

23. ツシマヤマネコの人工繁殖技術に関する研究

担当機関 環境省 自然環境局 (委託先) 財団法人自然環境研究センター 米田久美子

重点強化事項	自然環境	研究期間	平成12年度～平成14年度
		研究予算総額	23,932千円

研究の背景と目的

国内希少野生動植物種に指定されているツシマヤマネコは国内では対馬にのみ生息する野生のネコ科動物である。平成9年度の第二次生息特別調査で生息数は70～90頭と推定されており、絶滅のおそれのある野生動植物種の中で最も危機ランクが高いとされている。これまで環境省では本種の保護増殖事業として、生息状況等調査、普及啓発と共に、飼育下繁殖の研究を行ってきており、平成10年度から飼育下繁殖が実施されている。

しかし、個体の繁殖能力に左右される自然繁殖のみでは、限られた飼育頭数で計画的な繁殖を行うことは困難である。事故死個体などからの配偶子の採取・保存技術を確立し、残されている遺伝的多様性を保存するとともに、人工繁殖技術を利用して飼育個体の計画的な繁殖を行い、野生個体群に負担の少ない方法での個体数の増加、長期的に安定した飼育下個体群の維持を図る必要がある。

本研究は、ツシマヤマネコの飼育現場において人工繁殖技術を確立することを目的とした。

研究の成果

本研究は以下の4分野について実施した。

1. 死体からの配偶子回収・保存

本研究期間にツシマヤマネコのオス6頭、メス8頭の死体から配偶子の回収を試み、オス2頭、メス6頭で回収に成功し、回収した配偶子を凍結保存した(表1)。オス1頭で前進運動する良好な精子が回収できた(図1)。メスの卵母細胞は形態で性状を判定したが、周囲を卵丘細胞層が密に覆っている「Excellent」ランクと判定されたものはなく、卵丘細胞層が部分的に欠落しているものの、それ以外は良好の「Good」ランクが1頭から回収され(図2)、残りはすべて「Fair」ランク以下であった。回収率、回収配偶子の性状には、対象個体14頭中9頭が亜成獣以下の若い個体であったこと、死亡から回収までに41～231.5時間以上と時間がかかったこと、繁殖期か否か、死亡時の健康状態などの要因が影響していると考えられた。

死体発生時に生殖器回収、輸送などの体制、技術が確立され、配偶子の回収はツシマヤマネコの死体発見時の通常業務の一部となった。今後、より良い性状の配偶子を回収するために、回収までの時間の短縮方法を検討すると共に、人工授精に使うための卵母細胞の培養・成熟の技術の検討、配偶子の凍結保存の最適条件の検討などが必要である。

2. イエネコにおける人工授精

ツシマヤマネコで人工授精を実施するために、ツシマヤマネコを飼育している動物園においてイエ

ネコを用いた基礎技術研究を行った。

電気射精では体位を側臥にして刺激することが有効であった。34回実施し、得られた精液の性状は精液量は 32~640 (平均 108) μ L、精子濃度は 8~1288 (平均 438) $\times 10^6$ 個/ml、精子数は 3.6~119 (平均 31.5) $\times 10^6$ 個であった。また、血中 CPK 値の平均が、刺激前の 278 単位/L から刺激後の 792 単位/L にまで上昇しており、電気刺激時間の長い例ほど CPK も上昇していた。しかし、3 日後には CPK 値は 282 単位/L まで低下した。一般に CPK は骨格筋などの損傷により上昇し、電気刺激により全身の骨格筋が収縮を繰り返す、損傷を受けたと考えられた。このように電気射精法は全身的な影響があると考えられ、全身麻酔を施すこともあり、十分な間隔を置いて採精する必要があると考えられた。

無発情期の健康なメスネコに、卵巢の発育を促す目的で PMSG を、排卵を促す目的で hCG を投与し、排卵誘発を行った。反応には個体差があり、人工授精等を行う場合には、予め内視鏡等を用いて卵巢の形態を観察し、卵胞の発達状態と排卵を確認する必要があると考えられた。

排卵誘発したメスに電気射精で得られた新鮮精液を用いて人工授精を行った。経膣法で 3 回、片側子宮内人工授精で 16 回実施し、経膣法で 1 回、片側子宮内人工授精で 2 回妊娠に至った(表 2、図 3)。しかし 2 例は流産し、残る 1 例も難産の後、親が食べてしまった。

また、非侵襲的な性周期の把握や妊娠診断法として、糞中の性ホルモンの分析を行うため、飼育施設での抽出方法を検討し、エストラジオールとプロジェステロンについてイエネコを用いて血中濃度と比較した。その結果、エストラジオールについては良好な結果が得られたが、プロジェステロンは抽出が不十分と考えられた。またテストステロンについても抽出方法を検討し、有機溶媒を用いなくても抽出が可能となった。

本研究によって、動物園においてツシヤマネコの人工授精を行う基礎技術は得られた。今後、イエネコにおいて人工授精技術の確実性を高めると共に、繁殖の季節性が明確な野生ネコ科動物での研究が必要と考えられる。

3. 遺伝的多様性

ツシヤマネコは少ない個体数で長期間、限られた生息地に生息しているため、遺伝的多様性はかなり低くなっていると考えられている。今回、飼育下繁殖対象個体について、マイクロサテライトによる遺伝的多様性の検討を行った。10 個のマイクロサテライト座位のうち 8 個について PCR 産物が得られ、塩基配列解読を行った結果、CA 反復配列の基本構造を含んでいることが明らかとなった。明らかに CA 反復数が個体間で同一の座位 (FCA77) および、技術的に配列解読が困難な座位ならびにサンプルが見られた。その中で、座位 FCA96 では反復配列の塩基配列解読が成功し、個体差を見出した(図 4)。またその結果、同じ場所で捕獲され、親子関係が疑われていた 2 頭のファウングメスは、母子関係にはないものと考えられた。

今後、より多くのマイクロサテライト座位を解読し、飼育下個体群および野生個体群の遺伝情報を明らかにしていく必要がある。

4. 飼育下繁殖計画

飼育下繁殖計画の対象となるツシヤマネコは 2003 年 3 月末現在、10 頭であり、そのうち 4 頭のメスは妊娠中と考えられている。この個体群について、飼育下個体群の人口学的・遺伝学的検討を行うコンピューターソフトを用いて、遺伝的多様性を維持するための長期的繁殖計画を検討した。その

結果、150 頭程度の収容設備を用意し、2 年に 1 頭ずつ保護収容個体などの野生個体を追加し続け、飼育下個体群を 130 頭前後に維持するという方法が望ましいと考えられた。

個体数が目標頭数にまで増えた後は近交係数、保護収容個体などの遺伝子資源の活用、有効個体数割合などに配慮し、毎年、見直しを行いながら繁殖計画に基づいて繁殖管理を行い、個体数を維持していく必要があると考えられる。

研究のまとめ

死体からの配偶子回収は体制、技術が確立され、ツシマヤマネコの死体発見時の通常業務の一部となった。イエネコでの人工授精技術については、妊娠はしたものの、出産・成長には至らず、メスへの侵襲の小ささと授精の確実さの両立など、技術的検討課題が多く残された。遺伝的多様性研究ではツシマヤマネコの個体間変異を示すマーカーが一つ発見され、親子関係が疑われていた 2 頭のファウンダのメスは親子ではなかったことが判明した。このように、本研究は一定の成果を上げ、今後の研究を誘発する起点となったと考えられる。

飼育下個体群管理のコンピューターソフトによる検討からは、ツシマヤマネコの飼育下個体群を 130 頭前後に維持することが望ましいと考えられた。個体数が増加した段階では遺伝学的に配慮した繁殖管理が必要で、それには人工繁殖技術の活用が不可欠となる。現状ではまだ利用できる段階ではなく、利用に向けて、今後、本研究で実施した技術の改善・向上・発展が必要と考えられる。

表 1 : ツシマヤマネコの配偶子回収結果

a .

個体	No.11		96-002		DM021229鹿見		DM021229泉		DM021231		DM030212	
経過時間*(h)	<66		45.5		>231.5		>210		>189.5		>41	
左右	右	左	右	左	右	左	右	左	右	左	右	左
回収部位	TE	TE	cEP	cEP	cEP	cEP	NS	cEP	TE	TE	cEP	cEP
回収方法	細切	細切	細切	灌流	灌流	灌流	NS	灌流	細切	細切	灌流	灌流
回収精子数(百万)	0.0	0.0	0.25	1.10	0.0	0.0	NS	0.0	0.0	0.0	17.50	4.20
生存精子率(%)	-	-	58.8	63.2	-	-	NS	-	-	-	81.6	87.2
精子運動指数	-	-	0.00	0.00	-	-	NS	-	-	-	7.50	17.50

b .

個体	DF011218		DF011226		CFS-14		DF021110	
経過時間*(h)	>81		70		41		>74	
左右	右	左	右	左	右	左	右	左
卵胞数***	4	5	0	0	0	0	0	0
採卵数	4	5	15	5	10	6	17	17
Excellent	0	0	0	0	0	0	0	0
Good	0	0	0	0	1	2	0	0
Fair	1	4	3	0	3	4	4	4
Poor	3	1	12	5	6	0	13	13

b .

個体	DF021124		DF021129		DF021223		DF030325	
経過時間*(h)	>47		>62		>52		>52	
左右	右	左	右	左	右**	左**	右	左
卵胞数***	0	0	0	0	NS	NS	0	0
採卵数	0	0	21	10	NS	NS	11	8
Excellent	-	-	0	0	NS	NS	0	0
Good	-	-	0	0	NS	NS	0	0
Fair	-	-	3	2	NS	NS	1	3
Poor	-	-	18	8	NS	NS	10	5

*死体発見または死亡確認から配偶子回収までに要した時間

**その後卵巣でないことが判明

***肉眼的に確認できたもの(直径<1 mm)

の回収部位 cEP: 精巣上体尾、TE: 精巣

Excellent: 卵子と透明帯の色や形、サイズも良好で、周囲を卵丘細胞層が密に覆っている

Good: 卵子、透明帯または卵丘細胞層に軽度の異常が見られる

Fair: 卵子、透明帯または卵丘細胞層にGoodよりも重度の異常が見られる

Poor: Empty zonaやfragmentationを含む著しい形態異常が見られる



図 1 : DM030212 の左精巣上体尾遠位部から回収した生存精子
(ニグロシン・エオジン染色、400倍で撮影)

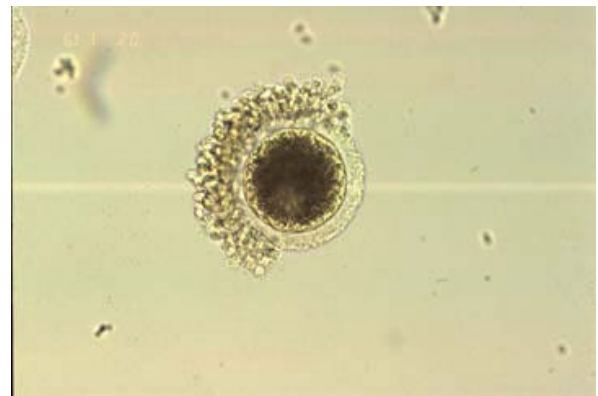


図 2 : CFS-14 の左卵巣から回収した「Good」ランクの卵母細胞(200倍で撮影)

表 2 : 片側子宮内人工授精の結果

メーカー	PMSG投与量(IU)			hCG (IU)	個体 番号	卵巣の状態					精子数 ($\times 10^6$)	結果
	7日前	6日前	5日前			右卵胞	右排卵	左卵胞	左排卵	判定		
Sigma	100	50	-	100	Q3	7	0	7	0		68	妊娠4胎、39日目流産
					Q4	?	0	?	0	×	3.0	
					Q5	?	0	?	0	×	11	
Sigma	100	100	-	100	Q2	0	0	0	0	×	20	
					Q4	5	0	?	0		62	
Sigma	200	100	-	100	Q1	?	0	?	0	×	19	
					Q5	3	0	5	0		66	
Sigma	100	100	100	100	Q2	0	0	0	0	×	12	
					Q3	10	0	<14	0		12	妊娠1胎、70日目出産
					Q5	3	0	2	0		nt	
日本全薬	100	100	-	100	Q1	9	0	3	0		46	
					Q3	18	2	11	2		25	
三共	100	100	-	100	Q4	0	0	4	0		20	
				-	Q2	5	0	0	0		-	実験用に卵巣を摘出
自然発情	-	-	-	100	Q1	?	0	?	0	×	26	
					Q4	6	0	1	0		8.7	
					Q5	3	0	7	0		17	

凡例 ? : 成熟卵胞が認められないか、明らかでなかったもの。
: 卵巣の発達が良好で排卵点が認められたもの。
: 卵巣の発達が比較的良好だったもの。
: 卵巣の発達があまり良くなかったもの。
× : 卵巣の発達が悪く成熟卵胞が認められなかったもの。
nt : not tested

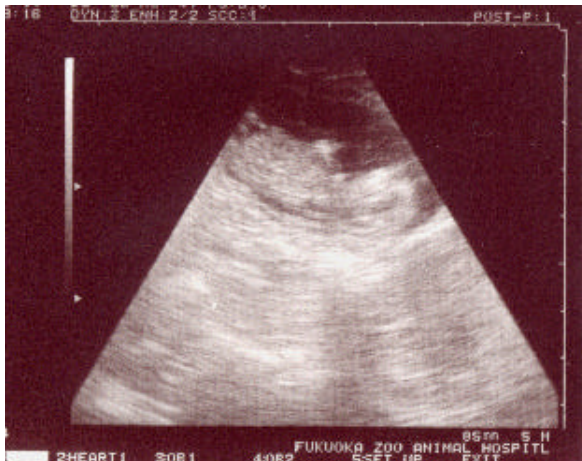


図 3 : 片側子宮内人工授精での妊娠例。
人工授精後 34 日目。

No. 8	メス親	(AC) ₁₁ (TC) ₁₉ TC
No. 3	オス親	(AC) ₁₁ (TC) ₁₉ AC
No. 9	メス仔	(AC) ₁₁ (TC) ₁₉ TC AC
No.10	メス仔	(AC) ₁₁ (TC) ₁₉ TC AC
死亡個体	オス仔	(AC) ₁₁ (TC) ₁₉ TC AC

図 4 : ツシマヤマネコのマイクロ
サテライト座位 FCA96

研究発表

発表題名	掲載法 / 学会等	発表年月	発表者
(誌上発表) ・保全繁殖技術で希少動物の種を保存	Science & Technology Journal, 14, 22-23	2002	楠
(口頭発表) ・ツシマヤマネコを含む死体からの配偶子の回収状況について (2001~2002)	第10回希少動物人工繁殖研究会議	2002	楠