

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580396

研究課題名（和文）補助犬の凍結精液銀行設立を目的とした犬凍結精液作成技術の確立

研究課題名（英文）Study on establishment of the dog frozen semen technique for the purpose of the frozen semen bank establishment of assistance dog

研究代表者

堀 達也（HORI TATSUYA）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80277665

研究成果の概要（和文）：日本では、盲導犬をはじめとする補助犬の数が不足している。これらの補助犬の繁殖には系統（血統）を重視する必要があるため、今後、地球レベルで優秀な犬の精子を導入し、系統立てて繁殖を行うことが必要である。そのためには、犬の凍結精液技術の確立が不可欠である。

今回の研究では、犬精液銀行の設立を目指した実用可能な凍結精液作成技術の開発、すなわち膣内授精でも受胎が可能な良好な性状が得られる凍結精液および雌犬への侵襲を少なくする非外科的な人工授精技術の確立を目的として様々な研究を行った。

その結果、犬の精液希釈液としては、卵黄トリス・フルクトース・クエン酸液が有効であり、この希釈液で作成した凍結精液においては外科的子宮内人工授精では高い受胎率が得られた。またこの時、凍結精液を 48 時間までであれば低温保存してからでも高い受胎率が得られる凍結精液が作成できることが明らかとなった。すなわち、遠方の国内または海外から精液を低温輸送した後に作成した凍結精液の使用も可能であることが明らかとなった。しかし、小動物用内視鏡（ファイバースコープ）を使用した経膣による子宮内授精法の技術開発のために、排卵前後の外子宮口と生殖道内の観察およびカテーテルの挿入が可能であるかどうかについての検討を行ったが、外子宮口にカテーテルが挿入できたものは、11 頭中 1 例だけであったため、経膣による子宮内人工授精後の凍結精液の受胎性についての検討を行うことができなかった。今後は、外子宮口の観察可能範囲の拡大を視野に入れ、それを可能にする空気圧やカテーテルの開発などが必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：It is the present situations in Japan that the assistance dog including the guide dog is very insufficient. Because the lineage is necessary for reproduction of these dogs, it will be necessary to introduce the semen of an excellent dog and breed systematically at earth level in future. The establishment of the canine frozen semen technique that practical use is possible is indispensable. Therefore, for the purpose of establishment of canine frozen semen bank, the development of frozen semen technique providing high conception rate by the vaginal insemination and the establishment of the nonsurgical artificial insemination technique to reduce the aggression on dog were studied.

As a result, Egg-yolk tris fructose citric acid extender was effective, and a high conception rate was provided by the surgical intrauterine insemination of canine frozen semen. In addition, it became clear that intrauterine insemination by the semen frozen after preservation at low temperature until 48 hours provided the high conception rate. It was thought that the semen frozen after transport of semen at low temperature from the distant place in Japan or the foreign countries might be useful. However, when we observed the vagina and the external os of uterus before and after the ovulation using the endoscope (fiberscope) for small animals, the insertion of the catheter was possible, but the passage of a catheter was able to insert in only one of 11 bitches. Therefore, I could not examine the conception by the transvaginal intrauterine insemination of canine frozen semen. It in future, it was thought that the expansion of the observable range

of the external os of uterus, the development of an air pressure and the development of catheter that enabled it would be necessary.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：臨床繁殖・産科・犬・凍結精液

#### 1. 研究開始当初の背景

全国で盲導犬を必要とされる視覚障害者は数万人といわれている。しかし、実際に盲導犬として活躍しているのはわずか800頭余りである。これら盲導犬の育成には、財団法人日本盲導犬協会が中心となって事業を行っており、多くのボランティアに頼っているのが現状である。盲導犬は、人の安全に深く関わる仕事をするため、適性が重視される。この適性は血統的な要因が最も重要であるため、盲導犬を繁殖させるためには系統的な繁殖が最も重要となる。しかし、日本にだけですべての盲導犬の繁殖を行うのは限界があることが考えられる。スウェーデン、オーストラリアなどの諸外国では、盲導犬（主にラブラドルレトリバー）を系統的に繁殖・育成している。盲導犬の先進国であっても、我が国と同様に多くの方々のボランティアによって事業が支えられており、日本に盲導犬候補の犬をそのまま提供していただける余裕はない。従って、地球レベルで優秀な犬の精子を導入し、系統立てて繁殖を行うことが、この事業を大きく推進させることになる。しかし、2004年11月の狂犬病予防法の強化によって、検疫制度が見直され、犬の輸入が困難となっている。すなわち、海外の優秀な血統の導入には、輸入凍結精液による人工授精が必要不可欠な技術であり、盲導犬協会としても、これら補助犬の育成には、凍結精液による人工授精技術の確立が急務であると考えている。しかし、犬の精子は耐凍性に弱く、凍結精液による人工授精が実用段階に至っていない。我々は、犬凍結精液に関する研究を続け、国内で始めて犬の凍結精液による子宮内授精で高率に受胎することに成功した。しかし、腔内への人工授精によ

る受胎率は低く、実用化にはまだ解決しなければならない点がいくつか存在する。

#### 2. 研究の目的

上記に述べたような背景から、今回の研究では、自ら維持しているビーグルコロニーを用いて、臨床的に実用可能な凍結精液作成技術の更なる開発、すなわち腔内授精でも受胎が可能な良好な性状が得られる凍結精液および雌犬への侵襲を少なくする非外科的な人工授精技術の確立を目指すことを目的に研究を進めていった。これらの研究結果は、補助犬の繁殖を効率よくすすめていくための凍結銀行設立のために世界的に役立つものと考えられた。

#### 3. 研究の方法

##### (1) 凍結精液希釈液および低温保存の有効性の検討

凍結精液希釈液中に含まれる糖類として、今までの研究においてフルクトースが使用されてきた。しかし、最近注目を浴びているトレハロースやラフィノースには、低温に対するショックを保護する作用があるといわれているため、これらの糖類を使用し精液希釈液を作成し、まず、精液の低温保存を行いその有用性について評価した。そして、この結果から凍結精液の希釈液としても有効であると考えた。また同時に、精液の輸送に関する評価も検討できると考えられた。

方法として、犬精液を3つの精液希釈液(卵黄トリス・クエン酸液・フルクトース、グルコースまたはトレハロース)で希釈し、2、4、8、12、16、20および24℃の温度で72時間まで保存し、精液性状からその有用性について検討した。

## (2) 非外科的な子宮内授精技術の確立

犬凍結精液による人工授精は今まで外科的に行っていたが、犬にかかるストレス（侵襲）を考慮すると非外科的な経腔の子宮内授精の開発が不可欠である。しかし、経腔の子宮内授精は雌犬の特徴的な解剖学的構造から容易に行うことはできず、熟練した技術や高価な機器を必要とする。そこで、凍結精液の技術を臨床応用することを目的として、小動物用内視鏡（ファイバースコープ）を使用した経腔による子宮内授精法の技術開発のための予備的な検討として、排卵前後の外子宮口と生殖道内の観察およびカテーテルの挿入が可能であるかどうかについての検討を行った。

## (3) 凍結前の低温保存が凍結融解後に与える影響の検討

国内の遠隔地や海外にいる優秀な犬の精液を凍結保存する場合、犬を輸送することは容易ではない。また、犬の低温精液は、2日の保存でも精子活力を80%以上に保持できることが知られている。すなわち、精液だけを低温で輸送し、この精液を凍結保存することが可能であれば、どの地域にいる優秀な犬の精液を有効に保存することが可能となる。しかし、この点についてはまだ検討がなされていないため、低温保存後の精液による凍結融解後の性状に与える影響について検討を行う。そしてその後、これら精液を用いた人工授精後の受胎率について検討した。

実験は、雄ビーグル犬2頭の犬から精液を採取し、精液性状に差がないことを確認後、混合して1サンプルとし、さらにこれを3等分して、0～48時間まで低温（4℃）保存後に凍結精液を作成し、融解後の精子活力、精子生存率および精子奇形率について観察した。その後、この精液における受精能を明らかにするため、雌ビーグル犬20頭を使用して外科的な子宮内授精を実施した。なお、授精精子数 $4 \times 10^7$ とした。

## (4) 高齢犬の凍結精液作成における融解後の精液性状に及ぼす影響

近年、動物の医療技術が高まり、ペットの高齢化が進んできている。余命の短い高齢犬において、凍結精液作成の需要が今後伸びてくる可能性は大いに考えられる。しかし、高齢犬は成犬と比較して精液性状が低下し、凍結融解後の性状にも影響を及ぼすことが示唆される。そこで、高齢犬精子の凍結融解後の性状を改善させることを目的に、実験1として高齢犬と成犬の凍結保存前後の精液性状の比較および加齢に伴う凍結精液の性状の影響を調べ、実験2として高齢犬凍結精液作成におけるグリセリン濃度およびグリセリン平衡時間についての検討を行った。

供試動物は、当研究室で飼育されている9歳の高齢犬ビーグル3頭と2～5歳の成犬ビーグル4頭を使用した。

まず実験1として、それぞれの犬から精液を採取した後、既報の方法で凍結精液を作成し、融解後の精液性状を比較した。

実験2として、グリセリンが精子に与える毒性に着目して、高齢犬と成犬でそれぞれ最終グリセリン濃度が2%、4%、7%となるように、それぞれグリセリン平衡時間を30分、60分、120分と設定して凍結精液を作成、すなわち全部で9グループの実験群を設定し、凍結融解後の精液性状からグリセリンの影響を比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 凍結精液希釈液および低温保存の有効性の検討

実験の結果、トレハロース群は、フルクトースおよびグルコース群に比較して精子活力はやや低値を示した。保存温度としては、4～12℃保存群では48時間まで精液性状を良好に保存することができたが、72時間の保存では精子活力の低下および精子奇形率の増加がみられた。また、2℃および16℃以上の保存群では24または48時間以上の保存で精子活力の低下および精子奇形率の増加がみられた。フルクトース群およびグルコース群との間で精液性状の結果に差はみられなかった。

以上のことから、犬精子は4～12℃の範囲での保存温度が適切で、卵黄トリス・クエン酸にフルクトースまたはグルコースを添加した希釈液を用いた場合、低温保存による輸送では48時間以内まで可能であることが明らかとなった。この結果から、犬凍結精液作成においても、我々が今まで使用してきた卵黄トリス・フルクトース・クエン酸液が有用であることが示唆された。

### (2) 非外科的な子宮内授精技術の確立

実験の結果、各性周期における腔内での観察は行えたが、外子宮口にカテーテルが挿入できたものは、11頭中発情前期の1頭だけであった。今後は、外子宮口の観察可能範囲の拡大を視野に入れ、それを可能にする空気圧や子宮腔部の弾力性と外子宮口の狭い径に対するカテーテルの強度の向上、また子宮頸管の走行に適合したカテーテルなどの開発が必要であると考えられた。

### (3) 凍結前の低温保存が凍結融解後に与える影響の検討

実験の結果、凍結融解後の精子活力および精子生存率は、0時間保存群と48時間保存群の間に有意差が認められた。精子奇形率は、0時間保存群に対して、24、48時間保存群でわずかに高値を示した。すなわち、低温保存後には精子活力は明らかに低下しているが、凍

結融解後の精子活力は24時間保存までは変わらず、48時間においても平均25.0±5.5%であり十分に子宮内授精に使用可能であると考えられた。しかし、子宮内授精後の結果は、0時間低温保存後の凍結精液による受胎率は80.0%、24時間低温保存後の凍結精液において受胎率は71.4%と高値であったが、48時間低温保存後の凍結精液において受胎率は22.2%と低率であった。

以上のことから、凍結融解後の精子活力や精子生存率が高いにもかかわらず、48時間低温保存した精液の凍結精液による子宮内授精では、高い受胎率が得られないことが明らかとなった。すなわち、精液を低温輸送して凍結保存するには、精液の低温保存は24時間までが有効であると考えられた。

#### (4) 高齢犬の凍結精液作成における融解後の精液性状に及ぼす影響

実験1の結果、高齢犬と成犬の凍結前の精液性状には差はみられなかったが、融解後には高齢犬で精子活力の有意な低下 ( $P<0.01$ ) がみられることが明らかとなった。そこで、同一個体の1歳時と9歳時に同じ方法で凍結精液を作成し、融解したデータを比較した結果、凍結前は両者で有意差はみられなかったが、融解後の精液性状は9歳時に作成したものが1歳時のものと比較して有意に低値を示し ( $P<0.01$ )、凍結融解後の精液性状は加齢に伴って変化することが明らかとなった。両者のデータを分析すると、グリセリン平衡後から精液性状が低値を示す傾向が明らかとなったため、グリセリンが高齢犬の精液に対して影響を与えていることが示唆された。

実験2の結果、グリセリン濃度に関して、凍結融解後の精子活力が成犬ではグリセリン4~7%の濃度ではほぼ同様の値を示したのに対し、高齢犬では4%に比較して7%では低値を示した。グリセリン平衡時間に関して、成犬では30~120分までほとんど差がみられなかったのに対し、高齢犬では30~60分に対して120分でやや精子活力が低値を示した。

以上の成績から、高齢犬は成犬と比較するとグリセリンの悪影響を受けやすく、高齢犬の凍結精液を作成する際にはグリセリン濃度は既報の7%よりも4%で良い成績を得られることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

堀 達也・吉國竜太・佐藤立人・曾宮陽子・高木勝子・岸部友里恵・篠田翔子・

河上栄一・筒井敏彦  
犬射出精液における低温保存温度の検討  
第148回日本獣医学会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

堀 達也 (HORI TATSUYA)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授  
研究者番号：80277665

##### (2) 研究分担者

筒井 敏彦 (TSUTSUI TOSHIHIKO)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授  
研究者番号：40060529

河上 栄一 (KAWAKAMI EIICHI)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授  
研究者番号：80139352

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：