HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the ovarian dynamics of brown bears to establish artificial insemination protocol [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	鳥居, 佳子
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第14545号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/81652
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Yoshiko_Torii_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：鳥居　佳子
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on the ovarian dynamics of brown bears to establish artificial insemination protocol

（人工授精技術確立に向けたヒグマの卵巣動態に関する研究）

IUCN（国際自然保護連合）で評価されている哺乳類約 5800 種のうち 800 種は、絶滅のおそれがあるとされており、人工繁殖技術は絶滅危惧種の個体群保護・増殖の一助となり得る。人工授精（AI）は、飼育下で繁殖が難しい野生動物における自然交配に代わる有用な技術であると考えられ、実用化できれば交尾行動に問題のある個体や遠隔地で飼育されている個体同士の繁殖が可能となり、遺伝的多様性の維持や個体数増加にも貢献できる。絶滅危惧動物であるホッキョクグマは、遺伝的多様性の低下、飼育個体群の高齢化により自然交配だけでは飼育下個体群を維持することが難しい状況となっている。しかし、同種においては、これまでに 8 度 AI が試みられているものの産子を得るに至っていない。その原因として、AI を実施するのに不可欠な、繁殖生理すなわち発情や卵胞発育の様式および排卵卵胞直径などの情報が得られていないことが挙げられる。超音波検査は、非侵襲的に繰り返し生殖器の観察が可能であることから、繁殖学領域の臨床および研究に広く用いられている。しかし、野生動物および多くの動物園動物では検査実施のために全身麻酔が必要となることから、その利用が制限されている。卵巣動態を解明するためには頻回の超音波検査、つまり麻酔の実施が必要となるため、そのリスクに対する懸念から個体数の少ない動物種では AI 技術確立に必要な基礎情報を収集する調査研究が難しい。そこで本研究は、近縁種であり絶滅危惧種となっていないヒグマをモデル動物として、同種を多数飼育し、かつ麻酔経験が豊富なのぼりべつクマ牧場（登別市）において超音波検査を用いて卵巣動態を調査し、卵胞発育の様式および速度を調べ、さらに発情様式および排卵誘起処置の目安となる卵胞直径を明らかにした。

第 1 章では、ヒグマの卵巣動態を明らかにするため、超音波画像診断装置を用いて卵巣を観察し、さらに、排卵可能な卵胞直径を明らかにするため排卵誘起処置を施した。また、卵胞発育期間中の内分泌学的評価のため、検査日に血液を採取し、性ステロイドホルモン濃度を測定した。のべ 6 頭の成熟雌ヒグマを使い、2017 年 6、7 月、2018 年 5 月から 7 月におよそ週 1 回（3 - 11 日）の頻度で、麻酔下において超音波検査により卵巣内の構造物を観察記録した。超音波検査には、自作のアタッチメントを超音波検査用 I 型リニアプローブに装着して経直腸的に卵巣を描出した。その結果、5 月には直径 6.0 mm 未満の卵胞が発育と退行を繰り返す波状の発育がみられ、6 月から 7 月にかけ

て 1 - 2 個の卵胞が直径 6.0 mm を超えて大型の卵胞（> 10.0 mm）へ発育することが分かった。卵巣に存在する胞状卵胞数は、5 月の平均 14.4 個（4 - 25 個）から 6 月以降は平均 6.2 個（1 - 13 個）に減少しており、主席卵胞への選抜が起こっていることが示唆された。また、血中エストラジオール-17β（E_2）濃度は、主席卵胞が最大直径を示す約 14 日前から増加し始め、約 7 日前に最大値を示し、その後低下していた。さらに卵胞発育速度は、5 月（0.15 mm/日）に比べて主席卵胞が出現した 6 月以降で加速していた（0.25 mm/日）。6 頭中 1 頭では、約 13 mm の卵胞の排卵が観察されており、一般には交尾排卵動物と考えられているヒグマにおいても飼育環境下では自然排卵する場合のあることが分かった。また、卵胞発育をモニタリングしていた 2 頭に対し、卵胞直径が初めて 10 mm を超えた検査日に排卵誘起のために性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）を筋肉内投与したところ、直径 10.2 mm の卵胞は排卵し、その後黄体の形成が確認できたことから、直径 10.0 mm 以上の卵胞は排卵を誘起できることが示唆された。一方、直径 14.0 mm の卵胞は排卵せず、その後、卵胞サイズが小さくなっていったことから、すでに退行過程にあったと考えられた。

第 2 章では、第 1 章で確認された卵胞発育および排卵可能な卵胞直径に関する情報の精度向上と発情様式の解明を目的として検討を行った。成熟雌ヒグマ 6 頭において繁殖期前である 4 月から排卵後の 10 月まで卵巣の観察を行い、卵胞発育開始時期の確認および発情様式の決定を行った。第 2 章では、血中ホルモン濃度に加え、血中ホルモンの影響を受けて変化する腟上皮細胞中の角化細胞率の割合および外陰部の充血・腫脹の変化を記録した。その結果、4 月には卵胞発育の開始が確認された。5 月から 6 月にかけては、波状の卵胞発育が認められ、6 月以降は直径 6.0 mm を超えて発育して 1 - 3 個の主席卵胞へと選抜されていった。排卵および黄体形成後は主席卵胞の発育は認められなかった。以上の結果から、ヒグマの発情様式は季節性の単発情であることが分かった。第 1 章の卵胞発育動態を含めて計算した卵胞発育速度は、波状の卵胞発育時の卵胞は 0.13 mm/日、主席卵胞の発育速度は 0.21 mm/日であった。一方、血中 E_2 濃度は、卵胞発育が活発となる 5 月および 6 月に高値を示し、排卵後は低値を維持していた。角化細胞率および外陰部の変化を示すスコアは E_2 濃度変動と類似し、5 月初期に増加後、主席卵胞消失後には低下し、その後も低値を維持した。以上の角化細胞率および外陰部徴候は、卵胞期の指標にはなるものの AI 実施時期の決定指標にはならないことが分かった。

排卵誘起処置は、GnRH 製剤を、牛への最大投与量とされる 20 μg またはその 2 倍量である 40 μg を筋肉内に投与して実施した。卵巣観察を行った 6 頭中 3 頭に排卵誘起処置を行い、GnRH 投与量によらず排卵が確認された。排卵または黄体形成が確認される直前の検査日（7 - 9 日前）に確認された卵胞直径は、9.4 ± 1.1 mm（平均 ± 標準偏差, 8.2 - 11.2 mm, n = 5）であった。また 6 頭のうち 2 頭において自然排卵が認められ、排卵する 7 日前に観察された卵胞直径は、7.7 ± 1.2 mm （5.8 - 8.8 mm, n = 6）であった。そのため、自然排卵が生じる可能性を考慮し、AI のための排卵誘起処置時期を決定する卵胞直径は、10.0 mm ではなく 8.0 mm が適切であることが考えられた。

本研究は、定期的な超音波検査によってヒグマの卵胞発育および発情様式と排卵可能な卵胞直径を明らかにした。ヒグマは、繁殖期開始前である 4 月には卵胞の発育が開始され、繁殖期中の 5 月から 6 月にかけて発育と退行を繰り返して波状に卵胞が発育し、交尾活動がピークとなる 6 月以降から卵胞直径 6.0 mm を超えて主席卵胞への発育が 1 回だけ認められることが分かった。また、主席卵胞の発育速度は、0.21 mm/日であり、それ以前の卵胞発育速度（0.13 mm/日）に比べ加速していた。また、繁殖期終了後には主席卵胞の発育が認められなかったため、ヒグマの発情様式は季節性の単発情であり、AI を実施する機会が 1 年に 1 回しかないことが明らかとなった。自然排卵の可能性を考慮すると、年 1 回の AI のチャンスを逃さないためには、排卵誘起処置のタイミングとして、最大卵胞が直径 8.0 mm になる時期が適切であることが分かった。本研究により、卵胞の発育速度

および排卵可能な卵胞直径を調べることで、必要最低限の麻酔頻度で実施できるヒグマの AI プロトコールの確立が可能となった。また、このプロトコールをホッキョクグマなどの絶滅危惧種に応用することで、繁殖生理学に基づいた AI プロトコールの確立が可能となり、絶滅危惧種の飼育下での個体群および遺伝的多様性の維持に寄与すると考えられる。