



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The studies on establishment of artificial insemination protocol in the Japanese macaque [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	高江洲, 昇
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第15032号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86033
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	TAKAESU_Noboru_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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：高江洲 昇

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

The studies on establishment of artificial insemination protocol in
the Japanese macaque.

(ニホンザルにおける人工授精プロトコル確立に向けた研究)

< abstract >

ニホンザル (*Macaca fuscata*) は日本の固有種であり、動物園で広く飼育・展示され、野生での生息状況を模すため雌雄混合の群れで飼育されることが多い。しかし、ニホンザルの繁殖力は強く、飼育環境下においても容易に繁殖するため、多くの動物園で飼育個体数過剰が問題となる。繁殖制限のため、オスについては精管切除術、メスについてはプロジェステロン製剤のインプラントが処置されるが、意図しない精管再疎通やサル自身によるインプラント剤の抜去により失敗することが多い。また、ニホンザルの群れは排他的で群れ内の結びつきが強く、外部から個体を導入すると攻撃されて死に至ることがある。結果として、外部からの遺伝子導入がないまま閉鎖的な群れで繁殖を繰り返すことで、遺伝的多様性の低下も問題となる。保存精液を使用した人工授精 (AI) が家畜および一部の動物園動物で繁殖管理に利用されており、ニホンザルにおいても精液を提供するオスおよび AI の対象となるメスの選別と厳密な避妊処置により、血統管理と繁殖数管理を同時に実施可能であると考えられる。しかし、ニホンザルの AI についての報告は少なく、凍結保存精液を使用した産子獲得については報告がない。

AI を成功させるには、オスおよびメス両方へのアプローチが必要となる。また動物福祉の改善および実用性の向上のため、侵襲性が低く簡便な方法が求められる。オスについては、精液の採取と保存が課題として挙げられる。ニホンザルの精液採取には直腸プローブによる電気刺激法 (EE 法) が一般的に用いられるが、同属であるマカク属を含む他の動物種よりも高い電圧が使用されている。また、精液が副生殖腺液の作用により射精後すぐに凝固し、採取精子数や精子運動性を減少させることが知られている。食肉目動物では、 α_2 アドレナリン受容体作動薬の精管収縮作用によって尿管内に分泌された精液を尿管カテーテルの挿入により回収する方法 (UC 法) が報告されている。霊長目動物における UC 法の有効性は不明であるが、電気刺激による侵襲なしで精液を回収すること、ならびに通常の射精を伴わないため精液凝固による精子数および運動性に対する負の影響を軽減すること

が期待できる。

一方、ニホンザルの精液凍結処理において、精液の濃縮と検査のため 30 分から 60 分間精液を一時的に保管する時間が必要であるが、精液の短時間保存に適切な温度は動物種によって異なり、ニホンザルの適正保存温度は不明である。また同属のアカゲザルにおいて、精液の冷却速度を速めることで凍結融解後の精子の活性が上昇したという事例が報告されており、ニホンザルの精液凍結処理においても、冷却速度を検討する価値があると考えられる。

第 1 章では、精液採取技術の改善および侵襲性の低減のため。ニホンザルの精液採取における UC 法および電気刺激後に UC 法を実施する方法 (EE-UC 法) の有用性について検討した。併せて低電圧刺激での精子採取の有用性を検討するため、低電圧群 (3-4-5、4-5-6 V) と高電圧群 (5-10-15 V) の、精液採取率を比較した。また、凍結保存処理中の精液性状改善のため、採取した精液を 4°C、15°C、25°C および 37°C で 60 分保存した後の精子運動性を比較し、適切な保存温度について検討した。さらに、2 次希釈のタイミングと冷却スピードを変えた 2 種類の冷却方法で精液を凍結保存し、各凍結処理段階および凍結融解後の精子性状を比較した。

その結果、ニホンザルにおいて鎮静量の α_2 アドレナリン受容体作動薬投与 (メドトミジン、25-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) では UC 法によって精液は採取できないことが明らかとなった。しかし、EE-UC 法によって EE 法のみでは採取不可能な尿道内に貯留する液状精液を回収し、総採取精子数を増加させられることが明らかとなった。高電圧群では低電圧群より精子採取率が有意に上昇した。精液採取率を最大にするためには 5 V から 15 V までの電圧上昇が必要であるが、個体への侵襲を抑えたい場合は 10 V までの上昇が有効であることが示唆された。精液の保存については、60 分間保存した後の前進運動精子率が 25°C の保存温度下で高い傾向にあり、一時保存温度として 25°C が適正であることが示唆された。また、二次希釈を冷却前に行い 20 分で素早く 4°C 付近まで冷却することで、60 分から 90 分かけて冷却した後に二次希釈を行う方法に比べ、凍結前の精子運動性が改善した。

一方、AI 実施のメス側の課題として、精液注入適期の検査および調整が挙げられる。ニホンザルの AI では、排卵確認のため排卵前後に複数回の腹腔鏡検査が実施され、精液注入も数日に渡って実施されていた。しかし、検査に伴う頻回の麻酔および外科的処置は侵襲性が高く、動物福祉の観点から改善が必要である。さらに動物園での実施を考慮すると、AI のためにサルを群れから隔離することは、群れ内の順位が混乱し闘争の原因となるため、隔離期間の短縮が求められる。超音波画像診断装置による卵巣動態観察は家畜およびマカク属のサルを含む野生動物において広く実施されているが、ニホンザルにおける報告はない。また AI 適期のコントロールに誘起排卵が利用されるが、ニホンザルにおいては性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の使用例はない。

第 2 章では超音波画像診断装置によるニホンザルの卵巣動態観察、GnRH による誘起排卵およびそれらの知見を応用した単回精液注入による AI の有効性を評価した。超音波画像診断装置によって 6 回の自然排卵を観察した結果、ニホンザルの自然排卵は生理周期の 12-14 日目に主席卵胞が 7.4 ± 1.5 (5.1-9.6) mm の時に起こることが明らかとなった。また主席卵胞が 5.8 ± 1.2 (4.7-7.4) mm の時、GnRH 投与により投与翌日までに排卵を誘起することが明らかとなった。GnRH による排卵誘起と単回の精液注入を併用した人工授精を生理周期の 8-14 日目に計 7 回実施した結果、生理周期の 12 日目で AI した 1 頭が妊娠したが、胎齢 50 日付近における胎子の発達停止が確認された。

本研究から、ニホンザルの精液採取において、EE-UC 法によって採取精子数を増加させられることが判明した。また、精液採取には高い電圧が必要であるが、最大 10 V の刺激で 15 V と同等な精液採取率が得られることが明らかとなった。精液凍結処理については、一時保存には 25°C が適正であること、二次希釈後に素早く冷却することで精子運動性を改善できることが併せて示された。また、ニホンザルの卵巢動態把握および排卵誘起に関して、超音波画像診断装置と GnRH 投与がそれぞれ有効であることが明らかとなった。ニホンザルの AI について、GnRH を使用した排卵誘起後の単回精子注入により妊娠が達成でき、侵襲性の低減および隔離期間の短縮が可能であることが示された。これらの知見は動物園等のニホンザル飼育施設における人工授精プロトコルの低侵襲化および効率化につながるものであり、将来的なニホンザル飼育群の繁殖管理および動物福祉の改善に貢献するものである。また、絶滅が危惧される近縁種の飼育下繁殖に応用できる可能性もあり、生息域外保全への貢献も期待される。