

# 生殖工学技術による新たな盲導犬繁殖・育成システムの確立と普及啓蒙活動の推進による栃木県盲導犬普及率の向上

事業代表者 宇都宮大学農学部附属農場 教授 長尾慶和

構 成 員 宇都宮大学農学部附属農場 助教 福森理加

地域共同研究センター 博士研究員 サラントラガ

東京農工大学大学院連合農学研究科 (宇都宮大学配置) 博士後期課程3年 緒方和子

宇都宮大学大学院農学研究科 修士課程2年 佐藤あかね

東日本盲導犬協会 育成・管理部長 菅根尚子

栃木県獣医師会 会長 岩上紘一

## 1. 事業の目的・意義

日本では、盲導犬を要望している視覚障害者が約3,000人いるとされているのに対し、供給できる頭数は年間に約125頭前後であり、慢性的に盲導犬が不足している状況がある。特に、栃木県における盲導犬普及率（人口100万人あたりの盲導犬ユーザー数）は5.0と、全国平均の7.9と比較して著しく低く、盲導犬不足が深刻化した状況である。このような現状とともに、県民の盲導犬事業への理解も貧しく、残念ながら栃木県は視覚障害者に対して優しい県とは言えない現状がある。栃木県の視覚障害者福祉を向上させるためには、盲導犬普及率の向上や、社会の理解は必要不可欠である。

そこで、本事業では、盲導犬普及率を向上させることを目的に、イヌの生殖工学技術の開発および優良盲導犬育種・繁殖システムの確立に向けた研究を行った。また、東日本盲導犬協会や獣医師会とタイアップし、県民の視覚障害者福祉への理解の促進を目的に、様々なイベントを通じて啓蒙・普及活動を行った。

## 2. 研究方法（又は事業内容）

①生殖工学技術の活用による盲導犬育種・繁殖システムの確立

### 1. 卵子体外成熟培養法の検討

体外受精技術は、優秀な個体から多くの産子を得る手段として有効であるが、イヌ卵子を体外で

受精可能な状態に成熟させる方法は確立されていない。そこで、イヌ卵子の体外成熟培養法の検討を行った。栃木県獣医師会加盟協力病院で避妊手術によって摘出された卵巣を飼い主の同意を得て入手した。得た卵巣から未成熟な状態の卵子を採取し、体外成熟培養を行った。検討項目として、成熟培養液へインスリン様成長因子（Insulin like growth factor-1: IGF-1）あるいはトランスフォーミング成長因子（Transforming growth factor- $\alpha$ : TGF- $\alpha$ ）を単独または組み合わせて様々な濃度で添加した。また、成熟に関与する因子の解明の一つとして、成長因子の働きを阻害するピーテン（Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10: PTEN）を抑制する因子であるPTENインヒビター（Bisperoxovanadium: bpV）を様々な濃度で添加する検討を行った。検討終了後、卵子の核を染色し、核の状態から成熟状態を判定した。

### 2. 精液凍結保存法の検討

イヌ凍結精液の質の向上を目的に、凍結希釈液の耐凍剤組成および凍結条件の改良に向けた検討を行った。実験に用いた精液は、東日本盲導犬協会の盲導犬繁殖犬より採取した。卵黄、トリス、クエン酸および糖類からなる一次希釈液およびグリセロールを含む二次希釈液を用いて精液を希釈し、凍結ストローへ充填した。その後、液体窒素（LN<sub>2</sub>）蒸気中でストローを凍結し、LN<sub>2</sub>中で凍結

保存した。耐凍剤組成は二次希釈液中のグリセロール濃度により、凍結速度は LN<sub>2</sub> 液面からストローまでの距離により調節した。凍結融解後の精子について、運動性、生存性ならびにミトコンドリア活性の評価を行い、至適グリセロール濃度および凍結速度を検討した。またそれらの相互作用の影響を評価した。

## ②盲導犬育成事業への県民の理解の促進

東日本盲導犬協会で開催された盲導犬啓発イベントの「盲導犬ふれあいデー」にボランティアスタッフとして参加し、イベントの運営補助および、宇都宮大学農学部と東日本盲導犬協会との共同研究について一般公開する企画運営を行った。

### 3. 事業の進捗状況

#### ①生殖工学技術の活用による盲導犬育種・繁殖システムの確立

##### 1. 卵子体外成熟培養法の検討

IGF-1 を単独で、あるいは IGF-1 と共に TGF- $\alpha$  を培養液中へ添加することで、イヌ卵子の成熟が促進されることが明らかとなった (図1)。

しかしながら、bpV 添加は、成長因子によって促進される卵子の成熟効果を増進しなかった。成長因子による成熟促進メカニズムについては、現在解析中である。

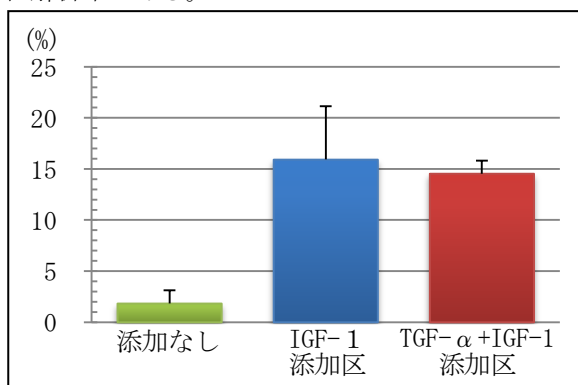


図1. イヌ卵子の成熟率

##### 2. 精液凍結保存法の検討

凍結融解 24 時間後の精子生存指数について、グリセロール濃度 3 および 6 % 区ならびに、凍結速度 1 cm 区で向上する傾向がみられた (図2)。

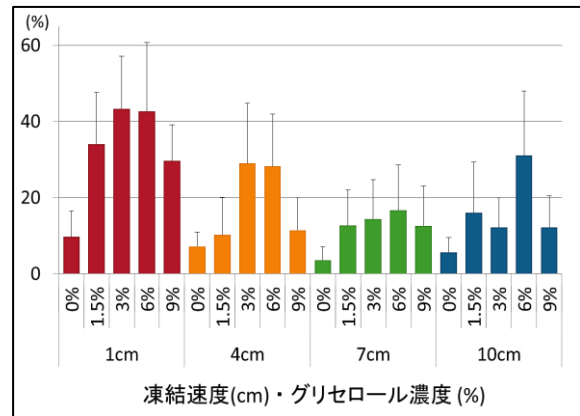


図2. 耐凍剤濃度と凍結速度の相互作用の影響

また、グリセロール濃度 6 % 区では、ミトコンドリア活性保有精子 (図3) の割合が高まる傾向があり、細胞毒性が低くミトコンドリアの保護効果が高い希釈液組成であることが示唆された。

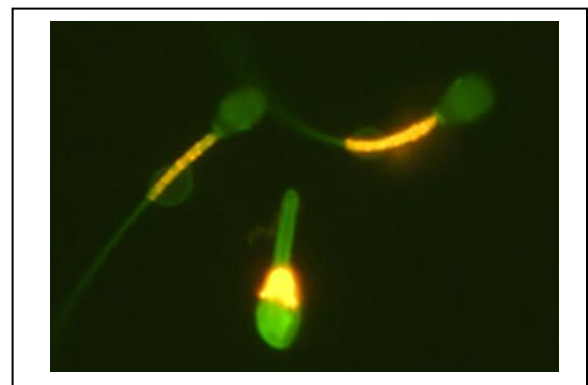


図3. ミトコンドリア活性保有精子

以上より、凍結時の氷晶による悪影響を軽減する耐凍剤組成および凍結速度として、グリセロール濃度 6 % および凍結速度 1 cm 区がイヌ精子の凍結保存に有効であることが示唆された。

## ②盲導犬育成事業への県民の理解の促進

2014 年 4 月 27 日に開催された盲導犬ふれあいデーには、栃木県内外から約 1,200 名の来場者が訪れ、盛大に開催された。共同研究発表ブースでは、ポスターを用いて研究成果を公表した他、体験コーナーを設置して研究で使う道具に実際に触れてもらった。また、実際に顕微鏡を用いた精子の観察や、模擬ツールを用いたイヌの人工授精体験コーナーを設置した (図4)。子供から大人まで、普段は目にすることができない道具を真剣な眼差しで見る姿が見受けられた。来場者からは「盲導犬が誕生する背景について勉強できた」との意見

があり、次回も参加することが決定した。



図4. 共同研究発表コーナーの様子

#### 4. 事業の成果

##### (1) 地域への還元

本事業の成果として、未だ世界的に成功例のないイヌ卵子の体外成熟技術において、培養液への成長因子の添加がイヌ卵子の成熟を促進することを明らかにした。また、ウシなどの家畜と比較して凍結融解後の質の低下が著しいイヌ凍結精液について、耐凍剤組成と凍結速度を改良することで、従来法と比較して凍結融解後の生存性が約 20% 向上した。さらに、本事業で改良した凍結精液を人工授精に用いた結果、盲導犬候補犬となる産子を獲得し、地域の盲導犬協会における繁殖・育種業務への直接的な貢献となった。これらは、地域のみならず、国内外のイヌ人工繁殖技術の進展および新たな盲導犬繁殖システムの確立に寄与する貴重な成果であるといえる。また、地域における盲導犬普及・啓蒙活動に積極的に参加した。

##### (2) 教育展開

本事業では、研究を通じた東日本盲導犬協会との地域連携の発展として、宇都宮大学生物資源科学科の「動物生産学概論」において、イヌとヒトとの関わりや、使役犬を取り巻く諸問題について講義を行った。また、「フィールド実習Ⅰ（動物分野）」において、栃木県動物愛護指導センターの視察見学を実施した。これらの講義実習では、学生が社会における動物の存り方を考える貴重な機会となった。動物や植物を学びの対象とする農学部  
の学生に対し、体験的に理解を深める場を提供で

きたことは本事業における重要な成果である。

#### 5. 今後の展望

以上のように、本事業では生殖工学技術による新たな盲導犬繁殖・育成システムの確立と普及啓蒙活動の推進による栃木県盲導犬普及率の向上に向け、多面的な取り組みを実施した。その結果、イヌ卵子の体外成熟およびイヌ精子の凍結保存法の改良に成功した。しかしながら、卵子の体外成熟率は 15% 程度、凍結融解精子の 24 時間後の生存指数は 40% 程度と未だ低い技術レベルにあり、盲導犬繁殖現場での実用化のためには更なる改良が必要である。体外受精や顕微授精技術を活用したイヌ産子獲得システムの構築を目指し、両技術における課題解決に向けた更なる検討を進めることを計画している。また、本事業では産学連携の取り組みにより、盲導犬の普及・啓蒙ならびに動物愛護に対する県民および学生の理解を促進する機会を設けた。今後も、盲導犬繁殖技術および盲導犬育成事業の相互の発展に向けた持続的な取り組みを実施し、研究および普及・啓蒙活動における種々の課題を達成することで、日本の盲導犬普及率の向上へ貢献したいと考える。