

氏名（本（国）籍）	ABDEL-GHANI, Mohammed Ali（エジプト・アラブ共和国）
主指導教員名	帯広畜産大学 教授 鈴木宏志
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第365号
学位授与年月日	平成24年9月18日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Studies on In Vitro Maturation of Canine Oocytes (イヌ卵子の体外成熟に関する研究)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 村瀬哲磨 副査 帯広畜産大学 教授 鈴木宏志 副査 岩手大学 教授 橋爪一善 副査 東京農工大学 教授 渡辺元 副査 岐阜大学 教授 志水泰武

### 論文の内容の要旨

家畜やヒトを含む哺乳動物の生殖を補助する技術、いわゆる生殖工学的技術は、マウスを始めとして多くの動物種で開発が進み、動物の改良・増殖、遺伝子資源の保全・有効利用あるいは不妊治療に応用されてきている。イヌの育種・繁殖においても生殖工学技術の適用が期待され、特に、慢性的な供給不足が継続している盲導犬や介助犬などの身体障害者補助犬、あるいは麻薬探知犬、検疫犬などの効率的育成への貢献が望まれている。しかしながら、イヌにおいては、その複雑な繁殖生理の理解に乏しいことを始めとする幾つかの要因によって、他の動物と比較して生殖工学技術の開発が著しく遅れており、イヌの体細胞クローンの誕生の報告はなされているものの、未だに、体外受精による産仔すら得られていない。現在のところ、イヌの人工繁殖において、唯一、実用化されている技術は人工授精のみであり、未成熟卵子の体外成熟、体外受精、あるいは胚の凍結保存技術等、雌側からの改良が期待される技術開発が切望されている。

イヌでは適切な過剰排卵技術も定着していないことから、卵巣由来の未成熟卵子を体外培養によって成熟させて体外受精に供し受精卵を得る技術の確立が、生殖工学技術開発の第一歩であると考えられるが、未成熟卵子の体外培養による成熟率も満足な成績が得られていない状況にある。そこで、本研究では、イヌ未成熟卵子の体外成熟におけるウシの体外受精時の培養上清の添加効果（第1章）を検討した。TCM-199を基礎培地として、培養上清を種々の割合で混合し、卵巣から採取した卵子-卵丘複合体(COC)を72時間あるいは96時間培養して核の成熟程度を観察した。その結果、培養上清を30%添加したTCM-199で72時間培養した場合に卵核胞崩壊～第二成熟分裂中期に達した卵子の割合が最も高く(42%)、この割合は対照のTCM-199(27%)と比較して有意に高い成績であった。また、培養時間を96時間に延長した場合には、退行卵子の割合が上昇する傾向が認められた。以上の成績より、ウシCOCの培養上清(体外受精培地)は、イヌ未受精卵の核成熟を促進する効

果があることが示唆された。また、培養上清の効果は、顆粒層細胞から分泌される種々の成長因子に起因するものと考えられた。

これらの成績を受け、ウシ顆粒層細胞のモノレイヤー(BGML)およびイヌ顆粒層細胞のモノレイヤー(CGML)を調整して、イヌ未成熟卵子の体外培養におけるBGMLあるいはCGMLとの共培養の効果について検討した(第2章)。その結果、発情期あるいは発情間期にあるイヌから採取したCOCをBGMLと72時間共培養した場合に、卵子の第二成熟分裂中期への成熟が最も促進される(27%)ことが明らかとなり、この成績は、CGMLとの共培養(8%)および培養液のみで成熟を促した実験区(3%)と比較して有意に高い成績であった。また、BGMLが卵子の成熟促進効果を発揮するためには、BGMLとCOCとの直接的な接触が重要であることが示唆された。加えて、卵子提供雌の発情周期の時期が、採取した卵子の体外成熟率に影響を及ぼすことも示唆された。

さらに、摘出した卵巣からより多くの体外成熟に供し得る卵胞を確保することを可能とすることを目的に、卵巣組織片の体外培養における卵胞の成長に及ぼす分化成長因子(GDF-9)および血管内皮成長因子(VEGF)の添加効果について検討した(第3章)。ヒト組換えGDF-9およびVEGF存在下で凍結融解したイヌ卵巣片をミリセル上で7~14日間培養し、卵胞の発育段階を組織学的に検索した結果、単位面積あたりの卵胞数が成長因子を添加していない対照と比較して、一次卵胞、二次卵胞および前胞状卵胞で有意に多い成績であった。これらの成績から、卵巣片の体外培養におけるGDF-9およびVEGFの添加は、卵胞の成長を促進する効果があることが示唆された。

以上、本研究においては、イヌ未成熟卵子の体外培養に対して有効な新たな培養系を提供するとともに、卵巣片の器官培養系を開発した。今後、これらの系の活用によってイヌにおける生殖工学技術の開発が進展するとともにイヌの繁殖生理の理解がより深まるものと期待される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

哺乳動物の生殖を補助する技術、いわゆる生殖工学的技術は、マウスを始めとして多くの動物種で開発が進み、動物の改良・増殖、遺伝子資源の保全・有効利用あるいは不妊治療に応用されてきている。イヌの育種・繁殖においても生殖工学技術の適用が期待され、特に、慢性的な供給不足が継続している身体障害者補助犬や使役犬などの効率的育成への貢献が望まれている。しかしながら、イヌにおいては、その複雑な繁殖生理の理解に乏しいことを始めとする幾つかの要因によって、他の動物と比較して生殖工学技術の開発が著しく遅れており、現在のところ、イヌの人工繁殖において実用化されている技術は人工授精のみであり、未成熟卵子の体外成熟、体外受精等、雌側からの改良が期待される技術開発が望まれている。

イヌでは適切な過剰排卵技術も定着していないことから、卵巣由来の未成熟卵子を体外培養によって成熟させて体外受精に供し受精卵を得る技術の確立が、生殖工学技術開発の第一歩であると考えられるが、未成熟卵子の体外培養による成熟率も満足な成績が得られていない状況にある。そこで、本研究では、イヌ未成熟卵子の体外成熟におけるウシの体外受精時の培養上清の添加効果(第1章)を検討した。TCM-199を基礎培地として、培養上清を種々の割合で混合し、卵巣から採取した卵子-卵丘複合体(COC)を培養して核の成熟程度を観察した。その結果、培養上清を30%添加したTCM-199で72時間培養した場合に卵核胞崩壊~第二成熟分裂中期に達した卵子の割合が最も高く(42%)、この割合は対照のTCM-199(27%)と比較して有意に高い成績であった。また、培養時間を96時間に延長した場合には、退行卵子の割合が上昇する傾向が認められた。以上の成績は、ウシCOCの培養上清(体外受精培地)は、イヌ未受精卵の核成熟を促進する効果があることを示唆したものであった。また、培養上清の効果は、顆粒層細胞から分泌される種々の成長因子に起因するものと考えられた。これらの成績を受け、ウシ顆粒層細胞のモノレイヤー(BGML)およ

びイヌ顆粒層細胞のモノレイヤー(CGML)を調整して、イヌ未成熟卵子の体外培養におけるBGMLあるいはCGMLとの共培養の効果について検討した(第2章)。その結果、発情期あるいは発情間期にあるイヌから採取したCOCをBGMLと72時間共培養した場合に、卵子の第二成熟分裂中期への成熟が最も促進される(27%)ことが明らかとなり、この成績は、CGMLとの共培養(8%)および培養液のみで成熟を促した実験区(3%)と比較して有意に高い成績であった。また、BGMLが卵子の成熟促進効果を発揮するためには、BGMLとCOCとの直接的な接触が重要であること、卵子提供雌の発情周期の時期が採取した卵子の体外成熟率に影響を及ぼすことも明らかにした。さらに、摘出した卵巣からより多くの卵胞を確保することを目的に、卵巣組織片の体外培養における卵胞の成長に及ぼす分化成長因子(GDF-9)および血管内皮成長因子(VEGF)の添加効果について検討した(第3章)。ヒト組換えGDF-9およびVEGF存在下で凍結融解したイヌ卵巣片を培養し、卵胞の発育段階を検索した結果、単位面積あたりの卵胞数が成長因子を添加していない対照と比較して、一次卵胞、二次卵胞および前胞状卵胞で有意に多い成績であった。これらの結果は、卵巣片の体外培養におけるGDF-9およびVEGFの添加は、卵胞の成長を促進する効果があることを示している。

以上、本研究においては、イヌ未成熟卵子の体外培養に対して有効な新たな培養系を提供するとともに、卵巣片の器官培養系を開発した。今後、これらの系の活用によってイヌにおける生殖工学技術の開発が進展するとともにイヌの繁殖生理の理解がより深まるものと期待される場所である。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Effect of bovine cumulus-oocyte complexes-conditioned medium on in-vitro maturation of canine oocytes  
著 者 名 : Abdel-Ghani, M.A., Abe, Y., Asano, T., Hamano, S. and Suzuki, H.  
学術雑誌名 : Reproductive Medicine and Biology  
巻・号・頁・発行年 : 10 (1) : 43-49, 2011
- 2) 題 目 : *In vitro* maturation of canine oocytes co-cultured with bovine and canine granulosa cell monolayers  
著 者 名 : Abdel-Ghani, M.A., Shimizu, T., Asano, T. and Suzuki, H.  
学術雑誌名 : Theriogenology  
巻・号・頁・発行年 : 77 (2) : 347-355, 2012

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Vitriification of canine cumulus-oocyte complexes in DAP213 with a cryotop holder  
著 者 名 : Abe, Y., Asano, T., Ali, M. and Suzuki, H.  
学術雑誌名 : Reproductive Medicine and Biology  
巻・号・頁・発行年 : 9 (2) : 115-120, 2010
- 2) 題 目 : Cryopreservation of canine embryos  
著 者 名 : Abe, Y., Suwa, Y., Asano, T., Ueta, Y. Y., Kobayashi, N., Ohshima, N., Shirasuna, S., Abdel-Ghani, M. A., Oi, M., Kobayashi, Y., Miyoshi, M., Miyahara, K. and Suzuki, H.  
学術雑誌名 : Biology of Reproduction  
巻・号・頁・発行年 : 84(2) : 363-368, 2011

- 3) 題 目 : Effect of graft site and gonadotrophin treatment on follicular development of canine ovarian grafts transplanted to NOD-SCID mice  
著 者 名 : Abdel-Ghani, M.A., Abe, Y., Asano, T. and Suzuki, H.  
学術雑誌名 : Reproductive Medicine and Biology  
卷・号・頁・発行年 : 10 (4) : 259-266, 2011