展示飼育下のアカキツネにおける繁殖成績の向上に関する研究

谷津 實^{1)†}

1) エム動物病院

要 約 宮城蔵王キツネ村に展示飼育されているアカキツネを用いて、受胎率の向上と遺伝的多様性の維持を目的に検討を行った。まず、使用する雌雄アカキツネが健康であることを確認するために、バイタルサイン、血液検査、凝固検査および血清生化学検査を行い基準値（範囲）を求めた。犬の既知参考値と比較して、直腸温、赤血球数、好酸球数、血清グルコース、アルブミンおよび尿素窒素濃度は高値、一方平均赤血球容積（MCV）および平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、血清ブチリルコリンエステラーゼ活性は低値を示した。得られた基準値には雌雄差はなく、健康状態の把握、疾患の類症鑑別や治療あるいは予防に利用できると考えられた。次に、雌キツネの発情時期と交配適期について、年間を通しての膣所見および子宮頸管粘液電気抵抗（VER）値から解析し、さらに VER のピーク値と受胎成績の関連、および VER 高値の個体における交尾時間と受胎率の関係について調べた。雌キツネの外陰部の発情徴候は毎年 2～3 月のみ観察され、VER 値のピーク値は外陰部の腫脹 1～2 日後に観察された。非発情時の基礎 VER 値は 140 units 前後であることから、発情期の VER のピーク高値（280 units 以上）は受胎の必要条件と考えられた。交尾時間は 40 分を超えると高い受胎率が得られた。このことから、発情期に VER が高値を示し、交尾時間が長くなると受胎率が飛躍的に高まることが明らかとなった。続いて、優秀な種雄キツネの精液を活用するために、人工授精法の確立を試みた。直腸電気刺激射精法を用いて雄キツネからの精液採取条件を検討し、牛用精液希釈液が精液の希釈増量・凍結保存に応用できるか調べた。精液採取には周波数 60 Hz で電圧 3～4 V（2～4 サイクル）で良好な精液量、精子数および精子生存指数が得られた。牛用精液希釈液を用いた凍結・融解精液は 25 カ月間不変で妊娠率は 81.3%であった。この結果から、精液採取には限定された電気刺激条件が存在し、牛用精液希釈液はキツネの人工授精に応用できることが判明した。最後に、2012～2017 年に得られたキツネの交配・人工授精データを取り纏め、受胎プロファイルを回顧的に解析した。自然交配では同一雄キツネと交配を繰り返すと妊娠率が上昇した。人工授精の妊娠率（82.4%）は自然交配（67.7%）に比べ高い傾向にあった。初産と経産の間に妊娠率、妊娠期間及び新生子数に差はみられなかった。以上、得られた成績は安定した繁殖成績の維持と向上に寄与するとともに、種の多様性維持にも役立つと考えられた。

——キーワード：アカキツネ、子宮頸管粘液電気抵抗（VER）、精液採取、人工授精

産業動物臨床医誌 10(3): 105-115, 2019

はじめに

キツネは哺乳綱ネコ目（食肉目）イヌ科イヌ亜科キツネ属に分類され、“猫のような犬科”と称されている。実際、猫との類似点として、瞳孔が縦長で夜間において視力がよく利くこと、四肢の爪が出し入れできること、歯と爪が細く先端が鋭いこと、木に登ることができること、髭が長く触覚としての機能があること、体が柔らかくしなやかに動くことがある。一方、犬とは歯の本数（永久歯 42 本）、単発情動物であること、陰茎骨や亀頭

球を有し、交尾時にコイタルロック（coital lock）がかかることがあげられる。

我が国ではアカキツネ属の亜種であるキタキツネ（*Vulpes vulpes schrencki*）とホンドキツネ（*Vulpes vulpes japonica*）の 2 種のみが棲息している [1, 2]。アカキツネの被毛は、突然変異により遺伝的多型が存在し [3]、通常みられるきつね色（golden brown fox）のほかに、銀（silver fox）、プラチナ（platinum fox）、茶ブラ（gold platinum fox）や十字（cross fox）と呼ばれる

† 連絡責任者：谷津 実（エム動物病院）

〒 989-0215 宮城県白石市斎川字入道前 29 ☎ 0224-25-2270 FAX 0224-25-2270
E-mail : yatu@hb.tpl.jp

ものも存在する。これまでキツネに関する研究はエキノコックス感染や防除のようなズーノーシスの観点 [4-6] あるいは分布・生態に関する研究 [1, 2] を除き、獣医学的視点での研究は極めて少ない。

本研究は宮城蔵王キツネ村で飼養されているアカキツネ（上記遺伝的多型の被毛を持つ個体もアカキツネと定義）を研究対象とし、屋外展示下にある群飼うキツネの繁殖データを収集し、繁殖に影響する背景や要因を明らかにして、受胎率の向上と遺伝的多様性の維持を目的に実施した。すなわち、① 屋外展示飼育下の群飼うキツネについて“臨床学的に健康である”ことの確認、② 自然交配では外見的には発情しているにも関わらず雄から逃避する個体、交尾したが受胎しない個体あるいは発情が発見できない個体が散見されるため、1年間を通しての発情徴候の観察、さらに交尾適期と交尾持続時間の検討、③ 近親交配を避け多様な毛色のキツネを計画的かつ長期的に維持するために人工授精法の確立、④ 自然交配（実施期間：2012～2017年）と人工授精（2015～2017年）データにおける受胎率、妊娠期間および新生子数の受胎プロファイルを回顧的に解析した。

蔵王キツネ村は宮城県白石市の蔵王山麓にあるキツネ専門の観光動物園で、1985年の開園以来、約0.5 haの敷地に100頭前後が野生に近い状態で屋外放牧されている。この他、繁殖用雄キツネおよび新生子キツネ（年間100～120頭）を含めると園内には約400頭が飼育されている。キツネ村は標高が高い（700 m）ため、年間平均気温11.9℃、12月から3月にかけては積雪（約1 m前後）がみられる。

材料および方法

供試動物：実験開始時の年齢は雌雄とも19～91カ月齢の成熟個体で、体重は雄で9～12 kg、雌で8～11 kgにあった。個体識別は左肩部皮下に装着したマイクロチップ（11×2.2 mm, Trovan 社, Köln, ドイツ）で行った。キツネには1日1回、ドックフードと魚肉、馬肉、牛肉を混ぜ合わせた餌を約400 g（総エネルギー150 kcal/100 g）与え、水道水を自由に摂取させた。交尾が確認された雌キツネは分娩舎（幅4×奥行き15×高さ3 m）に設置した外部から光が遮断された木製の分娩哺育箱（90×50×50 cm）付きのワイヤーケージ（90×120×60 cm）に移し、健康状態、流産や死産、保育中の死亡についてビデオカメラで継続的にモニターした。

キツネ村では犬糸状虫感染予防のため毎年5～10月の期間、イベルメクチン製剤（イベルメック散0.6%：フジタ製薬、東京）を定期的に混餌給与し、併せて検査（ヘマトクリット法）を実施している。エキノコックス感染に対しては無作為に選別した個体より糞便を採取

図1. マジックハンド型の保護・保定具

し、定期的にELISA検査（環境動物フォーラム、札幌）と糞便鏡検を行い、かつ予防処置としてプラジクアンテル製剤（ドロンタールプラス錠：バイエル、東京）を混餌給与している。これまでミクロフィラリアおよびエキノコックスとも全て陰性であった。

キツネの保定は餌肉あるいはサラミソーセージを用いて保定可能な狭い場所に誘導し、タイミングを見計りマジックハンド型の捕獲・保定具（Fox neck tong 75 mm black：Granlunds Farmtillbehör 社, Nykarleby, フィンランド、図1）で頸背部を保持した。この方法では気管や頸部血管を圧迫することなく、保定者と術者の2人で、ほぼ全ての手技（バイタルサイン測定、触診、採血、投薬あるいは人工授精）が無麻酔下を実施可能である。

全ての実験は動物実験に関する指針 [7] を基に宮城蔵王キツネ村の飼育、管理および使用規定に従い実施した。

展示飼育下の健康アカキツネにおけるバイタルサインと臨床検査値の基準値：実験には外貌、被毛、動作、歩様、食欲、飲水や糞尿の状態に異常がみられない雄12頭、雌12頭を用いた。採血は16時間絶食後（飲水は自由）、25G針付の5 ml注射筒を用いて、覚醒下で外側伏在静脈より全血約4.5 mlを採取した。尿および糞便は採血1～2週間前に個別ケージの下に尿・糞分離用木製バットを設置し、2日間連続して採取した。尿量と糞量を測定後、尿定性検査スティック（pH、糖、潜血、ケトン体、蛋白質：ロシュダイアグノスティックス、東京）および糞便検査（直接法）を行った。バイタルサインとして直腸温、脈拍数、呼吸数を測定した。血液検査はEDTA-2Na加全血を用いて、赤血球数、ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、総白血球数および血小板数をCBC多項目自動血球計算装置（poCH-100ivDiff：シスメックス、神戸）で測定・算出した。ヘマトクリット値は上記ミクロフィラリア検査と同時にを行うために毛細管遠心管法を用いた。白血球分画は塗抹標本（ギムザ染色）を鏡検し、リンパ球、好中球、単球、好酸球および好塩基球に分類し、総白血球数

に乗じて細胞数で表した。血液凝固検査は3.8% クエン酸ナトリウム加血液を遠心後、得た血漿を用いて、プロトロンビン時間およびフィブリノーゲン濃度を全自動凝固素測定装置（ドライヘマト COAG1:和光純薬、大阪）で測定した。また、C 反応性蛋白濃度を Laser CRP-2（アローズ、東京）で測定した。血清生化学検査は遠心後の血清を用いて、アスパラギン酸アミノ基転移酵素活性、アラニンアミノ基転移酵素活性、アルカリホスファターゼ活性、乳酸脱水素酵素活性、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性、クレアチンキナーゼ活性、グルコース濃度、総ビリルビン濃度、総コレステロール濃度、トリグリセリド濃度、総タンパク質濃度、アルブミン濃度、アルブミン/グロブリン比、クレアチニン濃度、尿素窒素濃度、カルシウム濃度、無機リン濃度およびマグネシウム濃度をディスクリット方式臨床化学自動分析装置（AccuteTBA-40FR：東芝メディカルシステムズ、栃木）で測定した。ナトリウム濃度、カリウム濃度およびクロール濃度は富士ドライケム 800V（富士フィルム、東京）で測定した。また、ブチリルコリンエステラーゼ活性（ブチルチオコリン法）、甲状腺刺激ホルモン濃度（TSH, ELISA 法）および遊離サイロキシン濃度（ELISA 法）は富士フィルムモノリス（調布、東京）で測定した。

雌キツネの発情徴候と子宮頸管粘液電気抵抗（VER）値との関係：実験には雌 4 頭を用いた。外陰部の腫脹（湿潤となり、色調が赤からやや黒ずみ、腔粘液の粘稠度の増加を観察）を非繁殖期（4～12 月）を通して観察し、雌雄を同居させた繁殖期（1～3 月）には腔を介して VER を隔日に測定した。VER 測定にはデジタル表示盤とプローブ（約 15 cm）からなる市販の測定器（Draminski 犬排卵指示器：Draminski 社、Olsztyn、ポーランド、図 2）を用いた。プローブは腔内 7～10 cm まで挿入し子宮経管粘液が良く付着するように回転させてから測定した。発情期には午前 8 時～10 時の間に 2 分間隔で 2 回測定し、低値の方をその個体の測定値とした。VER の単位は“unit”で表示されるが、1 unit は 1

Ω （オーム、デジタル estrus メーター：A/S LIMA 社、Sandnes、ノルウェー）に相当する。

自然交配における受胎の有無と VER のピーク値との関連性：実験には雄 19 頭、雌 32 頭を用いた。雄はノルウェーから輸入した種雄かその第一世代で体型や毛色から選抜した。VER は外陰部の腫脹と腔粘液の粘稠度（粘り気）の増加が観察された後 3 日間連続して測定し、basal VER 値（140 units）を超えていることを確認した時点で、雌キツネを雄キツネが入ったワイヤーケージ（120 × 120 × 60 cm）に移し、ビデオカメラ（DCR-TRV950:ソニー、東京）で約 1 時間交尾行動をモニターした。その後、得られたデータから受胎の有無（受胎率）と VER のピーク値との関連性を回帰的に解析し以下の 3 グループに分類した。

I グループ：交尾し受胎した群

II グループ：交尾したが受胎しなかった群

III グループ：交尾しなかった群

受胎率（%）＝（分娩した雌の頭数 / 人工授精を行った雌の頭数）× 100

VER 高値を示す雌個体における交尾持続時間と受胎率の関係：実験には雄 35 頭、雌 44 頭を用いた。交尾持続時間は雄の陰茎が雌の腔内に挿入された時点から抜けるまでの時間（分）とした。

精液採取と人工授精法の検討：実験には雄 71 頭（重複使用はなし）、雌 16 頭を用いた。凍結精液は雄 4 頭から採取したものをを用い、雄 1 頭当たり雌各 4 頭に人工授精した。精液採取は種雄を約 20 時間絶食し、塩酸キシラジン 1.6 mg/kg（ゼノアック、福島）の筋肉内注射で鎮静・不動化して、処置台に横臥保定した。射精には直腸から通電する電気刺激射精器（One channel type for mammals：富士平工業、東京）を用いた。射精器は電流と電圧を計測できる本体とプローブから成り、プローブ（直径 1.9 cm × 長さ 30 cm）の先端部（10 cm）には 4 つの電極が装着されている（図 3A, B）。浣腸により直腸の糞便を除去後、潤滑剤をプローブ表面に塗り肛

図 2. キツネの子宮頸管粘液電気抵抗（VER）値測定器

図 3. 電気刺激射精器（A）と直腸プローブ（B）

門より直腸の中に約 12 cm 挿入した。ペニスを露出後、生理食塩水でよく洗浄し精液採取用試験管の中に先端を保持した。電気刺激は周波数 60 ヘルツ (Hz) で 1 秒通電 - 1 秒休止の間隔で 1 ボルト (V) から 5 V まで電圧を上げる操作を行い、これを“1 サイクル”とした。5 サイクル終了時に精液を得られた電圧での採精成功率を下記式により算出した。

$$\text{採精成功率 (\%)} = (\text{精液を採取できた雄の頭数} / \text{使用した雄の頭数}) \times 100$$

なお、後肢の伸長や筋肉の攣縮や硬直がみられた場合には、それ以上電圧を上げなかった。

採取した精液は外観から尿の混入がないことを確認後、直ちに 32℃ の恒温槽に置き、精液量をマイクロピペットにより計測した。精子数はトーマ式血球計算盤 (Hem cytometer: 富士平) により顕微鏡下で算出した。精子生存指数は加温装置 (Microwarm Plate MP-1000: 北里コーポレーション, 静岡) を取り付けた精子活力計算盤 (Horwell chamber: 富士平) を用い顕微鏡下 (20 ~ 400 倍) に観察した。精子生存指数は牛精子の標準的な精子活力基準法 [8] に従いスコア化した。

精液希釈液は宮城県畜産試験場 (大崎, 宮城) から提供された牛用精液希釈液を用い、牛での精液希釈および凍結保存法 [8] に準じて行った。グリセリンの最終濃度は精子数 (濃度) によって若干異なり 5.8 ~ 6.0% であった。調整した希釈精液はストロー (0.5 ml, タイプ 133: 富士平工業) に充填してパテ (火災) で封入した。その後、ストローをストローラックに水平に並べ、予め液体窒素 (-196℃) を入れた凍結ボックスに移した。まず、液体窒素液面の 5 cm の高さで 5 分間、その後 4 cm の高さで 5 分間放置して温度を徐々に下げ凍結した。凍結精液は液体窒素中で 8 日 ~ 25 カ月間保管後に人工授精に供した。使用に際しては 37℃ の温湯で融解し、1 分以内に精子活力を検査して、35℃ 前後の溶解精液を下記精液注入器に装着した。

人工授精は雌の外陰部が湿潤膨張したことを確認後、VER 値が 350 units (Ω) を超えた時点およびその 24 時間後の計 2 回無麻酔下を実施した。まず子宮頸管を腹壁を介して保持し、新規考案した精液注入器 (図 4A) のプローブ (図 4B) を頸管深部に挿入して、精液を 0.5 ml / 回を注入した。使用したプローブは外筒や内筒の

図 4. 精液注入器の外筒 (A) と内筒プローブ (B)

位置や角度から先端部を認知することが可能で頸管深部まで誘導できる利点がある。

アカキツネの自然交配と人工授精における受胎プロフィール: 自然交配では雌 98 頭、人工授精では雌 34 頭 (重複はなし) を用い、受胎率、妊娠期間および新生子数を回顧的 (自然交配: 2012 ~ 2017 年, 人工授精: 2015 ~ 2017 年) に解析した。なお、自然交配では同一雄キツネと 1 ~ 3 回交尾 (最大 3 回) させて、別途交尾回数毎の受胎率、妊娠期間および新生子数を求めた。さらに自然交配と人工授精について、初産と経産間で受胎プロフィールに差異があるかも解析をした。

統計解析: 測定値は全て平均値 ± 標準誤差 (SEM) を算出した。臨床検査値の雌雄差は F 検定による分散を確認し、分散が等しい場合は Student's の *t*-検定、分散が等しくない場合は Welch's の *t*-検定を行い、有意差 ($p < 0.05$) の有無を調べた。雌雄間に有意差がない場合には雄雌キツネの各値を合算 ($n = 24$) し、平均値 ± 2 x 標準偏差 (2SD) [9] をキツネの基準範囲とした。なお、正規性の確認は Shapiro-Wilk 検定で行ない、“はずれ値”は箱ヒゲグラフを基に除外した。正規分布しなかった項目 (赤血球数, 白血球数, ALT, CK, TSH と CRP) は Box-Cox 変換後に平均値 ± 2SD を求めた [10]。基準範囲における外れ値は 1 ~ 2 頭であった。なお、雌雄キツネの平均値が双方とも犬の参考値 [11-14] より高値での逸脱を高値、低値での逸脱を低値とした。

精子の数値データと生存能力指数の統計解析は Student の *t*-検定 (2 群間) あるいは Steel 検定 (3 群間) で行い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

受胎率 (%) は Chi-square 検定で行い、いずれも $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

展示飼育下の健康アカキツネにおけるバイタルサインと臨床検査値の基準範囲: 尿量は雌雄とも 1.3 ~ 18.7 ml / kg / 日、排糞量は 0.5 ~ 3.4 g / kg / 日の範囲にあった。犬の参考値に比べ、直腸温 (38.8 ~ 40.1℃)、赤血球数 ($890 \sim 943 \times 10^4 / \mu\text{l}$)、好酸球数 ($3.0 \sim 21.4 \times 10^2 / \mu\text{l}$)、血清グルコース (112 ~ 169 mg / dL)、アルブミン (3.3 ~ 4.2 g / dL) および尿素窒素濃度 (19 ~ 44 mg / dL) は高値、逆に MCV (45 ~ 51 fL) および MCH (15 ~ 17 pg)、血清ブチリルコリンエステラーゼ活性 (596 ~ 1015 IU / L) は低値を示した。全ての項目で雌雄差は認められなかった。

雌キツネの発情徴候と子宮頸管粘液電気抵抗 (VER) 値との関係: 外陰部の変化と VER 値を 1 年間を通して継続的に調べところ、湿潤腫脹を伴う発情徴候は 2 ~ 3 月に観察され、VER 値のピーク値は外陰部の腫脹 1 ~

図 5. 雌アカキツネの典型的な子宮頸管粘液電気抵抗 (VER) の推移と発情徴候

図 6. 雌アカキツネの子宮頸管粘液電気抵抗 (VER) 値と交尾・分娩との関連

I グループ：交尾し分娩 ($n = 13$), II グループ：交尾したが不分娩 ($n = 5$), III グループ：交尾せず ($n = 14$). a: 交尾を繰り返すも妊娠せず, b: 雄に対し逃避行動を示す. 破線：平均値, 実線：中央値

図 7. 雌アカキツネの交尾持続時間 (A) と受胎率 (B)

** $p < 0.01$ vs. 妊娠

2 日後にみられた (図 5). 非発情時の平均 basal VER 値は 144 ± 4 units ($n = 32$) であった.

自然交配における受胎の有無と VER のピーク値との関連性：受胎の有無と VER のピーク値との関連性を調べたところ、交尾し受胎した群 (I グループ) の VER 値は 381 ± 30 units (中央値：350 units), 交尾したが受胎しなかった群 (II グループ) では 264 ± 51 units (230 units), 交尾しなかった群 (III グループ) では 202 ± 13 units (190 units) であった (図 6). したがって、アカキツネでは発情期の VER の高値 (350 units 以上) は受胎に必要条件であると考えられた.

VER 高値を示す雌個体における交尾持続時間と受胎率の関係：交尾直前の VER 値が 350 units 以上の 44 頭において、受胎した雌キツネ ($n = 23$) の交尾持続時間は 41.5 ± 2.5 分 (中央値 40 分), 受胎しなかった雌キツネ ($n = 21$) の交尾持続時間は 26.6 ± 1.2 分 (25 分) であり有意差 ($p < 0.01$) がみられた (図 7A). また、交尾持続時間が 40 分を超えると受胎率が飛躍的に上昇した (図 7B). このことから、発情期に VER の高値 (350

units 以上) を示す個体で交尾持続時間が長くなると受胎率が高まることが判明した.

アカキツネにおける精液採取と人工授精法の検討：精液採取には周波数 60 Hz で電圧 3 ~ 4 V, 2 ~ 4 サイクルで良好で再現性のある精液量 ($0.41 \sim 0.42$ ml) および精子数 ($555 \sim 629 \times 10^6$ cells/ml) が得られた (図 8). 使用した雄キツネ 71 頭のうち 47 頭で精液が採取され、

図 8. 雄アカキツネにおける電気刺激のサイクル数、電圧 (V) と精液の採取匹数

1 サイクル：周波数 60 ヘルツで、1 秒通電 - 1 秒休止の間隔で 1 V から 5 V まで電圧を上げる操作。() 内は匹数

図 9. 雄アカキツネにおける電気刺激の電圧 (V) と精液採取率 (A) と精子数 (B)

** $p < 0.01$ $n = 6 \sim 22$

採精成功率は 66.2% であった。しかし、電圧を 5 V まで上げると採精率は高まるが (図 9A)、精子数は減少し ($p < 0.01$)、個体によっては苦痛症状を呈したため 5 V は除いた (図 9B)。3 ~ 4 V で精液を採取した雄キツネ 25 頭のうち、精子数および精子生存指数を基に、実際の人工授精には 20 頭の種雄キツネを選別した。凍結融解時の精子生存指数は精液を液体窒素中で保存 (8 日間 ~ 52 週間) し、その後融解して凍結の影響を調べた。精子生存指数は凍結前 (65.0 ± 3.8) に比べ凍結融解後 (46.5 ± 2.5) 有意に低下し、平均低下率は 28.5% であった。しかし、保存期間 8 日間と 52 週間との間では精子生存指数の低下率に差が見られなかった。本条件下における人工授精における受胎率は、81.3% (13/16 頭) であった。

アカキツネの自然交配と人工授精における受胎プロファイル：自然交配の総受胎率 67.7% (65/96 頭) は、人工授精の受胎率 82.4% (28/34 頭) に比べやや低かったが有意差はみられなかった。自然交配において、同一雄との 3 回交尾での受胎率 85.7% (24/28 頭) は、1 回交尾の 55.8% (24/43 頭) や 2 回交尾の 68.0% (17/25 頭) に比べ高い傾向にあり、1 回と 3 回交尾間には有意差が認められた ($p < 0.05$)。妊娠期間 (52 ~ 56 日) および産

子数 (3 ~ 5 頭) は交尾回数の影響がみられなかった (表 1)。また、自然交配 (初産 30 頭、経産 35 頭) と人工授精 (初産 12 頭、経産 16 頭) ととも出産回数は妊娠期間や産子数に影響しなかった。

考 察

蔵王キツネ村での繁殖は 2007 年頃までは自然に近い状態で交配が行われていたが、発情発見の見逃しや近親交配により、新生子数が激減したことから、安定した繁殖管理技術が強く求められていた。まず、群飼いきつネが“臨床学的に健康である”ことを確認することともに、バイタルサインと臨床検査値の基準範囲を調べた。試験は 1 ~ 3 月のアカキツネの発情期 [15-17] における性ホルモンや食欲低下の影響を避けるため、非発情期の 11 月に実施した。犬の既知参考値 [11-14] と比較して、直腸温、赤血球数、好酸球数、血清グルコース、アルブミンおよび尿素窒素濃度は高値、一方 MCV および MCH、血清ブチリルコリンエステラーゼ活性は低値を示した。これら所見を基にすると、夏毛から冬毛への換毛期の影響 (体温上昇)、小球性赤血球 (赤血球恒数 MCV と MCH の低値を伴う赤血球数の高値)、群飼いから個別ケージへの移動ストレス (好酸球数の高値)、肉

表 1. 過去 6 年間の自然交配と人工授精の受胎プロファイル

項目	自然交配 ^{a)}			人工授精
	1 回交尾	2 回交尾	3 回交尾	
n 数	43	25	28	34
受胎率 ^{b)} (%)	55.8	68.0	85.7*	82.4
妊娠期間 (日)	$53.3 \pm 0.2^c)$	52.1 ± 0.3	52.4 ± 0.3	53.1 ± 0.2
産子数	3.7 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.2

^{a)} 自然交配では同一雄と最大 3 回交尾させた

^{b)} 受胎キツネ数 / 使用した雌キツネ数

^{c)} 平均値 $\pm$ 標準誤差

* $p < 0.05$ vs. 1 回交尾群 (Chi-squared test)

食中心の食餌（血清グルコース、アルブミンと尿素窒素濃度の高値）によると考えられた。血清ブチリルコリンエステラーゼ活性は犬との間に種差が推測された。このことより、犬に使用されている臨床検査試薬はほぼキツネに应用可能で、得られた基準値は今後の研究に利用できると考えられた。

雌アカキツネの発情徴候や交配適期と VER 値との関係を検討し、受胎の有無と VER のピーク値との関連性を回顧的に調べた。さらに、VER 高値を示す雌個体における交尾持続時間と受胎率の関係も解析した。外陰部の湿潤腫脹を伴う発情徴候は、2～3月に観察され、VER 値のピーク値は外陰部の腫脹後にみられた（図5）。これらの結果は北欧での既報データ [15-17] とほぼ一致していた。

VER の発情期の反応については動物種差があることが報告されている [18]。牛では発情日に VER 値は低下するが [19]、犬 [18, 20] やキツネ [15, 17, 21, 22] では発情期には VER が高値（犬：LH サージ前 10 日前後から上昇、キツネ：LH サージ 1～2 日後にピーク値）を示し、明らかに種差が認められている。この種差は発情期における頸管粘液の構成成分特に NaCl 含量の差 [19]（例えば、NaCl 含量が増加すると、通電し易くなるため VER は低下する）あるいは血球・血漿成分の漏出（出血）の関与が指摘されている [18]。Møller ら [23] によると、キツネでは VER 値がピークを示す 1～2 日前に血漿エストラジオール-17 β 濃度が最大値に達し、それに伴い LH サージ（期間は 1～3 日）が誘発され排卵が起こるという。血漿エストラジオール濃度が最大値となる時期は外陰部の湿潤腫脹と一致することから、その 1～2 日後の腔粘液の粘稠度の増加が電気抵抗を増大させ VER の高値に繋がったと考えられた。

雌キツネの受胎と非受胎データ（ $n = 32$ ）を基に VER のピーク値を分類したところ、交尾し受胎した群（I グループ）の平均 VER 値は 381 units であり、交尾したが受胎しなかった群（II グループ）の 264 units や交尾しなかった群（III グループ）の 202 units に比べ明らかに高値を示した（図6）。本条件下での非発情期の平均 basal VER 値の 144 units に対し、交尾し受胎した群（I グループ）の VER ピーク範囲が 280～700 units であったことを考え合わせると、受胎に必要な VER 閾値は 280 units 前後（あるいはそれ以上）と推察された。これらのことから、発情期の VER の高値は受胎の必要条件であるとも考えられた。なお、II グループの“a”個体はその後 3 年間交配を試みたが受胎しなかった。また、III グループの“b”個体は発情徴候を示すもののケージの隅にうずくまり、かつ雄に対し逃避あるいは恐怖行動を示し交尾には至らなかった。これらの 2 頭の原因は

不明であるが、キツネの自然交配においては時折認められる現象である。

発情期に VER 高値（350 units 以上）を示す雌キツネ（ $n = 44$ ）の受胎率データから交尾持続時間との関連を回顧的に解析したところ、受胎した雌キツネ（ $n = 23$ ）の平均交尾持続時間は 42.5 分、受胎しなかった雌キツネ（ $n = 21$ ）の平均交尾持続時間は 26.6 分であり統計学的に有意な延長（ $p < 0.01$ ）が認められた（図7A）。次に交尾持続時間を 4 つに区切り、時間毎に受胎率を算出したところ、交尾持続時間が 20 分以下では受胎率は 0%、21～30 分では 27.8%、31～40 分では 66.7%、40 分以上では 100% となり、交尾持続時間依存的に受胎率が増加していた（図7B）。交尾時のコイタルロックは前記したように犬属やキツネ属においても認められるが、犬では交尾直後（80 秒以内）に精子を濃厚に含む精液（第 2 分画精液、0.5～3 ml）が射精され、その後、コイタルロック中（5～45 分）には前立腺液（第 3 分画精液、30 ml 前後）が射出されるという。したがって、交尾持続時間と受胎との間には直接関係ないとの報告 [24, 25] がある反面、前立腺液には精子の子宮内遡上に関与する重要な役割があるとの指摘 [24, 25] もある。犬はキツネのような季節繁殖動物でなく、発情周期（犬では 6～7 カ月毎）や発情期間（犬では 8～13 日）もキツネ（2～3 日）と大きく異なっていることから、交尾持続時間と受胎率の関連において、犬とキツネとを同列に論じられないかもしれない。

近親交配を避け多様な毛色のキツネを計画的かつ長期的に維持するためには、多数の優秀な種雄の確保・維持が必須であるがキツネ村では難しいことから、人工授精法の確立を試みた。人工授精には繁殖率の向上や遺伝的多様性の維持のほか、少数の優秀な種雄の精液を安定的に供給できる利点がある。雄キツネから直腸電気刺激法で精液採取の条件設定を行った。電気刺激（周波数 60 Hz）を 1 V から 5 V まで（1 秒通電－1 秒休止する操作）を 5 サイクル繰り返した。サイクル数と精液採取の関連を調べたところ、1 と 5 サイクルでは精液は 5 V のみで採取され、2～4 サイクルでは 3 V から 5 V の間で精液が採取された（図8）。この原因として 1 サイクルでは負荷刺激が短く精液採取には不十分であり、5 サイクルでは 2～4 サイクルで既に精液が採取されてしまったためと推測された。1～5 サイクルを基本（刺激）条件として採精成功率を求めたところ 66.2%（47/71 頭）であった。用手法 [16] の採精成功率（75%）に比べやや低値であったが、技術的な不慣れさ（直腸内へのプローブの挿入深度の失宜）と雄キツネの性的未成熟が一部原因として考えられた。1～5 サイクル下における各電圧 1～5 V における採取頭数と採精成功率を集計

したところ、採取頭数順位は5 Vで22頭（採精成功率：31.0%）>4 Vで19頭（26.8%）>3 Vで6頭（8.5%）>2 V以下で0頭（0%）の順であった（図9a）。精液中の精子数順位は逆に3 Vで62,900万>4 Vで55,500万>5 Vで27,900万の順であった（図9b）。精液量（280～750 μl ）と精子生存指数（37.5～90.3）には電圧間で差は認められなかった。これらの結果から、電圧を5 Vまで上げると採精成功率は高まるが、精子数は減少し、個体によっては苦痛症状を誘発することが判明した、したがって、以後の精液採取には2～4サイクルで電圧3～4 Vを採用することにした。

電圧3～4 Vで精液を得た雄キツネ25頭（3 Vで6頭、4 Vで19頭）の内20頭を用いて凍結精液融解後の性状を検討した。20頭の選別には精子生存指数が高い個体を優先した。凍結保存は液体窒素中で8日～52週間行っていたが、凍結融解後の精子生存指数は平均28.5%低下していた。この低下率はパンダ[26]やヒゲマ[27]での報告とほぼ一致していた。また、8日間と25週間の凍結融解精液の精子生存指数に差は見られなかったことから、牛用精液希釈液を用いた凍結精液は最大25週間は保存できると考えられた。

凍結・融解精液を用いて人工授精を実施した本実験条件下での雌アカキツネの受胎率は81.3%（13/16頭）であった。この結果はアカキツネあるいは亜種である銀キツネでの既結果[15, 16, 28]とほぼ一致していた。牛用精液希釈液はキツネ用精液希釈液とは（モル濃度には差異があるものの）構成成分はトリス緩衝液を主体としたものであることから、代替希釈液として応用できたと考えられた。また、高い受胎率が得られた背景には、選別した雄キツネは個体差が少なく、遺伝的にも優秀であったことが一因と考えられた。今後、人工授精の頭数を増やし、これらの推測を検証する必要がある。

人工授精は無麻酔下、腹壁を介し子宮頸管を保持し、精液注入器のプロープを頸管深部に挿入して行った。キツネの子宮頸管は非繁殖期には小さくかつ細く体外から触知することは困難であるが、発情期になると、硬く太くなり触知可能となる。人工授精では子宮頸管深部に精液を注入すると受胎率が向上するとの報告[28]もある。新規考案した精液注入器は外筒や内筒の位置や角度からプロープ先端部を認知することが可能で頸管深部まで誘導できる利点があった。これらの結果から、精液採取には限定された電気刺激条件が存在し、牛用精液希釈液はアカキツネの人工授精に応用できることが判明した。

2012～2017年に蔵王キツネ村で得られた自然交配および人工授精データを取り纏め、受胎率、妊娠期間と新生子数および初産と経産間の受胎プロファイルについて回顧的に解析を行った。

人工授精の受胎率は自然交配の総受胎率に比べ高い傾向にあったが有意差はみられなかった。人工授精の受胎率82.4%は前述の“人工授精法の確立”で得られた受胎率81.3%（13/16頭）を裏づけるものであり、既報[15, 20]ともよく一致していた。自然交配の受胎率は交尾回数に依存して上昇（1回交尾55.8%→2回交尾68.0%→3回交尾85.7%）していたが、これは交尾回数を重ねることで雌キツネの性機能が刺激、特に交尾刺激によりエストロゲン濃度が高まり、卵子の成熟に繋がった可能性が考えられた。この事象はマウスでのフェロモンコミュニケーションの1つとして知られている“Vandenbergh効果”（未成熟雌の群れに雄を入れると性機能が刺激され性成熟が急速に高まる）[29]に類似している。いずれにしても今後、頭数を増やしこれら仮説を検証する必要がある。

自然交配において、1回交尾での交尾持続時間は受胎個体の42.3 ± 2.4分に対し、非受胎個体で25.7 ± 1.1分であり、受胎個体で有意に長かった。

妊娠期間は全ての解析で52～56日（平均52日）にあったが、これは北欧からの多くの報告[15, 16]とほぼ一致していた。

産子数は3～5頭と既報[15, 16]に比べやや多い傾向にあった。Elmerosら[30]によるとアカキツネの平均産子数は1.3～3.5頭であるが、子宮に残る胎子痕跡は5.2～11.2頭分であったという。一方、アカキツネとは別系統のホッキョクキツネ属（*Alopex* spp.）のblue foxでは死産は2%程度であるが、出生時平均10.8頭の新生子が離乳時には7.8頭に減っていたという[31]。また、出生後死亡した新生子の80%が出生後1週間以内に起こったという[31]。これらの報告は、出生前後や周産期には死亡事故が起こり易いことを示している。このことから、受胎・分娩・哺育期間中の胎子・新生子の死亡事故発生には、居室や飼育環境が極めて重要な要因になると考えられた。本実験で採用した分娩哺育箱（入口がトンネル状で内部が3つ区切れ完全に光を遮断した構造）は、入口が広く部屋の区切がない伝統的な巣箱に比べ、ヒトとの接触を最小限にするよう設計[31-34]されている。このことが産子数の増加傾向に繋がった可能性がある。

以上、本研究で得られたアカキツネでの基礎データは、安定した繁殖成績の維持向上に寄与するとともに、種の多様性維持にも役立つと考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり終始懇篤にご指導、ご鞭撻を賜りました岩手大学農学部共同獣医学科 佐藤 繁教授に心から拝謝いたします。また論文作成にあたり有益な

ご助言とご指導を賜りました同科 高橋 透教授, 佐藤 洋教授, 一條 俊浩准教授, 居在家 義昭前教授に感謝いたします。和文・英文の校閲をして頂きましたNPO 法人いわて野生生物疾病研究センター理事長 古濱 和久博士に深甚なる謝意を表します。

参考文献

1. 塚田英晴：知床国立公園におけるキタキツネ (*Vulpes vulpes schrenchi*) の外部形態, 繁殖期, リッターサイズ, 生存率および食性について, 知床博物館研究報告, 18, 35-43 (1997)
2. 塚田英晴：野生動物管理 理論と技術, 第32章中・小型哺乳類の個体群と生息地の管理技術, 羽山伸一, 他編, 451-465, 文永堂出版, 東京 (2016)
3. Forsberg M, et al. : Effect of melatonin implants on reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*), J Reprod Fertil, 88, 383-388 (1990)
4. Deplazes P, et al. : Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*, Trends Parasitol, 20, 77-84 (2004)
5. Kamiya M, et al. : Research on targeting sources of alveolar echinococcosis in Japan, Comp Immunol Microbiol, Infect Dis, 30, 427-448 (2007)
6. Nonaka N, et al. : Towards the control *Echinococcus multilocularis* in the definitive host in Japan. Parasitol Int, 55, S263-266 (2006)
7. 日本実験動物学会：動物実験に関する指針, Exp Anim, 36, 285-288 (1987)
8. 家畜繁殖学会編：新繁殖学辞典, 315-316, 文永堂出版, 東京 (1992)
9. Schalam OW, et al. : Veterinary Hematology, 3rd ed, 807, Lea and Febiger Co, Philadelphia (1975)
10. Box GPE, Cox DR : An analysis of transformation (with discussion), J Roy Statist Soc, B26, 211-252 (1975)
11. 鬼頭克也：付表2 臨床検査項目の基準範囲. 獣医内科学小動物編, 日本獣医内科学アカデミー編, 岩崎利郎, 他監修, 第2版, 665-672, 文永堂出版, 東京 (2014)
12. McCue PM, O'Farrell TP : Hematologic values of the endangered San Joaquin kit fox, *Vulpes Macrotis Mutica*, J Wildl Dis, 23, 144-151 (1987)
13. 大西堂文, 他：レーザー免疫比ろう法による健常犬および疾患犬における C-反応性蛋白の測定, 日獣会誌, 53, 595-601 (2000)
14. Panakoval L, et al. : Thyroid testing in Sloughis, J Vet Intern Med, 22, 1144-1148 (2008)
15. Farstad W : Reproduction in foxes: current research and future challenges, Anim Reprod Sci, 53, 35-42 (1998)
16. Fougner JA : Artificial insemination in fox breeding, J Reprod Fertil Suppl, 39, 317-323 (1989)
17. Boue F, et al. : Reproductive management of silver foxes (*Vulpes vulpes*) in captivity, Theriogenology, 53, 1717-1728 (2000)
18. Leidl W, Stolla R : Measurement of electric resistance of the vaginal mucus as an aid for heat detection, Theriogenology, 6, 237-249 (1976)
19. 武石秀一, 他：次世代型センシング技術を用いた家畜精密飼養管理技術の確立 ア 腔内粘液電気抵抗値を利用した家畜管理システムの開発, 大分県産業科学技術センター, 平成19年度試験成績報告書, 36, 36-40 (2007)
20. Günzel A-R, et al. : Electrical resistance of vaginal secretion in the bitch, Theriogenology, 25, 559-570 (1986)
21. Farstad W, et al. : The effect of sperm number on fertility in blue fox vixens (*Alopex lagopus*) artificially inseminated with frozen silver fox (*Vulpes vulpes*) semen, Theriogenology, 37, 699-711 (1992)
22. Farstad W, et al. : The optimum time for single artificial insemination of blue fox vixens (*Alopex lagopus*) with frozen-thawed semen from silver foxes (*Vulpes vulpes*), Theriogenology, 38, 853-865 (1992)
23. Møller OM, et al. : Temporal relationships between hormonal concentrations and the electrical resistance of the vaginal tract of blue foxes (*Alopex lagopus*) at pro-oestrus and oestrus, J Reprod Fertil, 70, 15-24 (1984)
24. Parkinson T : Normal reproduction in male animals, In: Veterinary Obstetrics and Reproduction, Noakes DE, et al. [eds], 9th ed, 681-704, Saunders Elsevier Co, Netherlands (2009)
25. Ptaszynska M : Canine Reproduction, In: Compendium of Animal Reproduction, 10th ed, 321-358, Intervet International Co, Tokyo (2009)
26. Platz CCJr : Electroejaculation and semen analysis and freezing in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), J Reprod Fertil, 67, 9-12 (1983)
27. Ishikawa A, et al. : Cryopreservation of the semen collected by electroejaculation from the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*), J Vet Med Sci, 64, 373-376 (2002)
28. Fougner JA, Forsberg M : Effect of different sperm numbers on fertility after artificial insemination of

- foxes, *Acta vet Scand*, 28, 403-407 (1987)
29. Vandenberg JG, et al. : Partial isolation of a pheromone accelerating puberty in female mice, *J Reprod Fertil*, 43, 515-523 (1975)
 30. Elmeros M, et al. : Placental scar counts and litter size estimations in ranched red foxes (*Vulpes vulpes*), *Mamm Biol*, 68, 391-393 (2003)
 31. Braastad BO : Behaviour of silver foxes in traditional breeding boxes and in boxes with an entrance tunnel, *Anim Welfare*, 5, 155-166 (1996)
 32. Pyykönen T, et al. : A note on the reproductive success of primiparous blue fox vixens in social groups, *Anim Reprod Sci*, 112, 409-414 (2009)
 33. Pyykönen T, et al. : The effect of a combination of permanent breeding cage and low housing density on the reproductive success of farmed blue foxes, *Anim Reprod Sci*, 106, 255-264 (2008)
 34. Pyykönen T : Periparturient behaviour in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*), *Appl Anim Behavior Sci*, 94, 133-147 (2005)

Review

Study on facilitating fertility for breeding of red foxes in captivity

M. Yatsu^{1)†)}

1) Emu Animal Clinic

ABSTRACT There are few reports about reproduction of captive red foxes (*Vulpes vulpes*) in Japan. The present investigation was carried out in red foxes maintained at the Zao Fox Village to clarify the backgrounds and factors involved in their reproduction, to maintain their genetic diversity, and to facilitate their fertility with improved conception rates. First, the experiment was designed to delineate the reference ranges for vital signs, hematology, coagulation and serum biochemistry in the non-breeding season during November using clinically healthy adult foxes. No sex difference was noted in any of the items tested. Both mean values for male and female foxes were compared with the reference ranges for healthy dogs. In foxes, elevated rectal temperature, high values in erythrocyte and eosinophil counts with lowered erythrocyte indices, lowered butyrylcholinesterase and elevations in glucose, albumin, and urea nitrogen in sera were observed. Reference ranges for various biological items assist veterinary clinicians and researchers in their interpretations of observations of red foxes. Next, the study was conducted to elucidate a practical tool for predicting conception in red fox vixens subjected to natural mating. Basal vaginal electrical resistance (VER) during post-breeding seasons consistently ranged from 90 to 220 units (mean: *ca.* 140 units). The VER displayed a single peak after the vulva became well-swollen during breeding seasons. Median VER magnitude was 350 units among all vixens that became pregnant, 230 units among vixens that did not become pregnant, and 190 units among vixens that did not mate. Conception rates in vixens with VER above 350 units were dramatically higher when coital-lock time was more than 40 min. These results suggest that a peak magnitude (over 280 units) of VER with coital-lock time may be an expedient predictor of conception in red foxes. Then, the appropriate voltage (V) in electroejaculation for semen collection from stud male red foxes was investigated, as well as whether frozen semen with bovine semen extender can be used for artificial insemination. The proper load voltage for electroejaculation was 3-4 V in 2-4 cycles (1 cycle: 1-sec duration each, with a 1-sec rest) based on semen collection rates with concentrations of

spermatozoa. The semen collection rate was 66.2% under the conditions of this study. In stud donors, the ejaculate volume of semen was $0.47 \pm 0.3 \mu\ell$, the concentrations of spermatozoa were $592 \pm 85 \times 10^6$ cells/ $\mu\ell$, and the score for the viability index of spermatozoa was 65 ± 5 . Frozen semen was prepared according to the known procedure for cows. In frozen-thawed semen, a relatively high conception rate (81.3%) was obtained in vixens. These findings demonstrate that the defined condition for semen collection by electroejaculation with cryopreservation of semen using bovine semen extender can be applied to artificial insemination of red foxes. Finally, breeding profiles at the periparturient stage in red foxes subjected to natural mating or artificial insemination were retrospectively surveyed using 130 vixens during their reproductive seasons of 2012 to 2017. Coupling of vixens with natural mating was attempted a maximum of three times with the same male, while artificial insemination was conducted using frozen-thawed semen with the bovine semen extender. With natural mating, conception rates in once, twice, and thrice copulations were 55.8%, 68.0%, and 85.7%, respectively, showing a significant difference between once and thrice copulation. Conception rates with artificial insemination were 82.4%. Mean gestation periods were between 52.1 and 53.3 days in all groups. Mean litter sizes were 3.7 to 4.3 cubs with natural mating, and 4.4 cubs with artificial insemination. No difference in breeding profiles was noted between primiparous and multiparous vixens. These results are available for understanding basic fox theriogenology in Japan. In conclusion, these data contribute to stable reproduction of captive red foxes and are useful for maintaining species diversity.

—**Key Words** : Red fox, Vaginal electrical resistance (VER), Semen collection, Artificial insemination

† Correspondence to : Minoru Yatsu (*Emu Animal Clinic*)

29 Saikawa-Aza-Nyudoumae, Shiroishi, Miyagi 989-0215, JAPAN

E-mail : yatu@hb.tp1.jp

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 10(3): 105–115, 2019