fuscata</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 429 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0590	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Azumano Akinori, Ueda Miya, Nomura Mika, Usui Masashi, Ichinose Midori, Yanagawa Yojiro, Kusuda Satoshi, Matsumoto Yuki, Murata Koichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Successful Laparoscopic Oviductal Artificial Insemination in the Endangered Tsushima Leopard Cat (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 777 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani12060777	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柳川 洋二郎、對馬隆介、兼子明久、澤田悠斗、宮部貴子、今井啓雄、片桐成二、岡本宗裕
2. 発表標題 ニホンザルにおける精液採取の方法が新鮮および凍結融解後の精液性状に与える影響
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥居佳子、松本直也、坂元秀行、永野昌志、片桐成二、柳川洋二郎
2. 発表標題 ヒグマにおける人工授精プログラム開発の試み
3. 学会等名 第25回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋野恭伍、鳥居佳子、柳川洋二郎、坂元秀行、松本直也
2. 発表標題 エゾヒグマ (<i>Ursus arctos yesoensis</i>) におけるチレタミン/ゾラゼパム (ゾレチル) およびキシラジン投与量と眼瞼反射消失との関連性
3. 学会等名 第25回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤拓斗、兼子明久、夏目尊好、森本真弓、愛洲星太郎、Vanessa Gris、Rafaela Sayuri Takeshita、宮部貴子、岡本宗裕、永野昌志、片桐成二、柳川洋二郎
2. 発表標題 ニホンザルにおけるプロジェステロン作動薬による月経周期同期化
3. 学会等名 第25回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳川洋二郎、菅野智裕、兼子明久、今井啓雄、片桐成二、永野昌志、岡本宗裕
2. 発表標題 人工授精への使用を目指したニホンザル精子の凍結保存法の検討
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥居佳子、永野昌志、片桐成二、柳川洋二郎
2. 発表標題 クマ科動物の人工授精技術開発に向けた研究
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥居住子、Sittinee Kulprasertsri、小林篤史、永野昌志、片桐成二、柳川洋二郎
2. 発表標題 死亡雄アフリカゾウ生殖器における繁殖および病理学的検査
3. 学会等名 第3回野生動物保全繁殖研究会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原明、鳥居住子、入江陽一、牛尾佳名子、曾地千尋、宗内一平、楠田哲士、東達也、一瀬貴大、中山翔太、石塚真由美、池中良徳、片桐成二、柳川洋二郎
2. 発表標題 液体クロマトグラフィー質量分析法によるアフリカゾウの血中ステロイドホルモン濃度測定法の確立および無排卵雌における排卵誘起の試み
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川洋二郎
2. 発表標題 野生動物および動物園動物の雄における繁殖研究：類似と相違の探求
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会 繁殖分科会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川洋二郎
2. 発表標題 動物園動物の繁殖を見て・知って・繋げる～実験室から飼育現場へ
3. 学会等名 第27回野生動物医学会 市民公開講座（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東野晃典、野村美佳、薄井正、植田美弥、尾形光昭、柳川洋二郎、楠田哲士、高橋明帆
2. 発表標題 ツシマヤマネコにおける人工授精の取り組み
3. 学会等名 第4回野生動物保全繁殖研究会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥居住子、曾地千尋、牛尾佳名子、宗内一平、入江陽一、永野昌志、楠田哲士、片桐成二、柳川洋二郎
2. 発表標題 初回交尾日に基づくホッキョクグマの人工授精と排卵誘起処置
3. 学会等名 第4回野生動物保全繁殖研究会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曾地千尋、柳川洋二郎、篠原明、鳥居住子、楠田哲士、宗内一平、牛尾佳名子、入江陽一、松村亜裕子、南條幸夫、吉住和規、橋本渉
2. 発表標題 アフリカゾウにおける排卵誘起の取り組みについて
3. 学会等名 第4回野生動物保全繁殖研究会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------