

交尾期における
ニホンツキノワグマ (*Ursus thibetanus japonicus*) の
生殖生理と人工授精技術の確立

2006 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岐阜大学)

岡野 司

目 次

第 1 章 緒言	1
1-1. ツキノワグマの現状	1
1-2. 繁殖生理学的特徴	2
1-3. 人工繁殖技術	3
1-4. 研究の目的	4
 第 2 章 全般的な材料および方法	 5
2-1. 供試動物	5
2-2. 全身麻酔	5
2-3. 採血	6
2-4. 電気刺激射精法	6
2-5. 精液検査	7
2-6. 精液凍結保存	9
2-7. 血清中性ステロイドホルモン濃度の測定	10
 第 3 章 電気刺激射精法による精液採取	 13
3-1. 異なる刺激電圧が採取精液性状に及ぼす影響	13
3-1-1. 背景	13
3-1-2. 材料および方法	14
3-1-3. 結果	15
3-1-4. 考察	16
3-1-5. 図表	20
3-2. 正常精子の形態および採取時期に起因する精液性状および出現精子奇 形の違い	21
3-2-1. 背景	21

3-2-2. 材料および方法	22
3-2-3. 結果	24
3-2-4. 考察	25
3-2-5. 図表	31

第4章 精液凍結保存

4-1. 異なる希釈液および一次・二次平衡時間が凍結融解後精子性状に及ぼす影響	35
4-1-1. 背景	35
4-1-2. 材料および方法	36
4-1-3. 結果	38
4-1-4. 考察	38
4-1-5. 図表	42
4-2. 異なるグリセロール濃度が凍結融解後精子性状に及ぼす影響	44
4-2-1. 背景	44
4-2-2. 材料および方法	44
4-2-3. 結果	46
4-2-4. 考察	47
4-2-5. 図表	49

第5章 排卵様式・排卵誘起

5-1. 隔離飼育実験による排卵様式の解明	50
5-1-1. 背景	50
5-1-2. 材料および方法	51
5-1-3. 結果	54
5-1-4. 考察	54

5-1-5. 図表	・ ・ ・ ・ ・ 58
5-2. 妊馬血清性腺刺激ホルモン（eCG）およびヒト絨毛性腺刺激ホル モン（hCG）による発情および排卵誘起	・ ・ ・ ・ ・ 63
5-2-1. 背景	・ ・ ・ ・ ・ 63
5-2-2. 材料および方法	・ ・ ・ ・ ・ 63
5-2-3. 結果	・ ・ ・ ・ ・ 66
5-2-4. 考察	・ ・ ・ ・ ・ 67
5-2-5. 図表	・ ・ ・ ・ ・ 72
 第 6 章 総括	 ・ ・ ・ ・ ・ 79
 謝辞	 ・ ・ ・ ・ ・ 82
 参考文献	 ・ ・ ・ ・ ・ 83
 英文抄録	 ・ ・ ・ ・ ・ 97

緒言

1-1. ツキノワグマの現状

世界には、ジャイアントパンダ (*Ailuropoda melanoleuca*)、マレーグマ (*Helarctos malayanus*)、ナマケグマ (*Melusus ursinus*)、メガネグマ (*Tremactos ornatus*)、アメリカクロクマ (*Ursus americanus*)、ヒグマ (*Ursus arctos*)、ホッキョクグマ (*Ursus maritimus*) およびツキノワグマ (別名アジアクロクマ: *Ursus thibetanus*) の 8 種のクマ科動物が生息しているが、いずれの種も人間活動が主な原因となり、絶滅の危機に瀕している (48)。ニホンツキノワグマ (*Ursus thibetanus japonicus*) は、ツキノワグマの 1 亜種であり、日本の本州と四国に生息する (51)。その他の亜種 (*Ursus thibetanus ussuricus*; *Ursus thibetanus formosus*) は、アジア南部、中国北東部およびロシア極東に生息している (103)。

ニホンツキノワグマの体重は、雄で概ね 50～120 kg、雌で概ね 40～80 kg であり、その体重は大きく季節変動することが知られている (35)。雑食性であるが、植物食の占める割合が高く、冬眠前には、ブナ (*Fagus crenata*) やミズナラ (*Quercus mongolica* spp. *crispula*) などの堅果類が重要な食物となる (34, 73, 119)。日本には、10,000～15,000 頭のニホンツキノワグマが生息していると推測されているが、有害捕獲を含む狩猟により年間約 2,000 頭が捕殺されている (36)。

IUCN (The World Conservation Union) の Red List of Threatened Species において、種としてのツキノワグマは「絶滅危惧 II 類 (絶滅の危険が増大している種)」に分類されている (48)。また、ツキノワグマは「絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約 (ワシントン条約)」において、最も規制の厳しい「附属書 I」に掲載され、生体はもちろんのこと、体の部分やその製品の国際取引が禁止されている。日本国内においては、中部以北では比較的個体数が安定しているが、西日本を中心に個体数を減らしており、下北半島、紀伊半島、四国山地、西中国地域、東中国地域および九州地方では、個体群が地域的に孤立しており、絶滅のおそ

れが高い状態にある(51)。特に九州地方では、1941 年以降確実な生息情報はなく、絶滅した可能性が高い(51)。個体数減少の主な原因としては、好適な生息環境の減少、生息地の分断および農林業被害防止を目的とした有害捕獲があげられる(51)。

2004 年秋季に、北陸・関西を中心にニホンツキノワグマの出没が相次いで発生したことは記憶に新しい。ニホンツキノワグマは、警戒心が強く積極的に人を襲うことはほとんどないが、多くの出没がみられた 2004 年には人身事故が全国で 103 件、そのうち死亡事故が 1 件発生した(前年比約 2 倍)(131)。この出没原因の一つとしては、堅果類の不作による行動圏の拡大があげられるが、様々な要因が複雑に重なり大量出没が発生したと考えられている(52)。このように、ニホンツキノワグマと人との軋轢が重要な社会問題となりつつある中、より計画的な保護管理計画を実施するため、「特定鳥獣保護管理計画」に基づき、2005 年 1 月現在、10 府県の自治体が保護管理対策に取り組んでいる。具体的には、狩猟の禁止や自粛、電気柵の設置、生息地保全および学習(奥山)放獣などが行なわれ、被害の防止を図りつつ、共生のための模索がなされている。

1-2. 繁殖生理学的特徴

ニホンツキノワグマは、季節繁殖性を示す。年に一度、6 月中旬から 8 月上旬に交尾期を迎え、交尾のピークは 7 月中旬に見られる(129)。多頭飼育条件下では、乗駕行動は不特定多数の雌雄間で見られ、交尾形態は乱交型である(129)。野生下では、母子を除き単独生活を行なう(132)。交尾行動から推定された雌の発情期間は 12-35 日で個体差が大きく、発情期間と非発情期間が不規則にくり返されることが報告されているが(129)、発情周期に伴う性ホルモン動態に関しては、詳細は分かっていない。また、排卵様式についても、未だ明らかではない。雄の精子形成は、冬眠期である 3 月頃から始まり、5-7 月に活発な精子形成が認められる(60, 61, 85)。一方で、雄のテストステロン濃度は、交尾期前の 5 月ごろにすでにピークに達しており、交尾期の 6 および 7 月には、低値を示す個体が多い(58, 60, 85)。交

尾期終了後、9月には精子形成はほとんど見られなくなる(60, 85)。交尾後、受精が成立してもすぐに着床は起こらず、受精卵は胚盤胞まで発育した後、子宮内に浮遊する(119)。この現象は、着床遅延と呼ばれる。着床遅延は、約4〜5ヶ月間続き、胚の着床は11月下旬から12月上旬に起こると推定されている(100, 119, 121)。この着床の時期に、ニホンツキノワグマは冬眠に入る(132)。冬眠中は、一切摂食を行なわないので、越冬および出産・育子のため、冬眠前の秋期には十分に体脂肪を蓄える必要がある(115, 119)。胎子発育には、約2ヶ月間を要し、出産は冬眠中の1月下旬から2月上旬にみられる(98〜100, 119)。産子数は、1〜3頭であるが、ほとんどの個体が2頭である(54, 132)。冬眠は、4月ごろまで続き、冬眠開け後も母子は行動を共にする(30, 132)。泌乳中のため、その年の交尾期の発情はないと考えられる(20, 38)。0歳子は、母親と共に越冬し、その翌年の交尾期に母親から独立する(30, 54)。雌は、2〜3年間隔で出産する(132)。ニホンツキノワグマの性成熟年齢は、雌雄共に2〜4歳頃と推定されており、栄養状態の良い飼育個体などは性成熟が早いと考えられている(55, 59, 85)。

1-3. 人工繁殖技術

野生動物の保全は、まず元来の生息地で行なわれるべきであるが、多くの野生動物種において、その生息数は人間の活動により過去に類を見ない速さで減少しつつある(48)。このような場合、元来の生息地での保全と同時に、生息地外においてもその種の保全を行なうことが必要である。現在、絶滅のおそれのある野生動物種において、精液の凍結保存が種の保存のための重要な技術の1つとして注目されている。このため、多くの野生動物種で精液が採取され、凍結保存されてきている(14, 42, 74, 105, 114, 127)。日本では、楠(63)および福井(29)のグループが、様々な種の動物園動物を対象に、絶滅のおそれのある野生動物の種の保存のため、精液の凍結保存などの技術を用いて、生息地外保全(*ex-situ Conservation*)を精力的に実践している。クマ科動物においては、ジャイアントパンダにおける研究を中心に精

液の凍結保存に関する研究が行なわれてきている (24, 29, 44, 45, 69, 86, 87, 92, 110)。ジャイアントパンダにおいては、繁殖生理に関する研究が盛んであり、新鮮および凍結保存精液を用いた人工授精による繁殖の成功が多く報告されている (24, 44, 69)。アメリカクロクマにおいては、精液の凍結保存に関する報告はほとんどなく、人工授精の成功も無いが、胚移植による繁殖が報告されている (9)。ヒグマにおいては、精液の採取および凍結保存に関する報告がいくつかなされ (45, 46)、人工授精も行なわれているが成功には至っていない (29)。ツキノワグマにおいては、これまでに新鮮精液の一般性状および電気刺激射精法による採取法に関する研究 (58) および野生下個体からの精液採取および凍結保存に関する報告 (86) がある。しかしながら、精液採取および凍結保存の技術は未だ十分とはいえず、さらなる研究が必要である。

1-4. 研究の目的

本研究の目的は、ツキノワグマにおける人工繁殖技術の確立を目指し、精液の採取および凍結保存法を改良することであり、さらには、人工授精の際に鍵となる排卵様式に関する知見を得ることであった。

第 2 章 全般的な材料および方法

2-1. 供試動物

本研究で供試した動物は、すべて秋田県北秋田市（旧北秋田郡阿仁町、北緯 40 度、東経 140 度）に所在する「マタギの里熊牧場」で飼育されているニホンツキノワグマであった。供試動物は、すべて性成熟年齢である 4 歳以上であった。当牧場のツキノワグマは、通常活動期である 4 月下旬から 12 月上旬まで屋外の運動場（雄：約 25×50 m、雌：約 20×30 m、それぞれに運動具、小プール、急傾斜部が設置）において飼育されている。それぞれの運動場には、基本的に雌雄別に約 30～40 頭ずつが飼育されるが、繁殖や研究の目的で雌雄が同居する場合もある。12 月下旬から 4 月上旬までの冬眠期は、屋内の冬眠室または分娩室で飼育される。活動期には、圧ペンとうモロコシや果物等が 1 日 1 回、その時期の要求量に応じて与えられている。また、当牧場は観光施設でもあるため、活動期に含まれる開園期間には、来園者によりクマ用乾燥ペレットが運動場内のツキノワグマに投げ与えられる。冬眠期は一切食餌を必要としないため、水以外は何も与えられていない。

2-2. 全身麻酔

全身麻酔は、屋内の飼育部屋（3.47×4.88 m）において行なった。塩酸ゾラゼパムと塩酸チレタミンの混合薬（Zoletil, Virbac, Carrors, France：9 mg / kg（推定体重））の単独、もしくは Zoletil（2 - 4 mg/kg）と塩酸メデトミジン（ドミツール、明治製菓、東京：20 - 50 μ g/kg）の併用を吹き矢式注射器を用いて筋肉内に投与した。深麻酔に至らなかった場合は、さらに Zoletil 半量の追加投与を行なった。深麻酔導入確認後、バイトブロックおよび目隠しの装着を行い、吊り下げ式体重計を用いて体重測定を行なった。その後、以下に記述する各々の作業を行なった。麻酔下での作業中は、15～20 分ごとに呼吸数、脈拍数および体温の測定を行なった。作業中に覚醒の兆候が見られた場合は、Zoletil 半量を筋肉内に投与した。作業終了後、塩

酸メデトミジンを併用した個体には、塩酸アチパメゾール（アンチセダン、明治製菓：100 - 250 μ g/kg）を筋肉内に投与し覚醒を促した。

2-3. 採血

全身麻酔後、頸静脈からプレインの真空採血管（10 ml）を用いて採血を行った。採取した血液は 1, 2 時間室温にて放置して血餅を形成させた後に、800G で 10 分間遠心分離した。分離した血清を 1.5 ml のマイクロチューブに分注して-30℃にてホルモン測定時まで凍結保存した。

2-4. 電気刺激射精法

電気刺激射精法は、Kojima et al. (58)の方法に改良を加えて、以下の通りに行なった。成熟雄ツキノワグマを全身麻酔後、仰臥位に保定した。陰茎の周囲の毛を短く切り整えた後、包皮から陰茎を露出させ、水道水、0.02%塩化ベンザルコニウム液（オスバン液、武田薬品工業株式会社、大阪）、滅菌生理食塩液を順に用いて陰茎およびその周囲を洗浄した。ポリプロピレン製尿道カテーテル 5 Fr（Sovereign、日本シャーウッド株式会社、東京）を用いて導尿を行い、膀胱内の尿を除去した。導尿後、先端を切断して開口部を広げた 8 Fr の尿道カテーテル（Sovereign）を尿道内に約 10 cm 挿入した。直径 2 cm、長さ 50 cm の塩化ビニール製パイプにドーム状のゴム栓（高さ 7 mm）を装着し、先端から 27 および 35 mm の位置に幅 8 mm の銅製のリング電極をそれぞれ 1 個、合計 2 個配した電極プローブ（独自に作製したもの）を、変圧器（60 Hz、1 チャンネル型、哺乳類用、富士平工業株式会社、東京）に接続した（Fig. 2-4-1）。電極プローブに流動パラフィンを薄く塗り、先端から 12-16 cm を直腸内に挿入した。5 秒間刺激および 10 秒間休止を 1 サイクルとして、1V から刺激を開始し 1V ずつ最大電圧である 7 または 10V まで電圧を増加し、引き続き最大電圧をくり返し合計 20 サイクルまで刺激した。精液が射出されなかった時には、このような増加電圧の 20 サイクルを 1 セットとして射精がみ

られるまで繰り返した。1セット終了時に射精の兆候がみられるものの精液が得られなかった場合はさらに最大電圧で5サイクル繰り返し刺激した。カテーテル内に尿の射出がみられた場合は刺激を中断し、カテーテルを交換または生理食塩液で洗浄し、新たに次のセットから刺激を再開した。各セットの間に数分間の休息を設けた。動物への負担を考慮して、良い性状の精液が採取できない場合でも最高4セットまでとした。射出された精液は、尿道に挿入しておいたカテーテル内に蓄積された。カテーテル内の採取精液は、シリンジでカテーテルに空気を送り込むことにより、滅菌尖底試験管内に押し出した。

2-5. 精液検査

精液検査は、Kojima et al. (58)の方法に改良を加えて、以下の通りに行なった。

2-5-1. 総精子数

採取精液量を、試験管の目盛りまたはマイクロピペットにより測定した。精液 $5\mu\text{l}$ を Sperm counting medium (NaCl を 4.5 g、0.1%ホルムアルデヒドを 1.25 ml、Polyethylene glycol を 0.5 g、1 mM EDTA pH 7.0 を 5 ml、超純水に加え 500 ml に作成したもの) $495\mu\text{l}$ に加え混合した後、トーマの血球計算盤を用いて精子濃度を計算した。総精子数を、(精液量) \times (精子濃度) で求めた。

2-5-2. 生存率

加温板上で予め 38°C に温めておいたスライドグラス上に $10\mu\text{l}$ の精液を滴下し、同様に温めておいたカバーグラスをのせて、顕微鏡用加温板(株式会社北里サプライ)で 38°C に保温しながら光学顕微鏡下で(100倍あるいは400倍)精子の運動性を観察し、以下の通り5段階に分類した。極めて活発な前進運動を行う精子を+++、活発な前進運動を行う精子を++、緩慢な前進運動を行う精子を+、旋回または振り子運動を行う精子を±、および静止している精子を-として主観的に判断し、それぞれの百分率で表した。-以外の運動性を示す精子の割合を合計して生存率(%)とした。

2-5-3. 原形質膜正常率

精子の原形質膜正常率をエオジン・ニグロシン染色による生死判別により求めた。すなわち、5% w/v エオジン水溶液と 10% w/v ニグロシン水溶液をスライドグラス上にそれぞれ 5 μ l ずつ滴下し、次に精液 5 μ l を滴下して三者を混合し、カバーグラスで塗抹した後直ちにヘアードライヤーで乾燥させた。光学顕微鏡下（400 倍）で直ちに検査し、100 精子を観察して頭部が染色されなかった精子（エオジンを取り込まなかった精子）を生存精子と判定し、その割合を百分率（%）で表した。

2-5-4. 奇形率

精子の奇形率をギムザ染色法もしくは固定精子の直接観察により求めた。ギムザ染色法による場合、精液 5 μ l を生理食塩液 50 μ l で希釈し、その希釈した液を 0.33 M カコジール酸ナトリウム（pH7.3）500 μ l と超純水 420 μ l、25 % グルタルアルデヒド 80 μ l を混合して作成した固定液 50 μ l と混合し、30 分間以上室温で固定した後、500G で 5 分間遠心分離して精子を沈澱させ、上清を 70 μ l 除去し、精子を再浮遊させた。スライドグラス上に 10 μ l を塗抹、風乾した。蒸留水で洗浄後、ギムザ調整液（ギムザ原液（Merck, Germany）15 ml に対し超純水 175 ml、0.1 M リン酸緩衝液（pH7.0）10 ml を混合して作成；0.1 M リン酸緩衝液は 61.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + 38.7 \text{ mM } \text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{無水}$ 、pH7.0）中で 2 時間から 1 晩染色した。蒸留水で水洗した後、風乾し、キシレンと封入剤（Eukitt、Merck, Germany）で封入した。光学顕微鏡下（400 倍あるいは 1,000 倍）で精子 100 個を観察し、奇形率（%）を調べた。固定精子の直接観察の場合、上記方法での固定後に、染色は行わず、後述する先体保有率の検査法と同様の方法で精子を観察した。以下のような異常形態を示す精子を奇形精子とした。

頭部奇形：重複、梨子状、過小、挟小、過大、欠損および形成不全

中片部奇形：屈折、重複、糸状、膨大

尾部奇形：欠損、屈折、ヘアピン、重複、旋回および発育不全

細胞質小滴遺残は、他との重複が多いため別途カウントし、奇形率には反映させ

なかった。頭部欠損および尾部欠損は、共に 1 カウントとした。奇形が重複して見られた場合は、より重要と考えられる奇形（精子形成中に発生する一次奇形など）を代表して 1 カウントとした。

なお、第 3 章 3-2 の奇形率の検査法は、本方法とは奇形精子の分類やカウント法などで異なる。

2-5-5. 先体保有率

上記のように固定した精子をスライドグラス上に 8 μ l 滴下し、カバーグラスをのせてキムワイプで軽く手指で圧迫することにより余分の液を取り除き、マニキュアでカバーグラスの周囲を封入した。位相差顕微鏡下（1,000 倍）で精子 100 個を観察し、頭部先端に太い輪郭のある精子を先体保有精子と判定し、先体保有率（%）を求めた（104）。

2-6. 精液凍結保存

精液凍結保存法は、Okano et al. (84, 86)の方法に改良を加えて、以下の通りになった。

2-6-1. 凍結保存用精液希釈液

第 4 章、4-1 および 4-2 では、異なる希釈液の組成およびグリセロール濃度を用いたが、ここでは全凍結保存実験で用いた基本となる希釈液について説明する。

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 3.0g、Citric acid \cdot H₂O 1.75 g、Glucose 1.0 g を H₂O 100 ml に溶解して作成した水溶液を 65–68°C で 30 分間湯煎し、これを 80 ml とり、卵黄（岐阜大学付属岐阜フィールド科学教育研究センター柳戸農場にて生産された新鮮鶏卵）20 ml とペニシリン G カリウム 52 mg、硫酸ストレプトマイシン 80 mg を加えて混合した後、4°C で 2 晩以上保存後、上澄みを採取した（卵黄-トリス-クエン酸-グルコース液）(94)。その上澄みは 5,000G \cdot 4°C で 10 分間遠心し、その上清を一次希釈液として使用した（卵黄球の除去）。一次希釈液に、16%v/v グリセロールを加え 2 次希釈液とした。希釈液は、4°C で保存し、使用期限を 2 週間と

した。

2-6-2. 精液の調整と平衡

精液調整と平衡の方法は、各精液凍結保存実験によって若干異なるが、基本となる方法をここで説明する。

多量の尿が混入した精液は、500G で 5 分間遠心した。遠心後、上清を吸引除去し、滅菌生理食塩液を適量加え、震盪し精子を再浮遊させた（尿の除去および精子の濃縮）。採取精液は、一次希釈液を添加し、精子濃度が 200×10^6 精子/ml となるように調整した（一次希釈）。希釈精液を 4℃で 3 時間一次平衡した後、希釈精液と等量の二次希釈液を 4〜5 回に分けて攪拌しながら少しずつ添加した。二次希釈後の精子濃度は、 100×10^6 精子/ml であった。二次平衡（グリセロール平衡）時間は特に設けなかった。

2-6-3. 凍結および融解操作

二次希釈後直ちに、希釈精液を 0.5 ml 動物用ストロー管（富士平工業）に注入し、ストローパウダーで閉じた。この操作をできるだけ温度変化を与えないように、約 4℃に保ちながら行った。発泡スチロール箱（内径 17.5 cm×24.5 cm、高さ 17.5 cm）を用意し、液体窒素を注ぎ底から 8 cm の高さになるようにした。試験管立てを入れ、液面から 6 cm の高さにストローを置き、ふたを完全に閉め、15 分間保持した。ストローを、大型ピンセットを用いて発泡スチロールの箱内の液体窒素内に投入した後、液体窒素保管器に移し、検査まで保存した。

精液検査直前にストローを 38℃の温水中に入れて 1〜2 分間で精液を融解した。

2-7. 血清中性ステロイド濃度の測定

血清中のプロジェステロンおよびエストラジオール-17 β 濃度を時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）により、ヒトの臨床用に開発されたキット（DELFI A Progesterone Reagent, Wallac, Turku, Finland）を用いて、取り扱い説明書に従って測定した。抽出は行わず、直接血清を測定した。測定内変動係数および測定間変動係数は、プロ

ジェステロンでそれぞれ 7.3%および 10.1%、エストラジオール-17 β でそれぞれ 10.0%および 9.7%であった。



Fig. 2-4-1. Electrical stimulator and rectal probe.

第3章 電気刺激射精法による精液採取

3-1. 異なる刺激電圧が採取精液性状に及ぼす影響

3-1-1. 背景

電気刺激射精法は、全身麻酔下で行なうため、動物側の訓練または馴致を必要としない精液採取法である (126)。このため、電気刺激射精法は、様々な種の野生動物に広く用いられてきた (124, 126)。ツキノワグマ以外のクマ科動物では、ヒグマ (29, 45, 46)、ホッキョクグマ (102) およびジャイアントパンダ (26, 69, 87, 92, 110) において、電気刺激射精法による精液採取の報告がされている。ツキノワグマにおいては、Kojima et al. (58)が電気刺激方法の違いによる採取精液性状の違いを、飼育下個体を用いて比較実験した。また、野生下ではクマ科動物で唯一ツキノワグマにおいて、Okano et al. (86)が、電気刺激射精法による精液採取について報告しており、山中で採取したその精液の凍結保存に成功している。しかしながら、電気刺激射精法により得られたクマ科動物の精液には、頻繁に尿が混入することが報告されており、尿の混入による精液性状の劣化が問題となっている (29, 46, 58, 86)。Kojima et al. (58)は、ツキノワグマにおいて、5〜10V の一定電圧による刺激法 (49) と、1V ずつ 10V まで電圧を増加させていく刺激法 (第2章参照) を比較し、尿の混入の無い採取精液の割合は、共に 33% と低く、差がなかったと報告した。著者は、Kojima et al. (58)が用いた、1V〜10V までの増加電圧による方法を用いてツキノワグマからの精液採取を行なってきた。これは、増加電圧を用いた方が、一定電圧を用いるより、採取される総精子数が多い傾向があったためである (58)。著者は、導尿により膀胱内の尿を予め除去しておくことをルーチンとして行なっているが (第2章参照)、完全に尿を除去することは困難で、少量の尿の採取精液への混入がしばしば認められている。また、尿が混入した場合、尿混入精液を遠心分離することにより、精子成分を沈殿させ、上澄みの尿および精漿を除去する方法を用いて、精子性状の劣化の抑制に若干の成果を得ている (岡野、未発表データ)。これによ

り、尿混入精液であっても検査や凍結実験に用いることが可能となった。

より弱い刺激電圧は、排尿に関わる神経の刺激を少なくすると考えられる。また、一方で射精に関わる神経の刺激も弱めるため、採取される精液性状の変化が予想される。本研究では、増加電圧による電気刺激射精法を用いて、従来から用いてきた最大刺激電圧 10V、およびより低い最大刺激電圧 7V で刺激を行い、採取された新鮮精液性状を比較し、その影響を調べることを目的とした。

3-1-2. 材料および方法

a) 供試動物

飼育下成熟雄ツキノワグマ 18 頭を実験に用い精液を採取した。

b) 精液採取

精液は、交尾期である 2003 年 6 月 29 日～7 月 31 日の間に、全 25 回、電気刺激射精法により採取した。電気刺激射精法は、第 2 章に記述した方法に従い、最大刺激電圧 10 および 7V が採取精液性状に及ぼす影響を調べた。最大刺激電圧の試行回数は、10 および 7V までが、それぞれ 10 および 15 回であった。

なお、本実験は、「4-2. 異なる希釈液および一次・二次平衡時間が凍結融解後精子性状に及ぼす影響」と並行して行なっており、採取後の精液の一部は、その凍結保存実験に用いた。

c) 精液検査

精液採取後に精液検査を行なった。精液検査は、第 2 章に記述した検査に加えて、尿混入の有無をその色合い（黄色透明を呈す）から主観的に判断した。射出物の大部分が精液で、尿の混入がわずかであると判断した場合（後述する遠心分離を必要としない場合）は、便宜的に尿の混入はないものとした。尿の混入が多い場合は、遠心分離による尿の除去および精子の濃縮（「2-6-2. 精液

の調整と平衡」参照)を行い、検査を行なった。

1回の精液採取で、2サンプル以上の精液が採取された場合は、それぞれ検査を行なった。そして、便宜的に生存率、原形質膜正常率、奇形率および先体保有率は、それらの平均値で、総精子数はそれらの和で表した。

d) 統計処理

数値による結果は、平均値±標準偏差で表した。異なる刺激電圧に起因する採取精液性状の違いを、 χ^2 検定(尿混入の有無)または一元配置の分散分析(その他の精液性状)を用いて比較した。P値は、0.05未満で有意と判定された。

3-1-3. 結果

全25回の精液採取の試みにおいて、精子を含む射出物が採取された。しかしながら、うち1回(最大刺激電圧10V)は正確な精液検査を行なうための十分な数の精子を含まなかったため、検査を行うことが出来ず、結果から削除した。

新鮮精液(n = 24)の、総精子数($\times 10^6$)、生存率(%), 原形質膜正常率(%), 奇形率(%), および先体保有率(%)は、それぞれ 221.8 ± 183.0 、 63.5 ± 33.9 、 81.2 ± 27.0 、 43.6 ± 25.2 および 91.5 ± 13.5 であった (Table 3-1-1)。

異なる最大刺激電圧(10V, n = 9; 7V, n = 15)を比較した場合、採取精液の総精子数、生存率、原形質膜正常率、奇形率、先体保有率および尿混入の割合に統計学的に有意な差は認められなかった (Table 3-1-1)。

尿の混入した精液の精子生存率、原形質膜正常率および先体保有率(n = 11)は、尿の混入していない精液(n = 13)に比べて有意に低かった (Table 3-1-2)。尿の混入した精液の精子奇形率(n = 11)は、尿の混入していない精液(n = 13)に比べて有意に高かった (Table 3-1-2)。尿の混入の有無は、総精子数には影響しなかった (Table 3-1-2)。

3-1-4. 考察

哺乳類においては、以下のような方法が精液採取の際に用いられている；自然交配後精液の横取り、人工腔法、マスターベーション法、用手法、電気振動法、電気刺激射精法、薬剤誘起射精法、直腸を介した内部器官（前立腺等）のマッサージ、および精巣上体精子の回収（124, 126）。ツキノワグマなどの取り扱いの際に、取扱者の生命の危険を伴う動物においては、全身麻酔下（外科的手術期）で行なえる方法、もしくは死亡個体を用いた方法が精液採取法の選択肢となる。Watson (124)は、精液採取法は、実施者に危険が及ばないものであるべきであり、このことが採取法の選択の際に最も重要なことであると述べている。このため、ツキノワグマで用いることの出来る精液採取法は、電気刺激射精法および死亡個体からの精巣上体精子の回収に限られる。ツキノワグマにおける死亡個体からの精巣上体精子の回収および凍結保存法は、現在確立されつつあり（77, 79）、さらなる改良のため研究が進んでいる。一方、電気刺激射精法は、ツキノワグマをはじめ、他のクマ科動物において一般的に用いられている方法である（26, 29, 45, 46, 58, 69, 86, 87, 92, 102, 110）。ジャイアントパンダでは、電気刺激射精法によって採取された精液を用いて人工授精が行なわれ、産子が得られており（69）、ヒグマでは人工授精は行なわれているが受胎には至っていない（29）。過去の報告（58）における電気刺激射精法によって採取されたツキノワグマ精子の総精子数、生存率、原形質膜正常率および奇形率（平均）は、それぞれ 84.0×10^6 、77%、77%および 11%であった。この過去の研究では、尿が多く混入したサンプルのデータは、結果に用いていないため単純に比較することは出来ないが、本研究と比べて生存率は高い傾向にあり、総精子数と奇形率は低い傾向にあった。過去の研究結果の方が、生存率および奇形率が良好な傾向にあったのは、尿の混入により劣化した精液のデータが削除されたためであると考えられる。採取された総精子数は、本研究の方が高い傾向にあり、このことは精液採取の技術が改良により向上していることを示しているのかもしれない。また、尿混入の割合においても、最高刺激電圧 10V を用いた過去の報告（67%）（58）と比

べて、最高刺激電圧 7V を用いた場合 (26.7%) は低い傾向にあり、このことも採取技術の向上を意味していると考えられる。他のクマ科動物において電気刺激射精法によって採取された精子の生存率および原形質膜正常率 (平均) は、ヒグマで、それぞれ 96 および 86% (45)、ジャイアントパンダで、それぞれ 77 および 84% であった (87)。これらの値は、本研究結果と比較して、若干高い傾向にあった。種差などによる生来の精液性状もこの違いの一因であると考えられるが、用いた手法による影響が大きいと考えられる。電気刺激射精法で得られた精液の性状は、自然交配時の射出精液、または人工陰法および用手法などの自然に近い状態で得られた精液の性状とは、若干異なると考えられるので、さらに電気刺激射精法による精液採取技術を向上させ、自然の射出に近い性状の精液を採取することが望まれる。

本研究において、電気刺激による精液への尿の混入を防ぐため、慣習的に用いていた最大刺激電圧 (10V) よりも低い電圧 (7V) を用いて電気刺激射精を行い、その採取精液に及ぼす影響を調べた。刺激電圧 7V は、電気刺激の際に、ほとんどすべての個体に後肢の伸展が現れる刺激電圧であるため、本研究で比較検討する電圧として適切であると考えた。過去の著者らの実験において、後肢の伸展は概ね 5〜7V で認められていた (岡野、未発表データ)。後肢の伸展は、精液の射出が起こるのに十分な電圧であることを示している (49, 58)。実際、精液の射出は、後肢の伸展の直後に発生するのではなく、その後何回か刺激をくり返すことにより認められた。また、後肢の伸展には、1) まっすぐに後肢が伸びる、2) 交差して後肢が伸びる、の 2 パターンがあり、どちらの状態においても射精は認められた。交差して後肢が伸びた場合、陰茎を保持する者の手が締めつけられ、陰茎の保持が困難となるため注意が必要である。異なる最大刺激電圧 10 および 7V を用いて採取した精液性状に、尿混入の割合も含めて、有意な差が認められなかったが、このことから、最大刺激電圧 7V はツキノワグマから精液を採取するのに十分な電圧であることが示された。Watson (124) は、精液の採取において、動物の健康および福祉に危険がない方法が用いられるべきであると述べている。より低い電圧の方が個体にとって

の負担が軽減されると考えられるため、最大電圧 7V を用いるのが望ましい。

尿混入精液が、不妊に影響することはよく知られている (21)。本研究において、尿の混入した精子の生存率、原形質膜正常率および先体保有率は、尿の混入のないものに比べて有意に低く、尿の混入した精子の奇形率は、尿の混入していないものに比べて有意に高かった。尿混入が精子の運動性に及ぼす影響について、ヒト (56, 67) およびウマ (32) など研究されてきた。精子の運動性は、生存性の低下や、奇形率（特に尾部奇形）の上昇を反映する。精子への尿混入の影響は、pH と浸透圧の変化によるものと考えられている (21, 67)。ヒトの精子は、アルカリ性環境に比べて、酸性環境に置かれた方が、精子の運動性が低下する (67)。しかしながら、酸性環境下で不動化されたヒト精子を、正常の pH 環境に戻すと運動性を取り戻すが、アルカリ性環境下におかれた場合は、運動性を回復しない (67)。一方、低浸透圧環境は、高浸透圧環境に比べて、ヒト精子の運動性により有害であり、正常の浸透圧環境に戻しても、運動性は回復しない (67)。低浸透圧環境のほうが精子の運動性により有害であるという同様の報告が、ウシおよびヒツジにおいてもなされている (5)。さらに、高浸透圧環境への暴露のみでは精子の原形質膜にほとんど影響を与えないが、高浸透圧環境から等浸透圧環境（通常精液と同様の浸透圧）に戻した場合に、精子の原形質膜が破壊されることが数種の動物で報告されている (1, 93, 108, 109)。また、尿中の窒素成分が精子に及ぼす影響が、ヒトの精子で研究されており、クレアチニン、尿素および尿酸は、精子の運動性に影響しないが、アンモニアが精子の運動性に有害であることが報告されている (56)。本研究では、採取精液の pH および浸透圧の測定は行なっていないが、以上に挙げたような pH および浸透圧の変化、および尿中のアンモニアが精子性状を劣化させたものと考えられる。一方、過去に著者は、ツキノワグマの膀胱尿を、カテーテルを用いて採取し、採取後に直ちに pH 試験紙を用いて尿の pH を測定する試験を行なった。その結果、尿の pH は弱酸性から弱アルカリ性を示し (n = 7, 範囲 6.2～7.4, 平均 6.8)、ツキノワグマの尿の pH が一定しないことが判明した (岡野、未発表データ)。このこ

とから、一般に尿の酸性環境が、精子性状を劣化させる原因と考えられてきたが、ツキノワグマに関しては酸性環境のみが影響しているのではないと考えられる。今後、尿混入のない精液採取および尿混入精液の精子洗浄ためのさらなる方法の改良が望まれる。

結論として、ツキノワグマの電気刺激射精において、異なる最大刺激電圧 10 および 7V を用いて採取した精液性状に有意な差は認められず、最高刺激電圧 7V はツキノワグマから精液を採取するのに十分な電圧であることが示された。

Table 3-1-1. Characteristics of Japanese black bear semen collected by electroejaculation using different maximal voltages (mean \pm SD)

Stimulation method	No. of trials	Total sperm count ($\times 10^6$)	% Motility	% Viability	% Abnormal morphology	% Intact acrosome	Cases (%) of urine contamination observed
1 to 10 V once each 10 V \times 10 times	9	280.7 \pm 209.6	51.7 \pm 40.5	84.1 \pm 20.8	45.9 \pm 23.4	91.5 \pm 9.8	7 (77.8)
1 to 7 V once each 7V \times 13 times	15	186.5 \pm 162.3	70.7 \pm 28.4	79.5 \pm 30.7	42.3 \pm 27.0	91.6 \pm 15.6	4 (26.7)
Overall	24	221.8 \pm 183.0	63.5 \pm 33.9	81.2 \pm 27.0	43.6 \pm 25.2	91.5 \pm 13.5	11 (45.8)

No statistically significant differences were found in any of the variables examined.

Table 3-1-2. Effect of urine contamination to Japanese black bear semen collected by electroejaculation (mean \pm SD).

Urine contamination	No. of samples examined	Total sperm count ($\times 10^6$)	% Motility	% Viability	% Abnormal morphology	% Intact acrosomes
Contaminated	11	240.4 \pm 220.3 ^a	39.1 \pm 36.0 ^a	67.6 \pm 35.2 ^a	56.4 \pm 25.1 ^a	84.4 \pm 17.5 ^a
Not contaminated	13	206.1 \pm 152.2 ^a	84.2 \pm 10.6 ^b	92.7 \pm 7.3 ^b	32.9 \pm 20.5 ^b	97.6 \pm 2.9 ^b

Groups with different superscripts in the same column are significantly different.

3-2. 正常精子の形態および採取時期に起因する精液性状および出現精子奇形の違い

3-2-1. 背景

ツキノワグマは、明らかな季節繁殖性を示すので、受精能力のある精子を採取できる期間は限られている。一般に、季節繁殖性を示す動物において、非交尾期には精液量および精子数の減少、ならびに精子活力の低下などが認められ（68）、非交尾期に採取した凍結保存精液は人工授精には適さないと考えられている。著者の配置する研究室では、これまでツキノワグマの精液を交尾の最盛期である7月に限って採取してきたため、その前後における精液の利用の可能性については不明であった。また、交尾期以外におけるツキノワグマ精液の利用の可能性についての報告は、他になされていない。交尾期外に精液性状の良い精液が採取可能であれば、より多くの凍結精液を確保することができ、人工授精の成功に繋げることができる。

ウシおよびイヌなどの家畜を中心に、精子奇形と不妊に関する研究がなされてきており、その関係性が明らかになっている（4, 83）。採取精液の精子形態の全体像は、その時の精巣および精巣上体の健全性だけでなく、個体自身の健康状態を反映する。ツキノワグマにおいては、本章の「3-1. 異なる刺激電圧が採取精液性状に及ぼす影響」で前述したように、比較的高率で奇形が認められる。しかしながら、その採取時期の違いによる出現奇形率の変化については分かっていない。また、奇形について調べる際、正常な形態についての知見が重要となるが、このようなツキノワグマ精子に関する報告も今までにない。

本研究の目的は、電気刺激射精法により採取した精液を用いて、正常なツキノワグマ精子の形態学的知見を得ること、および人工授精可能な精液の採取時期を知るため、異なる採取時期である交尾期の初期、中期および終了直後における精液性状および出現精子奇形の違いを調べることであった。

3-2-2. 材料および方法

a) 供試動物

飼育下成熟雄ツキノワグマ 25 頭を実験に用い精液を採取した。

b) 精液採取

精液は、交尾期および交尾期終了直後である 2003～2006 年の 6～9 月の間に、全 74 回、電気刺激射精法により採取した。電気刺激射精法は、第 2 章に記述した通りである。これらの精液のうち、尿混入の有無をその色合いから主観的に判断し、尿の混入のほとんど無い 36 サンプルを実験に用いた。

採取時期を、交尾期初期（6 月 19 日～6 月 25 日, $n = 7$ ）、交尾期中期（7 月 2 日～7 月 31 日, $n = 21$ ）および交尾期終了直後（8 月 29 日～9 月 10 日, $n = 8$ ）の 3 期に分類した。

c) 精巣容量の測定

2005 および 2006 年に精液採取を行なったのべ 23 頭（交尾期初期 $n = 7$, 交尾期中期 $n = 8$, 交尾期終了直後 $n = 8$ ）において、精巣容量の測定を行なった。Tsubota and Kanagawa (117) の方法に従って、左右精巣の長径、短径および厚さを計測した。（長径×短径×厚さ）^{1/3}(mm)を算出し、左右の平均を求めこの値を精巣容量とした (117)。

d) 精液検査

精液採取後に精液検査を行なった。精液検査は、奇形率検査を除き、第 2 章に記述した通りである。第 2 章に記述した検査に加えて、下記の方法により、射出精液の pH の測定および正常精子の計測および観察を行なった。

・ 奇形率検査

2005 および 2006 年に精液採取を行なった 23 サンプルにおいて、下記の方法に

より奇形率検査を行なった。

精子形態を、位相差顕微鏡を用いて 100 精子観察した（第 2 章参照）。精子奇形を、正常形態 Normal morphology (Fig. 3-2-1, 3-2-2a)、重要欠陥 Major defects および非重要欠陥 Minor defects に分類し、さらに頭部、中片部および頸部、尾部、ならびにその他の奇形について詳細に分類した (Table 3-2-1) (4, 6, 83)。奇形精子の分類は、以下の通りである。

頭部奇形（欠陥）Head defects:

頭部重複 Double head (Fig. 3-2-2b), 不整形頭 Amorphous head (Fig. 3-2-2a), 梨子状頭 Pear-shaped head (Fig. 3-2-2c), 瘤状頭 Knobbed acrosome (Fig. 3-2-2d), 核内小腔 Nuclear vacuoles (Fig. 3-2-2e), 頭部過大 Microcephalic, 頭部過小 Macrocephalic (Fig. 3-2-2a), 先体反応 Acrosome reaction (Fig. 3-2-2f)

中片部および頸部奇形（欠陥）Midpiece and neck defects:

中片部重複 Double midpiece (Fig. 3-2-2d), 捩状中片部 Kinked midpiece, 短形中片部 Short midpiece, 糸状中片部 Thin midpiece (Fig. 3-2-2g), 膨大中片部 Thick midpiece (Fig. 3-2-2b), 不整塊付着中片部 Midpiece with irregular debris, 頸部重複 Double neck (Fig. 3-2-2d), 近位細胞質小滴 Proximal droplet (Fig. 3-2-2h), 中片部屈折 Bent midpiece (Fig. 3-2-2i), 頸部屈折 Bent neck, 遠位細胞質小滴 Distal droplets (Fig. 3-2-2i)

尾部奇形（欠陥）Tail defects:

尾部重複 Double tails (Fig. 3-2-2a), 重度尾部屈曲旋回 Dag defect (Fig. 3-2-2j), 短形尾部 Short tail, 単純旋回尾部 Simple coiled tail (Fig. 3-2-2k), 終末旋回尾部 Terminally coiled tail (Fig. 3-2-2l), 単純屈折尾部 Simple bent tail (Fig. 3-2-2m)

その他の奇形（欠陥）Other defects:

複雑奇形 Teratoid spermatozoa (Fig. 3-2-2n-p), 頭部欠損 Detached tail, 尾部欠損 Detached head

1 つの精子において、奇形が重複して認められた場合は、それぞれカウントを行

なった (128)。

- ・ pH 測定

2005 および 2006 年に精液採取を行なった 23 サンプルにおいて、射出精液の pH 測定を行なった。精液の pH は、pH 試験紙 (DUOTEST, Macherey-Nagel, Dueren, Germany) を用いて、採取後直ちに測定した。

- ・ 正常精子の計測および観察

任意の 20 サンプルの精液を、それぞれ 10 精子ずつ位相差顕微鏡下で計測・観察した (第 2 章参照; $n = 200$)。計測・観察した精子は、形態の正常なものを選んだ。精子を位相差顕微鏡に接続した ORCA-ER (Hamamatsu Photonics Co. Ltd., Hamamatsu) を用いてデジタル撮影した。その精子画像を、解析ソフト AQUA-LITE (Hamamatsu Photonics) の計測ツールを用いて、精子の頭部長、頭部幅、中片部長および全長を測定した。

d) 統計処理

数値による結果は、平均値±標準偏差で表す。採取時期に起因する採取精液性状および各精子奇形の出現率の違いを、一元配置の分散分析を用いて比較した。一元配置の分散分析で有意差が認められた場合、Fisher's PLSD post-hoc test を用いて比較した。P 値は、0.05 未満で有意と判定された。

3-2-3. 結果

a) 精子の形態

正常な精子の形態を Fig. 3-2-1 に示す。精子頭部は、扁平な卵円形であり、前半部に頭帽をかぶり、後半部に向かって緩やかに細まっていた。頸部は、位相差顕微鏡下 1,000 倍で頭部と中片部の連結部分にくびれとして観察された。中片部は尾部の主部と比較して約 1.5 倍太い構造を示し、位相差顕微鏡下 1,000 倍で両境界が明瞭であった。尾部は、終末付近で次第に細くなっていた。

精子の頭部長、頭部幅、中片部長および全長は、それぞれ 6.3 ± 0.4 、 4.5 ± 0.3 、 10.4 ± 0.7 および $69.6 \pm 3.1 \mu\text{m}$ であった。

b) 採取時期に起因する精液性状の違い

採取時期に起因する精液性状の違いを Table 3-2-2 に示す。体重、精巣容量、精液量、精液 pH、精子濃度、総精子数および先体保有率において、異なる採取時期（交尾期初期、交尾期中期および交尾期終了直後）間で有意な差は認められなかった。交尾期初期および中期における精子生存率および原形質膜正常率は、それぞれ交尾期終了直後におけるそれらの値より有意に高かった。

c) 採取時期に起因する出現精子奇形の違い

採取時期に起因する出現精子奇形の違いを Table 3-2-1 に示す。尾部欠損 Detached head の出現率を除き、調べた各奇形および正常精子の出現率において、異なる採取時期間で有意な差は認められなかった。交尾期初期および中期における尾部欠損の出現率は、それぞれ交尾期終了直後のその値よりも有意に低かった。

特に頻繁に観察された奇形は、出現率の順に、単純屈折尾部 ($19.9 \pm 22.6 \%$, Fig. 3-2-2m)、遠位細胞質小滴 ($13.5 \pm 11.7 \%$, Fig. 3-2-2i)、近位細胞質小滴 ($13.5 \pm 11.7 \%$, Fig. 3-2-2h)、複雑奇形 ($6.7 \pm 10.7 \%$, Fig. 3-2-2n~p)、瘤状頭 (4.9 ± 8.6 , Fig. 3-2-2d)、先体反応 ($3.7 \pm 2.8 \%$; Fig. 3-2-2f) および中片部屈折 ($3.7 \pm 5.1 \%$; Fig. 3-2-2i) であった。

3-2-4. 考察

本研究により、ツキノワグマ精子の形態学的特徴を明らかにした。正常な精子の形態学的知見を得ることは、生物学的に重要なだけでなく、奇形精子の検査をする際に有用な指標となる。精子の形態は、動物種によって相違がある。ヒトおよび家畜の精子頭部は扁平な卵円形を、ラットおよびマウスにおいては鎌形を、ニワトリ

においてはヒモ状を呈する (57, 68)。ツキノワグマに近縁な食肉目の動物 (イヌ、ライオン *Panthera leo* およびミンク *Mustela vison*) において、精子頭部は他の家畜と同様に扁平な卵円形を呈するが、一般に他の家畜に比べて精子頭部は厚みがあり、頭長が短く、頭幅が広い (57)。ウシ、ブタおよびイヌにおける精子頭部の大きさ (頭長-頭幅) は、それぞれ $4.2\sim 5.6 - 2.3$ 、 $7.2\sim 9.6 - 3.6$ および $6.5 - 3.5\sim 4.5\ \mu\text{m}$ であり (57)、ツキノワグマの精子頭部は、円形に近いと言われるイヌの精子頭部よりもさらに丸みを帯びていた。精子の大きさも、動物種によって相違がある。一般的に、有袋類は大きな精子を形成する傾向があり (例: ハニーポッサム *Tarsipes rostratus* $356.3\ \mu\text{m}$; タスマニアンデビル *Sarcophilus harrisii* $218.5\ \mu\text{m}$ (全長))、また、体の小さな齧歯類も比較的精子が大きい種が多い (例: ゴールデンハムスター *Mesocricetus auratus* $186.8\ \mu\text{m}$; クマネズミ *Rattus rattus* $158.0\ \mu\text{m}$ (全長)) (22)。一方、体の大きな偶蹄類の精子は、比較的小さいことが多い (例: キリン *Giraffa camelopardalis* $47.8\ \mu\text{m}$; カバ *Hippopotamus amphibious* $33.5\ \mu\text{m}$ (全長)) (22)。ツキノワグマの近縁種であるジャイアントパンダ、イヌおよびネコの精子の全長は、それぞれ 51.2 、 55.3 および $59.3\ \mu\text{m}$ であり、ツキノワグマの精子は、それらと同程度であった (22)。しかしながら、このような精子の大きさの違いが持つ繁殖学的な重要性に関しては理解されておらず、今後の研究が期待される。

交尾期初期および中期における精子生存率および原形質膜正常率は、それぞれ交尾期終了直後におけるそれらの値より有意に高く、交尾期終了直後における精液は人工授精での使用には適さない可能性が示唆された。ツキノワグマの繁殖機能には、明らかな季節変動が認められる。ツキノワグマの交尾期は6月中旬から8月上旬である (129)。精子の形成は、冬眠期である3月頃から始まり、5-7月に活発な精子形成が認められ、交尾期終了直後の9月には精細管内において精子はほとんど見られなくなる (60, 61, 85)。一方、9月に捕殺されたツキノワグマの精巣上体管腔内において、多数の精子が観察されたとの報告がある (77)。精子成熟および貯蔵の場所である精巣上体を精子が通過するのに要する時間は、ウシ、ヤギおよびウサ

ギなどの哺乳類において 10 日前後であり、受精能を保持したまま数週間精巣上体尾部にて貯蔵される (53, 88)。つまり、本研究において交尾期終了直後において採取された精液のほとんどは、精巣上体内で数週間貯蔵された精液であると考えられる。交尾期後においては、精子の貯蔵可能な期間が過ぎると、新たな精子が補充されることはほとんどないため、精液性状の劣化が進むと考えられる。このため、交尾期終了直後の精液性状は、交尾期に比べて劣っていたと考えられる。一方、例外的ではあるが、季節繁殖動物であるウマにおいて、冬期における運動精子の割合と正常形態精子の割合が、交尾期である 5 月におけるそれらよりも有意に高いとの報告もある (7)。ツキノワグマの非交尾期採取精液については、今後、実際に人工授精を行い、その有用性について検討していく必要がある。

尾部欠損の出現率を除き、採取時期の違いにより精子奇形の出現率に有意な差は認められず、調べた期間内でははっきりとした季節変化が認められなかった。交尾期終了直後における尾部欠損の出現率は、交尾期における出現率よりも有意に高かった。尾部欠損は、精子操作の際に二次的に発生するだけでなく、精子自体の老化により発生する (4)。交尾期終了直後におけるこのような変化は、前述の通りである。また、精巣發育不全によっても発生することが報告されている (4)。ツキノワグマの精巣は、生理的な季節変化により 9 月以降退縮していく (85)。このようなツキノワグマの生理状態が、精巣發育不全の状態に似ていたのかもしれない。一方、尾部欠損とほぼ同数が確認されるべき頭部欠損に関しては、有意な差は認められなかったが、交尾期終了直後において高い傾向が認められた。これより、一般精液性状での考察と同様に、交尾期終了直後の精液は、交尾期のものに比べて、人工授精には適さない可能性が示唆された。

正常形態、重要および非重要欠陥の出現率は、調べた時期の間で有意な差は認められず、全期間を通して比較的高い奇形率を示した (重要欠陥 $27.1 \pm 18.0 \%$; 非重要欠陥 $53.6 \pm 30.3 \%$)。家畜の場合、奇形率は通常 10%以下で、20~30%を超える場合は一般に受胎率が低下すると考えられている (68)。実験に用いたツキノ

ワグマを飼育している施設では、自然交配により順調に繁殖が行なわれており、本種においては問題の無い奇形率の範囲であるのかもしれない。しかしながら、凍結保存精液を用いて人工授精を行なう場合は、凍結操作により精子性状が大幅に劣化するため、できる限り奇形率の低い精液を用いるべきである。

本研究においては、奇形の分類を一次・二次奇形ではなく、重要・非重要欠陥で分類した (4, 6, 83)。一次・二次奇形による分類は、その奇形が精子形成の際に発生したものか (一次奇形)、それとも精子が精巣を離れてから発生したものなのか (二次奇形) による。通常、一次奇形は繁殖能力に影響を与えるものが多いが、そうで無いものも多く認められる (4)。一方、重要・非重要欠陥による分類とは、受精能力に障害があるかどうか判断の基準となっている (4, 6, 83)。つまり、重要欠陥とは受精能力に障害があることを示す奇形であり、非重要欠陥とはそれほど重大でない奇形を示す。しかしながら、この分類法にも議論の余地があり、研究者によって若干の違いが見られる。

実験前、交尾期初期の精子には細胞質小滴付着精子などの未熟精子の割合が多く、交尾期終了直後の精子には精子形成不全に関する奇形が出現するのではないかと予期していたが、結果は予想と異なっていた。ほとんどの奇形において明らかな季節変化が認められなかった原因の1つに、個体およびサンプル間の差が大きかったことがあげられる。また、採取時期が近接していたことも原因であると考えられる。

本研究において、最も多く認められた奇形は単純屈折尾部であり、全奇形の約4分の1を占めた。一般に、尾部奇形において屈折は、最も普通に出現する奇形である (81)。単純尾部屈曲は、射出後に精子が低浸透圧環境下に暴露されることによって発生すると考えられている (4)。また、生理食塩液やリン酸緩衝液での精液希釈において急激に精子が冷却されることによっても本奇形が発生する (4)。本研究では、精液検査の際に精子の固定を行なったが、その際の生理食塩液での精液の希釈が単純尾部屈曲発生の一因であるのかもしれない。今後は、精液と生理食塩水の温度を同じくするなどの対策が必要である。

細胞質小滴付着精子の出現率は、調べた時期の間で有意な差は認められなかった。細胞質小滴は、精子が未熟であることを示す (68)。細胞質小滴は、中片部への付着部位により、近位および遠位細胞質小滴に分類される。細胞質小滴は、成熟が進むにつれて中片部上を近位から遠位に移動する (4)。つまり、近位細胞質小滴の方がより未熟であることを示す。近位細胞質小滴の出現は、精子形成異常の兆候であると考えられているが、遠位細胞質小滴の出現はそれほど深刻ではないとされている (4)。本研究では、全期間を通して多くの細胞質小滴付着精子が認められた。未熟であることを示す細胞質小滴が交尾期終了直後にも多くみられたということは、交尾期後もしばらく精子形成があることを示すのかもしれない。しかしながら、過去の研究における組織観察では、9月に精子形成がほとんど認められていない (60, 61, 85)。交尾期終了直後における細胞質小滴の高い出現率については不明である。一方、交尾期においても多くの細胞質小滴が認められた。交尾期初期に、未熟な精子が多いのは当然であると考えられる。交尾期中期に本奇形が多い理由は明らかではないが、自然状態の交尾による射精回数が多い時期であったためかもしれない。細胞質小滴は、採精過度の個体においても認められている (68)。

本研究においては、複雑奇形 Teratoid spermatozoa が、全期間を通して多く認められた。複雑奇形とは、かろうじて精子であると認識できる重度の異常形態を呈する精子奇形を示し、精子形成が阻害されることにより出現する (4)。通常、健康な家畜において、本奇形の出現率は1%未満である (4)。このような奇形が多く認められたのは、これらの個体において精子形成異常があったことを示す。前述の通り、本研究では全体的に高い奇形率が認められている。精子形成異常による高い奇形率の原因については不明であるが、遺伝的・環境的要因のどちらも考えられる。チーターでは、近親交配により高い精子奇形率およびそれに伴う低繁殖率が認められている (82, 95, 127)。実験を行なった施設では、現在のところ近親交配は進んでいない。

結論として、本研究において正常なツキノワグマ精子の形態学的知見が得られた。

また、交尾期初期および中期における精子生存率および原形質膜正常率は、それぞれ交尾期終了直後におけるそれらの値より有意に高く、交尾期終了直後における尾部欠損の出現率は、交尾期における出現率よりも有意に高いことから、交尾期終了直後における精液は、人工授精での使用には適さない可能性が示唆された。

Table 3-2-1. Abnormal morphology rate of Japanese black bear spermatozoa in different seasons (mean \pm SD)

		Early mating season	Mid-mating season	Post-mating season	Overall
No. of males		7	8	7	18
No. of samples		7	8	8	23
Normal morphology		39.9 \pm 28.9	35.0 \pm 23.8	26.3 \pm 22.5	33.4 \pm 24.5
Major defects		34.3 \pm 23.9	23.3 \pm 15.9	24.6 \pm 14.0	27.1 \pm 18.0
Minor defects		38.1 \pm 34.4	55.0 \pm 25.9	65.6 \pm 28.2	53.6 \pm 30.3
Head defects:					
Major	Double heads	0.1 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.4	0.1 \pm 0.3
	Amorphous head	1.3 \pm 1.6	0.6 \pm 0.7	0.4 \pm 0.5	0.7 \pm 1.1
	Pear-shaped head	0.7 \pm 0.8	0.3 \pm 0.7	0.0 \pm 0.0	0.3 \pm 0.6
	Knobbed acrosome	4.3 \pm 8.4	8.1 \pm 11.8	2.3 \pm 3.6	4.9 \pm 8.6
	Nuclear vacuoles	0.1 \pm 0.4	0.1 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.3
Minor	Microcephalic	2.0 \pm 3.3	0.4 \pm 0.7	0.5 \pm 0.5	0.9 \pm 1.9
	Macrocephalic	0.1 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.2
	Acrosome reaction	2.9 \pm 2.4	4.0 \pm 3.6	4.0 \pm 2.3	3.7 \pm 2.8
	Overall	11.6 \pm 11.7	13.5 \pm 15.2	7.3 \pm 4.7	10.7 \pm 11.2
Midpiece and neck defects:					
Major	Double midpiece	0.1 \pm 0.4	0.1 \pm 0.4	0.1 \pm 0.4	0.1 \pm 0.3
	Kinked midpiece	0.1 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.7	0.2 \pm 0.5
	Short midpiece	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.4	0.0 \pm 0.2
	Thin midpiece	0.3 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	0.3 \pm 0.4
	Thick midpiece	1.6 \pm 1.4	0.5 \pm 0.9	0.9 \pm 0.8	1.0 \pm 1.1
	Midpiece with irregular debris	0.1 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.2
	Double neck	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.4	0.1 \pm 0.4	0.1 \pm 0.3
	Proximal droplets	12.7 \pm 8.9	6.3 \pm 4.5	10.3 \pm 8.9	9.6 \pm 7.8
Minor	Bent midpiece	2.0 \pm 2.5	2.8 \pm 3.2	6.1 \pm 7.4	3.7 \pm 5.1
	Bent neck	1.0 \pm 2.6	1.4 \pm 1.6	3.1 \pm 3.4	1.9 \pm 2.7
	Distal droplets	8.4 \pm 10.5	15.1 \pm 12.1	16.3 \pm 12.2	13.5 \pm 11.7
	Overall	26.4 \pm 11.7	26.5 \pm 14.9	37.6 \pm 20.7	30.3 \pm 16.5
	Cytoplasmic droplets	21.1 \pm 8.7	21.4 \pm 12.7	26.5 \pm 20.0	23.1 \pm 14.4
Tail defects:					
Major	Double tails	0.4 \pm 0.8	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.4	0.2 \pm 0.5
	Dag defect (tight bent or coiled)	1.7 \pm 1.4	2.9 \pm 3.5	2.3 \pm 3.0	2.3 \pm 2.7
	Short tail	0.6 \pm 1.0	0.1 \pm 0.4	0.6 \pm 0.7	0.4 \pm 0.7
Minor	Simple coiled tail	2.6 \pm 6.4	3.1 \pm 7.3	0.6 \pm 1.4	2.1 \pm 5.5
	Terminally coiled tail	1.6 \pm 2.7	4.6 \pm 11.5	3.9 \pm 5.4	3.4 \pm 7.4
	Simple bent tail	15.6 \pm 25.1	19.5 \pm 16.8	24.0 \pm 27.2	19.9 \pm 22.6
	Overall	22.4 \pm 33.7	30.3 \pm 30.6	31.5 \pm 34.5	28.3 \pm 31.7
Other defects:					
Major	Teratoid spermatozoa	10.0 \pm 16.7	3.9 \pm 6.0	6.8 \pm 8.1	6.7 \pm 10.7
Minor	Detached tail	1.1 \pm 1.1	2.6 \pm 3.2	4.0 \pm 4.8	2.7 \pm 3.5
	Detached head	0.9 \pm 0.9 ^a	1.5 \pm 0.8 ^a	3.1 \pm 2.2 ^b	1.9 \pm 1.7

Groups with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

The sum of normal morphology, major and minor defects is over 100%, because some spermatozoa have more than one defect.

Table 3-2-2. Semen characteristics, body weight and testes volume of Japanese black bears
in different seasons (mean \pm SD)

	Early mating season	Mid-mating season	Post-mating season	Overall
No. of males	7	16 (8)	7	24 (18)
No. of samples	7	21 (8)	8	36 (23)
Body weight (kg)	105 \pm 13	121 \pm 25	108 \pm 21	115 \pm 23
Testes volume (mm) *	38.6 \pm 2.6	38.3 \pm 3.9	37.5 \pm 2.5	38.1 \pm 3.0
Ejaculate volume (ml)	0.57 \pm 0.52	0.46 \pm 0.36	0.38 \pm 0.30	0.46 \pm 0.38
Ejaculate pH *	7.2 \pm 0.5	7.3 \pm 0.4	7.0 \pm 0.5	7.2 \pm 0.5
Sperm concentration ($\times 10^6$ /ml)	316 \pm 265	659 \pm 644	384 \pm 431	531 \pm 557
Total sperm count ($\times 10^6$)	149 \pm 110	214 \pm 208	162 \pm 200	190 \pm 189
Motility (%)	80.0 \pm 11.5 ^a	82.9 \pm 9.6 ^a	60.6 \pm 30.3 ^b	77.4 \pm 18.5
Viability (%)	94.6 \pm 2.6 ^a	89.3 \pm 9.5 ^a	78.5 \pm 13.7 ^b	87.9 \pm 11.0
Intact acrosomes (%)	97.1 \pm 2.4	97.0 \pm 3.2	96.0 \pm 2.3	96.8 \pm 2.8

*: The numbers of samples of testes volume and ejaculate pH in mid-mating season were 8.

Groups with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

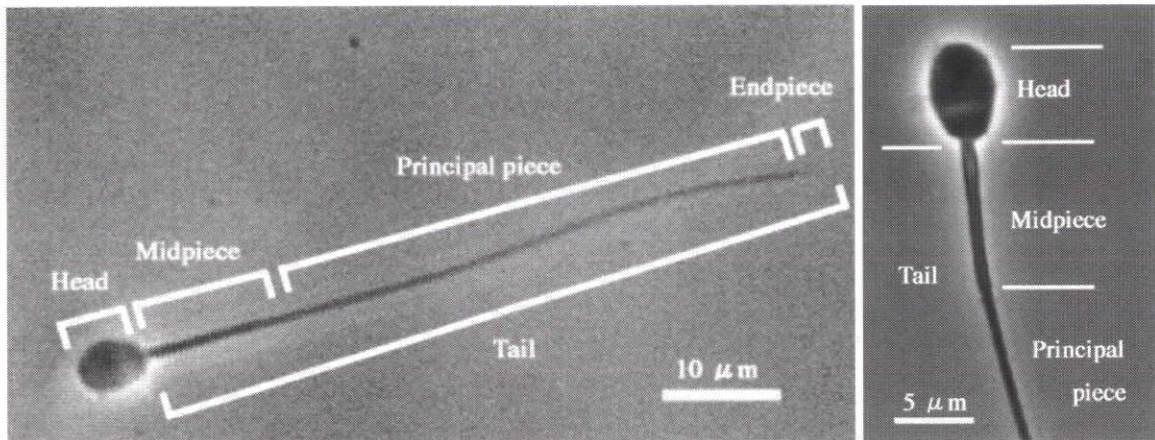


Fig. 3-2-1. Normal morphology of Japanese black bear spermatozoon:
a) Total. b) Anterior half.

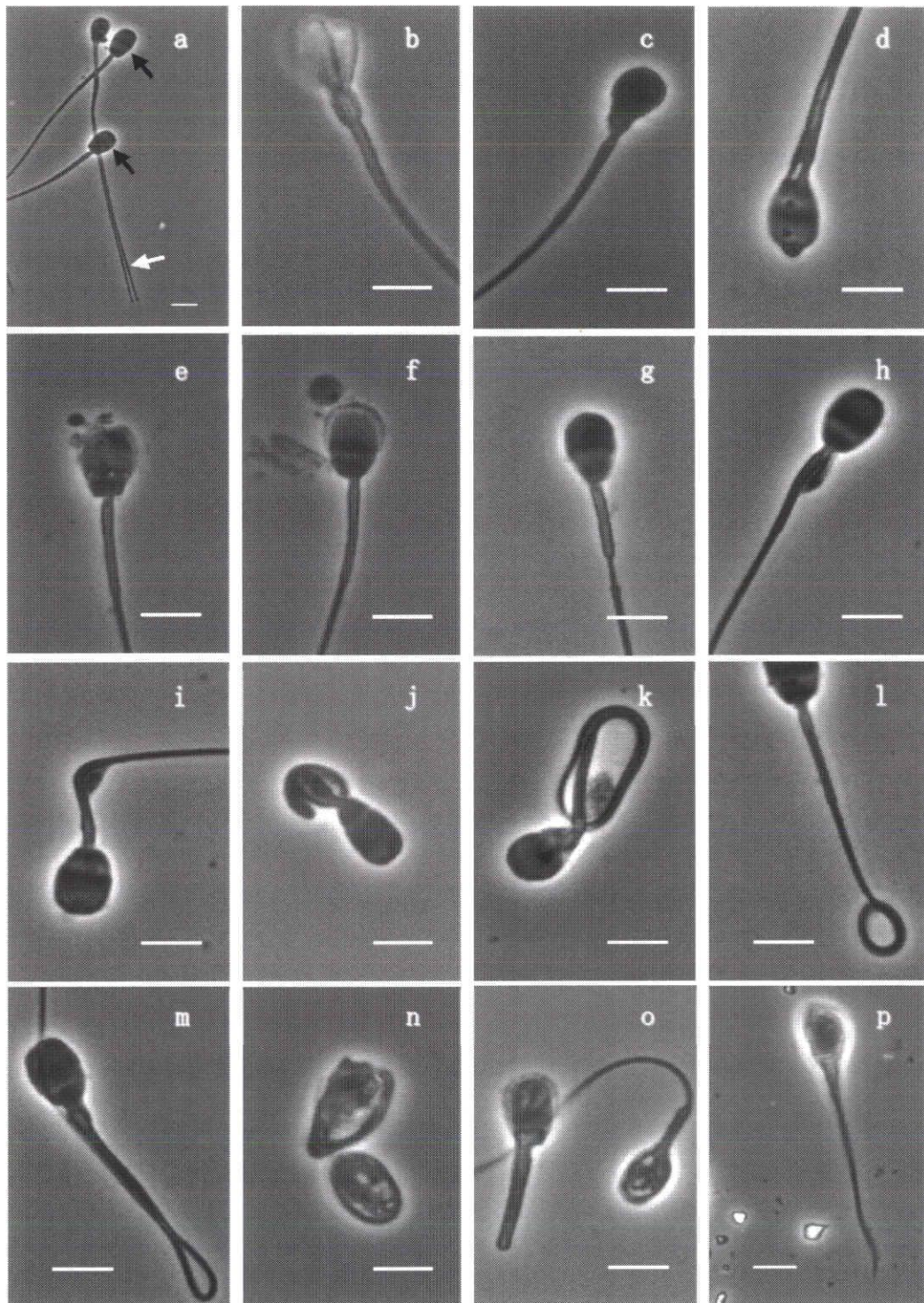


Fig. 3-2-2. Abnormal morphology of Japanese black bear spermatozoa: Bar, 5 μ m. a) Normal morphological sperm (\blacktriangledown) and abnormal sperm with double tails (\diamond) and small amorphous head in some extent . b) Double head and thick midpiece (partly). c) Pear-shaped head. d) Double neck/midpiece and knobbed head. e) Nuclear vacuoles and acrosome reaction. f) Acrosome reaction. g) Thin midpiece (partly). h) Proximal droplet i) Bent midpiece and distal droplet. j) Dag defect. k) Simply coiled tail with (distal?) cytoplasmic droplet. l) Terminally coiled tail. m) Simply bent tail. n~p) Teratoid spermatozoa.

第4章 精液凍結保存

4-1. 異なる希釈液および一次・二次平衡時間が凍結融解後精子性状に及ぼす影響

4-1-1. 背景

日本の本州および四国に生息するニホンツキノワグマは、ツキノワグマの1亜種である。ツキノワグマは、その他の地域では、アジア南部、中国北東部およびロシア極東に広く生息している。近年、ツキノワグマは、生息地の減少や過剰な狩猟などにより生息数が減少しており、IUCNのRed List of Threatened Speciesにおいて、「絶滅危惧II類（絶滅の危険が増大している種）」に分類されている（48）。また、ツキノワグマは「ワシントン条約」においても、最も規制の厳しい「附属書I」に掲載されている。日本国内においては、中部以北では比較的個体数が安定しているが、西日本を中心に個体数を減らしてきている（51）。

野生動物の保全は、まず元来の生息地で行なわれるべきであるが、多くの野生動物種において、その生息数は人間の活動により過去に類を見ない速さで減少しつつある（48）。このような場合、生息地外における人工繁殖が種の保存にとって重要となる。クマ科動物においても精液の凍結保存に関する研究がいくつか見られるが、（29, 45, 86, 87, 92, 110）、異なる精液凍結法を比較研究した報告は少なく、凍結融解後の精液性状は決して良好ではないため、最適な凍結保存法を確立するため、さらなる研究が必要とされている。

ツキノワグマ精液の凍結保存に関しては、著者の属する研究グループ以外が行なった研究報告は今までに無い。著者らは、これまでツキノワグマの精液保存の際に、精液の希釈液として、卵黄-クエン酸-トリス-グルコース液（94）を用いてきた。しかしながら、その他の組成の希釈液を用いた場合の凍結融解後精子への影響は明らかではない。そこで本研究では、従来のものも含めて添加糖類の異なる3種の希釈液を用いて精液を凍結し、融解後の精子性状を比較した。

本研究では、2段階希釈法により精液の凍結保存を行なった。本法は、グリセロールを含まない希釈液で精液を希釈し、冷却・平衡（一次平衡）した後、さらにグリセロールを含む希釈液で希釈し、平衡（二次平衡）した後、凍結保存する方法である（31, 84, 91, 94, 111）。著者らの過去の研究において（84）、一次平衡3時間および二次平衡0時間が、イヌ精液の凍結保存の際に有用であることが判明している。そこで本研究では、従来から用いていた一次平衡1時間と二次平衡1時間による方法と、イヌで結果の良好であった一次平衡3時間と二次平衡0時間による方法を用いて、ツキノワグマ精液の凍結保存を行い、融解後の精子性状を比較した。

本研究の目的は、より良いツキノワグマ精液の凍結保存法を開発するため、3種の精液希釈液と2パターンの一次・二次平衡時間が凍結融解後の精子性状に与える影響を調べることであった。

4-1-2. 材料および方法

a) 供試動物

飼育下成熟雄ツキノワグマ18頭を実験に用い精液を採取した。

b) 精液採取

精液は、交尾期である2003年6月29日～7月31日の間に、全25回、電気刺激射精法により採取した。電気刺激射精法は、第2章に記述した通りである。本実験は、「3-1. 異なる刺激電圧が採取精液に及ぼす影響」と並行して行っており、最大刺激電圧は、10および7Vまでが、それぞれ10および15回であった。

c) 精液検査

精液採取後および凍結融解後に精液検査を行なった。精液検査の方法は、第2章に記述した通りである。

d) 精液凍結保存（実験デザイン）

精液凍結保存法は、第2章に記述した方法に従い、3種の希釈液および2パターンの一次・二次平衡時間を用いて、それらが凍結融解後の精子性状に及ぼす影響を調べた。

採取精液の原形質膜正常率が90%未満、または総精子数が 100×10^6 未満である場合、その精液を凍結保存実験には用いなかった。採取精液の総精子数が、 $100 - 200 \times 10^6$ および 200×10^6 である場合、それぞれ2つおよび4つのアリコートに分けた（Fig. 4-1-1）。

用いた3種の希釈液（一次希釈液）の組成をTable 4-1-1に示す。希釈液は、卵黄-クエン酸-トリス-グルコース液（希釈液1；Diluent 1）（94）、卵黄-クエン酸-トリス-フルクトース液（希釈液2；Diluent 2）（18）および卵黄-クエン酸-トリス-フルクトース-ラクトース-ラフィノース液（希釈液3；Diluent 3）（45, 80）であり、主な違いは添加糖類の種類であった。

2つのアリコートを準備できた場合、それらを希釈液1で希釈した。その後、1つは一次平衡1時間後、二次平衡（グリセロール平衡）1時間を行い（プロトコル1；Protocol 1）、もう1つは一次平衡3時間後、二次平衡時間は特に設けなかった（プロトコル2；Protocol 2）。

4つのアリコートを準備できた場合、うち2つは上記と同じ方法で希釈およびインキュベートし、残り2つはそれぞれ希釈液2および3を用いて希釈後、共にプロトコル1を用いてインキュベートした（Fig. 4-1-1）。

以降の凍結処理は、第2章に記述した通りである。

e) 統計処理

結果は、平均値±標準偏差で表した。異なる希釈液および一次・二次平衡時間に起因する凍結融解後精子性状の違いを、一元配置の分散分析を用いて比較した。P値は、0.05未満で有意と判定された。

4-1-3. 結果

すべての精液採取の試みにおいて、精子を含む射出物が採取された。全 25 回の精液採取のうち、1 回の採取の試みの間に、2 サンプル（射出物を 2 回に分けて採取）得られた場合が 6 回あった。つまり、全 31 サンプルが精液検査の対象となった。31 サンプルのうち、精子原形質膜正常率が 90%以上、かつ総精子数が 100×10^6 以上であったのは、12 サンプルであった。このうち、総精子数が 200×10^6 以上であったのは、10 サンプルであった。（新鮮精液の性状結果は、3-1 参照）。

異なる希釈液を用いて凍結保存した精子の融解後の生存率（%）、原形質膜正常率（%）、奇形率（%）および先体保有率（%）は、希釈液 1 でそれぞれ 25.5 ± 15.4 、 57.6 ± 11.5 、 21.6 ± 10.5 および 72.6 ± 11.8 、希釈液 2 でそれぞれ 16.0 ± 14.5 、 54.3 ± 13.1 、 22.6 ± 11.6 および 70.8 ± 13.6 、希釈液 3 でそれぞれ 28.0 ± 16.4 、 50.4 ± 11.1 、 21.7 ± 9.2 および 65.5 ± 14.6 であった（ $n = 10$; Table 4-1-2）。異なる 3 種の希釈液（希釈液 1、2 および 3）を用いて精液を凍結保存した場合、融解後の精子性状（生存率、原形質膜正常率、奇形率および先体保有率）に統計学的な有意差は認められなかった。

異なる一次・二次平衡時間を用いて凍結保存した精子の融解後の生存率（%）、原形質膜正常率（%）、奇形率（%）および先体保有率（%）は、プロトコル 1 でそれぞれ 26.3 ± 14.6 、 60.5 ± 14.3 、 25.3 ± 13.6 および 73.7 ± 11.3 、プロトコル 2 でそれぞれ 36.3 ± 17.7 、 63.2 ± 10.4 、 26.6 ± 15.4 および 73.6 ± 10.6 であった（ $n = 12$; Table 4-1-3）。異なる 2 パターンの一次・二次平衡時間（プロトコル 1 および 2）を用いて精液を凍結保存した場合、融解後の精子性状（生存率、原形質膜正常率、奇形率および先体保有率）に統計学的な有意差は認められなかった。

4-1-4. 考察

凍結融解後の精子性状が、希釈液の選択による大きな影響を受けなかったことから、本研究で用いたいずれの 3 種の希釈液でもツキノワグマの精液の凍結保存に用

いることができることが示された。

精液希釈液の選択は、凍結精液を用いた人工授精の成功に影響する重要な要因である。しかしながら、クマ科動物において異なる希釈液を比較し、評価する実験はこれまで行なわれてこなかった。希釈液 1 は、著者の配置する研究室において、ツキノワグマ (86) およびイヌ (84) 精液の凍結保存に用いられてきた。希釈液 2 は、イヌ精液の凍結保存に広く用いられている (18)。希釈液 3 は、エゾヒグマ (*Ursus arctos yesoensis*) において用いられており (45)、本来はウシ精液の凍結保存用に開発されたものである (80)。

上記 3 種の希釈液は、異なる糖類を含む。基本の成分であるクエン酸およびトリリスに、グルコース (希釈液 1)、フルクトース (希釈液 2)、またはフルクトース、ラクトースおよびラフィノース (希釈液 3) が加えられている。精液希釈液に含まれる糖類は、外的エネルギー基質、浸透圧調整成分および耐凍剤として重要な働きをする (126)。グルコース、フルクトース、マンノースおよびマルトースなどの糖類は、哺乳類の精子において、エネルギー基質として、ミトコンドリアの酸化的リン酸化および解糖系によって消費される (97)。哺乳類の精子は、浸透圧ストレスに非常に敏感であることが知られており、糖類は希釈液中で浸透圧を調整することにも貢献している (2, 16, 66, 109)。細胞膜を通過できない三糖類であるラフィノースは、マウス精子の凍結保存に耐凍剤として用いられている (62, 113)。

希釈液に用いる最適な糖類は、対象とする動物種によって異なる。ヒツジ精子を凍結保存した場合、グルコースを含む希釈液を用いた方が、フルクトースを用いた場合より、融解後の精子性状が良かった (96)。しかしながら、ブタ (123) およびイヌ (130) 精子の場合、グルコースよりもフルクトースを用いた方が、凍結保存により適していた。本研究では、ツキノワグマ精液を凍結保存する場合、糖類の違いによる大きな差は認められなかった。

ツキノワグマの近縁種であるジャイアントパンダにおいては、一次平衡 3 時間・二次平衡 0 時間が精液凍結保存において用いられている (87)。また、以前の著者

らの研究により、本研究のプロトコル2と同様の凍結保存法（一次平衡3時間・二次平衡0時間）が、イヌ精液の凍結保存に適していることが示された（84）。このイヌでの結果を受け、著者らは野生ツキノワグマから精液を採取し、プロトコル2を用いて精液凍結保存を行なった（86）。その研究では、急激な温度変化を防ぐため採取精液を水に浸した試験管に入れ、さらに保冷剤を入れた発泡スチロール箱に入れて、山中の精液採取地点から車まで移送し、その後車内に設置した移動式冷蔵庫に移し入れ、研究室まで持ち帰った。つまり、山中から研究室までの移動を3時間の一次平衡にあてた。研究室到着後、二次希釈を行い、二次平衡（グリセロール平衡）時間なしで直ちに凍結を行なった。

著者の配置する研究室では、これまでプロトコル1（一次平衡1時間・二次平衡1時間）を用いてツキノワグマ精液の凍結保存を行っていた。過去の野生下ツキノワグマからの精液採取においてはプロトコル2を用いたが（86）、プロトコル1と2のツキノワグマを用いた比較実験を行なっておらず、イヌで良好であったプロトコル2が、ツキノワグマにも適しているのかを本研究で明らかにした。

結果より、凍結融解後の精子性状は、プロトコル1と2の間で統計学的に有意な差は認められず、グリセロール平衡である二次平衡時間を特に設ける必要のないことが示された。このことは、グリセロールは速やかに精子細胞内に浸透していくという報告を支持するものである（125）。プロトコル2は、プロトコル1と同様に、ツキノワグマ精液の凍結保存に有用である。

プロトコル2を用いることにより、野生ツキノワグマの精液凍結保存を効率的に行なうことができる。野生動物から精液を採取する場合、厳しい環境下で精液を取り扱わなくてはならない。二次希釈の際、浸透圧ショックを防ぐため、二次希釈液を分割して添加する必要があるが（50）、このような作業は野外で行なうことを避けることが望ましい。従って、一次希釈のみを野外で行い、二次希釈は環境の整った研究室で行ないたい。一次平衡3時間であるプロトコル2を用いれば、一次平衡時間内に採取地点から研究室まで戻ることができ、研究室での二次希釈が可能とな

る。さらにその後、二次平衡の待ち時間なしで凍結に入ることができるので効率的に作業を進めることが可能となる。

本研究の結果より、結論として、用いたいずれの希釈液もツキノワグマ精液の凍結保存に有用であり、一次平衡を3時間行なえば、二次平衡時間を特に設ける必要のないことが示された。

Table 4-1-1. Components of semen diluent (first extender).

	Diluent 1	Diluent 2	Diluent 3
Citric acid H_2O	1.40 g	-	-
Citric acid, anhydrous	-	1.36 g	0.763 g
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	2.40 g	2.416 g	1.365 g
Glucose	0.80 g	-	-
Fructose	-	1.00 g	0.375 g
Lactose	-	-	1.50 g
Raffinose	-	-	2.70 g
K-Penicillin G	52 mg	52 mg	52 mg
Streptomycin sulfate	80 mg	80 mg	80 mg
Egg yolk	20 ml	20 ml	20 ml
H_2O	80 ml	80 ml	80 ml

Table 4-1-2. Characteristics of Japanese black bear spermatozoa after freezing and thawing using different diluents^{a)}

Diluent	No. of samples examined	% Motility	% Viability	% Abnormal morphology	% Intact acrosomes
Diluent 1 ^{b)}	10	25.5 \pm 15.4	57.6 \pm 11.5	21.6 \pm 10.5	72.6 \pm 11.8
Diluent 2 ^{c)}	10	16.0 \pm 14.5	54.3 \pm 13.1	22.6 \pm 11.6	70.8 \pm 13.6
Diluent 3 ^{d)}	10	28.0 \pm 16.4	50.4 \pm 11.1	21.7 \pm 9.2	65.5 \pm 14.6

a) Cooling and glycerol equilibration times were 1 and 1 h, respectively. Results are shown as means \pm SD.

b) Egg yolk-TRIS-Citrate-Glucose.

c) Egg yolk-TRIS-Citrate-Fructose.

d) Egg yolk-TRIS-Citrate-Fructose-Lactose-Raffinose.

Table 4-1-3. Characteristics of Japanese black bear spermatozoa after freezing and thawing following different times for cooling and glycerol equilibration^{a)}

Incubation time	No. of samples examined	% Motility	% Viability	% Abnormal morphology	% Intact acrosomes
Cooling for 1 h Glycerol equilibration for 1 h	12	26.3 \pm 14.6	60.5 \pm 14.3	25.3 \pm 13.6	73.7 \pm 11.3
Cooling for 3 h Glycerol equilibration for 0 h	12	36.3 \pm 17.7	63.2 \pm 10.4	26.6 \pm 15.4	73.6 \pm 10.6

a) Diluent 1 (Egg yolk-TRIS-Citrate-Glucose) was used. Results are shown as mean \pm SD.

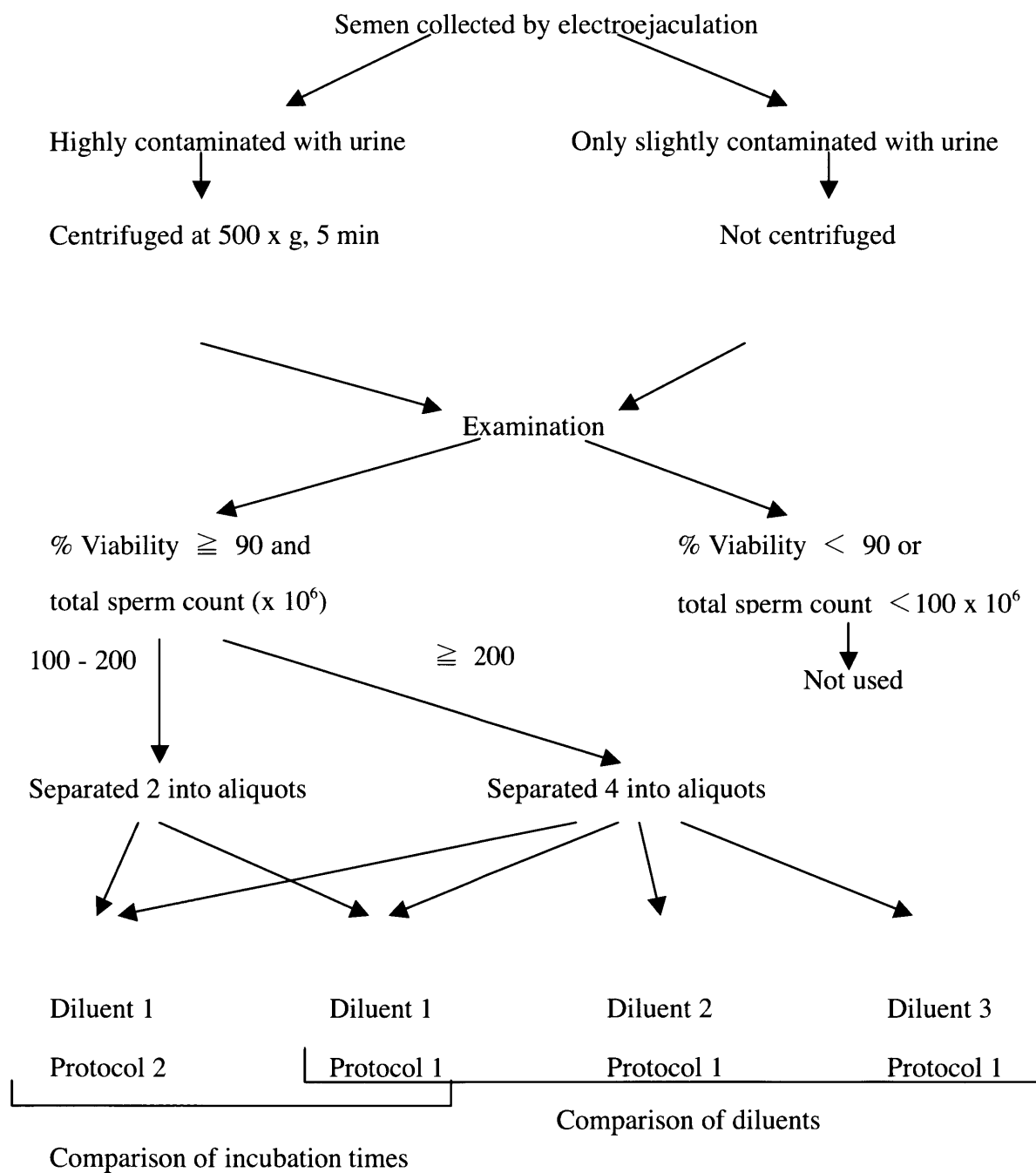


Fig. 4-1-1. Methods used to evaluate different conditions under which to cryopreserve Japanese black bear semen.

4-2. 異なるグリセロール濃度が凍結融解後精子性状に及ぼす影響

4-2-1. 背景

近年、ツキノワグマは、生息地の減少や過剰な狩猟などにより、生息数が減少している (48)。精液の凍結保存は、種の保存のための重要な技術の 1 つである。ツキノワグマを含めて、クマ科動物において、精液の凍結保存に関するいくつかの研究が報告されている (29, 45, 86, 87, 92, 110)。しかしながら、凍結融解後の精液性状は、十分満足いくものではなく、さらなる凍結保存法の改良が望まれている。

グリセロールは、精液凍結保存の耐凍剤として、広く家畜や野生動物に用いられてきた (126)。そして、最適なグリセロール濃度は、動物種によって異なることが知られている (1)。また、グリセロールは過剰な添加により、精子の原形質膜や先体を破壊するなどの有害な作用が認められている (39, 70)。このため、動物種ごとに最適なグリセロール濃度を確認しておく必要があるが、ツキノワグマを含め、クマ科動物においては、このような研究報告はない。

本研究の目的は、ツキノワグマの精液保存の際に、異なるグリセロール濃度が、凍結融解後の精子性状に与える影響を調べることであった。

4-2-2. 材料および方法

a) 供試動物

飼育下成熟雄ツキノワグマ 7 頭を実験に用い精液を採取した。

b) 精液採取

精液は、交尾期である 2005 年 6 月 19 日～7 月 22 日の間に、全 7 回、電気刺激射精法により採取した。電気刺激射精法は、第 2 章に記述した方法に以下に記述する改良を加えて行なった。膀胱内の尿を除去後、さらに約 38℃に温めた滅菌生理食塩液で膀胱内をフラッシングした。フラッシングは、回収される生理食塩液が黄色から無色になるまで 2～5 回行なった。これにより、膀胱内の尿がほぼ完全に除

去された。最大刺激電圧は 7V であった。

c) 精液検査

精液採取後および凍結融解後に精液検査を行なった。第 2 章に記述した検査に加えて、尿と生理食塩液の混入具合を判断するため、射出精液の色を記録した。

(なお、第 3 章の「3-1. 異なる刺激電圧が採取精液性状に及ぼす影響」では、膀胱を生理食塩液で洗浄する作業を行なっていないため、尿混入の明らかな影響が新鮮精子の性状に現れた。しかしながら、本節の実験では、いったん洗浄により膀胱内の尿は除去され、少量の生理食塩液と置き変っているため、採取精液にはごく少量の尿の混入（刺激中に尿が生成）のみしか認められなかったため、新鮮精子の性状に影響がなかった。つまり、3-1 の実験で尿が混入したと判断した精液の色合いと、本研究で尿が混入したと判断した色合いは異なり（3-1 の方が濃い）、その点を区別する目的で、本節の実験では、採取精液の色合いを直接、「尿の混入の有無」と表現するのを避けた。）

d) 精液凍結保存

精液凍結保存法は、第 2 章に記述した方法を基本とし、一部方法を変更して、異なるグリセロール濃度 4, 6, 7, 8, 10 および 12% が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響を調べた。採取した精液は、すべて凍結保存実験に用いた。採取精液の精子濃度が $200 \times 10^6/\text{ml}$ 以上であった場合、一次希釈液（卵黄-クエン酸-トリス-グルコース液（94））を加えて精子濃度が $100 \times 10^6/\text{ml}$ となるように希釈した。精子濃度が $200 \times 10^6/\text{ml}$ 未満であった場合、一次希釈液により等倍希釈した。一次希釈精液を、6 つのアリコートに分け、4°C で 3 時間一次平衡した。グリセロール濃度がそれぞれ 8, 12, 14, 16, 20 および 24 v/v% である二次希釈液で、一次平衡後の希釈精液を等倍希釈した。つまり、二次希釈後の最終グリセロール濃度は、4, 6, 7, 8, 10 および 12 v/v% であった。二次平衡時間は、特に設けなかった。長さ 70 mm に短く切った 0.5 ml ストロー（富士平工業株式会社、東京）に、二次希釈後の精液

を 0.2 ml ずつ注入し、ストローパウダーで閉じた。このようにストロー1 本当たりの精液量を少なくしたのは、限られた採取精液で 6 段階のグリセロール濃度を比較するためであった。少量の希釈精液を短くしていないストローに注入すると、ストロー内に空気の層ができ、液体窒素中で浮遊してしまうため、ストローは短くして使用した。

以降の凍結処理は、第 2 章に記述した通りである。

e) 統計処理

結果は、平均値±標準偏差で表した。異なるグリセロール濃度に起因する凍結融解後精子性状の違いを、一元配置の分散分析を用いて比較した。一元配置の分散分析で有意差が認められた場合、Fisher's PLSD post-hoc test を用いて比較した。P 値は、0.05 未満で有意と判定された。

4-2-3. 結果

各個体より、1 サンプルずつ合計 7 サンプルの精液を採取した。新鮮精液の精液量 (ml)、精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)、生存率 (%)、原形質膜正常率 (%)、先体保有率 (%) および奇形率 (%) は、それぞれ 0.59 ± 0.45 、 221.4 ± 130.9 、 77.1 ± 11.1 、 93.9 ± 2.3 、 95.4 ± 2.2 および 49.7 ± 32.9 であった ($n = 7$: Table 3-2-1)。観察された主な精子奇形は、尾部旋回 ($10.4 \pm 16.9\%$) および尾部屈曲 ($18.0 \pm 23.2\%$) であった。採取精液の色は、白色透明 ($n = 4$) および白黄色透明 ($n = 3$) であり、その色合いの違いにより、採取新鮮精子の性状に有意な差は認められなかった (Table 4-2-1)。

凍結融解後の精子性状を Table 4-2-2 に示す。凍結融解精子の生存率および奇形率において、異なるグリセロール濃度間で有意な差は認められなかった。グリセロール 4 および 6% で凍結保存した凍結融解後精子の原形質膜正常率および先体保有率は、グリセロール 10 および 12% で凍結保存した場合よりも有意に高かった。

4-2-4. 考察

著者の属する研究グループでは、ツキノワグマ精液の凍結保存の際、グリセロール濃度 8%を慣習的に用いてきた (86)。しかしながら、本研究により、より低いグリセロール濃度である 4 および 6%を用いた方が、原形質膜正常率と先体保有率が良好であることが判明した。グリセロール濃度 4%未満が及ぼす影響に関しては、本節の実験結果からは不明である。高グリセロール濃度による毒性は、グリセロール 10%以上で明らかに現れた。著者らが以前用いていたグリセロール濃度 8%は、ツキノワグマ精液の凍結保存に適していないことが判明した。哺乳動物の精液の凍結保存において、2〜10%の範囲のグリセロール濃度が用いられてきている (1)。ツキノワグマの近縁種であるヒグマ (45) およびジャイアントパンダ (87, 110) 精液の凍結保存においては、それぞれグリセロール濃度 4.7%および 4〜5%が用いられている。本研究結果は、これら他のクマ科動物における慣習的グリセロール濃度を支持する。

最適な耐凍剤濃度は、動物種による違いと同様に、冷却速度による影響も受ける (27, 126)。著者の用いた凍結保存法は、特別な装置を必要とせず、野生動物を対象として用いるのに有用である。本方法では、精液ストローは発泡スチロール箱の中で、液体窒素の蒸気で冷却された。一般に、より低いグリセロール濃度は、より速い冷却速度を必要とする (126)。ツキノワグマ精液の凍結保存において、本方法を用いた場合、今回調査した範囲では、グリセロール濃度は 4〜6%が適切であると考えられる。

ヒツジ (27)、ウマ (19)、ブタ (15) およびアカゲザル (*Macaca mulatta*) (106) などの動物種においては、異なるグリセロール濃度が凍結融解後の精子生存率に影響した。しかしながら、ツキノワグマを用いた本研究においては、異なるグリセロール濃度は生存率および奇形率のどちらにも大きく影響しなかった。原形質膜および先体は、凍結融解のストレスの影響を特に受けやすい (126)。精子の原形質膜正常率と先体保有率は、グリセロール毒性の鋭敏な指標であるといえる。

本研究では、凍結融解後に大幅に精子性状が劣化した。本研究における凍結融解後の精子性状は、本章の「4-1. 異なる希釈液および一次・二次平衡時間が凍結融解後精子性状に及ぼす影響」での結果（生存率 $36.3 \pm 17.7\%$ 、原形質膜正常率 $63.2 \pm 10.4\%$ 、先体保有率 $73.6 \pm 10.6\%$ および奇形率 $26.6 \pm 15.4\%$ ；グリセロール濃度 8%）よりも劣っていた。この理由は、用いた新鮮精液の性状がもともと悪かったことが影響しているのかもしれない。それを示すように、本研究では、新鮮精子の奇形率が高く、尾部旋回や尾部屈曲などの二次奇形が多く認められた。採取精液の色合いの違いにより、新鮮精子の性状に有意な差は認められなかったことから、新鮮精子における高い奇形率は、尿の混入により起こったとは考えにくい。採取精液の色合い、つまり尿の混入が新鮮精子の性状に影響しなかったのは、採精前に膀胱内を生理食塩液で洗浄したため、尿の混入がごく少量であったためであると考えられる。一方、膀胱を洗浄したにも関わらず、尿の混入が起こったのは、電気刺激中に尿が生成されたためかもしれない。また、採取精液の色合いが白色透明から白黄色透明を示したことから、精液は洗浄用の生理食塩液の混入により希釈されているものと考えられる。一般に、生理食塩液は、精子にとって無害であると考えられているが、高張環境である精巣上体内に貯蔵されていた精子が、より低い浸透圧である生理食塩液に突然暴露されたため、精子の原形質膜が傷害を受けたのかもしれない。高浸透圧環境から等浸透圧環境（通常精液と同様の浸透圧）に戻した場合に、精子の原形質膜が破壊されることが数種の動物で報告されている（1, 93, 108, 109）。このことが、新鮮精液における高い二次奇形率と、低い耐凍性の原因であるのかもしれない。膀胱の洗浄法については、再検討が必要であると考えられる。

結論として、グリセロール 4 および 6% で凍結された精子は、グリセロール 10 および 12% で凍結された場合よりも、凍結融解後の原形質膜正常率および先体保有率が有意に高く、このことからツキノワグマ精液の凍結保存には、今回調べた範囲では、グリセロール濃度 4～6% がもっとも適していることが示された。

Table 4-2-1. Characteristics of fresh semen collected by electroejaculation in Japanese black bears.

Appearance ^{a)}	% Motility	% Viability	% Intact acrosome	% Abnormal morphology
White transparent (n = 4)	77.5 ± 12.6	93.3 ± 2.8	94.5 ± 2.6	55.5 ± 37.4
White yellow transparent (n = 3)	76.7 ± 11.5	94.7 ± 1.5	96.7 ± 0.6	42.0 ± 31.6
Total	77.1 ± 11.1	93.9 ± 2.3	95.4 ± 2.2	49.7 ± 32.9

a) Appearance was used for judgment of urine contamination. A yellow color indicates contamination of semen with urine.

The values shown are means ± SD. There is no significant difference in semen characteristics between the appearances.

Table 4-2-2. Characteristics of frozen-thawed spermatozoa cryopreserved with different glycerol concentrations in Japanese black bears.

Glycerol concentration (%)	% Motility	% Viability	% Intact acrosome	% Abnormal morphology
4	23.6 ± 13.5	63.3 ± 19.6 ^a	53.9 ± 12.5 ^a	47.3 ± 37.2
6	25.0 ± 12.9	60.1 ± 26.1 ^a	53.9 ± 14.2 ^a	45.1 ± 35.9
7	20.7 ± 6.7	57.6 ± 22.7 ^a	43.9 ± 19.4 ^{a,b}	45.9 ± 31.7
8	25.7 ± 12.4	48.3 ± 20.3 ^{a,b}	39.0 ± 12.7 ^{a,b,c}	51.6 ± 34.9
10	15.0 ± 7.1	26.0 ± 12.1 ^b	29.0 ± 14.6 ^{b,c}	50.9 ± 35.8
12	15.7 ± 6.1	30.6 ± 23.5 ^b	24.3 ± 22.6 ^c	48.4 ± 33.1

The values shown are means ± SD. Groups with different superscripts in the same column are significantly different (P < 0.05).

第5章 排卵様式・排卵誘起

5-1. 隔離飼育実験による排卵様式の解明

5-1-1. 背景

日本の本州と四国に生息するニホンツキノワグマは、アジアからロシアにかけて広く生息するツキノワグマの1亜種である。ニホンツキノワグマ（以下、ツキノワグマ）には、北半球に生息する他のクマ科動物と同様に、特有の繁殖特性が認められる（28, 37, 47, 90, 116, 118, 120）。

ツキノワグマの交尾期は、6月中旬から8月上旬であり（129）、出産は冬眠の中期にあたる1月下旬から2月上旬に起こる（98-100）。約6-7ヶ月の妊娠期間は、着床遅延期間を含み、11月下旬から12月上旬に胚の着床が起こる（100, 121）。雌における血清中性ステロイドホルモン濃度は、このような繁殖状態に伴って変化する（98-100）。

哺乳動物は、その排卵様式によって「交尾排卵動物 induced (reflex or copulatory) ovulator」もしくは「自然排卵動物 spontaneous ovulator」に分類される（72）。交尾排卵 induced ovulation は、交尾行動の際の外的刺激（主に陰茎の挿入による刺激）によって引き起こされる LH サージによって起こる。交尾排卵動物とは、このような排卵様式を基本的に行なう動物であると定義できる（72）。一方、自然排卵 spontaneous ovulation は、交尾をしていない雌においても、動物種によって決められた一定の間隔でくり返される排卵で、自然排卵動物とは、このような排卵様式を基本的に行なう動物であると定義できる（72）。

ジャイアントパンダが自然排卵動物であることは、以前から判明していたが（17, 24, 107）、その他のクマ科動物が、交尾排卵動物であるか自然排卵動物であるかについては、長年にわたって議論されてきた（8, 72, 90）。近年、Boone et al. (10) は、アメリカクロクマが交尾排卵動物であることを結論づけた。彼らは、雄と雌の隔離実験を行ない、血清中のプロジェステロン濃度の上昇を確認すると共に、直接腹腔

鏡により黄体の形成を確認することにより、排卵を確認した。そして、雄と隔離したほとんどの雌が排卵せず、雄と同居させたほとんどの雌が排卵したと報告した。しかしながら、雄と交尾していないクマ科動物（ジャイアントパンダを除く：以下同様）の血清もしくは糞中のプロジェステロン濃度が、交尾期後に高値を示したとの報告がいくつか見られる(89, 99, 101, 118, 120)。プロジェステロン濃度の上昇は、これらのクマにおいて、排卵と卵胞の黄体化が起こったことを意味しているのかもしれない。このことは、クマ科動物は交尾無しで排卵するかもしれないことを示唆している。しかしながら、ネコを含む交尾排卵動物において、交尾刺激（膣への機械的刺激）無しでも、例外的に排卵することが知られている(33, 65)。このような例外発生の可能性があるため、クマ科動物が交尾排卵動物であるのか自然排卵動物であるのかの決定が、より複雑な問題となっている。

山本ら(129)は、飼育下ツキノワグマの性行動を観察し、交尾排卵動物に見られるような、個体毎に長さが異なる長い発情期間を持つことを報告した。Sato et al. (99)の報告によると、交尾をしたすべての雌ツキノワグマが12月に有意なプロジェステロン濃度の上昇を示した一方、交尾をしなかった雌の5頭中2頭も交尾をした雌と同様のプロジェステロン濃度の変化を示した。著者は、このような過去の研究から、ツキノワグマは交尾排卵動物であるが、例外的に交尾以外の何らかの外的刺激により排卵することもあると仮説を立てた。

本研究の目的は、排卵に関わる性ステロイドホルモンを測定することにより、ツキノワグマが交尾刺激排卵動物であるかどうかを確かめること、およびどれくらいの割合で交尾刺激なしで排卵に至るのかを知ることであった。

5-1-2. 材料および方法

a) 供試動物および飼育形態

雌雄の飼育下成熟ツキノワグマを実験に用いた。雌ツキノワグマ11頭を、A、B、C および D の4グループに、それぞれ2、3、3 および3頭に分けた。グループ毎

に、交尾期前から屋内の飼育部屋（3.47×4.88 m）で飼育した。なお、本研究における交尾期とは、6月中旬から8月上旬を指す。グループ別の供試ツキノワグマの飼育状況の詳細は、以下の通りである。

グループ A（雄同居群）：雌ツキノワグマ、No. 1 および 2 を 1 頭の雄と一緒に、交尾期である 2004 年 6 月中旬から 7 月下旬の間飼育し、交尾の機会を与えた (Fig. 5-1-1. a)。雄による雌へのマウンティングが時々観察されたが、陰茎の挿入は不明であった。雄を雌から隔離した後も、これらの雌は 2004 年 11 月下旬まで一緒に飼育された。これらの雌は、最終的に出産予定期である 2 月を過ぎても出産が認められなかった。

グループ B（雄対面群 1）：雌ツキノワグマ、No. 3、4 および 5 を、2003 年 5 月下旬から 10 月下旬の間、一緒に飼育した。隣接する飼育部屋に 1 頭の雄を交尾期初～中期である 6 月下旬から 7 月下旬の間飼育した (Fig. 5-1-1. b)。雌は、檻の格子のすき間を通して雄を見たり、匂いを嗅いだり、すき間から前肢や鼻先を出して、雄に触れたり、触れられたりすることが可能であったが、格子に隔てられているため交尾は不可能であった。

グループ C（雄対面群 2）：雌ツキノワグマ、No. 6、7 および 8 を、2003 年 5 月下旬から 10 月下旬の間、一緒に飼育した。隣接する飼育部屋に 1 頭の雄を交尾期後期～交尾期終了後にあたる 7 月下旬から 10 月下旬の間飼育した (Fig. 5-1-1. c)。グループ B と同様に、雌は檻の格子のすき間を通して雄との接触は可能であったが、交尾は不可能であった。グループ B と C との違いは、雄を隣接して飼育させた時期の違いであった。

グループ D（雄隔離群）：雌ツキノワグマ、No. 9、10 および 11 を、雄から身体的および視覚的に完全に隔離して、2005 年 5 月下旬から 9 月下旬の間、一緒に飼育した (Fig. 5-1-1. d)。しかしながら、雄の聴覚的および嗅覚的刺激への暴露はあった。つまり、この飼育施設には、約 40 頭の成熟雄ツキノワグマが飼育されており、実験グループの雌であっても、少し離れた場所（> 約 3 m）から雄の鳴き声を

聞いたり、臭いを嗅いだりすることが可能であった。

b) 採血

第 2 章の記述に従い、採血を 5 月下旬から 10 月下旬の間に、各雌ツキノワグマから 4〜6 回行なった。

c) 血清中性ステロイドホルモン濃度の測定

第 2 章の記述に従い、血清中のプロジェステロンおよびエストラジオール-17 β 濃度を TR-FIA 法を用いて測定した。

d) 卵巣の観察

犬猫で用いられている常法を用いて、8 月下旬にグループ D の雌に卵巣摘出術を行なった。採取した卵巣は、10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定した。固定した卵巣は、矢状面で約 3 mm 間隔に切断し、卵胞および黄体を観察した。切断観察後、卵巣を常法に従い、脱水後、パラフィン包埋した。その後、パラフィン包埋した卵巣組織を厚さ 4 μ m に薄切し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、光学顕微鏡下で卵胞および黄体を組織学的に観察した。

e) 統計処理

結果は、平均値 \pm 標準偏差で表す。グループ A、B および C において、それぞれ、交尾期である 6 月中旬から 8 月上旬のプロジェステロン濃度と、着床遅延期後半にあたる 10 月下旬のプロジェステロン濃度の違いを調べるため、スチューデントの t 検定を用いて検定を行なった。もし、雌ツキノワグマが排卵していれば、本研究では着床期（11 月末から 12 月初め）に一番近い 10 月下旬に、プロジェステロン濃度は最高値に達すると考えられることに基づき (Sato et al., 2001)、この時期の値を、交尾期のプロジェステロン濃度と比較した。P 値は、0.05 未満で有意と判定さ

れた。

5-1-3. 結果

各グループのそれぞれの雌における血清中プロジェステロン濃度の推移を Fig. 5-1-2 に示す。交尾期である 6 月中旬から 8 月上旬における、グループ A, B, C および D の雌の血清中プロジェステロン濃度は、それぞれ 0.87 ± 0.27 , 1.35 ± 0.82 , 1.13 ± 0.80 (Fig. 5-1-3) および 1.13 ± 0.63 ng/ml であった。一方、着床遅延期後半にあたる 10 月下旬における、グループ A, B および C の雌の血清中プロジェステロン濃度は、それぞれ 4.23 ± 2.97 , 2.66 ± 0.45 および 2.47 ± 0.64 ng/ml であった (Fig. 5-1-3)。グループ A, B および C の雌の 10 月下旬の血清中プロジェステロン濃度は、交尾期に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。

すべての雌の血清中エストラジオール- 17β 濃度は、5 月下旬から 10 月下旬において 12.5 ± 5.1 pg/ml であり、季節的な変化は認められなかった (Fig. 5-1-4)。

卵巣摘出術によって 8 月下旬に採取したグループ D の雌の卵巣に、黄体は認められず、卵胞はすべて直径 7 mm 以下であった (Fig. 5-1-5~7)。

5-1-4. 考察

Sato et al. (99) の報告によると、妊娠および偽妊娠ツキノワグマにおける血清中プロジェステロン濃度は、5~7 月に低値を示し (概ね < 1.0 ng/ml)、着床遅延期間にあたる 8~10 月には上昇した (概ね $2\sim 5$ ng/ml)。続いて、11 および 12 月に、明らかに高いプロジェステロン濃度を示し (概ね $10\sim 20$ ng/ml)、その高値は 1 月に激減するまで続いた。一方、非妊娠ツキノワグマは、持続的に低いプロジェステロン濃度を示した (概ね < 1.0 ng/ml)。アメリカクロクマ (28, 37)、ホッキョクグマ (90)、ヒグマ (118, 120) などの他のクマ科動物の妊娠個体においても、プロジェステロン動態の傾向は、ツキノワグマにおける研究結果と同様の傾向を示した。

上述したように、妊娠および偽妊娠グマにおいて、妊娠の維持に働くプロジェス

テロン濃度の上昇は、交尾期終了後に認められる (28, 37, 90, 99, 118, 120)。プロジェステロンは、食肉動物においては、主に黄体から分泌される (23, 71)。そして、正常では卵胞の黄体化は排卵に続いて起こる。したがって、交尾期終了後に起こるプロジェステロン濃度の上昇は、排卵が起こった可能性を示している。

本研究において、グループ A、B および C の雌の 10 月下旬における血清中プロジェステロン濃度は、交尾期に比べて有意に高かった。排卵したツキノワグマ（妊娠もしくは偽妊娠）のプロジェステロン濃度は、交尾期後に着床期まで徐々に上昇する (99)。従って、グループ A、B および C のすべての雌において、排卵が起こったものと推測された。このことは、雄と一緒に飼育し交尾を許した雌、および雄と檻越しに隔離して飼育し交尾をさせなかった雌のすべてが排卵した可能性を示している。

高いプロジェステロン濃度は、排卵することなく卵胞が黄体化したことにより引き起こされたと考えることもできるかもしれない。実際に、排卵なしでの大型卵胞の黄体化が、交尾排卵動物であるヒトコブラクダ (*Camelus dromedarius*) において報告されている (78)。このような場合、プロジェステロン濃度の上昇は、交尾期の間に急激に起こる。しかしながら、本研究におけるプロジェステロン濃度の上昇は、交尾期終了後 (10 月下旬) に遅れて起こっている。このプロジェステロン動態は、前述したように、妊娠および偽妊娠ツキノワグマと同様であった (99)。従って、本研究における高いプロジェステロン濃度は、排卵した黄体によって引き起こされたと推測するのが妥当である。

グループ D における排卵の有無の確認は、卵巢の直接観察により行なった。卵巢の採取は、黄体が形成されている場合の黄体の成長期間を見込んで、交尾期終了後の 8 月下旬に行なった。グループ D のいずれの雌においても黄体は確認されなかった。このことから、雄から身体的および視覚的に隔離した雌は、排卵に至らなかったことが示唆された。

本研究において、雄との交尾を許したすべての雌が排卵したと推測され、雄と隔

離したすべての雌が排卵しなかった。このことは、ツキノワグマが交尾排卵動物であることを示唆している。この結果は、Boone et al. (10) によるアメリカクロクマの報告と同様である。本研究では、雄と同居して交尾をすることができた雌が、実際に陰茎の挿入を伴う交尾を行なったかどうかは不明であった。しかしながら、雄と隔離した雌と比較して、より密接な雄の刺激により、排卵が起こったのではないかと推測された。

さらに、本研究では、雄と檻越しに接触することはできたが、交尾はできない状態であったすべての雌において排卵が起こったものと推測された。このことから、ツキノワグマは、交尾刺激なしで高率に排卵することが示唆された。雄と対面させる時期の違いは、排卵に影響しなかった。交尾をしていないクマ科動物が偽妊娠に至ったとの報告がいくつかみられる (89, 99, 101, 118, 120)。ネコは交尾排卵動物としてよく知られているが、Gudermuth et al. (33) は、多頭飼育した若齢ネコの 87% が交尾刺激なしで自然に排卵したと報告している。交尾刺激なしでの排卵は、発情中の雌ネコにおいて、個別にケージ飼った雄にしばらく暴露した（交尾はできない状態）後に、より頻繁に起こった。Gudermuth et al. (33) は、この原因を雄の視覚的および嗅覚的刺激が、排卵に影響したからではないかと推測した。本研究において、グループ B および C の雌は、鉄格子によって雄と隔離されていたが、格子のすき間を通して雄に接触したり、声を聞いたり、匂いを嗅いだり、見たりすることができた。したがって、交尾を伴わない雄の何らかの性的な刺激が、これらの雌の排卵を誘起したのかもしれない。

一方、少し離れた距離から雄の声や臭いなどの刺激を感知することができたにもかかわらず、雄から身体的および視覚的に隔離された雌（グループ D）は、排卵に至らなかった。距離があるため比較的弱くなってしまった雄の刺激では、排卵を誘起させることはできなかったのだろう。雄との身体的接触が可能であり、雄を見ることができた雌ツキノワグマ（グループ B および C）が排卵したと推測されたことから、身体的および視覚的刺激が、ツキノワグマの排卵にとって重要であるのかも

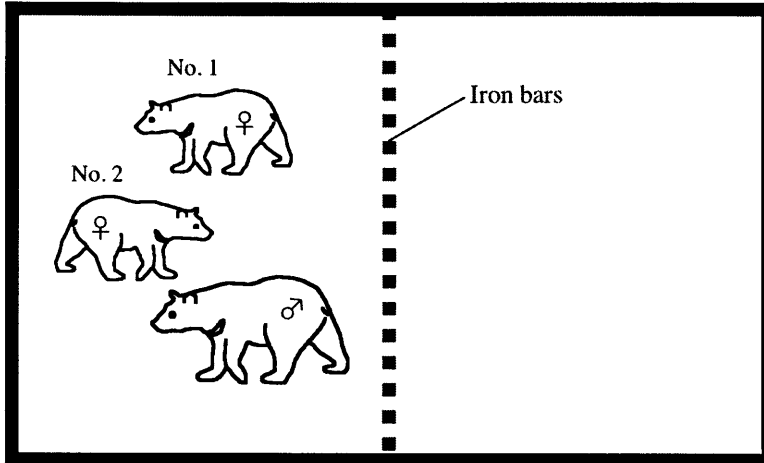
しれない。ツキノワグマにおいて、排卵を誘起するためには、雄のどのような種類の刺激がどのくらい必要であるのかを知るため更なる研究が望まれる。

ツキノワグマは、交尾期中に比較的長い発情期間を示す種であるにもかかわらず (129)、本研究において検査したすべての血清中エストラジオール-17 β 濃度は、30 pg/ml 未満と低値を示した。本研究と同様に、過去のツキノワグマの研究においても (99, 100)、交尾期中のエストラジオール-17 β 濃度のピークは認められていない。非侵襲的かつ高頻度のサンプリングが可能となる、糞もしくは尿中の性ステロイドホルモンの測定法の確立が、発情周期や排卵様式を明らかにするのに必要である。

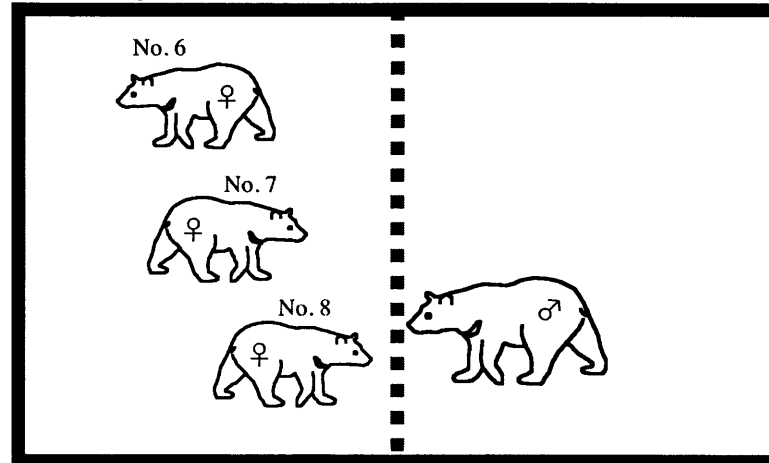
本研究において、交尾期間中に比較的高いプロジェステロン濃度 (概ね 1–2 ng/ml) が時折認められた。著者は、有害捕獲個体などの野生ツキノワグマを数多く解剖してきているが、7 月以前の卵巣に黄体を観察したことは、未だかつてない (岡野、未発表データ)。過去の研究においても (99, 100)、交尾期前もしくは交尾期中に、高い血清中プロジェステロン濃度 (概ね 1–4 ng/ml) が時折認められている。Sato et al. (99) は、交尾排卵動物であるミンク (*Mustela vison*) (64) などで報告されているように、閉鎖卵胞の黄体化が比較的高いプロジェステロン濃度の原因ではないかと推測している。交尾期前もしくは交尾期間中に認められる高いプロジェステロン濃度は、Sato et al. (99) の仮説により、説明できるであろう。

結論として、血清中プロジェステロン濃度の上昇を基にして、ツキノワグマは交尾排卵動物であり、交尾刺激を伴わない雄の何らかの刺激により高率に排卵することが推測された。

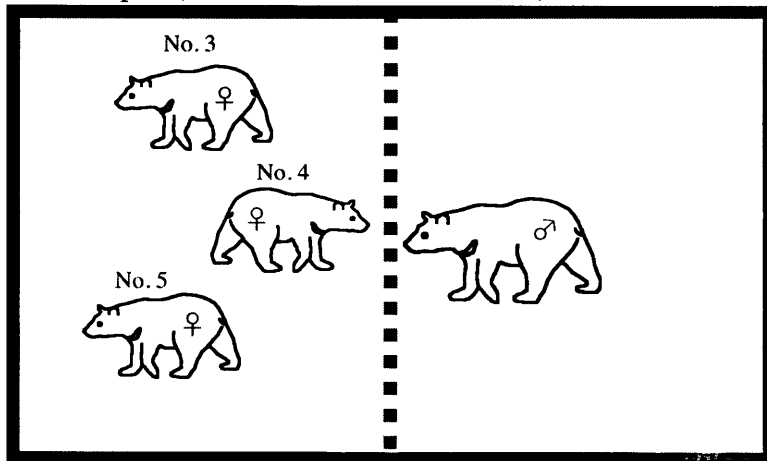
a) Group A (kept with a male)



c) Group C (male contact without coitus)



b) Group B (male contact without coitus)



d) Group D (Keep without a male)

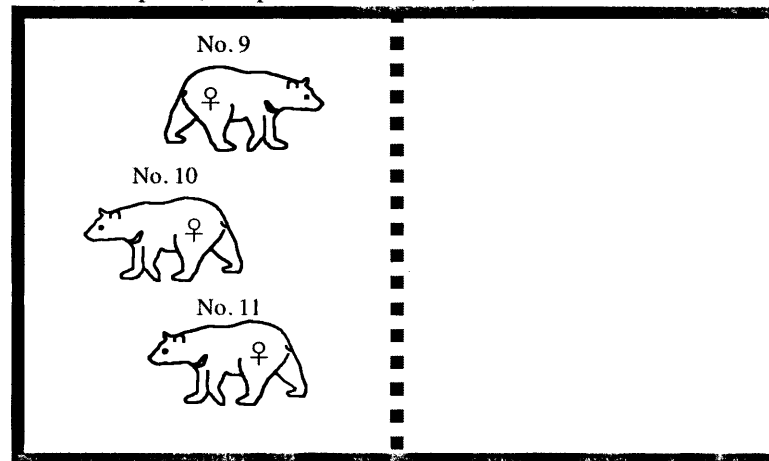


Fig. 5-1-1. Frame format of captivity. a) Group A; a male was kept with females from mid-June to late July. b) Group B; in the adjoining run, a male was kept from late June to late July. c) Group C; in the adjoining run, a male was kept from late July to late October. d) Group D; females were isolated from males.

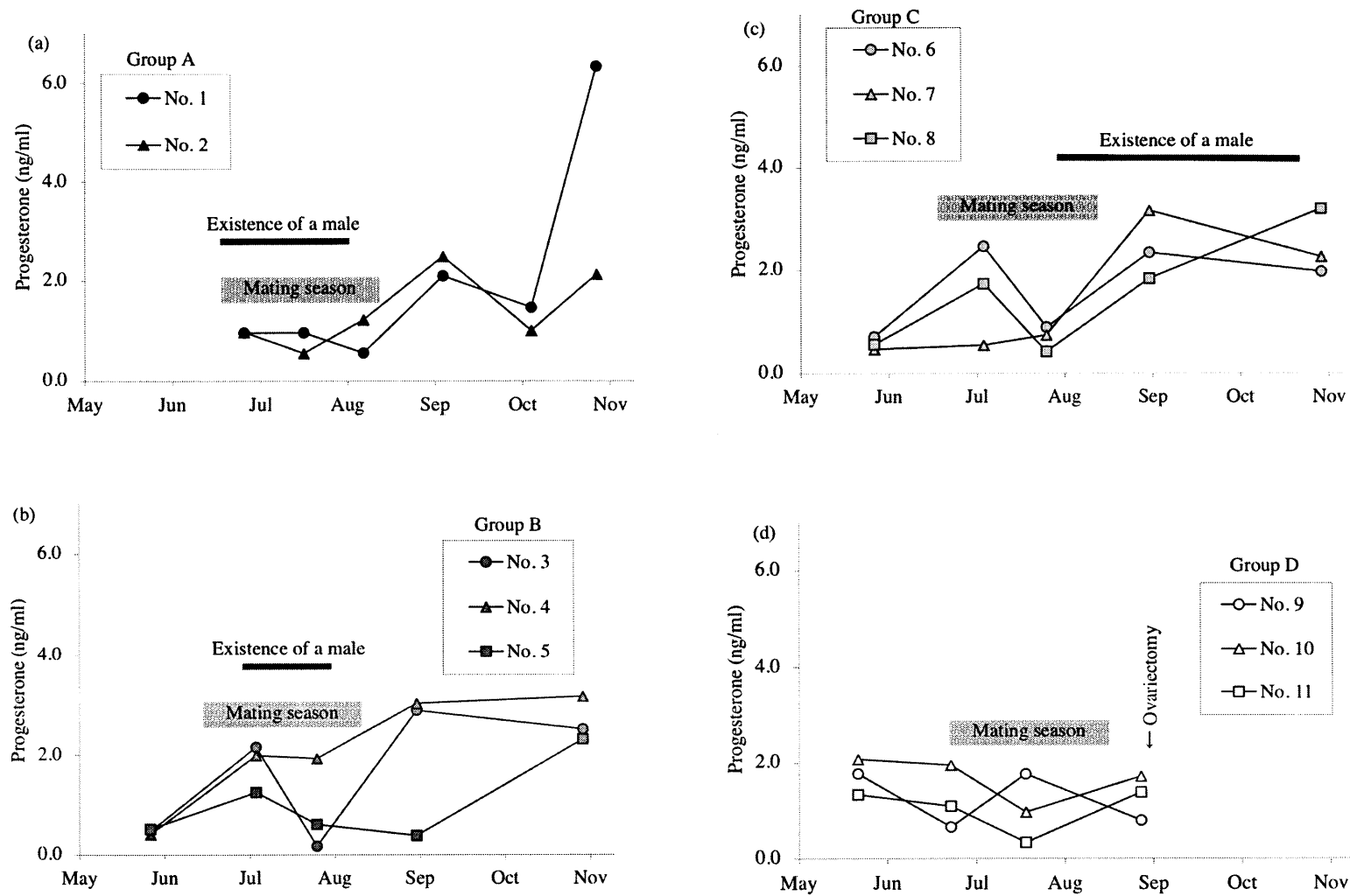


Fig. 5-1-2 Changes of serum progesterone concentrations in captive female Japanese black bears: (a) Females in Group A were kept with a male during mating season and were given the chance to mate. (b) and (c) In the adjoining indoor run, a male was kept from the early to mid- (Group B) and late to post- (Group C) mating season, respectively. Although females could contact the male through the bars, they could not mate. (d) Females in Group D were isolated from the male, though they could hear his call and detect his smell.

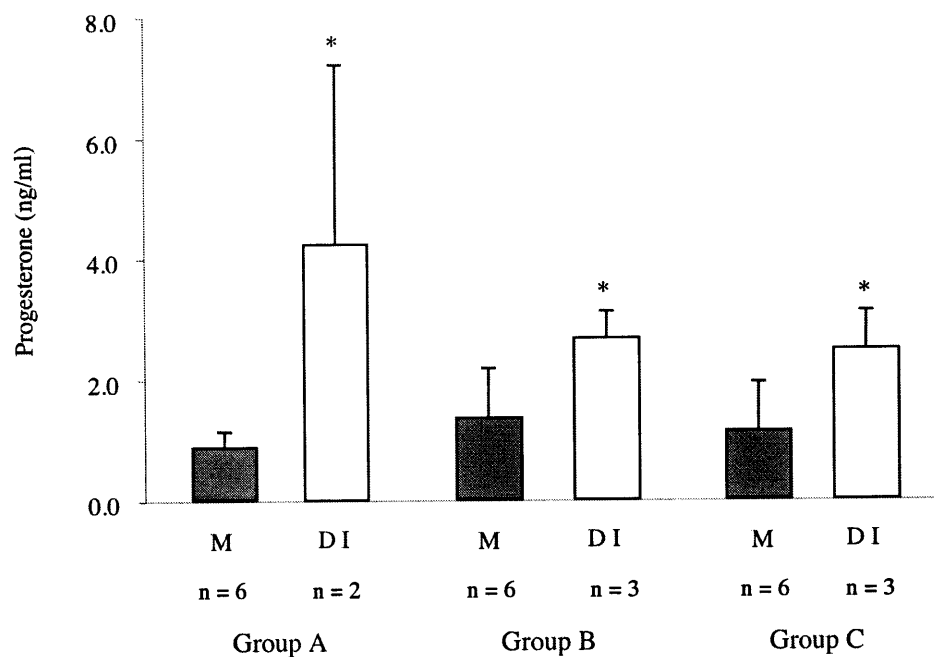


Fig. 5-1-3. Comparison of serum progesterone concentrations in captive female Japanese black bears between mating season and late delayed implantation period: Values are presented as mean \pm SD. M; Mating season (from mid-June to early August). DI; Late delayed implantation period (late October). *; Different from mating season within the same group significantly ($P < 0.05$).

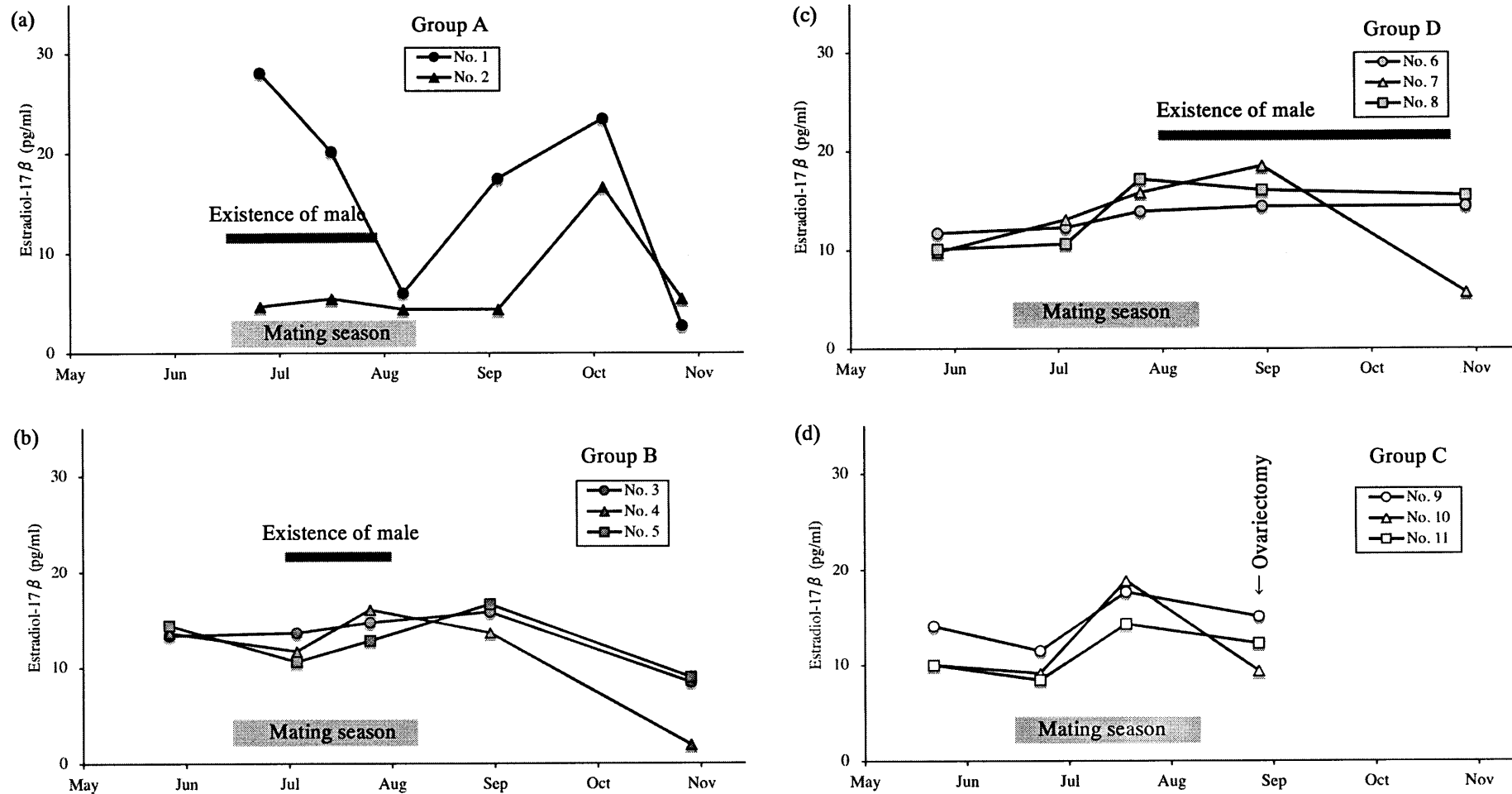


Fig. 5-1-4 Changes of serum estradiol-17 β concentrations in captive female Japanese black bears: (a) Females in Group A were kept with a male during mating season and were given the chance to mate. (b) and (c) In the adjoining indoor run, a male was kept from the early to mid- (Group B) and late to post- (Group C) mating season, respectively. Although females could contact the male through the bars, they could not mate. (d) Females in Group D were isolated from the male, though they could hear his call and detect his smell.



Fig. 5-1-5. Right ovary of Bear No. 9 (macroscopic appearance).
Large corpus luteum and follicles were not observed.



Fig. 5-1-6. Right ovary of Bear No. 9 (sagittal section).
Small follicles were observed.

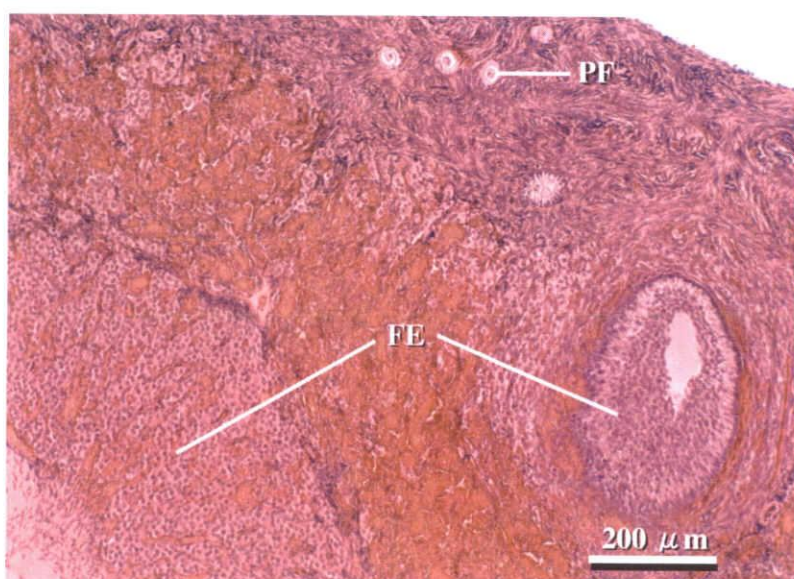


Fig. 5-1-7. Sagittal section of ovary in Bear No. 9 (HE stain).
Small follicles were observed. PF: primordial follicle. FE: follicle epithelium.

5-2. 妊馬血清性性腺刺激ホルモン (eCG) およびヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) による発情および排卵誘起

5-2-1. 背景

人工繁殖技術は、希少種の絶滅を防ぎ、飼育および野生下の動物の遺伝的多様性を維持するための重要な技術の一つである。人工授精は、よく用いられる人工繁殖技術の一つであるが、クマ科動物ではジャイアントパンダを除き、人工授精による出産の報告は未だない (69)。ジャイアントパンダは自然排卵動物であるため (17, 24, 107)、人工授精の際、人工的に排卵を誘起する必要がない。一方、前節の実験からニホンツキノワグマは交尾排卵動物であると考えられ (本章「5-1. 隔離飼育実験による排卵様式の解明」)、またジャイアントパンダを除く他のクマ科動物も交尾排卵動物である可能性が指摘されている (8, 10, 90)。このため、人工授精の際は、人工的な排卵の誘起が必要である。

薬剤投与による排卵の誘起は、クマ科動物においてはアメリカクロクマのみで報告されている (101)。そのアメリカクロクマでの研究において、交尾期のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 投与により排卵の誘起が試みられ、3 頭中 2 頭のクマが血清中プロジェステロン濃度の上昇から偽妊娠状態、つまり排卵が起こったと判断された。しかしながら、このような排卵誘起実験は、ニホンツキノワグマにおいては行なわれていない。本研究の目的は、妊馬血清性性腺刺激ホルモン (eCG) および hCG の投与により、ツキノワグマの発情および排卵を誘起することであった。

5-2-2. 材料および方法

a) 供試動物および実験デザイン

雌ツキノワグマ 9 頭を、3 頭ずつ A、B および C の 3 グループに分け、実験に用いた。これらの雌は、交尾期前から雄と隔離して、グループ毎に屋内の飼育部屋 (3.47×4.88 m) で飼育した。グループ別の供試ツキノワグマ飼育状況の詳細

は、以下の通りである。

グループ A (hCG 投与群)：雌ツキノワグマ、No. 1、2 および 3 を 2004 年の 5 月下旬から 11 月上旬の間、一緒に飼育した。交尾期初期に hCG の投与により、排卵を誘起した。血清中プロジェステロン濃度測定により排卵の有無を調べた。

グループ B (eCG および hCG 投与群)：雌ツキノワグマ、No. 4、5 および 6 を 2005 年の 5 月下旬から 8 月下旬の間、一緒に飼育した。No. 6 は、2005 年 2 月に 2 頭の子を出産したが、2005 年 4 月に子と離された。交尾期の初期に、卵胞の発育を eCG 投与により、排卵を hCG 投与により、それぞれ誘起した。卵巣を外科的に摘出し、肉眼的に黄体を確認することにより排卵の確認を行なった。

グループ C (対照群)：雌ツキノワグマ、No. 7、8 および 9 を 2005 年の 5 月下旬から 9 月下旬の間、一緒に飼育した。これらのグループの雌には、hCG および eCG 投与を行なわなかった。卵巣を外科的に摘出し、肉眼的に黄体を確認することにより排卵の確認を行なった。

なお、このグループ C は、本章「5-1. 隔離飼育実験による排卵様式の解明」に供試した雄隔離群と同一である。

b) eCG および hCG の投与

交尾期初期にあたる 2004 年 6 月 26 日に、全身麻酔による不動化後、グループ A の雌に hCG (ゴナトロピン、帝国臓器、東京：50 IU/kg 実測体重) を筋肉内に投与した。hCG 投与時の No. 1、2 および 3 の体重および hCG 投与量は、それぞれ 70 kg—3,500 IU、72 kg—3,600 IU および 43 kg—2,150 IU であった。

交尾期の初期にあたる 2005 年 6 月 19 日に、グループ B の雌に eCG (セロトロピン、帝国臓器、東京：1,000 IU/頭) を、吹き矢式注射器を用いて無麻酔下で筋肉内に投与した。その約 80 時間後 (±1 時間；6 月 22 日)、全身麻酔による不動化後、hCG (35 U/kg 実測体重) を筋肉内に投与した。hCG 投与時の No. 4、5 および 6 の体重および hCG 投与量は、それぞれ 63 kg—2,205 IU、52 kg—1,820 IU

および 68 kg—2,380 IU であった。

これら薬剤の投与は、発情周期のステージを考慮せずに行なった。

c) 血液および膣垢の採取

グループ A の雌において、血液を 2004 年 6 月 26 日、7 月 3 日、7 月 17 日、8 月 7 日、9 月 4 日、10 月 5 日および 10 月 28 日の計 7 回採取した。グループ B および C の雌において、血液および膣垢を 2005 年 5 月 21 日、6 月 22 日、7 月 18–20 日および 8 月 27–28 日（グループ B を除く）の計 3–4 回採取した。膣垢の採取は、全身麻酔後、生理食塩液で濡らした滅菌綿棒を膣内に約 3 cm 挿入し、360° 回転させて膣垢を付着させた後抜き出し、スライドグラスに塗布することにより行なった。スライドを Diff Quick (国際試薬、神戸) で染色した後、Eukitt (O. Kinder, Germany) で封入した。

d) 血清中性ステロイドホルモン濃度の測定

第 2 章の記述に従い、血清中のプロジェステロンおよびエストラジオール-17 β 濃度を TR-FIA 法を用いて測定した。

e) 膣スメアの観察

光学顕微鏡下 ($\times 400$) で、1 スライドあたり少なくとも 100 以上の細胞を計数し、傍基底細胞、小型中間層細胞、大型中間層細胞、有核角化上皮細胞および無核角化上皮細胞に分類し記録した。また、白血球の数を主観的に 4 段階 (-; 無し、+; 少し存在、++; 存在、+++; 多く存在) に分けて記録した。

f) 卵巣の観察

グループ B および C の雌に、それぞれ 7 月下旬および 8 月下旬に、犬猫で用いられている常法を用いて、卵巣摘出術を行なった。グループ B では、hCG が効果

を発揮していれば黄体が形成され、成長している時期で、かつ、投与したホルモン剤以外の影響（雄の何らかの刺激；本章「5-1. 隔離飼育実験による排卵様式の解明」参照）で排卵が起った場合には、黄体が未だ成長していない早い時期を選択して、卵巣を摘出した。グループ C では、交尾刺激無しで排卵が起り、黄体が形成された場合には、黄体が成長している時期を選択して、卵巣を摘出した。

採取した卵巣は、重量および容量（長径、短径および厚さ）の計測を行なった後、10%中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定した。卵巣容量は、（長径×短径×厚さ）^{1/3} mm で算出した（117）。固定した卵巣は、矢状面で約 3 mm 間隔に切断し、卵胞および黄体を観察した。切断観察後、卵巣を常法に従い、脱水後、パラフィン包埋した。その後、パラフィン包埋した卵巣組織を厚さ 4 μm に薄切し、HE 染色を行い、光学顕微鏡下で卵胞および黄体を組織学的に観察した。

5-2-3. 結果

各グループの血清中プロゲステロン濃度を Fig. 5-2-1 に示す。グループ A の No. 1、2 および 3 は、hCG 投与時、幾分高いプロゲステロン濃度（1.06–1.95 ng/ml）を示す傾向がみられた。No. 3 は、hCG 投与後にプロゲステロン濃度が上昇した（2.71 ng/ml）が、すぐに減少し、8 月以降は低値（0.39–0.84 ng/ml）を示す傾向が見られた。No. 1 および 2 は、hCG 投与後にプロゲステロン濃度が減少し（0.40–0.51 ng/ml）、その後若干変動し、9 月以降は低値（0.31–0.89 ng/ml）を示す傾向がみられた。グループ B の No. 4、5 および 6 は、hCG 投与時、幾分低いプロゲステロン濃度（0.11–0.70 ng/ml）を示す傾向がみられた。eCG および hCG 投与の約 1 ヶ月後、No. 4、5 および 6 のプロゲステロン濃度は幾分上昇した（0.48–1.96 ng/ml）。グループ C の No. 7、8 および 9 のプロゲステロン濃度は、0.33–2.08 ng/ml の範囲で、平均 1.32 ng/ml であった。

各グループの血清中エストラジオール-17β 濃度は、1.6–25.1 pg/ml の範囲で、平均 11.9 pg/ml と低値を示し、季節的变化は認められなかった。No. 1, 2, 3, 4, 5

および6におけるhCG投与時の血清中エストラジオール-17 β 濃度は、それぞれ13.9, 17.7, 16.1, 9.3, 2.2 および 16.7 pg/ml であった (Fig. 5-2-2)。

採取した卵巢の重量、容量および卵胞・黄体の数を Table 5-2-1 に示す。No. 4 の卵巢は、比較的大きく (右 2.18 g、左 2.17 g)、左右共に小型の黄体が複数個認められた (Fig. 5-2-3)。黄体の直径はすべて 5 mm 以下で、表層から突出したものは認められなかった。No. 5 の卵巢は、比較的大きく (右 3.58 g、左 3.25 g)、左右共に小型の卵胞 (<5 mm) が多数認められた (Fig. 5-2-4)。右の卵巢には、小型の黄体 (約 4 mm) が 1 つ認められた (Fig. 5-2-5)。No. 6 の卵巢は、比較的小さく (右 0.74 g、左 1.41 g)、目立った卵胞の発達は無く、黄体も認められなかった (Fig. 5-2-6)。No. 7、8 および 9 の卵巢では、目立った卵胞の発達は無く、黄体も認められなかった (Fig. 5-2-7)。

腔の細胞診による各種腔上皮細胞の出現割合を Fig. 5-2-8 に、白血球の出現状況を Table 5-2-2 に示す。No. 4、5 および 6 において、hCG 投与時の 6 月下旬、傍基底細胞および中間層細胞の割合が高く、No. 5 および 6 においては、白血球が多く認められた (Fig. 5-2-9)。No. 4、5 および 6 において、卵巢摘出時の 7 月下旬、角化上皮細胞もしくは大型中間層細胞の割合が高く、白血球はほとんど認められなかった (Fig. 5-2-10)。No. 7、8 および 9 において、5、6 および 7 月には、白血球が比較的多く認められたが (Fig. 5-2-11)、交尾期終了後にあたる 8 月下旬には、白血球がほとんど認められず、No. 7 においては、8 月下旬に角化上皮細胞の割合が高かった (Fig. 5-2-12)。

5-2-4. 考察

外因性に投与した hCG は、LH (Luteinizing hormone) と同様の生物活性を示し、大量投与により排卵を誘起する (76)。本研究で用いた hCG の投与量、35 および 50 IU/kg は、アメリカクロクマでの研究 (101) を参考に決定した。Schulz et al. (101) は、交尾期中に発情周期のステージを考慮せずに、1 頭あたり 5,000 IU (27.2-39.3

IU/kg 実測体重) の hCG を 3 頭の雌アメリカクロクマに投与し、3 頭のうち 2 頭 (35.2 および 39.3 IU/kg) において、プロジェステロン濃度の上昇により偽妊娠を認めた。

本研究のグループ A においては、Schulz et al. (101) がアメリカクロクマにおいて偽妊娠を誘起したのと同様の条件でホルモン処置 (hCG 50 U/kg) を行なったが、交尾期終了後、すべての個体において血清中プロジェステロン濃度は低値を示し、排卵を誘起することはできなかった。hCG 投与時の血清中エストラジオール-17 β 濃度は、3 頭共に低値 (13.9–17.7 pg/ml) を示しており、LH の大量投与により排卵が起きる状態にある卵胞が存在しなかったためであると考えられる。しかしながら、アメリカクロクマにおける研究 (101) において、偽妊娠となった 2 頭中 1 頭の hCG 投与時の血清中エストラジオール-17 β 濃度は、本研究結果と同レベル (16.7 pg/ml) であった。このことから、アメリカクロクマに比べて、ツキノワグマは排卵誘起のために外因性に投与された hCG の感受性が低いのかかもしれない。さらに、これらのツキノワグマは交尾期初期に hCG が投与されており、時期的な要因により hCG への反応性が弱かった可能性も考えられる。しかしながら、試行回数が少なく、他の要因も考えられ、今後の研究が期待される。

グループ A の No. 3 の血清中プロジェステロン濃度は、hCG 投与後に幾分上昇した。この高プロジェステロン濃度は、hCG 投与の影響によるものかもしれない。しかしながら、交尾期後にはプロジェステロン濃度は減少しており、このことから No. 3 は偽妊娠状態ではなかったことが示された。この個体において、おそらく卵胞は排卵に至っておらず、プロジェステロンが閉鎖卵胞から一時的に分泌されたのかもしれない。

グループ B においては、交尾排卵を行なうネコ科動物での研究 (チーター *Acinonyx jubatus* (12, 41, 43)、ウンピョウ *Neofelis nebulosa* (11, 40, 43)、オセロット *Felis pardalis* (112) およびピューマ *Felis concolor* (3)) を参考に、eCG の投与量 (1,000 U/頭) および eCG と hCG の投与間隔 (80 ± 1 時間) を決定した。Howard et al. (43)

は、チーターにおいて、eCG および hCG を用いて排卵の誘起実験を行い、eCG 100～400 IU/頭および hCG 100～250 IU/頭のいずれの容量においても、排卵の誘起が可能であったが、より高い eCG 濃度を用いた方が排卵の確率が高かったと報告した。有効な eCG 濃度は、動物種によって異なるが (43)、本研究では eCG の投与量を若干高めと思われる値に設定した。

eCG および hCG 処置した No. 4 および 5 において、処置後約 1 ヶ月に、黄体 (No. 4 および 5 で、それぞれ 8 および 1 個) および多数の卵胞の形成が認められた。これらの黄体は比較的小型で、直径は 5 mm 以下であった。野生下ツキノワグマの卵巣観察においても、黄体の直径は 8 mm を越えることはほとんどなく、直径 5 mm 程度の黄体も自然に観察される (岡野、未発表データ)。本研究と同様に、自然に形成された黄体も卵巣の表面から大きく突出することはない (岡野、未発表データ)。ツキノワグマにおいて、通常 1 回の交尾期で形成される黄体の数は、平均 1.89 個であり (55)、No. 4 においては通常より多くの黄体が形成された。対照群であるグループ C のツキノワグマにおいては黄体が形成されなかったことから、No. 4 および 5 で形成された黄体は、eCG および hCG 処置により誘起されたものと考えられる。黄体の形成は、通常排卵後に起こる。したがって、No. 4 および 5 は、eCG および hCG 投与により、排卵が誘起されたものと考えられた。

Howard et al. (43) は、チーターおよびウンピョウの研究において、eCG および hCG 処置により排卵を誘起し、39～50 時間後に腹腔鏡での観察により小型 (2-4 mm) および大型 (5-8 mm) の黄体を認めた。そして、人工授精の際、大型の黄体を認めたチーターにおいてのみ、妊娠を認めた。つまり、妊娠を目的とする場合は、排卵の誘起に加えて、さらに大型の黄体の形成が必要であると考えられる。黄体の大きさは、eCG の投与量に関係し、多すぎても少な過ぎても大型の黄体は形成されず、動物種によってその反応性は異なる (3, 41)。今後、eCG 投与量の範囲を広げて試行を繰り返し、妊娠可能となる eCG 投与量を決定する必要がある。

No. 6 は、出産をして、4 月まで授乳をしており、eCG および hCG 処置の 1 ヶ月

後の観察で、機能黄体は観察されず、卵胞は小型のものが僅かしか認められなかった。当年出産の個体に、eCG および hCG を投与し、排卵を誘起することはより困難であるのかもしれない。ツキノワグマの育子期間は、通常 1 年であり (13)、出産個体の排卵は、泌乳中は抑制されて、1 年の無排卵期間が存在すると考えられている。しかしながら、自然の状態においても、子の死亡などにより、出産年の交尾期に排卵が起こる可能性も考えられている (55)。

本研究において、No. 4 および 6 の 7 月、および No. 7 の 8 月における膣スメアは、イヌにおける発情期の像 (112) を示した。飼育下における交尾行動の観察により、ツキノワグマの交尾期は 8 月上旬に終了すると考えられている (129)。No. 7 は、8 月下旬に発情期にあったのだろうか。No. 7 は、雄と隔離されて飼育された個体であった。山本ら (129) の交尾行動観察は、雄と雌を同居させて行なわれた。ツキノワグマは交尾排卵動物であると考えられるので、雌は交尾などの雄の刺激で排卵し、その後、発情を終了する。つまり、雄と隔離されて排卵に至らなかった No. 7 は、発情期が通常よりも延長していたのかもしれない。しかしながら、No. 7 の 8 月下旬（膣スメア採取時）における血清中エストラジオール-17 β 濃度は、幾分低値を示した。ツキノワグマの発情期におけるホルモン状態や卵巢の状態は、明らかになっていない。ツキノワグマなどの取り扱いに危険を伴う動物では、膣スメア採取の際、基本的に全身麻酔が必要とされ、高頻度のサンプリングが困難である。しかしながら、Durrant et al. (24, 25) は、ジャイアントパンダにおいて、無麻酔下で膣スメアの採取が可能となるように、馴致を行い、発情周期における膣スメア像の変化を明らかにした。ツキノワグマにおいても、同様の採取法が可能であると考えられるので、このような方法を用いて頻回のサンプリングを行い、ツキノワグマの膣スメア像の変化を明らかにすることが望まれる。

結論として、ツキノワグマにおいて発情周期のステージを考慮せずに交尾期初期に hCG 50 IU/kg を投与した場合、排卵を誘起することはできず、eCG 1,000 IU/頭の投与後、約 80 時間後に hCG 35 IU/kg を投与した場合、排卵の誘起が可能であ

ることが示唆された。

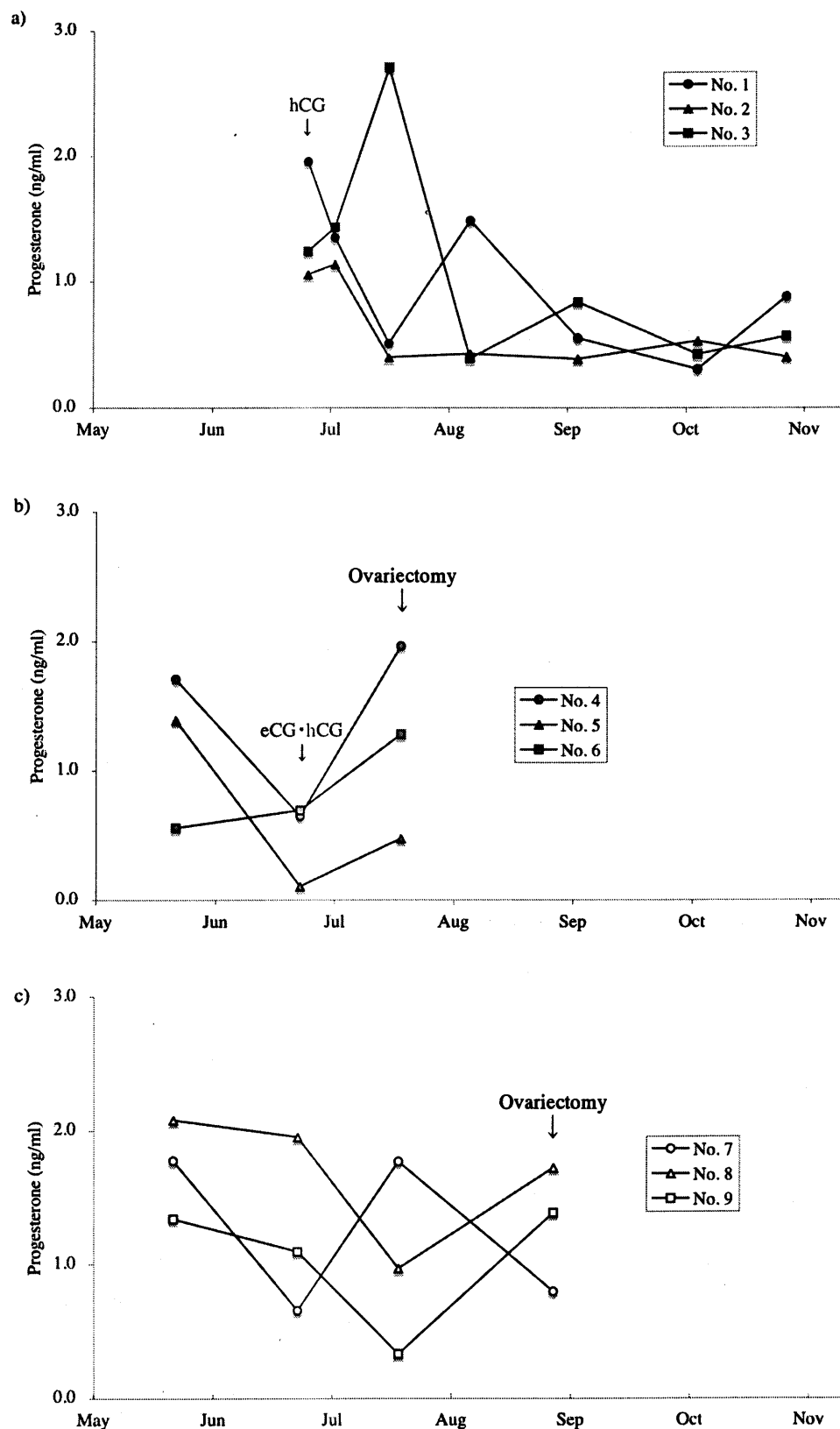


Fig. 5-2-1. Changes of serum progesterone concentrations. in captive female Japanese black bears (a) Females in Group A were administrated hCG at early mating season. (b) Females in Group B were administrated eCG and hCG at early mating season, and then ovariectomized after about a month. (c) Females in Group C were not treated, and ovariectomized after mating season.

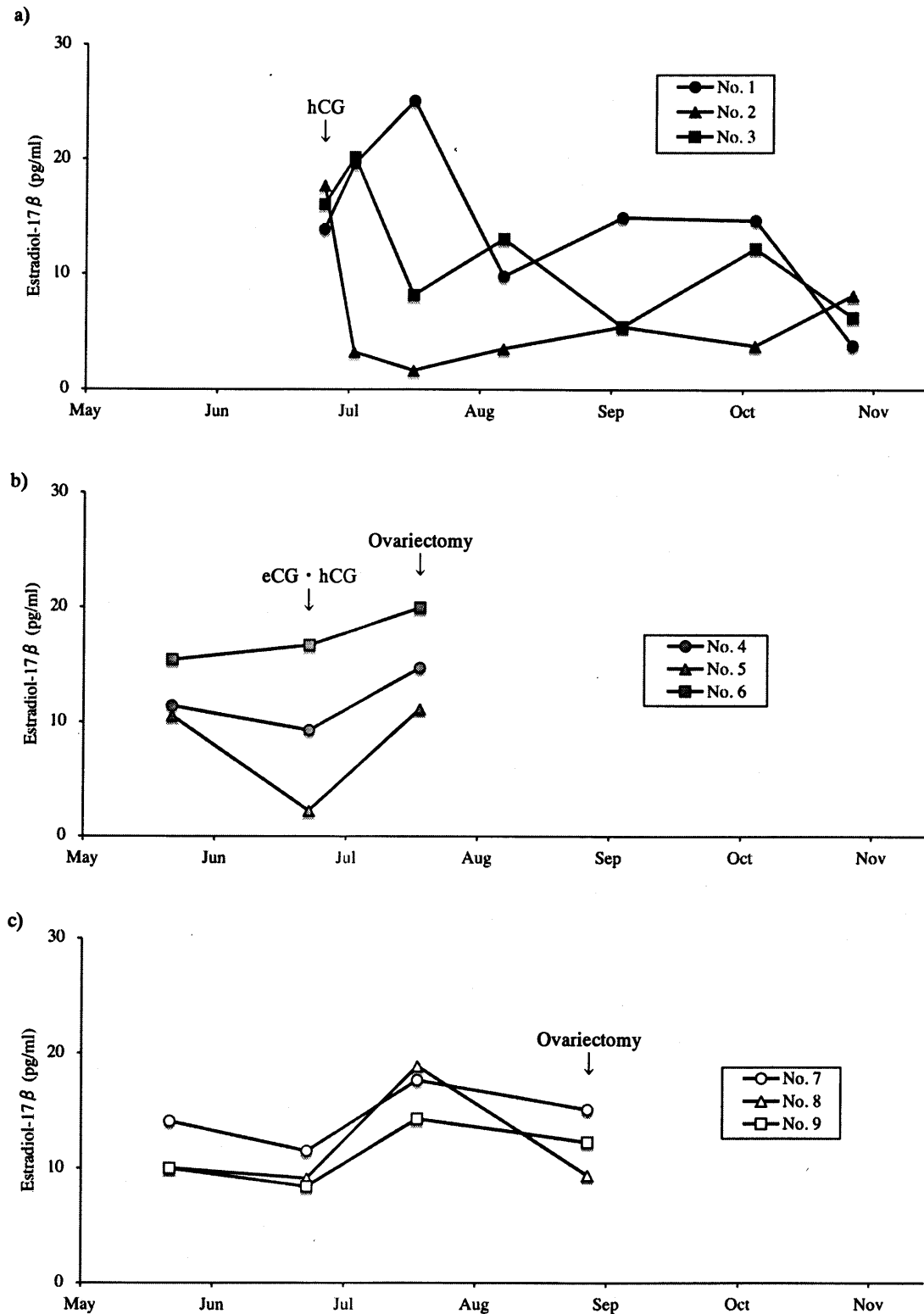


Fig. 5-2-2. Changes of serum estradiol-17 β concentrations in captive female Japanese black bears. (a) Females in Group A were administrated hCG at early mating season. (b) Females in Group B were administrated eCG and hCG at early mating season, and then ovariectomized after about a month. (c) Females in Group C were not treated, and ovariectomized after mating season.

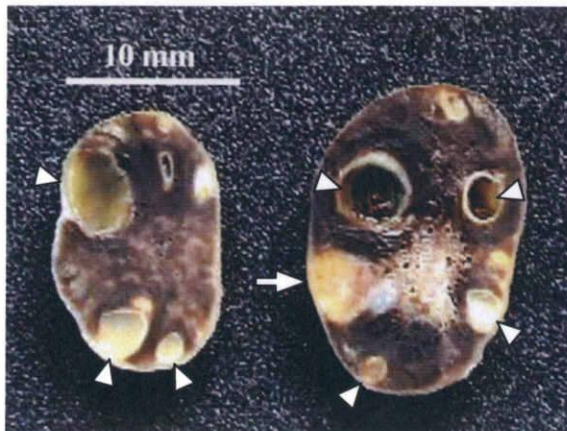


Fig. 5-2-3. Right ovary of Bear No. 4 (sagittal section). Small follicles (Δ) and a corpus luteum (\uparrow) were observed.

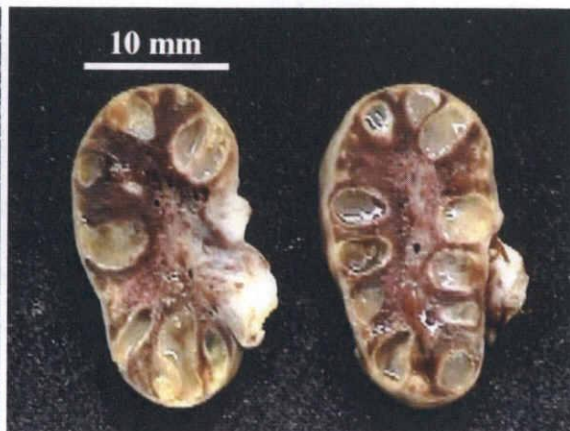


Fig. 5-2-4. Right ovary of Bear No. 5 (sagittal section). Many small follicles were observed.

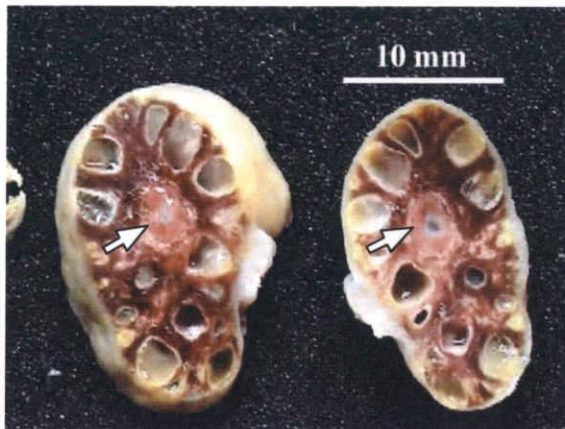


Fig. 5-2-5. Left ovary of Bear No. 5 (sagittal section). Small corpus luteum (\uparrow : examined by histologically) was observed.



Fig. 5-2-6. Left ovary of Bear No. 6 (sagittal section). Small follicle (Δ) was observed.



Fig. 5-2-7. Right ovary of Bear No. 8 (sagittal section). Small follicles (atretic follicle) were observed.

Table 5-2-1. Observation of ovaries collected from captive female Japanese black bears.

Group	Bear	Date of ovarioectomy	Right ovary						Left ovary					
			Weight (g)	Size (mm)	The number of F		The number of CL		Weight (g)	Size (mm)	The number of F		The number of CL	
					(2-4 mm)	(5-8 mm)	(2-4 mm)	(5-8 mm)			(2-4 mm)	(5-8 mm)	(2-4 mm)	(5-8 mm)
B (eCG/hCG)	No. 4	2005.7.20	2.18	15.7	6	3	3	2	2.17	16.3	8	2	1	2
	No. 5	2005.7.18	3.58	19.6	>30	-	-	-	3.25	18.6	>30	-	1	-
	No. 6	2005.7.18	0.74	11.4	1	-	-	-	1.41	13.4	1	-	-	-
C (control)	No. 7	2005.8.27	1.93	14.4	2	1	-	-	1.61	15.0	5	-	-	-
	No. 8	2005.8.28	1.42	13.5	13	-	-	-	1.36	12.7	12	-	-	-
	No. 9	2005.8.28	1.11	13.2	2	1	-	-	0.85	10.9	2	-	-	-

F: Follicles, CL: Corpora lutea

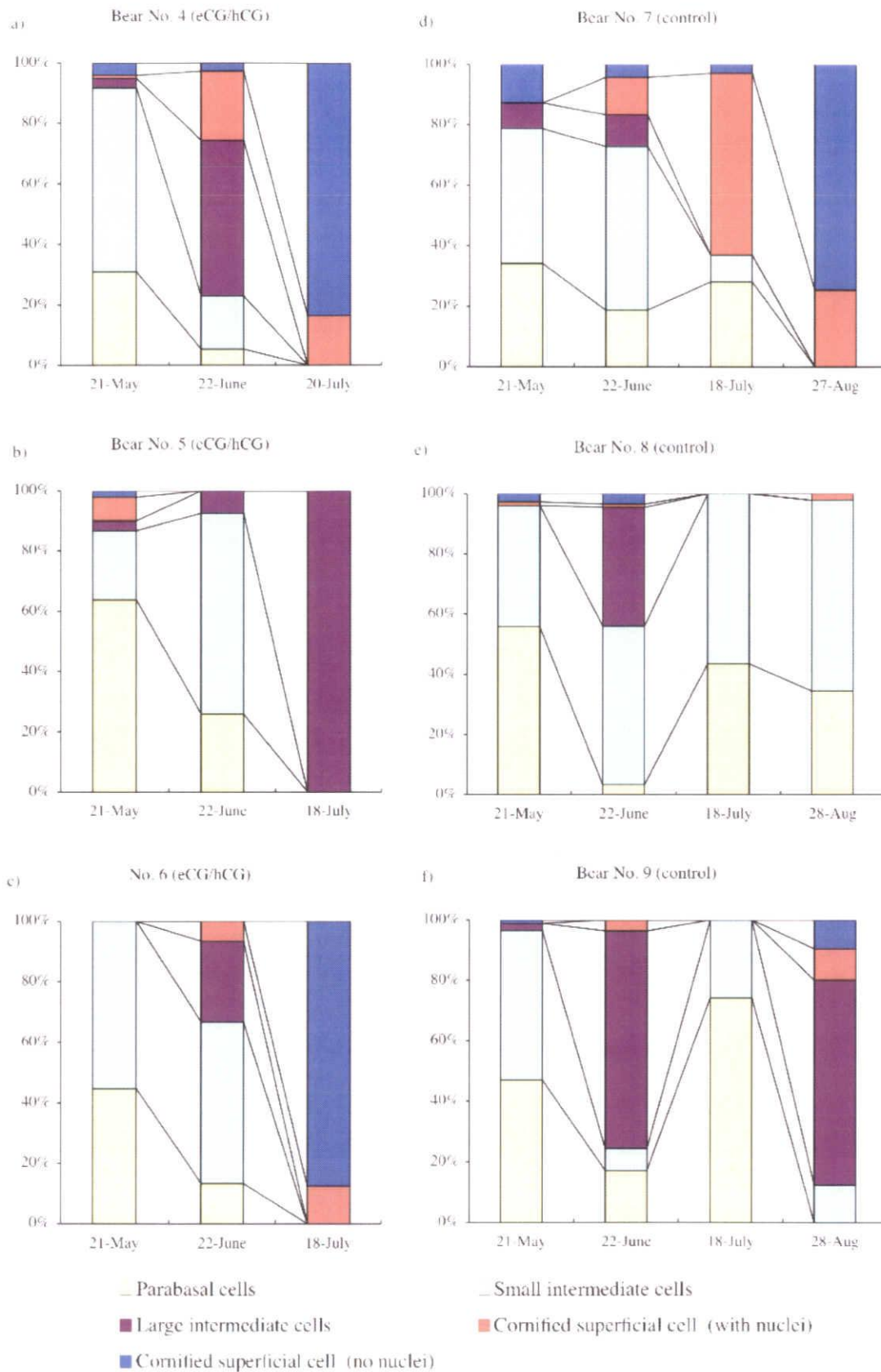


Fig. 5-2-8. Changes of vaginal epithelial cells in captive female Japanese black bears. a-c) Bear Nos. 4, 5 and 6 were administrated eCG and hCG on 19 and 22 June, respectively, and then ovariectomized on 18-20 July. d-f) Bear Nos. 7, 8 and 9 were not treated, and ovariectomized on 27-28 August.

Table 5-2-2. Leukocytes existed in vaginal smears of Japanese black bears.

	21-May	22-June	18, 20-July	27, 28-Aug
No. 4	+++	+	-	*
No. 5	+++	++	-	*
No. 6	+++	+++	-	*
No. 7	+	+++	++	-
No. 8	+	+++	+++	-
No. 9	+	+	++	-

-; no existence, +; little, ++; moderate, +++; much

*: Not examined

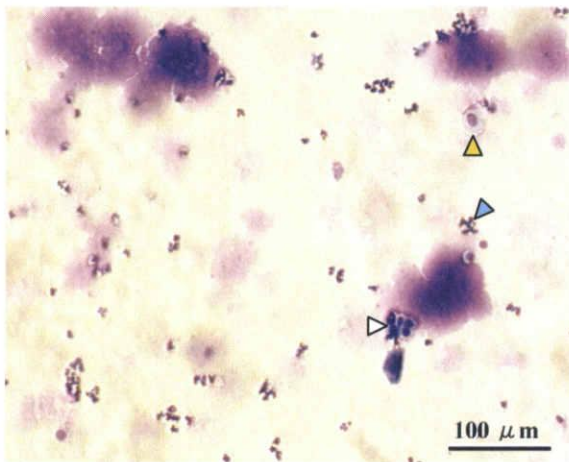


Fig. 5-2-9. Vaginal smear of Bear No. 6 on 22 June (Diff Quick stain). Parabasal (Δ) and intermediate (Δ) cells and leukocytes (Δ) were observed.

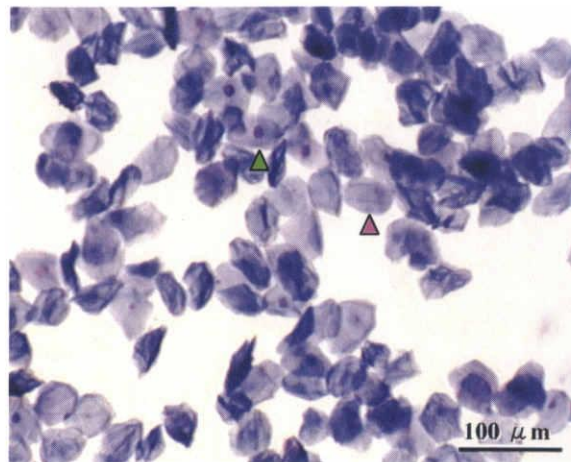


Fig. 5-2-10. Vaginal smear of Bear No. 4 on 20 July (Diff Quick stain). Many cornified superficial cells with (Δ) or without (Δ) nuclei were observed.

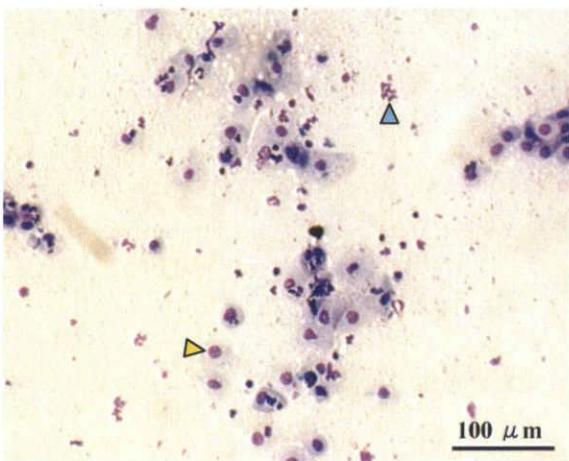


Fig. 5-2-11. Vaginal smear of Bear No. 9 on 18 July (Diff Quick stain). Intermediate cells (Δ) and leukocytes (Δ) were observed.

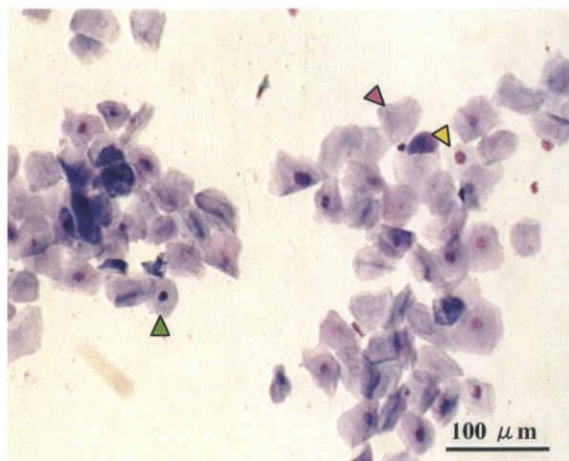


Fig. 5-2-12. Vaginal smear of Bear No. 7 on 27 August (Diff Quick stain). Many cornified superficial cells with (Δ) or without (Δ) nuclei and intermediate cells (Δ) were observed.

第6章 総括

本州および四国に生息する大型哺乳類であるニホンツキノワグマ (*Ursus thibetanus japonicus* ; 以下、ツキノワグマ) は、人為的利用空間の拡大によりその生息域は縮小・分断され、絶滅の恐れの高い地域個体群が増大している動物である。この貴重な野生動物を、絶滅させないためにも適切な保護管理対策が早急に行われなくてはならない。科学的根拠に基づいた保護管理を行うには、繁殖学を含め生物科学的データの集積・解明が必要である。また、避けなくてはならないが絶滅に瀕してしまった場合、飼育下での遺伝情報を考慮した人工繁殖が必要となる。その際に必要な人工繁殖技術を前もって確立させておく必要がある。

本研究では、秋田県阿仁熊牧場で飼育されている性成熟に達した雌雄のツキノワグマを供試して、人工繁殖に必要な人工授精技術の改良と排卵様式に関する知見を得ることを目的とした。

はじめに、経直腸電気刺激射精法を用いた精液採取法について検討を行なった。本法は、全身麻酔下で行なわれるため、動物の馴致を必要とせず、野生動物の精液採取の際に広く用いられてきた方法である。しかしながら、クマ科動物において、従来法では、採取精液への尿の混入による精液性状の劣化が問題となっている。このため、尿混入の抑制を目的として、従来用いていた刺激電圧 (10V) よりも、可能な範囲で低くした刺激電圧 (7V) を用いて刺激を行い、採取された新鮮精液の性状を比較した。その結果、比較した2つの電圧間で、採取精液の性状 (尿の混入、運動および生存など) に有意な差は認められなかった。しかしながら、動物への負担も軽減される刺激電圧 7V が有用であると考えられた。さらに、採取精液性状の季節変化を見るため、精液の性状を交尾期の初期、中期、および終了直後で比較を行なった。その結果、交尾期終了直後の新鮮精子は、交尾期中のもの比べて、精子生存率および原形質膜正

常率が有意に低く、尾部欠損奇形の出現率が有意に高く、交尾期後の精液は人工授精には適さないことが示唆された。また、正常精子の計測および観察を行ない、正常精子の形態に関する基礎的知見を得た。

次に、採取精液の凍結保存法について検討を行なった。精液の凍結は、2段階希釈法を用いた。卵黄-トリスクエン酸を基本とした添加糖類の異なる3種の希釈液（グルコース、フルクトース、またはフルクトース-ラクトース-ラフィノース）、および2パターンの一次・二次平衡時間（一次1時間・二次1時間、または一次3時間・二次0時間）が、凍結融解後の精液性状に及ぼす影響を調べた。その結果、それぞれの凍結融解後の精液性状に有意な差は認められなかった。このことから、調べた希釈液および平衡時間はいずれも使用可能であることが判明した。一次平衡3時間・二次平衡0時間を用いることにより、野生個体から野外で採取した精液の凍結保存を効率良く進めることが可能であると考えられた（一次平衡の間に、野外から研究室まで持ち帰り可）。また、希釈液に添加する異なるグリセロール濃度（4～12%）が凍結融解後の精液性状に及ぼす影響を調べた。その結果、凍結融解後の精子生存率および奇形率は、グリセロール濃度の影響を受けなかったが、精子原形質膜正常率および先体保有率は、4および6%の方が10および12%よりも有意に高かった。このことから、本研究の方法で凍結保存する場合、グリセロール濃度は4～6%が適していると考えられた。

最後に、排卵様式の解明を行なった。ツキノワグマは、交尾排卵動物であるか否かが未だ明らかでないため、その解明を目的とした。交尾期に、雌雄の隔離飼育実験を行なったところ、雄と同居させた群（交尾可）と雄との接触を許した群（交尾不可）の雌では、全ての個体において血清中プロゲステロン濃度の上昇が認められ、排卵が起こったと推測された。一方、雄と隔離して飼育した群の雌は、交尾期後の卵巣の観察で、黄体は認められず、排卵が認められなかった。このことから、ツキノワグマは交尾排卵動物であるが、交尾以外の雄との接触などの何らかの刺激によっても高い

確率で排卵に至るものと推測された。従って、ツキノワグマの人工授精を行なう場合は、人工的な排卵の制御が必要であると考えられた。そこで、性腺刺激ホルモン投与により排卵の誘起を試みた。交尾期に発情周期のステージを考慮せずに、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン製剤（hCG）を単独投与したところ、黄体の形成によるプロジェステロン濃度の上昇は認められなかった。一方、妊馬血清性性腺刺激ホルモン製剤（eCG）およびhCGの投与では、黄体の形成が認められ、本法により排卵の誘起が可能であると考えられた。

以上のように、本研究により、ツキノワグマにおける精液の採取および凍結保存法が改良され、さらに人工授精の際に鍵となる排卵様式に関する知見を得ることができた。今後は、発情周期における詳細な雌の性ホルモン動態の解明と共に、排卵の誘起法を確立し、人工授精による産子の獲得を目指していく必要がある。

謝 辞

本研究全般にあたり、多大なるご指導およびご鞭撻を頂いた帯広畜産大学畜産学部の三宅陽一教授、岐阜大学応用生物科学部の村瀬哲磨助教授および坪田敏男教授、ならびに学位論文を審査して下さった岩手大学農学部の橋爪一善教授、東京農工大学農学部の加茂前秀夫教授および岐阜大学応用生物科学部の工藤忠明教授に心から感謝致します。

本研究の遂行にあたり、実験計画および動物管理に多大なるご協力およびご便宜を図って頂いた阿仁ツキノワグマ研究所の小松武志博士ならびに阿仁マタギの里熊牧場の職員の皆様に感謝致します。また、サンプリングにあたりご協力頂いた北海道大学大学院農学研究科の八代田千鶴氏、東京農工大学大学院連合農学研究科の中下留美子博士、野生動物医学会学生部会の学生諸氏、北海道大学大学院獣医学研究科の兒玉有加氏および飯渕るり子氏、岐阜大学大学院連合獣医学研究科の中村幸子氏および加味根あかり氏に感謝致します。

最後に本研究遂行にあたり、多大なるご指導およびご協力を頂いた岐阜大学応用生物科学部の宮澤清志教授および浅野玄講師、ならびに野生動物医学研究室の学生諸氏に感謝致します。

参考文献

- 1) Agca, Y. and Critser, J. K. (2002). Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. *Semin. Reprod. Med.* 20, 15~23.
- 2) Ahmadi, A. and Ng, S. C. (1997). The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 68, 346~350.
- 3) Barone, M. A., Wildt, D. E., Byers, A. P., Roelke, M. E., Glass, C. M. and Howard, J. G. (1994). Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod. Fertil.* 101, 103~108.
- 4) Barth, A. D. and Oko, R. J. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, Ames.
- 5) Blackshaw, A. W. and Emmens, C. W. (1951). The interaction of pH, osmotic pressure and electrolyte concentration on the motility of ram, bull and human spermatozoa. *J. Physiol.* 114, 16~26.
- 6) Bloom, E. (1977). Sperm morphology with reference to bull infertility. First All-India Symp. Anim. Reprod., Ludhiana.
- 7) Blottner, S., Warnke, C., Tuchscherer, A., Heinen, V. and Torner, H. (2001). Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 75~88.
- 8) Boone, W. R., Catlin, J. C., Casey, K. J., Boone, E. T., Dye, P. S., Schuett, R. J., Rosenberg, J. O., Tsubota, T. and Bahr, J. M. (1998). Bears as induced ovulators – A preliminary study. *Ursus* 10, 503~505.
- 9) Boone, W. R., Catlin, J. C., Casey, K. J., Dye, P. S., Boone, E. T. and Schuett, R. J. (1999). Live birth of a bear cub following nonsurgical embryo collection. *Theriogenology* 51, 519~529.
- 10) Boone, W. R., Keck, B. B., Catlin, J. C., Casey, K. J., Boone, E. T., Dye, P. S. Schuett, R. J.,

- Tsubota, T. and Bahr, J. C. (2004). Evidence that bears are induced ovulators. *Theriogenology* 61, 1163~1169.
- 11) Brown, J. L., Wildt, D. E., Graham, L. H., Byers, A. P., Collins, L., Barrett, S. and Howard, J. G. (1995). Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. *Biol. Reprod.* 53, 93~102.
- 12) Brown, J. L., Wildt, D. E., Wielebnowski, N., Goodrowe, K. L., Graham, L. H., Wells, S., and Howard, J. G. (1996). Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. *J. Reprod. Fertil.* 106, 337~346.
- 13) Bromley, G. F. (1987). (藤巻裕蔵, 新沼昭夫訳) ヒグマとツキノワグマ-ソ連極東南部における比較生態学的研究. 思索社, 東京.
- 14) Bornman, M. S., van Vuuren, M., Meltzer, D. G., van der Merwe, C. A. and v Rensburg, S. J. (1988). Quality of semen obtained by electroejaculation from Chacma baboons (*Papio ursinus*). *J. Med. Primatol.* 17, 57~61.
- 15) Buhr, M. M., Fiser, P., Bailey, J. L. and Curtis, E. F. (2001). Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J. Androl.* 22, 961~969.
- 16) Caiza De La Cueva, F. I., Rigau, T., Pujol, R., Piedrafita, J. and Rodriguez-Gil, J. E. (1997). Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 301~315.
- 17) Chaudhuri, M., Kleiman, D. G., Wildt, D. E., Bush, M., Frank, E. S. and Thau, R. B. (1988). Urinary steroid concentrations during natural and gonadotrophin-induced oestrus and pregnancy in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J. Reprod. Fertil.* 84, 23~28.
- 18) Christiansen, I. J. and Schmidt, M. (1980). Deepfreezing of dog semen. *Klg Vetog Landbohjsk, Inst Sterilitetsforskin, Arsberetn* 23, 69~75 (in Danish, with English abstract).
- 19) Cochran, J. D., Amann, R. P., Froman, D. P. and Pickett, B. W. (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 degrees C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 22, 25~38.

- 20) Craighead, J. J., Hornocker, M. G. and Craighead, F. C. Jr. (1969). Reproductive biology of young female grizzly bear. J. Reprod. Fertil. Suppl. 6, 447~475.
- 21) Crich, J. P. and Jequier, A. M. (1978). Infertility in men with retrograde ejaculation: the action of urine on sperm motility, and a simple method for achieving antegrade ejaculation. Fertil. Steril. 30, 572~576.
- 22) Cummins, J. M. and Woodall, P. F. (1985). On mammalian sperm dimensions. J. Reprod. Fertil. 75, 153~175.
- 23) Douglas, D. A., Song, J. H., Houde, A., Cooke, G. M. and Murphy, B. D. (1997). Luteal and placental characteristics of carnivore gestation: expression of genes for luteotrophic receptors and steroidogenic enzymes. J. Reprod. Fertil. Suppl. 51, 153~166.
- 24) Durrant, B., Czekala, N., Olson, M., Anderson, A., Amodeo, D., Campos-Morales, R., Gual-Sill, F. and Ramos-Garza, J. (2002). Papanicolaou staining of exfoliated vaginal epithelial cells facilitates the prediction of ovulation in the giant panda. Theriogenology 57, 1855~1864.
- 25) Durrant, B. S., Olson, M. A., Amodeo, D., Anderson, A., Russ, K. D., Campos-Morales, R., Gual-Sill, F. and Ramos-Garza, J. (2003). Vaginal cytology and vulvar swelling as indicators of impending estrus and ovulation in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Zoo Biol. 22, 313~321.
- 26) Feng, W. H., Zhao, J. and Fujihara, N. (1997). Physiological characteristics of electro-ejaculated giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) semen. Jpn. J. Zoo Wildl. Med. 2, 107~112.
- 27) Fiser, P. S., and Fairfull, R. W. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. Cryobiology 21, 542~551.
- 28) Foresman, K. R. and Daniel, J. C. (1983). Plasma progesterone concentrations in pregnant and nonpregnant black bears (*Ursus americanus*). J. Reprod. Fertil. 68, 235~239.
- 29) 福井大祐 (2006). 生物多様性の保全を目指した野生動物の人工繁殖と細胞保存—地球の健康を守るため動物園水族館ができること—. 日本野生動物医学会誌 11, 1~10.

- 30) 岐阜県哺乳動物調査研究会 (1993). 今なお多い謎. (岐阜県哺乳動物調査研究会編) 滅びゆく森の王者ツキノワグマ. pp. 35~80. 岐阜新聞社, 岐阜.
- 31) Gil, J., Lundeheim, N., Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H. (2003). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59, 1241~1255.
- 32) Griggers, S., Paccamonti, D. L., Thompson, R. A. and Eilts, B. E. (2001). The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. *Theriogenology* 56, 613~622.
- 33) Gudermuth, D. F., Newton, L., Daels, P. and Concannon, P. (1997). Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. *J. Reprod Fertil Suppl.* 51, 177~184.
- 34) Hashimoto, Y. (2002). Seasonal food habits of the Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) in the Chichibu Mountains, Japan. *Mammal Study* 27, 65~72.
- 35) Hashimoto, Y. and Yasutake, A. (1999). Seasonal changes in body weight of female Asiatic black bears under captivity. *Mammal Study* 24, 1~6.
- 36) Hazumi, T. (1999). Status and management of the Asiatic black bear in Japan. *In*: Servheen, C., Herrero, S. and Peyton, B. [eds] *Bears. Status survey and conservation action plan*, pp. 207~211. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U. K.
- 37) Hellgren, E. C., Vaughan, M. R., Gwazdauskas, F. C., Williams, B., Scanlon, P. F. and Kirkpatrick, R. L. (1990). Endocrine and electrophoretic profiles during pregnancy and nonpregnancy in captive female black bears. *Can. J. Zool.* 69, 892~898.
- 38) Hensel, R. J., Troyer, W. A. and Erickson, A. W. (1969). Reproduction in the female black bear. *J. Wildl. Manage.* 33, 357~365.
- 39) Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47~58.
- 40) Howard, J. G., Byers, A. P., Brown, J. L., Barrett, S. J., Evans, M. Z., Schwartz, R. J. and

- Wildt, D. E. (1996). Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Zoo Biol.* 15, 55~69.
- 41) Howard, J. G., Donoghue, A. M., Barone, M. A., Goodrowe, K. L., Blumer, E. S., Snodgrass, K., Starnes, D., Tucker, M., Bush, M. and Wildt, D. E. (1992). Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the Cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 23, 288~300.
- 42) Howard, J. G., Pursel, V. G., Wildt, D. E. and Bush, M. (1981). Comparison of various extenders for freeze-preservation of semen from selective captive wild ungulates. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 1157~1161.
- 43) Howard, J. G., Roth, T. L., Byers, A. P., Swanson, W. F. and Wildt, D. E. (1997). Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Biol. Reprod.* 56, 1059~68.
- 44) Huang, Y., Wang, P. Y., Zhang, H. M., Zhang, G. O., Li, D. S., Tang, C. X., Wei, R. P., Hu, D. M. and Howard, J. G. (2001). Efficiency of artificial insemination in giant pandas at the Wolong breeding center. *J. Androl. Suppl.* P1/2, 146, 118.
- 45) Ishikawa, A., Matsui, M., Sakamoto, H., Katagiri, S. and Takahashi, Y. (2002). Cryopreservation of the semen collected by electroejaculation from the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*). *J. Vet. Med. Sci.* 64, 373~376.
- 46) Ishikawa, A., Matsui, M., Tsuruga, H., Sakamoto, H., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1998). Electroejaculation and semen characteristics of the captive Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*). *J. Vet. Med. Sci.* 60, 965~968.
- 47) Ishikawa, A., Sakamoto, H., Katagiri, S. and Takahashi, Y. (2003). Changes in sexual behavior and fecal steroid hormone concentrations during the breeding season in female Hokkaido brown bears (*Ursus arctos yesoensis*) under captive condition. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 99~102.
- 48) IUCN. (2006). 2006 IUCN Red List of Threatened Species. < <http://www.iucnredlist.org/> >

(opened Oct. 30, 2006)

- 49) Johnstone, I. (1984). Electroejaculation in the domestic cat. *Aust. Vet. J.* 61, 155~158.
- 50) 金川弘司 (1995). 人工授精 (森純一, 金川弘司, 浜名克己編) 獣医繁殖学, pp. 206~220. 文永堂出版, 東京.
- 51) 環境省 (2002). 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物-レッドデータブック-1 哺乳類. 財団法人自然環境研究センター, 東京.
- 52) 環境省 (2005). ツキノワグマの大量出沒に関する調査報告書 (平成 16 年度ツキノワグマ個体群動態等調査事業). 財団法人自然環境研究センター, 東京.
- 53) 假屋堯由 (1995). I 生殖器の構造と機能. (森純一, 金川弘司, 浜名克己編) 獣医繁殖学, pp. 1~20. 文永堂出版, 東京.
- 54) 片山敦司 (2005). クマを殺さずにすむ被害対策の試み-奥山・学習放獣-. (坪田敏男編) 緊急クマシンポジウム; なぜクマが人里に出沒するのか? その対策はどうすべきなのか? (抄録) pp. 14~18. 日本クマネットワーク, 岐阜大学 21 世紀 COE プログラム, 岐阜.
- 55) 片山敦司, 坪田敏男, 山田文雄, 喜多功, 千葉敏郎 (1996). ニホンツキノワグマ (*Selenarctos thibetanus japonicus*) の繁殖指標としての卵巣と子宮の形態学的観察. 日本野生動物医学会誌 1, 26~32.
- 56) Kim, S. C. and Kim, H. W. (1998). Effects of nitrogenous components of urine on sperm motility: an in vitro study. *Int. J. Androl.* 21, 29~33.
- 57) 小島義夫 (1972). 精子の形態. (飯田勲 編) 哺乳動物の精子, pp. 146~179. 学窓社, 東京.
- 58) Kojima, E., Tsuruga, H., Komatsu, T., Murase, T., Tsubota, T. and Kita, I. (2001). Characterization of semen collected from beagles and captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Theriogenology* 55, 717~731.
- 59) 小松武志, 坪田敏男, 岸本真弓, 浜崎伸一郎, 千葉敏郎 (1994). 雄ニホンツキノワグマにおける (*Selenarctos thibetanus japonicus*) における性成熟と精子形成に関わる幹細胞. *J. Reprod. Dev.* 40, 65~71.
- 60) Komatsu, T., Tsubota, T., Yamamoto, Y., Atoji, Y. and Suzuki, Y. (1997). Seasonal changes

- in the immunolocalization of steroidogenic enzymes in the testes of the Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). J. Vet. Med. Sci. 59, 521~529.
- 61) Komatsu, T., Yamamoto, Y., Atoji, Y., Tsubota, T. and Suzuki, Y. (1997). Seasonal changes in subcellular structures of Leydig and Sertoli cells in the Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*. Arch. Histol. Cytol. 60, 225~234.
- 62) Koshimoto, C. and Mazur, P. (2002). The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. Cryobiology 45, 80~90.
- 63) 楠比呂志 (2005). 希少動物の種の保存を目的とした保全繁殖技術. 日本野生動物医学学会誌 10, 1~12.
- 64) Lagerkvist, G., Einarsson, E. J., Forsberg, M. and Gustafsson, H. (1992). Profiles of oestradiol-17 beta and progesterone and follicular development during the reproductive season in mink (*Mustela vison*). J. Reprod. Fertil. 94, 11~21.
- 65) Lawler, D. F., Johnston, S. D., Hegstad, R. L., Keltner, D. G. and Owens, S. F. (1993). Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47, 57~61.
- 66) Liu, Z. and Foote, R. H. (1998). Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and nonpermeable agents. Cryobiology 37, 207~218.
- 67) Makler, A., David, R., Blumenfeld, Z. and Better, O. S. (1981). Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. Fertil. Steril. 36, 507~511.
- 68) 舩田博司 (1995). IV 雄の繁殖生理. (森純一, 金川弘司, 浜名克己編) 獣医繁殖学, pp. 119~130. 文永堂出版, 東京.
- 69) Masui, M., Hiramatsu, H., Nose, N., Nakazato, R., Sagawa, Y., Tajima, H. and Saito, K. (1989). Successful artificial insemination in the giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) at Ueno Zoo. Zoo Biol. 8, 17~26.
- 70) McLaughlin, E. A., Ford, W. C. L. and Hull, M. G. R. (1992). Motility characteristics and

- membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 95, 749~754.
- 71) Meyer, H. H. (1994). Luteal versus placental progesterone: the situation in the cow, pig and bitch. Exp. Clin. Endocrinol. 102, 190~192.
- 72) Milligan, S. R. (1982). Induced ovulation in mammals. Oxford Rev. Reprod. Biol. 4, 1~46.
- 73) 溝口紀泰, 片山敦司, 坪田敏男, 小見山章 (1996). ブナの豊凶がツキノワグマの食性に与える影響 -ブナとミズナラの種子落下量の年次変動に関連して-. 哺乳類科学 36, 33~44.
- 74) Morato, R. G., Conforti, V. A., Azevedo, F. C., Jacomo, A. T. A., Silveira, L., Sana, D., Nunes, A. L. V., Guimaraes, M. A. B. V. and Barnabe, R. C. (2001). Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). Reproduction 12, 745~751.
- 75) 森純一 (1995). III. 雌の繁殖生理, 6. 各種家畜の発情周期. (3) 実験小動物 (森純一, 金川弘司, 浜名克己編) 獣医繁殖学, pp. 115~118. 文永堂出版, 東京.
- 76) 森裕司, 竹内ゆかり (1995.) II. 内分泌, 3. 視床下部と下垂体. (森純一, 金川弘司, 浜名克己編) 獣医繁殖学, pp. 25~36. 文永堂出版, 東京.
- 77) 茂崎宇十沙 (2004). スイムアップ法によるイヌおよびニホンツキノワグマ精巢上体精子の回収と凍結保存. 岐阜大学農学部卒業論文
- 78) Nagy, P., Juhasz, J. and Wernery, U. (2005). Incidence of spontaneous ovulation and development of the corpus luteum in non-mated dromedary camels (*Camelus dromedarius*). Theriogenology 64, 292~304.
- 79) 中山奈美 (2006). イヌおよびニホンツキノワグマ精巢上体精子の回収法および凍結保存法の検討. 岐阜大学応用生物科学部卒業論文.
- 80) 日本家畜人工受精師協会 (1998). 家畜人工受精講習会テキスト-家畜人工受精編. 社団法人日本家畜人工受精師協会, 東京.
- 81) 西川義正 (1972). 精液の一般性状 (飯田勲 編) 哺乳動物の精子, pp. 198~222. 学窓社, 東京.

- 82) O'Brien, S. J., Wildt, D. E., Bush, M., Caro, T. M., FitzGibbon, C., Aggundey, I. and Leakey, R. E. (1987). East African cheetahs: evidence for two population bottlenecks? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 508~511.
- 83) Oettle, E. E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47, 257~260.
- 84) Okano, T., Murase, T., Asano, M. and Tsubota, T. (2004). 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, 1359~1366.
- 85) Okano, T., Murase, T. and Tsubota, T. (2003). Spermatogenesis, serum testosterone levels and immunolocalization of steroidogenic enzymes in the wild male Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *J. Vet. Med. Sci.* 65, 1093~1099.
- 86) Okano, T., Murase, T. and Tsubota, T. (2004). Electroejaculation and semen cryopreservation of free-ranging Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1371~1376.
- 87) Olson, M. A., Yan, H., DeSheng, L., Hemin, Z. and Durrant, B. (2003). Comparison of storage techniques for giant panda sperm. *Zoo Biol.* 22, 335~345.
- 88) 大沼秀男 (1972). 雄の生殖器. (飯田勲 編) 哺乳動物の精子, pp. 40~79. 学窓社, 東京.
- 89) Onuma, M., Suzuki, M. and Ohtaishi, N. (2001). Reproductive pattern of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak, Malaysia. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 293~297.
- 90) Plamer S. S., Nelson, R. A., Ramsay, M. A., Stirling, I. and Bahr, J. M. (1988). Annual changes in sex steroids in male and female black (*Ursus americanus*) and polar (*Ursus maritimus*) bears. *Biol. Reprod.* 38, 1044~1050.
- 91) Peña, A. and Linder-Foresberg, C. (2000). Effects of Equex, one- or two-step dillution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54, 859~875.
- 92) Platz, C. C. Jr., Wildt, D. E., Howard, J. G. and Bush, M. (1983). Electroejaculation and

- semen analysis and freezing in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). J. Reprod. Fertil. 67, 9~12.
- 93) Pukazhenth, B., Noiles, E., Pelican, K., Donoghue, A., Wildt, D. and Howard, J. (2000). Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. Cryobiology 40, 139~150.
 - 94) Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. (1997). Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. Theriogenology 47, 1093~1101.
 - 95) Roth, T. L., Swanson, W. F., Blumer, E. and Wildt DE. (1995). Enhancing zona penetration by spermatozoa from a teratospermic species, the cheetah (*Acinonyx jubatus*). J. Exp. Zool. 271, 323~330.
 - 96) Salamon, S. and Visser, D. (1972). Effect of composition of Tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Aust. J. Biol. Sci. 25, 605~618.
 - 97) Salisbury, G. W. and VanDemark, N. L. (1961). Principles and technique of spermatozoa preservation. In: Salisbury, G. W. and Crampton, E. W. [Eds] Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. pp. 380~402. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
 - 98) Sato, M., Nakano, N., Tsubota, T., Komastu, T., Murase, T., Kita, I. and Kudo, T. (2000). Changes in serum progesterone, estradiol-17 β , luteinizing hormone and prolactin in lacting and non-lacting Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). J. Reprod. Dev. 46, 301~308.
 - 99) Sato, M., Tsubota, T., Komatsu, T., Watanabe, G., Taya, K., Murase, T., Kita, I. and Kudo, T. (2001). Changes in sex steroids, gonadotropins, prolactin, and inhibin in pregnant and nonpregnant Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Biol. Reprod. 65, 1006~1013.
 - 100) Sato, M., Tsubota, T., Yamamoto, K., Komatsu, T., Hashimoto, Y., Katayama, A., Hazumi, T., Kita, I. and Kudo, T. (2000). Serum progesterone and estradiol-17 β concentrations in captive and free-ranging adult female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). J. Vet. Med.

- Sci. 62, 415~420.
- 101) Schulz, L. C., Nelson, R. A., Pyter, L. M. and Bahr, J. M. (2003). Induction of pseudopregnancy in the American black bear (*Ursus americanus*). J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol. 298, 162~166.
 - 102) Seager, S. W. J. (1974). Semen collection and artificial insemination in captive wild cats, wolves, and bears. Ann. Proc. Am. Assn. Zoo. Vets. 1974, 29~33
 - 103) Servheen, C. (1990). The status and management of the bears of the world. Int. Conf. Bear Res. Manage. Monogr. Series 2, 32.
 - 104) Shams-Borhan, G. and Harrison, R. A. P. (1981). Production, characterization, and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa. Gamete Res. 4, 407~432.
 - 105) Shivaji, S., Jayaprakash, D. and Patil, S. B. (1998). Assessment of inbreeding depression in big cats: testosterone levels and semen analysis. Curr. Sci. 75, 923~930.
 - 106) Si, W., Zheng, P., Li, Y., Dinnyes, A. and Ji, W. (2004). Am. J. Primatol. 62, 301~306.
 - 107) Snyder, R. J., Lawson, D. P., Zhang, A., Zhang, Z., Luo, L., Zhong, W., Huang, X., Czekala, N. M., Bloomsmith, M. A., Forthman, D. L. and Maple, T. L. (2004). Reproduction in giant pandas: Hormone and behavior *In*: Lindburg, D. and Baragona, K. [eds] Giant pandas: Biology and Conservation, pp. 125~132. University of California press, Berkeley, Los Angeles, London.
 - 108) Songsasen, N. and Leibo, S. P. (1997). Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. Cryobiology 35, 255~269.
 - 109) Songsasen, N., Yu, I., Murton, S., Paccamonti, D. L., Eilts, B. E., Godke, R. A. and Leibo, S. P. (2002). Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. Cryobiology 44, 79~90.
 - 110) Spindler, R. E., Huang, Y., Howard, J. G., Wang, P., Zhang, H., Zhang, G. and Wildt, D. E. (2004). Acrosomal integrity and capacitation are not influenced by sperm cryopreservation in the giant panda. Reproduction 127, 547~556.

- 111) Ström, B., Rota, A. and Linde-Forsberg, C. (1997). *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48, 247~256.
- 112) Swanson, W. F., Howard, J. G., Roth, T. L., Brown, J. L., Alvarado, T., Burton, M., Starnes, D. and Wildt, D. E. (1996). Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *J. Reprod. Fertil.* 106, 87~94.
- 113) Szein, J. M., Noble, K., Farley, J. S., Mobraaten, L. E. (2001). Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 42, 28~39.
- 114) Taggart, D. A., Leigh, C. M., Steele, V. R., Breed, W. G., Temple-Smith, P. D. and Phelan, J. (1996). Effect of cooling and cryopreservation on sperm motility and morphology of several species of marsupial. *Reprod. Fertil. Dev.* 8, 673~679.
- 115) 坪田敏男 (2005). なぜクマは秋にえさをたくさんたべるのか -冬眠と繁殖の不思議-. (坪田敏男編)緊急クマシンポジウム; なぜクマが人里に出没するのか? その対策はどうすべきなのか? (抄録) pp. 19~20. 日本クマネットワーク, 岐阜大学 21 世紀 COE プログラム, 岐阜.
- 116) Tsubota, T., Howell-Skalla, L., Boone, W. R., Garshelis, D. L. and Bahr, J. M. (1998). Serum progesterone, oestradiol, luteinizing hormone and prolactin profiles in the female black bear (*Ursus americanus*). *Anim. Reprod. Sci.* 53, 107~118.
- 117) Tsubota, T. and Kanagawa, H. (1989). Annual changes in serum testosterone levels and spermatogenesis in the Hokkaido brown bear, *Ursus arctos yesoensis*. *J. Mamm. Soc. Japan* 14, 11~17.
- 118) Tsubota, T., Kanagawa, H., Yamamoto, K., Mano, T., Yamanaka, M., Kita, I. and Tiba, T. (1992). Progesterone concentrations using P-EIA kit in captive and free-ranging Hokkaido brown bears, *Ursus arctos yesoensis*. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 1~5.
- 119) 坪田敏男, 溝口紀泰, 喜多功 (1998). ニホンツキノワグマ *Ursus thibetanus japonicus* の生態と生理に関する野生動物医学的研究. *日本野生動物医学会誌* 3, 17~24.

- 120) Tsubota, T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1987). Changes in serum progesterone levels and growth of fetuses in Hokkaido brown bears. *Int. Conf. Bear Res. Manage.* 7, 355~358.
- 121) Tsubota, T., Taki, S., Nakayama, K., Manson, J. I., Kominami, S., Harada, N. and Kita, I. (2001). Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the corpus luteum and the placenta of Japanese black bears, *Ursus thibetanus japonicus* during pregnancy. *Reproduction* 121, 587~594.
- 122) 筒井敏彦 (1995). III. 雌の繁殖生理, 6. 各種家畜の発情周期. (2) 犬, 猫 (森純一, 金川弘司, 浜名克己編) 獣医繁殖学, pp. 100~115. 文永堂出版, 東京.
- 123) Visser, D. and Salamon, S. (1974). Effects of composition of Tris-based diluent on survival of boar spermatozoa following deep-freezing. *Aust. J. Biol. Sci.* 27, 485~497.
- 124) Watson, P. F. (1978). A review of techniques of semen collection in mammals. *In: Watson, P. F. [ed] Artificial breeding of non-domestic animals*, pp. 97~126. Academic Press, London.
- 125) Watson, P. F. (1979). The preservation of semen in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 1, 283~350.
- 126) Watson, P. F. (1990). Reproduction in the male. *In: Lamming, G. E. [ed] Marshall's Physiology of Reproduction*, 4th ed. Vol. II, pp. 747~869. Churchill Livingstone, London.
- 127) Wildt, D. E., Bush, M., Howard, J. G., O'Brien, S. J., Meltzer, D., Van, Dyk, A., Ebedes, H. and Brand, D. J. (1983). Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 29, 1019~1025.
- 128) World Health Organization. (1999). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- 129) 山本かおり, 坪田敏男, 喜多功. (1998). 飼育条件下におけるニホンツキノワグマ (*Ursusthibetanus japonicus*) の性行動の観察. *J. Reprod. Dev.* 44, j13~j18.
- 130) Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M. and Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54, 579~585.
- 131) 米田政明 (2005). 今年日本ではクマが問題となった -全国のクマの生息状況と 2004 年

の出没-。(坪田敏男編) 緊急クマシンポジウム; なぜクマが人里に出没するのか? その対策はどうすべきなのか? (抄録) pp. 3~4. 日本クマネットワーク, 岐阜大学 21 世紀 COE プログラム, 岐阜.

- 132) 米田政明 (2005). 食肉目 Carnivora クマ科 Ursidae ツキノワグマ Asiatic black bear. (財団法人自然環境研究センター編) 日本の哺乳類・改訂版. pp. 78. 東海大学出版会, 神奈川.

Reproductive Physiology and Establishment of Artificial Insemination Technique during Mating Season in Japanese Black Bears (*Ursus thibetanus japonicus*)

Tsukasa Okano

The Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*) is a large mammal that inhabits the islands of Honshu and Shikoku in Japan. In recent years, their habitats have become fragmented and shrunk by human activity, and this species even faces extinction in some areas. To prevent the extinction of the valuable animals, appropriate wildlife conservation and management must be carried out without delay. In order to enhance the conservation and management based on scientific ground, accumulation and investigation of biological data including reproductive physiology is required. Although it must be avoided, if the species would be threatened with extinction, artificial breeding considering genetic information in captivity will be required. The useful artificial breeding technique should be prepared in advance.

In this study, sexually matured Japanese black bears kept at the Ani Mataginosato Bear Park, Akita, Japan were used, in order to improve artificial insemination technique and obtain knowledge about ovulation pattern for success of artificial breeding.

First, semen collection methodology using electroejaculation *via* rectum was examined. Applying this method to anaesthetized animals requires no prior training. For that reason, electroejaculation has been widely employed in various non-domestic animals. However, it has been reported that ejaculates of ursid obtained by electro-stimulus are frequently contaminated with urine. For urine contamination control, we collected the semen using conventional (10V) and lower (7V) stimulus voltages, and compared the characteristics of fresh semen after collection. Although none of the characteristics of fresh semen including rate of urine contamination, total sperm count, motility, viability and morphology were statistically different

between the two electro-stimulus voltages, it is considered that lower stimulus voltages (7V) may be better, because such a lower voltages would reduce the strain on stimulated animals. Furthermore, fresh semen characteristics in early, middle, and post mating season were compared to study seasonal changes of them. As a result, percent sperm motility and viability in post mating season were significantly lower than those in early and middle mating seasons, and percent detached tail in post mating season was significantly higher than those in early and middle mating seasons. This suggests that semen collected in post mating season was unsuitable for artificial insemination. Besides, morphologically normal spermatozoa were measured and observed for size determination and, basic morphological findings about normal spermatozoa were obtained.

Second, cryopreservation methods for Japanese black bear semen were examined. In the present study, I employed a two-step dilution technique for semen cryopreservation, whereby semen is first cooled following an initial dilution with an extender (not including glycerol), then diluted again with the same extender supplemented with glycerol, and equilibrated. Semen collected by electroejaculation was cryopreserved, and the effects of three different diluents (egg yolk-TRIS-citrate-glucose, egg yolk-TRIS-citrate-fructose, and egg yolk-TRIS-citrate-fructose-lactose-raffinose) and 2 different incubation times (1 - 1 h and 3 - 0 h of cooling-glycerol equilibration times) on frozen-thawed spermatozoa were compared. None of the characteristics of frozen-thawed spermatozoa examined (i.e., motility, viability and morphology) were statistically different among the three diluents and between the two incubation times. This suggests that any of the three diluents and the two incubation times examined was useful for cryopreservation of Japanese black bear semen. It is considered that 3 - 0 h of cooling- glycerol equilibration times may be effective and convenient for cryopreservation of the semen of free-ranging Japanese black bears because a cooling time of 3

h may be acceptable for transport from the field to the laboratory. Furthermore, effect of different glycerol concentrations (4 – 12%) added to diluents for semen cryopreservation was examined. As a result, no significant difference was observed in percent motility or percent abnormal morphology of frozen-thawed spermatozoa among different glycerol concentrations. While, percent viability and percent intact acrosomes of spermatozoa cryopreserved with 4 and 6% glycerol were significantly higher than those with 10 and 12% glycerol. This suggests that suitable glycerol concentration for freezing semen would be 4 – 6% within the range tested.

Third, the ovulation pattern of female Japanese black bears was elucidated. The purpose of this study was to ascertain whether Japanese black bears are induced (reflex) ovulators, and how often they ovulate without mating. Female-male isolation studies were performed in mating season. As a result, in females kept with a male (allowed to mate), and could contact with a male (without mating), progesterone levels were increased significantly in late October. This suggests that they might have ovulated. On the other hand, ovaries collected from females isolated from males physically and visually were observed macroscopically and histologically after mating season. No corpus luteum was observed in any of them, which indicates they have not ovulated. These results suggest that Japanese black bears may be induced ovulators, and ovulate at a high rate with some male stimuli in spite of no coitus. When artificial insemination is performed in Japanese black bears, artificial control of ovulation will be required prior to an insemination. Finally induction of ovulation by chemical treatments was attempted. Human chorionic gonadotropin (hCG; 50 IU/kg) preparation was administrated solely in order to induce ovulation to 3 female bears in mating season regardless of their estrous cycle stage. However, progesterone levels of these bears were not increased, suggesting that they have not ovulated. On the other hand, equine chorionic gonadotropin (eCG; 1,000 IU/animal) and hCG (35 IU/kg; about 80 h after administration of eCG) preparations were administered sequentially

to other 3 female bears, and formation of corpora lutea were observed in two specimens out of three. That is, it was suggested that ovulation was not induced by sole hCG administration in the early mating season, while ovulation was supposed to be induced and corpora lutea were formed by hCG and eCG administration in early mating season.

In conclusion, semen collection and cryopreservation methods were improved, and the knowledge of ovulation pattern, which is a key for timing of artificial insemination, was acquired in Japanese black bears. Further studies will be required to investigate changes in sex steroid hormones of female bears during the estrous cycle in details, and to establish artificial induction method of ovulation. In the future, practical attempt of artificial insemination and raising of cubs will be expected.