

200929007B

厚生労働科学研究費補助金

障害保健福祉総合研究事業

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 宏志

平成22（2010）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

障害保健福祉総合研究事業

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 宏志

平成22（2010）年 4月

## 目 次

### I. 総合研究報告

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究 ..... 1

鈴木宏志

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 11

III. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 13

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究

主任研究者 鈴木 宏志 帯広畜産大学教授

（研究要旨）障害者の社会参加の促進に資するため、補助犬の人工繁殖技術の開発と実用化および補助犬適性の遺伝子レベルでの診断系の開発を果たし、優秀な補助犬の効率的育成とその啓蒙・普及を達成する基礎・応用研究を計画した。（I）イヌ精子の超急速凍結保存法の開発に関する研究：スキムミルクとグルコースを基礎とする新規のイヌ精子の凍結保存液（SG液）を開発した。また、SG液にさらに改良を加え、イヌ精子の凍結保存にはトレハロースがより適していることを明らかにした。卵黄を用いないイヌ凍結精子の利用により、イヌ遺伝子資源の流通が、一層、容易になるものと考えられる。さらに、イヌ精子の受精能力の評価にマウス卵子を用いた顕微授精系が利用可能であることを示した。（II）盲導犬の人工授精法の普及に関する研究：人工授精の実用化を果たした。これまでに、全国5ヶ所の盲導犬事業所で人工授精の試行・取り組みがなされるに至っており、最も実用化が進んでいる北海道盲導犬協会では、全出産頭数の半数以上が凍結精子由来の産仔で占められている。また、繁殖生産性の維持、向上のためには、感染症の適切なコントロールが重要な課題であるが、ブルセラ症の迅速、的確な摘発のため、血清抗体法およびPCR法による検査系を確立し、全国の盲導犬協会8施設の繁殖犬、育成犬についての検査サービスを継続的に提供した。（III）盲導犬の卵巣移植法の確立：卵巣移植術においては、移植後の移植片に対する酸化ストレスあるいは虚血状態によって、移植後の卵巣組織の卵胞の多くが失われるが、この現象の抑制にはアシアロ化したエリスロポエチンの投与が有効であることを示した。（IV）イヌ胚の凍結保存技術、胚移植技術の開発：エチレングリコールとシュークロースから成るガラス化保存液で胚の凍結保存を行い、これを非外科的に移植した結果、世界で初めて、イヌ凍結胚由来の産仔を得ることに成功した。これまでに、4頭の受容雌から合計7頭の凍結胚由来の産仔を得ていることから、十分な再現性を確保しているものと考えられる。（V）遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発：盲導犬および非盲導犬（不合格犬）について、14遺伝子の26多型について解析を行った結果、合計4種類の多型について、盲導犬群と非盲導犬群の遺伝子頻度に有意な差が認められた。これら4種類の多型について、盲導犬群で有意に頻度の高い遺伝子型すべてを持つイヌの合格率は100%であった。しかしながら、最も頻度の低い遺伝子型を持つイヌに盲導犬は含まれていなかった。以上の成績は、性格関連遺伝子の遺伝子多型が、盲導犬適性の指標と成り得ることを示していると思われる。また、進行性網膜萎縮症（PRA）摘発のための遺伝子検査系を開発し、盲導犬事業所に対して検査サービスを継続的に実施した。

## A. 研究目的

障害者の社会参加の促進に資するため、補助犬の人工繁殖技術の開発と実用化および補助犬適性の遺伝子レベルでの診断系の開発を果たし、優秀な補助犬の効率的育成とその啓蒙・普及を達成する基礎・応用研究を計画する。

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、その普及には法体系や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。我が国の盲導犬は、約 1,000 頭が実働しているが、盲導犬希望者は約 4,800 人と推定されている。盲導犬の安定的・効率的繁殖育成は、最も重要な課題のひとつであるが、現在、全国の盲導犬訓練施設では、優れた雌雄の繁殖犬の確保が困難であること、盲導犬の合格率が低いなどの問題を抱えている。事実、我が国の盲導犬普及率は、欧米先進諸国と比較して 1/2~1/10 程度と極めて低く、まったくの「盲導犬後進国」の状況にある。歴史の浅い他の補助犬の育成、利用に至っては、適切な犬種の選定、繁殖システムなどについて、手探りの状態が続いている。さらに、我が国に導入されているラブラドルリトリバーについては、補助犬としては不適格な股関節形成不全症や進行性の網膜萎縮症などの重篤な遺伝性疾患のキャリアーが高頻度で存在するといわれており、実態の把握を含めた緊急な対処を要する状況にある。

適切な資質を有する補助犬の安定的な提供は、我が国の身体障害者の経済社会への一層

の進出、貢献を促すものである。本研究の成果は、盲導犬や介助犬などの補助犬、あるいは災害救助犬や麻薬探知犬などの資質向上にも寄与することから、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、大きな国際貢献をも果たす。

## B. 研究方法

1) イヌ精子の超急速凍結保存法の開発に関する研究（平成 19 - 20 年度）：これまでのイヌ精子の凍結保存は煩雑な操作を要した。また、既存の方法では、凍結保存液にニワトリの卵黄を用いているため、トリインフルエンザの蔓延によって、凍結精子の輸出入に困難が生じており、化学的組成の明確な凍結保存液の開発が急務となっている。そこで、新規な保存液を開発し、遺伝子資源の流通促進に寄与する。

2) 盲導犬の人工授精法の普及に関する研究（平成 19 - 21 年度）：大型犬の人工授精においては、精子の子宮体部への注入が困難である。申請者らは、ヒト用膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精に成功しているが、今後は、盲導犬協会への普及を図るとともに、規模の小さい盲導犬協会に対しては、人工授精サービスを提供するシステムを実現する。さらに、海外から導入済みの精子の利用を図る。

3) 盲導犬の卵巣移植法の確立（平成 19 - 21 年度）：盲導犬候補犬の卵巣を用いた同種移植の成功率の向上を図る。本システムは、これまで廃棄の対象であった遺伝子資源を有効に活用し、補助犬の育種に適用させる画期的な検討として世界の盲導犬協会から注目さ



れている。

4) イヌ胚の凍結保存技術、胚移植技術の開発（平成19-21年度）：ヒト膀胱鏡を応用した胚の移植術を確立する。これにより、避妊手術（卵巣摘出）に先立って人工授精を施し、胚を凍結保存する雌側からの育種が可能となる。

5) 遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発（平成19-21年度）：盲導犬の合格率が30%程度である我が国のコロニーにおいては、盲導犬適性を遺伝子レベルで検査可能なシステムの開発は重要な課題である。これまでに、性格関連遺伝子の多型解析による予備選別で、合格率の飛躍的向上が可能性であることを示唆する成績を得ている。本研究においては、解析対象遺伝子を拡大し、20遺伝子の多型解析を実施する。

疾患関連遺伝子については、盲導犬が失明する疾患として問題となっている進行性網膜萎縮症(PRA)の原因遺伝子の同定系を開発している。本研究では、盲導犬のスクリーニングと訓練前の検査システム構築によって、この危険因子を排除する。

#### （倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究、遺伝子組換え実験には該当しない。動物実験に該当するので、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省）、厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針（厚生労働省）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省）を遵守して動物愛護上の配慮を行う、また、実験に際しては、国立大学法人帯広畜産大学の動物

実験指針に沿った実験計画を立案して、計画書を動物実験委員会に提出し、審査、承認を経て実施する。

#### C. 研究結果

1) イヌ精子の超急速凍結保存法の開発に関する研究：卵黄を含む凍結保存液に代わる、スキムミルクとグルコースを基礎とする新規のイヌ精子の凍結保存液(SG液)を開発した。グリセロールを添加したSG液で凍結保存したイヌ精子を用いて2頭の雌に人工授精を行った結果、合計6頭の産仔を得ることに成功した。また、SG液にさらに改良を加えた結果、イヌ精子の凍結保存にはトレハロースがより適していることを明らかにした。以上の成績より、卵黄を用いないイヌ凍結精子の利用により、イヌ遺伝子資源の流通が、一層、容易になるものと考えられる。さらに、凍結融解あるいは凍結乾燥精子の *in vitro* における受精能力の検査系を開発するために、マウス卵子にイヌ新鮮、凍結融解および凍結乾燥精子を顕微授精して、その後の発生を観察した結果、精子由来の前核形成に至る事を明らかにした。これにより、イヌ精子の受精能力の評価にマウス卵子を用いた顕微授精系が利用可能であることが示唆された。

2) 盲導犬の人工授精法の普及に関する研究：人工授精の実用化を果たした。これまでに、全国5ヶ所の盲導犬事業所で人工授精の試行・取り組みがなされるに至っており、最も実用化が進んでいる北海道盲導犬協会では、全出産頭数の半数以上が凍結精子由来の産仔で占められている。これまでの啓蒙、普及活動によって、我が国の盲導犬事業所における

人工授精の効果についての理解は確実に進んでいると考えられる。また、繁殖生産性の維持、向上のためには、ネオスポーラ症やブルセラ症などの適切なコントロールが重要な課題であるが、ブルセラ症の迅速、的確な摘発のため、血清抗体法およびPCR法による検査系を確立し、全国の盲導犬協会8施設の繁殖犬、育成犬についての検査サービスを継続的に提供した。

3) 盲導犬の卵巣移植法の確立：新生仔時期(6～9日齢)に凍結融解卵巣の同種移植を施行したラブラドルレトリバー3例については、発情兆候の出現を継続観察中であるが、現在までに発情兆候は認められていない。卵巣移植術においては、移植後の移植片に対する酸化ストレスあるいは虚血状態によって、移植後の卵巣組織の卵胞の多くが失われるといわれていたが、これがイヌ卵巣においても同様に認められることを明らかにするとともに、この現象の抑制にはアジアロ化したエリスロポエチンの投与が有効であることを示した。加えて、アジアロエリスロポエチンの投与は、全身投与でも局所投与でも同様に機能することも明らかにした。今後は、アジアロエリスロポエチンの投与下でイヌ卵巣の同種移植を試みるのが効果的であると考えられる。

4) イヌ胚の凍結保存技術、胚移植技術の開発：イヌの着床前の胚発生については、その理解が十分ではなく、胚移植などの人工繁殖技術開発の障害となっていた。そこで、ラブラドルレトリバーに人工授精を施し、継時的に胚を回収することによって、胚はLHサーージ後9～11日目に卵管から子宮に移行すること、LH11日には桑実胚に、LH12日には胚盤胞

に発生することを明らかにした。エチレンジリコールとシュークロースから成るガラス化保存液で回収胚の凍結保存を行い、これをヒト用膀胱鏡を用いて非外科的に移植した結果、世界で初めて、イヌ凍結胚由来の産仔を得ることに成功した。これまでに、4頭の受容雌から合計7頭の凍結胚由来の産仔を得ていることから、十分な再現性を確保しているものと考えられる。

5) 遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発：盲導犬および非盲導犬(不合格犬)、それぞれ、約320例のDNAサンプルを血液、口腔粘膜細胞あるいは爪から調整し、14遺伝子の26多型について解析を行った結果、5-HTR1B、DRD4およびGLT-1に存在する合計4種類の多型について、盲導犬群と非盲導犬群の遺伝子頻度に統計学的に有意な差が認められた。これら4種類の多型について、盲導犬群で有意に頻度の高い遺伝子型すべてを持つイヌの合格率は100%(10/10)であった。しかしながら、最も頻度の低い遺伝子型を持つイヌに盲導犬は含まれていなかった(0/4)。以上の成績は、性格関連遺伝子の遺伝子多型が、盲導犬適性の指標と成り得ることを示していると思われる。また、治療法の存在しないPRA摘発のための遺伝子検査系を開発し、盲導犬事業所に対して検査サービスを継続的に実施した。

#### D. 考察

新規のイヌ凍結精子保存液の開発を果たしたことは、今後の人工授精技術の向上に寄与するものと思われる。また、卵巣移植にアジアロ化エリスロポエチンの投与が有効である

ことを明らかにしたことは、イヌの卵巣移植だけではなく、ヒトの卵巣移植術の開発にも寄与する重要な知見であると考えられる。加えて、性格関連遺伝子の遺伝子多型が、盲導犬適性の指標と成り得ることを示したこと、世界で初めて凍結胚由来の産仔を、しかも非外科的移植によって得たことは、特筆すべき成果であると考えられる。今後の本研究の遂行によって、一層の優良補助犬の効率的育成と普及に寄与する成果が得られるものと思われる。

行政面からも以下に述べるように幾つかの貢献を果たしたものと考えられる。我が国の盲導犬事業所に人工授精技術の啓蒙、実用化、普及を進展させた。また、ブルセラ症、PRA 症の診断・検査系を確立し、診断サービスを継続的に提供した。補助犬の生殖工学技術、人工繁殖の有用性については、これまでの研究あるいは啓蒙活動によって理解が進み、多くの補助犬事業所その利用が増加することが十分期待されるが、人工授精をはじめとする生殖工学技術の意義、有効性について十分理解しているものの、施設面、経済面あるいは人的要因から、その導入が困難な補助犬事業所も存在すると考えられる。今後は、そのような比較的規模の小さい盲導犬事業所に対して、適切にサービスを提供でき得るようなシステムの構築が必要である。このような仕組みを整備しつつ、今後、人工繁殖技術の積極的な利用と開発によって、年間 300 頭の盲導犬育成、1,500 頭の現役盲導犬を維持する体制の構築が期待できる。

また、ブルセラ症、PRA 等の検査サービスの提供を通じて、各盲導犬事業所における公衆衛生に関する意識の向上が図られた。このこ

とは、補助犬として能力が優れているだけでなく、人獣共通感染症の蔓延を防ぐために微生物学的にも清浄な補助犬を障害者に提供しなければならないという社会的意義が理解されたものと考えられる。

本研究の成果は、盲導犬、介助犬等の補助犬のみならず、麻薬探知犬や検疫犬等の他の使役犬の普及や質の向上にも貢献し得ることから、我が国の安全・安心で快適な社会の構築ばかりではなく、国際貢献にも利用し得るものと考えられる。

## E. 結論

研究計画に沿った活動によって、新規のイヌ凍結精子保存液の開発を果たすと同時に、人工授精の実用化、普及を進展させた。また、ブルセラ症、進行性網膜萎縮症の診断・検査系を確立し、診断サービスを継続的に提供した。加えて、世界で初めて、凍結胚由来の産仔を、しかも非外科的移植によって得たことは、特筆すべき成果であると考えられる。次年度以降の本研究の遂行によって、一層の優良補助犬の効率的育成と普及に寄与する成果が得られるものと思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 鈴木宏志、植田佳子：盲導犬を科学する—盲導犬適性を左右する遺伝子がわかってきた— 遺伝 61: 4-6, 2007.

2) Lee JY, Uzuka Y, Tanabe S, Sarashina T, Suzuki H, Sato M: Cloning and characterization of canine thyroglobulin complementary DNA. *Domest. Anim. Endocrinol.* 32: 178-189, 2007.



- 3) Maeda K, Lee DS, Yanagimoto UY, Suzuki H: Expression of uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1) in the mouse uterus during the peri-implantation period. *J. Reprod. Dev.* 53: 931-936, 2007.
- 4) Kawase Y, Hani T, Kamada N, Jishage K, Suzuki H: Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential. *Reproduction* 133: 841-846, 2007.
- 5) Watarai M, Kim S, Yamamoto J, Miyahara K, Kazama M, Matsuoka S, Chimura S, Suzuki H: A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 477-480, 2007.
- 6) Kawase Y, Tachibe T, Jishage K, Suzuki H: Transportation of freeze-dried mouse spermatozoa under different preservation conditions. *J. Reprod. Dev.* 53: 1169-1174, 2007.
- 7) Hama K, Aoki J, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Suzuki H, Shibasaki M, Arai H: Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice. *Biol. Reprod.* 77: 954-959, 2007.
- 8) 鈴木宏志、川瀬洋介：凍結乾燥によるマウス精子の保存 低温生物工学 54: 21-27, 2008.
- 9) Abe Y, Suwa Y, Ueta YY, Suzuki H: Preimplantation development of embryos in laborador retrievers. *J. Reprod. Dev.* 54: 135-137, 2008.
- 10) Abe Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H: Vitrification of canine oocytes. *J. Mamm. Ova Res.* 25: 32-36, 2008.
- 11) Tachibana M, Watanabe K, Yamasaki Y, Suzuki H, Watarai M: Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *Microb. Pathog.* 45: 105-109, 2008.
- 12) Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Ueta YY, Asano T, Suwa Y, Suzuki H: Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. *J. Reprod. Dev.* 54: 290-294, 2008.
- 13) Watanabe K, Iwai N, Tachibana M, Furuoka H, Suzuki H, Watarai M: Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) contributes to abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 681-686, 2008.
- 14) Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H: Heat shock cognate protein 70 contributes to *Brucella* invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol. Biol.* 8: 212, 2008.
- 15) Suzuki H, Ishijima T, Maruyama S, Ueta YY, Abe Y, Saitoh H: Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation. *J. Assist. Reprod. Genet. J.* 25: 571-575, 2008.
- 16) Tsogtbaatar G, Tachibana M, Watanabe K, Kim S, Suzuki H, Watarai M: Enzyme-linked immunosorbent assay for screening for canine brucellosis using recombinant Cu-Zn superoxide dismutase. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 1387-1389, 2008.

- 17) Kawase Y, Tachibe T, Hani T, Tateishi H, Jishage K, Suzuki H: Effect of zona incision by Piezo-micromanipulator (ZIP) on the *in vitro* fertilization in 21 transgenic mice lines. *Exp. Anim.* 58: 415-419, 2009.
- 18) Ishijima T, Abe Y, Suzuki H: Follicular loss of the cryopreserved canine ovary after xenotransplantation. *J. Mamm. Ova Res.* 26: 61-65, 2009.
- 19) Suwa Y, Abe Y, Lee DS, Ueta YY, Suzuki H: Individual fertility differences in the frozen-thawed spermatozoa among semen donors in the Labrador Retriever. *Reprod. Med. Biol.* 8: 125-129, 2009.
- 20) Fukumoto S, Tamaki Y, Igarashi I, Suzuki H, Xuan X: Immunogenicity and growth inhibitory efficiency of the prime-boost immunization regime with DNA followed by recombinant vaccinia virus carrying the P29 gene of *Babesia gibsoni* in dogs. *Exp. Parasitol.* 123: 296-301, 2009.
- 21) 鈴木宏志: 盲導犬の生殖工学、日本生殖内分泌学会雑誌、14: 44-47, 2009.
- 22) 鈴木宏志: 盲導犬の人工繁殖、日本補助犬科学研究、3: 9-16, 2009.
- 23) Watanabe H, Asano T, Abe Y, Fukui Y, Suzuki H: Pronuclear formation of freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26: 531-536, 2009.
- 24) Watanabe H, Suzuki H, Fukui Y: Fertilizability, developmental competence, and chromosomal integrity of oocytes microinjected with pre-treated spermatozoa in mice. *Reproduction* 139: 513-521, 2010.
- 25) Abe Y, Asano T, Ali M, Suzuki H: Vitrification of canine cumulus-oocyte complexes in DAP213 with a cryotop holder. *Reprod. Med. Biol.* In press.
2. 学会発表
- 1) 阿部靖之、諏訪義典、李 東洙、金 相根、鈴木宏志: イヌ GV 期卵母細胞および胚のガラス化保存の試み 第 143 回日本獣医学会学術集会 pp205, 2007.
- 2) 柳本(植田)佳子、李 晶淵、諏訪義典、鈴木宏志: 盲導犬適性と性格関連遺伝子多型との関連性 第 143 回日本獣医学会学術集会 pp217, 2007.
- 3) 阿部靖之、諏訪義典、李 東洙、金 相根、鈴木宏志: イヌにおける着床前の胚発生および非外科的手法によるガラス化胚移植の試み
- 4) 第 48 回日本哺乳動物卵子学会 24: S28, 2007.
- 5) 鈴木宏志、阿部靖之、諏訪義典: イヌのバイオバンク整備に向けての生殖工学技術の開発について 第 4 回北海道実験動物研究会学術集会 pp8, 2007.
- 6) 柳本(植田)佳子、李 晶淵、諏訪義典、鈴木宏志: 盲導犬適性と性格関連遺伝子多型との関連性 第 4 回北海道実験動物研究会学術集会 pp9, 2007.
- 7) 阿部靖之、佐野 光、野田大地、古林与志安、鈴木宏志: イヌ精巢の凍結保存と異種移植 第 4 回北海道実験動物研究会学術集会 pp10, 2007.
- 8) Abe Y, Suwa Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H: Vitrification of canine oocytes and embryos, and pregnancy after non-surgical transfer of vitrified

embryos. 40th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, pp107, 2007.

9) Suzuki H, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Suwa Y, Abe Y: Cryopreservation of Canine Spermatozoa in a Simple Extender Composed of Skim Milk, Glucose and Glycerol. 40th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, pp237, 2007.

10) 鈴木宏志：盲導犬を科学する—性格関連遺伝子の探究— 第16回日本パーソナリティ心理学会 pp9, 2007.

11) 阿部靖之、李 東洙、佐野 光、秋山幸司、諏訪義典、鈴木宏志：スキムミルク希釈液を用いたイヌ精液の凍結保存 第100回日本繁殖生物学会大会 53: j119, 2007.

12) 鈴木宏志：盲導犬を科学する 第100回日本繁殖生物学会大会第12回日本生殖内分泌学会学術集会合同大会 53: j25, 2007.

阿部靖之、諏訪義典、李 東洙、鈴木宏志：  
13) イヌにおける胚のガラス化保存および非外科的手法による胚移植の試み 第25回日本受精着床学会総会・学術講演会 pp223, 2007.  
14) 柳本(植田) 佳子、李 晶淵、諏訪義典、鈴木宏志：盲導犬適性と性格関連遺伝子多型との関連性 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会年会合同大会 pp356, 2007.

15) 阿部靖之、諏訪義典、鈴木宏志：イヌGV期卵母細胞および胚のガラス化保存 第49回日本哺乳動物卵子学会 S70, 2008.

16) 阿部靖之、秋山幸司、浅野智由、鈴木宏志：イヌ卵丘細胞の生存性 北海道実験動物研究会日本実験動物技術者協会北海道支部合同研究会 pp16, 2008.

17) 秋山幸司、阿部靖之、鈴木宏志：異種移植および体外成熟によるイヌ未成熟卵母細胞の人為的成熟誘起 北海道実験動物研究会日本実験動物技術者協会北海道支部合同研究会 pp17, 2008.

18) 阿部靖之、秋山幸司、浅野智由、鈴木宏志：イヌ卵丘細胞の生存性 第101回日本繁殖生物学会大会 j78, 2008.

19) 渡部浩之、鈴木宏志、Bhuiyan Mohammad、福井 豊：マウス顕微授精における精子処理が受精、胚発生および染色体正常性に及ぼす影響 第101回日本繁殖生物学会大会 j100, 2008.

20) 鈴木宏志：身体障害者補助犬の人工繁殖の現状と将来 第21回動物生殖工学研究会(熊本シンポジウム) pp4, 2008.

21) Abe Y, Suwa Y, Suzuki H: Vitrification of canine embryos at various developmental stages. 41th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, pp152, 2008.

22) Suzuki H, Abe Y, Suwa Y: Preimplantation development of embryos in Labrador Retrievers. 41th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, pp207, 2008.

23) 鈴木宏志：盲導犬の繁殖研究の動向 日本身体障害者補助犬学会 2008年シンポジウム「補助犬の福祉を考える」—動物福祉の現状と課題— pp26, 2008.

24) 阿部靖之、浅野智由、諏訪義典、鈴木宏志：イヌ胚の凍結保存 第22回動物生殖工学研究会 pp4, 2008

25) 浅野智由、阿部靖之、鈴木宏志：スキムミルクと糖を用いたイヌ精子の凍結保存 第22回動物生殖工学研究会 pp5-6, 2008.

- 26) 血管収縮剤の局所投与を伴う胚の卵管内移植 第22回動物生殖工学研究会 pp11-12, 2008.
- 27) 阿部靖之、鈴木宏志：イヌ生殖細胞の凍結保存 - 盲導犬の効率的な繁殖を目指して - 第14回日本臨床エンブリオロジスト学会 pp32, 2009.
- 28) 石嶋隆子、阿部靖之、鈴木宏志：凍結融解イヌ卵巣の異種移植におけるアジアロ化エリスロポエチン投与の卵胞数減少抑制効果について 第50回日本哺乳動物卵子学会 S45, 2009.
- 29) Asano T, Abe Y, Suwa Y, Suzuki H: Cryopreservation of canine spermatozoa in a skim milk/sugar-based extender. International Symposium on Laboratory Animal Science, Bangkok, Thailand, pp106, 2009.
- 30) Suzuki H, Abe Y, Asano T, Suwa Y: Successful delivery of pups from cryopreserved canine embryos. International Symposium on Laboratory Animal Science, Bangkok, Thailand, pp98, 2009.
- 31) 柳本(植田)佳子、松原健一、浅田理央、大嶋なつみ、白砂早織、小林菜苗、諏訪義典、鈴木宏志：セロトニン受容体1Bとグルタミン酸トランスポーターの遺伝子多型が盲導犬適性を左右する 第32回日本分子生物学会年会 4P-0905, 2009.
- 32) 鈴木宏志：精子の凍結乾燥による保存と受精能 第28回日本アンドロロジー学会学術大会および第15回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会 シンポジウム2「精子形成 基礎と臨床」 pp69, 2009.
- 33) Abe Y, Ali M, Asano T, Suwa Y, Suzuki H: Improved viability after vitrification of canine oocytes at germinal vesicle stage using DAP213 solution with cryotop holder. 42nd Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, 620, 2009.
- 34) Suzuki H, Asano T, Suwa Y, Abe Y: Successful delivery of pups from cryopreserved canine embryos. 42nd Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, 619, 2009.
- 35) 阿部靖之、浅野智由、諏訪義典、鈴木宏志：イヌ胚のガラス化保存法および非外科的な移植法の開発 第102回日本繁殖生物学会大会 j91, 2009.
- 36) Suzuki H: Reproductive bio-technology for the guide dog for the blind in Japan. The 2009 International Symposium, Recent Research Trends using Animal in Biomedical Science. Chungnam National University, Korea. pp18-22, 2009.
- 37) 鈴木宏志、阿部靖之、浅野智由、諏訪義典：イヌ胚の凍結保存と移植 第147回日本獣医学会学術集会 pp265, 2009.
- 38) 鈴木宏志、阿部靖之、浅野智由、諏訪義典：イヌ胚のガラス化保存 第148回日本獣医学会学術集会 pp241, 2009.
- 39) 鈴木宏志、阿部靖之、浅野智由、諏訪義典：イヌ胚の凍結融解後の産仔への発生 第56回日本実験動物学会総会 2PO-099, 2009.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 

特願 2007-188779: イヌ精子の凍結保存剤および凍結保存方法 鈴木宏志、阿部靖之

特願 2007-035628: 盲導犬に適した犬を選抜する方法 鈴木宏志・植田佳子
  2. 実用新案登録

該当なし

該当なし

3. その他

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
鈴木宏志、植田佳子	: 盲導犬を科学する－盲導犬適性を左右する遺伝子がわかってきた－	遺伝	61	4-6	2007
Lee JY, Uzuka Y, Tanabe S, Sarashina T, Suzuki H, Sato M	Cloning and characterization of canine thyroglobulin complementary DNA.	<i>Domest. Anim. Endocrinol.</i>	32	178-189	2007
Maeda K, Lee DS, Yanagimoto UY, Suzuki H	Expression of uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1) in the mouse uterus during the peri-implantation period.	<i>J. Reprod. Dev.</i>	53	931-936	2007
Kawase Y, Hani T, Kamada N, Jishage K, Suzuki H	Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential.	<i>Reproduction</i>	133	841-846	2007
Watarai M, Kim S, Yamamoto J, Miyahara K, Kazama M, Matsuoka S, Chimura S, Suzuki H	A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	69	477-480	2007
Kawase Y, Tachibe T, Jishage K, Suzuki H	Transportation of freeze-dried mouse spermatozoa under different preservation conditions.	<i>J. Reprod. Dev.</i>	53	1169-1174	2007
Hama K, Aoki J, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Suzuki H, Shibasaki M, Arai H	Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice.	<i>Biol. Reprod.</i>	77	954-959	2007
鈴木宏志、川瀬洋介	凍結乾燥によるマウス精子の保存	低温生物学	54	21-27	2008
Abe Y, Suwa Y, Ueta YY, Suzuki H	Preimplantation development of embryos in laborador retrievers.	<i>J. Reprod. Dev.</i>	54	135-137	2008
Abe Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H	Vitrification of canine oocytes.	<i>J. Mamm. Ova Res.</i>	25	32-36	2008
Tachibana M, Watanabe K, Yamasaki Y, Suzuki H, Watarai M	Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by <i>Brucella abortus</i> infection in pregnant mice.	<i>Microb. Pathog.</i>	45	105-109	2008
Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Ueta YY, Asano T, Suwa Y, Suzuki H	Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender.	<i>J. Reprod. Fert.</i>	54	290-294	2008
Watanabe K, Iwai N, Tachibana M, Furuoka H, Suzuki H, Watarai M	Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) contributes to abortion caused by <i>Brucella abortus</i> infection in pregnant mice.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	70	681-686	2008
Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H, Watarai M	Heat shock cognate protein 70 contributes to <i>Brucella</i> invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion.	<i>BMC Microbiol.</i>	8	212	2008



Suzuki H, Ishijima T, Maruyama S, Ueta YY, Abe Y, Saitoh H	Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation.	<i>J. Assist. Reprod. Genet.</i>	25	571-575	2008
Tsogtbaatar G, Tachibana M, WatanabeK, Kim S, Suzuki H, Watarai M	Enzyme-linked immunosorbent assay for screening for canine brucellosis using recombinant Cu-Zn superoxide dismutase.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	70	1387-1389	2008

Ishijima T, Abe Y, Suzuki H	Follicular loss of the cryopreserved canine ovary after xenotransplantation.	<i>J. Mamm. Ova Res.</i>	26	61-65	2009
Suwa Y, Abe Y, Lee DS, Ueta YY, Suzuki H	Individual fertility differences in the frozen-thawed spermatozoa among semen donors in the Labrador Retriever.	<i>Reprod. Med. Biol.</i>	8	125-129	2009
鈴木宏志	盲導犬の生殖工学	日本生殖内分泌学会雑誌	14	44-47	2009
鈴木宏志	盲導犬の人工繁殖	日本補助犬科学研究	3	9-16	2009
Watanabe H, Asano T, Abe Y, Fukui Y, Suzuki H	Pronuclear formation of freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes	<i>J. Assist. Reprod. Genet.</i>	26	531-536	2009
Kawase Y, Tachibe T, Hani T, Tateishi H, Jishage K, Suzuki H	Effect of zona incision by Piezo-micromanipulator (ZIP) on the <i>in vitro</i> fertilization in 21 transgenic mice lines.	<i>Exp. Anim.</i>	58	415-419	2009
Fukumoto S, Tamaki Y, Igarashi I, Suzuki H, Xuan X	Immunogenicity and growth inhibitory efficiency of the prime-boost immunization regime with DNA followed by recombinant vaccinia virus carrying the P29 gene of <i>Babesia gibsoni</i> in dogs.	<i>Exp. Parasitol.</i>	123	296-301	2009
Watanabe H, Suzuki H, Fukui Y	Fertilizability, developmental competence, and chromosomal integrity of oocytes microinjected with pre-treated spermatozoa in mice.	<i>Reproduction</i>	139	513-521	2010
Abe Y, Asano T, Ali M, Suzuki H	Vitrification of canine cumulus-oocyte complexes in DAP213 with a cryotop holder.	<i>Reprod. Med. Biol.</i>			In press

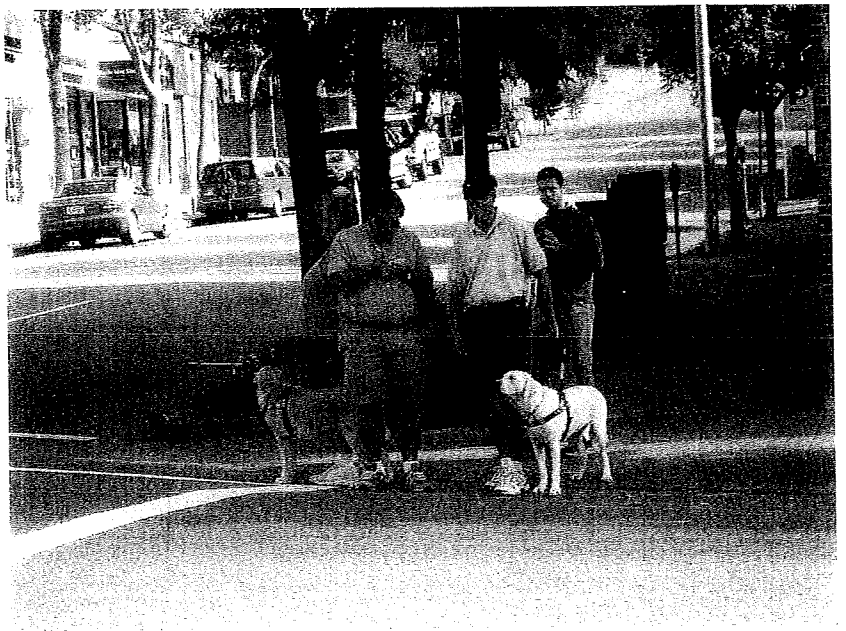
## 盲導犬を科学する ——盲導犬適性を左右する遺伝子がわかってきた

★[Nature誌2007年3月8日掲載記事を読む]

盲導犬の起源は、紀元79年に火山の噴火で埋もれた都市、ポンペイの壁画に描かれていた視覚障害者らしい男性がイヌに導かれて歩いている姿にさかのぼるが、より正確な資料からは、1819年にウイーンの宣教師が盲導犬の訓練をしたのが最初とされている。その後、1916年にドイツのオルデンブルグに盲導犬学校が設立され、現在のような系統的な盲導犬の育成が始められた。当初は、第一次大戦で負傷した傷兵の援助が目的であったが、以来、盲導犬による視覚障害者全般に対する支援が、ヨーロッパを中心に拡大してきた(図1)。

現在、わが国では約950頭の盲導犬が視覚障害者のQOLの維持・向上に寄与すべく活動しているが、30万人を超える視覚障害者からの需要は4,800頭とも7,800頭ともいわれており、慢性的な盲導犬不足が続いている。全国9カ所の盲導犬訓練施設から年間120頭程度の盲導犬が育成され、視覚障害者に提供されているが、盲導犬候補犬が訓練後に卒業できる割合(合格率)は30%程度にとどまっていることから、盲導犬1頭当たりの育成コストは270万円に上っており、その成績の向上が望まれるところである。不合格の理由はさまざまであるが、警戒心の強さや不安を感じる度合いの強さが、訓練によっても除けなかったということが多いようである。人口10万人当たりの盲導犬数は、アメリカでは3.6頭、イギリスでは7.9頭、フィンランドでは4.1頭およびドイツでは2.4頭であるが、わが国では0.7頭と、欧米諸国との差はきわめて大きい(人口に対する視覚障害者の割合は、国、地域によって差がないといわれていることから、盲導犬の普及率は人口比で示されることが一般的である)。わが

国で盲導犬の普及が進んでこなかった要因には、さまざまな社会的・文化的な背景が関与していると思われ、その主因を特定することは困難であるが、育種・繁殖学的な側面からは、小規模の繁殖コロニーが散在していることと、特徴的な盲導犬の育成システムがあげられる。盲導犬候補犬は、例外なく雌雄ともに避妊・去勢術を受けるので、たとえ優秀な盲導犬に育成されたとしても、その子孫を残す術がない。すなわち、盲導犬事業においては、育種概念から逆行した育成システムがとられているので、比較的小さな規模のコロニーでは、その質の維持・向上は難しいものと考えられる。最近になって、家畜の育種・繁殖に一般的に利用されている凍結精子による人工授精技術の盲導犬事業への応用や、これまで廃棄の対象であった盲導犬候補犬の卵巣や精巣を凍結保存しておき、当該個体が優秀な盲導犬に育成されたときに、これらに存在する生殖細胞を利用しよ



(米国サンラフェエルにて)

図1 盲導犬の路上訓練

表1 盲導犬と非盲導犬との性格関連遺伝子多型における遺伝子型頻度の違い

遺伝子名	ヒトにおける遺伝子多型と疾患等との関連	イヌの遺伝子多型	多型の種類	P値
COMT	統合失調症, 固執, 痛がり, 酵素活性	G39A	Silent SNP	0.328
		G216A	Silent SNP	0.006
		G482A	Missence SNP	0.034
5-HTR1B	攻撃性, アルコール依存症	A157C	Missence SNP	0.021
		G246A	Silent SNP	0.021
		C660G	Silent SNP	0.752
		T955C	Silent SNP	0.086
GLT-1	アルツハイマー病	T471C	Silent SNP	0.003
DRD4	新奇追求性	Exon I	24 bpの挿入/欠失	0.259
		Exon III	8種の変長タンデムリピート	0.979
MAOB	パーキンソン病	T199C	Missence SNP	0.182
TH	たばこ依存症	G180A	Silent SNP	0.159
		C264T	Silent SNP	0.652
DBH	酵素活性, パーキンソン病, 注意欠陥, 多動性障害	C789A	Missence SNP	0.678
		A1819G	Missence SNP	-

Silent SNP: アミノ酸置換を伴わない1塩基多型  
Missence SNP: アミノ酸置換を伴う1塩基多型

うとする生殖工学的な技術開発の試みとともに、より盲導犬としての適性が高い候補犬を訓練の対象にすることが期待できる遺伝子診断システムの構築が進められている。

## 盲導犬の遺伝子多型解析

訓練前における盲導犬のより正確な適性把握が、その育成効率を改善すると考えられるが、盲導犬としての適性は性格によるところが大きく、遺伝的な要因も関与しているといわれている。そこで、性格形成に関与しているといわれている遺伝子の多型と盲導犬適性との関連性に関して、盲導犬および非盲導犬(不合格犬)それぞれ約100例のDNAサンプルを血液あるいは口腔粘膜細胞から調製し、7遺伝子の15多型について遺伝子型頻度の解析を行うことによって検討した。対象とした遺伝子は、ドーパミンD4受容体(DRD4)、モノアミン酸化酵素B(MAOB)、チロシン水酸化酵素(TH)、ドーパミンβ-水酸化酵素(DBH)、カテコール-O-メチル基転移酵素(COMT)、セロトニン受容体1B(5-HTR1B)、およびグルタミン酸輸送体(GLT-1)であったが、これらのうちCOMT、5-HTR1Bお

よびGLT-1に存在する合計5種類の1塩基多型について、盲導犬群と非盲導犬群との間の遺伝子型頻度に統計的に有意な差が認められた(表1)。さらに興味深いことに、これら5種類の遺伝子多型について、盲導犬群で頻度の高い遺伝子型すべ

### 塩基配列と遺伝子型

DNA配列のうちの1塩基が多型を示すこと。その場所によっては遺伝子から転写・翻訳されるアミノ酸、タンパク質に影響を及ぼす場合がある。繰り返し配列は遺伝子ではない部分に存在することが多いが、1塩基多型は遺伝子内にも存在し、遺伝子機能に違いをもたらすため、病気に対する感受性や抵抗性に関与する可能性もある。

### 多型と塩基配列

DNAの塩基配列に2通り以上の異なる配列が存在する場合、普通と異なる塩基配列の頻度が1%以上存在するものを多型と定義し、これより少ないまれな場合には突然変異として区別される。多型には1塩基多型のほか、繰り返し配列の繰り返し回数の違いがあり、親子鑑定などのマーカーに利用される。

てを持つイヌの合格率は約80%であったが、頻度の高い遺伝子型をまったく持たないイヌの合格率は10%にすぎないという成績であった。これらの成績は、性格関連遺伝子の遺伝子多型が、盲導犬適性の指標となりうることを示していると思われるが、環境を異にする海外の盲導犬を含めた解析規模の拡大によって、より詳細な情報が提供されるものと考えられる。

5-HTR1Bの1塩基多型A157Cについて一般のラブラドルレトリバーではCアレルは存在しないこと、およびG246Aにおける遺伝子型については、一般のラブラドルレトリバーではG/Gの頻度が高いことが報告されているが<sup>1)</sup>、解析対象となった盲導犬・非盲導犬群においては、それぞれA/CおよびG/Aの遺伝子型頻度が高い傾向が認められたことから、これらの遺伝子型がなんらかの表現型に反映しており、盲導犬候補犬を選ぶにあたって、積極的に選択されたものと推察される。また、GLT-1においては、1塩基多型T471Cの遺伝子型は、一般のラブラドルレトリバーではC/Cの頻度が高いことが報告されている<sup>2)</sup>。しかし、盲導犬・非盲導犬群においては、T/Tが優勢であることから、盲導犬コロニーにおいてはなんらかの指標による選抜によってT/Tの遺伝子型頻度が上昇したものと考えられる。今後、性格に関する表現型と遺伝子多型との関連性についての解析の進展が待たれるところである。

## K9 バイオバンク

バイオバンクとは、オーダーメイド医療の実現化に向けた研究を目的として、数十万人のDNAおよび血液試料を集めるプロジェクトのことで、集められた遺伝子情報を生活習慣病などの病気と遺伝子の個人差との関係の解明に利用しようとするものである。一方、盲導犬の効果的な育成に活用することを目的として、イヌについて同様な情報を統合管理するのがK9 (canine(イヌの意)) バイオバンクである。K9 バイオバンクは、世界に先駆けてわが国で企画されたものであり、個人情報データベースと遺伝子資源データベースとから構成され、上述の性

格関連遺伝子の多型やマイクロサテライトマーカーを含めた盲導犬の遺伝子情報、病歴、家系情報等とDNA、卵子、精子等の遺伝子資源を統合的に管理することによって、比較的詳細な規模の盲導犬事業所が散在しているわが国の盲導犬育成のポテンシャルを最大限に発揮させることを意図している。一方、生物資源の維持管理の観点からみた盲導犬事業の大きな特徴は、イヌの個体・家系管理が厳重になされ、各世代にわたって、健康状態、病歴、繁殖歴等が記録・保管されていることにある。したがって、これらの情報をデータベース化するとともに、血液を含む体細胞、ゲノムDNAおよび生殖細胞を保存するイヌのバイオバンクを整備することによって、医学・薬学研究に活用できるきわめて貴重な生物資源バンクを実現させることができる。ヒトのバイオバンクとは異なり、生殖細胞の保存・利用が可能な動物のバイオバンクの最大の利点は、個体の作出を可能とさせることである。K9 バイオバンクは盲導犬事業のみならず、広く学術利用されることによって、バイオサイエンスの発展にも寄与することが期待される。

### [引用文献]

- 1) Masuda, K., Hashizume, O., Ogata, N., Kikusui, T., Takeuchi Y. *et al. J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 965-972 (2004).
- 2) Ogata, N., Hashizume, C., Momozawa, Y., Masuda, K., Kikusui, T. *et al. J. Vet. Med. Sci.*, **68**, 157-159 (2006).

### 鈴木 宏志 Hiroshi Suzuki

帯広畜産大学 原虫病研究センターゲノム機能学分野 教授  
東京大学大学院 医学系研究科 衛生・医療工学講座 客員教授

### 植田 佳子 Yoshiko Ueta

帯広畜産大学 原虫病研究センターゲノム機能学分野 研究員



## Cloning and characterization of canine thyroglobulin complementary DNA<sup>☆</sup>

J.-Y. Lee<sup>a,\*,1</sup>, Y. Uzuka<sup>b</sup>, S. Tanabe<sup>a</sup>, T. Sarashina<sup>a</sup>,  
H. Suzuki<sup>c</sup>, M. Sato<sup>d</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Department of Clinical Veterinary Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan*

<sup>b</sup> *Department of Veterinary Clinical Radiology, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan*

<sup>c</sup> *Research Unit for Functional Genomics, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan*

<sup>d</sup> *Department of Veterinary Clinical Radiology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan*

Received 12 October 2005; received in revised form 21 February 2006; accepted 23 February 2006

### Abstract

Canine thyroglobulin (cTg) is one of the thyroid autoantigens associated with hypothyroidism caused by autoimmune thyroiditis in dog. To identify canine-specific areas in cTg, we cloned, by reverse transcriptase PCR, and sequenced the complete cDNA of cTg. It revealed an open reading frame of 8289 nucleotides, which encode a polypeptide of 2762 amino acids that is 78.9 and 78.1% identical to bovine and human thyroglobulin, respectively. This complete cTg sequence may be useful to promote the understanding of the primary structure of cTg and, it will be informative data in the

<sup>☆</sup> The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to DDBJ with the accession number AB231914.

\* Corresponding author. Tel.: +81 155 5806; fax: +81 155 5643.

*E-mail address:* [s01060@st.obihio.ac.jp](mailto:s01060@st.obihio.ac.jp) (J.-Y. Lee).

<sup>1</sup> Current address: Research Unit for Functional Genomics, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan.

further search about antigenic epitopes associated with autoimmune thyroiditis and pathogenesis of cTg-associated thyroid diseases in dog.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Autoimmune thyroid diseases; cDNA; Thyroglobulin; RT-PCR; Dog

---

## 1. Introduction

In dog, hypothyroidism is a common endocrine disease and at least half of patients have autoimmune thyroiditis (lymphocytic thyroiditis) [1,2], a condition analogous to Hashimoto's thyroiditis in human. In humans, autoantibodies to human thyroglobulin (hTgAA) are found in high titers in the sera of patients with autoimmune thyroid diseases, including Graves' and Hashimoto's diseases and other thyroid disorders such as thyroid carcinoma [3–5]. Canine thyroglobulin (cTg) is one of the autoantigens implicated in the pathogenesis of canine hypothyroidism caused by autoimmune thyroiditis. In conjunction with clinical signs and clinicopathological abnormalities suggestive of thyroiditis, detection of circulating autoantibodies to cTg (cTgAA) has been considered useful in supporting the diagnosis of hypothyroidism [6,7]. cTg is about 660 kDa glycoprotein composed of two identical subunits and secreted by thyrocytes and constitutes most of the follicular colloid as well as part of the cytosolic material. The biological function of cTg is known to provide a matrix for the iodination of its tyrosine and thus the synthesis of thyroid hormones [8]. Also, thyroglobulin (Tg) is known to contain many antigenic epitopes and capable of inducing thyroiditis in human and experimental animals [9–11]. In a previous study, to localize the disease-associated epitopes of cTg, after degradation of cTg with trypsin, the tryptic peptides of cTg were tested by Western immunoblotting for their immunoreactivity to serum thyroglobulin autoantibodies from patients with TgAA-positive hypothyroidism and normal individuals [12]. However, the search for unique cTg epitopes has been hampered by the lack of the complete primary structure of cTg [12]. Complete sequences of thyroglobulin gene have been reported for bovine, human, murine and rat Tg [13–16]. The purposes of this study were to obtain cDNA sequence and complete primary structure of cTg, and compare it with Tg sequences of human and other species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. mRNA extraction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

mRNA was prepared from thyroid glands of healthy dogs using the FastTrack 2.0 mRNA isolation kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using RNA LA PCR kit (TaKaRa, Shiga, Kyoto).

cDNA synthesis was carried out for 30 min at 50 °C in a 20 µl reaction solution containing 50 ng mRNA, 20 pmol downstream primer (Table 1) and 5 units AMV Reverse