

盲導犬の生殖工学

帯広畜産大学原虫病研究センター

鈴木 宏志

はじめに

現在、わが国では約1,000頭の盲導犬が実働している。また、全国の盲導犬事業所から毎年130頭程度の盲導犬が、新規に視覚障害者に供給されている。しかしながら、盲導犬を希望する視覚障害者は約4,800人、潜在的希望者も加えるとその需要は約7,800人と推定されており、わが国で盲導犬事業が開始されてから50年を過ぎても慢性的な盲導犬不足が続いている。身体障害者補助犬の導入によって自立と社会参加を果たし得る障害者は数多く存在しており、その普及には、社会的受け入れ体制の整備とともに、良質な補助犬の育成体制の整備が不可欠であると考えられる。わが国においても、盲導犬、聴導犬、介助犬など、いわゆる補助犬の社会生活へのアクセス保障のみならず、補助犬の育成や使用者の責務までに踏み込んだ法整備が開始されたが、生物学、獣医学的な観点から補助犬の適切な活用および育成を支えようとするアプローチは十分ではない。本来、盲導犬を含む各種補助犬に要求される能力とその適合犬種の選定のための行動学、遺伝学的研究や補助犬の社会への浸透を確保するためのイヌ由来の人畜共通感染症に関する公衆衛生学的研究を含めた、新しい視点からのいわゆる「イヌ学」を総合的に推進する必要があると考えられるが、その基礎となる遺伝子資源の確保、保存、利用のための繁殖生理学、特に生殖工学的研究の立ち遅れがこれを阻んでいる。

盲導犬の普及を推進するためには、その訓練方法はもとより盲導犬の安定的、効率的繁殖が、もっとも重要な課題の1つであると思われるが、現在、全国の盲導犬訓練施設で使用されている繁殖犬はわずかに180頭余りで、ここから得られた産仔の盲導犬の合格率（適格犬数率）は30～40%と低い水準にある。この原因の1つとして挙げられるのは、盲導犬のきわめてユニークな育成システムである。すなわち、盲導犬の候補犬は雌雄ともに避妊・去勢を受けた後に訓練を開始するために、優秀な盲導犬であってもその遺伝子を繁殖によって次世代に伝える術を失うのである。これは、育種概念に逆行した繁殖・育成システムであるとも言える。したがって、自然交配に終始することなく、人工授精、受精卵移植や卵巣移植

などの人工繁殖技術の導入・開発によって、これまで廃棄の対象であった生殖細胞を活用し得る高度な効率化が、盲導犬普及率の改善のために必要であると思われる。

人工授精

イヌの凍結精子による人工授精は、1950年代から研究されており、現在、オーストラリア、アメリカ、イギリス、ニュージーランド、フィンランドなどの盲導犬協会・盲導犬事業所においては実用的な応用を果たしている。残念ながら、わが国においては、盲導犬事業への凍結精子を用いた人工授精の導入が遅れていたが、2002年に筆者らによって国内初の成功例が得られ、現在では実用化に至っている [1]。

イヌの自然交配においては、精液は腔内に射出されるが、凍結融解精子の運動性は新鮮射出精子と比較して劣るので、凍結融解精子を用いた人工授精においては、融解した精子を子宮体部に注入することが望ましい。補助犬に汎用されるラブラドルリトリバーのような大型犬では、解剖学的に腔が長いので子宮頸管を通過して子宮体部に精子を注入するには、適切なカテーテルを準備することが必要である。Norwegian カテーテルと呼ばれている金属製のカテーテルは、元来、キツネの人工授精のために開発されたものであるが、これは比較的小型の動物の腹部を触診しながらガイドして子宮頸管を通過するには適当であるが、大型犬への妥当性は乏しい。その点、1992年に Wilson が開発したヒト用の膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精法は、カテーテルの先端をモニターで観察しながら実施するので、技術的にも容易で確実性が高い [2]。術者はカテーテルの先端が頸管を通過したことをモニターで確認してから、カテーテル内の凍結融解精子を子宮体部に注入することが可能である。ヒト膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精法に問題点があるとすれば、それは用いる機材が比較的高価であることと思われる。国産の膀胱鏡ではシース（鞘）部の長さが不足しており、大型犬の人工授精に用いることは困難であり、ドイツのストルツ社製のヒト用膀胱鏡を輸入することが必要である。交配頻度がそれほど高くない比較的小規模の補助犬事業所に数百万円もする膀胱鏡を準備す

ることは現実的ではないので、国内に補助犬繁殖のセンター機能をもつ研究機関の存在が望まれるところである。ヒト用膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精法は、比較的容易に技術習得が可能であること、また、イヌに対する鎮静処置や補助者を必要しないことから、フィールドにおいてもきわめて実用的な授精法であると考えられる。凍結融解精液を用いた人工授精では、新鮮精液に比較して受胎率、および産仔数が低い傾向が認められるが、この原因は人工授精技術そのものではなく、精子を提供する雄の違いによるものである。すなわち、授精機会の違いよりもむしろ、個体の違いによる精液性状の差異に起因すると思われる受胎率の差異が顕著であった [1]。低受胎率を示す（耐凍能が低い）精子の受精能力の向上のための凍結融解方法の改良や新規技術、たとえば、卵細胞質内精子注入法の開発が必要であろう。

また、これまでのイヌ精子の凍結保存は、煩雑な操作と時間を要するので、フィールドでの凍結を可能とするような、より簡便な凍結保存法が求められている。イヌ精子の凍結保存には、鶏卵の卵黄が用いられているが、昨今のトリインフルエンザの蔓延により、卵黄を含む試料の輸出入が制限される場合があり、イヌの凍結精子もこの例外ではない。事実、筆者らは、トリインフルエンザの発生を理由にイギリスとフィンランドがニワトリ生体由来材料を含む試料、すなわちイヌ凍結精子の輸出を一時差し止め、輸入不能になったことを経験し、急遽、卵黄を用いない、より化学的組成の明確な凍結保護剤の開発に取り組んでいる。これまでに、マウス精子の超急速凍結保存法に用いられている凍結保護剤の組成を改良し、0.3M グルコースと3% スキムミルクのみから構成される凍結保存液を用いた凍結融解後のイヌ精子の運動性が、従来の卵黄を用いた凍結融解法と比較して、同等かそれ以上を示す凍結保存法を開発し、この方法による凍結融解精子由来の産仔を得ることに成功している [3]。

イヌ胚の初期発生

他の動物と比較して、イヌの繁殖生理の理解が遅れていることは前述したが、初期胚の発生に関する知見も例外ではなく、情報が限られていた。イヌにおいては、LH サージ後6~10日目に受精卵子は2細胞期に発生し、LH サージ後11~12日目に子宮に移動すること [4, 5]、また、ビーグル犬においては、LH サージ後8~9日に



世界で初めて得られたイヌ凍結融解胚由来の産仔

胚盤胞に発生することが報告されているが [6]、胚の凍結保存および胚移植研究を進めるにあたっては、犬種間で着床前の発生速度に差異が認められるか否かを含めた、より詳細な情報が必要であった。これまで、補助犬に汎用されているラブラドルリトリバーの着床前の胚発生に関する検討は、ほとんどなされていなかったことから、筆者らは、発情兆候を示したメスの血中プロゲステロンレベルをモニターすることによってLH サージ日を推定し、LH サージ後の種々の日数に人工授精を行い、摘出した生殖器をかん流することによってLH サージ後の日数と胚の発生ステージ、および胚の局在部位との関係を観察することから着手した。これまでに75頭の雌を用いて観察した結果、ラブラドルリトリバーにおいては、胚の卵管から子宮への移動は、LH11日目から始まり、約24時間を費やして子宮に達すること、そして、LH14日目までに、すべての胚は子宮に移動することが明らかとなった。また、胚は、LH10から13日目までには桑実胚に、LH14日目までには胚盤胞に発生することが明らかとなっており [7, 未発表]、イヌ胚の着床前の発生速度には、品種間によって差異が存在する可能性が示唆された。

イヌ胚の凍結保存法および胚移植法の開発

盲導犬候補犬の避妊手術前に人工授精を施して胚を回収し、これを凍結保存することは、卵巣の凍結保存と双壁をなす遺伝子資源の有効利用方法であると考えられる。これまでに、マウス胚の凍結保存液であるDAP213およびクライオトップを用いたイヌ卵母細胞の超急速凍

結融解を試みた結果、良好な凍結融解後の生存性が得られている [8]。しかしながら、これまでイヌ新鮮胚を外科的に移植した後に産仔を得ることに成功した事例は報告されているが、イヌ凍結融解胚の移植後の産仔への発生は、まったく成功例がなかった。最近になって、筆者らは、ガラス化保存後のイヌ胚を受容雌の子宮内に人工授精と同様にヒト用膀胱鏡を用いて非外科的に移植した結果、2頭の受容雌から、それぞれ、2頭の生存産仔を得ることに成功している [未発表]。胚移植時における移植胚の発生ステージは、受容雌の妊娠日齢より1～2日先行させることが必要かもしれない。また、一般に、凍結融解後の胚の生存性は、割球の体積の小さい、より発生の進んだ発生ステージが良好であると解されているが、筆者らの経験では、桑実胚よりもむしろ8細胞期や16細胞期胚が凍結融解後の生存性に優れている傾向を認めている。しかし、この原因は明らかではない。いずれにしても、この成功によって、雌側からの人工繁殖による育種改良も可能になったことから、盲導犬の育成への貢献が期待されることである。今後は、胚の着床率の向上を目指した胚の凍結融解方法の改良や胚の非外科的回収法の開発によって、実用化への道が開かれるものと思われる。

盲導犬のバイオバンクの構築

国内外の盲導犬の個体情報のみならず、凍結精子・胚等のバンキングを行い、これらの情報を広く公開することによって国内外の遺伝子資源の需要に対応する体制の構築が進められている。このバンキングにおいては、盲導犬の生殖細胞のみならず、盲導犬のゲノムDNA、血清、病歴、家系などについても保存とデータベース化(K9バイオバンク)し、ユーザーが必要な情報へのアクセスと有効活用が可能となることを目的としている。

これまでに、データベースの要件、すなわち表記言語(英語表記を原則とし、コメント等の項目に英語以外の言語を入力・閲覧できるようにした)、データ(犬の基本データ(ID, 機関, 管理番号, 犬名, 生年月日, 性別, 現在の状態(訓練犬, 盲導犬, 繁殖犬など), 犬種, 体色)その他の犬情報(稟性, 健康診断記録, 遺伝的性質, 写真)交配データ(父犬, 母犬, 発情日, 交配日, 交配形態, 交配時間など)出産データ(出産日, 死産数など)盲導犬育成団体情報, データベース利用者情報), 機能(登録・修正機能, 検索機能, 掲示板機能, 閲覧(表示)について詳細を検討したデータベースが完成している。イヌ個体情報のデータベースは、盲導犬飼育施設が保有するイヌ個体情報を登録・閲覧・検索・集計するこ

とのできるデータベースである。現在のところ、本サイトの利用はID登録した12機関に限られており一般公開はしていない。データベースサーバは帯広畜産大学に設置し、各機関はインターネット経由でサーバにアクセスして所属機関のデータの登録・編集を行うことができるほか、他機関の情報を閲覧・検索することができる。個体情報は「基本情報」「交配記録」「出産記録」の3部構成で、これらの情報を使って交配や出産結果の集計をしたり、訓練成功率や近交係数の算出、また発情日の予想などもできるようになっている。また、「リソース管理データベース」と連結するために、個体情報の中に精子、卵子、組織などのリソース情報を格納することができる。

リソース管理データベースは、イヌの凍結精子、凍結卵子・胚、組織などのバイオリソースを保存管理・提供するためのデータベースである。サンプルの出入庫状況、また利用者情報などをWeb上で管理できる仕組みになっている。

おわりに

適切な資質を有する盲導犬の安定的な提供は、視覚障害者の経済社会への一層の進出、貢献を促すものであり、わが国の安心・安全で快適な社会の構築に貢献する波及効果も具備している。盲導犬の繁殖生理および人工繁殖研究の成果は、優良盲導犬の育成のみならず、介助犬や聴導犬などの補助犬あるいは麻薬探知犬、検疫犬、災害救助犬等の資質向上にも寄与すると考えられることから、国内の安心・安全で快適な社会の構築への寄与のみならず、大きな国際貢献も果たすものと考えている。

引用文献

1. Suwa Y, Abe Y, Lee DS, Ueta YY, Suzuki H (2009) Individual fertility differences in the frozen-thawed spermatozoa among semen donor in the Labrador Retriever. *Reprod Med Biol* in press.
2. Wilson MS (2001) Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 31, 291-304.
3. Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Ueta YY, Asano T, Suwa Y, Suzuki H (2008) Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. *J Reprod Dev* 54, 290-294.
4. Concannon PW, Lein DH (1989) Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy and pregnancy in dogs. In: Kirk R (ed) *Curr Vet Ther Small Anim Pract*, vol.10. Philadelphia, WB Saunders Company, pp. 1269-1282.
5. Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PS (2001) Canine pregnancy. In: Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PS (eds) *Ca-*

- nine and feline theriogenology. Philadelphia, WB Saunders, pp. 66-104.
6. Tsutsui T, Hori T, Okazaki H, Tanaka A, Shiono M, Yokosuka M, Kawakami E (2001) Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci* 63, 401-405.
 7. Abe Y, Suwa Y, Ueta YY, Suzuki H (2008) Preimplantation development of embryos in labrador retrievers. *J Reprod Dev* 54, 135-137.
 8. Abe Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H (2008) Vitrification of canine oocytes. *J Mamm Ova Res* 25, 32-36.