

アムールヤマネコ(*Prionailurus bengalensis euptilurus*)の
人工繁殖技術に関する研究

Studies on assisted reproductive technology
in Amur leopard cats

田 島 日 出 男

目 次

	頁
第1章 緒 論	— 1 —
第2章 アムールヤマネコの経直腸電気刺激法による精液採取の検討	
緒 言	— 1 1 —
実験材料および方法	— 1 2 —
結 果	— 1 5 —
考 察	— 1 8 —
小 括	— 2 5 —
第3章 アムールヤマネコの尿道カテーテル法による精液採取の検討 および個体差の影響	
緒 言	— 5 2 —
実験材料および方法	— 5 4 —
結 果	— 5 6 —
考 察	— 5 7 —
小 括	— 6 2 —
第4章 アムールヤマネコ精液における低温保存および凍結保存の検討	
緒 言	— 6 6 —
実験材料および方法	— 6 7 —
結 果	— 7 0 —
考 察	— 7 2 —
小 括	— 7 7 —

第5章	アムールヤマネコの精巢上体尾部精子の性状および凍結保存の検討	
緒言		— 87 —
実験材料および方法		— 88 —
結果		— 90 —
考察		— 94 —
小括		— 98 —
第6章	非繁殖季節のアムールヤマネコの発情誘起および排卵誘起の検討	
緒言		— 109 —
実験材料および方法		— 110 —
結果		— 112 —
考察		— 113 —
小括		— 117 —
第7章	アムールヤマネコにおける新鮮精液を用いた子宮内人工授精の検討	
緒言		— 121 —
実験材料および方法		— 122 —
結果		— 125 —
考察		— 127 —
小括		— 133 —
第8章	結論および総括	— 139 —
謝辞		— 148 —
参考文献		— 149 —

第1章

緒論

野生ネコ科動物は、現在、2 亜科、8 系統、14 属、41 種、77 亜種に分類されている [86]。これらの種の多くは、開拓による生息域の縮小、分断化および生息環境の悪化などによりその個体数が減少しており、国際自然保護連合 (IUCN) から公表されているレッドリストにおいて、41 種の野生ネコ科動物のうち 18 種が絶滅危惧カテゴリーである EN (Endangered : 危機) から VU (Vulnerable : 危急) として分類され、絶滅の危機に瀕している状況にあることが記載されている [84]。そのため、世界中において、これらの個体を保護し生息数を増加させるための取り組みを行うことは急務とされている。

日本にも 2 種の固有の小型の野生ネコ科動物が存在する。それは、野生個体が沖縄県西表島にのみ生息しているイリオモテヤマネコ (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*) と長崎県対馬にのみ生息しているツシマヤマネコ (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) である。イリオモテヤマネコは、主にアジアに広く分布して生息しているベンガルヤマネコ (*Prionailurus bengalensis*) の 1 亜種として分類されている。一方、ツシマヤマネコは、ベンガルヤマネコの別亜種であり [112]、ベンガルヤマネコのうち最も北に分布し、中国東北部からシベリア東南部、朝鮮半島の広葉樹林帯やヤナギ・スゲなどの繁茂する川沿いの谷に生息しているアムールヤマネコ (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) の地域個体群であると考えられている。ベンガルヤマネコは、レッドリストにおいて LC (低危険種) に分類されており絶滅の危険性はまだそれほど高くない [85]。しかし、日本の固有種であるツシマヤマネコとイリオモテヤマネコは、1960 年代には約 300 頭が生息していたが、その後、減少傾向にあり、2000 年代前半の個体数は 80~100 頭、2010 年前半の個体数も 70~100 頭と推定されており [96]、環境省が作成しているレッドリストでは絶滅のおそれが最も高い絶滅危惧 IA 類 (CR) に分類されており [95]、このままでは両種とも絶滅してしまうおそれがあることが想定されている。

これらの個体数が減少している主な理由は、その生息環境の変化による影響である。すなわち、広葉樹林の伐採や針葉樹の植林、河川改修、交通事故、イエネコからのネ

コ免疫不全ウイルス (FIV) やネコ白血病ウイルス (FeLV) などの感染、そして野良イエネコとの餌や生息域の競合などが挙げられる [72]。したがって、これら日本固有のヤマネコの個体数を増加させるために最も大切なことは、本来の生息地における自然環境の維持や再生、情報収集、交通事故対策、地域住民への啓蒙などを通して行われる個体群の保全などの生息域内保全である [122]。しかし、それと同時に、動物園や野外繁殖施設などの飼育下での繁殖を行い、同時に日本固有のこれらヤマネコの繁殖に関する基礎知識を得るための研究などを行う生息域外保全をバランス良く推進することも必要であると考えられる。

環境省は、ツシマヤマネコの保護増殖事業として、生息状況調査、普及啓発とともにツシマヤマネコの飼育下繁殖による生息域外保全の計画をたて、1994年から野生個体の捕獲作業を開始し5頭の野生ツシマヤマネコ個体を確保し、1996年から対馬以外の施設として福岡市動物園（福岡県福岡市）において飼育下繁殖の取り組みを開始した。そして2000年には自然交尾による繁殖が初めて成功し、産子を得ることができた [94, 100, 117]。その後、飼育下個体を1か所の施設だけで飼育・繁殖し続けた場合、感染症の発生や災害などにより多くの飼育下の個体が一度に失われる可能性があること、繁殖に成功し飼育個体が増えた場合、動物園内での飼育スペースにも限界が生じてしまうこと、また同じペアリングでしか繁殖ができないことで遺伝的多様性が失われてしまうおそれが考えられた。この問題を解決するため、環境省は全国10ヶ所の動物園にツシマヤマネコを移動させ分散飼育を開始し、そのうち井の頭自然文化園を含む5つの動物園（その他は、よこはま動物園、富山市ファミリーパーク、福岡市動物園、九十九島動植物園）にて飼育下繁殖を試みた。しかし、2010～2013年の間にはどの動物園でも自然繁殖は成功せず、個体数を増加させることはできなかった [73]。この理由として、雌ツシマヤマネコの発情徴候が不明瞭で交配適期、ペアリングの判断が困難であること、動物園での限られた飼育頭数では雄と雌の個体間同士の相性の不一致が起こってしまうことが挙げられた。また、これまで飼育下繁殖が成功しているのは

同じペアのみ、もしくは同じ雄または雌ツシマヤマネコだけであり、長期的に見ると飼育個体数には限界があるため、飼育下個体群の遺伝的多様性が低下する危険性が予測された。したがって、これら飼育下繁殖を成功させるため、かつ遺伝的多様性を維持するためには、繁殖への人工的な繁殖補助技術 (Assisted Reproductive Technology: ART) を導入する必要があると考えられた。ARTとしては、精液 (精子) や胚 (卵子) など生殖子の凍結保存 [10, 18, 27, 30, 32, 48, 62, 67, 71, 105, 155, 157, 158, 170, 171, 174, 176, 183, 190, 197, 202, 203, 206-208]、人工授精 [9, 11, 13, 30, 38, 46, 47, 49, 78, 79, 82, 143, 147, 164, 165, 169, 176, 180, 183, 187-189, 191, 194, 204]、胚移植 [6, 53, 66, 132, 134, 162, 172, 192, 196]、体外受精 (IVF) [18, 36, 37, 48, 49, 53, 61, 62, 82, 105, 116, 119, 125, 132-134, 136, 144, 172, 200]、顕微授精 [18, 132]、クローニング [172, 196, 200]などが挙げられる。これらのARTを繁殖に導入し十分に機能させることができれば、飼育下個体群での遺伝的多様性の維持、計画的な繁殖プランの作成、感染症蔓延の予防、飼育施設間の個体の移動によるストレスの軽減および繁殖不能個体の利用など様々な利点が得られることが期待される。

現在までに、イエネコにおいて多くの ART に関する研究が行われている。しかし、野生ネコ科動物における ART の報告はそれほど多くなく、その技術はまだ確立されていない。イエネコと野生ネコ科動物は同じネコ科動物でも、種によって発情周期をはじめとする繁殖学的特徴、性質、生活環境および繁殖能力に大きな違いがあることは明らかであるため [38]、イエネコの技術をそのままツシマヤマネコに応用することは困難と考えられる。しかも、野生のツシマヤマネコに関しては生息域内での繁殖に関する情報、知識が極めて乏しいのが現状である。しかし、ART の確立のために、希少な野生ネコ科動物を実験的に使用して多くの研究を行うことは容易にはできない。そこで、ツシマヤマネコの近縁種であるアムールヤマネコに注目した。アムールヤマネコは、ツシマヤマネコやイリオモテヤマネコと同様にベンガルヤマネコの亜種であるため、イエネコよりも絶滅の危機に瀕しているこれらヤマネコにより近縁であり、

繁殖学的特徴、性質および生活環境などが類似しているため、ART 確立のための良いモデル動物となると考えられた。

井の頭自然文化園では、2000年8月からアムールヤマネコを飼育・展示している。自然繁殖も行っており、現在までに合計11回44頭の出産と27頭の育成に成功している。アムールヤマネコの体重は3~5kgで、ツシマヤマネコよりはやや大きく、繁殖季節は1~4月とツシマヤマネコとほぼ同様であり、井の頭自然文化園での繁殖成績では産子数は2~4頭であった [150]。ベンガルヤマネコはレッドリストでもLCに分類されており、絶滅の危険性はまだ低いとされている [85]。しかし、アムールヤマネコは韓国のレッドリストではVUに分類され、将来的にアムールヤマネコも絶滅するおそれもあるため、この種におけるARTを確立しておくことは重要であると考えられる。

ARTの中で最も個体数の増加につながるのは人工授精であり、良好な性状を持つ精液の採取が重要であると考えられる。精液採取は、ウシやブタなどの産業動物やイヌでは人工膣法や陰茎マッサージ法を用いて、麻酔処置などを行うなどの動物への負担もかけず、比較的容易に行うことができる [4, 54, 70, 119]。しかし、イエネコでは、小さい頃から訓練を行っていると上記の動物と同様に人工膣を用いた精液採取を行うことが可能であるが、イエネコおよび野生ネコ科動物の精液採取には、一般的には全身麻酔の処置が必要となり、容易に精液採取を行うことができない。

野生ネコ科動物の精液採取方法として最も一般的に行われているのは、経直腸電気刺激法である [13, 42, 46-49, 57, 79, 82, 118, 142, 164, 196-199]。この方法は、全身麻酔下にて電極がついたプローブ（直腸プローブ）を雄の肛門から直腸に挿入して、主に腰仙部の勃起中枢と射精中枢、前立腺部を電氣的に刺激して射精させるものである。この方法では、直腸プローブの長さおよび太さ、挿入深度、刺激強度などが動物種によって異なるため、これらの適切な条件を探ることが必要となる。また最近では、イエネコの精液採取において尿道カテーテル法によって精液採取を行うことができることが報告されている [40, 56, 88, 129, 136, 137, 163, 202, 205, 208, 209]。この方法は、

麻酔導入に使用する $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬である塩酸メデトミジンの作用により自然な射精が起こることを利用した精液採取方法であり、前立腺部の精管が開口していると思われる位置までカテーテルを挿入し、カテーテル内に入ってきた精液を回収する方法であり、経直腸電気刺激法と異なり全身に電気を流すようなことを行わないため、動物に与えるストレスが少ない新しい精液採取方法として注目されている。また、この方法に関しては、イエネコだけではなく、野生ネコ科動物であるアフリカライオン (*Panthera leo*) [107] やジャングルキャット (*Felis chaus*) [99]、ジャガー (*Panthera onca*) [8] においても報告があり、応用されている。最近では、アムールヤマネコにおいても尿道カテーテル法を用いた精液採取の報告がなされた [89]。

上記の方法以外に精子を回収する方法として、精巣上体尾部を用いることも可能である [10, 18, 26-28, 31, 32, 55, 59, 71, 88, 90, 105, 109, 136-138, 156, 158, 174-177, 191, 195]。ツシマヤマネコが生息している地域では、交通事故による死亡例が数多く報告されている。飼育下動物においても、不慮の事故で死亡してしまうこともある。したがって、これら死亡した雄動物から精子を回収し有効利用することが望まれる [12, 34, 54, 113, 123, 135, 139]。精巣上体尾部精子の性状に関して、Jelinkova ら [88] は、イエネコにおいて尿道カテーテル法および経直腸電気刺激法によって採取できた精液と精巣上体尾部精子との性状の比較を行った。その結果、経直腸電気刺激法によって採取された精液の性状が最も良好であったが、次に良好であったのは精巣上体尾部精子であった。しかし、精巣上体尾部精子は頭部奇形のみが有意に劣っていた。一方、尿道カテーテル法で採取された精液の性状は3つの中で最も悪かったことを明らかにした。この結果からも、精巣上体尾部精子は十分に利用できるものと考えられる。

また、ART として精子（精液）の保存技術を確立することも重要である。精子の保存方法としては、一般的に液状精液による4~5°Cの低温保存方法と、-196°Cの液体窒素による凍結保存方法が知られている。低温保存方法は保存期間が短く応用範囲も限られているが、イエネコ [55, 59, 155, 157] だけでなく、野生ネコ科動物であるジャガーネコ (*Leopardus tigrinus tigrinus*) [7] でも報告が行われており、数日間ではあ

るが、精液性状を維持して保存することが可能であった。低温保存は、精液希釈液があれば、特別な設備、機材がなくても精液の保存ができることが利点である。すなわち、数日間の良好な保存を行うことによって遠方の施設での人工授精に供することができるという、動物園で飼育されている野生動物に対しては有効な方法と考えられる。一方、凍結精液は、保存のための種々の機材が必要となるが、半永久的な保存が可能である方法であり、イエネコでは多くの報告がある [90, 155, 174, 177, 194, 207, 208]。野生ネコ科動物においても、チーター (*Achinonyx jubatus*) [35, 39, 161, 171] やライオン (*Panthera leo*) [60, 161]、オセロット (*Leopardus pardali*) [161, 165, 166]、スナドリネコ (*Prionailurus viverrinus*) [166]、マヌルネコ (*Otocolobus manul*) [166]、アムールヤマネコ [5] などにおいて凍結精液の研究報告があり、マヌルネコ [166] では融解後の精液を用いた人工授精によって産子が得られている。また、精巣上体尾部精子の凍結保存に関しても、イエネコでは多くの報告がある [10, 18, 26, 27, 31, 32, 59, 71, 90, 109, 155, 156, 170, 174, 175, 177, 195]。Toyonaga ら [176] は、低温保存した精巣上体尾部から回収した精子を用いて作成した凍結精液による子宮内人工授精を行い、産子を得ることに成功した。これらの研究報告から、ヤマネコにおいても精子の凍結保存は十分に応用できる技術であることが期待できる。

精子と同様にイエネコの卵子を用いた ART についても、現在まで様々な研究が多数報告されている。卵巣から回収した未成熟卵を体外成熟後に IVF を行い、胚移植で正常な子を生産することも可能になっている [63]。胚 (卵子) の保存技術も行われており、融解後の胚を用いた移植後に受胎している例もある [6, 53, 134]。IVF 技術は、トラ (*Panthera tigris*) [47-49]、クロアシネコ (*Felis nigripes*) [133]、ジャングルキャット [133]、ステップヤマネコ (*Felis silvestris ornata*) [133]、スナドリネコ [133]、オセロット [165]、マーブルキャット (*Pardofelis marmorata*) [172] などの野生ネコ科動物にも応用され、トラ [49]、ステップヤマネコ [133] では胚移植後に産子が得られたことが報告されている。イエネコでは、クローン技術

によりクローンネコの生産にも成功している [200] が、野生ネコ科動物でのクローンの成功例はまだ報告されていない。

人工授精技術に関して、イエネコでの報告は多い [9, 11, 30, 38, 78, 104, 143, 169, 176, 180, 183, 187-189, 191, 194, 204]。一方、野生ネコ科動物においても人工授精の報告があり、その中には人工授精後に産子が得られた報告もある。しかし多くは、アジアゴールデンキャット (*Catopuma temminckii*) [106] や、トラ [29, 47, 91, 103]、チーター [80, 82]、ウンピョウ (*Neofelis nebulosa*) [79, 82]、ピューマ (*Puma concolor*) [13]、ユキヒョウ (*Panthera uncia*) [147] などのヒョウ亜科の大型の野生ネコ科動物で、小型の野生ネコ科動物ではオセロット [21, 103, 165]、ジャガーネコ [21] の報告があるだけで、現在まで他の成功例は報告されていない。

ツシマヤマネコおよびアムールヤマネコは、1年のうちの一定の季節のみに繁殖期を持つ季節繁殖動物であるため、繁殖を行う機会が少ない。しかもこの時期に繁殖に失敗すると、1年後まで産子を得ることはできない。また、これらのヤマネコは、排卵には交尾を必要とする交尾排卵動物である。生息域外保全において、自然繁殖をめざしてペアリングを行う際に、メスの行動から発情を見極め同居のタイミングを図ることは極めて重要で、これに失敗すると交尾に至らないばかりか、不要な闘争を招き最悪の場合には死に至らしめることがある。また、発情徴候が明瞭な場合でも雌と雄の相性が悪く交尾に至らない場合もある。これらの問題を解決するためには、各種ホルモン剤を用いて人工的に雌個体に発情を誘起し、排卵をコントロールする技術を確認することも必要となる。この技術が確立されれば、繁殖季節に関係なく繁殖を行うことも可能となり、とくに1年のうちの限られた数ヶ月にしか繁殖季節を持たないこれらのヤマネコにおいて、季節外での繁殖が可能になることによって、1年に数回の繁殖が可能になることも想定される。

イエネコでは、新しい卵胞発育を形成する際に用いられるウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) と排卵を誘起する際に用いられるヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の組み合わせによって、それぞれ発情誘起および排卵誘起処置が行われている [102]。

野生ネコ科動物における人工授精の成功例においても、これら両者のホルモン投与によって発情および排卵誘起が行われたものであった [13, 46, 79, 80, 82, 147, 165]。しかし、Howard らの報告 [82] によると、卵巢の反応は種特異性が著しく、多くは反応に乏しいことが報告されている。すなわち、イエネコや他の野生ネコ科動物では十分に効果のある方法でも、アムールヤマネコやツシマヤマネコに同様に用いることができるかどうかは不明である。そのため、発情誘起および排卵誘起に必要なホルモンの投与量および投与のタイミングについて、人工授精前に検討しなくてはならない重要な項目であると思われる。野生動物では、保定等による個体へのストレスの問題から、これらのホルモン投与後の血中ホルモン動態を経時的に観察することは困難である。そのため、これらのモニタリングの手法として、糞中の性ステロイドホルモンの測定が行われている [2, 19, 21-24, 41, 64, 65, 74, 149, 152, 154]。したがって、最初に、アムールヤマネコにおける外因性ゴナドトロピン投与後の反応性を糞中性ホルモン動態から観察し、その結果から人工授精のタイミングを決定する必要があるだろう。

これらの背景から、今回はベンガルヤマネコ種の ART を確立するため、アムールヤマネコを用いて、精液採取方法の確立および凍結精液作成方法の検討、外因性ゴナドトロピン投与による発情誘起法および排卵誘起方法の検討、および子宮内人工授精方法を検討するための研究を行った。なおこの研究は、日本動物園水族館協会の定める倫理福祉規程に準じて行われた。

本論文は 8 章よりなり、第 1 章は緒論である。第 2 章では、アムールヤマネコの経直腸電気刺激法による精液採取の検討を行った。第 3 章では、アムールヤマネコの尿道カテーテル法による精液採取の検討および個体差の影響の検討を行った。第 4 章では、アムールヤマネコ精液における低温保存および凍結保存の検討を行った。第 5 章では、アムールヤマネコの精巢上体尾部精子の性状および凍結保存の検討を行った。第 6 章では、非繁殖季節のアムールヤマネコの発情誘起および排卵誘起の検討を行った。第 7 章では、第 1 章および第 6 章の結果をもとに、アムールヤマネコにおける新鮮精液を用いた子宮内人工授精の検討を行った。第 8 章に結論および総括を述べた。

第2章

アムールヤマネコの経直腸電気刺激法 による精液採取法の検討

緒言

イエネコの精液採取方法として、一般的に人工膣法 [51, 168, 169, 180, 184, 188]、経直腸電気刺激法 [50-52, 58, 92, 128, 130, 205-207, 209]、および尿道カテーテル法 [40, 56, 88, 129, 136, 137, 163, 202, 205, 208, 209] が知られており、これらの方法で困難な場合には、精子の貯蔵部位である精巣上体尾部から精子を回収する方法も選択肢として挙げられている [10, 18, 26-28, 31, 32, 55, 59, 71, 88, 90, 105, 109, 136-138, 156, 158, 174-177, 191, 195]。これらの方法のうち人工膣法は、雌に雄がマウントしたときに人が近づいても嫌がらずに人工膣に陰茎を挿入する方法であり、若齢時から訓練したイエネコのみで実施できる。そのため、全身麻酔をかけずに直接近づき触れることが難しい野生ネコ科動物では、この方法を応用することは困難と考えられる。また精巣上体尾部からの精子の回収は、基本的には死亡個体を使用するか、生体から精巣摘出を行うことが前提となるため、今後も繁殖に供する予定がある健康な野生ネコ科動物に用いる方法としては適していない。したがって、野生ネコ科動物からの精液採取としては、一般的に全身麻酔下での経直腸電気刺激法もしくは尿道カテーテル法が行われている。

経直腸電気刺激法は、ウシ、ヒツジ、ヤギなどの産業動物でも用いられている精液採取方法で [120]、直腸プローブを肛門から直腸に挿入し、腰仙部の勃起中枢と射精中枢を電氣的に刺激して射精させる方法である。四肢の故障で乗駕できない場合や非繁殖季節において雄の交尾欲が弱い場合などには、この方法が適用される。電気刺激の方法は動物種によって異なっており、より良い性状の精液を多く採取するためには、電圧の強さ、回数、直腸プローブの大きさおよび電極の形状など、その動物にとって最適な電気刺激の条件が必要である。これまで、イエネコ以外の野生ネコ科動物では、トラ [46-49, 57]、マレーヤマネコ (*Prionailurus planiceps*) [173] を始めとして多くの種 [13, 42, 79, 82, 142] の精液採取のために検討されているが、アムールヤマネコで行われた報告はない。これらの動物で行われている電気刺激方法の条件は様々であ

り、電気刺激の条件は動物の身体の大きさなどが異なるため、動物種に適した条件でないと採取した精液性状に影響が出るだけでなく、動物に対して大きなストレスを与えてしまうことが考えられるため、そのままアムールヤマネコに直接あてはめることはできない。したがって、アムールヤマネコにおける最適な電気刺激の条件を明らかにすることが必要であると考えられた。

そこで、全身麻酔を行った雄アムールヤマネコに様々な条件で経直腸電気刺激法による精液採取を行い、動物の反応と回収した精液の性状からアムールヤマネコの経直腸電気刺激法の最適な条件を明らかにするための検討を行った。精液採取は、同一個体を用いて様々な季節で長期間行い、アムールヤマネコの精液性状における季節による影響や加齢に伴う変化についても同時に検討した。

実験材料および方法

1. 供試動物

供試動物は、東京都井の頭自然文化園で2003年4月23日に生まれ、飼育されている雄アムールヤマネコ1頭である（個体番号No. 15）。この個体は、2004年5月に同居した雌アムールヤマネコを妊娠させていることから、交尾能および受精能が確認されていた。また、この個体は以前（2004年）に骨折した経験があったが、実験期間中の健康状態には問題はみられなかった。個別のケージで単独で飼育されており、給餌は季節差なく、鶏頭や馬肉、マウスなどが与えられていた。飲水は自由であった。

2. 実験期間

実験期間は、2006年4月～2010年6月までの約4年間で、No. 15の年齢は、実験開始時は3歳、終了時は7歳であった。精液採取は、捕獲および全身麻酔による影響などを考慮し、約2ヶ月に1回、ただし真夏の暑さの厳しい時期はできるだけ避けるようにして、合計19回実施した。合計19回の実施日は、表1に示したとおりである。

3. 全身麻酔方法

精液採取の前日の夕方から、全身麻酔による誤嚥の影響を避けるために絶水絶食を行った。実施日に飼育場所より網で捕獲し、網の上から塩酸メデトミジン（ドミツール、日本全薬工業株式会社）60～80 μ g/kg と塩酸ケタミン（動物用ケタラール 50 筋注射用、三共エール薬品株式会社）2mg/kg の混合液を筋肉内投与して麻酔導入を行った。麻酔が効き、不動化した後に井の頭自然文化園内の動物病院へ移動し、体重を測定した後に手術台に乗せ、気管チューブ（5Fr.）を挿管し、イソフルラン（エスカイン吸入麻酔液、マイラン製薬株式会社）によって麻酔維持した。

4. 採血およびホルモン測定方法

全身麻酔後、前腕橈側皮静脈または外側伏在静脈から採血を行った。血液は、健康管理のための血液検査を行うために採血したもの（約 5ml）であるが、一部は血清を分離したのち、ホルモン測定まで-40 $^{\circ}$ Cで保存した。採血は全て同じ時間帯で行われた（PM1:00～2:00）。その後、自動蛍光免疫測定装置（SPOTCHEM VIDAS SV-5010、アークレイ株式会社）を用いて血中テストステロン値の測定を行った。なお血中テストステロン値の測定は、キットによる測定誤差を減らすために全回分を同時に行った。

5. 精巣容積の計測方法

精巣の大きさの測定は、陰囊の外側からノギスを用いて縦 (a)・横 (b)・厚さ (c) (直径) を測定し、楕円体の体積の公式 (cm^3) = $4/3\pi \times a/2 \times b/2 \times c/2$ から精巣容積を求めた。なお、精巣の大きさの測定は、手技による誤差を減らすため、すべて同じ人が行った。

6. 精液採取方法

精液採取は、アムールヤマネコを横臥位にし、直腸プローブを肛門から少量の白色

ワセリンを塗って差し込み、固定し、露出させた陰茎に滅菌尖底管をかぶせて、勃起や射精状況を観察しながら、電気刺激の強さや長さを調節して行った。射精がみられたら、尖底管を交換した。なお、尖底管には乾燥を防止するため、直ちに精液希釈液である卵黄トリス・フルクトース・クエン酸液 (EYT-FC) [189] 50 μ l を添加した。

合計 19 回の電気刺激法による精液採取法では、2 種類の電気刺激装置 (NF-01 (富士平工業株式会社) : 図 1a または ORM (株式会社 ORM) : 図 1b) と 4 種類の直腸プローブ (直径 1cm) : 1) 4 連のリング状電極がついたもの (F-4 (富士平工業株式会社) : 図 1c)、2) F-4 の一番根元の電極をビニールテープで絶縁して 3 連リング状電極に変更したもの (F-3 : 図 1d)、3) 3 本の電極が平行についたもの (O-3 (株式会社 ORM) : 図 1e)、4) 平行電極を 1 本にして裏側をステンレスで絶縁したもの (O-1 (株式会社 ORM) : 図 1f) のうちの 1 つを用いて行った (表 1)。また直腸プローブの挿入の長さ、電圧の強さ、刺激回数は、アムールヤマネコの状態および精液採取状況をみて適宜変更した。電圧に関しては、低い方から高い方への 3 段階の電圧 (0.5~6V) をそれぞれ 3 秒ずつ刺激したものを 1 セットとして行い、10 回行った後には必ず 10 分間の休憩を入れてから次の刺激を行うようにした。なお電気刺激は、採取された精液中に含まれる精子数がほとんどなくなった時点で終了とした。

7. 採尿方法

電気刺激による精液への尿の混入を減らすために、精液採取直前に 3Fr. のアトム栄養カテーテル (アトム栄養カテーテル、アトムメディカル株式会社) に粘滑・表面麻酔剤 (キシロカインゼリー 2%、アストラゼネカ株式会社) を少量つけて尿道から膀胱内に挿入し、採尿を行った。

8. 精液検査方法

精液は、採取直後に井の頭自然文化園の動物病院において精子の有無および精子活力検査を行い、その後、精液を日本獣医生命科学大学の獣医臨床繁殖学研究室に持ち

帰り、総精子数、精子生存率および精子奇形率の検査を行った。なお、採取から持ち帰って検査するまでの時間は30分以内であった。

総精子数は、血球計算盤を用いて精子濃度を求め、精液量から算出した。精子活力は、37°Cに加温した精液性状検査板（富士平工業株式会社）を用いて、活発に前進運動するものを+、緩慢な運動をするものを±、動かないものを-として百分比で観察し、+の割合を精子活力として示した。精子生存率は、エオジンで染色した塗抹標本で、精子頭部が赤色のものを死滅精子、不染のものを生存精子として、百分比で算出した。また精子奇形率は、エオジン染色した塗抹標本で、精子頭部、中片部および尾部奇形に分けて百分比で観察し、総奇形率を精子奇形率として示した。

9. 統計処理

本研究で得られた成績は、雌アムールヤマネコの繁殖季節を基準として、精液を採取した時期によってサブグループを作成して、そのサブグループ間の多重比較検定によって有意差の解析を行い、有意差が認められたものではその後に Tukey-Kramer 法で検定を行った。なお、危険率 5%未満であった場合、両者に有意差があると判断した。なお、サブグループは、井の頭自然文化園にて飼育している雌アムールヤマネコのこれまでの発情が 1 月下旬~4 月にみられていることから、1~4 月（繁殖季節、n=6）、5~8 月（繁殖季節後、n=7）、9~12 月（繁殖季節前、n=6）とした。また、体重、左右平均精巣容積、血中テストステロン値および各種精液性状の項目の間における相関性については、スピアマンの順位相関係数によって検定を行った。

結 果

1. 体重および精巣平均容積

研究期間における体重の推移および季節によって分類したサブグループの平均値（±SE）のデータは、図 2 に示したとおりである。その結果、研究期間内における体

重は、3.8～5.9 kgの範囲でやや大きな変動がみられた。体重は繁殖季節前が最も高値を示し、繁殖季節および繁殖季節後との間に有意差がみられた ($p < 0.05$ および $p < 0.01$)。また加齢に伴う影響を観察するために年ごとの平均値 ($\pm SE$) のデータ (2006年 $n=4$ 、2007年 $n=3$ 、2006年 $n=5$ 、2006年 $n=5$ 、2006年 $n=2$) に分類して、図3に示した。その結果、各年の間に有意な差はみられなかった。

精巣容積は、左右精巣の平均容積の推移および季節によって分類したサブグループの平均値 ($\pm SE$) のデータは、図4に示したとおりである。右精巣と左精巣の間で若干の差がみられたが、両者の間に有意な差はみられなかったため、左右精巣の平均容積 ($\pm SE$) をデータとして示した。その結果、研究期間内における左右精巣の平均容積は、1.0～2.4 cm^3 の範囲でやや大きく変化した。左右精巣の平均容積は繁殖季節後が最も低値で、繁殖季節が最も高値を示し、両者の間には有意差がみられた ($p < 0.05$)。また、体重と左右精巣の平均容積の間には有意な相関性はみられなかった (図5)。また加齢に伴う影響を観察するために年ごとの平均値 ($\pm SE$) のデータに分類して、図6に示した。その結果、加齢に伴って、やや小さくなっていくようにみえたが、各年の間に有意差はみられなかった。

2. 精液採取直後の精液性状

各種電気刺激法の条件は表1に、採取直後の精液性状は表2にそれぞれ示した。すなわち、各種条件で行った電気刺激によって採取された精液の性状は様々であったが、直腸プローブの種類、刺激の強さおよび刺激の回数による有意差はみられなかった。ただし、4連リングの直腸プローブを用いて肛門から8～10 cm挿入した電気刺激のうち、2～6Vで刺激したNo.1および1～3Vで刺激したNo.7では尿の混入が、1～3Vで刺激したNo.6では尿および薄い血液の混入がみられた。これらの精液においては、精子活力や精子生存率が低値を示し、精子奇形率がやや高値を示した。これは尿や血液による人為的な影響があると判断したため、総精子数以外の精液性状のデータを統計処理から除外した。したがって、精子活力、精子生存率、精子奇形率に関して

は、繁殖季節 n=5、繁殖季節後 n=6、繁殖季節前 n=5 となった。

研究期間における採取直後の総精子数のデータと季節によって分類したサブグループの平均値 (±SE) のデータを図 7 に示した。その結果、全 19 回の精液採取のうち、8 月の真夏の時期に行った精液採取では射精はみられたが、精子がほとんど含まれていなかった。それ以外の時期では精子を含む射精がみられたが、総精子数は $1.0 \sim 68.6 \times 10^6$ と、採取を行った時期によって大きなばらつきがみられた。総精子数は、繁殖季節および繁殖季節前に比較して繁殖季節後で低値を示したが、各季節の間で有意差はみられなかった。また、総精子数と体重および左右平均精巣容積の間には、有意な相関性はみられなかった (図 8)。また、加齢に伴う影響を観察するために年ごとの平均値 (±SE) のデータに分類して図 9 に示した結果、加齢に伴い総精子数が増加する傾向がみられたが、各年の間に有意差はみられなかった。

研究期間における採取直後の精子活力のデータと季節によって分類したサブグループの平均値 (±SE) のデータを図 10 に示した。その結果、繁殖季節後が他の季節に比較して低値を示したが、季節間で有意差はみられなかった。また、精子活力と体重または左右平均精巣容積の間には、有意な相関性はみられなかった (図 11)。また加齢に伴う影響を観察するために年ごとの平均値 (±SE) のデータに分類して図 12 に示した結果、加齢に伴い増加する傾向があったが、各年の間に有意差はみられなかった。

研究期間における採取直後の精子生存率のデータと季節によって分類したサブグループの平均値 (±SE) のデータを図 13 に示した。その結果、繁殖季節後が他の季節に比較して低値を示したが、季節間で有意差はみられなかった。精子生存率と体重または左右平均精巣容積の間には、有意な相関性はみられなかった (図 14)。また加齢に伴う影響を観察するために年ごとの平均値 (±SE) のデータに分類して図 15 に示した結果、明らかな傾向はみられず、各年の間に有意差はみられなかった。

研究期間における採取直後の精子奇形率のデータと季節によって分類したサブグループの平均値 (±SE) のデータを図 16 に示した。その結果、繁殖季節後が最も高値を示したが、他の季節との間に有意差はみられなかった。なお奇形精子の多くは、尾

部奇形（屈折、屈曲、旋回）であった。精子奇形率と体重または精巣容積の間には、有意な相関性はみられなかった（図 17）。また加齢に伴う影響を観察するために年ごとの平均値（±SE）のデータに分類して図 18 に示した結果、加齢に伴いやや増加する傾向があったが、各年の間に有意差はみられなかった。なお、2007 年は 1 例であったため、データから除外した。

3. 血中テストステロン値と季節、体重、精巣容積および精液性状との関係

研究期間における採取直後の血中テストステロン値の推移と季節によって分類したサブグループの平均値（±SE）のデータを図 19 に示した。その結果、血中テストステロン値は、0.13～13.00ng/ml と採取時期によって大きな変動がみられた。血中テストステロン値の平均値は、繁殖季節前が最も高値を示し、繁殖季節後が最も低値を示し、これら両者の間には有意差がみられた（ $p < 0.05$ ）。加齢に伴う影響を観察するために年ごとの平均値（±SE）のデータに分類して図 20 に示した結果、明らかな傾向はみられなかった。また血中テストステロン値と体重または左右精巣の平均容積、総精子数との関係において、明らかな相関性はみられなかった（図 21, 22）。また、血中テストステロン値と精子活力、精子生存率または精子奇形率とのそれぞれの関係においても、明らかな相関性はみられなかった（データは示さず）。

考 察

今回行った最初の経直腸電気刺激法は、福岡市動物園で行われていたイエネコの精液採取に用いた方法 [201] を応用して行われた。この方法では、電圧は 2V、3V、4V と低い電圧から初めて、電気刺激に対する反応を見ながら 6V まで上げる方法であった。しかし、最初にアムールヤマネコに 2～6V の電圧で刺激を行なったところ、身体が過剰に反応してしまった。そのため、個体へのストレスを最小限にし、射精状況を見ながら徐々に電圧を下げるようにして行い、16 回目以降では 2V 以下の電圧で行うよう

にした。この点に関して、イエネコの電気刺激法を検討した Howard ら [81] は 2~3 分間隔で 3 セット (合計 8 回の刺激) を行い、1 セット目は、2V、3V、4V で 10 回ずつ、3 セット目は 4V、5V で 10 回ずつと徐々に電圧を高くした方法で行ったことを報告しており、この刺激方法は Zambelli ら [205] も活用している。これらの報告からも、精液採取にはある程度の高い電圧が必要であると考えられるが、6V までの高い電圧は必要ないと判断された。電気刺激と精液性状の関係に関して、イエネコの電気刺激法による精液採取の報告 [127, 128] によると、電気刺激の強さと回数は回収精子数に影響するが、精液量には影響しないことが明らかとなっている。その報告では 1V または 2V の刺激に対して、4V または 8V の刺激の方が回収精子数は有意に多かったが、電圧を高くしすぎると尿の混入が起こることが問題となっていた。今回の研究では、アムールヤマネコの身体への影響を考え、高い電圧での刺激をあまり行わなかったことから、低電圧と高電圧で刺激を行った結果を比較することはできなかった。また、イエネコの電気刺激法において、刺激の強さに対して 2 つの閾値、すなわち、0~1V の間に副生殖腺分泌液の放出 (精漿) の閾値、2~8V の間に精子数が最大になる閾値があることが報告されている [127]。したがって、低い電圧で刺激を行って精液が射出されたとしても、精子が十分に含まれているとは限らないため、電気刺激のかけ方は、精子濃度の確認を十分に行う必要があると考えられた。また、尿の混入に関しては、今回 2~6V で行った時だけではなく、1~3V の低い電圧で行った時にもみられた。したがって、尿の混入は電圧だけの問題ではなく、直腸プローブの形状やプローブの位置にも影響されていると考えられた。以上の結果から、アムールヤマネコでも精液を多く射出させるためには、高い電圧が必要であることが示唆された。今後、本研究で行った方法を元に、高い電圧での刺激や刺激の頻度、刺激の強さの変化の方法などをさらに検討する必要がある。

電気刺激が与える影響に関する福岡市動物園のイエネコの研究 [201] では、電気刺激前後に血液検査を行い、クレアチン・ホスホキナーゼ (CPK) の上昇が顕著にみられたことを報告した。すなわち、これは電気刺激によって骨格筋が興奮、疲弊したこと

によるものと推察されたが、3 日程度で回復した。しかし、全身麻酔や電気刺激を繰り返してもイエネコに全く悪影響がなかったという報告もある [128]。今回、検査は行わなかったが、CPK の上昇はアムールヤマネコにも起こっていると考えられるため、電気刺激法による精液採取を行う場合には、ある程度の間隔をあけることが必要であると考えられた。今回は、2 ヶ月に 1 回の精液採取としたが、実験期間中、とくに精液採取直後にアムールヤマネコの健康状態には問題はなかったため、この間隔は適切であったと考えられた。

今回の研究では、2 種類の電気刺激装置と 4 種類の直腸プローブについての検討を行った。その結果、電気刺激装置の違いによる精液性状には大きな差はみられなかった。ただ両者を比較すると、電気刺激装置 ORM は小型であり、充電器を用いて使用できるように設計されているため、電源のない場所でも使用することができる点で優れていると思われる。直腸プローブについては、最初、富士平工業製の電気刺激装置に付属している 4 連リングの直腸プローブを使用し、肛門から 8~10 cm 挿入して行った。しかし、この方法では尿の混入が頻繁にみられた。これは、おそらく電気刺激が膀胱に伝わり、排尿を促したものと考えられた。そこで、排尿刺激がないようにリングの一番下の部分をビニールテープで絶縁して 3 連リングとし、挿入の長さは 6.5 cm に調節して行った。その結果、尿の混入はみられなくなったため、精液性状に影響がみられることはなくなった。さらに、直腸プローブにおける電極は、上記のリング式よりも直腸に平行なものが良いと考え、ORM-3 を使用して行った。その結果、回収精子数は微増した。その後、背側への刺激はいらないと考えられたため、電極を腹側に 1 本にし、背側を絶縁した ORM-1 を使用した。その結果、回収精子数は変わらず回収でき、尿が混入することは全くみられなくなった。以上のことから、アムールヤマネコの経直腸電気刺激法における精液採取に用いる直腸プローブとしては、リング状電極より平行電極が良好であり、挿入部位は肛門から約 6.5 cm が最も良いと判断された。しかし、今回の実験では、1 頭のアムールヤマネコでしか行っていないため、個体差についての検討は実施できなかった。アムールヤマネコの体格の違いや電気刺激の反応に

対する個体差によって、今回の条件があてはまらない可能性も考えられるため、今後さらに違う個体についての検討を行う必要がある。

これまで、イエネコで行われている電気刺激による精液採取は、麻酔薬によって影響を受けることが知られている。Zambelli ら [205] は、イエネコの電気刺激法に関して麻酔薬の検討をした結果、塩酸ケタミン単独で使用した場合と塩酸メデトミジン単独で使用した場合では、塩酸メデトミジンを使用した時でより多くの精子を回収できることを明らかにした。今回使用した麻酔薬は、ネコ科動物で最も一般的な麻酔薬である塩酸ケタミンと塩酸メデトミジンの混合投与であったが、上記の報告から塩酸メデトミジン単独で用いた方が良い可能性も考えられた。これらの点からも、アムールヤマネコの精液採取において麻酔薬の選択および使用法は、精液性状に影響を与える大きな要因であると考えられるため、今後さらに精液採取において最適な麻酔薬の検討が必要である。

今回行ったアムールヤマネコの平均射精総精子数は、1,500万であった。この射精精子数は、イエネコで塩酸メデトミジンを使用した経直腸電気刺激法によって採取された射精精子数(2,500万)に比較するとやや低値であったが、塩酸ケタミンを使用した場合(1,310万)より高値であった[205]。イエネコの人工授精に必要な授精精子数は腔内授精で8,000万、子宮内授精で800万であることが報告されている[180]。アムールヤマネコの人工授精においてもイエネコと同じ授精精子数が必要であるかは不明であるが、同じであると仮定すれば子宮内授精にしか用いることができないと考えられた。しかし、イエネコの子宮内授精には開腹手術を必要とするため、アムールヤマネコのような野生ネコ科動物には容易に応用することができない。したがって、今後アムールヤマネコの人工授精に必要な精子数の検討を行うと同時に、麻酔法や刺激の条件などを変えることで精液採取方法を検討して、腔内授精にも用いられるように、さらに多くの精子を射出する適切な条件を開発することが必要であると考えられた。

また、イエネコの電気刺激法による精液採取では、かなりの数の精子が膀胱に逆流

することが報告されている [52]。ただ、この逆流は、自然交配や人工膣法による精液採取後にも観察されることが明らかとなっているため、イエネコの射精過程における生理的な現象であると考えられる。今回の研究において膀胱内の尿中に含まれる精子数を観察しなかったため、アムールヤマネコがイエネコと同様の現象が起こっているかを確認することはできなかったが、回収精子数が少なかったことから、精子の逆流が起こっていることが示唆された。今後、この精子を利用するために、精液採取前に膀胱洗浄を行い、精子に影響の少ない希釈液（例えば、生理食塩液）で置き換え、電気刺激による射精後に膀胱内の希釈液を回収することで多くの精子を利用することもできるのではないかと考えられる。また、この方法では射精時に排尿処置を実施しておらず、電気刺激によって膀胱内の尿が排出される可能性もある。しかし、その排出によって生殖道内に付着した精子も回収でき、多くの精子を回収できるのではないかと考えられた。

今回、雄アムールヤマネコの全身麻酔下における精液採取を検討したのは1頭だけであったが、約4年間という長期間にわたって実施したため、雄アムールヤマネコの造精機能における季節的な変化および加齢の伴う変化を観察することができた。季節的な影響としては、体重に顕著な変化が現れ、夏に低値を、秋に高値を示した。すなわち、雌アムールヤマネコの繁殖季節は1~4月であるため、雌の繁殖期前に体重が最高値を示し、繁殖期に向けて体重が減少し始めることが明らかとなった。井の頭自然文化園では、アムールヤマネコの飼育において一年を通して餌の内容や量は変えていない。すなわち、秋頃から寒さに備えて代謝を抑制してエネルギーを蓄え、繁殖期頃から消費するようになるため、このような体重の変化が起こったと考えられた。しかし、体重、精巣容積と精液性状の間に有意な相関性はみられず、身体的計測によって精液性状を推測することは困難であることが明らかとなった。

また、血中テストステロン値にも季節的な影響がみられ、他の季節に対して冬が有意に高値を示した。すなわち、繁殖期前に最大値を示し、その後低下していくことが明らかとなった。しかし、血中テストステロン値と体重、精巣容積および総精子数、

精子奇形率を含むすべての精液性状との間に有意な関係性はみられなかった。ただし、総精子数は精液採取方法などが関係してくることが考えられ、今回の成績で正確に判断できるとは限らないため、今後、テストステロンと精液性状の関係については更なる検討が必要である。

体重の変動に比較して、精巣の大きさには季節的な影響はみられなかった。また、精巣容積と精液性状の間にも有意な差はみられず、精液性状において季節的な影響はみられなかった。いくつかの野生動物（例えば、タヌキ、シカなど）においては、雄の生殖器（とくに精巣）にも季節性がみられ、雌の繁殖期に最大の大きさとなり、それ以外の季節は萎縮することが明らかとなっている [151, 184]。野生ネコ科動物においては、精巣容積において季節性変化がみられるかどうかは明確にされていない [17]。一方、イエネコの造精機能の季節性変化に関しては報告がある。筒井ら [184] は、同一雄ネコを用いて採取した精液の性状について比較検討した。その結果、雌イエネコの非繁殖季節においては、雄イエネコの造精能および性ホルモンの分泌能は営まれているものの、繁殖期との間に明らかな差が認められ、雄イエネコも繁殖機能に季節的（日照時間）な影響を受けていることを明らかにした。ただし、この論文では精巣容積の変化については記載がなかった。精巣容積に関しては、野良イエネコにおける精巣重量や精管内の精子数は季節による変化はみられなかったが、精巣上体重量にわずかな変化があったこと [93] や、カナダ都市部のイエネコでは精巣重量に季節差がみられ、血中テストステロンと強い相関性がみられたこと [101] も報告されている。これらの報告から、野生ネコ科動物において、精巣容積および造精機能において季節の影響を受けることが示唆される。この点に関して、今回の研究において、繁殖季節の精巣容積に対して有意な差が生じたのは繁殖季節後のみであったのは、測定法に原因がある可能性がある。すなわち、陰嚢壁の上から測定したため、多少の誤差が生じてしまったことが推察された。しかし、精巣を直接測定することは難しいため、超音波診断装置を利用するなど、他の測定法の検討も必要であろう。

本実験成績から、今回用いた経直腸電気刺激法でアムールヤマネコの精液採取を行

うことは可能であることが判明した。さらに精液採取に適した条件を決定することができた。また精液採取を行う時期は、夏を避け、秋から春にかけての季節が適していることが明らかになった。ただし今回の1頭だけのデータでは、アムールヤマネコの造精機能を決定することはできないため、今後さらに他の雄個体についても精液採取を試み、例数を重ねて、最適な精液採取方法および精液性状における個体差についても検討する必要がある。

小 括

1頭の雄アムールヤマネコから、約4年間にわたり、約2ヶ月に1回の頻度で計19回の経直腸電気刺激法による精液採取を行った。計2種類の電気刺激装置、計4種類の形状の直腸プローブを用い、電気刺激の条件を検討するとともに、採取できた精液性状、体重、精巣容積、血中テストステロン値から季節的および経年的変化の検討を行った。なお、季節的な変化はデータを精液採取時期によって3つのサブグループ、すなわち繁殖季節(1~4月)、繁殖季節後(5~8月)、繁殖季節前(9~12月)に分けて分析を行った。

その結果、体重は繁殖季節前が他の季節に比較して有意に高値を示した($p < 0.05$ および $p < 0.01$)。左右精巣の平均容積は、繁殖季節後が繁殖季節に比較して有意に低値を示した($p < 0.05$)。体重と左右精巣の平均容積の間には有意な関係はみられなかった。またすべての項目で、加齢による有意な変化はみられなかった。

各種条件で行った電気刺激によって採取された精液の性状は、直腸プローブの種類、刺激の強さおよび刺激の回数の違いによる差はみられなかった。電極を直腸と平行に腹側に1本にした直腸プローブが、尿の混入を最小限にし、多くの精子を採取できた。挿入部位は肛門から約6.5 cmが最も適していると判断された。

採取できた精子数は、採取時期によって大きな差がみられ、他の季節に比較して繁殖季節後で低値を示したが、各季節間で有意差はみられなかった。平均総精子数は約1,500万であった。精子活力および精子生存率は、繁殖季節後が他の季節に比較して低値を示したが、季節間で有意差はみられなかった。なお精子奇形率は、繁殖季節後が最も高値を示したが、他の季節との間に有意差はみられなかった。各精液性状において、加齢に伴う変化はみられなかった。

血中テストステロン値は、繁殖季節後に比較して繁殖季節前が有意に高値を示した($p < 0.05$) が、加齢に伴う変化はみられなかった。

以上のことから、今回の条件で行った経直腸電気刺激法でアムールヤマネコの精液

採取を良好に行うことができた。精液採取を行う時期は、夏を避け、秋から春にかけての季節が適していることが明らかになった。

表 1. 各精液採取時における電気刺激装置・プローブおよび電気刺激の条件

	日付	電気刺激装置	プローブ	プローブ挿入深度	電圧	刺激回数
1	06/04/24	NF-01	F-4	—	2~6V	13
2	06/06/29	NF-01	F-4	10cm	1~3V	11
3	06/08/17	NF-01	F-4	10cm	1~3V	13
4	06/11/18	NF-01	F-4	8、10cm	1~3V	13
5	07/05/28	NF-01	F-4	10cm	1~3V	18
6	07/07/30	NF-01	F-4	8cm	1~3V	7
7	07/10/02	NF-01	F-4	8、10cm	1~3V	9
8	08/01/28	NF-01	F-3	6.5cm	1~4V	13
9	08/03/24	NF-01	F-3	6.5cm	1~4V	15
10	08/06/05	NF-01	F-3	6.5cm	1~3V	10
11	08/10/07	NF-01	F-3	6.5cm	1~3V	9
12	08/12/11	NF-01	F-3	6.5cm	1~4V	9
13	09/02/24	NF-01	ORM-3	6.5cm	1~3V	8
14	09/04/23	NF-01	ORM-3	6.5cm	0.5~3V	9
15	09/06/25	NF-01	ORM-3	6.5cm	1~3V	9
16	09/10/13	ORM	ORM-1	6.5cm	0.5~2V	16
17	09/12/09	ORM	ORM-1	6.5cm	0.5~2V	16
18	10/03/04	ORM	ORM-1	6.5cm	0.5~2V	11
19	10/06/11	ORM	ORM-1	6.5cm	0.5~2V	8

表 2. アムールヤマネコの精液採取直後の精液性状

	日付	精子活力 (%)	精子生存率 (%)	精子奇形率 (%)	総精子数 ($\times 10^6$)	備考
1	06/04/24	0	8.1	33.6	10	尿混入
2	06/06/29	30	82.8	2.7	23.4	
3	06/08/17	30	71.1	4.2	0	
4	06/11/18	70	91.1	5.9	6.5	
5	07/05/28	75	87.5	21.0	6.5	
6	07/07/30	55	66.2	18.8	20.3	血液混入
7	07/10/02	0	42.6	22.9	68.6	尿混入
8	08/01/28	90	94.8	4.2	38.6	
9	08/03/24	70	78.4	5.7	9.3	
10	08/06/05	50	86.5	3.6	8	
11	08/10/07	50	91.6	11.2	3.4	
12	08/12/11	60	73.2	9.2	4.1	
13	09/02/24	70	96.9	6.4	13.9	
14	09/04/23	55	94.0	4.7	14.4	
15	09/06/25	50	65.0	24.5	1	
16	09/10/13	70	94.0	3.9	34	
17	09/12/09	60	92.7	5.3	23.3	
18	10/03/04	50	64.3	17.3	61.6	
19	10/06/11	80	84.5	4.5	13.9	

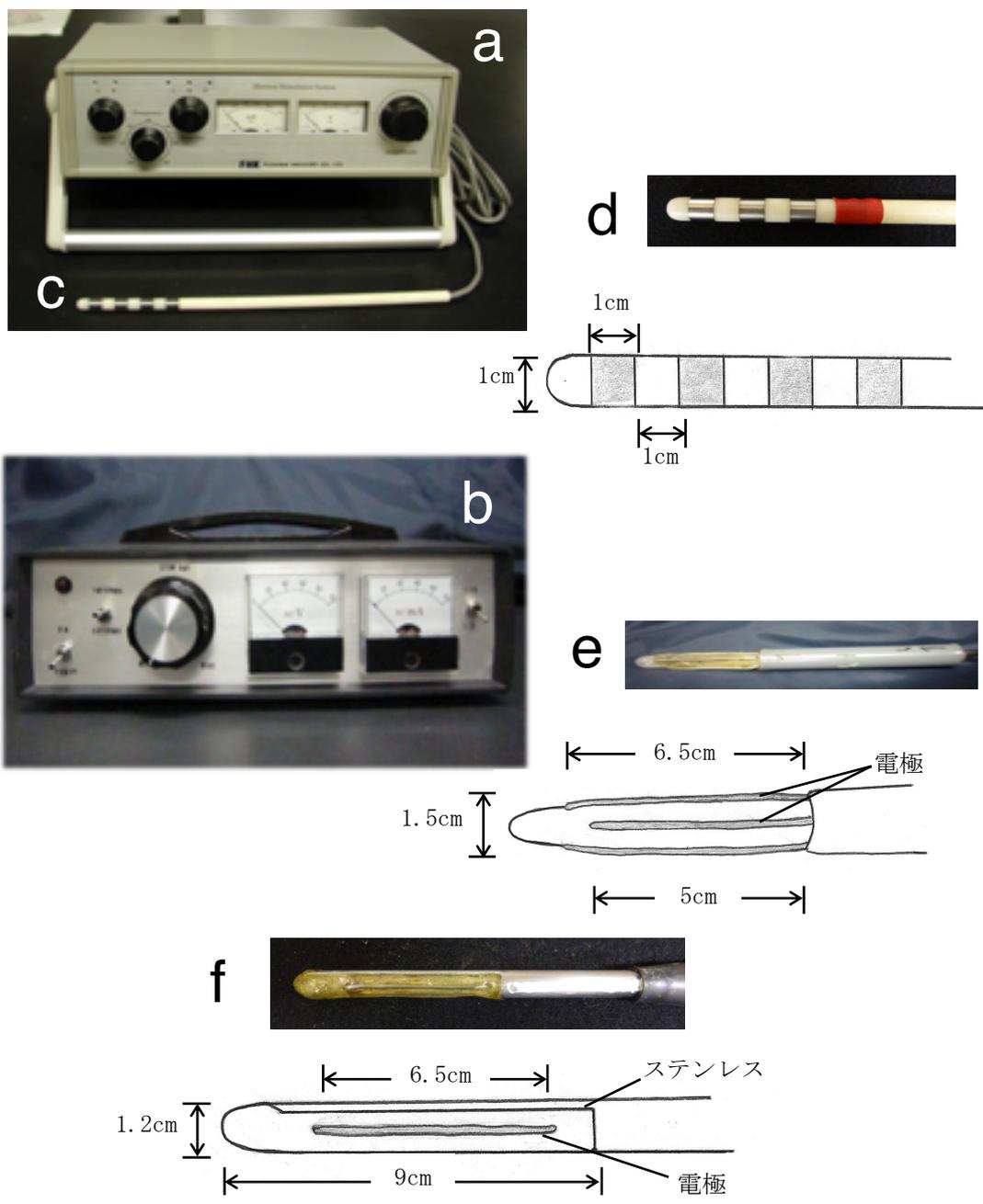


図1. 実験に使用した各種電気刺激装置および直腸プローブ

電気刺激装置 : a. NF-01、b. ORM

直腸プローブ : c. F-4、d. F-3、e. ORM-3、f. ORM-1

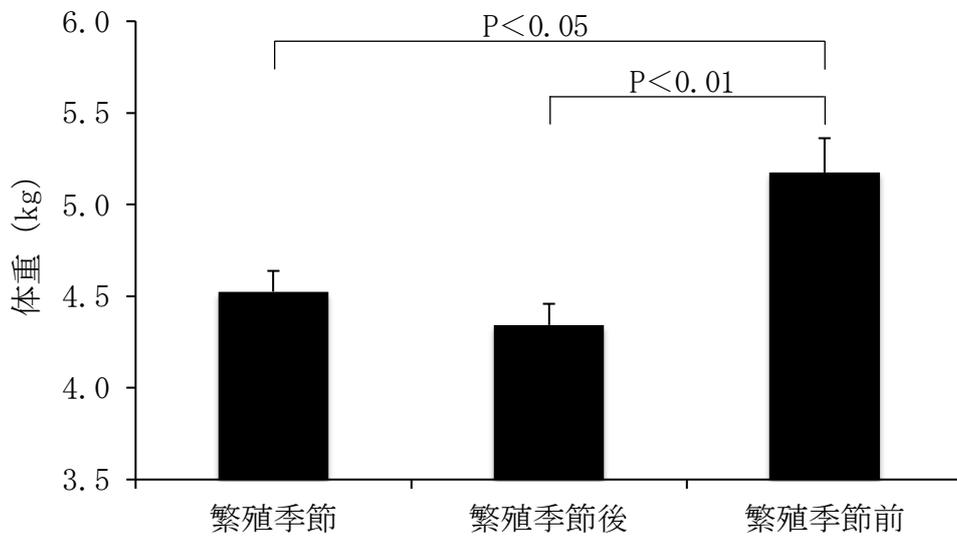
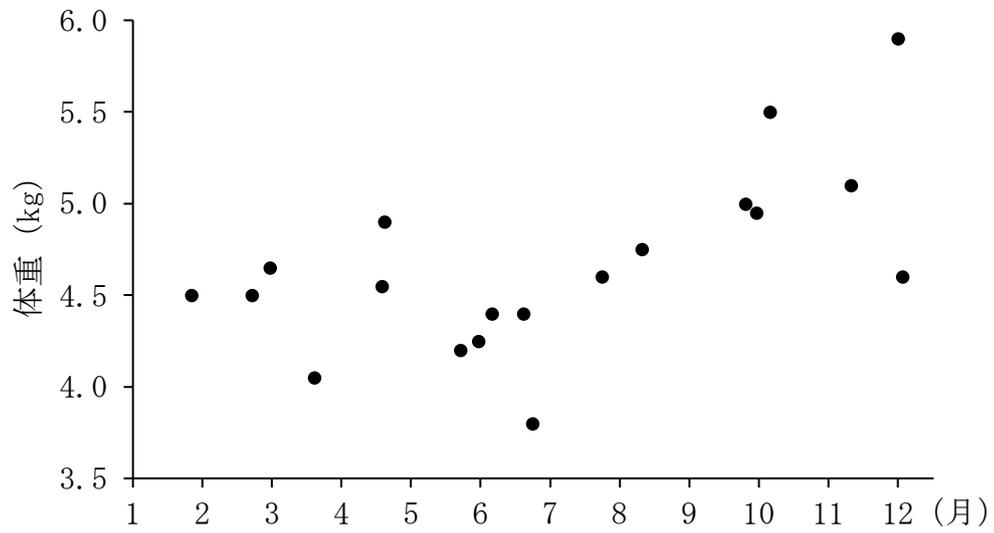


図2. アムールヤマネコの体重の季節的変化

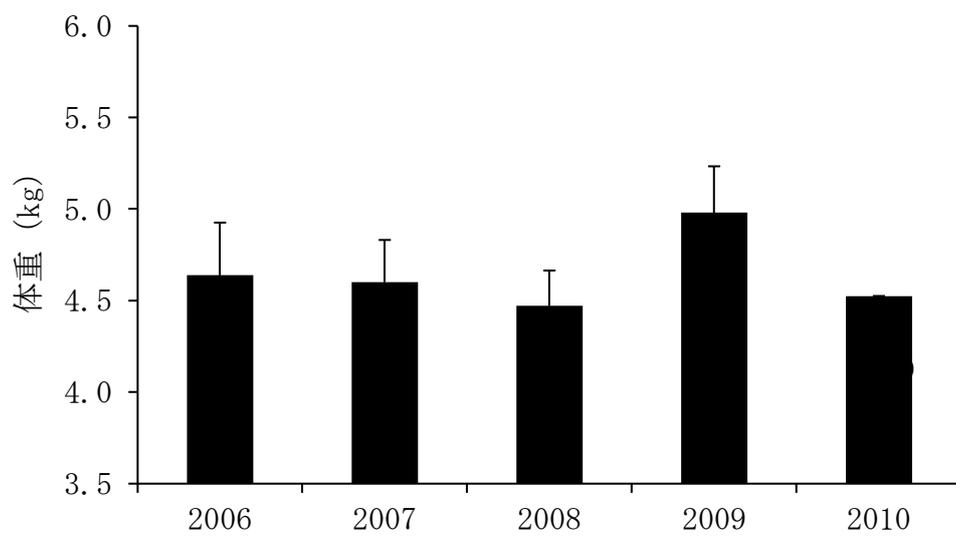
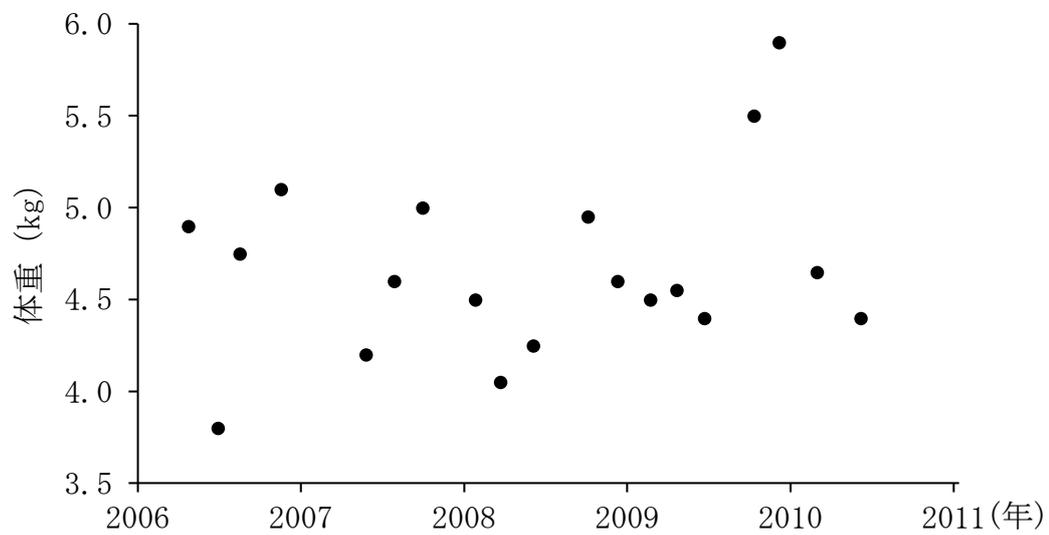


図3. アムールヤマネコの体重の経時的変化

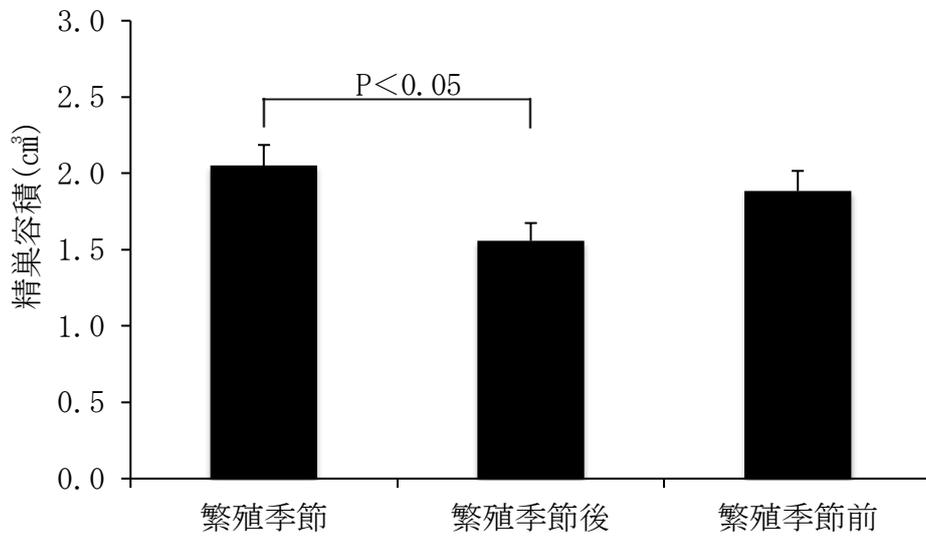
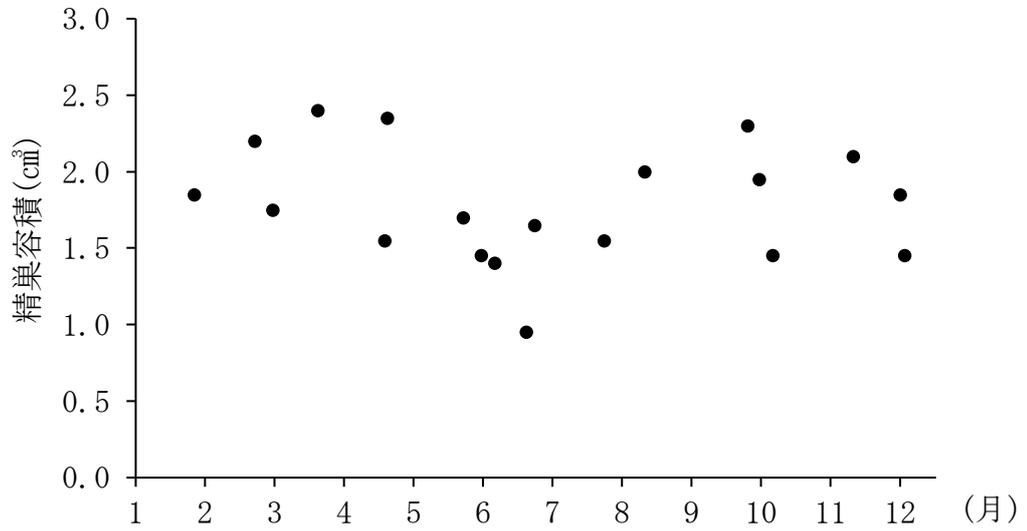


図 4. アムールヤマネコの左右精巣の平均容積の季節的变化

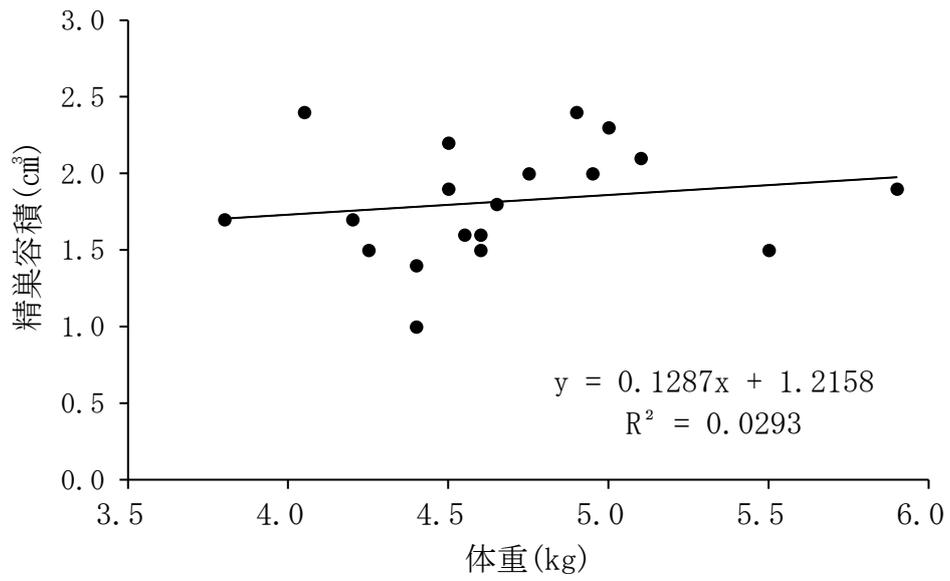


図5. アムールヤマネコの体重と左右精巣の平均容積の関係

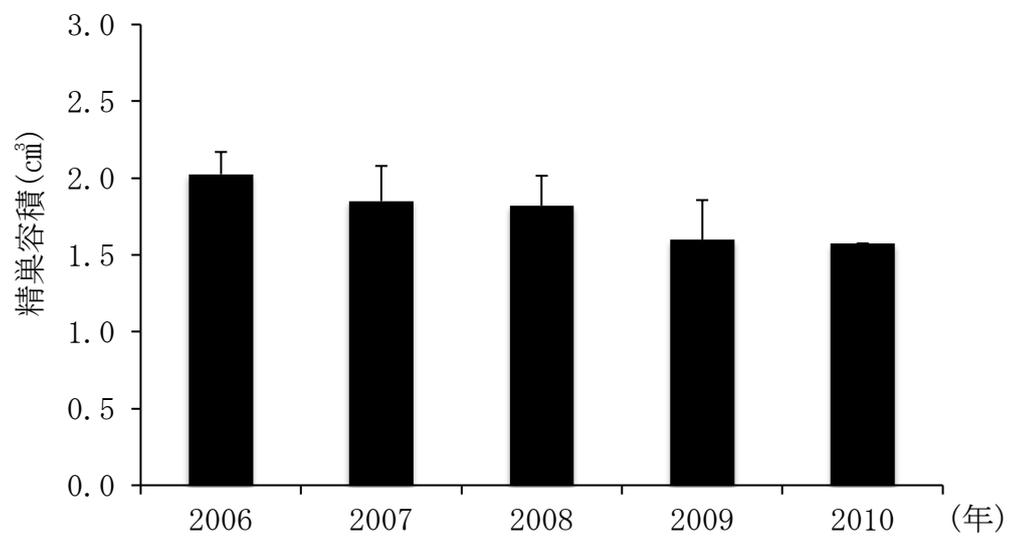
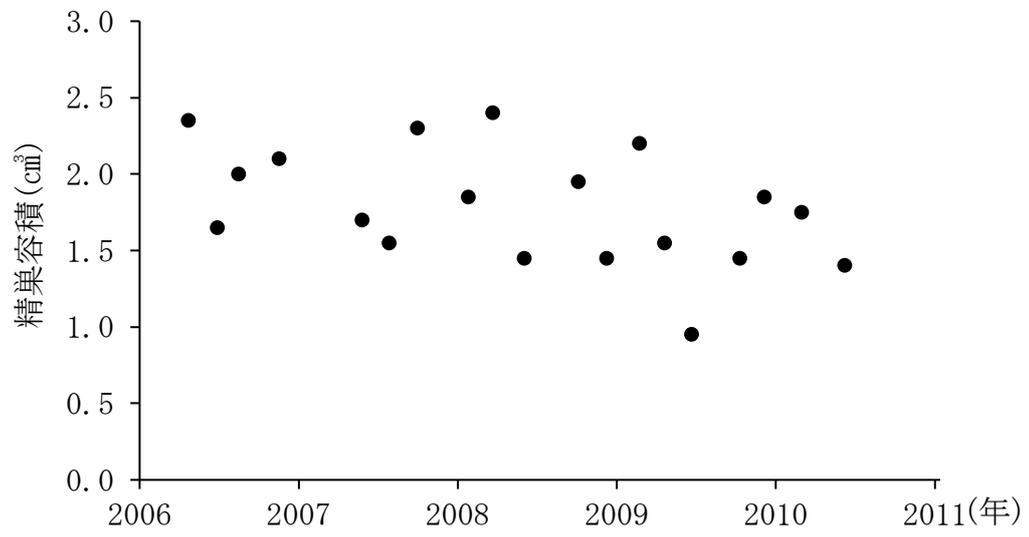


図6. アムールヤマネコの左右精巣の平均容積の経時的

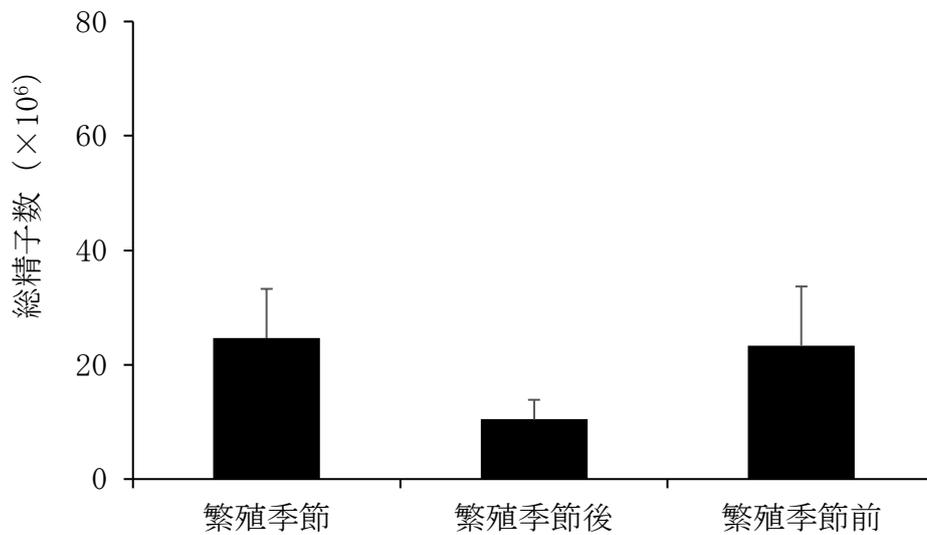
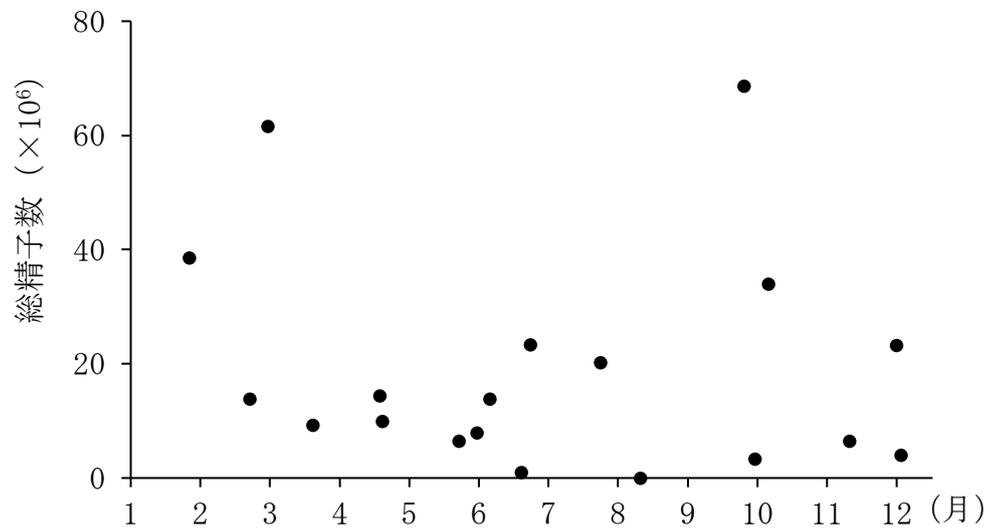


図7. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における総精子数の季節的変化

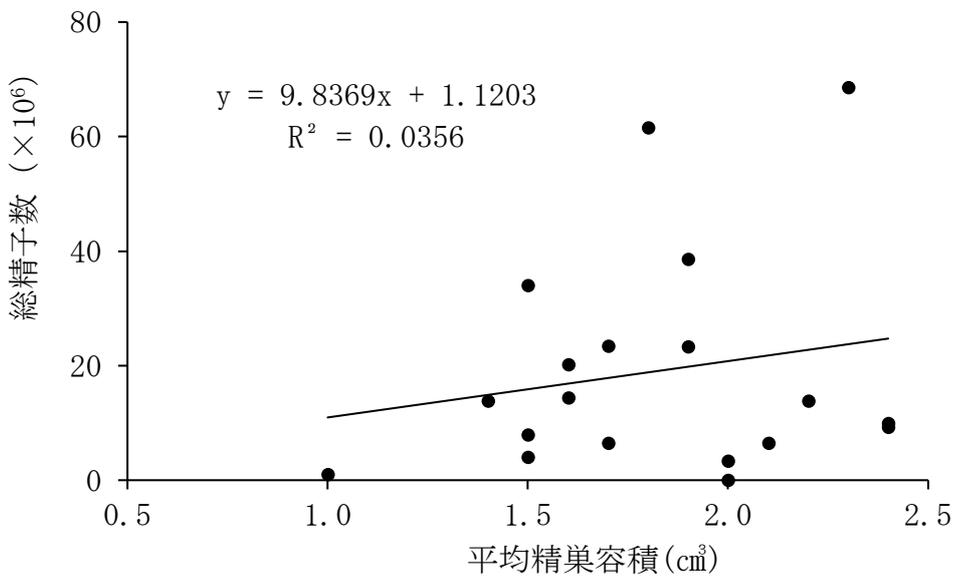
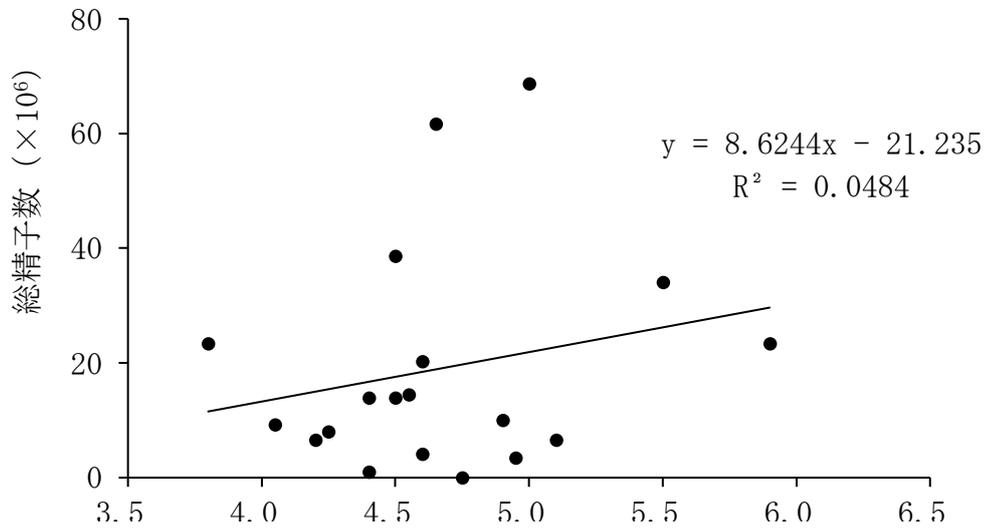


図8. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における総精子数と体重および左右平均精巣容積の関係

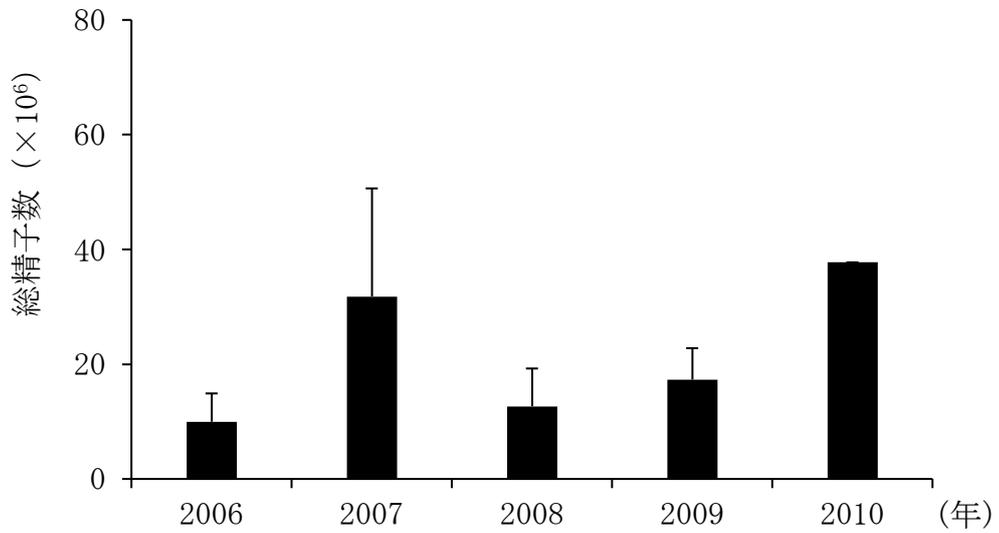
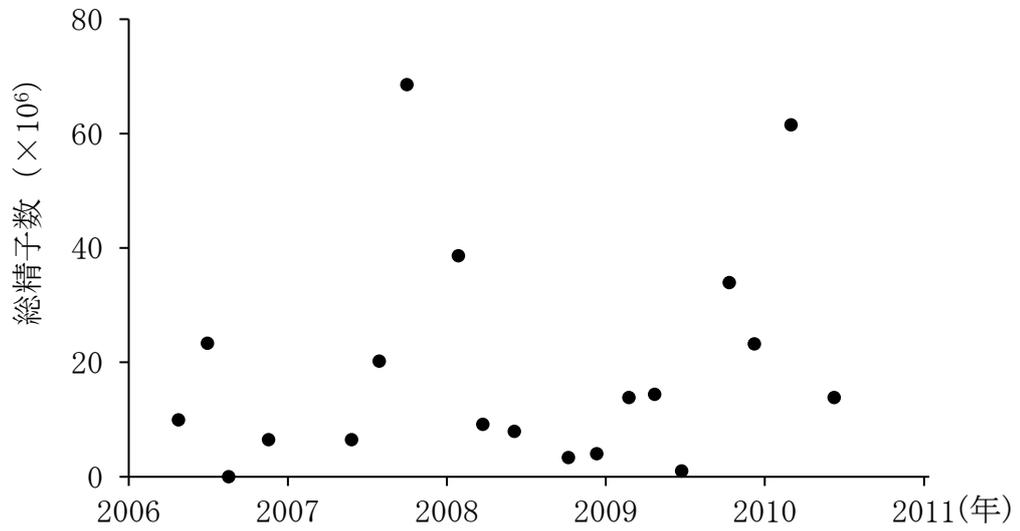


図9. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における総精子数の経時的変化

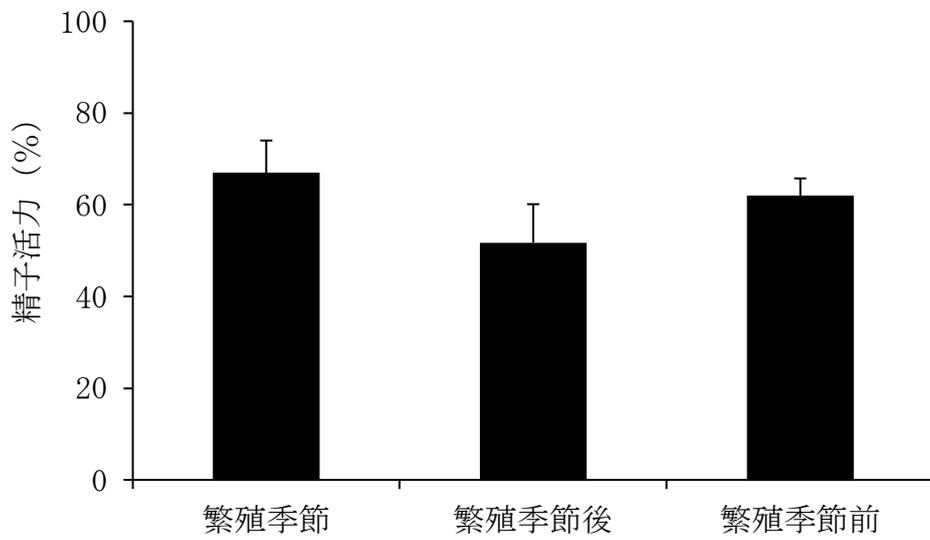
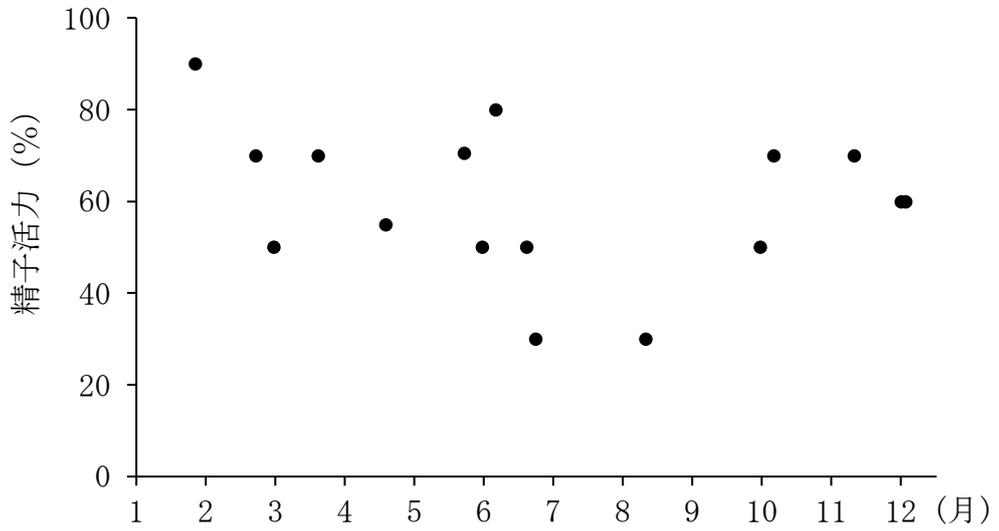


図 10. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における精子活力の季節的变化

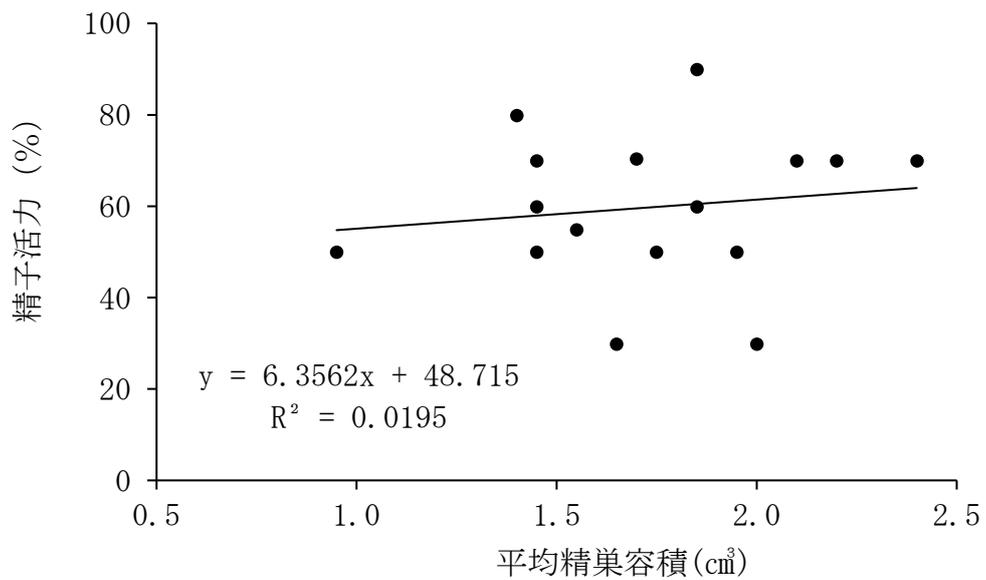
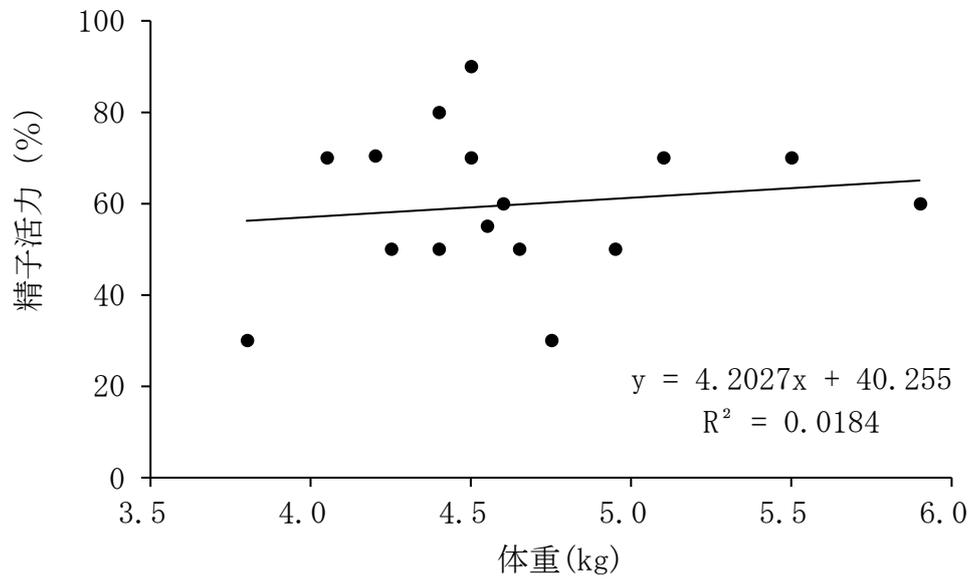


図 11. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における精子活力と体重および左右精巣の平均容積の関係

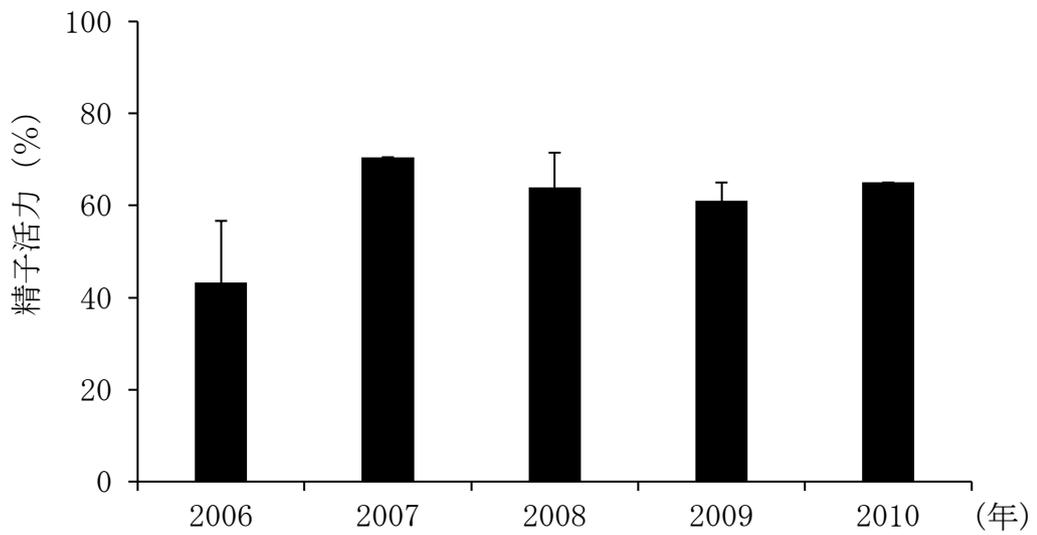
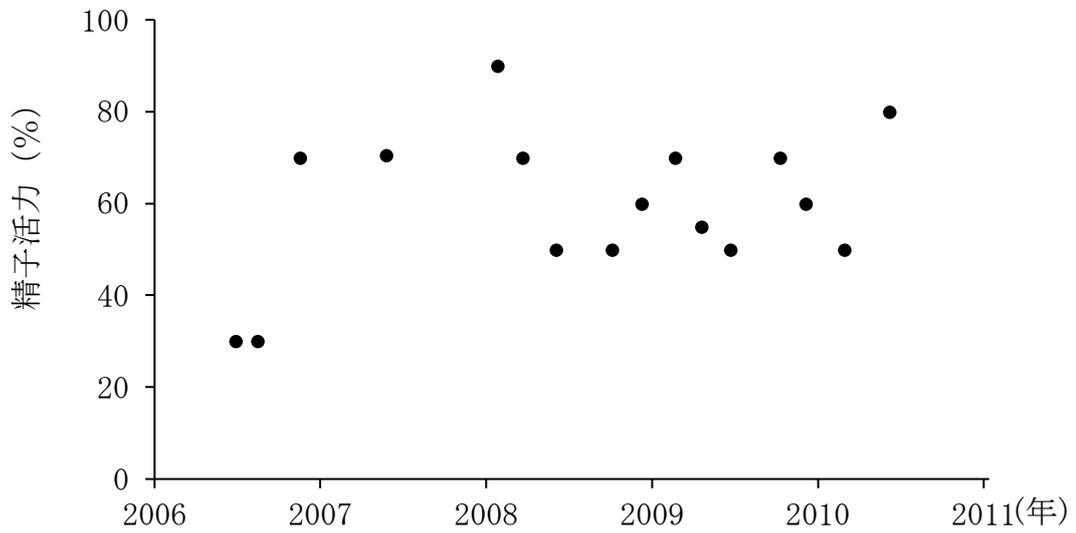


図 12. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における精子活力の経時的 変化

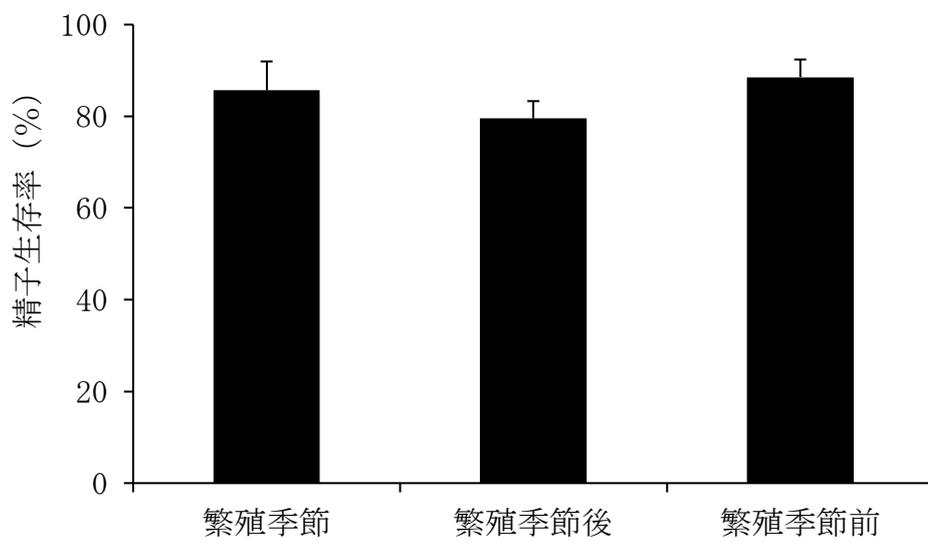
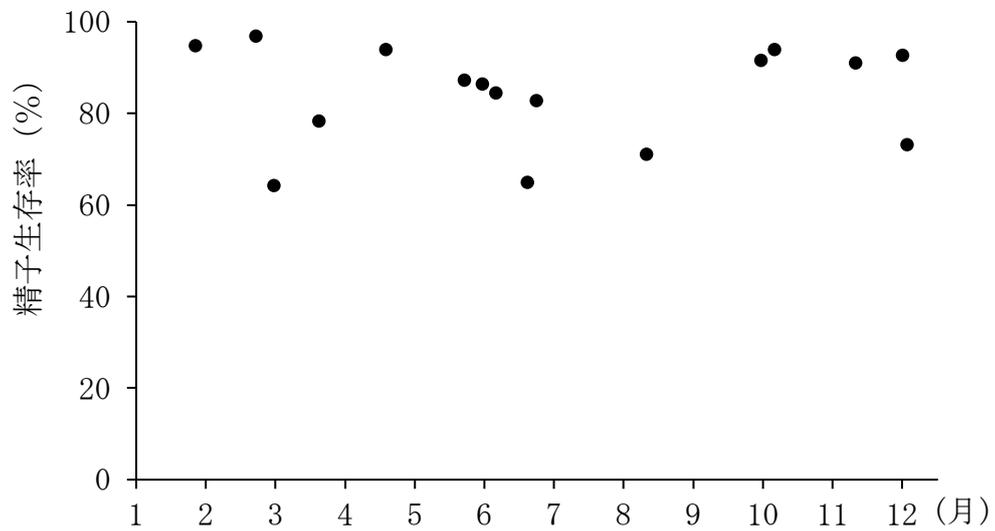


図 13. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における精子生存率の季節的变化

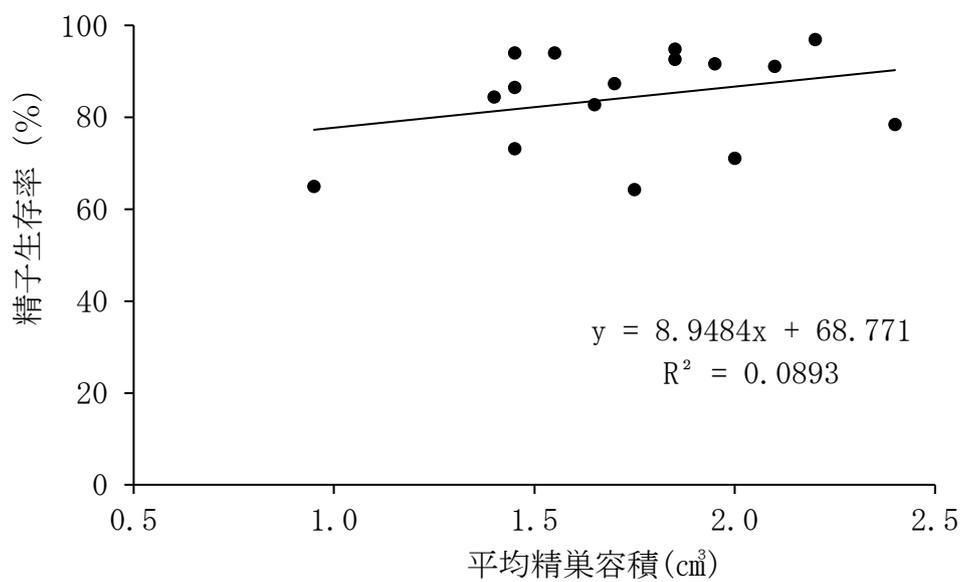
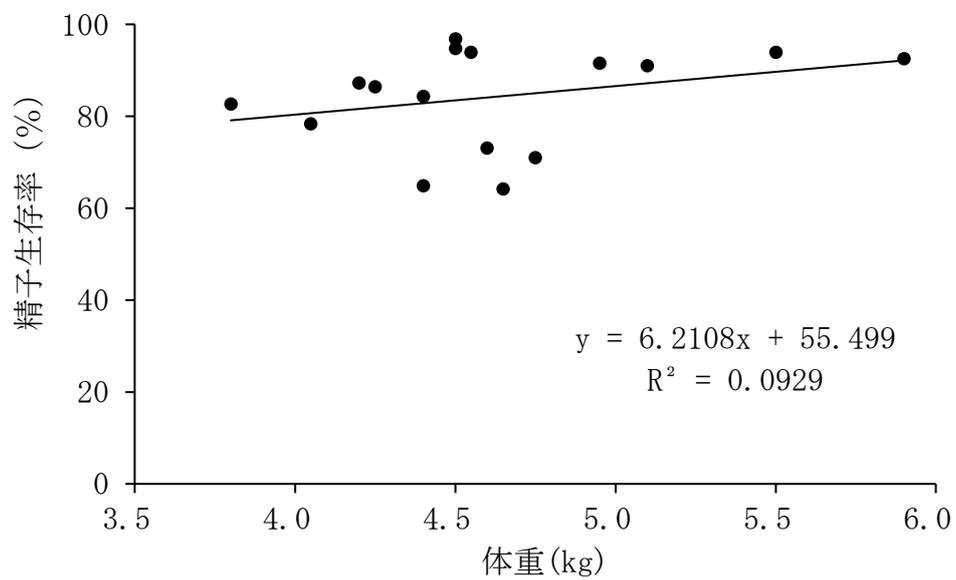


図 14. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における精子生存率と体重および左右精巣の平均容積の関係

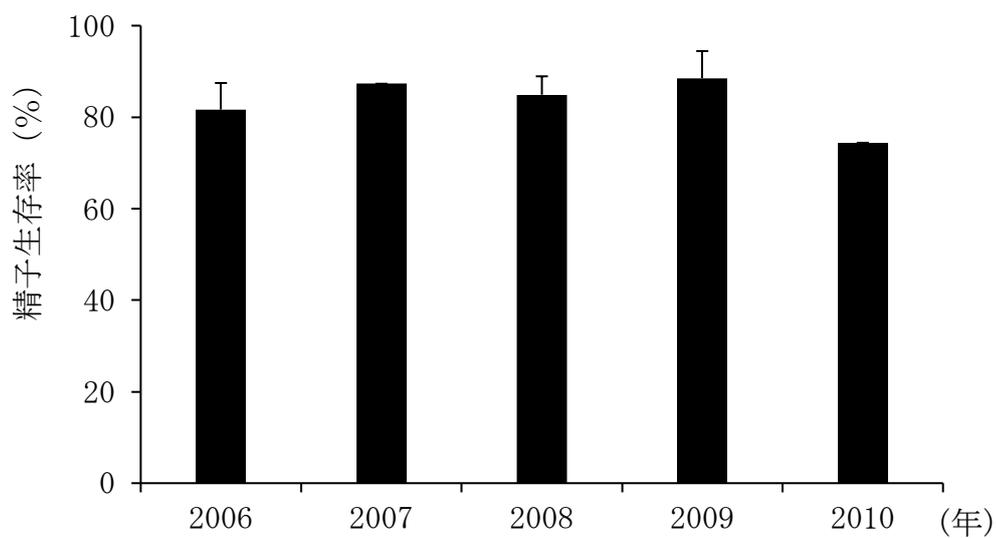
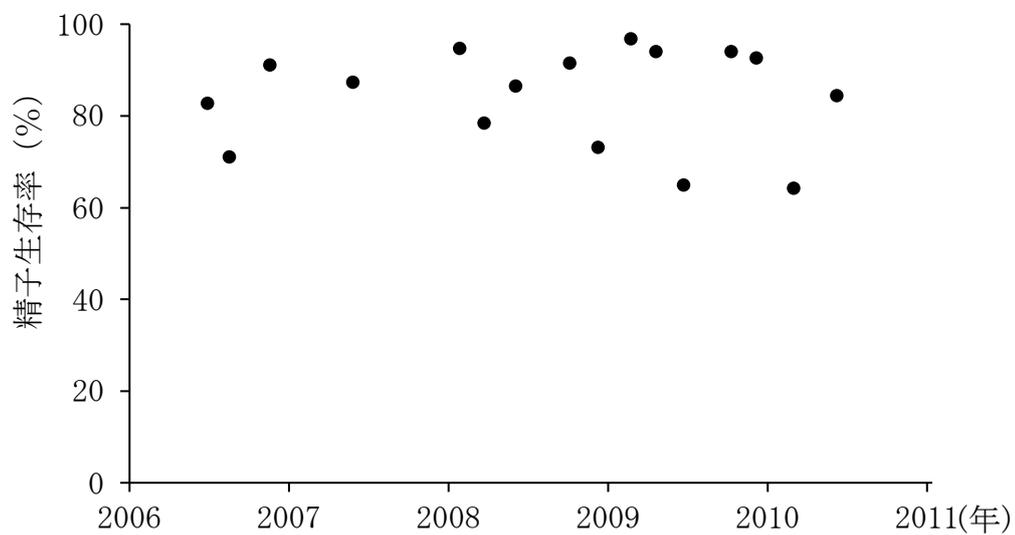


図 15. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における精子生存率の経時的変化

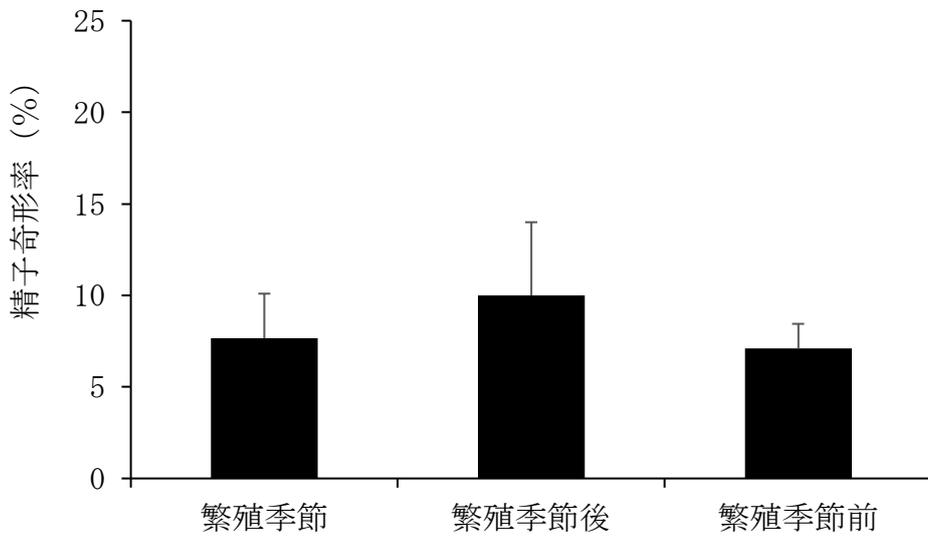
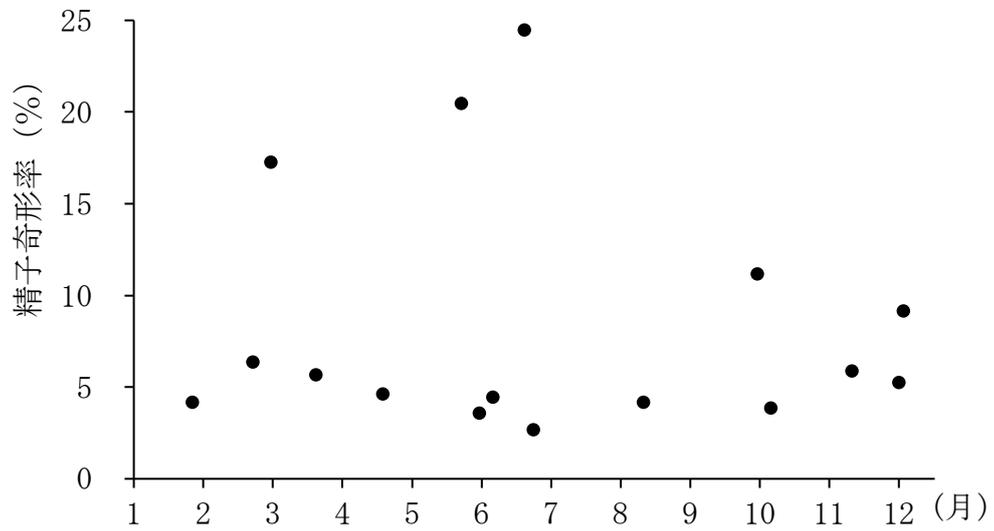


図 16. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における精子奇形率の季節的变化

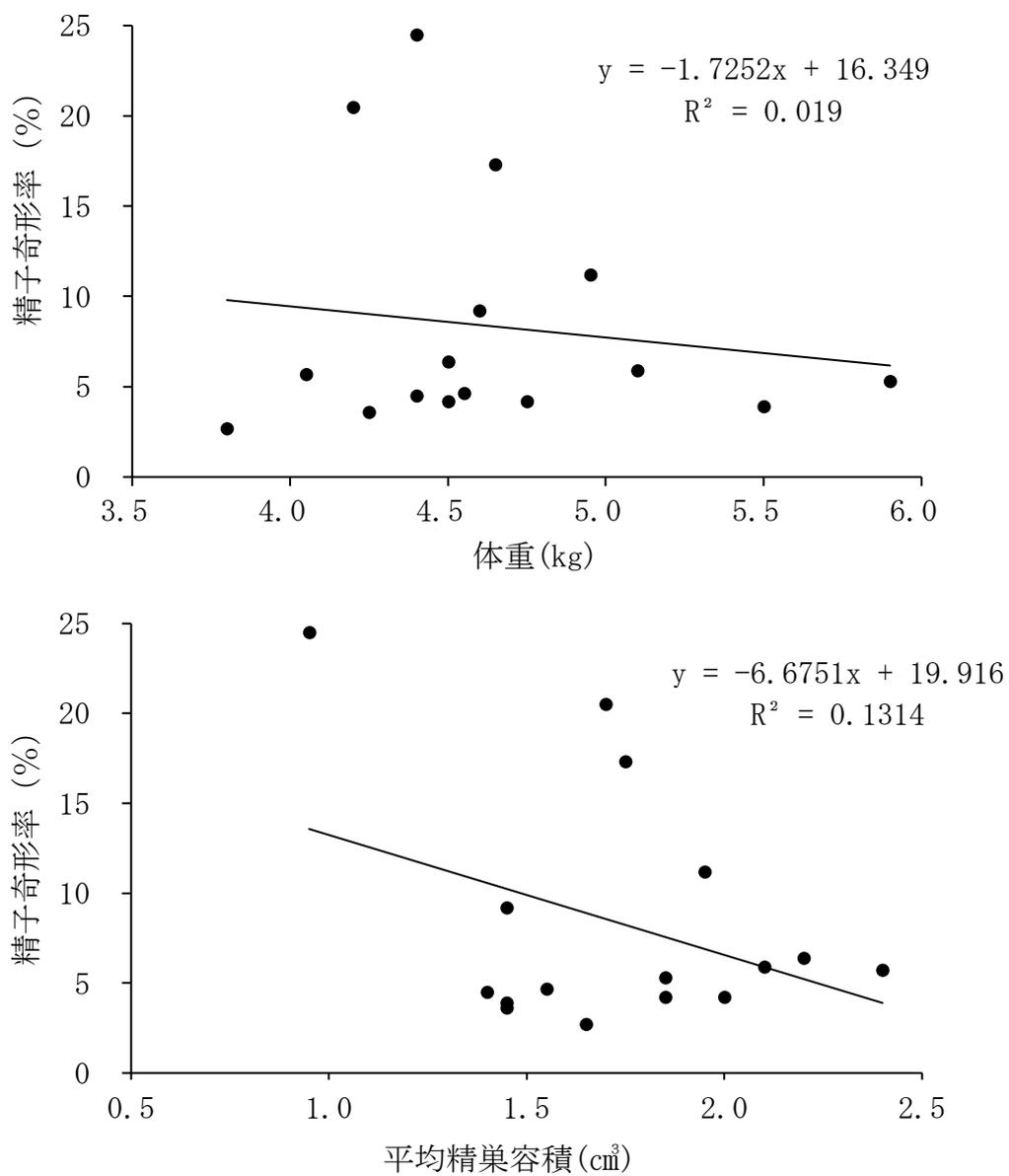


図 17. アムールヤマネコの経直腸電気刺激による採取直後の精液における精子奇形率と体重および平均精巣容積の関係

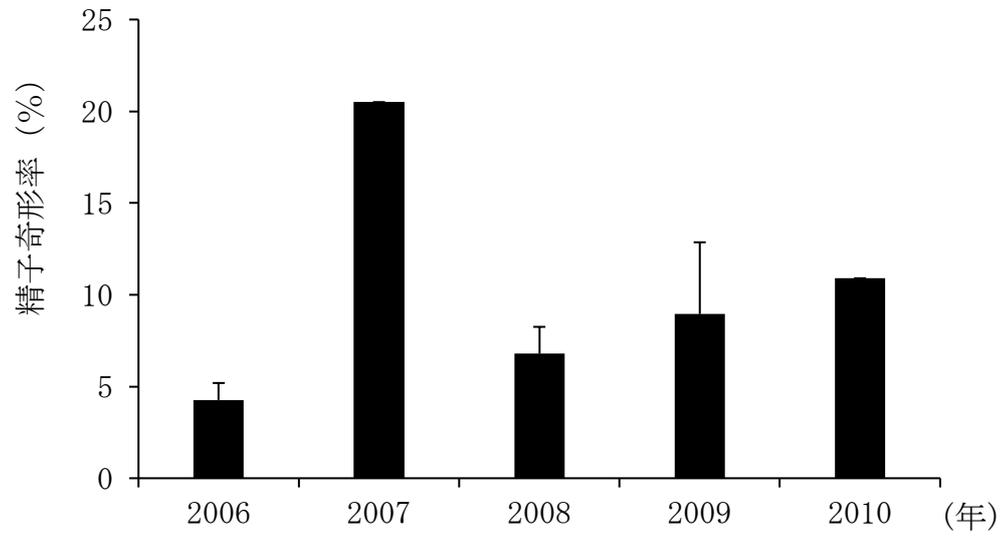
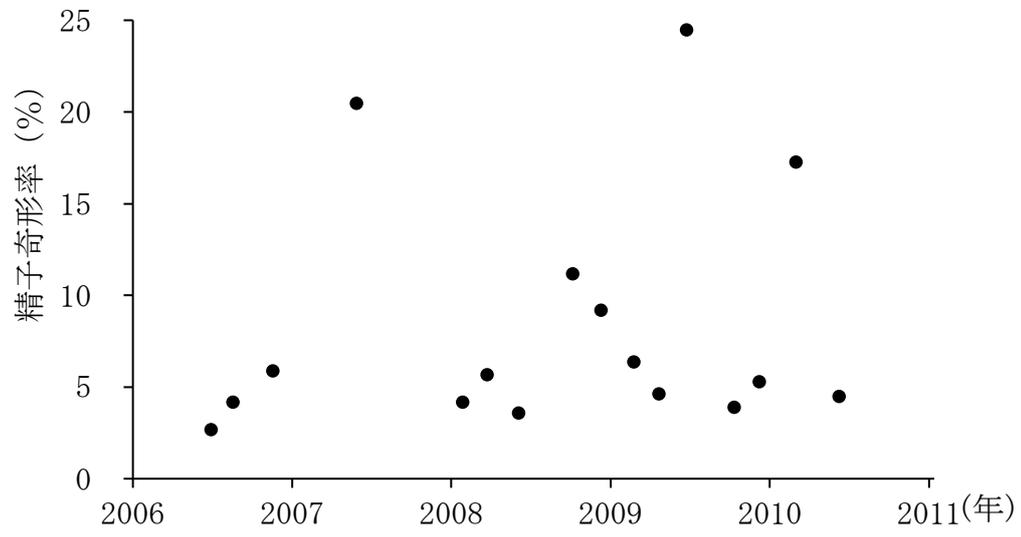


図 18. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法によって採取した精液における精子奇形率の経時的変化

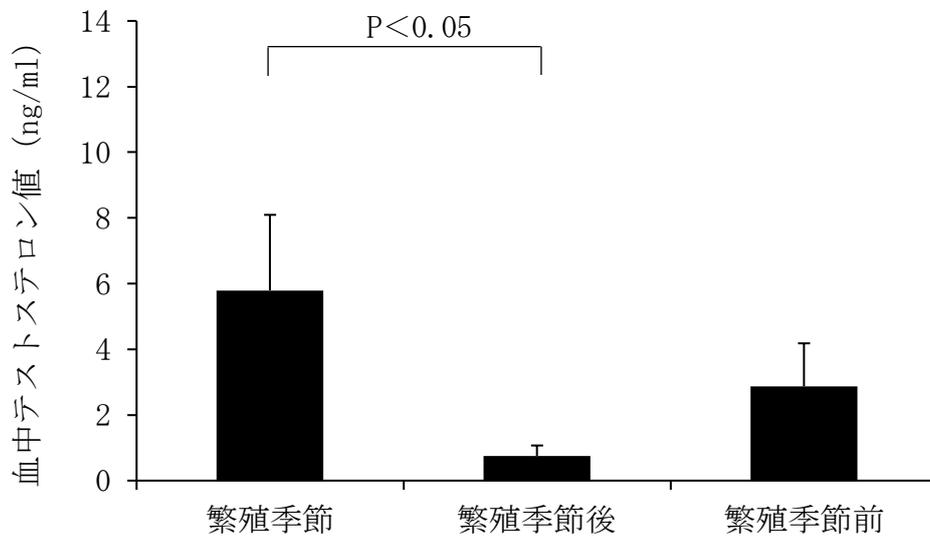
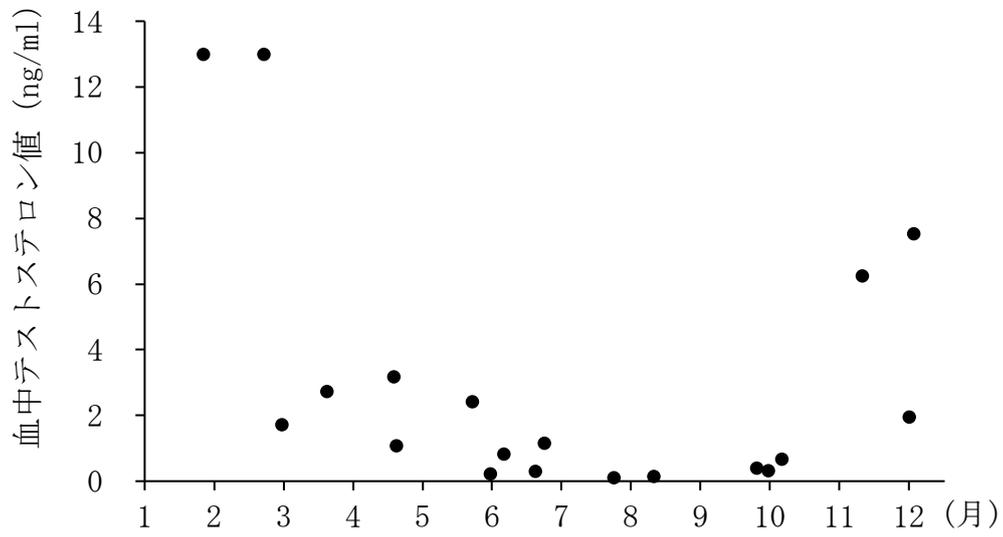


図 19. アムールヤマネコの血中テストステロン値の季節的变化

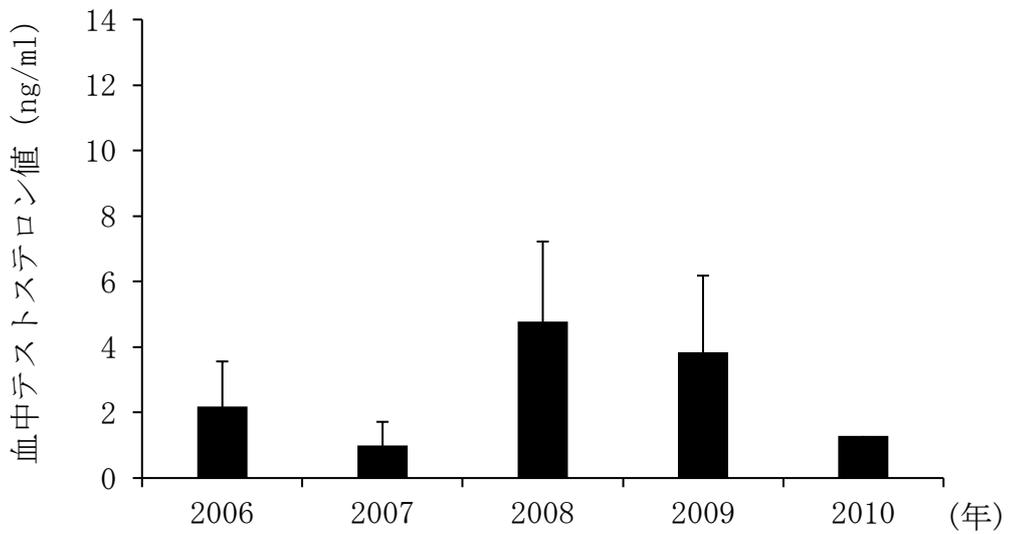
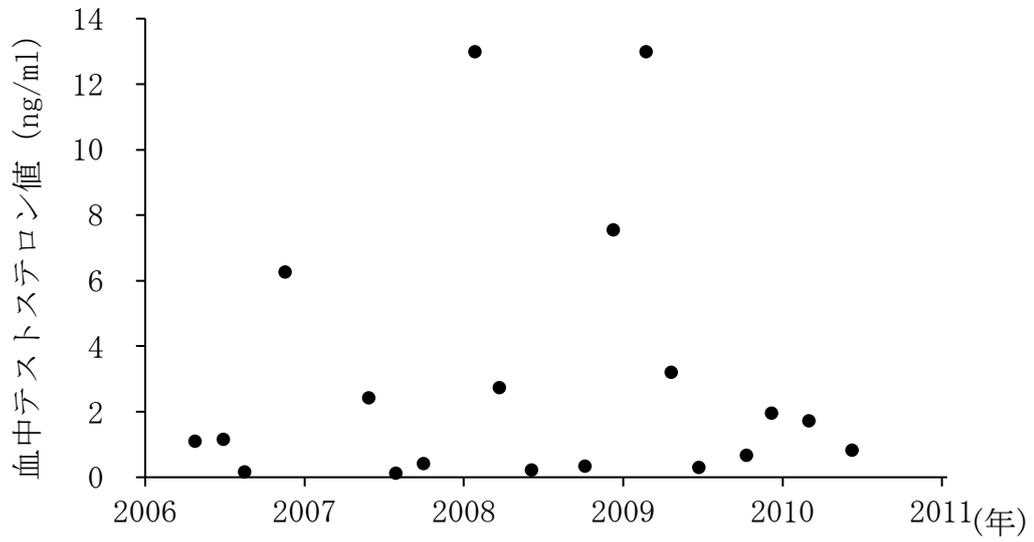


図 20. アムールヤマネコの血中テストステロンの経時的変化

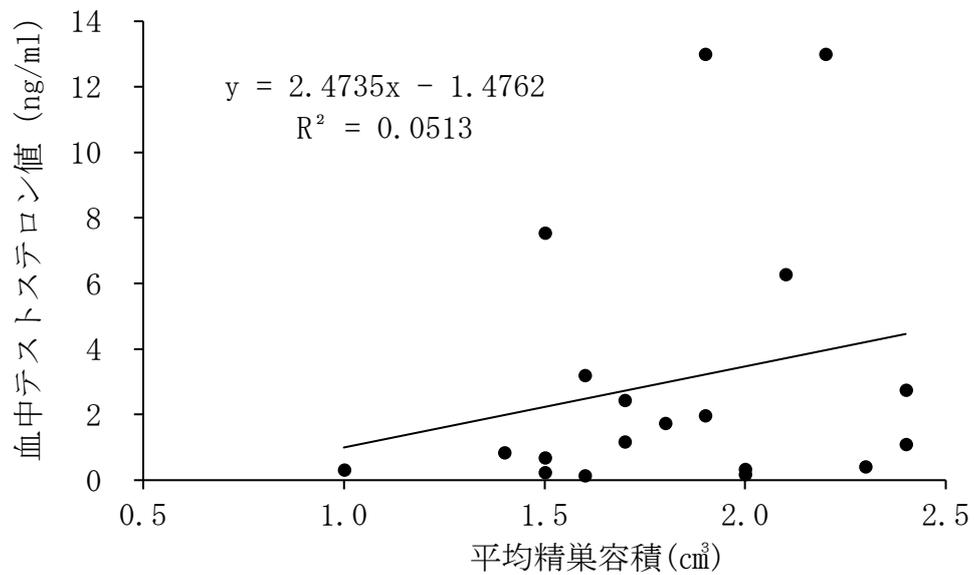
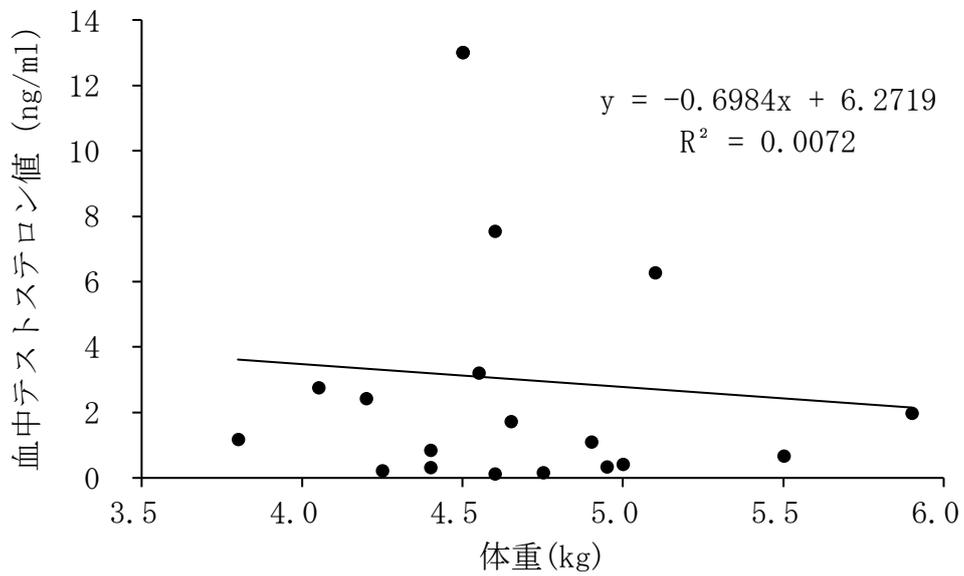


図 21. アムールヤマネコの血中テストステロン値と体重および左右精巣の平均容積の関係

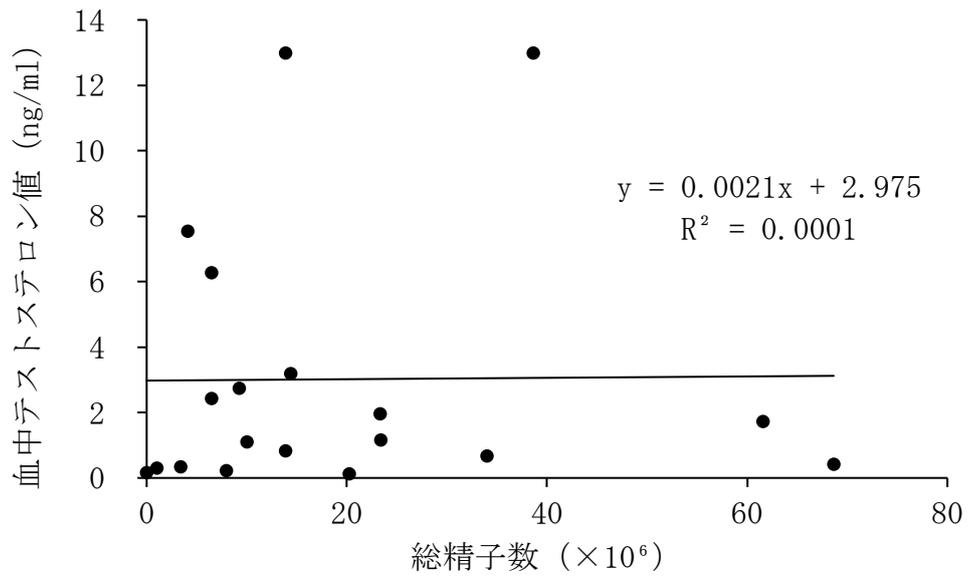


図22. アムールヤマネコの血中テストステロン値と総精子数の関係

第3章

アムールヤマネコの尿道カテーテル法 による精液採取法の検討

緒 言

一般的に野生ネコ科動物の精液採取方法として、経直腸電気刺激法が行われている。第2章にて検討した結果、アムールヤマネコにおいても経直腸電気刺激法によって人工授精に必要な精子数を採取することが可能であることが明らかとなった。しかし、この方法では全身麻酔処置が必要であること、また直腸からプローブの電極を介して電気を全身に流すことで身体の収縮が起こることから、直腸や全身への影響が多少なりとも生じることが考えられた。ただし、第2章において使用したアムールヤマネコでは、精液採取後に体調が悪くなったことはないため、その影響はそれほど大きくないのかもしれないとも考えられる。人間と容易に接することができない野生動物から精液を採取するには、どうしても動物への負担（ストレス）がかかってしまうことは避けられない問題であるが、動物にできるだけ負担をかけずに、多くの精液を採取することができる精液採取方法の確立は検討しなくてはならない点であると考えられる。

最近の報告では、イエネコにおいて尿道カテーテル法による精液採取法の検討が行われている [40, 56, 88, 107, 129, 136-138, 145, 163, 202, 205, 208, 209]。これは、麻酔導入薬として使用した塩酸メデトミジンが精管に筋弛緩の効果を示し、麻酔導入後に尿道中へ精液（精子）の射出を誘導するため、尿道口から前立腺部の精管が開口していると思われる位置までカテーテルを挿入し、カテーテルに入ってきた精子を回収する方法である。この方法は、経直腸電気刺激法とは異なり全身に電気を流すようなことを行わないため、動物に与えるストレスが少なく、電気刺激装置などの特別な機器も必要ないことから、新しい精液採取方法として注目されている。また尿道カテーテル法は、イエネコ以外の野生ネコ科動物にも検討されている [8, 99, 107]。

塩酸メデトミジンは、 α_2 アドレナリン受容体選択性、容量依存性が高い薬物であり、獣医領域において鎮静・鎮痛、筋弛緩を誘導するために広く使用されている麻酔導入薬である [145]。塩酸メデトミジンの最大の特徴は、有効な拮抗薬（塩酸アチパメゾール）が存在することである [145, 148]。イエネコにおける鎮静・鎮痛を目的と

した塩酸メドミジンの用量は、体重 1kg あたり中等度の鎮静・鎮痛で 50～80 μ g、深い鎮静・鎮痛で 80～150 μ g である。最大の効果は投与後 15 分程度で発現するため、効果発現までは安静に保つことが望ましい。塩酸メドミジンの副作用としては、投与後の嘔吐(とくにイエネコでは、回復時にも嘔吐が認められることがある)、体温低下、心拍数・呼吸数の低下がみられ、心電図において房室ブロックが認められることも報告されている。また、一時的に血圧が上昇するが、その後、正常値付近に回復することが知られている [210]。

イエネコおよび野生ネコ科動物の精液採取における塩酸メドミジンと尿道カテーテル法の有用性については、これまでにいくつか検討が行われている [56, 99, 107, 208]。Zambelli ら [208] は、イエネコにおける塩酸メドミジン投与後の尿道カテーテル法と経直腸電気刺激法によって採取した精液について、凍結融解後の性状と体外受精能の比較を行った。その結果、採取した精液は経直腸電気刺激法よりも尿道カテーテル法で精子濃度が高かったが、融解後の性状や体外受精能は両者ではほぼ同様であることを報告した。Filiers ら [56] は、イエネコにおいて塩酸メドミジン投与後の尿道カテーテル法によって採取した精液と精巣上体尾部精子の性状および体外受精能を比較した。その結果、前進性の精子活力および正常形態精子の割合は精巣上体尾部精子の方が高く、両者の性状に差はみられたものの、どちらも体外受精能は同様に有していることを報告した。野生ネコ科動物における報告では、Lueders ら [107] が、塩酸メドミジンおよび塩酸ケタミンによる全身麻酔下において、アフリカライオンの尿道カテーテル法による精液採取が実施可能であるかどうかを検討した。その結果、良好な性状の精液を採取でき、アフリカライオンの精液採取法として尿道カテーテル法が有用であることを明らかにした。また、Kheirkhah ら [99] は、ジャングルキャットにおいて塩酸メドミジン投与後の尿道カテーテル法による精液採取が可能であるかどうかを検討し、採取できた精液の性状を評価した。その結果、経直腸電気刺激法や人工腔法などの過去の研究に比較して高い精子濃度を示したため、ジャングルキャットにおいてもこの方法による精液採取は有用であることを明らかに

した。これらの報告から、イエネコおよびいくつかの野生ネコ科動物の精液採取方法として塩酸メドミジンを使用した尿道カテーテル法は有用であることが明らかとなっているため、アムールヤマネコの精液採取においても尿道カテーテル法の有用性を検討する必要があると考えられた。

また第2章では、1頭の雄アムールヤマネコにおいて経直腸電気刺激法について検討を行った。長期間にわたって精液採取を行ったため、精液性状の季節による影響と加齢に伴う影響については検討できたが、精液性状の個体差については検討することができなかった。

そこで本章では、3頭の雄アムールヤマネコを用いて、経直腸電気刺激法による精液採取の前に尿道カテーテル法による精液採取を行い、各方法で採取した精液性状の検査を行い、両者を比較して、アムールヤマネコにおける尿道カテーテル法の有用性の検討を行い、同時に精液性状の個体差の影響について検討した。

実験材料および方法

1. 供試動物

供試動物は、東京都井の頭自然文化園にて飼育されている雄アムールヤマネコ3頭（個体番号No. 7、No. 15、No. 42）であった。No. 7は2001年5月6日に、No. 15は2003年4月18日に、No. 42は2005年6月29日に、いずれも井の頭自然文化園で生まれた個体であり、実験期間中の年齢および体重は、No. 7で10歳、体重は5.24～5.45kg、No. 15で7～10歳、体重は4.4～5.8kg、No. 42で7歳、体重は3.65～3.9kgであった。No. 15は交尾能および受精能が確認されていたが、No. 7とNo. 42は繁殖に供されたことがなかったため、これら能力の有無は不明であった。いずれの個体も実験期間中の健康状態に問題はみられなかった。普段は個別のケージで飼育されており、季節差なく馬肉、鶏肉および鶏頭などが給餌されていた。

2. 実験期間および精液採取回数

研究期間は2010年10月29日～2013年5月18日で、No.7は2回、No.15は3回、No.42は2回、異なる季節に精液採取を行った。個体ごとの採精日は、表1に示したとおりである。

3. 全身麻酔方法

すべての実験における全身麻酔方法は、第2章に示したとおりである。ただし、塩酸メデトミジン（ドミツール、日本全薬工業株式会社）の投与量は60 μ g/kgとした。

4. 精巣の計測方法

精巣の大きさの測定方法は、第2章に示したとおりである。

5. 精液採取方法

麻酔導入を行い不動化した後、最初に尿道カテーテル法にて精液採取を行った。まずアムールヤマネコを横臥位にし、後肢を開脚状態にして陰茎を包皮から裸出させた。カテーテルは3Fr.の栄養カテーテル（アトム栄養カテーテル、アトムメディカル株式会社）を用いたが、先穴式ではないため先端をカットし、再度ホルマリンガスで滅菌したものを使用した。挿入直前にカテーテルに粘滑・表面麻酔剤（キシロカインゼリー2%、アストラゼネカ株式会社）を少量つけて尿道口から挿入した。そして前立腺部の精管が開口していると思われる深さ（尿道口から約9 cm）までカテーテルを挿入し、カテーテル内に入ってきた精液を回収した。なおカテーテル内に採取された精液は、あらかじめEYT-FCを50 μ l入れた滅菌尖底管に、1ml シリンジを用いて押し出して回収した。

尿道カテーテル法による精液採取終了後、カテーテルを膀胱内に入れて採尿を行い、膀胱を空にした状態で、経直腸電気刺激法による精液採取を行った。

経直腸電気刺激法は、第2章に示したとおりである。なお電気刺激装置および直腸

プローブはそれぞれ ORM と ORM-1 を使用し、直腸プローブの挿入は肛門から約 6.5 cm の深さとした。電圧の強さおよび刺激回数は、アムールヤマネコの状態、精液採取量を観察して適宜変更した。

6. 精液性状検査

精液検査方法は、第 2 章に示したとおりである。

結 果

雄アムールヤマネコ 3 頭の経直腸電気刺激法および尿道カテーテル法によって採取した直後の精液性状を表 1 に示した。2012 年 6 月 30 日に行った No. 42 では、経直腸電気刺激法では精液が採取できたが、尿道カテーテル法では精液を採取することができなかった。そのため、尿道カテーテル法は 6 回、経直腸電気刺激法は 7 回のデータで平均値を示した。

尿道カテーテル法で採取した精液の精子活力は 0~85%、平均 55.8 ± 13.4 (SE) % で、経直腸電気刺激法で採取した精液の精子活力は 35~90%、平均 71.4 ± 7.1 % であった。2012 年 1 月 24 日に行った No. 7 では精子活力が 0% で、おそらく尿の混入が疑われた。両者の精子活力を比較してみると、6 回中 3 回では尿道カテーテル法が経直腸電気刺激法に比較してやや高値を示し、1 回は両者で同様であったが、尿の混入が疑われたデータを除いた尿道カテーテル法では、 67.0 ± 9.2 % であり、平均は尿道カテーテル法に比較して経直腸電気刺激法が高値を示した。個体差の傾向はみられなかった。

尿道カテーテル法で採取した精液の精子生存率は 4.5~97.3%、 67.6 ± 13.5 % で、経直腸電気刺激法で採取した精液の精子生存率は 78.4~97.3%、 85.1 ± 2.4 % であった。尿が混入したと思われる 2012 年 1 月 24 日に行った No. 7 では 4.5% と低値を示した。両者を比較すると、顕著な傾向はみられなかったが、平均は尿道カテーテル法に

比較して経直腸電気刺激法が高値を示した。個体差はみられなかった。

尿道カテーテル法で採取した精液の精子奇形率は3.6~79.3%、 $23.7 \pm 11.9\%$ で、経直腸電気刺激法で採取した精液の精子奇形率は2.1~27.9%、 $10.2 \pm 3.3\%$ とやや幅がみられた。尿が混入したと思われる2012年1月24日に行ったNo.7では79.3%と高値を示した。両者の精子奇形率を比較してみると、6回中4回では尿道カテーテル法が経直腸電気刺激法に比較してやや高値を示していた。尿の混入が疑われたデータを除いた尿道カテーテル法では $12.6 \pm 5.1\%$ であり、平均は尿道カテーテル法に比較して経直腸電気刺激法がやや低値を示した。個体差の傾向はみられなかった。

尿道カテーテル法で採取した精液の総精子数は0~ 6.75×10^6 、 $2.05 \pm 0.93 \times 10^6$ で、経直腸電気刺激法で採取した精液の総精子数は0.5~ 12.15×10^6 、 $4.40 \pm 1.47 \times 10^6$ とやや幅がみられた。両者の総精子数を比較してみると、No.7では2回とも尿道カテーテル法よりも経直腸電気刺激法が、No.15では3回中2回で経直腸電気刺激法よりも尿道カテーテル法が多く採取できた。No.42では、2回中1回では尿道カテーテル法での精液採取が行えなかったが、他の2頭に比較して総精子数が極端に少なかった。平均値では、尿道カテーテル法に比較して経直腸電気刺激法がやや高値を示した。

また総精子数は第2章の結果から季節の影響があることから、尿道カテーテル法と経直腸電気刺激法との合計の総精子数を、採精実験実施日によって繁殖季節群(1~4月)、繁殖季節後群(5~8月)、繁殖季節前群(9~12月)に分け個体ごとに分類し、表2に示した。その結果、すべてのアムールヤマネコで繁殖季節後よりも繁殖季節で総精子数が多かった。なお、No.15では繁殖季節後、繁殖季節前、繁殖季節の順に総精子数が採取できた。

考 察

第2章では、1頭の雄アムールヤマネコの経直腸電気刺激法でのみ精液採取を行ったが、本章では3頭の雄アムールヤマネコで経直腸電気刺激法と尿道カテーテル法に

よる精液採取を実施した。その結果、No. 7 では2 回中 1 回で経直腸電気刺激法が精液検査のすべての項目で尿道カテーテル法より優れた数値を示したが、No. 15 では3 回中 1 回は経直腸電気刺激法が、1 回は尿道カテーテル法がすべての項目で良好な性状を示した。また、No. 42 では経直腸電気刺激法と尿道カテーテル法とでそれぞれ 1 回ずつで、すべての項目で良好な性状を示した。すなわち、両者の方法を比較すると、精液採取を行った日によって差がみられ、どちらの方法が優れているという結論は出せなかった。Zambelli ら [209] によるイエネコを用いた研究では、尿道カテーテル法によって採取した精液は、経直腸電気刺激法に比較して精液量は少なかったが精子濃度が高く、経直腸電気刺激法では精子濃度が低い精液量が多いため、回収できる総精子数では両者の差はないことを報告した [209]。しかし、今回のアムールヤマネコにおいて得られた結果ではその報告と同様ではなく、実験実施日および個体間での差が大きくみられ、イエネコよりもアムールヤマネコでは、精液採取が難しいことが明らかとなった。

また尿道カテーテル法において、No. 7 では1 回、尿の混入が強く疑われた所見がみられたこと、No. 42 では精液を採取できなかったことから、アムールヤマネコの尿道カテーテル法には問題があると思われた。しかし、第2 章でも述べられたとおり、できるだけ尿の混入が起こりにくい直腸プローブを使えば尿の混入を減らすことはできるが、経直腸電気刺激法においても直腸プローブが膀胱を刺激してしまうことで尿の混入がみられることがある。この点に関して Marrow ら [111] は、チーターの経直腸電気刺激法による精液採取において、塩酸ケタミンと塩酸メデトミジンの混合投与は、塩酸ケタミン単独または塩酸ケタミンとデクスメドミジンの混合投与よりも精液採取時において精液に尿の混入が起こりやすいことを明らかにした。したがって、アムールヤマネコでも同じようなことが起こっているのではないかと考えられたため、今後麻酔薬の選択について検討する必要があると考えられた。尿の混入は、精子活力および精子生存率の低下、精子奇形率の上昇を起し、人工授精に使用できなくなってしまうため、できる限り尿の混入を防ぎながら精液採取を行わなければならないと考

えられた。

以前 Zambelli ら [209] は、イエネコの尿道カテーテル法と経直腸電気刺激法を比較した研究において、個体間での射精量、総精子数の差がみられることを報告していた。したがって、アムールヤマネコの精液性状にも個体差がみられることを想定して、今回、3頭の雄アムールヤマネコから精液採取を行い、個体による精液性状の差について観察した。その結果、No. 7 および No. 15 に比較して、No. 42 では多くの精子を採取することができなかった。とくに尿道カテーテル法では、2回行ったうちの1回では精液を採取することができなかった。したがって、No. 42 は造精機能が低いか、精液採取できない個体であると考えられた。No. 42 は他の2頭に比較して若い個体であったが、他の2頭よりも体重は軽い個体であった。また精巣容積は個体間で大きな差はみられなかったが、一番多くの精子が採取できた No. 7 に比較して、No. 42 の精巣は小さかった。したがって、体重と精巣容積から、ある程度、精液が採取できる個体であるかどうか推定できるのではないかと考えられた。

第2章では、精液採取を行う季節によって、採取できる精子数にやや差がみられることを明らかにした。そのため、今回のデータも第2章と同様に繁殖季節、繁殖季節後、繁殖季節前のサブグループに分け、個体ごとに総精子数を分類したが、いずれの個体も繁殖季節の値が最も高く、繁殖季節後の値が最も低かった。残念ながら、2頭では繁殖季節前に精液採取を行うことができなかったが、今回の結果からも、繁殖季節前から繁殖季節にかけての時期が最も精子が多く採取できることが示唆された。

なお、この研究を開始する前ではアムールヤマネコの精液採取に関する研究はなかったが、最近、関係する論文が発表された [89]。その論文によると塩酸メデトミジン 50 μ g/kg と塩酸ケタミン 5mg/kg で麻酔した6頭の雄アムールヤマネコから尿道カテーテル法で合計28回の精液採取を2~4月に行ったところ、その精液性状は精子活力：平均 79.3 \pm 16.2%、精子奇形率：平均 18.3 \pm 8.6%、総精子数：平均 11.37 \pm 2.80 \times 10⁶ といずれの項目も今回の結果より良好な値であった。しかし、この論文で使われた個体は、いずれも2~6歳と若いこと、また全ての精液採取が繁殖季節に行われている

ことなど、今回の研究との違いから生じたことが示唆された。また、今回の研究からも精液性状には個体差がみられると思われるため、個体差による影響も結果の違いに関連していると考えられた。また Amstislavsky らの報告 [5] では、2~4 月の間に 5 頭の雄アムールヤマネコから直腸電気刺激法による精液採取をそれぞれ 1 回ずつ行った結果であるが、塩酸メデトミジン 130 μ g/kg と塩酸ケタミン 9.5mg/kg で麻酔したところ、その総精子数は $4.1 \pm 1.9 \times 10^6$ と今回の研究結果とほぼ同様の値であった。

第 2 章では、麻酔導入薬として塩酸メデトミジンを使用し、電気刺激を行う前に尿の混入を最小限にするために膀胱尿を採取した後、イソフルレンの吸入麻酔で経直腸電気刺激法だけの精液採取を行っていた。そのため、塩酸メデトミジンの作用により自然に射精が起こったものを採尿時に回収してしまっていた可能性が考えられた。今後、この現象が起こっていることを想定して、経直腸電気刺激法前に尿道カテーテル法による精液採取を行うか、採尿を行わずに経直腸電気刺激法を行うことによって、さらに多くの精子を回収することができると考えられた。ただし、尿道カテーテル法や経直腸電気刺激法のどちらの方法においても、尿が精液に混入しないように気をつけなければならないと考えられた。

イエネコでの新鮮精液を用いた子宮内人工授精で高い受胎率を得るためには 800 万以上の精子数が必要であることが報告されている [169, 180, 187]。アムールヤマネコの子宮内人工授精の必要な精子数は明らかではないが、イエネコと同様の精子数が必要であると推定すると、今回の結果のようにばらつきがある場合、子宮内人工授精に供することができないこともあると考えられた。そのため今後は、より精子数が採取できる方法の改良が必要であると考えられた。例えば、塩酸メデトミジン投与後の精液の膀胱への逆流を最小限にすること、尿道カテーテル法にて精液採取を行った後、直腸電気刺激法を開始するまでの時間を可能な限り短縮すること、尿道カテーテル挿入後の静置時間を変更することなどを考慮する必要があると考えられた。また Cunto ら [40] は、イエネコの尿道カテーテル法による精液採取において、塩酸メデトミジン投与量を 50 μ g/kg と 130 μ g/kg で比較した結果、投与量が多い方が精液量、精子濃

度、総精子数、運動性のいずれも良い性状の精液が得られたことを報告している。この結果から、今後、塩酸メドトミジンの投与量の検討も必要である。

以上の結果から、尿道カテーテル法は個体に与えるストレスが少ない精液採取方法ではあるが、アムールヤマネコの尿道カテーテル法にはまだ解決しなくてはならない問題点もあることや、個体によってはあまり精液が採取できないことから、人工授精を目的として多くの精子を回収する精液採取方法としては経直腸電気刺激法が優れていると判断された。ただし、今後、麻酔方法、カテーテル挿入のタイミングなどを改良することで、アムールヤマネコの尿道カテーテル法において性状の良い精子を多く採取できることが期待されるため、検討が必要である。

小 括

7～10歳の3頭の雄アムールヤマネコを用いて、経直腸電気刺激法の前に尿道カテーテル法による精液採取を各個体から2～3回実施し、採取された精液性状の結果からアムールヤマネコにおける尿道カテーテル法の有用性の検討を行い、同時に精液性状における個体差の影響について検討した。

その結果、採取直後の精子活力および精子生存率は、尿道カテーテル法に比較して経直腸電気刺激法が高値を示した。精子奇形率は、尿道カテーテル法に比較して経直腸電気刺激法がやや低値を示した。平均総精子数は、尿道カテーテル法に比較して経直腸電気刺激法がやや高値を示した。繁殖季節を基準に総精子数を分析したところ、すべてのアムールヤマネコで繁殖季節後群よりも繁殖季節群で多くの精子が回収されていた。総精子数は個体差が大きかったが、その他の精液検査項目には個体差はみられなかった。

以上のことから、尿道カテーテル法は個体に与えるストレスが少ない精液採取方法ではあるが、イエネコで報告されているほど容易ではなく、アムールヤマネコにおいて多くの精子を回収できる精液採取方法としては尿道カテーテル法よりも経直腸電気刺激法が優れていると判断された。しかし、尿道カテーテル法でも多くの精子が採取できる個体もあったため、麻酔方法などの条件の改良を行うことで、尿道カテーテル法でもアムールヤマネコから安定して多くの精子が採取できるのではないかと考えられた。

表 1. 雄アムールヤマネコ 3頭の経直腸電気刺激法および尿道カテーテル法によって採取した直後の精液性状

個体番号	実施日	精巢容積 (cm ³)		精液採精 方法	精子活力 (%)		精子 生存率 (%)	精子奇形率 (%)			総精子数 (×10 ⁶)		
		L	R		+	±		頭部	中片部	尾部		合計	
No. 7	11/06/22	5.45	1.8	2	カテーテル	80	10	87.1	0	0	32.4	32.4	0.85
					電気刺激	70	10	87.5	0.5	0	10.5	11	4.96
	12/01/24	5.24	1.8	2	カテーテル	0	0	4.5	0	0.3	79	79.3	1.92
					電気刺激	80	10	84.4	0.3	1.5	10.8	12.6	12.15
	10/10/29	5.8	1.6	1.8	カテーテル	80	10	69.1	0.3	5.3	5.3	10.9	3.88
					電気刺激	80	10	80.9	0.3	0.6	1.2	2.1	3.4
No. 15	11/01/17	5.8	1.2	1.7	カテーテル	85	10	97.3	0.5	1.6	1.5	3.6	6.75
					電気刺激	60	5	80.2	0.3	1.7	25.9	27.9	3.75
	13/05/18	4.4	1.7	1.6	カテーテル	50	10	66.1	1.2	3.9	4.8	9.9	0.01
					電気刺激	85	5	87.1	2.1	1.2	3	6.3	5.18
No. 42	12/06/30	3.9	1.6	1.5	カテーテル	-	-	-	-	-	-	-	採取できず
					電気刺激	90	5	97.3	1.2	0	1.2	2.4	0.84
	13/01/24	3.65	1.6	1.5	カテーテル	40	10	81.4	1.2	0.9	4.2	6.3	0.91
					電気刺激	35	10	78.4	1.5	0.9	6.9	9.3	0.5

表 2. 雄アムールヤマネコ 3 頭の総精子数における季節による分類 (×10⁶)

個体番号	繁殖季節			繁殖季節後			繁殖季節前					
	実施日	CT法	EE法	合計	実施日	CT法	EE法	合計	実施日	CT法	EE法	合計
No. 7	12/01/24	1.92	12.15	14.07	11/06/22	0.85	4.96	5.81				
No. 15	11/01/17	6.75	3.75	10.5	13/05/18	0.01	5.18	5.19	10/10/29	3.88	3.4	7.28
No. 42	13/01/24	0.91	0.5	1.41	12/06/30	0	0.84	0.84				

※ CT法：尿道カテーテル法、EE法：経直腸電気刺激法

第4章

アムールヤマネコ精液における低温保存 および凍結保存の検討

緒言

様々な繁殖補助技術(ART)の中で、精子(精液)の保存は重要な技術の1つである。一般的な精液の保存方法としては、4~5°Cで保存する低温保存方法と-196°Cの液体窒素を用いる凍結保存方法、いわゆる凍結精液が行われている。

凍結精液は、特別な精液希釈液が必要である他に、作成のために設備や機材を必要とするが、液体窒素中に保存することで半永久的な保存が可能である有用な保存方法である。現在までに、イエネコでは凍結精液に関する多くの研究報告があり、融解後の精液を用いた人工授精後に産子が得られている[90, 155, 174, 177, 207, 208]。またチーター[161, 171]、ライオン[60, 161]、オセロット[161, 165, 166]、スナドリネコ[166]、マヌルネコ[166]、アムールヤマネコ[5, 89]、ウンピョウ[140]などの野生ネコ科動物においても凍結精液に関する研究報告があり、その中には実際に融解後の精液を用いた人工授精を実施し、産子が得られている報告がある[166]。凍結精液は、使用する精液希釈液の種類、凍結方法、融解方法、凍結保護物質の種類・濃度などの条件の違いによって、融解後の性状は様々である。また、ブタおよびイヌの精子は他の動物に比較して耐凍性が低いことが知られていることから、動物の違いも凍結融解後の性状に影響を及ぼす要因であると考えられる。凍結精液は、動物の死後でも生殖子を保存することができ、融解後に人工授精を行うことで産子を得ることができるため、希少動物の人工繁殖においては非常に有用なARTであると考えられる。したがって、アムールヤマネコにおいても、凍結精液作成技術の確立は必要である。

一方、精液の低温保存は、精液希釈液だけがあれば、特別な設備、機材がなくても保存ができる方法であるが、保存可能な期間が短いため応用範囲も限られている。現在まで、イエネコにおいては精液の低温保存に関する研究報告があるが[55, 59, 155, 157]、野生ネコ科動物においては精液の低温保存に関する報告はほとんどない。その中でジャガーネコの精液の低温保存の報告[7]によると、4°Cで24時間の保存では、精液性状を良好に維持することが可能であることから、アムールヤマネコ精液につい

ても、短期間の低温保存は有効であることが期待できる。

精液の保存は、遺伝的多様性を維持することを目的に、多くの個体の遺伝子資源の保存を行うことが可能である。しかし、それ以外に、輸送できることが大きな利点となる。動物園では個体の飼育数に限界がある。また、個体数の少なくなっている希少動物（例えばツシヤママネコ）では、いくつかの動物園で分散飼育が行われている。そのため、特定のペア以外の組み合わせで繁殖を行うためには動物を移動しなくてはならない。動物を移動することは、動物に大きなストレスを与えることとなってしまうが、精液だけを輸送して人工授精を行うことで、この問題点解決できると考えられる。とくに、精液の低温保存では、数日間は凍結精液の融解後の性状よりも精液性状を良好に維持して保存することが可能である。したがって、遠方で飼育されている雌の交配適期に合わせて精液採取を行い、精液を輸送して人工授精に供することができれば、国内全体で繁殖の管理を行うことが可能である。しかし、アムールヤママネコの精液については低温保存に関する研究報告がないため、検討が必要である。

そこで本章では、実験 1 としてイエネコにおける凍結精液の作成方法 [189] を参考にしてアムールヤママネコ精液の凍結保存を行い、融解後の精液性状からその有用性について検討を行った。さらに、実験 2 としてアムールヤママネコの精液の低温保存を行い、その有用性について検討を行った。

実験材料および方法

1. 供試動物、実験期間および精液採取回数

実験 1 の供試動物は、東京都井の頭自然文化園にて飼育されている雄アムールヤママネコ 1 頭（個体番号 No. 15）で、実験には第 2 章で採取された精液のうち性状が良好であった 10 回分を用いた。

実験 2 には、雄アムールヤママネコ 1 頭（個体番号 No. 49）を使用した。No. 49 は 2007 年 10 月 2 日に井の頭自然文化園で生まれた個体で、これまで繁殖に供されることは

なかったため、交尾能および受精能の有無は不明であった。実験 2 の実験期間は 2016 年 7 月 9 日～2017 年 9 月 30 日で、3 回の精液採取を行なった。実験期間中の No. 49 の年齢および体重は、8～9 歳、3.9～4.7kg であった。

実験期間中、アムールヤマネコの健康状態に問題はみられなかった。普段は個別のケージで飼育されており、季節差なく馬肉、鶏肉および鶏頭などが給餌されていた。

2. 全身麻酔方法

実験 1 における全身麻酔方法は、第 2 章に示したとおりである。

実験 2 においては、井の頭自然文化園の動物病院内で 2016 年 7 月 9 日では麻酔箱を用いてイソフルラン（エスカイン吸入麻酔液、マイラン製薬株式会社）で導入麻酔後、130 μ g/kg 塩酸メドトミジン（ドミツール、日本全薬工業株式会社）を筋肉内投与した。また、2017 年 6 月 3 日および 2017 年 9 月 30 日ではスクイズケージで塩酸メドトミジン 130 μ g/kg と塩酸ケタミン（動物用ケタラール 50 筋注用、三共エール薬品株式会社）1mg/kg の混合液を筋肉内投与して麻酔導入を行った。麻酔が効き、不動化した後にイソフルランによって麻酔維持した。

3. 精巣の計測方法

精巣の大きさの測定方法は、第 2 章に示したとおりである。

4. 精液採取方法

実験 1 における精液採取方法は、第 2 章に示したとおりである。

実験 2 では、第 3 章で示した尿道カテーテル法と経直腸電気刺激法による精液採取を行った。それぞれの方法は、第 3 章に示したとおりである。なお、電圧の強さおよび刺激回数は、アムールヤマネコの状態、精液採取量を観察して適宜変更した。

5. 凍結精液作成方法および融解方法

実験 1 において、凍結精液作成方法はイエネコで行われている方法 [189] に準じて行った。ただし、イエネコにおいて採取された精液は一次希釈として精子濃度が 5,000 万/ml となるように EYT-FC で調整し、これを A 液としていたが、アムールヤマネコでは採取できる総精子数が少ないため、最終的に 0.25ml ストローが 1 本または 2 本できるように、今回は A 液量を 0.15ml または 0.30ml になるように希釈して A 液とした。そして、EYT-FC に Orvus ES paste (OEP) (Nova chemical sales, Inc., MA, USA) (2%) とグリセリン (Sigma) (14%) を添加した A 液と等量の B 液を作成した。

精液は、プログラム低温処理装置 (MIR-153、富士平工業株式会社) を用いて 1 時間かけて 20°C から 4°C へゆっくりと一次冷却を行い、4°C 下の低温処理装置内で 1ml シリンジとカテラン針 (ニプロカテラン針 20G×70R. B GA、ニプロ株式会社) を用いて優しく混和しながら A 液に B 液をゆっくり添加して、二次希釈を行った。この時、グリセリンおよび OEP の最終濃度はそれぞれ 7%、1% であったが、最終精子濃度はそれぞれの凍結精液によって異なっていた。二次希釈終了後直ちに 0.25ml ストローに注入し、カラーパウダーで栓をした。そのまま 4°C 下で 1 時間静置することでグリセリン平衡を行い、発泡スチロール内の液体窒素液面から 7 cm に 10 分間ストローを感作させた後、液体窒素内に落とす投げ込み法 [180] で二次冷却 (凍結) を行い、その後は液体窒素タンク内で保存した。

凍結精液ストローの融解は、1 週間以上保存したもので、37°C の温湯中に 30 秒間投入することによって行った。融解直後の精液性状検査として、精子活力、精子生存率および精子奇形率の検査を行った。なお、精液性状の検査方法は、第 2 章で述べたとおりである。

6. 精液の低温保存方法

実験 2 では、尿道カテーテル法または経直腸電気刺激法で採取した精液を、それぞれ別々にプログラム低温処理装置を用いて低温ショックを避けるために 1 時間かけて 20°C から 4°C までゆっくり冷却し、その後、4°C に設定した冷蔵庫 iCube (FC1-280、ア

ズワン株式会社) 内でそれぞれ保存し、精液採取方法の違いが低温保存精液の性状に及ぼす影響について検討した。また、2017年9月30日に経直腸電気刺激法で採取した精液については、精液を2つに分け、1つは上記に示した方法で4°Cに、もう1つはミニ恒温槽 e-ThermoBucket (ETB、タイテック株式会社) 内で8°Cに保存し、アムールヤマネコ精液の許容できる保存温度について検討した。

低温保存後の精液検査は、精液がなくなるか精子活力が0%になるまで、精子活力、精子生存率および精子奇形率について1日1回行った。なお、精液性状の検査方法は、第2章で述べられたとおりである。

7. 統計処理

本研究で得られた成績は、分散分析によって統計処理を行った。また、凍結融解後の精液性状と季節の影響についての検討を行うため、データを第2章と同様に、1~4月を繁殖季節 (n=3)、5~8月を繁殖季節後 (n=2)、9~12月を繁殖季節前 (n=5) のサブグループに分類し、スピアマンの相関関数検定を行い、危険率5%未満である場合、有意であると判断した。

結 果

実験1：アムールヤマネコにおける凍結精液作成方法の検討

今回の実験に使用したアムールヤマネコ No. 15 における凍結融解前後の精液性状を、表1に示した。

すなわち、凍結前の精子活力は50~90%、平均 $67.0 \pm 4.0\%$ であったのに対し、融解後は0~60%、 $26.0 \pm 6.7\%$ に低下した。とくに、2007年5月28日、2009年12月9日は凍結前の精子活力はそれぞれ60%、80%と高かったが、融解後は0%に低下した。一方、凍結前の精子生存率は73.2~96.9%、 $88.5 \pm 2.4\%$ であったのに対し、融解後は40.5~82.3%、 $62.5 \pm 3.9\%$ に低下したが、著しく低下したものはみられなか

った。また精子奇形率は、凍結前は、3.6～19.1%、 $6.9 \pm 1.4\%$ であったが、融解後は3.3～34.0%と大きな幅がみられ、 $16.4 \pm 3.7\%$ と高値を示した。

ストロー中の最終精子濃度は $5 \sim 50 \times 10^6$ と差がみられた。この精子濃度が精液性状に影響を及ぼしていないかを検討するため、融解後の精子活力、精子生存率および精子奇形率とストロー中の最終精子濃度との関係をそれぞれ図 1～3 に示した。その結果、両者の間には有意な相関関係はみられなかった。

凍結融解後の精液性状と季節の影響について、図 4 に示した。精子活力は、凍結前では繁殖季節（平均 $76.7 \pm 6.7\%$ ）が他の季節よりも高値を示し、融解後も繁殖季節が他の季節よりも高値を示した（平均 $38.3 \pm 4.4\%$ ）。繁殖季節後（平均 $55.0 \pm 5.0\%$ ）と繁殖季節前（平均 $66.0 \pm 5.1\%$ ）の融解後の平均精子活力はそれぞれ平均 $10.0 \pm 10.0\%$ 、 $25.0 \pm 11.6\%$ であり、繁殖季節後では凍結前の精子活力に比較して、融解後の精子活力の低下が顕著であった。

凍結前の精子生存率は、繁殖季節（平均 $90.0 \pm 5.8\%$ ）、繁殖季節後（ $86.9 \pm 10.4\%$ ）、繁殖季節前（ $88.3 \pm 3.8\%$ ）でほぼ同様の値であったが、融解後もそれぞれ $66.1 \pm 8.8\%$ 、 $57.2 \pm 5.2\%$ 、 $62.5 \pm 6.2\%$ と、各季節でほぼ同様の値を示し、季節による差はみられなかった。

凍結前の精子奇形率は、繁殖季節（平均 $4.9 \pm 0.4\%$ ）、繁殖季節後（ $11.4 \pm 7.8\%$ ）、繁殖季節前（ $6.4 \pm 0.7\%$ ）と繁殖季節後がやや高値を示したが、融解後はその差が大きくなり、繁殖季節後で $28.4 \pm 5.6\%$ が顕著に高値を示し、他の季節との差が大きくなった（繁殖季節は $8.9 \pm 2.1\%$ 、繁殖季節前は $16.2 \pm 5.8\%$ ）。

実験 2：アムールヤマネコ精液の低温保存方法の検討

実験 2 におけるアムールヤマネコ No. 49 の体重、精巣容積、精液採取直後の精液性状および低温保存時の精子濃度を、表 2 に示した。また、各方法で採取した精液をそれぞれ 4°C で低温保存したときの各精液性状の経時的変化について、図 5 に示した。ただし、2017 年 9 月 30 日に行った尿道カテーテル法で採取した直後の精液は精子活

力の低下と精子奇形率の増加がみられたことから、精液に少量の尿の混入が疑われたため平均から除外した。

その結果、低温保存後の精子活力は、採取直後と保存1日後までは両群はほぼ同様であったが、保存2日後以降はカテーテル群に比較して電気刺激群が急激に低値を示し、両者の差は保存時間とともに大きくなった。また精子生存率も同様に、保存2日後以降は電気刺激群の方がカテーテル群に比較して低値を示した。精子奇形率は、保存2日後まで両群でほぼ同様の値であったが、保存3日後からカテーテル群が保存時間の経過とともに高値を示し、両群の差が大きくなった。

経直腸電気刺激法で採取した精液を4℃と8℃に保存した後の各精液性状の経時的変化を、図6に示した。

その結果、精子活力において8℃保存群は保存1日後に急激に低下したが、4℃保存群では緩やかに低下し、4日目には8℃保存群と同様の値を示した。精子生存率は、保存1日後までは両群でほぼ同様であったが、その後は8℃保存群がやや低値を示して推移した。また精子奇形率は、保存5日後まで両群でほぼ同様に推移した。

考 察

これまで報告されているイエネコの凍結精液の作成方法は、研究者によって様々である[90, 155, 174, 207, 208]。また、イエネコまたは野生ネコ科動物用に市販されている精液希釈液も存在していない[90]。したがって、ネコに関する凍結精液作成方法は、まだ十分に確立されていないと考えられる。今回、アムールヤマネコ精液の凍結保存は、我々の研究室で以前にイエネコで行った方法[189]に準じて行った。その結果、融解後の性状は比較的良好であったため、凍結精液作成方法としては問題がないものと考えられた。しかし、融解後の精子活力が60%とイエネコの成績よりも高値を示したのもあれば、0%になってしまったものもあり、かなりばらつきがみられた。この原因は不明であったが、精液採取を行った時点で尿が少量混入しているなど、採取直

後の精液性状には影響しないが、凍結保存には影響を与える何かが混入していることも考えられた。

今回、凍結保護物質として用いたグリセリンの最終濃度は7%でのみ行った。これは、以前にイエネコの凍結精液 [189] と同様の濃度である。しかし最近、Jeong ら [89] はアムールヤマネコの尿道カテーテル法によって採取した精液を用いた凍結保存において最適なグリセリン濃度の検討を行ったところ、2%または4%の濃度が6%の濃度よりも精子活力が高値を示したことを報告した。したがって、今回行ったグリセリン7%は、高濃度であった可能性が示唆された。この報告からも、イエネコとアムールヤマネコでは凍結精液における最適なグリセリン濃度が異なることも考えられるため [193]、今後さらにこの点について検討する必要がある。

また今回、イエネコの凍結精液にも使用されているが [189]、精液希釈液に OEP (Equex STM paste) を添加して、凍結精液の作成を行った。OEP は界面活性剤であり、卵黄をベースとした精液希釈液に添加することで精子、とくに精子頭部アクロソーム部分を保護し、凍結によるダメージを軽減することが報告されている [9, 141, 206]。精子の耐凍性が低いブタやイヌ以外の動物では、OEP を添加しなくても凍結融解後の精子を用いた人工授精で高い受胎率を得ることができるため、とくに添加の必要はない。最近、報告されたアムールヤマネコの凍結精液の報告 [5, 89] においても、OEP は使用されていない。しかし、OEP を精液希釈液に添加して凍結精液を作成することで、融解後の精液性状が良好になることが、多くの動物において報告されている [44, 141, 179, 182, 183]。したがって、アムールヤマネコの凍結精液においても OEP は有用であると考えられる。ただし、OEP は最適な濃度で添加しないと OEP の精子に対する毒性から融解後の性状が低下することが報告されている [181]。そのため、アムールヤマネコの凍結精液においても最適な濃度を決定してから OEP を使用しなければならないが、今回、アムールヤマネコの精液量および精子数が非常に少なかったため、OEP の添加の有無に対する凍結融解後の性状に及ぼす影響や最適な濃度の検討を行わずに、イエネコで用いられている最終 OEP 濃度 1.0% で凍結精液の作成を行った。その結果、

融解後に高い精子活力と精子生存率が得られたことから、アムールヤマネコの精液においても、イエネコと同じ OPE の濃度での使用で問題なかったと判断された。

今回、イエネコの凍結精液では、最終精子濃度を 5,000 万/ml で統一して行っていた [189]。しかし、射精された精子数が少なく、5,000 万/ml の濃度で作成することができなかったため、射出総精子数とストローの本数に合わせて凍結精液の作成を行った。そのため、精液希釈液中の精子濃度は 5 万～5,000 万/ml とばらつきがみられた。また、精子濃度と融解後の精液性状の関係を検討したが、両者の間には有意な関係はみられなかった。ただし、イヌの凍結精液においては、凍結時の精子濃度は融解後の精液性状に影響を与える要因の一つとする報告 [126] と関与しないとする報告 [121] がある。そのため、精液希釈液中の最終精子濃度と融解後の性状との関係については、もう少し例数を集めて検討する必要がある。

また、精液採取を行った季節が融解後の精液性状に及ぼす影響についても検討した。精液採取直後の精液性状は、他の季節に比較して繁殖季節(1～4 月)が最も良好であったため、融解後の精液性状もこの季節が最も良好であった。しかし、繁殖季節後の融解後の精子活力は採取直後の精液性状に比較して、顕著に低下し、精子奇形率は顕著に増加していた。そのため、この時期に精液採取を行ったものでは、凍結精液に対してダメージを受けやすい可能性が示唆された。この理由は不明であるが、第 2 章の結果から、繁殖季節後は最も血中テストステロン値が低下する時期であると考えられる。この血中テストステロン値の低下が、精子の耐凍性にも影響しているのではないかと考えられた。この点に関して、ウマでは繁殖季節である春ではなく、秋に最も良い凍結融解後の性状が得られたことが報告されている [87]。この報告はスイスで行われたデータであり、当時の一番暑い夏で 17.7℃、寒い冬で 1.2℃であったことから、東京より明らかに気温が低いと考えられ、スイスの秋の気温が東京の冬の気温程度であると推測できる。このことから、凍結融解後の精液性状は、季節ではなく、採取時期の気温が関与する可能性があることが示唆された。ただし今回、暑い時期を含む繁殖季節後(5～8 月)に採取直後の精液性状があまり良くなかったため、凍結精液作成を

ほとんど行っていなかった。そのため、他の季節に比較して例数が少なかった。しかし、今回行った2例はどちらも融解後の精子活力は低値を示し、精子奇形率は高値を示していたため、この時期の精子は凍結保存には適していないことが示唆された。これはウマで行われた報告 [87] とほぼ同様であった。

イエネコにおける凍結精液を用いた子宮内人工授精では、5,000万の授精精子数が必要であることが報告されている [184]。アムールヤマネコとイエネコが同じ授精精子数を必要とするかどうかは不明であるが、今回の結果から、1回で採取した精液を凍結精液での人工授精に使用することは困難であると考えられた。しかし、この精液は体外受精、顕微授精には十分使用することができる。今回用いた精液の凍結保存方法は、アムールヤマネコの生殖子を保存する方法としては有用であり、さらにツシマヤマネコにも十分に応用できると推察された。

また今回は、実験例数は少ないが、凍結精液だけでなくアムールヤマネコ精液の低温保存の有用性についても検討を行った。まず尿道カテーテル法と経直腸電気刺激法によって採取した精液を別々に4°Cで保存し、精液採取方法の違いが低温保存後の精液性状に及ぼす影響を検討した結果、尿の混入を防ぎ、精液採取時の精液性状に問題がなければ、経直腸電気刺激法に比較して、尿道カテーテル法で採取した精液の方が、4°Cの低温保存において精子活力および精子生存率を数日間、高値で維持できることが明らかとなった。しかし、低温保存の経過とともに尿道カテーテル法で採取した精液は、経直腸電気刺激法で採取した精液よりも精子奇形率が増加してしまうことが明らかとなった。この精子奇形率の増加の考えられる原因として、尿道カテーテル法では麻酔導入に用いた塩酸メドミジンの作用によって精巣上体尾部および精管内の精子を回収しているものであるため、副生殖腺液すなわち前立腺分泌液が混入していないことが考えられた。イヌでは、精巣上体尾部精子を前立腺液に感作させないで低温保存すると、精子奇形率が上昇することが明らかとなっている [77]。これは、前立腺液中に含まれる糖タンパクが精子に付着しないために [98]、低温保存によって精子の正常な形態が維持できないと考えられている。そのため、アムールヤマネコでも同様

の現象が起こっているのではないかと考えられた。しかし、Toyonaga らの報告 [177] では、イエネコの精巣上体尾部精子と射出精子の間には糖タンパク質の違いを明らかにできなかった。また、イエネコから回収した精巣上体尾部精子に精漿を添加しても、凍結融解後の性状に良い影響は与えられなかったことも報告している [177]。すなわち、雄イエネコの副生殖腺液には低温保存に対して精子を保護する物質は含まれていない可能性も考えられたが、アムールヤマネコ精子とイエネコ精子が同じであるかは不明である。その他の原因として、尿道カテーテル法によって採取された精液は、精管に貯留していた古い精子が多く含まれている可能性や、カテーテル挿入時に潤滑液として使用したキシロカインゼリーが精子の低温保存に影響を及ぼしている可能性も考えられた。しかし、この点についても明らかにすることができなかった。今回は、1 頭のアムールヤマネコの 3 回分の精液で実験を行ったため、例数が少ないと考えられ、今後例数を増やして検討する必要がある。

今回、1 例だけではあるが、保存温度がアムールヤマネコ精液の低温保存に及ぼす影響についても検討を行った。低温保存は、雄と雌が離れて飼育されており、雄から採取した精液を雌が飼育されている施設まで運搬して人工授精を行うことを想定した実験である。国内の移動であれば、短時間の保存で十分であるが、4℃で一定に輸送することは難しい。そのため、8℃でも 4℃と変わらず精液の輸送ができれば、精液の輸送に関して有用であると考えられるため、今回は精液を 2 つに分け、それぞれ 4℃と 8℃で低温保存を行い、その影響について検討を行った。その結果、精子奇形率では両群で差はみられなかったが、8℃保存群では保存 1 日後で精子活力が 20%以下に急激に低下し、精子生存率では保存 2 日後に低下がみられた。したがって、8℃での保存は、保存温度として適さないことが示唆された。しかし、今回の実験結果は、1 頭のアムールヤマネコの 1 回分の精液のものであったため、この結果だけで決定することはできないと考えられる。したがって、さらに例数を増やし、精液の保存温度についてさらに検討することが必要である。

小 括

実験1として、イエネコの方法を参考にして凍結精液を作成し、融解後の精液性状からその有用性について検討を行った。また実験2として、1頭の雄アムールヤマネコから経直腸電気刺激法（電気刺激群）および尿道カテーテル法（カテーテル群）によって採取した3回の射出精液を用いて、4℃および8℃で低温保存を行い、その有用性について検討を行った。

その結果、実験1では、精子濃度と融解後の精液性状の間には有意な関係はみられなかった。また、第2章と同様に、繁殖季節を基準にデータを分析したところ、凍結前および融解後の精子活力は繁殖季節が他の季節よりも高値を示し、繁殖季節後では凍結前に比較して融解後の精子活力の低下が顕著であった。また凍結前の精子奇形率は、他の季節に比較して繁殖季節後がやや高値を示したが、融解後はその差が大きくなった。また、実験2では、低温保存後の精子活力は、採取直後と保存1日後では電気刺激群とカテーテル群はほぼ同様であったが、保存2日後以降は、電気刺激群が急激に低値を示し、両者の差は保存経過とともに大きくなった。精子生存率も同様に、保存2日後以降は電気刺激群の方がカテーテル群に比較して低値を示した。また精子奇形率は、保存3日後からカテーテル群が保存経過とともに高値を示し、差が大きくなった。また保存温度の検討において、8℃保存群は保存1日後に急激に精子活力が低下したが、4℃保存群では緩やかに低下した。精子生存率は、保存2日後以降で、4℃保存群よりも8℃保存群がやや低値を示して推移した。また精子奇形率は、保存5日後まで両群でほぼ同様に推移した。

以上のことから、アムールヤマネコの凍結精液は、イエネコと同様の方法で問題がないものと考えられた。また4℃の低温保存においては、経直腸電気刺激法に比較して尿道カテーテル法で採取した精液の方が精子活力および精子生存率を数日間、良好に維持できることが明らかとなった。また保存温度は、8℃よりも4℃の方が適していることが示唆された。

表 1. アムールヤマネコ No. 15 (における凍結融解前後の精液性状

日付	凍結前の性状 (%)			融解後の性状 (%)			最終精子濃度 ($\times 10^6$ /ml)
	活力	生存率	奇形率	活力	生存率	奇形率	
06/11/18	70	90.1	5.9	10	73.8	15.4	10
07/05/28	60	87.3	19.1	0	52.0	34.0	10
08/01/28	90	94.8	4.2	30	82.3	10.1	50
08/03/24	70	78.4	5.7	40	52.2	11.7	10
08/06/05	50	86.5	3.6	20	62.3	22.8	13
08/10/07	50	91.6	9.2	10	57.4	33	5
08/12/11	60	73.2	6.4	60	72.7	4.2	9
09/02/24	70	96.9	4.7	45	63.9	4.8	28
09/10/13	70	93.9	5.2	45	68.2	24.9	40
09/12/09	80	92.7	5.3	0	40.5	3.3	22
平均	67.0	88.5	6.9	26.0	62.5	16.4	19.7
±SE	4.0	2.4	1.4	6.7	3.9	3.7	4.8

表 2. アムールヤマネコ No. 49 の尿道カテーテル法および経直腸電気刺激法によって採取した直後の精液性状

実施日	精巢容積 (cm ³)		精液採精 方法	精子活力 (%)		精子生 存率 (%)	精子奇形率 (%)				総精子数 (×10 ⁶)	保存時の精子濃度 (×10 ⁶ /ml)	
	L	R		+	±		頭部	中片部	尾部	合計			
16/07/09	3.9	1.5	1.3	カテーテル	70	10	75.4	0.3	0.6	6.0	6.9	2.9	2.9
				電気刺激	60	10	59.8	1.2	1.5	5.4	8.1	2.0	2.0
17/06/03	4.0	1.2	1.2	カテーテル	70	10	68.2	1.5	1.5	6.0	9.0	1.5	1.5
				電気刺激	70	10	78.9	0.3	1.8	2.7	4.8	4.0	4.0
17/09/30	4.7	1.3	1.2	カテーテル	30	10	83.5	0.0	1.8	20.1	21.9	1.7	1.7
				電気刺激	60	10	85.6	0.3	1.2	10.8	12.3	1.9	1.9

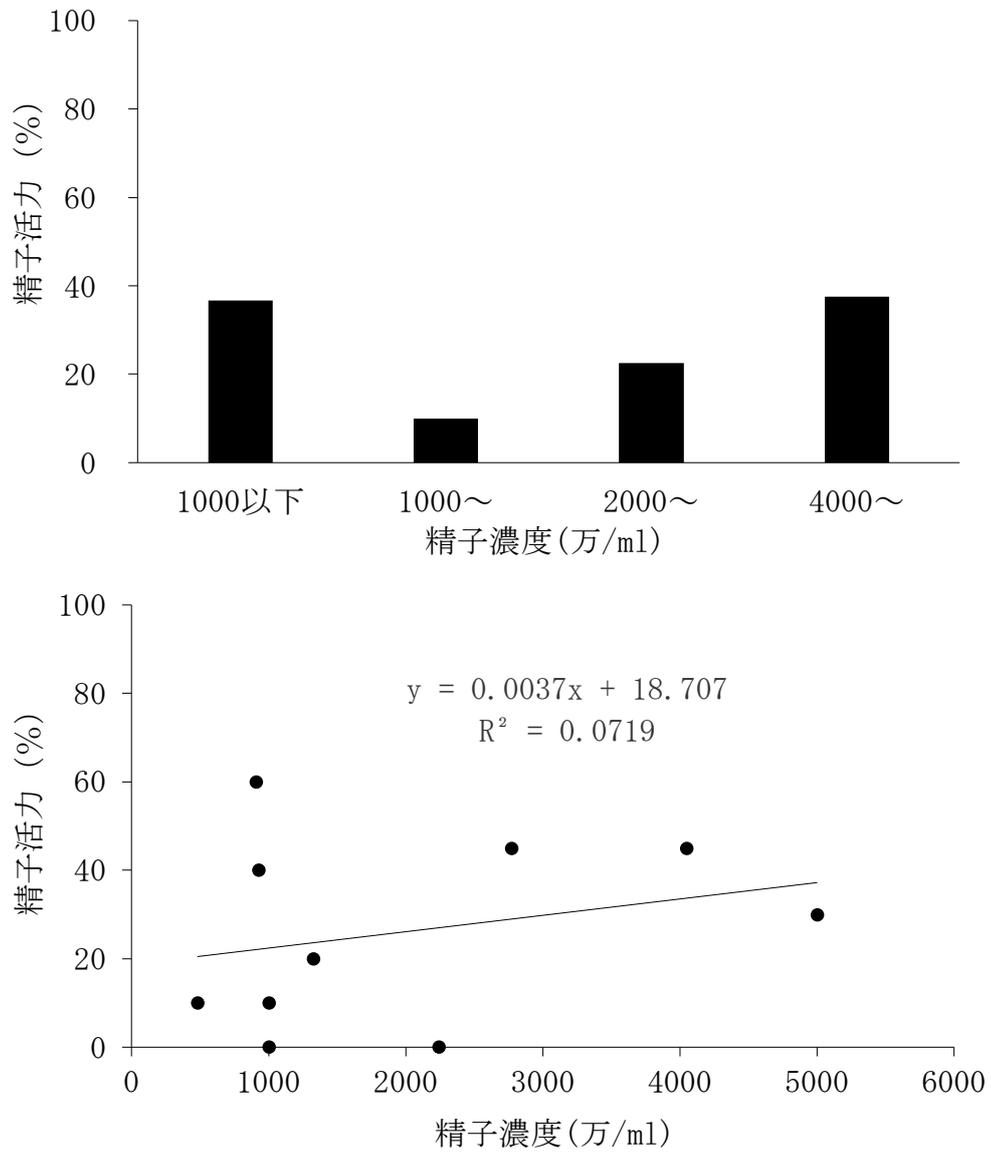


図1. アムールヤマネコの最終精子濃度と精子活力の関係

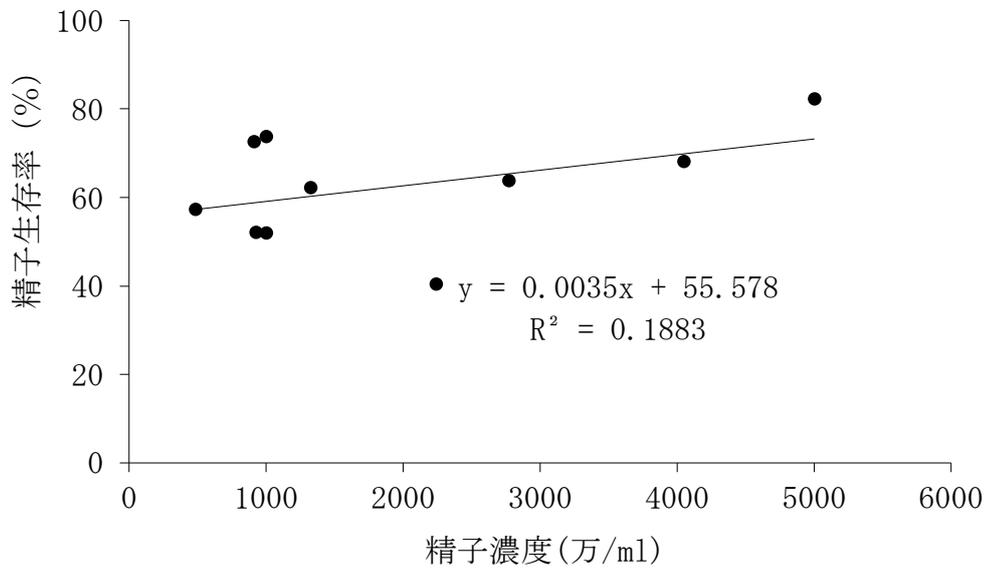
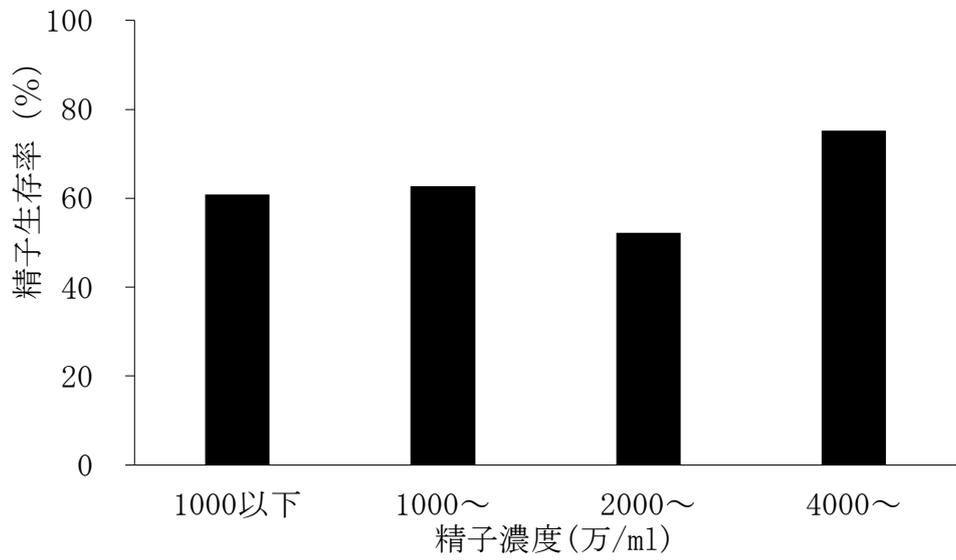


図2. アムールヤマネコの最終精子濃度と精子生存率の関係

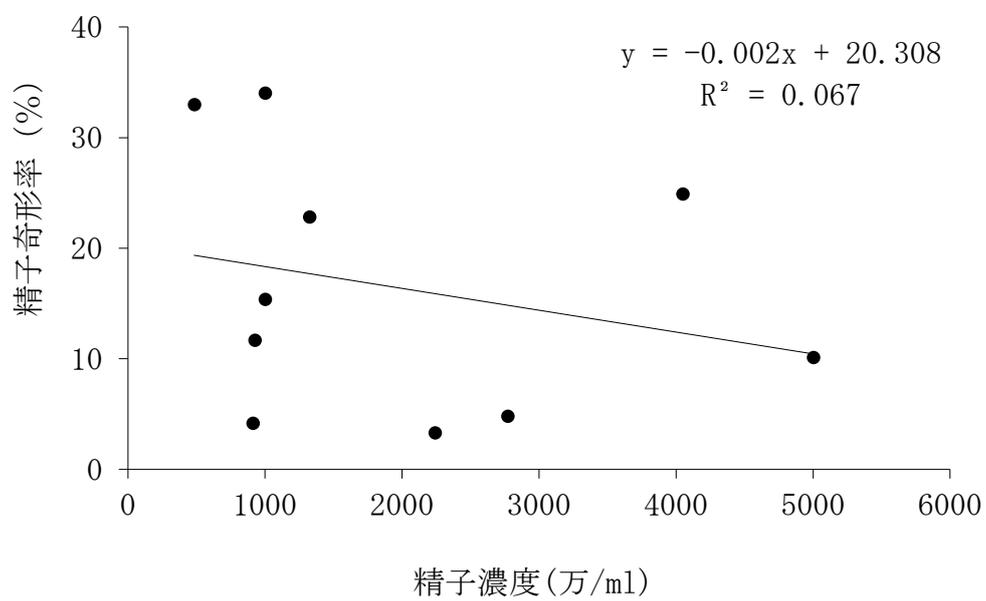
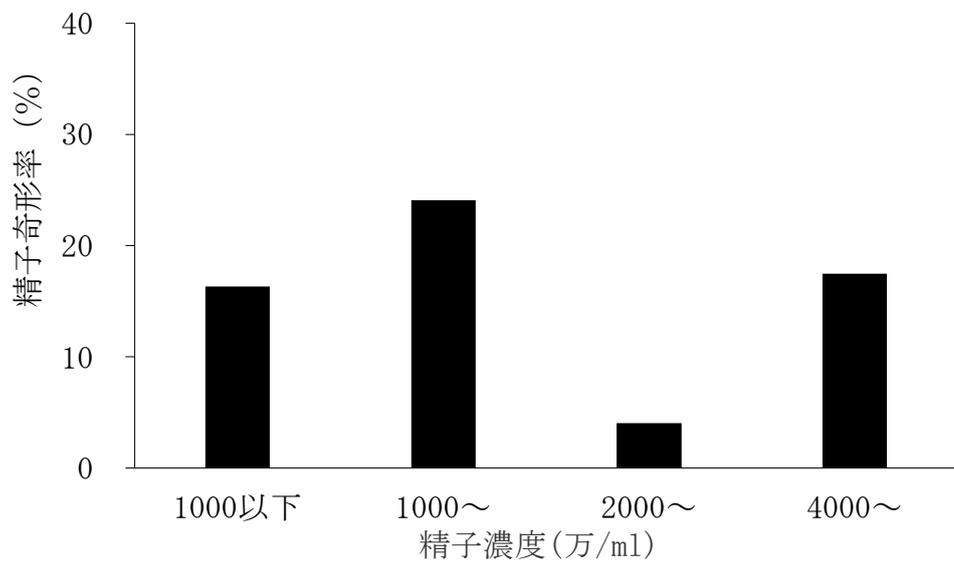


図3. アムールヤマネコの最終精子濃度と精子奇形率の関係

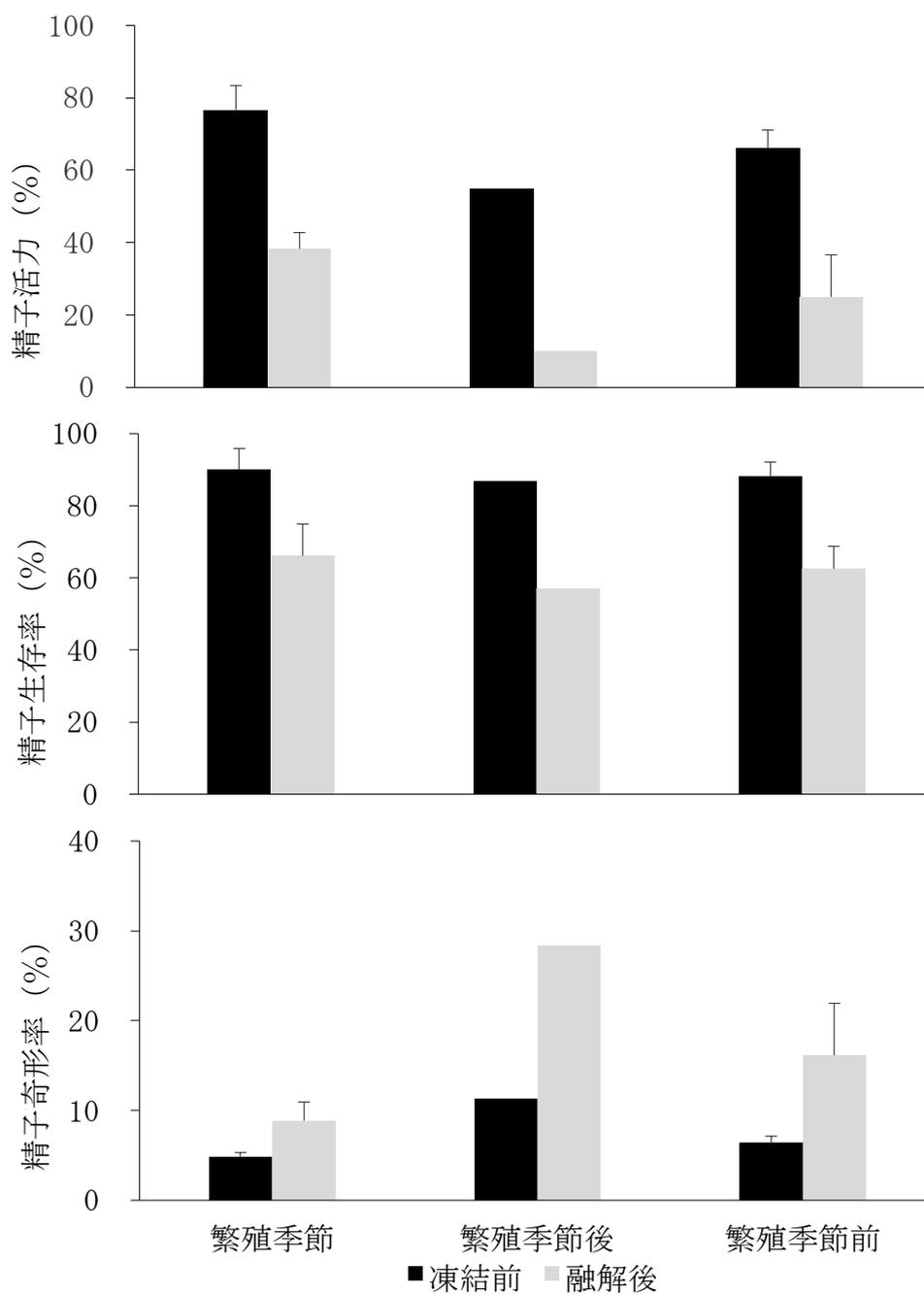


図4. アムールヤマネコの凍結融解後の各精液性状における季節の影響

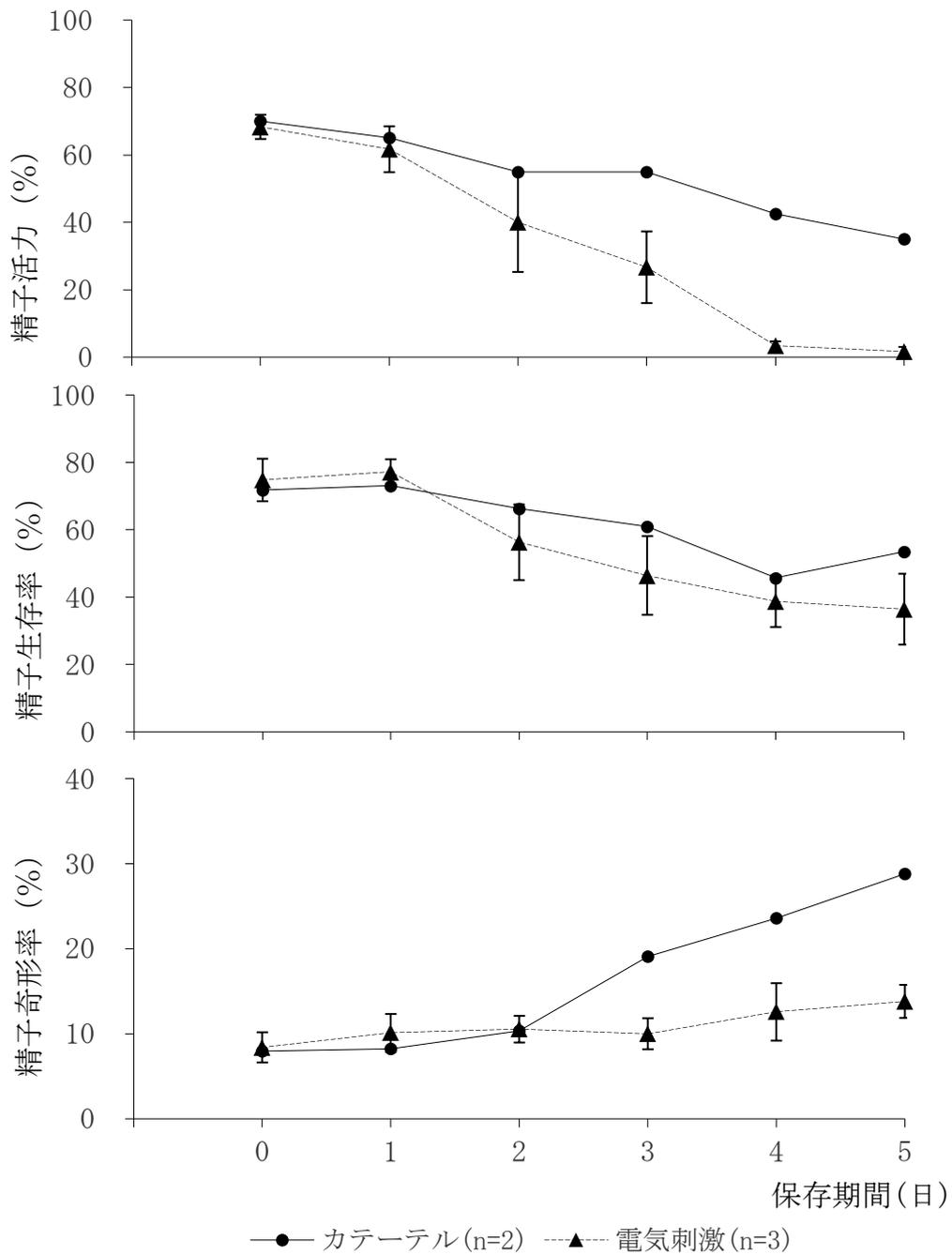


図5. アムールヤマネコ No. 49 の尿道カテーテル法と経直腸電刺激法によって採取した精液の各精液性状における経時的変化

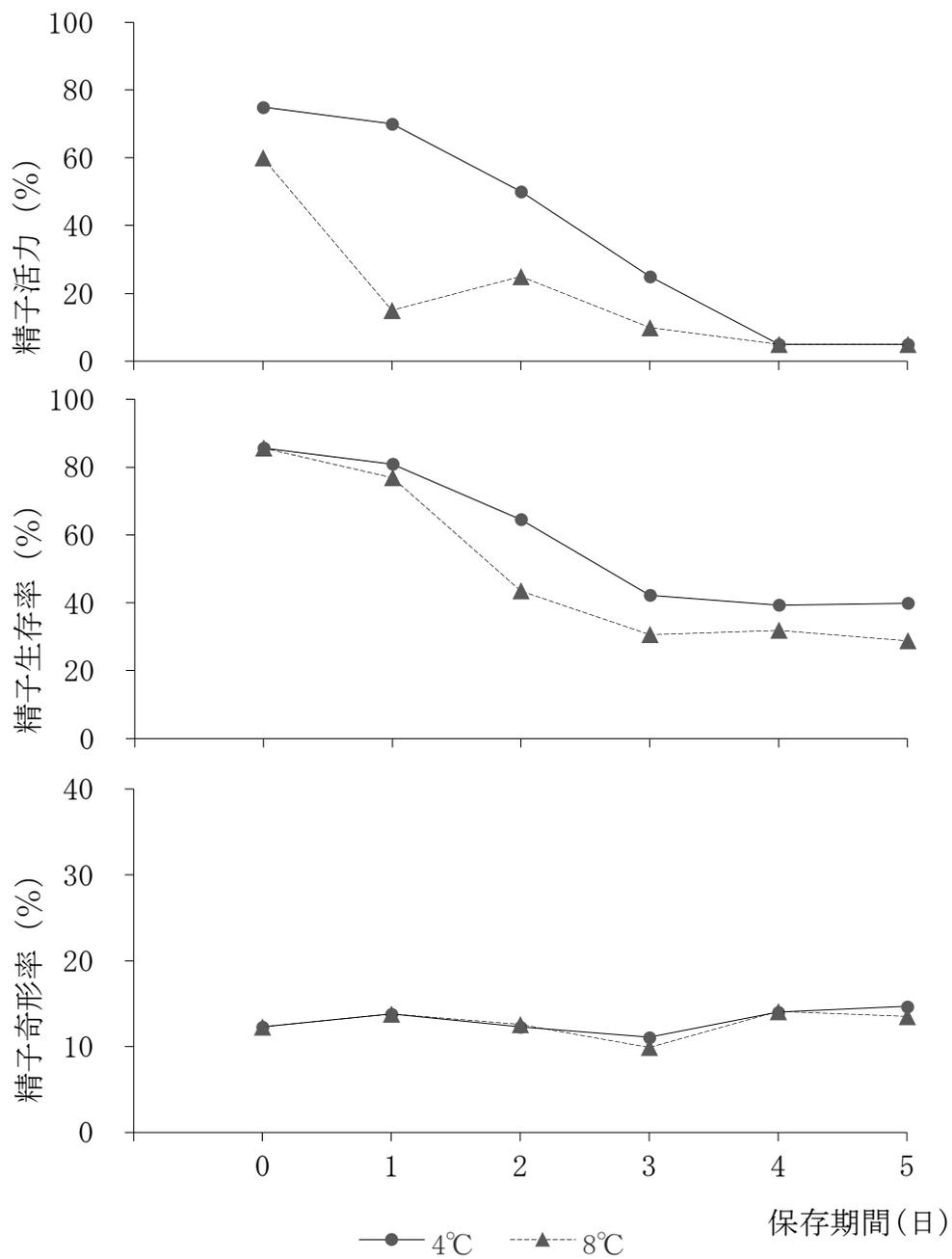


図6. アムールヤマネコ No. 49 の経直腸電気刺激法によって採取した精液の保存温度の違いによる各精液性状の経時的変化

第5章

アムールヤマネコの精巣上部尾部精子の 性状および凍結保存の検討

緒言

ツシマヤマネコが生息している長崎県対馬市では、ツシマヤマネコの生息域内保全の一環として「市民参加の森づくり活動による森林環境の改善」、「イエネコの適正飼育の推進」、「交通事故のメカニズムの解明と対策」などの啓蒙活動を行い、ツシマヤマネコと人が共存できる環境作りに取り組んでいる。しかし、年間に数頭のツシマヤマネコが交通事故で死亡している（2018年は4頭、2019年は5頭）[178]。またその他に、野良犬に襲われて死亡してしまう事故が起こることがある。

このような状況のように、雄動物が不慮の事故で死亡した場合、精子が貯蔵されている精巣上体尾部から精子を回収して、凍結保存を行うことが可能である。この技術はこれまで、イヌ [75, 76, 110, 131] やイエネコ [26, 27, 32, 109, 155, 156, 170, 174, 175, 177, 195] を始めとする様々な動物において、その技術を確立するための多くの研究が行われている [14, 16, 33, 60, 97, 108, 115, 123, 124, 135, 146]。精巣上体尾部から回収した精子を、人工授精 [180, 191]、体外受精 [105] または顕微授精 [18, 144] に用いることによって、予期せずに死亡してしまった個体においても、その個体の遺伝子を維持しながら個体数を増加させることに役立つと考えられる。また、精子の保存方法の確立は、個体数の増加のみならず、域外保全の中で遺伝的多様性を維持するための新しい血統を供給できる手段としても有効であると考えられる。

しかし、イエネコでは多くの精巣上体尾部精子に関する研究が報告されているものの、野生ネコ科動物の精巣上体尾部精子の回収方法、性状および凍結保存に関する報告はほとんどない。もちろん、現在までにアムールヤマネコの精巣上体尾部精子の性状および凍結保存に関する報告はない。したがって、野生ネコ科動物の精巣上体尾部精子の回収および凍結保存に関しては、イエネコで報告されている方法を参考に行われている。筒井ら [191] は、イエネコの精巣上体尾部から回収した精子の性状は良好であり、凍結融解後の精巣上体尾部精子を用いた子宮内人工授精によって産子を得られることを明らかにした。この時の凍結保存方法は、第4章で報告した射出精液の凍

結保存と同じ方法であった。したがって、アムールヤマネコにおいても、この方法で精巢上体尾部精子を凍結保存すれば、融解後に良好な性状が得られることが期待できる。

そこで本章では、研究期間中に死亡した雄アムールヤマネコの精巢上体尾部から精子を回収し、その精子の性状を評価した後に凍結保存を行い、融解後の性状から凍結保存した精巢上体尾部精子の有用性について検討を行った。

実験材料および方法

1. 供試動物

供試動物は、東京都井の頭自然文化園で飼育されていたが、2011～2013年の間に死亡した雄アムールヤマネコ3頭であった（個体番号No. 21、No. 42、No. 43）。3頭とも死亡時の年齢は7歳で、死因は表1に示したとおりである。すべての個体は生前、繁殖に供されることはなかったため、交尾能および受精能については不明であった。No. 42は2012～2013年の間に、第3章で述べたものを含めて全部で4回、全身麻酔下での尿道カテーテル法および経直腸電気刺激法にて精液採取を行った個体であったが、その他の個体では精液採取を行ったことはなかった。これらの個体は、個別のケージで飼育されており、季節差なく馬肉、鶏肉および鶏頭などが給餌されていた。

また対照群として、年齢1.1～2.6歳（平均 1.6 ± 0.3 歳）、体重4.5～5.2kg（平均 4.8 ± 0.1 kg）の雄イエネコ5頭を用いた。品種は、1頭はブリティッシュショートヘアで、その他の4頭は雑種であった。これらのイエネコは2011～2014年に、去勢を目的に日本獣医生命科学大学動物医療センターに来院した症例であった。

2. 精巢および精巢上体の計測方法

精巢から精巢上体を分離した後、ノギスを用いて精巢の縦 (a)・横 (b)・厚さ (c) (直径) を測定し、その後、重量を測定した。精巢容積 (cm^3) は、 $4/3\pi \times \text{縦}/2 \times \text{横}/2$

×厚さ/2 の公式から求めた。また精巣上体はノギスを用いて、頭部および尾部の幅と厚さ、全体の長さを測定し、その後、重量を測定した。

3. 精巣上体尾部精子の回収方法

アムールヤマネコの死亡後、直ちに 5°C の冷蔵庫に個体ごと保管し、その後、精巣および精巣上体を総鞘膜に包まれたまま摘出し、滅菌生理食塩液につけ、日本獣医生命科学大学 獣医臨床繁殖学研究室まで室温にて運搬した。研究室に到着後、直ちに精巣上体尾部から精子の回収を行った。また対照群のイエネコでは、一般的な去勢手術による精巣および精巣上体の摘出後、直ちに精巣上体尾部から精子の回収を行った。

全ての個体における精巣上体尾部からの精子の回収は、イエネコで一般的に行われている切り刻み法 [176] で行なった。すなわち、まず回収精子への血液混入を抑えるために、可能な限り精巣上体の表面にある血管を除去した。精巣上体尾部と体部の境界部で精巣上体を切断した後、13 mm プラスチックシャーレの中に、精巣上体尾部および精管と少量の卵黄トリス・フルクトース・クエン酸液 (EYT-FC) [190] を入れ、外科用メス刃を使って切り刻んで EYT-FC の中で精子を遊出させた。その後、ガラス漏斗と 80 μ m の金属メッシュを用いて精巣上体尾部精子が含まれた遊出液を濾過して、スピッツ管の中に回収した。

また精巣上体尾部精子の対照群として、2012～2013 年の間に、全部で 4 回、全身麻酔下での尿道カテーテル法および経直腸電気刺激法にて採取したアムールヤマネコ No. 42 の射出精液のデータを用いた。精液採取の方法は、第 2 章および第 3 章に述べたとおりである。

4. 精巣上体尾部精子の性状検査方法

精巣上体尾部精子の性状検査方法は、第 2 章で述べられたとおりである。

5. 凍結保存方法

アムールヤマネコおよびイエネコの精巣上部尾部精子の性状に問題がないことを確認した後に、第2章に示した方法でそれぞれ凍結保存を行った。

6. 融解方法および融解後の精液性状検査

融解方法は、第4章に示したとおりである。

融解直後には、精子活力、精子生存率、精子奇形率および未熟精子出現率についての検査を行った。また、その精液をミニ恒温槽 e-ThermoBucket (ETB、タイテック株式会社) を用いて 20°C に保存し、融解後 1、2、4 および 6 時間後に精子活力および精子生存率の経時的変化について観察した。

7. 統計処理

本研究で得られた成績は、Student's *t*-test によって統計処理を行った。危険率 5% 未満である場合、有意であると判断した。

結 果

1. アムールヤマネコとイエネコの精巣および精巣上部の大きさの比較

3 頭のアムールヤマネコの精巣および精巣上部の大きさを表 2 に、イエネコの精巣および精巣上部の大きさを表 3 にそれぞれ示した。すなわち、アムールヤマネコの精巣の大きさおよび重量に関しては各個体とも左右では差はみられなかったが、精巣の重量において、No. 21、No. 42 に対して No. 43 が高値を示し、個体間で差がみられた。同様にイエネコの精巣の大きさおよび重量においても、各個体の左右で差はみられなかったが、個体間ではやや差がみられた。

アムールヤマネコの精巣上部の大きさにおいて、No. 43 の精巣上部尾部の幅と精巣上部尾部の全体の長さにおいて左右間でやや差がみられたが、No. 21 および No. 42 の精巣上部の大きさには左右では差はみられなかった。また精巣上部の重量には各個体

とも左右では大きな差はみられなかったが、No. 21、No. 42 に対して No. 43 がやや高値を示し、個体間で差がみられた。イエネコの精巣上体の大きさおよび重量は、精巣上体頭部の幅において 1 頭 (No. 1) で左右間に差がみられたが、他の 4 頭では左右間に差はみられなかった。また精巣上体の大きさには左右間で差はみられなかったが、個体間ではやや差がみられた。

アムールヤマネコとイエネコの精巣および精巣上体の大きさと重量の平均値を表 4 に示した。すなわち、精巣の大きさおよび重量において、両者間で有意差は認められなかった。また精巣上体の大きさおよび重量に関して、精巣上体頭部の厚さはアムールヤマネコでは平均 0.23 ± 0.02 cm、イエネコでは 0.37 ± 0.02 cm で、アムールヤマネコの方が有意に低値を示した ($P < 0.01$) が、その他の項目に関しては、両者の間に有意差は認められなかった。

2. アムールヤマネコ精巣上体尾部精子の性状と、イエネコ精巣上体尾部精子およびアムールヤマネコ射出精子の性状との比較

アムールヤマネコ 3 頭の回収直後の精巣上体尾部精子の性状を表 5 に示した。なお個体の死亡から精子回収までの時間は、No. 21 は約 13 時間、No. 43 は約 5 時間、No. 42 は約 30 分とそれぞれ異なっていた。

回収直後の精子活力は、No. 21 では左右それぞれ 85%、80%、No. 42 では左右それぞれ 90%、85%、No. 43 では左右ともに 80% と、どの個体も左右で大きな差はみられず高値を示した。

精子生存率は、No. 21 では左右それぞれ 90.9%、72.0%、No. 42 では 90.1%、85.9%、No. 43 では 90.1%、80.2% であった。No. 21 の右側精巣上体尾部から回収した精子の生存率は、他の個体に比べてやや低値を示したが、その他はすべて 80% 以上の高値を示した。

精子奇形率は、No. 42 では左右で 8.7%、6.9% とやや高値を示したが、その他は 1.8 ~ 3.3% と低値であった。

未熟精子出現率は、No. 43 では左右ともに1%前後の低値を示したのに対し、No. 21 と No. 42 では左右でやや高値を示した。

総精子数は、No. 21 では左右でやや差がみられたが、他の2頭はほぼ同様の値であった。左右合計の精子数は、No. 21 で約8,000万、No. 42 で約5,500万、No. 43 で約1億であった。3頭の中で、精巣および精巣上部が一番大きかったNo. 43 が最も高値を示した。

アムールヤマネコおよびイエネコの精巣上部尾部精子と、アムールヤマネコの射出精子の性状の平均値を、表6に示した。

アムールヤマネコの精巣上部尾部精子の活力（平均 $83.3 \pm 1.5\%$ ）とイエネコの精巣上部尾部精子活力（ $82.0 \pm 1.2\%$ ）はほぼ同様に高値を示した。また、アムールヤマネコの射出精子の精子活力は35~90%と幅がみられ、平均 $67.1 \pm 7.8\%$ とやや低値を示したが、3群間で有意差はみられなかった。

アムールヤマネコの精巣上部尾部精子の生存率（平均 $84.9 \pm 2.8\%$ ）とイエネコの精巣上部尾部精子生存率（ $90.1 \pm 2.0\%$ ）、はほぼ同様に高値を示した。また、アムールヤマネコの射出精子の精子生存率は78.4~97.3%、 $86.4 \pm 2.7\%$ と同様に高値を示し、3群間で有意差はみられなかった。

アムールヤマネコの精巣上部尾部精子の奇形率（ $4.3 \pm 1.1\%$ ）とイエネコの精巣上部尾部精子奇形率（平均 $6.9 \pm 0.9\%$ ）は、ほぼ同様であった。またアムールヤマネコの射出精子の精子奇形率も2.4~9.3%、 $6.5 \pm 0.8\%$ と同様であり、3群間で有意差はみられなかった。

未熟精子出現率において、アムールヤマネコの精巣上部尾部精子（平均 $4.9 \pm 1.3\%$ ）は、イエネコの精巣上部尾部精子（ $12.2 \pm 3.7\%$ ）のものと比較して有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）。また、アムールヤマネコの射出精子の未熟精子出現率は0~2.1%、平均 $0.9\% \pm 0.3\%$ と低値であり、アムールヤマネコおよびイエネコの精巣上部尾部精子に比較して有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）。

アムールヤマネコの精巣上部尾部から回収した総精子数（平均 78.6×10^6 ）に対し

て、イエネコの精巣上部尾部から回収した総精子数は平均 90.7×10^6 とやや高値を示したが、両者の間に有意差は認められなかった。一方、アムールヤマネコの射出精子数は、平均 5.3×10^6 と、アムールヤマネコの精巣上部尾部から回収した総精子数に比較して有意に低値を示した ($P < 0.01$)。

No. 42 では、尿道カテーテル法および経直腸電気刺激法による精液採取を行った直後に死亡した個体であった。そこで、死亡直前に採取した射出精液と死亡の後に回収した精巣上部尾部精子の性状を比較するため、それぞれのデータを表7に示した。

その結果、経直腸電気刺激法で採取した精液中の精子活力および精子生存率は精巣上部尾部精子の性状とほぼ同様であったが、電気刺激前と電気刺激後に行った尿道カテーテル法によって採取された精液中の精子活力はやや低値を示した。精子奇形率は、精巣上部尾部精子と射出精液はほぼ同様で、両者の間に差はみられなかった。未熟精子出現率は、精巣上部尾部精子に比較して射出精液が低値を示した。また総精子数は、射出精液中の総精子数に比較して、精巣上部尾部精子は高値を示した。

3. アムールヤマネコ精巣上部尾部精子の凍結融解後の性状

アムールヤマネコ精巣上部尾部精子の凍結融解後の精子活力および精子生存率の経時的变化について図1に、融解直後の精子奇形率と未熟精子出現率を図2に示した。

融解直後の精子活力は、3頭の中でNo. 42 が35%と最も高値を示し、No. 21 が15%と最も低値を示した。その後、融解後4時間でNo. 42 がNo. 21 よりも低値を示したが、融解後6時間ではNo. 21、No. 43 がそれぞれ5%であったのに対し、No. 42 が10%と一番高値を示した。融解直後の精子生存率は、No. 21 が60.7%と最も高値を示し、No. 43 が48.3%と最も低値を示した。精子活力ではNo. 42 がNo. 21 よりも高値を示していたが、精子生存率では逆であった。その後、融解後4時間でNo. 21 が27.6%と急激に低下し、融解後6時間ではNo. 21 が19.8%、No. 43 が16.5%であったのに対し、No. 42 が32.1%と最も高値を示した。融解直後の精子奇形率について個体によってやや差がみられたが、凍結前に最も低値を示していたNo. 43 が、融解直後ではもっと高値を示

していた。また融解直後の未熟精子出現率は、すべての個体で凍結前よりも低値を示した。

考 察

今回、3頭のアムールヤマネコの精巣上体尾部から精子を回収したところ、総精子数は平均 78.6×10^6 で、これはイエネコの精巣上体尾部から回収した精子数（平均 90.7×10^6 ）よりやや少なかったが、両者の間で有意差はみられなかった。今回のアムールヤマネコは3頭とも7歳であったが、5頭のイエネコは平均1.6歳の比較的若い個体であった。またアムールヤマネコの平均体重は3.8kgで、イエネコの平均体重は4.8kgであったため、両者の回収精子数の差は体重の違いから生じたものと考えられた。また、No. 42は精液採取直後（電気刺激から約1時間後）の個体であったため、回収できる数がやや少なかったことも考えられた。

今回の結果から、これまで第2章、第3章でアムールヤマネコから経直腸電気刺激法、尿道カテーテル法で採取できた総精子数に比較して、精巣上体尾部にはもっと多くの精子が貯蔵されていることが明らかとなった。とくに、アムールヤマネコ No. 42は、精液採取直後に死亡した個体であり、経直腸電気刺激法およびカテーテル法で得られた精子数は約1,400万であったが、その約1時間後に約5,500万の精子が精巣上体尾部から回収されたため、精液採取直後でも精巣上体尾部内に多くの精子が残っていることが明らかとなった。これまでの精液採取で回収される精子が少ないのは、精巣上体に貯蔵されている精子が元々少ないからではないことが明らかとなったことから、現在行っている精液採取方法をさらに改良することでさらに多くの精子が回収できる可能性も示唆された。

また第2章で、アムールヤマネコの射出精液は、季節によって若干の影響を受け、繁殖季節前の時期が最も良いことが明らかとなった。この点に関して、今回の3頭のアムールヤマネコの死亡した季節は、No. 21が12月、No. 42が4月、No. 43が4月と、

どれも繁殖季節に近い時期であったため、回収された性状には季節による影響はないと考えられた。

今回、アムールヤマネコが死亡してから精子を回収するまでの時間は個体によって異なっており、それぞれ約 13 時間、5 時間、30 分であったが、回収直後の精子活力はどれも高値であった。一般的には、個体が死亡してから室温に放置される時間が長ければ長いほど回収直後の精子活力の低下が起こるが、イエネコの精巢上体尾部精子における研究 [32, 71, 176] でも明らかにされているように、4~5°Cの低温に保存されれば、少なくとも 24 時間は精液性状を良好に保持できると考えられる。今回は、動物の死後、すぐに精巢上体から尾部精子の回収ができなかったために死亡してからすぐに個体を 5°Cに保管したものであった。したがって、この処置が精巢上体尾部内の精液性状を著しく低下させることなく良好に維持できたことが原因と考えられた。対馬などで交通事故などの不慮の事故が起こった場合、すぐに発見できると限らない。しかし、死亡した個体を発見した場合、できるだけ早く精巢上体尾部から精子を回収して保存することが必要であると思われるが、もしそれができないのであれば、できるだけ早く個体もしくは精巢および精巢上体を摘出し、4~5°Cの低温下に維持することが必要であると判断された。

イエネコの精巢上体尾部精子の凍結保存方法に関しては、これまでに様々な検討が行われている。例えば Buranaamnuary [27] は、イエネコの精巢上体尾部から回収した精子に卵黄トリス希釈液 (EYT) と 3%グリセリンを加えた後、冷却し、さらに EYT に 7%グリセリンと 1%の Equex を精液希釈液に添加した場合 (すなわちグリセリンの最終濃度は 5%、Equex の最終濃度は 0.5%)、凍結融解後の性状が良好であったことを報告した。今回行った凍結方法では、グリセリンの最終濃度は 7%、OEP (Equex と同様のもの) の最終濃度は 1%で行っていたため、この点についてはさらに検討すべき必要があると考えられた。また Jimenez ら [90] は、イエネコの精巢上体尾部精子の凍結保存において精液希釈液の検討を行ったところ、市販されているウシやウマの精液の希釈に用いる卵黄トリス液 (Triladyl) や卵黄が入っていない精液希釈液

(Andromed)、卵黄スキムミルクベースの精液希釈液 (Gent) よりも、卵黄トリス希釈液にグルコースまたはフルクトースを入れた精液希釈液の方が良い性状を示したことを明らかにしている。今回行った凍結方法では、以前にイエネコの精巣上体尾部精子の凍結保存 [175, 176] と同様の精液希釈液である EYT-FC を用いており、融解後の精子活力も高値を示し、精子奇形率も比較的低値を示していたため、アムールヤマネコの精巣上体尾部精子の凍結保存用の精液希釈液としては良好であると考えられた。

今回、凍結前の精巣上体尾部精子の精子活力および精子生存率が高値を示しているも、融解後に低くなってしまふことがあることが明らかとなった。また精子奇形率についても凍結前に同様の値を示しているも、融解後に高値になる個体があることが明らかとなった。これは、その個体の精子が持つ耐凍性の違いから生じるものと考えられた。したがって、この点に関しては、精巣上体尾部精子だけでなく射出精子でも同様であると思われるが、凍結前に十分良好な精液性状を示しているも、融解後の性状は個体によって異なるため、凍結融解後の性状を観察してみないとわからないことが示唆された。

今回、融解後の性状検査を行うために数本の凍結精液ストローを融解したが、まだ No. 21 では約 6,000 万、No. 43 では約 8,000 万、No. 42 では約 4,000 万の精子が凍結保存されている。イエネコの射出精液の凍結精液による子宮内人工授精後に高い受胎率を得るためには、約 5,000 万の精子が必要であることが以前の報告から明らかとなっている [180, 189]。この報告から、現在残っている精液を用いて子宮内人工授精を行うことは可能であると考えられる。また、イエネコにおいて精巣および精巣上体を摘出後、4℃で 24 時間保存した後、精巣上体尾部精子を凍結保存した精液を用いた卵管内人工授精を行い、産子を得たという報告もある [176]。この報告で用いた授精に必要な精子数は 100 万であったため、アムールヤマネコにおいても子宮内人工授精ではなく卵管内人工授精を選択することができれば、さらに多くの回数の人工授精を行うことができることも想定される。しかし今回、井の頭自然文化園で飼育されている雌アムールヤマネコの高齢化が進んでおり、これらの精子を用いた授精試験を行うこと

ができなかった。日本の他の動物園では、若齢の雌アムールヤマネコは飼育されていないため、雌アムールヤマネコは生息地意識である韓国からの導入を行わなくてはならない。したがって、今後、若齢の雌アムールヤマネコを導入することができれば、凍結融解した精巣上部尾部精子を用いた子宮内人工授精または卵管内人工授精を実施して、受胎が得られるかどうかの試験を検討してゆきたい。

小 括

死亡した3頭の雄アムールヤマネコの精巣、精巣上体の大きさ、重量および切り刻み法によって精巣上体尾部から回収した精子の性状を5頭のイエネコの同様のデータと比較した。また精巣上体尾部精子については凍結保存を行い、融解後の性状からその有用性について検討を行った。

その結果、アムールヤマネコとイエネコとも、個体間でやや差がみられた。また、精巣上体頭部の厚さはアムールヤマネコの方が有意に低値を示した ($P < 0.01$) が、それ以外の項目には両種の間には有意差は認められなかった。アムールヤマネコ3頭からの、回収直後の精巣上体尾部精子の性状は良好であった。また平均回収総精子数は、それぞれ約8,000万、約5,500万、約1億であり、これはイエネコよりもやや少なかったが、両者の間に有意な差はみられなかった。その他の性状についても両者でほぼ同様であった。アムールヤマネコ精巣上体尾部精子の凍結融解後の精液性状はいずれも良好であった。

以上のことから、アムールヤマネコの精巣上体尾部からイエネコとほぼ同様の十分な数の精子が回収できることが明らかとなった。精液採取で得られる総精子数は少なかったが、精巣上体尾部にはさらに多くの精子が貯蔵されていることが明らかとなった。そのため、現在行っている精液採取方法を改良することでさらに多くの精子が回収できる可能性が示唆された。今回、精巣上体尾部精子の性状が良好であったのは、個体の死後すぐに5°Cに保管したためであると考えられた。したがって、動物が死亡した場合、すぐに精子を回収することができなければ、個体もしくは摘出した精巣、精巣上体を5°Cの低温下に維持することが必要であると考えられた。

表 1. 雄アムールヤマネコ 3 頭および雄イエネコ 5 頭の個体情報

アムールヤマネコ	個体No.	No. 21	No. 42	No. 43		
	精液採取の経歴	なし	あり	なし		
	死亡時の年齢	7歳	7歳	7歳		
	死亡時の体重	4. 8kg	3. 6kg	3. 1kg		
	死因	肺炎	気胸	腎不全		
イエネコ	個体No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
	年齢	2歳	1歳2ヶ月	1歳1ヶ月	1歳1ヶ月	2歳7ヶ月
	体重	5. 2kg	4. 5kg	5. 0kg	4. 5kg	4. 7kg

表 2. アムールヤマネコ 3 頭の精巢および精巢上体の大きさ

	No. 21		No. 42		No. 43	
	左	右	左	右	左	右
精巢						
長径 (cm)	1.6	1.7	1.6	1.6	1.3	1.2
短径 (cm)	1.4	1.3	1.4	1.5	1.1	1.1
厚さ (cm)	1.2	1.1	1.2	1.3	0.9	0.9
精巢容積 (cm ³)	1.4	1.3	1.4	1.6	0.7	0.6
重量 (g)	1.2	1.3	1.5	1.5	3.0	3.0
全体の長さ (cm)	3.5	3.2	3.4	3.8	2.8	3.8
重量 (mg)	368.0	324.4	365.7	415.5	791.0	827.3
精巢上体						
頭部：幅 (cm)	0.8	0.6	0.5	0.7	0.4	0.3
厚さ (cm)	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2
尾部：幅 (cm)	0.8	1.0	0.9	0.7	1.0	1.8
厚さ (cm)	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4

表3. イエネコ5頭の精巢および精巢上体の大きさ

	No.1		No.2		No.3		No.4		No.5	
	左	右	左	右	左	右	左	右	左	右
長径 (cm)	1.9	1.8	1.0	1.1	1.5	1.6	1.8	1.5	1.6	1.7
短径 (cm)	1.5	1.5	1.4	1.1	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
厚さ (cm)	1.5	1.4	0.9	0.9	1.3	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2
精巢容積 (cm ³)	2.2	2.0	0.7	0.6	1.4	1.3	1.3	1.1	1.3	1.4
重量 (g)	2.2	2.0	0.69	0.61	1.4	1.5	1.0	1.0	1.5	1.5
全体の長さ (cm)	3.7	3.4	3.0	2.0	3.6	3.4	3.2	3.1	3.6	3.9
重量 (mg)	414.6	464.3	317.5	284.5	456.8	512.5	208.7	232.0	344.6	326.6
頭部：幅 (cm)	0.4	0.7	0.6	0.6	0.8	0.8	0.4	0.4	0.6	0.6
厚さ (cm)	0.4	0.5	0.3	0.3	0.5	0.4	0.2	0.3	0.4	0.4
尾部：幅 (cm)	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.8	0.4
厚さ (cm)	0.6	0.6	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3

精巢上体

表4. アムールヤマネコとイエネコにおける精巢および精巢上体の大きさの比較

	アムールヤマネコ (n=3)	イエネコ (n=5)
長さ (cm)	1.50±0.07	1.55±0.09
幅 (cm)	1.30±0.06	1.34±0.04
厚さ (cm)	1.10±0.06	1.18±0.06
精巢容積 (cm ³)	1.28±0.16	1.33±0.15
重量 (g)	1.93±0.31	1.34±0.15
全体の長さ (cm)	3.42±0.14	3.29±0.16
重量 (mg)	515.32±85.61	356.21±30.74
頭部：幅 (cm)	0.55±0.06	0.59±0.04
厚さ (cm) *1	0.23±0.02	0.37±0.02
尾部：幅 (cm)	1.03±0.15	0.65±0.03
厚さ (cm)	0.42±0.02	0.40±0.03

精巢上体

*1 イエネコとの間に有意差あり (P<0.01)

表 5. アムールヤマネコ 3 頭における回収直後の精巢上部尾部精子の性状

個体No.	No. 21		No. 42		No. 43	
死亡から精子回収までの時間	約13時間		約30分		約5時間	
左右	左	右	左	右	左	右
精子活力 (%)	+	85	80	90	85	80
	±	10	10	5	5	5
精子生存率 (%)		90.9	72.0	90.1	85.9	90.1
	頭部	0.9	0.9	2.1	0.3	0.6
	中片部	0.3	0.9	1.5	2.7	0.9
	尾部	1.5	1.5	5.1	3.9	0.6
	合計	2.7	3.3	8.7	6.9	2.1
未熟精子出現率 (%)		10.8	4.8	6.6	4.2	1.5
総精子数 ($\times 10^6$)		20.8	59.8	23.8	31.8	49.8

表6. アムールヤマネコおよびイエネコの精巢上体尾部精子と
アムールヤマネコの射出精子の性状の比較

	アムールヤマネコ 精巢上体精子 (n=3)	アムールヤマネコNo. 42 射出精子 (n=4)	イエネコ 精巢上体精子 (n=5)
精子活力 (%)	83.3±1.5	67.1±7.8	82.0±1.2
精子生存率 (%)	84.9±2.8	86.4±2.7	90.1±2.0
頭部	0.9±0.2	1.4±0.1	0.8±0.1
中片部	1.2±0.3	1.0±0.2	1.1±0.2
尾部	2.3±0.7	4.3±0.7	5.0±1.0
合計	4.3±1.1	6.5±0.8	6.9±0.9
未熟精子出現率 (%)	4.9±1.3 *1,2	0.9±0.3	12.2±3.7
総精子数 (×10 ⁶)	78.6±6.0 *3	5.3±1.4	90.7±37.4

- *1. アムールヤマネコとイエネコの精巢上体尾部精子との間に有意差あり (P<0.05)
 *2. アムールヤマネコの精巢上体尾部精子と射出精液との間に有意差あり (P<0.05)
 *3. アムールヤマネコの精巢上体尾部精子と射出精液との間に有意差あり (P<0.01)

表7. アムールヤマネコ No. 42 の同一日に採取した射出精液および精巢上部尾部精子の性状

	射出精液				精巢上部尾部精子	
	刺激前 カテーター	電気刺激	刺激後 カテーター	左	右	
精子活力 (%)	80	90	65	90	85	
精子生存率 (%)	81.4	93.4	72.2	90.1	85.9	
	頭部	1.2	1.0	2.1	0.3	
	中片部	1.8	2.0	1.5	2.7	
	尾部	3.6	3.0	5.1	3.9	
	合計	5.7	6.0	8.7	6.9	
精子奇形率 (%)						
		2.1	1.0	6.6	4.2	
未熟精子出現率 (%)						
		1.1	0.05	23.8	31.8	

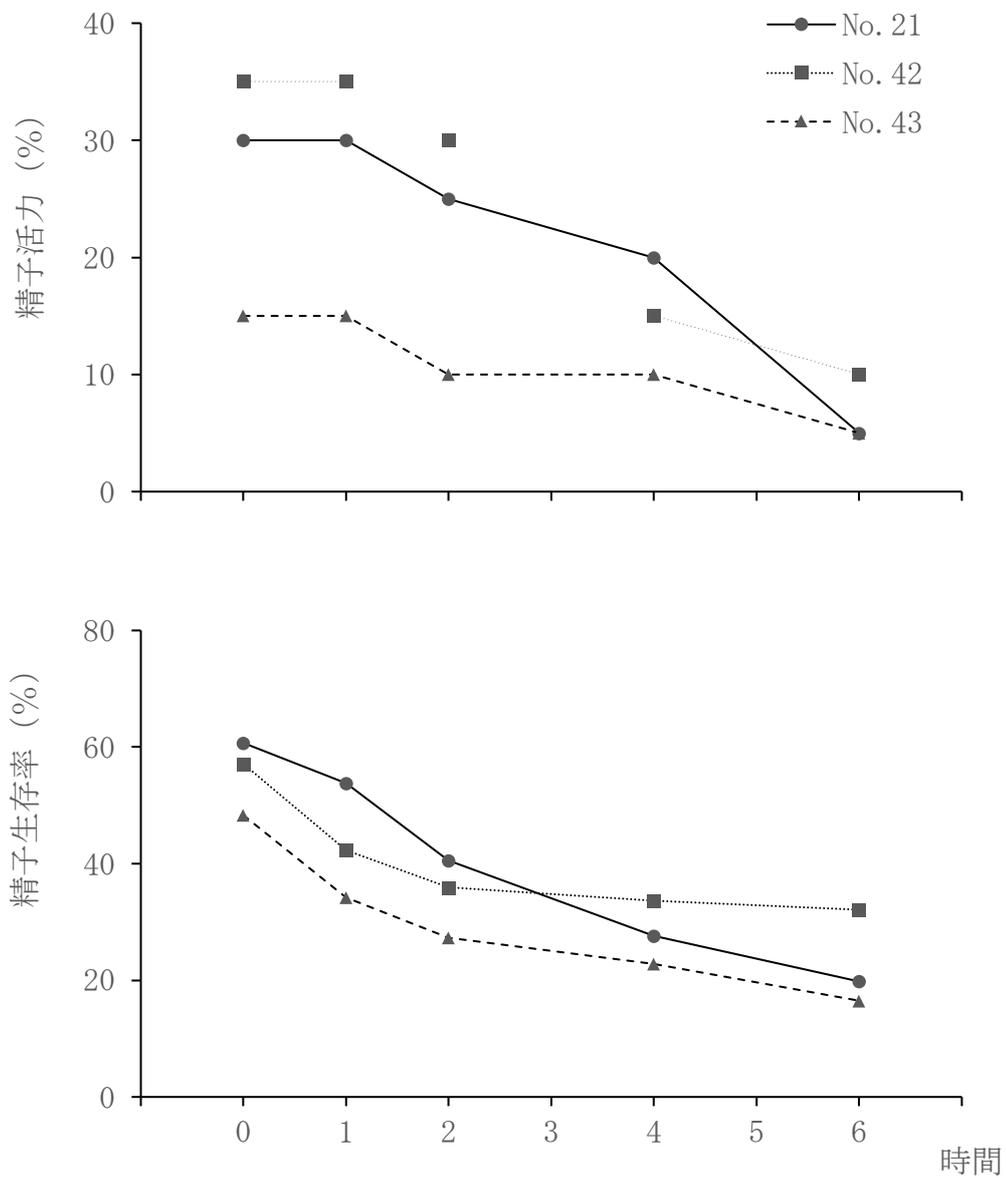


図1. アムールヤマネコ3頭の精巢上体尾部精子における凍結融解後の精子活力および精子生存率の経時的変化

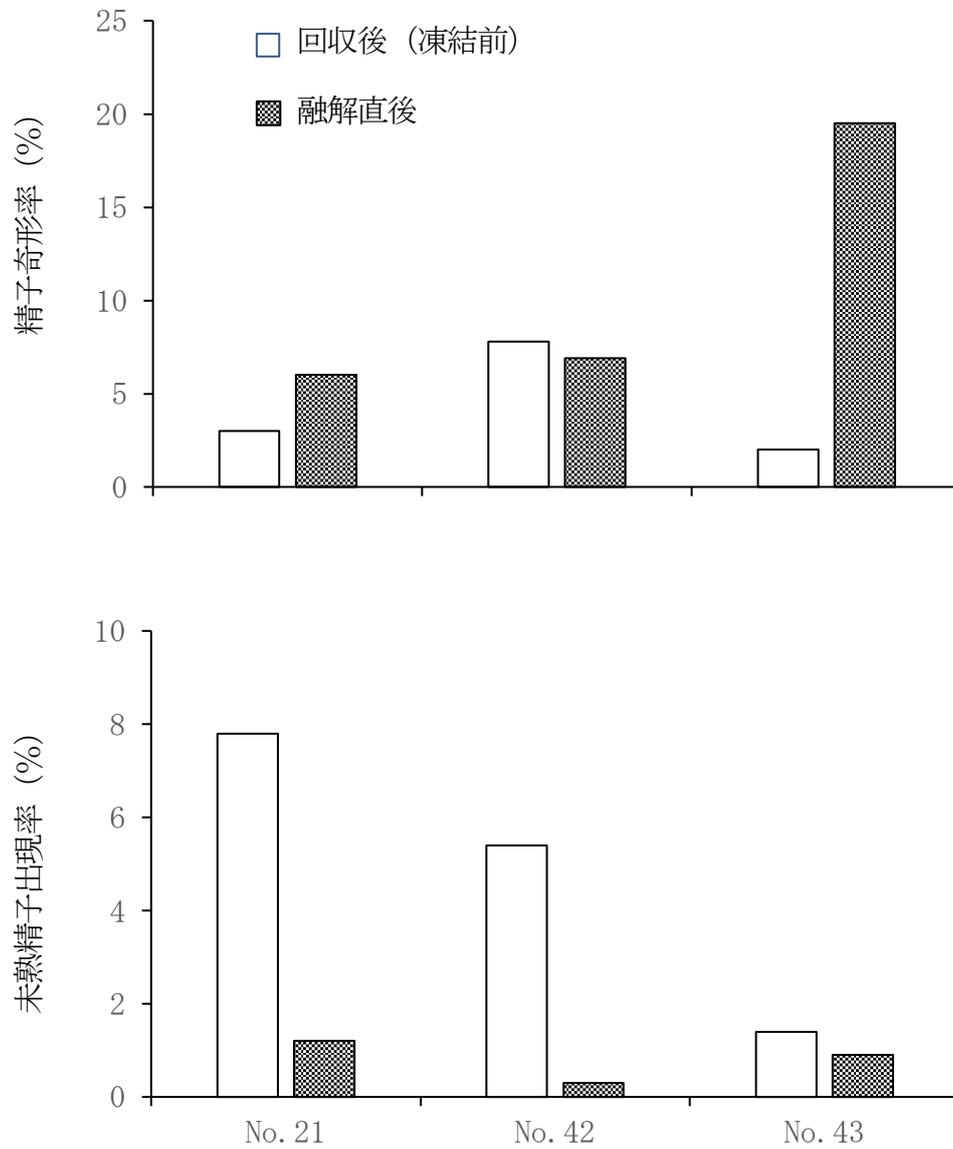


図2. 精巢上部尾部精子の凍結融解前後の精子奇形率および未熟精子出現率

第6章

非繁殖季節のアムールヤマネコの
発情誘起および排卵誘起の検討

緒 言

繁殖を成功させるためには、雌動物の発情徴候および発情による行動の変化を正しく見極め、最適な時期に交配を行うことが重要である。また、不適切な時期に雄個体と雌個体を同居させることで闘争が起こり、最悪な場合、雄個体が雌個体をかみ殺してしまうことも起こってしまうこともある。したがって、交配時期の見極めは、このような不要な闘争を防ぎ個体の安全を確保するためにも重要である。しかし、飼育下におけるアムールヤマネコは顕著な発情徴候がなく、交配適期を見極めることが難しい。これが自然交配を困難にさせている理由の1つでもある。しかし、人工授精を成功させるためには、最適な授精のタイミングを決定することが重要な鍵となるため、他の動物で行われているものと同様にアムールヤマネコにおいても各種ホルモン剤を用いて発情および排卵をコントロールすることができれば、人工授精のタイミングを容易に決定できるのではないかと考えられる。

イエネコや野生ネコ科動物を含む多くの動物に対して発情誘起を行うためには、一般的にウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) が使用されている [23, 78, 102, 167]。eCG は、卵胞刺激ホルモン (FSH) 様の作用をもち、投与後に卵胞の発育を誘起することで、エストロジェンが分泌され発情徴候が現れるようになる。また排卵誘起を行うためには、一般的にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) が使用されている。hCG は、黄体形成ホルモン (LH) と同様の作用を持っており、投与後に排卵を誘起できる [25, 120]。しかし、イエネコや野生ネコ科動物を含む多くの動物で、各ホルモン剤の投与量、投与時期などが異なっている [102]。アムールヤマネコにおいて、現在までにこれらのホルモン剤の投与により、発情および排卵誘起を検討した報告はない。そのため、これらの2種類のホルモン剤の組み合わせによって、発情誘起および排卵誘起処置が可能であるかどうかを確認する必要があると考えられた。

また人工授精を実施する時期として、非繁殖季節に行うことを設定した。この理由として、アムールヤマネコの個体数を増加させることを目的としているため、季節外

に誘起した発情にて人工授精後に受胎できることが明らかになれば、季節を問わず繁殖を行うことが可能になることが期待されることが挙げられる。例えば、1～4月の繁殖季節に繁殖を行った後、その年の非繁殖季節に人工授精を行うことが可能となれば、本来1年に1回しか繁殖を行うことができないが、ホルモン投与により2回行うことも可能になると考えられる。また、第2章の結果から、アムールヤマネコの精液性状には季節性があり、精液性状は繁殖季節前から繁殖季節にかけての時期が最も良くなることを明らかにした。そのため、人工授精は非繁殖季節の中でも繁殖季節前の時期が最も適切な時期ではないかと考えた。

これらの背景から本章では、実験1として非繁殖季節の雌アムールヤマネコにeCG製剤を投与して発情を誘起できるかどうかの検討を行い、その後、実験2としてeCG投与後にhCG製剤を投与して発情誘起後に排卵を誘起できるかどうかの検討を行った。

実験材料および方法

1. 供試動物

供試動物は、東京都井の頭自然文化園で飼育されている、2005年4月28日生まれの同腹子である雌アムールヤマネコ2頭である（個体番号No. 33および34）。実験時の年齢はともに7歳齢であった。この2頭は、いずれも交配および出産経験がないため、交尾能および受胎能は確認されていない個体であった。また、これまでに性ホルモン剤の投与歴もない個体であった。2頭ともに実験期間中の健康状態に問題はみられず、それぞれの個体は個別に飼育され、季節差なく馬肉、鶏肉および鶏頭が給餌されていた。

2. 使用薬剤

使用したホルモン製剤として、eCG（動物用セロトロピン、あすかアニマルヘルス株式会社）およびhCG（動物用ゴナドロピン1000、あすかアニマルヘルス株式会社）を

付属の溶解液 (0.6%塩化ナトリウム溶液) で溶解して使用した。

3. 実験方法

実験は2つに分けて行った。すなわち、実験1としてeCG投与で発情を誘起できるかどうかの検討を行い、実験2としてeCG投与により発情誘起した後、hCGを投与して排卵を誘起できるかどうかの検討を行った。

実験1におけるホルモン投与は、2012年12月9日に行った。この時、環境の違いがホルモン剤の反応に影響を及ぼすかどうかを合わせて観察するため、No.33は井の頭自然文化園内の動物病院に入院させることにより同種他個体と隔離させた状況で、No.34は通常通りの生活環境、すなわち雄アムールヤマネコの隣のケージ内にて、用手保定下でeCG 200単位を1回筋肉内投与した。

発情徴候は、日中、動画撮影による行動観察によってモニタリングが行われ、ホルモン剤投与後に発情を思わせるような行動について記録された。また発情誘起(卵胞発育)の状況を確認するために、基本的に1日1回の頻度で各個体の寝室から糞を採取し、糞中のエストラジオール-17 β (E2) およびプロジェステロン (P4) の代謝産物の測定を行い、糞中E2値の上昇がみられた場合には卵胞の発育があったと判断し、糞中P4値の上昇がみられなかった場合には排卵は起こらなかったと判断した。

実験2のホルモン投与の開始は、実験1の約4ヶ月後の2013年3月30日に行った。各個体は実験1と同様の環境において、用手保定下で再びeCGを300単位、1回筋肉内投与した。その後、No.33は実験1の結果から得られたタイミングによりhCGを200単位、1回筋肉内投与した。またNo.34は同日に雄アムールヤマネコと同居させ、自然交配が可能であるかどうかについて検討した。ただし、交配が成立しない時には、翌日にhCG 200単位を1回筋肉内投与した。

実験1と同様に、発情徴候の観察は、日中、動画撮影によるモニタリングによって行い、ホルモン剤投与後に発情を思わせるような行動のみ記録した。また卵胞発育および排卵の状況を確認するために、基本的に1日1回の頻度で各個体の寝室から糞を

採取し、実験1と同様に糞中 E2 および P4 の代謝産物の測定を行った。すなわち、糞中 E2 値の上昇がみられた場合には卵胞の発育があったと判断し、hCG 投与後に糞中 P4 値の上昇がみられた場合には排卵が起こった（誘起された）と判断した。

4. 糞中ホルモンの測定方法

採取した糞はすべて岐阜大学 動物繁殖学教室に送付し、楠田 哲士先生の協力の下、以前にツシマヤマネコの糞中ホルモンを測定した方法 [2] と同様の方法である酵素免疫測定法によって測定を行った。

結果

実験1における eCG 投与前後の糞中 E2 および P4 値の推移を、図1に示した。

すなわち eCG 投与後、2頭ともに顕著な発情徴候（発情と思わせるような行動の変化）は観察されなかったが、eCG 投与後5日目から糞中 E2 値の上昇が確認でき、投与後7～9日目にはピーク値が認められた。また、糞中 P4 値は2頭ともに上昇はみられなかった。

実験2における eCG および hCG 投与前後の糞中 E2 および P4 値の推移を、図2に示した。なお実験1の結果から、糞中へのステロイドホルモンの代謝日数を考慮し [2]、eCG 投与後5日目に血中 E2 値のピークがあると推定し、eCG 投与後5日目に hCG の投与を行った。

その結果、No. 33 では eCG 投与後に顕著な発情徴候（発情と思わせるような行動の変化）は観察されなかったが、hCG 投与後3日目から糞中 P4 値の上昇がみられたため、排卵が誘起されたことが明らかとなった。また糞中 P4 値は、eCG 投与後2～4週でピーク値に達し、それから低下し始め55日前後に基底値に達した。一方、No. 34においては、糞中 E2 値が eCG 投与前から上昇し始めており、自然な発情時期、すなわち卵巣に卵胞がある時期にホルモン投与を行ってしまったと判断された。なお、eCG 投

与後でも発情と思わせるような行動の変化は観察されなかった。eCG 投与後 5 日目に雄アムールヤマネコと同居させても交尾が成立しなかったため、翌日に hCG 投与を行ったが、hCG 投与前から糞中 P4 値が上昇していた。その後、糞中 P4 値は eCG 投与後 3 週前後でピーク値に達し、それから低下し始め 45 日前後に基底値に達した。

考 察

人が容易に近寄ることができない野生動物では、無麻酔の状態で採血することは困難である。したがって、採血を行うためには全身麻酔または軽い鎮静を必要とするため、頻繁に採血を行うことは困難である。最近では、ハズバンドリートレーニングを行い、採血などを無麻酔で行えるような報告 [114] もあるが、ハズバンドリートレーニングを行っていたとしても採血を頻繁に行うことは、動物に大きなストレスを与えることになると考えられる。そのため、野生動物におけるホルモン投与後の卵巣の反応の評価は、一般的に糞または尿を用いたステロイドホルモンの測定により行われている [153]。卵胞上皮細胞から分泌されたエストロゲンや黄体細胞から分泌されたプロジェステロンは、血中に分泌された後に肝臓や腎臓で代謝され、代謝産物が胆汁とともに糞中に 95%排泄されることが知られている [22, 153]。すなわち、糞中に含まれるホルモンの代謝産物を測定することによって、非侵襲的に血液中のホルモン動態を観察できることが明らかになっている [2, 19, 24, 41, 152, 154]。ただし、血中のホルモンが代謝されて糞中に出現するまでには、約 2 日の遅れが生じると推定されている [22]。しかしこの点に関して、Brown ら [20] は、異種どうしのみならず、近縁種内であっても、季節、環境により卵巣周期、排卵メカニズム、排卵誘起方法への反応に大きな差を生じ、同種内でもホルモンの種により、代謝と排泄経路に大きな違いが存在すると述べている。Adachi ら [2] は、アムールヤマネコの近縁種であるツシマヤマネコにおける糞中ステロイドホルモンの代謝産物の測定を行い、これらのホルモンの動態が血中ホルモンと連動していることを報告した。また同様に Brown ら [22]

は、ベンガルヤマネコ (*Prionailurus bengalensis*) (論文では Leopard cat (*Felis bengalensis*)) において、糞中性ホルモン測定による卵巢動態のモニタリングの有用性を報告している。アムールヤマネコにおいても同様に測定可能であると考えられたことから、今回の実験におけるホルモン投与後の反応性を糞中ホルモンから推定した。

非繁殖季節の雌アムールヤマネコへのホルモン剤投与によって発情および排卵誘起が可能であるかの検討は、これまで報告がなかった。Howard ら [82] は、卵巢のホルモン剤に対する反応は種特異性が著しく、個体間でも差があると報告している。そのため、アムールヤマネコの最適なホルモン剤の投与量および時期を決定するために、イエネコや様々なネコ科動物種で行われている研究報告 [78, 102] を参考にしつつ、今回は2段階に分けて検討を行った。

まず発情誘起に関して、eCG の有効投与量は体重 2~4kg のイエネコでも、体重 35kg 前後のチーターでも投与量は 100~200 単位であり、この投与量で十分な卵胞の発育が認められることが報告されていた [102, 125]。したがって、eCG の有効投与量は体重によって変わらずに作用すると考え、実験 1 では eCG 200 単位の投与を行った。その結果、糞中 E2 値は eCG 投与後に上昇したため、卵胞発育が誘起できていることが明らかとなったが、発情を思わせるような行動の変化はみられなかった。そのため、この投与量では十分に作用しなかったために発情を思わせるような行動の変化が現れなかったという可能性を考え、実験 2 では eCG の投与量を 300 単位に増量したが、実験 1 と同様に顕著な変化は認められなかった。また、アムールヤマネコは警戒心の強い野生動物であるため、ホルモン投与後に 2 頭を異なる環境、すなわち 1 頭は動物病院の入院室に、もう 1 頭は通常通りの、雄アムールヤマネコが隣にいる檻の中で生活させたが、結果はどちらもほぼ同様であった。これらの結果から、アムールヤマネコでは卵胞の発育を発情行動から見極めることは困難であるが、糞中 E2 値が上昇していることから eCG 200 単位の投与量で十分に卵胞の発育が行えることが明らかとなった。

実験 1 における糞中 E2 値は、eCG 投与後 7~9 日目にそのピークがみられた。したがって、糞中へ排泄されるまでの代謝日数を考慮すると、血中 E2 値のピークは 5~7

日目にあると推測した。この結果から、実験2におけるhCGの投与時期をeCG投与後5日目に行うことに決定した。また、hCGの投与量に関して、イエネコでは100単位前後で排卵を誘起できることが報告されていた[1]が、確実に排卵させるために、少し増量して200単位に設定した。その結果、No.33では排卵誘起は成功した。またhCG投与後3日目から糞中P4値が上昇し始めていることから、糞中へ排泄されるまでの代謝日数を考慮して、血中P4値はhCG投与後24～48時間で上昇し始め、この間で排卵が起こっていることが推測された。ネコ科動物のhCG投与後から排卵までの時間は動物種によって異なる。イエネコおよびジャガーネコではhCG投与後25～30時間、オセロットではhCG投与後30～36時間であることが報告されている[78]。今回の結果から、アムールヤマネコでもおそらく、これらの動物とほぼ同様のhCG投与後30時間前後で排卵が起こっていると推察された。

また今回、No.34では、eCG投与前に糞中E2値が上昇しており、発情しているにもかかわらずeCGを投与してしまったことが明らかとなった。実験を行う前に発情徴候の有無を確認しており、すでに発情は終了しているものと考えて実験を行ったはずであった。このことから、アムールヤマネコの行動からは発情の判断が困難であることが明らかとなった。今回、eCG投与後5日目に雄アムールヤマネコとの同居を試みたが交尾は成立しなかった。これは、同居させた時期が卵胞の発育がみられた時期とは少しずれていたためであったことが考えられた。さらにhCG投与前に糞中P4値の上昇がすでにみられており、hCG投与とは関係なく排卵が起こっていた。最近のイエネコでは自然排卵するものがあると報告されているが[68]、No.34に関しては自然な発情中に投与したeCGの影響(eCGはFSH作用の他に、弱いLH作用も持つ)であると考えられた。今回は失敗してしまったが、eCG投与後に卵胞が十分に発育した状況において、雄アムールヤマネコと同居させて交尾が成立すれば人工授精のような処置は必要なくなるため、今後、この点については詳細に検討する価値があると考えられた。

以上の結果から、非繁殖季節のアムールヤマネコにeCG200単位を投与することで十分な卵胞の発育が起こり、その5日後にhCG200単位を投与することで排卵を誘起

できることが明らかとなった。また排卵時期は、hCG 投与後 24～48 時間であることが推定された。

小 括

非繁殖季節の雌アムールヤマネコ 2 頭を用いて、eCG 製剤投与後に発情を誘起できるかどうかの検討を行い、その後、eCG 投与後に hCG 製剤を投与して排卵を誘起できるかどうかの検討を行った。卵胞発育および排卵の状況を確認するために、糞中のエストラジオール-17 β (E2) およびプロジェステロン (P4) の代謝産物の測定を行った。

その結果、eCG 投与後 5 日目から糞中 E2 値の上昇が確認でき卵胞の発育が確認された。ピークは、投与後 7~9 日目に認められた。糞中 P4 値は上昇しなかったため、自然排卵はなかったと判断された。この結果から、血中 E2 値のピークがあると推定された eCG 投与後 5 日目に hCG 200 単位の投与を行った。その結果、1 頭では hCG 投与後 3 日目から糞中 P4 値の上昇がみられたため、排卵が誘起されたことが明らかとなった。しかしもう 1 頭では、糞中 E2 値が eCG 投与前から上昇し始めており、自然な発情時期に実験を行ってしまったため確認ができなかった。

以上のことから、非繁殖季節のアムールヤマネコに eCG 200 単位を 1 回投与することで十分な卵胞の発育が起こり、その 5 日後に hCG 200 単位を投与することで排卵を誘起できることが明らかとなった。また排卵は、糞中 P4 値の上昇状況から、hCG 投与後 24~48 時間で起こっていることが推定された。

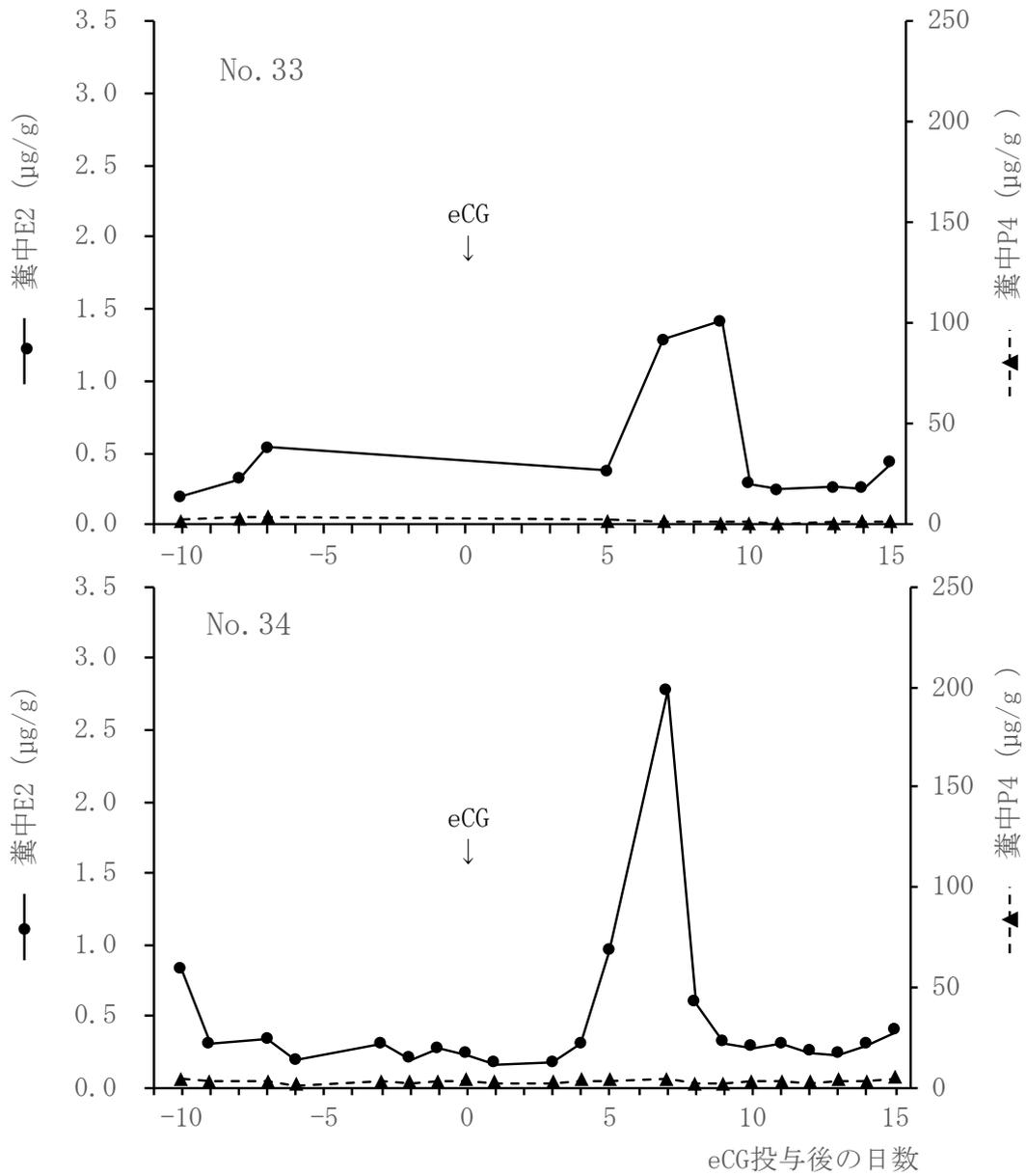


図1. 雌アムールヤマネコ2頭のeCG投与前後(投与日=0)の糞中E2および糞中P4の値の推移(実験1)

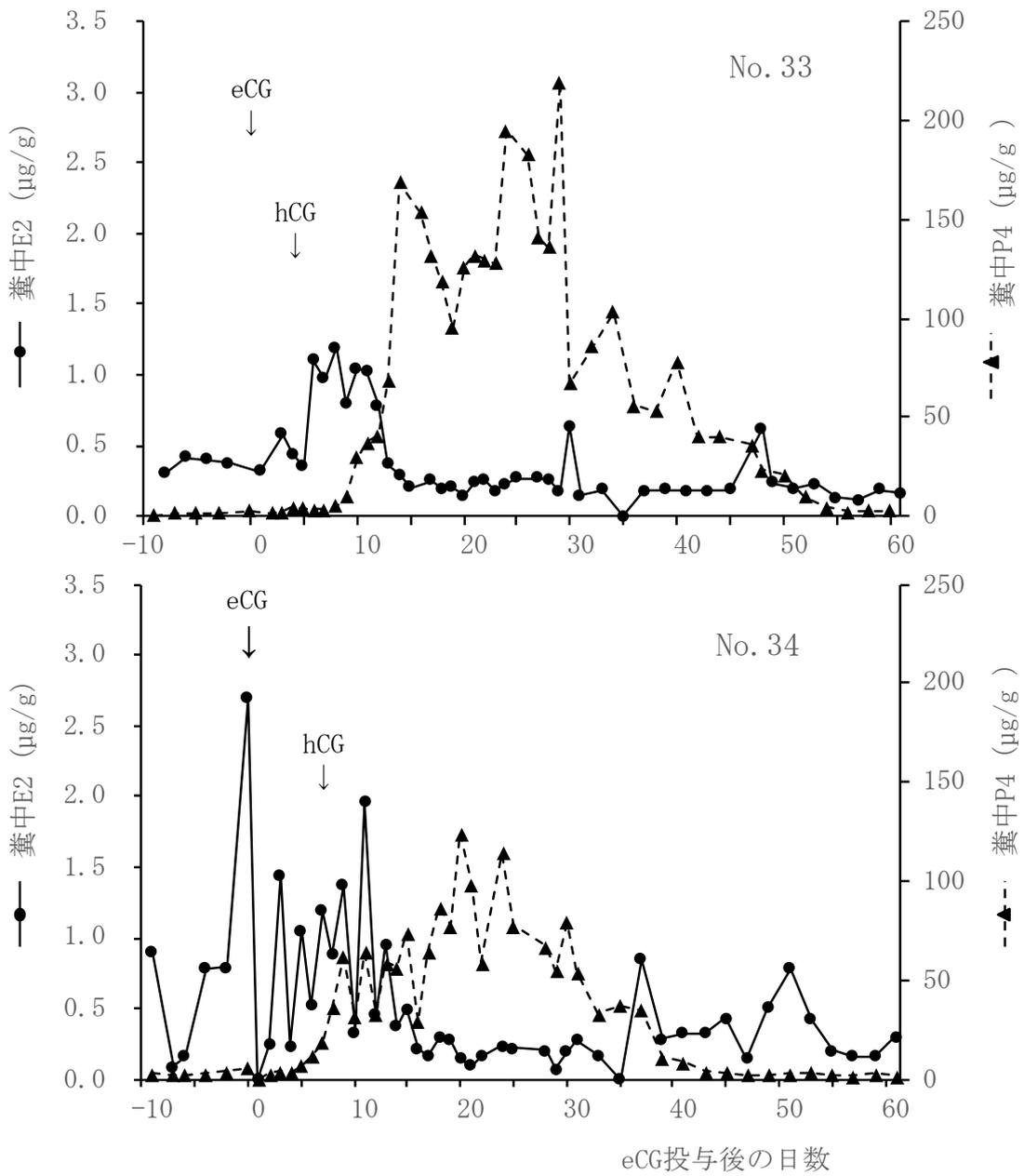


図2. 雌アムールヤマネコ2頭のeCG投与前後(投与日=0)の糞中E2および糞中P4の値の推移(実験2)

第7章

アムールヤマネコにおける新鮮精液を用いた 子宮内人工授精の検討

緒 言

現在まで、イエネコの人工授精に関する研究は多数行われており、多くの報告で産子が得られている [9, 30, 104, 169, 180, 187, 189, 194, 204]。また野生ネコ科動物では、アジアゴールデンキャット [106]、トラ [29, 46, 91, 103]、チーター [80, 82]、ウンピョウ [79, 82]、ピューマ [13]、ユキヒョウ [147]、ジャガーネコ [21]、オセロット [103, 162, 165] およびマヌルネコ [162] で人工授精に関する研究が報告されており、その中のいくつかの報告では産子を得ることに成功している [46, 82, 103, 106, 162]。しかし、アムールヤマネコの人工授精に関する報告はまだない。

イエネコは、発情徴候が非常にわかりやすい動物である。したがって、人工授精を行うためには、自然発情における発情徴候が強い時に hCG を投与して排卵を誘起し、それに併せて人工授精のタイミングを決定している。しかし、アムールヤマネコでは発情徴候がわかりにくいため、hCG を投与するタイミングを決定することが難しい。そこで非繁殖季節に eCG を用いて誘起した発情において人工授精を行う方が良いと考え、第 6 章にて人工授精を行うタイミングを決定するための予備的な実験を行った。その結果、非繁殖季節のアムールヤマネコに eCG 200 単位を投与することで十分な卵胞の発育が起こり、その 5 日後に hCG 200 単位を投与することで排卵を誘起できることが明らかとなり、糞中プロジェステロン (P4) の上昇値から糞中への代謝日数を考慮して [2]、hCG 投与後 24~48 時間の間に排卵が起こっていることが推定された。イエネコの人工授精では、排卵後よりも排卵前の方が人工授精のタイミングとしては最適であることが明らかとなっているため [169, 180, 188]、アムールヤマネコの人工授精のタイミングとしては、イエネコと同様の hCG 投与後 20 時間前後が良いと考えられた。

またイエネコにおける人工授精の方法として、膣内、子宮内および卵管内人工授精が知られている。イエネコの新鮮精液を用いた各人工授精において高い受胎率を得るために必要な精子数は、膣内では 8,000 万、子宮内では 800 万、卵管内では 200 万以

上であることが明らかとなっている [169, 180, 187, 188]。第2章、第3章において、アムールヤマネコの1回射出精子数は1,000万前後であることを明らかにした。アムールヤマネコの人工授精に必要な授精精子数は明らかにされていないが、高い受胎率を得るためにイエネコとほぼ同じ授精精子数が必要であると想定すると、膣内人工授精は行えないため、子宮内または卵管内人工授精が必要であると考えられた。しかし、卵管内人工授精は熟練した技術を必要とし、動物に与えるダメージがやや大きいこと、また精子の受精能獲得現象の問題から、受胎率が低いことが明らかとなっている [187]。そのため、アムールヤマネコ精子を用いた人工授精によって産子を得るためには、外科的な子宮内人工授精が最も適していると考えられた。

そこで本章では、第6章での結果を基本に eCG および hCG 投与によって卵胞発育と排卵を誘起した非繁殖季節の雌アムールヤマネコに子宮内人工授精を行い、産子が得られるかどうかについての検討を行った。

実験材料および方法

1. 供試動物

供試動物として、第6章と同様に2頭の雌アムールヤマネコ（個体番号 No. 33 と No. 34）を使用した。人工授精時の年齢はともに8歳齢であった。実験時の体重は No. 33 が 4.35kg、No. 34 が 4.2kg であった。

また人工授精に用いる精液は、雄アムールヤマネコ2頭（個体番号 No. 15 と No. 49）を用いた。No. 15 は2003年4月18日生まれで、人工授精時は10歳齢、体重 5.7 kg であった。No. 49 は2007年10月2日に静岡県日本平動物園で生まれた個体で、人工授精時は6歳齢、体重 5.0 kg であった。

これらのアムールヤマネコは、実験期間中健康的な問題はなく、井の頭自然文化園においてそれぞれ飼育され、餌として馬肉、鶏肉および鶏頭が与えられていた。

2. 卵胞発育および排卵誘起方法

雌アムールヤマネコの発情および排卵誘起処置は、第6章と同様の方法で行った。すなわち、雌アムールヤマネコを井の頭自然文化園内の動物病院に入院させ、最初にeCG（動物用セロトロピン、あすかアニマルヘルス株式会社）200単位を1回筋肉内投与して卵胞発育を誘起し、その5日後にhCG（動物用ゴナトロピン1000、あすかアニマルヘルス株式会社）200単位を1回筋肉内投与して排卵を誘起した。なおeCGの投与日は、No. 33は2013年11月7日、No. 34は2014年1月3日であった。

3. 全身麻酔方法

雄アムールヤマネコにおける経直腸電気刺激法による精液採取および雌アムールヤマネコにおける子宮内人工授精および妊娠診断を行うために、それぞれ全身麻酔処置を行った。

各アムールヤマネコは、誤嚥の影響を避けるため、全身麻酔を行う日の朝から絶水絶食を行った。

精液採取および人工授精では、スクイーズケージあるいは用手保定下で、塩酸メドトミジン（ドミツール、日本全薬工業株式会社）60 μ g/kg単独か、あるいは塩酸メドトミジンと塩酸ケタミン（動物用ケタラール50筋注用、三共エール薬品株式会社）1.8～2.0 mg/kgの混合液を筋肉内投与することで麻酔導入を行い、気管内挿管後にイソフルレン（エスカイン吸入麻酔液、マイラン製薬株式会社）の吸入麻酔を行って維持した。覚醒のために、塩酸アチパメゾール（アンチセダン、明治製菓株式会社）300 μ g/kgを筋肉内投与した。

妊娠診断に関しては、保定やスクイーズケージ内での注射によるストレスが妊娠に対して影響を与えることを考慮して、注射麻酔薬の投与は行わず、雌アムールヤマネコを麻酔箱に入れ、イソフルレンの強制吸入のみにより麻酔処置を行った。

4. 精液採取および精液検査方法

子宮内人工授精に用いる新鮮精液は、人工授精を行う 2 時間前に、雄アムールヤマネコから全身麻酔下における経直腸電気刺激法にて採取した。

精液採取および精液検査方法は、第 2 章と同様の方法で行った。なお、精液性状の検査に関して、採取された尖底管ごとに最初に精子活力検査を行い、ある程度の精液量が採取されたところで一旦精液採取を中断し、精子活力が著しく低いものを除く全ての尖底管内の精液を 1 つに合わせてから、精子活力、精子生存率、精子奇形率および総精子数の検査を行った。そして、採取合計精子数が 800 万以上に達した時点で、精液採取を終了した。

5. 外科的子宮内人工授精方法

子宮内人工授精は、第 6 章の結果から、hCG 投与後 20 時間に行うように計画した。

精液採取終了後、直ちに雌アムールヤマネコに麻酔導入を行った。この時、綿棒を用いて膣粘膜の細胞を採取した後、スライドグラスに塗抹して膣スミア標本を作製した。角化上皮細胞が多数を占める発情期の所見が得られることを確認した。この時、発情期の所見が得られなかった場合は、人工授精を中止することとした。

子宮内人工授精の方法は、筒井ら [188] によるイエネコの方法を参考にして行った。すなわち、まず腹部正中を常法により切開し、子宮を吊り出し鉗子を用いて腹腔外に露出させ、卵胞の発育あるいは排卵の有無を確認するために卵巢の観察を行った。そして、子宮角を 21G の注射針で穴をあけ、その穴から精液が含まれた 1ml シリンジを接続した 22G の留置針の外筒を付け、挿入し、精液をゆっくりと注入した。なお、精液は、1,500 回転、5 分間遠心分離を行い、上清を取り除いて液量を 50~150 μ l に調整した。注入した際の子宮の穴は 6-0 ポリソープ吸収糸（コヴィディエンジャパン株式会社）で縫合し、4-0 ポリソープ吸収糸を用いて埋没法にて常法通り閉腹した。

6. 血中および糞中ホルモン測定法

雌アムールヤマネコにおいて、妊娠診断時の血中プロゲステロン (P4) 値の測定

およびリラキシンによる妊娠診断テストを行うために、採血を行なった。血液は採血後、直ちに 3,600 回転、10 分間遠心して血清を分離した後、ホルモン測定まで -40°C で保存した。血清中 P4 値は、自動蛍光免疫測定装置 (SPOTCHEM VIDAS SV-5010, ARKRAY 株式会社) を用いて測定した。

また第 6 章と同様に、ホルモン投与前後の糞を採取し、eCG 投与 10 日前から、eCG 投与後 80 日まで、基本的に 1 日 1 回糞を採取し、糞中エストロジェン (E2) および P4 の代謝産物を、酵素免疫測定法を用いて測定した。

7. 妊娠診断法

人工授精後 30 日前後に、全身麻酔下での超音波画像診断装置 (HS-2100V、本多電子株式会社) を用いて胎嚢および胎子拍動の確認を行った。またそのときに採血を行い、犬用のリラキシン妊娠新診断キット (WITNESS® Relaxin, SYNBIOTICS CORPORATION, Kansas City, MO, USA) を用いて妊娠診断を行った。

8. 分娩の観察方法

妊娠が確認された場合、人工授精後 45 日前後から産室へ移動させた。分娩の状況は産室に設置したモニターによって経時的な観察を行った。

結 果

人工授精時に採取した膣スメア検査では、2 頭ともに角化上皮細胞が主体の所見がみられたため、卵胞発育が確認され、発情期であることが明らかとなった。また開腹手術による卵巣の肉眼的観察では、No. 33 は左卵巣に 5~6mm の卵胞が 3 個確認され (卵巣と子宮のダメージを最小限にするために、右卵巣は観察を行わなかった)、No. 34 は 4~5mm の卵胞が左卵巣に 3 個、右卵巣に 4~6 個観察され、2 頭ともに排卵前の所見であることが確認された (図 1)。

それぞれの子宮内人工授精に用いた精液性状を、表 1 に示した。すなわち、No. 33 の人工授精のために採取した No. 49 の精液性状は、総精子数 960 万、精子活力 70%、精子生存率 74.2% であった。一方、No. 34 の人工授精では最初に No. 49 から精液採取を行ったが、総精子数が 160 万しか採取できなかったため、直ちに No. 15 から精液採取を行った。その結果、総精子数 2,100 万、精子活力 40%、精子生存率 71.5%、精子総奇形率 3.2% の精液を採取することができたため、この精液を用いて人工授精を行った。

精液の注入は、No. 33 では左子宮角のみに全ての精液を、No. 34 では精液を 2 等分して、両子宮角内にそれぞれ注入した。精液は、No. 33 では 150 μ l に調整したところ、注入時に子宮角から少し精液が漏れ出てしまった。子宮内人工授精は、計画通り hCG 投与後 20 時間であった。また、麻酔導入から閉腹までの時間は 120 分であった。一方、No. 34 は 50 μ l に調整して左右の子宮角内に注入したところ全てもれずに注入できた。そのため、子宮内人工授精の時間は予定の時間より遅れて、hCG 投与後 22 時間であった。また、麻酔導入から閉腹までの時間は 145 分であった。No. 33、No. 34 とも手術後入院室にて維持したが、傷口をいじることなく、問題なく管理された。

妊娠診断は、No. 33 で人工授精後 30 日目に、No. 34 では人工授精後 28 日目にそれぞれ行った。この時の 2 頭の雌アムールヤマネコの乳頭は、ピンク色を呈し、やや腫大している所見（ピンキング）が観察された。No. 33 について超音波検査を行ったところ、直径 2 cm の胎囊と思われる所見が膀胱の両側に 2 つ観察されたが、形がややいびつで内部に胎子らしいエコー像は見えるものの胎子心拍は確認できなかった（図 2）。そのため、1 週間後にも同様の検査を行ったが、やはり同じように胎囊と思われる所見がみられたが、前回の所見と大きさに変化がみられなかった。そのため、着床したが早期胚死滅が起こったものと判断された。なお No. 33 は妊娠診断の数日前から、外陰部からうすい出血がみられていたことが観察されていた。一方、No. 34 における超音波検査所見では、直径 3cm の胎囊が左右子宮角にそれぞれ 1 つずつ、合計 2 つ確認され、ともに胎子心拍が確認された（図 2）。なお胎囊の形は両側とも異常なく円形の

ようにみられたが、右の胎胞の胎盤は内側にくびれがみられ、やや不整であった。妊娠診断時の血中P4値は、No. 33では人工授精後30日で50.35ng/ml、38日で9.42ng/ml、No. 34では人工授精後29日で80ng/ml以上と高値を示した。またリラキシンによる妊娠診断テストの結果は、No. 33は陰性、No. 34は陽性であった。

妊娠診断後、No. 34は大きな問題はみられず、人工授精後68日目に自然分娩が確認された。陣痛開始後97分で第1子は尾位で娩出されたが全く動かず、しばらくするとNo. 34に食べられてしまった。この胎子は死産であったと判断された。その13分後に第2子が頭位で無事に娩出され、母親は新生子をなめて世話をする様子が確認された。誕生したアムールヤマネコはその後問題なく成長し、性別は雄であることが確認された。

2頭の雌アムールヤマネコの糞中E2およびP4値の推移について、図3および図4にそれぞれ示した。すなわち、No. 33の糞中P₄値はhCG投与後45日前後で低値を示し、偽妊娠の動態を示した。一方、No. 34では分娩まで高値で維持をした。また、糞中E₂値はhCG投与40日頃から徐々に高値を示し、分娩後に低下がみられた。

考 察

アムールヤマネコは、第6章の結果から、発情期において糞中E2値が上昇しているにもかかわらず、イエネコにみられるような顕著な発情行動を示さないことが明らかとなった。したがって、自然な発情期において人工授精を行うタイミングを決めることはやや困難であると思われたため、人工授精を成功させるためにはホルモン剤の投与による誘起した発情が必要であると考えた。また人工授精を行う時期として、自然な繁殖季節には自然交配を行うことが優先であることと、自然な卵胞発育がある場合、外因性ホルモン剤の効果に差が生じることが想定されること、そして非繁殖季節においても人工授精後に産子を得ることができれば、アムールヤマネコだけでなく、同じような小型の野生ネコ科動物の人工繁殖技術における大きな進歩となることを理由と

して、非繁殖期を選択した。また非繁殖期の中でも夏の暑い時期はアムールヤマネコへの負担が大きいこと、第2章、第3章の結果からアムールヤマネコの精液性状は、繁殖季節前の時期が良好であったため、11月～1月が選択された。

今回のアムールヤマネコの人工授精の方法は、以前にイエネコで行われた外科的な子宮内授精方法を参考にして行った [188]。この報告では、授精のタイミングは排卵前が良いことが明らかとなっている。そのため、第6章の結果からアムールヤマネコの排卵時期もイエネコとほぼ同様であることが推定され、hCG投与後20～22時間の排卵前になるように人工授精を行った。その結果、受胎したためにこの人工授精のタイミングは問題ないことが明らかとなった。また、イエネコにおいてホルモン処置により誘起された発情では、麻酔剤の影響により排卵が抑制されることがあることが報告されている [78, 83]。しかし、今回の実験で行った全てのhCG投与後に糞中P4値が上昇していることから、麻酔処置による排卵の抑制はみられなかった。しかし、チーターにおける報告では、全身麻酔が生殖道内の精子の移送や排卵を抑制するために、排卵後に子宮内に精子を注入した方が排卵前よりも妊娠率が高かった [83] ことが報告されているため、今後、排卵前後でどちらがアムールヤマネコの子宮内人工授精において有効かどうかに関する、更なる検討が必要であると考えられた。

これまで、アムールヤマネコの子宮内人工授精に必要な注入精子数は明らかにされてないが、イエネコでは子宮内人工授精に800万の精子数を必要とすることが明らかとなっている [189] ため、これを参考にして800万以上の精子を注入することを決定した。その結果、妊娠が確認されたため、授精方法および授精精子数は適切であったことが明らかとなった。ただし、受精率を上昇させるためには、両側子宮内への精子注入が必要であるため、1,600万の授精精子が必要と考えられる。しかし、第2章で述べた通り経直腸電気刺激法によって採取できる射精精子の数はイエネコよりは少ないことが想定されるため、必要な授精精子数は少なくとも良いことが想定される。そのため今後、アムールヤマネコの人工授精に必要な精子数を明らかにすることを目的として、より少ない精子数での人工授精を検討する必要がある。

また、No. 33 では約 960 万の精子を片側の子宮角にのみ注入して 2 つの着床を確認し、No. 34 では約 1,000 万ずつの精子を左右両側の子宮角内に注入して 2 つの着床を確認した。アムールヤマネコの平均的な産子数から考えると、この着床数は少ないと思われた。このことに関して、卵胞が過剰に発育し、分泌されたエストロゲン過多によって子宮の自発運動抑制作用や着床性増殖が起こらなかったこと、ホルモン処置したイエネコで、全身麻酔によって生殖道内の精子の移送や排卵が抑制されたという報告 [78, 79] があり、同様の現象が起こったこと、今回の注射針で子宮に穴をあけているため、その周囲では着床しなかったこと、精子の活力が不十分で、排卵まで十分な活力を保つ精子が少なかったことなどが原因として考えられたが、今回の実験においてその原因を特定することはできなかった。

今回、hCG 投与後から排卵までの時間について、イエネコでは 25～30 時間であることが知られている [185]。第 6 章の結果から、hCG 投与後 72 時間頃から糞中 P4 値の上昇がみられており、代謝を考慮して hCG 投与後 20 時間での人工授精を計画して行ったが、開腹手術によって確認した卵巣所見においても、hCG 投与後 20～22 時間では排卵前であることが明らかにすることができた。またイエネコでは、eCG 投与によって 20 個以上の過排卵を誘起できることが知られている [192] が、今回の実験において eCG 投与後に誘起されたアムールヤマネコの卵胞数を観察したところ、No. 33 では左のみで 3 個、No. 34 は左右合わせて 7～9 個であった。一般にアムールヤマネコの平均的な産子数は 2～4 頭であると考えたと自然な成熟卵胞数よりは多いと思われたが、イエネコでみられるような 20 個以上の過排卵誘起はアムールヤマネコでは起こらないことが示唆された。

今回、人工授精を行う前に膣スミア検査を行ったところ、卵胞の発育が確認され、開腹手術による卵巣所見と同様の反応であったと考えられた。イエネコの膣スミアも、エストロジェンの影響を受けて、イヌと同様の変化をすることが知られている [120] ため、アムールヤマネコにおける卵胞発育の指標の 1 つとして用いたが、実際にホルモン処置に対して反応したことが明らかとなったため、膣スミア検査は有用な検査法

であったと推察される。

今回行ったような外科的な開腹手術による子宮内人工授精 [188] では、麻酔や手術による影響や、術創の感染や離開など、術後の管理上の問題が心配された。子宮内人工授精法としては、開腹手術よりは影響は少ない腹腔鏡を用いた方法も報告されている [46, 47, 79]。野生動物であるため、できるだけストレスを与えないためにも、このような方法を選択すべきであるが、今回用いた方法においても術後には術創の自傷行為などの問題は全く起こらなかったし、卵巣の観察による卵胞の発育状況の観察や、子宮の異常の有無の確認を確実に短時間で行えたこと、そして精液を確実に子宮に入れることができたことなどのメリットの方が大きかったと考えられた。また今回、精液を注入する時に子宮の観察を行ったところ、子宮はイエネコに比べると伸張性に乏しく、精液注入のために子宮を腹腔外に引き出すのがやや困難であることが明らかとなった。ただし、最近ではイエネコにおいて内視鏡を用いた経膣による非外科的な子宮内人工授精の報告も行われており [192]、この方法では全身麻酔が必要であるが、外科的な侵襲がないため、野生動物において適した方法であると考えられる。したがって、今後はこれら他の方法におけるアムールヤマネコの人工授精法についても検討していく必要がある。

妊娠診断法に関して、アムールヤマネコの産子数は2~4頭であるため、外観から妊娠を確認することは難しい。そのため、確実に妊娠診断する方法を検討する必要があった。妊娠診断の方法として、今回は母体にストレスおよび物理的圧迫がかからないように麻酔箱を用いたイソフルレン強制吸入による全身麻酔下による超音波検査を選択した。また妊娠診断時期としては、複数回の検査は難しいことから、着床後に妊娠が安定し確実に妊娠を確認することができると思われる人工授精後 30 日前後を選択した。その結果、No. 34 ではイエネコのものとほぼ同様な大きさの胎嚢と胎子心拍が確認でき、検査後に流産を起こすなどの影響も与えなかったため、診断方法および時期は問題なかったと考えられた。ただし、最近では野生動物においてもハズバンドリートレーニングを行うことで無麻酔でも簡単な保定を行うことは可能であると考えら

れる [114]。したがって、今後、無麻酔で妊娠診断を行うことについても検討が必要である。

今回、妊娠診断時に採取した血液を用いて行った血中リラキシン妊娠テストを、イエネコ [3] と同様に行うことが可能であることが明らかとなった。リラキシンの検出は、血液が採取できればアムールヤマネコにおいても有効な妊娠診断方法であると考えられる。なお No. 33 では1回目の妊娠診断の前日から外陰部からのうすい出血が見られていた。肉眼での観察では乳頭のピンキングが起こっており、超音波検査で胎嚢も認められたが、形がいびつで胎子心拍が確認できなかった。このとき採取した血液を用いたリラキシン妊娠診断テストは、陰性を示した。犬では、末梢血中リラキシンは妊娠 20 日で初めて検出され、35 日で最高に達することが知られており [186]、イエネコでは 25 日で初めて検出され、30~35 日で最高に達することが知られている [160]。このことから、アムールヤマネコにおいても 25 日前後で検出可能であると考えれば、超音波検査で見られた胎盤はすでに変性して機能的でなく、リラキシンの分泌がなかった可能性が考えられた。また最近では、野生ネコ科動物において尿中リラキシン [43, 69] または糞中 13, 14-dihydro-15-keto- prostaglandin F2 (PGFM) の測定 [45] などによる非侵襲的な妊娠診断方法も検討されている。もちろん、これらの方法では胎子の数や生死を確認することはできないが、野生動物にとって非侵襲的な妊娠診断方法の検討を行うことは必要である。

イエネコでは非繁殖季節にホルモン投与により誘起した発情で妊娠すると、下垂体や視床下部といった上位のホルモンが機能しないため血中 P4 値が妊娠期間を通して維持できず、排卵後 25~30 日で基底値に低下してしまい流産が起こる個体が存在することが知られている [192]。アムールヤマネコでも同様の現象が起こるかは明らかにされていないが、もしその現象が起こる場合は、妊娠を維持するため P4 製剤の補充が必要となる。今回の 2 頭のうち、1 頭 (No. 33) では、妊娠診断時の超音波検査所見から胚死滅が起こったものと推察された。この原因として血中 P4 値の低下が疑われたが、妊娠診断時の血中 P4 値は 9.42ng/ml と比較的高い値を示していた。また、妊娠

維持できた個体においても妊娠中の P4 値の低下は起こらなかったため、イエネコと同じ現象は起こらないことが示唆された。したがって、胚死滅の原因は血中 P4 値の低下以外の原因、例えば、術後の生活環境の変化によるストレスが疑われた。確かに、妊娠維持された No. 34 よりも、No. 33 の方がストレスを受けやすい性格であったが、今回の胚死滅の原因を特定することはできなかった。また、両者を比較すると、妊娠維持した No. 34 と胚死滅が起こった No. 33 では妊娠時期が異なっており、No. 34 の方が本来の繁殖季節に近かったことが妊娠維持をできた原因としても挙げられた。これを明らかにするために、今回流産が起こった 9～11 月頃の人工授精の例数を増やして確認する必要がある。

また今回、人工授精後 68 日目に 2 頭の胎子を分娩したが、1 頭は母親に食べられてしまった。モニター画面による観察であったため正確なことは不明だが、動くこともなく、おそらく死産であったものと推察された。しかし、胎子の大きさは 2 頭に大きな違いはないと思われたが、死亡した妊娠時期や原因を明らかにすることはできなかった。なお、この 1 頭は超音波検査による妊娠診断において、胎盤が内側にくびれ、不整であった右側子宮角に存在した胎胞から育ったものである可能性が考えられたが、その因果関係を明らかにすることはできなかった。

本実験成績において、非繁殖季節のアムールヤマネコにおける新鮮精液を用いた外科的な子宮内人工授精によって初めて産子を得ることができた。この時、アムールヤマネコの卵胞発育誘起のための eCG の投与量は 200 単位、その 5 日後の排卵誘起のための hCG の投与量は 200 単位、hCG 投与後 20～22 時間の人工授精で、授精精子数は 800 万で妊娠が成立したことが明らかとなった。繁殖季節を持つ野生動物では自然の状態では季節外には産子を得ることはできないため、今回のような人工繁殖技術を用いることができれば繁殖期以外でも産子を得られることが期待される。今後はこの技術を絶滅の危機に瀕した希少野生ネコ科動物であるツシマヤマネコに応用できるように、更に例数を重ねて不明な点を明らかにし、人工授精の技術を確立したいと考えている。

小 括

非繁殖季節の雌アムールヤマネコ 2 頭に eCG および hCG を投与して卵胞発育と排卵を誘起し、雄アムールヤマネコ 2 頭から採取した新鮮精液を用いて外科的子宮内人工授精を行い、産子が得られるかどうかについての検討を行った。

その結果、1 頭では hCG 投与後 20 時間に左子宮角のみ精液（精子活力 70%、精子生存率 74.2%、総精子数 960 万）を注入したところ、授精後 30 日目の超音波検査において直径 2cm の胎嚢が確認できたが胎子心拍は確認できなかったため、早期胚死滅が起こったものと判断された。もう 1 頭では、hCG 投与後 22 時間に左右の子宮角内に精液（精子活力 40%、精子生存率 71.5%、精子総奇形率 3.2%、精子数は左右の子宮角内にそれぞれ 1,000 万）を注入し、授精後 28 日目に超音波検査を行ったところ直径 3cm の胎嚢が左右子宮角にそれぞれ 1 つずつ、合計 2 つ確認され、ともに胎子心拍が確認された。そして授精後 68 日目に自然分娩が確認され、1 頭は死産であったが、もう 1 頭は問題なく成長した。

以上のことから、卵胞発育および排卵誘起を行った非繁殖季節のアムールヤマネコに新鮮精液による外科的子宮内人工授精で産子が得られることが明らかとなった。この時、授精精子数はイエネコの子宮内人工授精と同様の 800 万以上が必要であると考えられた。

表 1. 雄アムールヤマネコ 2 頭から経直腸電気刺激法によって採取した精液の性状

実施日	個体番号	精子活力 (%)	精子生存率 (%)	精子奇形率 (%)				総精子数 (×10 ⁶)
				頭部	中片部	尾部	合計	
13/11/13	No. 49	70	74.2	-※	-	-	-	9.6
	No. 49	40	-	-	-	-	-	1.6
14/01/09	No. 15	40	71.5	0.6	0.9	1.7	3.2	21.0

※ 測定せず

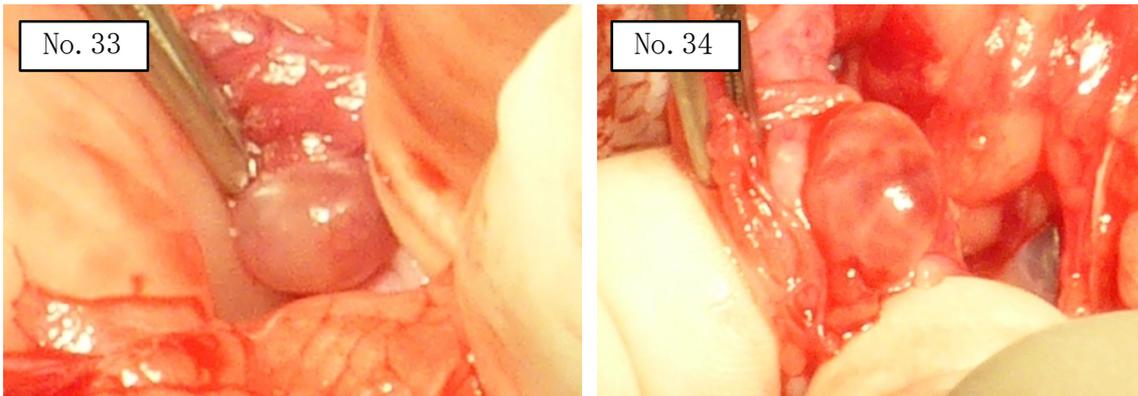


図1. 雌アムールヤマネコ2頭における子宮内人工授精時に観察した卵巣の所見

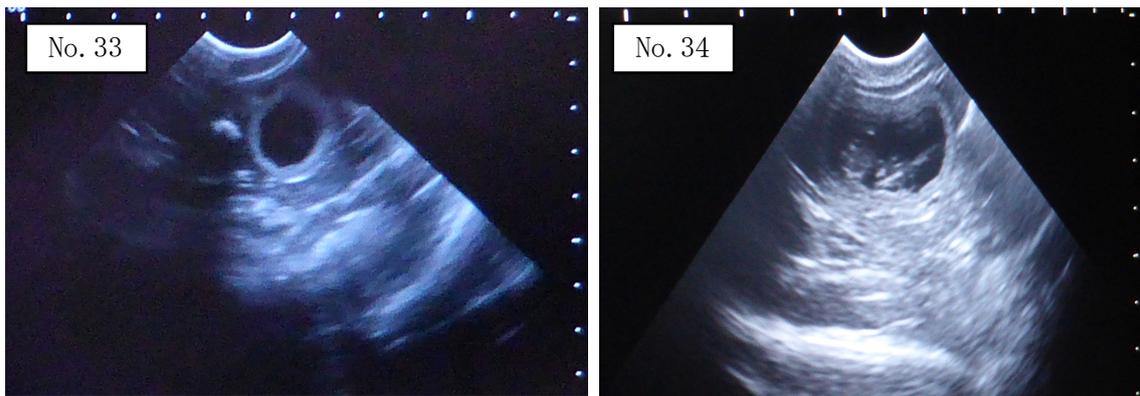


図2. 雌アムールヤマネコ2頭における妊娠診断のために行った超音波検査所見
(No. 33:人工授精後31日、No. 34:人工授精後28日)

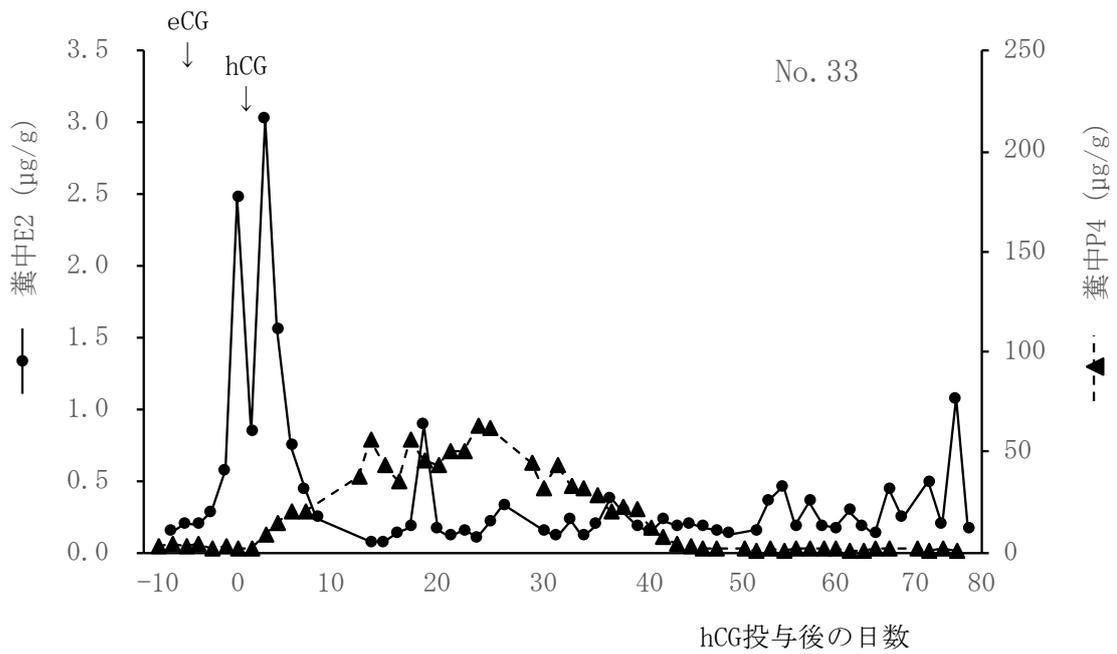


図3. アムールヤマネコ No. 33 における hCG 投与前後の
 囊中エストロゲンおよび囊中プロゲステロンの値の推移

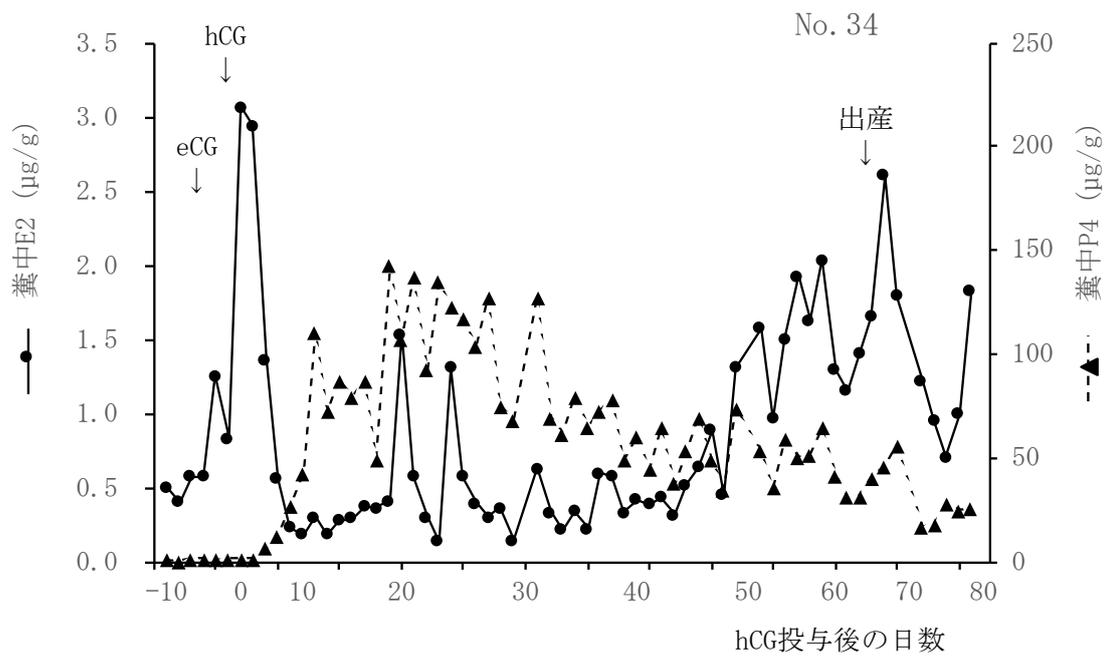


図4. アムールヤマネコ No. 34 における hCG 投与前後の
 囊中エストロゲンおよび囊中プロゲステロンの値の推移

第8章

結論および総括

日本固有の野生ネコ科動物であるツシマヤマネコとイリオモテヤマネコは、世界に生息する多くの野生ネコ科動物と同様に絶滅の危機に瀕している。このままでは両種とも絶滅してしまう恐れがあることが想定されるため、これらの種を保護、増殖させることは急務であると考えられている。これら野生動物種を保護するためには、生息地の域内保全とともに、生息域外保全において繁殖に様々な人工繁殖技術（ART）を導入することが必要であると考えられる。

しかし、これらの技術を確立させるためには、希少動物を多くの実験に使用することはできない。イエネコにおける ART の報告は参考になるが、動物種によって発情周期をはじめとする繁殖学的特徴、性質、生活環境および繁殖能力に大きな違いがあるため、イエネコの技術をそのまま絶滅の危機に瀕しているツシマヤマネコなどの野生ネコ科動物に応用することは困難と考えられる。

そこで今回、イエネコより近縁でツシマヤマネコと同じベンガルヤマネコの亜種であり、まだ絶滅の危機に瀕していないアムールヤマネコを用いて、様々な ART 技術の確立のための一連の研究を行った。

1. アムールヤマネコの経直腸電気刺激法による精液採取法の検討（第2章）

個体数を増加させることを目的とした人工授精を成功させるためには、まず雄動物から良好な精液性状を持った精液の採取方法の確立が必要である。

そこでこの章では、1頭の雄アムールヤマネコから約2ヶ月に1回の頻度で約4年間にわたり、野生ネコ科動物で一般的に行われている全身麻酔下での経直腸電気刺激法による精液採取を行い、電気刺激の条件を検討するとともに、採取できた精液性状、体重、精巣容積、血中テストステロン値から季節的および経年的変化の検討を行った。なお、季節的な変化はデータを精液採取時期によって3つのサブグループ、すなわち繁殖季節（1～4月）、繁殖季節後（5～8月）、繁殖季節前（9～12月）に分けて分析を行った。

その結果、体重は繁殖季節前が他の季節に比較して有意に高値を示した（ $p < 0.05$ ）

および $p < 0.01$)。精巢容積は左右で差がみられなかったため、左右精巢の平均容積として検討したところ、繁殖季節後が繁殖季節に比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。体重と左右精巢の平均容積の間には有意な関係はみられなかった。またすべての項目で、加齢による有意な変化はみられなかった。

各種条件で行った電気刺激によって採取された精液の性状は様々であったが、直腸プローブの種類、刺激の強さおよび刺激の回数の違いによる差はみられなかった。電極を直腸と平行に腹側に1本にした直腸プローブが、尿の混入を最小限にし、多くの精子を採取できることが明らかとなった。挿入部位は肛門から約 6.5 cm が最も適していた。

採取できた精子数は、採取時期によって大きな差がみられ、他の季節に比較して繁殖季節後で低値を示したが、各季節間で有意差はみられなかった。平均総精子数は約 1,500 万であった。精子活力および精子生存率は、繁殖季節後が他の季節に比較して低値を示したが、季節間で有意差はみられなかった。なお精子奇形率は、繁殖季節後が最も高値を示したが、他の季節との間に有意差はみられなかった。各精液性状において、加齢に伴う変化はみられなかった。

血中テストステロン値は、繁殖季節後に比較して繁殖季節前が有意に高値を示した ($p < 0.05$) が、加齢に伴う変化はみられなかった。

以上のことから、今回の条件で行った経直腸電気刺激法でアムールヤマネコの精液採取を良好に行うことができた。精液採取を行う時期は、夏を避け、秋から春にかけての季節が適していることが明らかになった。

2. アムールヤマネコの尿道カテーテル法による精液採取法の検討 (第3章)

経直腸電気刺激法に代わる方法として、近年、尿道カテーテル法が動物に与えるストレスが少なく、電気刺激装置などの特別な機器も必要としないことから新しい精液採取方法として注目されており、イエネコだけでなく多くの野生ネコ科動物において検討されている。

そこでこの章では、3頭の雄アムールヤマネコを用いて、経直腸電気刺激法の前に尿道カテーテル法による精液採取を各個体から2~3回実施し、採取された精液性状の結果からアムールヤマネコにおける尿道カテーテル法の有用性の検討を行い、同時に精液性状における個体差の影響について検討した。

その結果、採取直後の精子活力および精子生存率は、尿道カテーテル法に比較して経直腸電気刺激法が高値を示した。精子奇形率は、尿道カテーテル法に比較して経直腸電気刺激法がやや低値を示した。平均総精子数は、尿道カテーテル法に比較して経直腸電気刺激法がやや高値を示した。繁殖季節を基準に総精子数を分析したところ、繁殖季節後群よりも繁殖季節群で多くの精子が回収されていた。総精子数は個体差が大きかったが、その他の精液検査項目には個体差はみられなかった。

以上のことから、アムールヤマネコにおいて多くの精子を回収できる精液採取方法としては尿道カテーテル法よりも経直腸電気刺激法が優れていると考えられた。しかし、尿道カテーテル法でも多くの精子が採取できる個体もあったため、麻酔方法などの条件の改良を行うことで、尿道カテーテル法でもアムールヤマネコから安定して多くの精子が採取できるのではないかと考えられた。

3. アムールヤマネコ精液における低温保存および凍結保存の検討（第4章）

精液の保存は、多くの個体の遺伝子資源の保存を可能にする。また保存された精液を輸送することで、遠距離で飼育されている個体間の人工授精を可能にする。そのため、短期間の保存に適した低温保存および半永久的な保存が可能である凍結精液の技術の確立は必要とされる。

そこでこの章では、実験1として第2章で採取された精液のうち性状が良好であったものを用いて、イエネコの方法を参考にして凍結精液を作成し、融解後の精液性状からその有用性について検討を行った。また実験2として、1頭の雄アムールヤマネコから経直腸電気刺激法（電気刺激群）および尿道カテーテル法（カテーテル群）によって採取した3回の射出精液を用いて、低温保存を行い、その有用性について検討

を行った。

実験1の結果、凍結融解後の精子活力は平均 $27.0 \pm 5.6\%$ と高値であったが、精子奇形率も平均 $15.8 \pm 3.3\%$ とやや高値を示していた。精液採取日によって総精子数が異なったため凍結時の精子濃度はすべて異なっていたが、精子濃度と融解後の精液性状との間には有意な関係はみられなかった。また繁殖季節を基準にデータを分析したところ、凍結前および融解後の精子活力は繁殖季節群が他の群よりも高値を示し、繁殖季節後群では凍結前に比較して融解後の精子活力の低下が顕著であった。また凍結前の精子奇形率は、他の群に比較して繁殖季節後群がやや高値を示したが、融解後はその差が大きくなった。

実験2の結果、低温保存後の精子活力は、採取直後と保存1日後では電気刺激群とカテーテル群はほぼ同様であったが、保存2日後以降はカテーテル群に比較して電気刺激群が急激に低値を示し、両者の差は保存経過とともに大きくなった。精子生存率も同様に、保存2日後以降は電気刺激群の方がカテーテル群に比較して低値を示した。また精子奇形率は、保存2日後まで両群でほぼ同様であったが、保存3日後からカテーテル群が保存経過とともに高値を示し、差が大きくなった。また保存温度の検討において、 8°C 保存群は保存1日後に急激に精子活力が低下したが、 4°C 保存群では緩やかに低下した。精子生存率は、保存2日後以降で、 4°C 保存群よりも 8°C 保存群がやや低値を示して推移した。また精子奇形率は、保存5日後まで両群でほぼ同様に推移した。

以上のことから、アムールヤマネコの凍結精液は、イエネコと同様の方法で問題がないものと考えられた。また 4°C の低温保存においては、経直腸電気刺激法に比較して尿道カテーテル法で採取した精液の方が精子活力および精子生存率を数日間、良好に維持できることが明らかとなった。また保存温度は、 8°C よりも 4°C の方が適していることが示唆された。

4. アムールヤマネコの精巢上体尾部精子の回収および凍結保存の検討 (第5章)

ツシマヤマネコは年間に数頭が交通事故によって死亡している。そのため、不慮の事故で死亡した個体から精子を回収し、凍結保存する技術の確立は、遺伝子を有効に利用するために必要であると考えられる。

そこでこの章では、研究期間中に死亡した3頭の雄アムールヤマネコの精巣、精巣上体の大きさ、重量および切り刻み法によって精巣上体尾部から回収した精子の性状を5頭のイエネコの同様のデータと比較した。また精巣上体尾部精子については射出精液と同様の方法で凍結保存を行い、融解後の性状からその有用性について検討を行った。

その結果、アムールヤマネコとイエネコとも精巣および精巣上体の大きさおよび重量には各個体とも左右では差はみられなかったが、個体間でやや差がみられた。精巣上体頭部の厚さはアムールヤマネコの方が有意に低値を示した ($P < 0.01$) が、それ以外の項目には両種の間には有意差は認められなかった。

アムールヤマネコ3頭の死因と死亡から精子を回収するまでの時間は異なっていたが、回収直後の精巣上体尾部精子の性状は良好であった。また平均回収総精子数は、それぞれ約8,000万、約5,500万、約1億であり、これはイエネコよりもやや少なかったが、両者の間に有意な差はみられなかった。その他の性状についても両者でほぼ同様であった。アムールヤマネコ精巣上体尾部精子の凍結融解後の精液性状はいずれも良好であった。

以上のことから、アムールヤマネコの精巣上体尾部からイエネコとほぼ同様の十分な数の精子が回収できることが明らかとなった。精液採取では総精子数が少なかったが、精巣上体尾部にはさらに多くの精子が貯蔵されていることが明らかとなった。そのため、現在行っている精液採取方法を改良することでさらに多くの精子が回収できる可能性が示唆された。今回、精巣上体尾部精子の性状が良好であったのは、個体の死後すぐに5°Cに保管したためであると考えられた。したがって、ツシマヤマネコなどの希少野生動物が交通事故などで死亡した場合、すぐに精子を回収することができなければ、個体もしくは摘出した精巣、精巣上体を5°Cの低温下に維持することが必

要であると考えられた。

5. 非繁殖季節のアムールヤマネコの発情誘起および排卵誘起の検討 (第6章)

最適な時期に交配を行うことは繁殖を成功させるために重要であるが、飼育下におけるアムールヤマネコは顕著な発情兆候がないため、交配適期を見極めることが難しい。そのため、最適なタイミングを見極めて人工授精を成功させるためには、発情誘起および排卵誘起処置が必要であると考えた。

そこでこの章では、非繁殖季節の雌アムールヤマネコ2頭を用いて、eCG製剤投与後に発情を誘起できるかどうかの検討を行い、その後、eCG投与後にhCG製剤を投与して排卵を誘起できるかどうかの検討を行った。卵胞発育および排卵の状況を確認するために、糞中のエストラジオール-17 β (E2) およびプロジェステロン (P4) の代謝産物の測定を行った。

その結果、eCG 200単位投与後、顕著な発情による行動の変化は2頭ともに観察されなかったが、eCG投与後5日目から糞中E2値の上昇が確認でき卵胞の発育が確認された。ピークは、投与後7~9日目に認められた。糞中P4値は上昇しなかったため、自然排卵はなかったと判断された。この結果から、糞中へのステロイドホルモンの代謝日数を考慮し、血中E2値のピークがあると推定されたeCG投与後5日目にhCG 200単位の投与を行った。その結果、1頭ではhCG投与後3日目から糞中P4値の上昇がみられたため、排卵が誘起されたことが明らかとなった。しかしもう1頭では、糞中E2値がeCG投与前から上昇し始めており、自然な発情時期に実験を行ってしまったため確認ができなかった。

以上のことから、非繁殖季節のアムールヤマネコにeCG 200単位を1回投与することで十分な卵胞の発育が起こり、その5日後にhCG 200単位を投与することで排卵を誘起できることが明らかとなった。また排卵は、糞中P4値の上昇状況から、hCG投与後24~48時間で起こっていることが推定された。

6. アムールヤマネコにおける新鮮精液を用いた子宮内人工授精の検討（第7章）

第2章の研究で得られたアムールヤマネコの射出精液中の平均射精総精子数は、1,500万であった。イエネコにおいて人工授精に必要な授精精子数は腔内授精で8,000万、子宮内授精で800万であることが報告されていることから、高い受胎率を得るためには子宮内人工授精が必要と考えられた。

そこでこの章では、非繁殖季節の雌アムールヤマネコ2頭にeCGおよびhCGを投与して卵胞発育と排卵を誘起し、雄アムールヤマネコ2頭から採取した新鮮精液を用いて外科的子宫内人工授精を行い、産子が得られるかどうかについての検討を行った。

その結果、1頭ではhCG投与後20時間に左子宮角のみ精液（精子活力70%、精子生存率74.2%、総精子数960万）を注入したところ、授精後30日目の超音波検査において直径2cmの胎嚢が確認できたが胎子心拍は確認できなかったため、早期胚死滅が起こったものと判断された。もう1頭では、hCG投与後22時間に左右の子宮角内に精液（精子活力40%、精子生存率71.5%、精子総奇形率3.2%、精子数は左右の子宮角内にそれぞれ1,000万）を注入し、授精後28日目に超音波検査を行ったところ直径3cmの胎嚢が左右子宮角にそれぞれ1つずつ、合計2つ確認され、ともに胎子心拍が確認された。そして授精後68日目に自然分娩が確認され、1頭は死産であったが、もう1頭は問題なく成長した。

以上のことから、卵胞発育および排卵誘起を行った非繁殖季節のアムールヤマネコに新鮮精液による外科的子宫内人工授精で産子が得られることが明らかとなった。この時、授精精子数はイエネコの子宮内人工授精と同様の800万以上が必要であると考えられた。

以上のように、非繁殖季節の雌アムールヤマネコにeCGおよびhCG投与によって卵胞の発育および排卵を誘起することができ、雄アムールヤマネコから経直腸電気刺激法によって採取した精液を用いてhCG投与後20～22時間に外科的子宫内人工授精を行ったところ、2頭ともに妊娠が認められ、1頭は早期胚死滅が起こったが、もう1頭

は問題なく妊娠が維持され、正常な産子を得ることができた。また精液の凍結保存および低温保存においても、どちらも良好な性状で保存することができた。さらに動物の死後、摘出した精巣上部尾部から回収した精子の性状およびその精子の凍結融解後の性状についても良好であることが明らかとなった。今後、これらの精子を用いた子宮内人工授精についても検討し、それぞれ有用性についてもさらに検討したいと考えている。

これらの技術は、アムールヤマネコの繁殖に役立つだけでなく、絶滅の危機に瀕しているベンガルヤマネコ種をはじめとする小型の野生ネコ科動物の繁殖に役立ち、個体数を増加させる助けになるものと考えられる。

謝 辞

項を終わるにあたり、本研究に終始懇切なる御指導およびご鞭撻を頂いた日本獣医生命科学大学 獣医臨床繁殖学研究室 堀 達也教授に深甚の謝意を表します。

実験遂行上多大なご協力、御指導を頂いた日本獣医生命科学大学 獣医臨床繁殖学研究室 河上 栄一教授、小林 正典准教授に深謝いたします。また、本論文の御校閲と多くのご助言をいただきました日本獣医生命科学大学 野生動物研究室 羽山 伸一教授、獣医生理学研究室 鈴木 浩悦教授、比較動物医学研究室 横須賀 誠教授に深く感謝いたします。

また、研究当初から指導して頂いた一般社団法人日本小動物繁殖研究所 Bio Art 代表理事の筒井 敏彦 日本獣医生命科学大学 名誉教授、電気刺激装置および直腸プローブの改良、使用方法についてご指導をいただきました株式会社 ORM 代表取締役社長の織間 博光 日本獣医生命科学大学 名誉教授の両先生に深く感謝いたします。そして、多くの実験をサポートしてくださった日本獣医生命科学大学 獣医臨床繁殖学研究室 繁殖補助技術班の卒業生および現役学生の皆様に謝意を表します。

さらに、本研究を進めるにあたり研究環境を整えていただきました成島 悦雄、永井 清、日橋 一昭各氏に深謝の意を表します。また、本研究で使用したアムールヤマネコの飼育担当で、研究にご協力いただきました佐々木 真一、唐沢 瑞樹両氏に深謝の意を表します。そして、本研究にご協力いただきました公益財団法人東京動物園協会のスタッフに心より感謝申し上げます。

そして最後に、いつも心の支えとなり、御支援と温かい励ましをいただきました私の家族に心より感謝いたします。

参考文献

1. Ackermann, C. L. , Volpato, R. , Destro, F. C. , Trevisol, E. , Sousa, N. R. ,
Guitolini, C. R. , Derussi, A. A. , Rascado, T. S. , Lopes, M. D.
Ovarian activity reversibility after the use of deslorelin acetate as a
short-term contraceptive in domestic queens.
Theriogenology, 78:817–822, 2012.
2. Adachi, I. , Kusuda, S. , Nagao, E. , Taira, Y. , Asano, M. , Tsubota, T. , Doi, O.
Fecal steroid metabolites and reproductive monitoring in a female Tsushima
leopard cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*).
Theriogenology, 74:1499–1503, 2010.
3. Addiego, L. A. , Tsutsui, T. , Stewart, D. R. , Stabenfeldt, G. H.
Determination of the source of immunoreactive relaxin in the cat.
Biol. Reprod., 37:1165–1169, 1987.
4. Amann, R. P. , Almquist, J. O.
Reproductive capacity of dairy bulls. VI. Effect of unilateral vasectomy
and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal
physiology.
J. Reprod. Fertil., 3:260–268, 1962.
5. Amstislavsky, S. , Brusentsev, E. , Kizilova, E. , Mokrousova, V. ,
Kozhevnikova, V. , Abramova, T. , Rozhkova, I. , Naidenko, S.
Sperm cryopreservation in the Far-Eastern wildcat (*Prionailurus bengalensis*

euptilurus).

Reprod. Domest. Anim., 53:1219–1226, 2018.

6. Amstislavsky, S., Lindeberg, H., Luvoni, G.

Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora.

Reprod. Domest. Anim., 47:164–175, 2012.

7. Angrimani, D. S. R., Barros, P. M. H., Losano, J. D. A., Cortada, C. N. M.,

Bertolla, R. P., Guimarães, M. A. B. V., Correa, S. H. R., Barnabe, V. H., Nichi, M.

Effect of different semen extenders for the storage of chilled sperm in

Tigrina (Leopardus tigrinus).

Theriogenology, 89:146–154, 2017.

8. Araujo, G. R., Paula, T. A. R., Deco-Souza, T., Morato, R. G., Bergo, L. C. F.,

Silva, L. C. D., Costa, D. S., Braud, C.

Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars

(Panthera onca) by urethral catheterization after pharmacological

induction.

Anim. Reprod. Sci., 195:1-7, 2018.

9. Axnér, E.

Updates on reproductive physiology, genital diseases and artificial

insemination in the domestic cat.

Reprod. Domest. Anim., 43 Suppl 2:144–149, 2008.

10. Axnér, E., Hermansson, U., Linde-Forsberg, C.

The effect of Equex STM Paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa.

Anim. Reprod. Sci., 84:179–191, 2004.

11. Axné, E., Linde-Forsberg, C.

Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat.

International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA., 2002.

12. Bainbridge, D. R., Jabbour, H. N.

Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review.

Vet. Rec., 143:159–168, 1998.

13. Barone, M. A., Wildt, D. E., Byers, A. P., Roelke, M. E., Glass, C. M., Howard, J. G.

Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*).

J. Reprod. Fertil., 101:103–108, 1994.

14. Bedford, J. M.

Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit.

J. Exp. Zool., 163:319–330, 1966.

15. Bergfelt, D. R., Peter, A. T., Beg, M. A.

- Relaxin: a hormonal aid to diagnose pregnancy status in wild mammalian species.
Theriogenology, 82:1187–1198, 2014.
16. Blash, S, Melican, D, Gavin, W.
Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats.
Theriogenology, 54:899–905, 2000.
17. Blottner, S., Jewgenow, K.
Moderate seasonality in testis function of domestic cat reproduction.
Reprod. Domest. Anim., 42:536–540, 2007.
18. Bogliolo, L., Leoni, G., Ledda, S., Naitana, S., Zedda, M., Carluccio, A.,
Pau, S.
Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic
cats with frozen thawed epididymal spermatozoa.
Theriogenology, 56:955–967, 2001.
19. Brown, J. L.
Female reproductive cycles of wild female felids.
Anim. Reprod. Sci., 124:155–162, 2011.
20. Brown, J. L.
Comparative ovarian function and reproductive monitoring of endangered
mammals.
Theriogenology, 109:2–13, 2018.

21. Brown, J. L., Graham, L. H., Wielebnowski, N., Swanson, W. F., Wildt, D. E., Howard, J. G.
Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids.
J. Reprod. Fertil. Suppl., 57:71-82, 2001.
22. Brown, J. L., Wasser, S. K., Wildt, D. E., Graham, L. H.
Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces.
Biol. Reprod., 51:776-786, 1994.
23. Brown, J. L., Wildt, D. E., Graham, L. H., Byers, A. P., Collins, L., Barrett, S., Howard, J. G.
Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis.
Biol. Reprod., 53:93-102, 1995.
24. Brown, J. L., Wildt, D. E., Wielebnowski, N., Goodrowe, K. L., Graham, L. H., Wells, S., Howard, J. G.
Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids.
J. Reprod. Fertil., 106:337-346, 1996.
25. Brussow, K. P., Wahner, M.
Biological and technological background of estrus synchronization and

- fixed-time ovulation induction in the pig.
Biotechnol. Anim. Hus., 27:533-545, 2011.
26. Buranaamnuay, K.
Sperm-TALP: an alternative extender for retrieving and diluting epididymal sperm in the domestic cat.
Reprod. Domest. Anim., 48:912-917, 2013.
27. Buranaamnuay, K.
Determination of appropriate cryopreservation protocols for epididymal cat spermatozoa.
Reprod. Domest. Anim., 50:378-385, 2015.
28. Buranaamnuay, K.
Cryopreservation and storage of cat epididymal sperm using -75 °C freezer vs liquid nitrogen.
Anim. Reprod. Sci., 191:56-63, 2018.
29. Chagas e Silva, J.N., Leitão, R.M., Lapão, N.E., da Cunha, M.B., da Cunha, T.P., da Silva, J.P., Paisana, F.C.
Birth of Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*) cubs after transvaginal artificial insemination.
J. Zoo Wildl. Med., 31:566-569, 2000.
30. Chatdarong, K., Axné, E, Manee-In, S., Thuwanut, P., Linde-Forsberg, C.
Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination

- with fresh and frozen semen.
Theriogenology, 68:1326-1333, 2007.
31. Chatdarong, K., Thuwanut, P., Morrell, J.M.
Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm.
Theriogenology, 73:1284-1292, 2010.
32. Chatdarong, K., Thuwanut, P., Suksamai, P., Patanatiradaj, S., Sangwomrachasup, A.
Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides.
Reprod. Domest. Anim., 44 Suppl 2:377-380, 2009.
33. Chatiza, F.P., Pieterse, G.M., Bartels, P., Nedambale, T.L.
Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphology and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*): pre- and- post-cryopreservation in South Africa.
Anim. Reprod. Sci., 126:234-244, 2011.
34. Cocchia, N., Ciani, F., El-Rass, R., Russo, M., Borzacchiello, G., Esposito, V., Montagnaro, S., Avallone, L., Tortora, G., Lorzio, R.
Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction.
Zygote, 18:1-8, 2010.

35. Comizzoli, P., Crosier, A. E., Songsasen, N., Gunther, M. S., Howard, J. G., Wildt, D. E.
Advances in reproductive science for wild carnivore conservation
Reprod. Domest. Anim., 44 Suppl 2:47–52, 2009.
36. Comizzoli, P., Wildt, D. E.
On the horizon for fertility preservation in domestic and wild carnivores.
Reprod. Domest. Anim., 47 Suppl 6:261–265, 2012.
37. Comizzoli, P., Wildt, D. E., Pukazhenthil, B. S.
In vitro development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa.
Theriogenology, 66:1659–1663, 2006.
38. Conforti, V. A., Bateman, H. L., Schook, M. W., Newsom, J., Lyons, L. A., Grahn, R. A., Deddens, J. A., Swanson, W. F.
Laparoscopic oviductal artificial insemination improves pregnancy success in exogenous gonadotropin-treated domestic cats as a model for endangered felids.
Biol. Reprod., 89:1–9, 2013.
39. Crosier, A. E., Pukazhenthil, B. S., Henghali, J. N., Howard, J., Dickman, A. J., Marker, L., Wildt, D. E.
Cryopreservation of spermatozoa from wild-born Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*) and influence of glycerol on cryosurvival.
Cryobiology, 52:169–181, 2006.

40. Cunto, M., Küster, D. G., Bini, C., Cartolano, C., Pietra, M., Zambelli, D.
Influence of different protocols of urethral catheterization after
pharmacological induction (Ur.Ca.P.I.) on semen quality in the domestic
cat.
Reprod. Domest. Anim., 50:999–1002, 2015.
41. Czekala, N. M., Durrant, B. S., Callison, L., Williams, M., Millard, S.
Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in
the cheetah (*Acinonyx jubatus*) .
Zoo Biol., 13:119–128, 1994.
42. de Haas van Dorsser, F. J., Strick, J. A.
Semen characteristics and sperm morphology in the Arabian leopard (*Panthera
pardus nimr*) and how these vary with age and season.
Reprod. Fertil. Dev., 17:675–682, 2005.
43. de Haas van Dorsser, F. J., Swanson, W. F., Lasano, S., Steinetz, B. G.
Development, validation, and application of a urinary relaxin
radioimmunoassay for the diagnosis and monitoring of pregnancy in felids.
Biol. Reprod., 74:1090–1095, 2006.
44. De Mercado, E., Rodríguez, A., Gómez, E., Sanz, E.
Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different
freezing extenders based on post-thaw sperm quality.
Anim. Reprod. Sci., 118:54–61, 2010.

45. Dehnhard, M., Finkenwirth, C., Crosier, A., Penfold, L., Ringleb, J., Jewgenow, K.
Using PGFM (13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α) as a non-invasive pregnancy marker for felids.
Theriogenology, 77:1088-1099, 2012.
46. Donoghue, A. M., Byers, A. P., Johnston, L. A., Armstrong, D. L., Wildt, D. E.
Timing of ovulation after gonadotrophin induction and its importance to successful intrauterine insemination in the tiger (*Panthera tigris*).
J. Reprod. Fertil., 107:53-58, 1966.
47. Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Armstrong, D. L., Simmons, L. G., Wildt, D. E.
Birth of a Siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination.
J. Zoo Wildl. Med., 24:185-189, 1993.
48. Donoghue, A. M., Johnstone, L. A., Seal, U. S., Armstrong, D. L., Simmons, L. G., Gross, T., Tilson, R. L., Wildt, D. E.
Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs in vitro.
J. Reprod. Fertil. 96:555-564, 1992.
49. Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Seal, U. S., Armstrong, D. L., Tilson, R. L., Wolf, P., Petrini, K., Simmons, L. G., Gross, T., Wildt, D. E.
In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the

tiger (*Panthera tigris*).

Biol. Reprod., 43:733-744, 1990.

50. Dooley, M. P., Murase, K., Pineda, M. H.

An electroejaculator for the collection of semen from the domestic cat.

Theriogenology, 20:297-310, 1983.

51. Dooley, M. P., Pineda, M. H.

Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat.

Am. J. Vet. Res., 47:286-292, 1986.

52. Dooley, M. P., Pineda, M. H., Hopper, J. G., Hsu, W. H.

Retrograde flow of spermatozoa into urinary bladder of cat during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating.

Am. J. Vet. Res., 52:687-691, 1991.

53. Dresser, B. L., Gelwicks, E. J., Wachs, K. B., Keller, G. L.

First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring.

J. Exp. Zool., 246:180-186, 1988.

54. Farstad, W.

Assisted reproductive technology in canid species.

Theriogenology, 53:175-186, 2000.

55. Filliers, M., Rijsselaere, T., Bossaert, P., De Causmaecker, V., Dewulf, J., Pope, C. E., Van Soom, A.
Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 °C) on sperm quality.
Theriogenology, 70:1550-1559, 2008.
56. Filliers, M., Rijsselaere, T., Bossaert, P., Zambelli, D., Anastasi, P., Hoogewijs, M., Van Soom, A.
In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques.
Theriogenology, 74:31-39, 2010.
57. Fukui, D., Nagano, M., Nakamura, R., Bando, G., Nakata, S., Kosuge, M., Sakamoto, H., Matsui, M., Yanagawa, Y., Takahashi, Y.
The effects of frequent electroejaculation on the semen characteristics of a captive Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*).
J. Reprod. Dev., 59:491-495, 2013.
58. Furthner, E., Cordonnier, N., Le Dudal, M., Fontbonne, A., Freiche, V.
Is electroejaculation a safe procedure in cats? An endoscopic and histological prospective blinded study.
Theriogenology, 119:69-75, 2018 .
59. Gañán, N., Gomendio, M., Roldan, E. R. S.
Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 °C on

- sperm quality and cryopreservation.
Theriogenology, 72:1268-1277, 2009.
60. Gilmore, J. A. , McGann, L. E. , Ashworth, E. , Acker, J. P. , Raath, J. P. , Bush, M. , Criser, J. K.
Fundamental of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking.
Anim. Reprod. Sci., 53:277-297, 1998.
61. Goodrowe, K. L.
Feline reproduction and artificial breeding technologies.
Anim. Reprod. Sci., 28:389-397, 1992.
62. Goodrowe, K. L. , Hay, M.
Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa.
Theriogenology, 40:967-975, 1993.
63. Goodrowe, K. L. , Wall, R. J. , O'Brien, S. J. , Schmidt, P. M. , Wildt, D. E.
Developmental competence for domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro.
Biol. Reprod. , 39:355-372, 1988.
64. Graham, L. H. , Byers, A. P. , Armstrong, D. L. , Loskutoff, N. M. , Swanson, W. F. , Wildt, D. E. , Brown, J. L.

- Natural and gonadotropin-induced ovarian activity in tigers (*Panthera tigris*) assessed by fecal steroid analyses.
Gen. Comp. Endocrinol., 147:362-370, 2006.
65. Graham, L. H., Raeside, J. I., Goodrowe, K. L., Liptrap, R. M.
Measurements of faecal oestradiol and progesterone in non-pregnant and pregnant domestic and exotic cats.
J. Reprod. Fertil. Suppl., 47:119-120, 1993.
66. Graham, L. H., Swanson, W. F., Brown, J. L.
Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport.
Theriogenology, 54:1117-1131, 2000.
67. Graves-Herring, J. E., Wildt, D. E., Comizzoli, P.
Retention of structure and function of the cat germinal vesicle after air-drying and storage at suprazero temperature.
Biol. Reprod., 88:139-139, 2013.
68. Gudermuth, D. F., Newton, L., Daels, P., Concannon, P.
Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone.
J. Reprod. Fertil. Suppl., 51:177-184, 1997.
69. Harris, L. A., Steinetz, B. G., Bond, J. B., Lasano, S., Swanson, W. F.
Refinement of a commercial bench-top relaxin assay for pregnancy diagnosis

- using urine from domestic and nondomestic felids.
J. Zoo Wildl. Med., 39:170-179, 2008.
70. Harrop, A. E.
Artificial insemination of a bitch with preserved semen.
Br. Vet. J., 110:424-425, 1954.
71. Hay, M. A., Goodrowe, K. L.
Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from
epididymides and vasa differentia of the domestic cat.
J. Reprod. Fertil. Suppl., 47:297-305, 1993.
72. Hayama, S., Yamamoto, H., Nakanishi, S., Hiyama, T., Murayama, A., Mori, H.,
Sugitani, A., Fujiwara, S.
Risk analysis of feline immunodeficiency virus infection in Tsushima
leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) and domestic cats using
a geographic information system.
J. Vet. Med. Sci., 72:1113-1118, 2010.
73. 林 輝昭、吉柳 善弘
平成 25-26 年ツシマヤマネコの飼育下繁殖の取り組みについて
<https://www.env.go.jp/nature/yasei/tsusimayamaneko/index.html>
74. Herrick, J. R., Bond, J. B., Campbell, M., Levens, G., Moore, T., Benson, K.,
D'Agostino, J., West, G., Okeson, D. M., Coke, R., Portacio, S. C., Leiske, K.,
Kreider, C., Polumbo, P. J., Swanson, W. F.

- Fecal endocrine profiles and ejaculate traits in black-footed cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*).
Gen. Comp. Endocrinol., 165:204-214, 2010.
75. Hewitt, D. A., Leahy, R., Sheldon, I. M., England, G. C.
Cryopreservation of epididymal dog sperm.
Anim. Reprod. Sci., 67:101-111, 2001.
76. Hori, T., Hagiuda, K., Kawakami, E., Tsutsui, T.
Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs.
Theriogenology, 63:1573-1583, 2005.
77. Hori, T., Masuda, T., Kobayashi, M., Kawakami, E.
Role of prostatic fluid in cooled canine epididymal sperm.
J. Vet. Med. Sci., 74:1349-1353, 2012.
78. Howard, J. G., Barone, M. A., Donoghue, A. M., Wildt, D. E.
The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats.
J. Reprod. Fertil., 96:175-186, 1992.
79. Howard, J. G., Byers, A. P., Brown, J. L., Barrett, S. J., Evans, M. Z., Schwartz, R. J., Wildt, D. E.
Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*).

- Zoo Biol., 15:55-69, 1996.
80. Howard, J. G., Donoghue, A. M., Barone, M. A., Goodrowe, K. L., Blumer, E. S., Snodgrass, K., Stames, D., Tucker, M., Bush, M., Wildt, D. E.
Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx Jubatus*).
J. Zoo Wildl. Med., 23:288-300, 1992.
81. Howard, J. G., Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Wildt, D. E.
Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats.
Biol. Reprod., 49:131-139, 1993.
82. Howard, J. G., Roth, T. L., Byers, A. P., Swanson, W. F., Wildt, D. E.
Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard.
Biol. Reprod., 56:1059-1068, 1997.
83. Howard, J. G., Wildt, D. E.
Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids.
Theriogenology, 71:130-148, 2009.
84. IUCN
Red List of Threatened Species, 2009.
International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.
<http://www.iucnredlist.org>

85. IUCN

The IUCN Red List of Threatened Species TM 2017-1.

<https://www.iucnredlist.org/species/18146/50661611>

86. IUCN/SSC Cat Specialist Group

A revised taxonomy of the Felidae Cat News (Special Issue 11): 26-29.

ISSN 1027-2992, 2017.

87. Janetta, F., Thuna, R., Niedererb, K., Burgerb, D., Hassiga, M.

Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion.

Theriogenology, 60:453-461, 2003.

88. Jelinkova, K., Vitasek, R., Novotny, R., Bartoskova, A.

A comparison of quality parameters of fresh feline ejaculates collected by three different collection techniques.

Reprod. Domest. Anim., 53:1068-1074, 2018.

89. Jeong, D. H., Kim, J. H., Na, K. J.

Characterization and cryopreservation of Amur leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) semen collected by urethral catheterization.

Theriogenology, 119:91-95, 2018.

90. Jimenez, E., Perez-Mann, C. C., Vizquete, G., Millan, Y., Aguera, E. I.

Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation.

- Reprod. Domest. Anim., 48: 665-672, 2013.
91. Johnston, L. A., Armstrong, D. L., Simmons, L. G., Wildt, D. E.
Birth of a siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following
laparoscopic intrauterine artificial insemination.
Health (San Francisco), 1993
92. Johnstone, I. P.
Electro ejaculation in domestic cat.
Aust. Vet. J., 61:155-158, 1984.
93. Jones, E., Coman, B. J.
Ecology of the feral cat, *Felis catus*, in south-eastern Australia II.
Reprod. Aust. Wildl. Res., 9:111-119, 1982.
94. 環境省
”広報(公社)日本動物園水族館協会 ツシマヤマネコ保護増殖事業の認定について
資料 1 ツシマヤマネコ保護に関する取組の概要
<http://www.env.go.jp/press/files/jp/82211/25529.pdf>”
95. 環境省
第4次レッドリスト 別添資料5: 【哺乳類】環境省レッドリスト2017
<http://www.env.go.jp/press/files/jp/105449.pdf>
96. 環境省 対馬野生生物保護センター
ツシマヤマネコ生息状況等調査(第四次特別調査)の結果概要について

<http://www.kyushu.env.go.jp/twcc/spot/130927.html>.

97. Katanbafzadeh, H., Barati, F., Tabandeh, M.

Cryoprotectant-free freezing of the goat epididymal sperm.

Cryo Letters, 35:293-298, 2014.

98. Kawakami, E., Morita, Y., Hori, T., Tsutsui, T.

Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa.

J. Vet. Med. Sci., 64:543-549, 2002.

99. Kheirkhah, M. S., Mollapour sisakht, M., Mohammadsadegh, M., Moslemi, H. R.

Sperm evaluation of Jungle Cat (*Felis ciliaris*) obtained by urethral catheterization (CT) after medetomidine administration.

Theriogenology, 91:17-20, 2017.

100. 木下 武

全国5カ所のツシマヤマネコ 残された適齢期あとわずか 飼育繁殖4年間不発

毎日新聞、2013.5.17;25

101. Kirkpatrick, J. F.

Seasonal testosterone levels, testosterone clearance and testicular weights in male domestic cats.

Can. J. Zool., 63:1285-1287, 1985.

102. Kutzler, M. A.

- Estrus induction and synchronization in canids and felids.
Theriogenology, 68:354-374, 2007.
103. Lambo, C., Bateman, H. L., Swanson, W. F.
Application of laparoscopic oviductal artificial insemination for conservation management of Brazilian ocelots and Amur tigers.
Reprod. Fertil. Dev., 26:116, 2013.
104. Lambo, C. A., Grahn, R. A., Lyons, L. A., Bateman, H. L., Newsom, J., Swanson, W. F.
Comparative fertility of freshly collected vs frozen-thawed semen with laparoscopic oviductal artificial insemination in domestic cats.
Reprod. Domest. Anim., 47 suppl 6:284-288, 2012.
105. Lengwinat, T., Blottner, S.
In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved, epididymal spermatozoa.
Anim. Reprod. Sci., 35:291-301, 1994.
106. Lueders, I., Ludwig, C., Schroeder, M., Mueller, K., Zahmel, J., Dehnhard, M.
Successful nonsurgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic golden cat (*Catopuma temmincki*)
J. Zoo Wildl. Med., 45:372-379, 2014.
107. Lueders, I., Luther, I., Scheepers, G., van der Horst, G.
Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*).

- Theriogenology, 78:696-701, 2012.
108. Luno, V., Gil, L., Olaciregui, M., Jerez, R. A., de Blas, I., Hozbor, F.
Antioxidant effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) and mate tea (*Ilex paraguensis*) on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa.
Andrologia, 47:1004-1011, 2015.
109. Manee-In, S., Parmomsupomvichit, S., Kraiprayoon, S., Tharasanit, T., Chanapiwat, P., Kaeoket, K.
L-carnitine supplemented extender improves cryopreserved-thawed cat epididymal sperm motility.
Asian-Australas. J. Anim. Sci., 27:791-796, 2014.
110. Marks, S. L., Dupuis, J., Mickelsen, W. D., Memon, M. A., Platz, C. C. Jr.
Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 204:1639-1640, 1994.
111. Marrow, J. C., Woc-Colburn, M., Hayek, L. A., Marker, L., Murray, S.
Comparison of two α_2 -adrenergic agonists on urine contamination of semen collected by electroejaculation in captive and semi-free-ranging cheetah (*Acinonyx jubatus*).
J. Zoo Wildl. Med., 46:417-420, 2015.
112. Masuda, R., Yoshida, M. C.
Two Japanese wildcats, the Tsushima cat and the Iriomote cat, show the same

- mitochondrial DNA lineage as the leopard cat *Felis bengalensis*.
Zool. Sci., 12:655-659, 1995.
113. McLachlan, R. I.
The use of epididymal spermatozoa in assisted reproduction.
J. Reprod. Fertil., Suppl., 53:277-284, 1998.
114. Mellen, J., MacPhee, M.
飼育管理のための動物の学習とハズバンドダリートレーニング. Ins:動物園動物管理
理学(村田浩一, 楠田哲士監訳), 文英堂出版, pp. 371-390, 2014.
115. Monton, A., Gil, L., Malo, C., Olaciregui, M., Gonzalez, N., de Blas, I.
Sage (*Salvia officinalis*) and fennel (*Foeniculum vulgare*) improve
cryopreserved boar epididymal semen quality study.
Cryo letters, 36:83-90, 2015.
116. Nagai, T., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwazawa, M., Fukushima, M.,
Iwasaki, S., Hamada, A.
In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa.
J. Reprod. Fertil., 84:585-591, 1988.
117. 永尾英史、上谷英則、長野理史、河野美和
特集 ツシマヤマネコにおける域外保全の医学「ツシマヤマネコの飼育と繁殖」
JVM 獣医畜産新報, 65:193-198, 2012.
118. Neubauer, K., Jewgenow, K., Blottner, S., Wildt, D. E., Pukazhenth, B. S.

Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*).

Biol. Reprod., 71:1517-1524, 2004.

119. Niwa, K., Ohara, K., Hosoi, Y., Iritani, A.

Early events of in vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa.

J. Reprod. Fert. 74:657-660, 1985.

120. 小笠 晃, 金田義宏, 百目鬼郁男 (監修)

動物臨床繁殖学

朝倉書店, 2014

121. Okano, T., Murase, T., Asano, M., Tsubota, T.

Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa.

J. Vet. Med. Sci., 66:1359-1364, 2004.

122. 大林圭司

特集 ツシマヤマネコにおける域外保全の科学「ツシマヤマネコ保護対策の現状と今後の展開」

JVM 獣医畜産新報, 65:183-186, 2012.

123. Pablos, M. T., Saragusty, J., Santiago-Moreno, J., Stagegaard, J., Göritz, F.,

Hildebrandt, T. B., Hermes, R.

Cryopreservation of Onager (*Equus hemionus onager*) epididymal spermatozoa.

J. Zoo Wildl. Med., 46:517–525, 2015.

124. Papa, P. M., Papa, F. O., Oliveira, L. A., Guasti, P. N., Castilho, C., Giometti, I. C.

Different extenders in the cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa.

Anim. Reprod. Sci., 161:58–63, 2015

125. Pelican, K. M., Wildt, D. E., Pukazhenthil, B., Howard, J.

Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids.

Theriogenology, 66: 37–48, 2006.

126. Peña, A., Linde-Forsberg, C. B.

Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa.

Theriogenology, 54:703–718, 2000.

127. Pineda, M. H., Dooley, M. P.

Effect of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat.

Am. J. Vet. Res., 45:1520–1525, 1984.

128. Pineda, M. H., Dooley, M. P., Martin, P. A.

- Long term study on the effects of electroejaculation seminal characteristics of the domestic cat.
Am. J. Vet. Res., 45:1038-1040, 1984.
129. Pisu, M. C., Ponzio, P., Rovella, C., Baravalle, M., Veronesi, M. C.
Usefulness of an injectable anaesthetic protocol for semen collection through urethral catheterisation in domestic cats.
J. Feline Med. Surg., 19:1087-1090, 2017.
130. Platz, C. C. Jr., Seager, S. W.
Semen collection by electroejaculation in the domestic cat.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 173:1353-1355, 1978.
131. Ponglowhapan, S., Chatdarong, K.
Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa.
Theriogenology, 69:666-672, 2008.
132. Pope, C. E., Gomez, M. C., Dresser, B. L.
In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century.
Theriogenology, 66:59-71, 2006.
133. Pope, C. E., Keller, G. L., Dresser, B. L.
In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra-and interspecies embryo transfer.

- J. Reprod. Fertil. Suppl., 47:189-201, 1993.
134. Pope, C. E., McRae, M. A., Plair, B. L., Keller, G. L., Dresser, D. L.
Successful in vitro and in vivo development of in vitro fertilized two-to four-cell cat embryos following cryopreservation, culture and transfer.
Theriogenology, 42:513-525, 1994.
135. Pradiee, J., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., Santiago-Moreno, J.
Cryopreservation of epididymal sperm from ibexes (*Capra purenaica*) using short equilibration time with glycerol.
Theriogenology, 82:525-528, 2014.
136. Prochowska, S., Nizański, W.
In vitro fertilizing potential of urethral and epididymal spermatozoa collected from domestic cats (*Felis catus*).
Pol. J. Vet. Sci., 20:19-24, 2017.
137. Prochowska, S., Nizański, W., Ochota, M., Partyka, A.
Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats-A retrospective study of 214 cases.
Theriogenology, 84:1565-1571, 2015.
138. Prochowska, S., Nizański, W., Partyka, A.
Comparative analysis of in vitro characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (*Felis domesticus*).

- Theriogenology, 86:2063-2072, 2016.
139. Pukazhenth, B., Comizzoli, P., Travis, A. J., Wildt, D. E.
Applications of emerging technologies to the study and conservation of
threatened and endangered species.
Reprod. Fertil. Dev., 18:77-90, 2006.
140. Pukazhenth, B., Laroe, D., Crosier, A., Bush, L. M., Spindler, R.,
Pelican, K. M., Bush, M., Howard, J. G., Wildt, D. E.
Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*)
spermatozoa.
Theriogenology, 66:1790-1796, 2006.
141. Pukazhenth, B. S., Neubauer, K., Jewgenow, K., Howard, J., Wildt, D. E.
The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and
its wild relatives.
Theriogenology, 66:112-121, 2006.
142. Pukazhenth, B. S., Wildt, D. E., Howard, J. G.
The phenomenon and significance of teratospermia in felids.
J. Reprod. Fertil. Suppl., 57:423-433, 2001.
143. Rijsselaere, T., SoomVan, A.
Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat.
Laams. Diergeneeskundig. Tijdschrift., 79:467-470, 2010.

144. Ringleb, J., Waurich, R., Wibbelt, G., Streich, W. J., Jewgenow, K.
Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI.
Reprod. Fertil. Dev., 23: 818-825, 2011.
145. Romagnoli, N., Zambelli, D., Cunto, M., Lambertini, C., Ventrella, D., Baron Toaldo, M.
Non-invasive evaluation of the haemodynamic effects of high-dose medetomidine in healthy cats for semen collection.
J. Feline Med. Surg., 18:337-343, 2016.
146. Ros-Santaella, J. L., Dominguez-Rebolledo, A. E., Garde, J. J.
Sperm flagellum volume determines freezability in red deer spermatozoa.
PLoS One, 9:e1112382, 2014.
147. Roth, T. L., Armstrong, D. L., Barrie, M. T., Wildt, D. E.
Seasonal effects on ovarian responsiveness to exogenous gonadotrophins and successful artificial insemination in the snow leopard (*Panthera uncia*).
Reprod. Fertil. Dev., 9:285-295, 1997.
148. 佐野忠士
 $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬について考える
Small Anim. Clin., 165, 2011.
149. Santymire, R. M., Brown, J. L., Stewart, R. A., Santymire, R. C., Wildt, D. E.,

- Howard, J.
Reproductive gonadal steroidogenic activity in the fishing cat
(*Prionailurus viverrinus*) assessed by fecal steroid analyses.
Anim. Reprod. Sci., 128:60–72, 2011.
150. 佐々木真一
特集 ツシマヤマネコにおける域外保全の医学「アムールヤマネコの飼育と繁殖」
JVM 獣医畜産新報, 65:187–192, 2012.
151. Schön, J., Göritz, F., Streich, J., Blottner, S.
Histological organization of roe deer testis throughout the seasonal cycle:
variable and constant components of tubular and interstitial compartment.
Anat. Embryol., 208:151–159, 2004.
152. Schwarzenberger, F., Mostl, E., Palme, R., Bamberg, E.
Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status
in farm, wild and zoo animals.
Anim. Reprod. Sci., 42: 515–526, 1996.
153. Shille, V. M., Haggerty, M. A., Shackleton, C., Lasley, B. L.
Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic
cat (*Felis catus*).
Theriogenology, 34: 779–794, 1990.
154. 下川優紀、菅原愛、荒木仁美、佐々木真一、熊谷岳、楠田哲士、羽山伸一、小林
和夫

特集 ツシマヤマネコにおける域外保全の科学「ツシマヤマネコの繁殖に向けた動物園での性ホルモン測定の利用」

JVM 獣医畜産新報, 65:204-208, 2012.

155. Siemieniuch, M., Dubiel, A.

Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures.

Anim. Reprod. Sci., 99:135-144, 2007.

156. Siemieniuch, M. J., Woclawek-Potocka, I.

Assessment of selected quality parameters of epididymal cat sperm using flow cytometry method and computer assisted sperm analyser.

Reprod. Domest. Anim., 43: 633-637, 2008.

157. Souza, A. K., Trautwein, L. G. C., Paranzini, C. S., Perencin, F. M.,
Cardoso, G. S., Martins, M. I. M.

Influence of cooling temperature in sperm subpopulations of domestic cats.

Anim. Reprod. Sci., 189:1-10, 2018.

158. Stachecl, J. J., Ginsburg, K. A., Leach, R. E. Armant, D. R.

Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat.

J. Androl., 14:60-65, 1993.

159. Steinetz, B., Lasano, S., de Haas van Dorsser, F., Glickman, S., Bergfelt, D.,
Santymire, R., Songsassen, N., Swanson, W.

Relaxin concentrations in serum and urine of endangered and crazy mixed-up species.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 1160:179-185, 2009.

160. Stewart, D. R., Stabenfeldt, G. H.

Relaxin activity in the pregnant cat.

Biol. Reprod., 32:848-854, 1985.

161. Swanson, W. F.

Research in nondomestic species: experiences in reproductive physiology research for conservation of endangered felids.

ILAR. J., 44:307-316, 2003.

162. Swanson, W. F.

Laparoscopic oviductal embryo transfer and artificial insemination in felids—challenges, strategies and successes.

Reprod. Domest. Anim., 47 Suppl 6:136-140, 2012.

163. Swanson, W. F., Bateman, H. L., Vansandt, L. M.

Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids.

Reprod. Domest. Anim., 52:255-260, 2017.

164. Swanson, W. F., Brown, J. L.

International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American fads.

- Anim. Reprod. Sci., 82-83:21-34, 2004.
165. Swanson, W. F., Howard, J. G., Roth, T. L., Brown, J. L., Alvarado, T., Burton, M.
Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic
artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis
pardalis*).
J. Reprod. Fertil., 106:87-94, 1996.
166. Swanson, W. F., Magarey, G. M., Herrick, J. R.
Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of in situ-
ex situ populations.
Soc. Reprod. Fertil. Suppl., 65:417-32, 2007.
167. Swanson, W. F., Wolfe, B. A., Brown, J. L., Martin-Jimenez, T., Riviere, J. E.,
Roth, T. L., Wildt, D. E.
Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human
chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the
domestic cat.
Biol. Reprod., 57: 295-302, 1997.
168. Tanaka, A., Kuwabara, S., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M.,
Tsutsui, T.
Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats.
J. Vet. Med. Sci., 62:1157-1161, 2000.
169. Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Hori, T., Tsutsui, T.

- Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats.
J. Vet. Med. Sci., 62:1163–1167, 2000.
170. Tebet, J. M., Martins, M. I. M., Chininea, V. H., Souza, F. F., Campagnol, D.,
Lopes, M. D.
Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus
electroejaculated spermatozoa.
Theriogenology, 66:1629–1632, 2006.
171. Terrell, K. A., Wildt, D. E., Anthony, N. M., Bavister, B. D., Leibo, S. P.,
Penfold, L. M., Marker, L. L., Crosier, A. E.
Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat (*Felis catus*)
and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa.
Cryobiology, 64:110–117, 2012.
172. Thongphakdee, A., Numchaisrika, P., Omsongkram, S., Chatdarong, K.,
Kamolnorrath, S., Dummui, S., Techakumphu, M.
In vitro development of marbled cat embryos derived from interspecies
somatic cell nuclear transfer.
Reprod. Domest. Anim., 41:219–226, 2006.
173. Thuwanut, P., Chatdarong, K., Bergqvist, A. S., Söderquist, L., Thiangtum, K.,
Tongthainan, D., Axner, E.
The effects of antioxidants on semen traits and in vitro fertilizing ability
of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*).
Theriogenology. 76:115–125, 2011.

174. Thuwanut, P., Chatdarong, K., Techakumphu, M., Axnér, E.
The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and
DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa.
Theriogenology, 70:233-240, 2008.
175. Toyonaga, M., Kaihara, A., Tsutsui, T.
The quality of cryopreserved sperm collected from feline caudal
epididymides stored at room temperature.
J. Vet. Med. Sci., 73: 1395-1398, 2011.
176. Toyonaga, M., Sato, Y., Sasaki, A., Kaihara, A., Tsutsui, T.
Artificial insemination with cryopreserved sperm from feline epididymides
stored at 4 °C.
Theriogenology, 76: 532-537, 2011.
177. Toyonaga, M., Tsutsui, T.
The quality of cryopreserved sperm collected from feline caudal
epididymides using seminal plasma.
J. Vet. Med. Sci., 74:1349-1353, 2012.
178. 対馬野生生物保護センター パンフレット 国内希少野生動植物種ツシマヤマ
ネコ
<http://kyushu.env.go.jp/twcc/report/pam/leaflet/index.html>.
179. 筒井敏彦

犬の輸入凍結・低温精液による人工授精

日本獣医師会会報

180. Tsutsui, T.

Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*).

Theriogenology, 66:122-125, 2006.

181. Tsutsui, T., Hase, M., Hori, T., Ito, T., Kawakami, E.

Effects of Orvus ES paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing.

J. Vet. Med. Sci., 62:533-535, 2000.

182. Tsutsui, T., Hase, M., Hori, T., Komoriya, K., Shimizu, N., Nagakubo, K., Kawakami, E.

Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes.

J. Vet. Med. Sci., 62:537-538, 2000.

183. Tsutsui, T., Mizutani, T., Matsubara, Y., Toyonaga, M., Oba, H., Hori, T.

Surgical intrauterine insemination with cat semen cryopreserved with Orvus ES paste or sodium lauryl sulfate.

J. Vet. Med. Sci., 73:259-262, 2011.

184. Tsutsui, T., Onodera, F., Oba, H., Mizutani, T., Hori, T.

Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding seasons.

- Reprod. Domest. Anim., 44:291-293, 2009.
185. Tsutsui, T., Stabenfeldt, G. H.
Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat.
J. Reprod. Fertil. Suppl., 47:29-35, 1993.
186. Tsutsui, T., Stewart, D. R.
Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog.
J. Vet. Med. Sci., 53:1025-1029, 1991.
187. Tsutsui, T., Tanaka, A., Hori, T.
Intratubal insemination with fresh semen in cats.
J. Reprod. Fertil. Suppl. 57:347-351, 2001.
188. Tsutsui, T., Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M., Anzai, M., Hori, T.
Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats.
J. Vet. Med. Sci., 62:1241-1245, 2000.
189. Tsutsui, T., Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M., Anzai, M., Hori, T.
Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats.
J. Vet. Med. Sci., 62:1247-1251, 2000.

190. Tsutsui, T., Tezuka, T., Mikaga, Y., Sugisawa, H., Kirihara, N., Hori, T., Kawakami, E.
Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature.
J. Vet. Med. Sci., 65:307–312, 2003.
191. Tsutsui, T., Wada, M., Anzai, M., Hori, T.
Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats.
J. Vet. Med. Sci., 65:397–399, 2003.
192. Tsutsui, T., Yamane, I., Hattori, I., Kurosawa, N., Matsunaga, H., Murao, I., Kanda, M., Hori, T.
Feline embryo transfer during the non-breeding season.
J. Vet. Med. Sci., 62:1169–1175, 2000.
193. Villaverde, A. I., Fioratti, E. G., Penitenti, M., Ikoma, M. R., Tsunemi, M. H., Papa, F. O., Lopes, M. D.
Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa.
Theriogenology, 80:730–737, 2013.
194. Villaverde, A. I., Melo, C. M., Martin, I., Ferreira, T. H., Papa, F. O., Taconeli, C. A., Lopes, M. D.
Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*) artificial insemination in domestic cats.
Anim. Reprod. Sci., 114:434–442, 2009.

195. Vizueté, G., Jiménez, E., Aquera, E. I., Pérez-Marín, C. C.
Impact of ultra-rapid freezing on the motility, morphology viability and acrosome integrity of epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders.
Reprod. Domest. Anim. 49:e5-8, 2014.
196. Wen, D. C., Yang, C. X., Cheng, Y., Li, J. S., Liu, Z. H., Sun, Q. Y., Zhang, J. X., Lei, L., Wu, Y. Q., Kou, Z. H., Chen, D. Y.
Comparison of developmental capacity for intra- and interspecies cloned cat (*Felis catus*) embryos.
Mol. Reprod. Dev., 66:38-45, 2003.
197. Wildt, D. E., Bush, M., Howard, J. G., O'Brien, S. J., Meltzer, D., Van Dyk, A., Ebedes, H., Bmnd, D. J.
Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat.
Biol. Reprod., 29:1019-1025, 1983.
198. Wildt, D. E., Howard, J. G., Chakraborty, P. K., Bush, M.
Reproductive physiology of the clouded leopard: II. A circannual analysis of adrenal-pituitary- testicular relationships during electroejaculation or after an adrenocorticotropin hormone challenge.
Biol. Reprod., 34:949-959, 1986.
199. Wildt, D. E., Howard, J. G., Hall, L. L., Bush, M.

- Reproductive physiology of the clouded leopard: I. Electroejaculates contain high proportions of pleiomorphic spermatozoa throughout the year. *Biol. Reprod.*, 34:937-947, 1986.
200. Yin, X.J., Lee, H. S., Yu, X. F., Kim, L. H., Shin, H. D., Cho, S. J., Choi, E. G, Kong, I. K.
Production of second-generation cloned cats by somatic cell nuclear transfer.
Theriogenology, 69:1001-1006, 2008.
201. 米田久美子
ツシマヤマネコの人工繁殖に関する研究
<https://www.env.go.jp/policy/digest/h15/pdf/023.pdf#search=%27>
202. Zambelli, D.
Semen collection in cats: Technique and analysis.
Theriogenology, 66:159-165, 2006.
203. Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C., Belluzzi, S.
Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates.
Reprod. Domest. Anim. 37:310-313, 2002.
204. Zambelli, D., Cunto, M.
Transcervical artificial insemination in the cat.
Theriogenology, 64:698-705, 2005.

205. Zambelli, D., Cunto, M., Prati, F., Merlo, B.
Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat.
Theriogenology, 68:796–803, 2007.
206. Zambelli, D., Iacono, E., Raccagni, R., Merlo, B.
Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste.
Theriogenology, 73:88–89, 2010.
207. Zambelli, D., Merlo, B., Iacono, E., Prati, F., Belluzzi, S.
Fertilizing ability of electro-ejaculated cryopreserved semen in the domestic cat.
Reprod. Domest. Anim., 41:137–141, 2006.
208. Zambelli, D., Prati, F., Cunto, M., Iacono, E., Merlo, B.
Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration.
Theriogenology, 69:485–490, 2008.
209. Zambelli, D., Raccagni, R., Cunto, M., Andreani, G., Isani, G.
Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization.
Theriogenology, 74:1396–1402, 2010.

210. ZENOAQ

ドミツール（日本全薬工業株式会社） 添付文書

<http://www.zenoaq.jp/product/pdf/pd-attached-126.pdf>