

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

熊科動物之生殖生理與人工繁殖應用之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-385-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學畜產學系暨研究所

計畫主持人：林仁壽

計畫參與人員：楊健仁

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

中文摘要

本計畫乃利用台北市立動物園之台灣黑熊及亞洲黑熊進行人工電擊採精及精液性狀之研究，初步建立電擊採精技術的模式，並於採精前導尿可避免精液受尿液之污染，降低精液品質，實驗顯示無污染的精液呈乳白色，約 0.3ml，pH 值約 7.6，濃度為 1.4×10^8 cells/ml，活精比為 50%，異常比約 17%，其中頭部異常 7%，尾部異常 10%；而精子之總長為 67.5 μ m，頭部 5 μ m、中段 3.75 μ m 及尾部 58.75 μ m；精液冷凍保存尚未成功，有待繼續研究。

關鍵詞：黑熊、精液、電擊採精。

英文摘要

The purpose of this study was to establish the technique of semen electroejaculation from Formosan black bear and Asian black bear and to provide the information on semen characteristics for further study in animal breeding. The study revealed that removal of urine from the bladder before electroejaculation minimizes contamination with urine and the normal semen characteristics were milky white in color, about 0.3 ml per ejaculation; pH 7.6; sperm concentration 1.4×10^8 cells/ml; live of sperm 50%; abnormal morphology 17%; total length of sperm 67.5 μ m, head 5 μ m, midpiece 3.75 μ m, and tail 58.75 μ m. The present study was not successful in frozen storage of the semen.

Key words: Black bear, semen, electroejaculation.

前言

熊科動物為陸生大型哺乳動物，廣泛分佈於歐亞及美洲地區，在生態上高居消費者的地位，其存在是自然環境良窳的指標，現存包括貓熊在內的八個品種均已屬瀕臨絕種的保育類動物，分別為華盛頓公約（CITES）列入附錄一、二名單管制中（Servheen, 1999）。台北動物園飼養亞洲黑熊、棕熊、台灣黑熊及馬來熊達 25 隻，其中台灣黑熊為行政院農委會列管保育類野生動物；台北動物園亦列為重點保育動物，並進行多年台灣黑熊糞便內泌素之基礎生理值的檢測，初步瞭解園內台灣黑熊雌雄間生殖內泌素之全年變化及社會行為的模式（張等，1994；楊，2003）。

基於對自然文化資產之價值觀，先進各國莫不積極投入本土野生動物之保育與研究，而台灣黑熊貴為我國特有亞種的保育類野生動物，欣見政府對野外族群及棲地的調查研究，已納入保育計畫給予經費支援；然相關的熊科動物生殖生理探討誠有必要自圈養族群著手，台北動物園肩負野生動物域外保育教育的使命，亦積極投入興革，初步已有掌握熊科動物的基礎生理變化仍有，惟進一步的保育繁殖仍有待學術機構的參與，始克有成，由於人類活動導致野生動物棲地的破壞，族群大小被切割的結果，導致個體遺傳變異歧異度的窄化（Tsuruga *et al.*, 1994），許多野生動物瀕臨滅絕，而人工繁殖是保存瀕臨絕種野生動物的重要措施之一。現代動物園存在的目的，不僅只是珍奇稀獸的教育展示，更肩負物種保育的使命。熊科動物的人工繁殖研究，以貓熊的成績最為斐然，北京動物園於 1978 年首先以人工授精，成功繁殖仔獸（Liu, 1981），日本上野動物園亦見人工授精成功繁殖仔獸之記錄（Masui, 1989），惟其他熊科動物未見報告。

再者，動物園熊科動物面臨老化的壓力，有必要利用人工授精的方式，彌補自然繁殖的困境。在進行人工授精前，必須配合許多的研究，如精液的採集、精液性狀的分析、正確發情及排卵時間的判定、利用外源性內泌素的誘發排卵、發情週期的長短及繁殖季節性的調查、凍結精液的保存、安全的麻醉及保定、與懷孕診斷等諸多研究，才能使人工授精成功（Seager, 1983）。其中，公熊之精液品質的良窳為成功繁殖的關鍵之一，此方面的研究，以日本棕熊最為深入（Ishikawa *et al.*, 1998），而電擊日本黑熊採精時，以導管伸入尿道收集精液，其品質及活力均遠勝於一般直接流入試管者佳（Kojima *et al.*, 2001）。

至於精液凍結保存對於瀕臨滅絕野生動物或動物園珍稀動物的物種保存及種源交換均十分重要。且可以進行遠距離的種源交換，改善遺傳性能，避免近親衰退；亦可保留優良珍稀動物的精液，進行保種計畫。1980 年以降，中國成都動物園對貓熊於自然交配後，分別使用新鮮精液和冷凍精液交替輸精，顯著提升產仔數（馮與張，1988）。尤有進者，透過外源激素，如孕馬血清激性腺素

(PMSG)、激濾泡素 (FSH)、激黃體素 (LH) 及人類絨毛膜激性腺素 (HCG) 等, 誘導大貓熊發情、排卵, 均有提高配種、懷孕和產仔效益, 唯使用劑量、次數、注射間隔、合併激素類型等方面, 尚須深入研究 (陳等, 1997)

本研究旨在開發公熊電擊採精的技術、評估精液性狀, 及不同品種間的比較, 研究結果可判定公熊的生殖潛力, 加速圈養熊科動物的繁殖效益, 篩選優良精液, 透過凍結保存, 結合新鮮精液, 進行人工授精的研究, 俾以期使稀有動物之資源得以永續利用。

材料與方法

一、試驗動物及場地

台北動物園圈養之亞洲黑熊 (1 公) 台灣黑熊 3 頭 (3 公), 動物於清晨 9:30 放出展示場, 4:30 收回室內獸舍; 後者除清掃隔離外, 其餘時間自由進出戶外活動場與室內獸舍。

二、電擊採精

於動物園年度例行動物麻醉健康檢查時進行動物電擊採精, 方法改良 (Ishikawa *et al.*, 1998) 電激採精方式。公熊以 ketamine (4-6 mg/kg 體重, im) 麻醉後, 側躺置於空調之外科手術台採集精液, 利用導尿管抽乾尿液。本研究自行製造電擊採精棒 (圖 1)。首先以三根 (2 mm) 銅線做為電擊刺激處, 長度為 8 cm, 中間銅線為正極, 兩側各為負極, 以平行方式排列, 間隔 1cm, 外包以樹脂, 僅將三條銅線露出, 其餘皆為絕緣體。電擊棒為不鏽鋼材質, 長 40 cm、直徑 2 cm, 電極棒並以電線連接於電擊刺激器主機 (electro-ejaculator) (Electro JAC III, Ideal Co. USA)。該機器電壓從 0 volt 開始, 然後逐階段加強, 最高可達 18 volt, 每隔 10 sec 刺激一次, 刺激時間 4 sec, 連續 20 階段為一循環, 並可固定電壓於一定的強度, 持續刺激。採精時先將尿道口外圍之毛髮修剪, 陰莖包皮翻開以露出陰莖, 將陰莖及睪丸周圍以生理食鹽水沖洗, 並以紗布擦拭乾淨, 肛門內之糞便需先清除, 然後將自製的直腸電激棒緩慢插入肛門約 14 – 25 cm, 方向與尾椎骨須成平行, 電擊面朝直腸腹部, 並將陰莖直接套入乾淨之塑膠袋中以收集精液。

三、精液性狀分析

精液性狀分析參考 (Howard *et al.*, 1986; Howard, 1993; Ishikawa *et al.*, 1998; 吳等, 2002), 及劉氏染劑 (Liu stain A 2801NA, stain B 2802NB, Tonyar, Biotech. INC, Taiwan) 染色法, 包括精液色澤、酸鹼度、精液量、精蟲數、精蟲外觀與活力等。酸鹼值以 pH 比色紙為之, 精子濃度以 Makler 計數盤計算精蟲數, 並檢查其活力: 精子型態學檢查先以血液推片法將精液塗抹於玻片上, 以劉氏染劑染色後, 利用光學顯微鏡 (400x, Nikon, Tokyo, Japan) 估算精子各部位長度, 並

以高倍（1000×，油鏡）觀察精子型態，依據 Parkinson（1996）的分類法為之。

四、精液冷凍保存

經精液性狀分析後，得到精子數目多，且活力需達 + + + + 者，才進行凍結保存。本研究參考謝（1996）以不同的凍結保護劑及凍結方式，進行熊科動物精液冷凍保存，並於解凍後比較各種方式中精子生存率及活力等。

（一）凍結保護劑製作如下：

BF5 釋液：以 100 ml 蒸餾水，溶入 0.2 g Tris (hydromethyl) aminomethane、1.2 g TES-N-Tris (hydromethyl) methy-2-aminomethane sulfonic acid 和 3.2 g 葡萄糖，再跟蛋黃混合成有 20% 蛋黃的稀釋液。BF5 + 8% 甘油稀釋液是取 8 ml 甘油和 BF5 液混合而成。

（二）凍結方式：將精液利用下面方式進行凍結。

將精液及 BF5 稀釋液放於水浴中將至 18℃ 後等量混合，混和後置於有水的燒杯中，一起擺入 4℃ 冰箱，讓其降溫平衡 2 小時，再把含有 8% 甘油之 BF5 稀釋液等量混和，約 5 分鐘後，滴於離液態氮表面約 5 公分之 60 孔目銅紗網上，其表面溫度為 -100℃，使其凝固成小滴，每顆約 0.1 ml，放置於冷凍小管，於液態氮中保存。

五、解凍及精液品質評估

經 7 天後，將精液由液態氮桶取出，置入 45℃ 水中，20 秒快速解凍。解凍後，每 0、1、2、4 小時於精子計數盤上，精子活力及前進運動率等，並利用精子死活染色法評估存活率。精子死與活區分法，將 1% eosin, 4% aniline blue 溶解於磷酸鹽緩衝液後，滴一至二滴於乾淨玻片上，加入少量精液混合，置於熱板上烘乾後鏡檢。

結果與討論

陰囊周徑與年齡、身長、體重之關係：

公熊之陰囊周徑與年齡、身長、體重如表 1 所示，顯示成年公熊之陰囊周徑介於 15-20 cm，似與身長有關，貓熊的研究顯示睪丸尺寸、重量隨年齡逐增，於 15 歲齡時達高峰，之後逐降（Feng *et al.*, 1997）。本實驗之公熊年齡介於 13-14 歲，已達成年，其睪丸尺寸之變化趨勢需持續追蹤，才能確認。

精液性狀：

公熊之精液顏色為乳白色，尿液污染者呈淺黃色澤，pH 值 7.6。日本黑熊為 7.6±0.0（Kojima *et al.*, 2001），北海道棕熊為 7.4±0.3（Ishikawa *et al.*, 1998）。在電擊前未導尿者，易使精液混入尿液污染，導致精液酸鹼值下降，影響精子的運動能力（Ishikawa *et al.*, 1998），本實驗公熊之精液 pH 介於 6-7.6 間，顯係有尿

液污染，其中小黑之精液 pH 值為 6.0，其尿液之 pH 為 5.41，顯係受到尿液之污染。因此，排除尿液的污染是確保電擊精液維持中性酸鹼值之先決要件。精液量約 0.3 ml，精子數為 1.4×10^8 cells/ml，相較日本黑熊為 0.212 ± 0.038 ml， $3.61 \pm 1.00 \times 10^8$ cells/ml (Kojima *et al.*, 2001)，北海道棕熊為 2.7 ± 2.6 ml， $4.72 \pm 4.29 \times 10^8$ cells/ml (Ishikawa *et al.*, 1998)，後兩者皆為繁殖季時採集，本實驗之黑熊活精比 50%，遠低於北海道棕熊 $80.2 \pm 23.6\%$ (Ishikawa *et al.*, 1998) 及日本黑熊 $77.6 \pm 2.6\%$ (Kojima *et al.*, 2001)，其異常比約 17%，北海道棕熊 $21.8 \pm 11.7\%$ (Ishikawa *et al.*, 1998) 及日本黑熊 $17 \pm 5\%$ (Kojima *et al.*, 2001)，貓熊之精子畸形率在繁殖季後會明顯增加 (Feng *et al.*, 1997)，而本實驗於 9-10 月份非繁殖季時進行，尚須持續追蹤方能瞭解精子的變化是否與其他熊科動物有類似變化。

精子性狀：

台灣黑熊精子外觀如圖 2 所示，總長為 $67.5 \mu\text{m}$ ，頭部約 $5 \mu\text{m}$ 佔 7.4%，中片 $3.75 \mu\text{m}$ 約佔 5.6%，尾長 $58.75 \mu\text{m}$ 約佔 87%，其外型大小及異常型態均與食肉目、靈長目、及偶蹄目牛科相似 (Austin, 1965; Parkinson, 1996)。

台灣黑熊之異常精子分頭部及尾部異常，本實驗所得異常精子約 17%，其中頭部異常者 7%，而尾部異常者 10%。頭部異常 (含不正常頭巾) 可能表示生精作用 (spermatogenesis) 的缺失 (Kretser and Kerr, 1994)，尾部異常者，如家貓的精子含原生質小滴的彎曲中片 (bent midpiece with cytoplasmic droplet) 者，被認為是成熟時的缺陷所致 (Howard *et al.*, 1990)；而獵豹 (Watson, 1978) 以及地理隔絕的獅子 (Seager, 1975) 其精子濃度甚低，且出現結構性的缺陷，可能由於遺傳變異窄化之故。熊科精子異常的肇因及對生育的影響尚待確認。

電擊採精：

本實驗以自製電擊棒深入直腸約 25 公分，並以供熊後肢產生強烈收縮及陰莖良好的勃起狀態為恰當的電擊位置，由 0 伏特逐漸增強至 18 伏特，約 4-5 回合後，維持 18 伏特連續刺激至射精發生，成功率高達 80%，圖 6 所示為電擊採精之各步驟，前人亦有用使後腿收縮的固定電流強度持續刺激至射精 (Johnstone, 1984)，經 Kojima (2001) 比較兩法施用於日本黑熊，顯示增強電流的刺激法能刺激較高的精子濃度。

本研究乃首度對台灣黑熊及亞洲黑熊進行電擊採精技術之報告，經逐步改良電擊方法，成功建立電擊之模式及精液和精子性狀之初步資料，此結果將有助於探討黑熊季節性繁殖的精液變化，提供圈養繁殖的參考，以及採集有效的精子，進行人工受精的研究，提高物種保存的基因庫。

冷凍保存：

本實驗於 7 日後解凍，於顯微鏡下發現無完整精細胞，需再確認其他冷凍條件。

參考文獻

- 吳瑞德、董光中、馮翰鵬、郭財榮、蔡沛學、鄭豐邦。2002。畜養牡台灣梅花鹿及牡台灣水鹿之生殖性狀分析：以直腸電刺激採精法進行精液性狀評估。台灣獸醫誌。28(3):1-6。
- 馮文和與張安居。1988。大貓熊的生殖生理及人工繁殖。四川大學出版。pp. 33-34。
- 陳紅節、鍾順隆、費立松、張志和、王強、何光晰、李光漢、葉志勇、黃祥明、餘建秋、李學兵、侯蓉、張安居、馮文和。1997。外源激素誘導大熊貓發情、排卵效果的比較研究。1997 成都二十一世紀環境保護與城市發展國際學術研討會。pp. 94-98。
- 張希賢、李素蘭、陳玉燕、趙明杰、楊健仁、陳寶忠、林仁壽、吳兩新。1994。雌性台灣黑熊糞孕酮濃度變化之初步報告。動物園學報 6 : 67-71。
- 楊健仁，2003。應用糞類固醇內分泌素監控台灣黑熊、馬來熊及無尾熊之生殖與緊迫生理。國立台灣大學畜產學研究所博士論文。台北。
- 謝來安。1996。稀釋液、甘油濃度及清潔劑對兔精子冷凍保存之影響。中國畜牧學會會誌 25 (5) : 175-181。
- Feng, W. H., J. Zhao, and N. Fujihara. 1997. Physiological characteristics of electro-ejaculated giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) semen. Jpn. J. Zoo Wildl. Med. 2:107-112.
- Howard, J. G. 1993. Semen collection and analysis in carnivores. In: Zoo and wildlife medicine: current therapy (M. Fower, ed.). pp. 390-399. Saunders, Philadelphia.
- Howard, J. G., J. L. Brown, M. Bush, and D. E. Wildt. 1990. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. J. Androl. 11:204-215.
- Howard, J. G., M. Bush, V. de Vos, and D. E. Wildt. 1984. Electroejaculation, semen characteristics and serum testosterone concentrations of free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*). J. Reprod. Fertil. 72:187-195.
- Ishikawa, A. 1998. Collection and cryopreservation of semen of the Hokkaido brown bear (*Uraua arctos yesoensis*). Dissertation thesis. Hokkaido University, Japan.
- Johnstone, I. 1984. Electroejaculation in the domestic cat. Aust. Vet. J. 61:155-158.

- Kogima, E., H. Tsuruga, T. Komatsu, T. Tsubota, and I. Kita. 2001. Characterization of semen collected from deagles and captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Theriogenology* 55:717-731.
- Krester, D. M. and J. B. Kerr. 1994. The cytology of the testis. In: *The physiology of reproduction* (E. Knobil and J. D. Neill, eds.). pp. 1177-1290. Raven Press, New York.
- Liu, W. 1981. A note on the artificial insemination of giant panda. *Acta Vetrinaha et Zotechnica* 12:73-76.
- Masui, M., H. Hiramatsu, N. Nose, R. Nakazato, Y. Sagawa, H. Tajima, and K. Saito. 1989. Successful artificial insemination in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) at Ueno Zoo. *Zoo Biol.* 8:17-26.
- Parkinson, T. J. 1996. Fertility and infertility in male animals. In: *Veterinary reproduction and obstetrics* (G. Arthur, D. E. Noakes, H. Pearson, and T. J. Parkinson eds.). pp. 572-633. Saunders, London.
- Seager, S. W. J. 1983. The breeding of captive wild species by artificial methods. *Zoo Biol.* 2:235-239.
- Seager, S. W. J., C. C. Platz, and W. Hodge. 1975. Successful pregnancy using frozen semen in the wolf. *Int. Zoo Yrbk.* 15:140-144.
- Servheen, C. 1999. The trade in bears and bear parts. Pages33-38 in C. Servheen, C. Herrero, and B. Peyton, editors. *Bears: status survey and conservation action plan*. IUCN, Gland, Switzerland.
- Tsuruga, H., T. Mano, M. Yamanaka, and H. Kanagawa. 1994. Estimate of genetic variations in Hokkaido brown bears (*Ursus arctos yesoensis*) by DNA fingerprinting. *Jpn. J. Vet. Res.* 42:127-136.
- Watson, P. F. 1978. A review of techniques of semen collection in mammals. *Sym. Zool. Soc. Lond.* 43:97-126.

研究成果自評

本試驗期間不幸遭逢全台非典型肺炎（SARS）疫情，至全園動物之健檢全面延期，無法於動物繁殖季節時進行試驗，惟本實驗已成功開發黑熊電擊採精之技術模式，日後可運用此技術，逐步建立完整的台灣黑熊精液性狀之基本資料及人工受精之運用，配合糞便內泌素對動物生殖生理的監控，期以發揮動物的繁殖潛能。



圖 1. 自行製造電擊採精棒

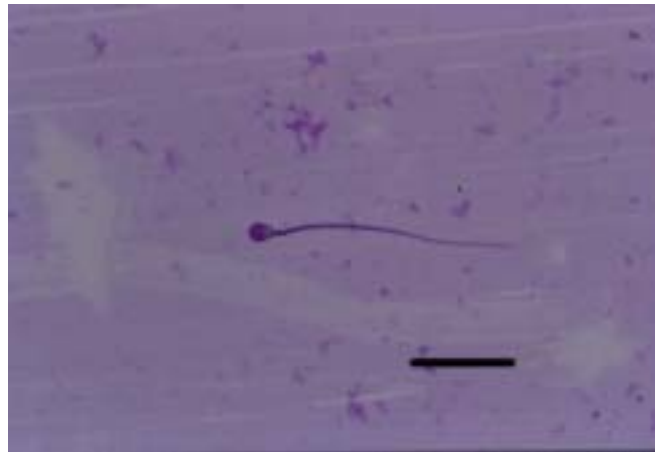


圖 2. 台灣黑熊精子外觀，比例尺：2.5 μ m

表 1. 台灣黑熊及亞洲黑熊公熊陰囊周徑與年齡、身長、體重之關係

種別	稱呼	陰囊周徑 (公分)	年齡 (歲)	身長 (公分)	體重 (公斤)
台灣黑熊	小三	15	13	167	112
	小熊	17	14	195	182
	嘉男	17	13	190	155
亞洲黑熊	小黑	20	13	190	167