

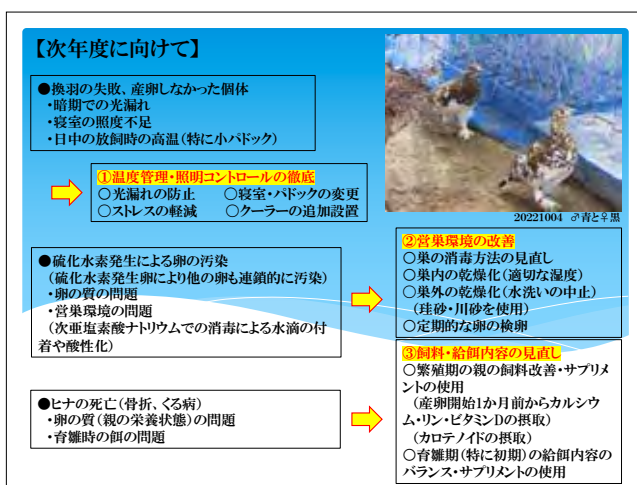


ります。

あとは盲腸に原虫多数寄生というもあります。これはコクシジウムですけど、重度の感染により栄養摂取の状態が悪くなったのか、それとも個体の弱体化により重度の感染になったか、そのどちらも考えられます。

動画が2つありますが飛ばしてください。

結局、2羽が死亡しましたので、中アへの成鳥の移送ということで、雄の空、雌の親、雌赤の3羽、成鳥3羽のみの移送になりました。



次年度に向けてなのですが、来年度は換羽の失敗、産卵しなかった個体の繁殖になりますので、まずは温度管理、照明コントロールの徹底をしないとイケないというのが1つです。

次に硫化水素発生による卵の汚染ですが、卵の質の問題も当然ですが、営巣環境の問題、これは巣の構造自体は那須どうぶつ王国とほぼ変わりませんので、次亜塩素酸での消毒とか水滴の付着や酸性化、非常にこれは改善していかないとイケないということで、消毒の見直しです。

あとは巣内の乾燥化、適切な湿度、あと「巣外の乾燥化」と書いてありますが、茶臼山ではコンクリートの地面なので水洗いしていたのですが、那須どうぶつ王国は川砂だとか珪砂を使っていますので、そこら辺も変えていかないとイケないかと思っています。

あとは定期的な卵の検卵、なるべく卵は触らないようにと

いうことで検卵を全然しなかったのですが、やっぱり検卵はしなきゃいけないなというのがあります。

あとはひなの死亡なのですが、骨折やくる病に関しては、繁殖期の親の飼料改善、サプリメントの使用などをして必要な栄養素を与えないといけないということです。

あとは、育雛期、特に初期ですけども、給餌内容のバランスだとかがサプリメントの使用というのは大切なことというふうに感じています。

早口になりましたが、報告を終わらせていただきます。

ありがとうございました。(拍手)

○座長(牛田 一成) ありがとうございました。

この2年間、大変な時期を過ごされて、まだ続くということで、ぜひ頑張ってください。

4「ライチョウにおける人工繁殖補助技術の最前線」

吉澤 円((公社)東京動物園協会・東京都恩賜上野動物園飼育展示課動物病院係)



○座長(牛田 一成) それでは4席目になります。上野動物園の吉澤先生から人工繁殖技術に関して御報告いただきます。

よろしくお願いいたします。

○吉澤 円 「ライチョウにおける人工繁殖補助技術の最前線」に関して発表いたします上野動物園の吉澤です。

背景

- 2014年 第一期域外保全実施計画策定（環境省）
- 2015年 卵から飼育開始
（富山市ファミリーパーク、恩賜上野動物園）
- 2020年 第二期域外保全実施計画にて**繁殖補助技術開発**が明記
将来的には「野生オスから採精」
- 2021年～ 横浜市繁殖センターと上野動物園で取り組み開始

利点： 個体を移動せずに遺伝的多様性を保つ
自然繁殖できない個体の遺伝子を残せる
凍結すると半永久的保存が可能

な多様度が保てる、それから、自然繁殖できない個体、例えば足が悪くて雌の上に乗れませんとかいう個体の遺伝子も残せる、凍結保存が可能になれば半永久的に保存が可能になるので、例えば今年は繁殖に使わないけれども3年後5年後とかに繁殖に使おうということに可能になります。

（人工）繁殖補助技術とは

- 人工採精、精液の保存（低温、凍結）、人工授精など

vs

- 人工繁殖：有精卵を孵卵器で孵卵し、孵化させたり、人工育雛をしたりすること

vs

- 自然繁殖：自然交配後、親が卵を温め、育雛をすること

この取り組みが始まった背景なのですが、ちょっと前半は飛ばしまして2020年の第2期生息域外保全実施計画の中に繁殖補助技術の開発というのが明記されたのが始まりです。こちらには、将来的には野生の雄から採精して個体を移動させずに精液でファウンダーを確保しようということまで明記されています。

これに基づいて、2021年、すなわち去年から始まったばかりなのですが、横浜市繁殖センターと上野動物園の2園間で取り組みを開始しました。

こちらは、先ほども言いましたが、個体を移動させるということ、例えば何か事故が起こる可能性とかを排除して遺伝的

ちょっと言葉のことなのですが、「人口」をつけたりつけなかったりしますが、繁殖補助技術とは何かというと、人口採精、精液の保存、人工授精などというところまでがライチョウのほうでは掲げられています。哺乳類ですと体外受精とか胚移植とかがありますが、我々はまだそこまでの技術には至っていません。

たまに混同されがちなのが人工繁殖という言葉ですが、こちらは有精卵を人工的にふ化させたりすることになります。

では、精液のお話になります。

I. 採精、精液保存、輸送

馴致

- クロアカ周囲の羽切り
- 保定やマッサージに対する馴致を実施
- スコアリング実施

評価項目	評価基準（％）	スコア
尾羽の上がり	基準に反応良好（75-100）	4
翼の上がり	基準に反応良好（75-100）	3
尾羽周囲の腫れ（クロアカ反転）	尾羽周囲のみ反応あり（25-50）	2
尾羽周囲の腫れ	少し反応あり（1-25）	1
	全く反応なし（0）	0



まず採精なのですが、そもそもライチョウで採精するのは誰も行ったことがないので馴致を行いました。こちらは上野だけでの取り組みなのですが、実は、まずクロアカの周辺の羽を切りました。そうするとクロアカの周りの色とか腫れ具合が分かるようになります。

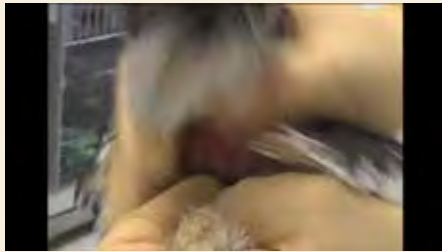
それから、補綴やマッサージに対しての馴致をやって、補綴しても大丈夫かどうかというのを見ました。

横浜市繁殖センターのほうは馴致をやらなくてもいきなり取れたということなので、取れるのかもしれないです。

そのときにスコアリングをしまして、クロアカの赤さとか、マッサージしていくと羽を広げてゴロゴロっていったりする

ので、それを数値化して、見た目と精液がどういふふうに変異するかというのを見ました。

採精



動画をお願いします。

採精の動画なのですが、置いてマッサージをして、出ているのが総排せつ腔の交尾器なのですが、白いのがライチョウの精液になります。これは留置針というちょっと柔らかい針で取っています。

精液検査



- 保存液で希釈
- 計量
- 活性 (+/-)
- 精子数
- 正常形態率
- 生存率

こちらも動画をお願いします。

精液検査を行おうとするのですが、まず保存液で先ほど取ったものを希釈します。2倍速になっています。

これをピペットできちんと計量して中の精液の活性を調べるのですが、精液性状検査板というものを使って顕微鏡に乗せ、こうやって精子が動いている活性をプラス、プラマイ、マイナスで見て判断しています。

鳥の性器は先端が細いのですが、これをさらにホルマリン生殖で固定して、こちらの血球計算盤というものに入れて、これもまた顕微鏡にかけて格子の中に何個の精子が入っているかというので精子濃度を数えます。このときに奇形数

なんかも見えています。

こちらは、今、染色液を垂らしていますが、こちらを精液と混ぜることによって、この時点で死んでいる精子は少し頭が赤く染まるというのを利用して生存率を出しています。

こうやって（イト？）を広げています。

採精結果（上野）

- 2021/4/20～7/5のうち19日間、のべ54羽
対象個体：N10、N13、N14、N39
- 2022/4/25～7/7のうち17日間、のべ47羽
対象個体：N6、N9、N10、N14



上野だけなのですが、採精結果です。

2021年2022年と4羽ずつの雄でやりました。

左側が2021年、右が2022年の結果になります。

縦軸が総精子数、横軸が日数になります。

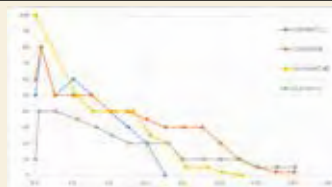
ここがびよんと飛び出ているのですが、これは恐らく固まりを数えてしまったものなので無視してください。

これは100万の単位なので6億5億という数字になります。

2021年は比較的盛り上がり後半にあつてすとんと終わったのですが、2022年はちょっとピークがおのおので違ったなという印象です。

低温保存・輸送

- 2021年は横浜で1週間以上精子の活性を保つことに成功
- 保存液：BPSEを使用
- 採取してすぐに希釈
- 検査終了後、冷蔵庫で保存
- 輸送：発泡スチロール＋氷水
公共交通機関を利用（採精後約4時間で到着）
- 横浜到着後に活性を検査
→上野での検査値と比較



先ほど取った精液をそのまま雌に人工授精するのだったらいいのですが、それをどこかに運んだりとか後で使ったりすることを考えると、どうしても保存をしなければなりません。

去年、上野では低温保存を試みたのですが、もう全然、半日も持たないぐらい、1日なんか当然持たないぐらいのさんざんな結果でした。

ところが、横浜のほうでは1週間以上精子の活性を保つことができていました。

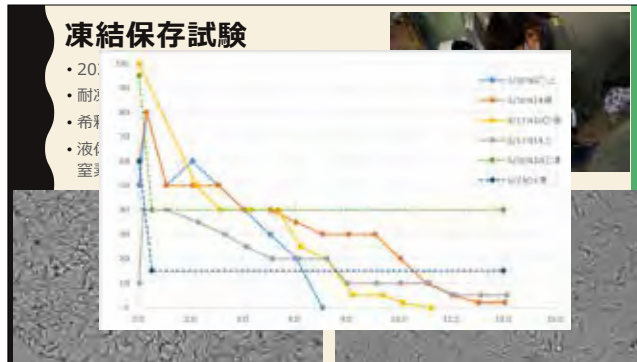
精液は、そのまま保存するよりも保存液を利用するほうが良いとされています。栄養を与えたりとかPHを鑑賞したりす

るためです。

ですので、今年はちょっと技術交流をしまして、これは各精液の活性がだんだん下がっていく様子なのですが、縦軸が活性%で横が日数なのですが、上野でも2週間ぐらい生きていたものもありました。

今年はこれを横浜に運ぶということになっていたのですが、上の保存は冷蔵庫で4度なのですが、発泡スチロールと氷水を使いゼロ度の状態で運びました。

横浜市繁殖センターに到着した後、こちらのように活性を検査して、上野でやった検査値と比較してあまりにも落ち込んでいるようだったら人工授精の対象から外すなどをこの場で判断していました。



今年は凍結保存の試験も行いました。

こちらはスパールバルライチョウを飼っているケージのすぐ横でやっているのですが、液体窒素に入れますので耐凍剤というのを入れたりしなくてはならないのと、あとは少しずつ温度を下げていかなくてはなりません。

左の動画をお願いします。

こちらは凍らせる前の元気な精液です。

右側の動画をお願いします。

こちらはちょっと濃度が下がっているのですが、大分動かなくなっている精子が増えているのが分かりますが、中にはすごく頑張って前進しているのが残っていると

思います。

クリックをお願いします。

先ほどの低温保存のグラフと凍結保存の活性を重ねました。

破線が凍結保存の部分なのですが、凍結保存は一気にかくんと活性が下がるのですが、その後はもう半永久的に同じになります。

低温保存は徐々に徐々に下がってきます、

現在の技術ですと、大体1週間くらいのところまでは低温保存のほうにメリットがあって、それより後だったら凍結のほうがいいのかと思うのですが、元の精液の質が違うので、ちょっとまだはっきりは言えません。

人工授精に入ります。



注入器具、手順

- 卵管内注入ーニトリ用精液注入器 (FHK製)
- 段ボールの中に入れて、尾を手前に出す
- 保定者が、上からマッサーして、♂の乗属を再現
- シリンジの先端を卵管内に挿入し、精液を注入

注入なのですが、こちらは鶏用精液注入器というのを使いました。

ただ、ライチョウの精液はすごく微量なので、そのままだと使いづらいということで中に栄養チューブをオリジナルで通しています。

動画をお願いします。

ちょっとこれはすごく見づらいのですが、雌のお尻なのですが、もう卵を産む頃になると卵管が後ろから見えるので、そこに向かって入れて、解剖学上の向きに合わせて挿入するとすぽんと入るところがあります。入ったよとなったら、精液をこうやって注入しています。

こちらは人工授精の上野での結果です。

2021年は保存せず、検査後すぐに精液を注入しました。2羽の雌に対して9回ずつです。

2022年に関しては、先ほど作った凍結精液をそれぞれ1回ずつ注入しています。

人工授精 (@上野)

- 2021年は検査後すぐに注入
5/24~7/2
N27、N75ともそれぞれ9回
産卵期間：N27:6/12~、N75:6/15~
- 2022年は凍結精液の注入
それぞれ、2個産卵してからすぐ
凍結精液を解凍、活性を確認後
6/13 N27へ 6/20 N75へ
それぞれ1回注入

	N14♂xN27♀	N10♀xN75♂
2021/5/24		21.15
2021/5/28	2.4	
2021/5/31		
2021/6/3	58.8	
2021/6/7		1.344
2021/6/11	100.27	352.24
2021/6/14	115.2	199.29
2021/6/17	53.04	76.16
2021/6/21	98	130.52
2021/6/24	45.84	164.32
2021/6/28	70.04	244.8
2021/7/2	65.33	226.56

	産卵数	産卵率	♀	使用凍結精液
2022/6/13	42.28	5.10.85	N27	UN14-20220602
2022/6/20	20.4	10.30.60	N75	UN10-20220618-1

低温輸送後の人工授精 @横浜

- 2022/5/16、5/19、5/20、6/6、6/9の5回輸送
- ♀ : N52、N122@横浜
- ♂ : N9、N10@上野
- 上野からの輸送以外にも、♂N44、N60で採精・人工授精
- 液量は200μl以内を目指す



日付	メス	オス	後入精子数・注入量・新鮮度
5月14日	N52	N9	4,500万・200μl・3番
5月16日	N52	N10	14,700万・200μl・3番
5月19日	N52	N9	16,700万・200μl・2番
5月23日	N52	N10	22,000万・200μl・4番
5月26日	N52	N9	40,000万・200μl・4番
6月4日	N52	N10	25,000万・200μl・3番
6月12日	N52	N9	87,500万・150μl・4番
6月13日	N52	N9	78,000万・250μl・3番
6月13日	N52	N9	78,000万・150μl・3番
6月16日	N122	N10	21,500万・200μl・3番

こちらは横浜に低温輸送した後の人工授精になります。
上野から5回輸送しました。
横浜での対象は2羽、上野も2羽を運んでいます。
実は、横浜のほうでは去年は人工授精には成功しなかった
ので、一生懸命ほかの雄でも採精して人工授精をしました。

結果




これが一覧になります。
ちょっと見づらい結果表なのですが、上の2つが昨年の上野の結果です。これが卵のナンバーで、この卵を産む前に注入したかどうか2段階、それをふ卵したかどうか3段階、有精か無精かという判定が4段階になります。
ピンクの濃いのがふ化した卵、薄いのが有精卵だったもの、緑色は不明、青が無精というふうになっています。有精無精については、今度お話しされる太田先生に判定していただいています。
2021年にふ化しました。実は、これが多分日本初なんじゃないかなという人工授精の成功ということになりました。

ほとんどが有精卵で、不明がありました。
真ん中の2022年—今年の横浜の結果がこちらなのですが、横浜では2卵を産卵後に注入を始めて、ふ卵したものとしなかったものがあつたのですが、一応昨年取れなかった有精卵が取れて、1羽がふ化しています。
クリックをお願いします。
こちらは横浜市のツイッターなのですが、ふ化しましたよという悲願のツイッターになります。
クリックをお願いします。
実は3羽の雄がお父さん候補だったので、マイクロサテライトの遺伝子解析で上野のN9が父親だと判明した。今年は輸送したことも成功しましたし、N9は、もともとは富山にいて、自然繁殖ができなかったので上野にきた個体だったので、もうろみがいくつか成功したということになります。
下の2弾は今年の凍結精液の注入の結果なのですが、一応有精卵が2個ずつ取れたということになります。

最後にまとめですが……。

Ⅲ. 課題 & まとめ

保存・人工授精の課題

- 低温保存：BPSE中で2週間生きている精子あり
↑授精能があるかどうかは検証が必要
山の上で採精し、飼育下の♀に注入するのに最低24時間？
- 凍結保存：最適な条件は未解明
ただし解凍したときに授精能あり
- 孵化率：変性が問題。
注入する際の希釈液の量を減らす、細菌対策（抗生剤）など




保存の課題なのですが、低温保存は、結構2週間生きている精子があつたのですが、生きていることと受精能があるかというのはまた別の問題なので、これは検証が必要になります。
もしも山の上で採精して飼育下に持ってきて雌に注入するのであれば24時間は生きていてほしいなあと、さらに雌の状態によってはもっと長く生きていてほしいなと思います。
凍結保存に関しては、実はミナミイワトビペンギンの手法をそのまま使わせていただいたので、最適な条件はまだ分かりません。

ただ、解凍したときに受精能があったということだけは分かりました。

最後のふ化率というのが一番の問題で、変性のせいでふ化しなかったのではないかと考えられています。細菌が入ってしまっとうやっって変性したのではないかと、もしくは注入する希釈液が多過ぎて変性したのかなあというのを現在は疑っています。

まとめ

		你保	胎胎	70%低温							
				浜仁(胎胎)	胎胎(胎胎)	胎仁(胎胎)	胎仁(胎胎)	胎仁(胎胎)	胎仁(胎胎)	胎仁(胎胎)	胎仁(胎胎)
2021年	胎胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎
2022年	胎胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎	胎

- 2021年に課題になっていたことは、2022年に各園とも達成
- 2023年以降の目標：
 - 横浜→24時間以上低温保存した精液の受精能確認
 - 上野→凍結保存の精液で孵化を確実にする
 - これまで採精したことのない個体からの採精可能性を検証
 - Wild個体からの採精につなげる



ありがとうございました。

横浜市繁殖センターのみなさま、海遊館のペンギンチーム、JAZA飼育園館メンバーと秋葉さん、各大学の先生方と学生さん、環境省と域内保全チーム、域外と域内をつないでくださる方々、上野動物園・多摩動物公園・葛西臨海水族園関係者、そして本日お聞き下さった方々

まとめです。

2021年2022年と横浜、上野でやったこと、やらなかったこと、できたこと、できなかったことをまとめてあります。

横浜のほうで去年できなかった受精卵を得ることが今年は低温保存の人工授精でできるようになりましたし、上野も精液の低温保存ができなかったものができるようになった、あとは凍結保存の注入というところまで今年は進んでいます。

来年以降なのですけれども、長期に長時間保存した精液に受精能があるかどうか、それから凍結保存精液でふ化するかどうか、それが来年以降の課題となっております。

発表はこれで終わりなのですが私たちが域外保全の中でもかなり端っここの縁のほうを攻めているので、なるべく現地の域内の空気を感じながらやりたいと思います。

これは人工授精に初めて成功した個体たちです。

ありがとうございました。(拍手)

○座長(牛田 一成) 吉澤先生、ありがとうございました。

質疑応答

○座長(牛田 一成) それでは、第2部の演者の方は前にお越しいただけますでしょうか。

〔発表者一同登壇〕

○座長(牛田 一成) 時間が少しございます。5分ほどございますので、何か特別に質問ということであれば1題ぐらいはお受けできると思いますが、よろしいでしょうか。一特にフロアから質問がないということでしたら、では、演者の4人の先生方をもう一度拍手で……。 (拍手) どうもありがとうございました。

〔発表者一同降壇〕

○司会者(本間香菜子) ありがとうございました。

試行錯誤されながらの取り組みだったと思いますけれども、ライチョウの生息域外である動物園だからこそできること、役割の大きさを感じました。

以上をもちまして第2部は終了となります。

牛田先生、ありがとうございました。どうぞ盛大な拍手でお送りいただきましょう。(拍手) ありがとうございます。

〔座長・中央大学応用生物学部 牛田一成 降壇〕

○司会者(本間香菜子) それでは、ここで少し5分ほど休憩のお時間を取らせていただきたいと思います。現在21分ですので、26分ぐらいに再開をさせていただきたいと思います。

お時間までにお席にお戻りくださいますようお願い申し上げます。