

## 論文の内容の要約

氏名	緒方 和子
学位の種類	博士 ( <u>農学</u> )
学府又は研究科・専攻	連合農学研究科 生物生産科学 専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文名	イヌ精子の凍結保存における希釈液組成に関する研究

## 【論文の内容の要約】

盲導犬をはじめとする使役犬の幅広い活躍は、他の動物に例を見ないイヌ特有の社会貢献である。一方で、訓練を経て使役犬として認定される個体は候補犬の内の一部に留まり、盲導犬を例に挙げると、その育成率は約 30%と非常に低い。その要因として、使役犬には気質や行動特性といった訓練によるコントロールが困難な生来の適性が求められることが挙げられる。そこで、適性の高い候補犬の効率的な獲得が望まれるが、現在の繁殖・育成システムでは改良効率が低く、実現し難い現状にある。

凍結精液を用いた人工授精技術は、絶滅危惧種や遺伝的資質が重要な動物の育種改良に有効である。人工授精技術は、交配時の動物間の接触を不用とし、動物の移動や伝染病の感染リスクの伴わない交配を可能とする。また、精液凍結保存技術は、射精された精液を複数回の交配に分配でき、それらを半永久的に保存できる点から、繁殖および育種改良の場における雄側の遺伝資源の活用を拡大する。そこで本研究では、使役犬の繁殖・育種改良に対する凍結精液を用いた人工授精技術の応用を目指した。

イヌ精子の凍結保存に関する研究は種々行われているが、凍結希釈液組成や凍結法等は様々であり、イヌ精子に最適な手法は未確立である。さらに、凍結融解によるダメージを受けたイヌ凍結精液では、新鮮精液と比較し人工授精による受胎率が不安定である。以上より、イヌ凍結精液の質的向上を目的として、精液性状に変動をもたらす要因の解析、ならびに凍結法と希釈液組成の改良に着目した検討を進めた。

第1章では、緒論として本研究の背景および目的を示した。

第2章では、実験を実施する上での基礎的データとして、季節および採精状況が雄イヌの精液性状に及ぼす影響を評価した。採精季節の影響、ならびに採精状況として、雄イヌの採精経験、発情期の雌イヌの存在および雄イヌの興奮状態の影響に着目し、検討を行った。その結果、本研究に供試した盲導犬繁殖犬の精液性状および耐凍性に季節変動は見られず、通年にわたり安定した精液の質が保たれることが明らかとなった。また、雌イヌを台雌として用いた用手法による採精では、採精経験や発情雌の存在が雄イヌの興奮を高めるが、雄イヌの興奮状態にかかわらず、精液性状および耐凍性の安定した精液を採取でき

ることが明らかとなった。

第3章では、凍結時の氷晶形成に伴う精子へのダメージに着目し、凍結希釈液中の耐凍剤濃度と凍結速度の相互作用の影響を評価した。凍結は、密閉箱内で液体窒素(LN<sub>2</sub>)蒸気にストローをさらした後、LN<sub>2</sub>中へ浸漬することにより行い、LN<sub>2</sub>液面とストロー間の距離により凍結速度を設定した。その結果、グリセロール濃度6%区および凍結速度1cm区における凍結条件で、融解後の精子生存指数が最も向上した。その理由として、精子細胞膜とミトコンドリアにおけるダメージの軽減が考えられた。また、凍結平衡時間を延長し浸漬温度を調節することで、融解後の生存指数が改善されることが明らかとなった。以上より、グリセロール濃度6%における凍結および浸漬温度の調節はイヌ精子の凍結条件として有効であることが示唆された。

第4章では、希釈液組成の改良に向けて、抗酸化剤である還元型グルタチオン(GSH)の効果および至適添加濃度を検討した。その結果、5mM添加区において凍結融解精子の運動性、長期生存性、先体の正常性の向上、ならびに膜の脂質過酸化の抑制がみられた。さらに、6%グリセロールおよび5mM GSHを含む希釈液を用いた凍結精子の受精能、受胎能および個体発生能を検証するため、経子宮頸管的人工授精による交配試験を行った。その結果、5頭の産子を得た。以上より、GSHは凍結融解時の精子への酸化ストレスを軽減し、凍結融解後の長期的な質の向上に効果的であることが示唆された。

以上を総括すると、本研究では、安定的な採精条件の下、イヌ凍結精液の質に及ぼす氷晶形成および耐凍剤による細胞毒性の影響、ならびに酸化ストレスの影響に着目した実験を行い、耐凍剤濃度と凍結速度の調節による氷晶形成障害の軽減および凍結希釈液へのGSH添加による凍結融解過程の活性酸素障害の軽減が、凍結融解後のイヌ精子の質的向上に有効であることを明らかにした。さらに、イヌ精子の凍結保存条件として6%グリセロールと5mM GSHを含む希釈液を用いた速い凍結速度での凍結保存が至適であり、この条件で凍結保存されたイヌ精子が個体発生能を有することを明らかにした。

今後、イヌ性格遺伝子の解明や卵子の体外培養技術の確立に伴い、イヌにおける凍結精液を活用した人工授精技術等の人工繁殖技術への需要は高まると考えられる。本研究の成果を基盤とするイヌ人工繁殖技術の発展が、人間社会におけるイヌの活躍の場の拡大につながることを期待する。