

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田島 日出男

日本固有の小型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、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。これら野生動物種を保護するためには、生息域内保全の他に、生息域外保全とし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。しかし、これらの動物種における ART はまだ確立されていない。

そこで著者は、ツシマヤマネコの地域個体群であり、まだ絶滅の危険性がそれほど高くないアムールヤマネコをツシマヤマネコなどのモデルとして用いて、ART 技術の確立のための一連の研究を行った。

本論文は、8 章より成り、第 1 章は緒論、第 2 章から第 7 章までは実験成績であり、第 8 章は総括である。実験成績を要約すると、次の通りである。

## 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）

良好な性状の精液の採取方法の確立を目的として、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（合計 19 回）にわたり、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、電気刺激条件の検討、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繁殖季節（1～4 月）、繁殖季節後（5～8 月）、繁殖季節前（9～12 月）のサブグループに分けて分析を行った。

その結果、体重は繁殖季節前が他群に比較して有意に高値を示した（ $p < 0.05$  および  $p < 0.01$ ）。精巣容積は、繁殖季節後が繁殖季節に比較して有意に低値を示した（ $p < 0.05$ ）。また、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（ $p < 0.05$ ）。

尿の混入を最小限にし、多くの精子を採取できる電気刺激の条件は、電極を直腸と平行で腹側に 1 本にした直腸プローブを用い、肛門から約 6.5 cm 挿入し、1～4V で行うことが最適であることが明らかとなった。

精液性状において、総精子数、精子活力、精子生存率および精子奇形率は、他群に比較して繁殖季節後で劣っていたが、各群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。

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、精液採取を行う時期は、9～4 月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)

3頭の雄アムールヤマネコを用いて、経直腸電気刺激法 (EE 群) の前に尿道カテーテル法 (CT 群) 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 CT 群に比較して EE 群が高値を示し、精子奇形率は CT 群に比較して EE 群がやや低値を示した。平均総精子数は、CT 群に比較して EE 群がやや高値を示した。繁殖季節を基準に分析したところ、総精子数は繁殖季節後よりも繁殖季節で高値を示した。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、アムールヤマネコの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適していると考えられたが、尿道カテーテル法については麻酔方法の改良など更なる検討が必要であると思われた。

## 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)

精液保存技術の確立を目的として、実験 1 として第 2 章で採取した精液を用いてイエネコと同様の方法で凍結精液を作成し、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 として経直腸電気刺激法 (EE 群) および尿道カテーテル法 (CT 群) によって採取した 3 回分の精液を用いて低温保存を行い、その有用性について検討した。

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、精子奇形率が平均  $15.8 \pm 3.3\%$  とやや高値を示した。凍結前および融解後の精子活力は繁殖季節が他の群よりも高値を示し、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。

実験 2 の結果、低温保存後の精子活力および精子生存率は、保存 2 日後以降は CT 群に比較して EE 群が急激に低値を示し、両者の差は経時的に大きくなった。精子奇形率は、保存 3 日後から CT 群が高値を示した。また  $8^{\circ}\text{C}$  の保存では、保存 1 日後に急激に精子活力が低下し、保存 2 日後以降で精子生存率が  $4^{\circ}\text{C}$  の保存に比較してやや低値を示して推移した。

以上のことから、アムールヤマネコ精液においても、イエネコと同様の方法で凍結精液を良好に作成できることが明らかとなった。また低温保存では、経直腸電気刺激法よりも尿道カテーテル法で採取した精液の方が数日間、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、 $8^{\circ}\text{C}$  よりも  $4^{\circ}\text{C}$  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巣上体尾部精子の性状および凍結保存の検討 (第5章)

精巣上体から回収した精子の凍結保存技術の確立を目的として、死亡した 3 頭の雄アムールヤマネコの精巣上体尾部から回収した精子の性状を 5 頭のイエ

ネコのデータと比較し、精巢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した。

その結果、アムールヤマネコの回収直後の精巢上体尾部精子の性状は良好であり、イエネコと比較して差はみられなかった。平均回収総精子数は、イエネコよりもやや少なかったが、両者に有意差はみられなかった。精巢上体尾部精子の凍結融解後の精液性状も良好であった。

以上のことから、精液採取では総精子数が少なかったが、アムールヤマネコの精巢上体尾部からイエネコとほぼ同様な精子数が貯蔵されており、回収できることが明らかとなった。また凍結保存後の性状も良好であったため、十分に人工授精に使用できると考えられた。

#### 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)

飼育下ではアムールヤマネコは顕著な発情兆候を示さず、交配適期の把握が難しいため、人工授精 (AI) に際し、発情誘起および排卵誘起処置が必要であると考えられた。そこで、非繁殖季節の雌アムールヤマネコ 2 頭を用いて、eCG 製剤投与による発情誘起方法と、その後の hCG 製剤投与による排卵誘起方法の有用性について検討した。卵胞発育および排卵の状況の確認は、糞中のエストラジオール-17 $\beta$  (E2) およびプロジェステロン (P4) の代謝産物の測定で行った。

その結果、eCG 200 単位投与後 5 日目から糞中 E2 値が上昇し、投与後 7~9 日目にピークが認められ、卵胞の発育が確認された。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 単位を投与した。その結果、hCG 投与後 3 日目から糞中 P4 値の上昇がみられたため、排卵が誘起されたと判断された。

以上のことから、今回の方法で非繁殖季節のアムールヤマネコにおける卵胞発育と排卵誘起は可能であることが明らかとなった。

#### 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)

アムールヤマネコから採取できた精子数で高い受胎率を得るためには子宮内 AI が必要と考え、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 AI 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 頭は hCG 投与後 20 時間に左子宮角に精液 (精子数 960 万、精子活力 70%、精子生存率 74.2%) 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 2 つ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 頭は、hCG 投与後 22 時

間に左右の子宮角内にそれぞれ精子数 1,000 万を含む精液（精子活力 40%、精子生存率 71.5%）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 2 つの胎嚢および胎子心拍が確認された。授精後 68 日目に自然分娩を認め、1 頭は死産であったが 1 頭の正常な産子を得ることに成功した。

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を用いた外科的子宮内 AI 後に、正常な産子を得ることが可能であることが明らかとなった。

以上の結果から、雄アムールヤマネコから経直腸電気刺激法によって人工授精に使用するのに十分な精液を採取する条件を明らかにした。また、非繁殖季節の雌アムールヤマネコにおける卵胞発育および排卵誘起の条件を明らかにした。そして新鮮精液を用いた外科的子宮内 AI を行い、正常な産子を得ることに成功した。この動物種において人工繁殖により産子を得たのは、世界で初めてであった。さらに、精液の凍結保存方法および低温保存方法の条件を検討し、保存精液の有用性について明らかにした。また精巣上体尾部から回収した精子の性状やその精子の凍結融解後の性状は良好であり、これらの精子を人工授精に使用できる可能性があることを明らかにした。

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小型野生ネコ科動物の繁殖にも役立ち、現在、減少している個体数を増加させる助けになるものと考えられた。

以上のように、今回の研究結果はこの動物種において初めて明らかにされたものが多かった。とくに、この動物種においてホルモン投与によって誘起された発情における子宮内人工授精にて、世界で初めて産子を得たことは特筆すべき点である。本論文は、絶滅の危機にある野生小型ネコ科動物の生息域外保全の観点からもきわめて重要であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。