

称号及び氏名 博士（獣医学） 大村 雅

学位授与の日付 平成24年3月31日

論文名 イヌ卵子の発育・成熟技術の改良に関する研究

論文審査委員 主査 稲葉 俊夫

副査 玉田 尋通

副査 中村 洋一

副査 杉浦喜久弥

論文要旨

緒言

前世紀には、遺伝子組換え技術、クローン技術、および胚性幹細胞（ES細胞）の樹立技術等が開発され、現在も急速に発展しつつある生命科学の進展に大きく貢献した。これらの技術の多くはマウスにおいて高い完成度を見ているが、その他の動物種、特に、大型・中型の実験動物では、上記の技術を実用的に利用することは依然として困難である。近年、イヌについてのゲノムの解析が完了し、イヌはマウスよりもヒトに近い遺伝子を持っていることが明らかにされた。また、イヌはヒトと類似した癌の自然発症がみられる唯一の動物種であることから、疾病研究、臨床応用、実験モデル等に多くの需要がある。しかしながら、発情休止期間が長く、年に1~2回の繁殖期をもつイヌ特有の繁殖生理学的特徴から、イヌにおける細胞工学的技術の開発は遅れている。現在、イヌ受精卵を用いたES細胞の樹立、優秀な盲導犬の遺伝子保護、イヌ科希少動物保護等において、雄および雌イヌの優良遺伝子を有効に利用する体外受精が重要視されている。体外受精の成功率を高めるには、多くの良質な成熟卵子が必要となる。

一般に、成熟卵子を得る方法として、発情誘起処置により体内で成熟させた卵子を回収する方法（体内成熟法）と、卵巣から未成熟な卵子を採取し、体外成熟（IVM）によって成熟卵子を得る方法があるが、いずれの方法でも、イヌの成熟卵子を得ることは極めて困難であり、他の動物種で確立されている技術をそのままイヌに応用することはで

きない。

そこで本研究では、イヌ卵子の体内成熟促進技術および体外成熟技術の改良を目的として、性腺刺激ホルモン放出ホルモン類似体 (**GnRH-A**) の徐放剤 (**GnRH 徐放剤**) を用いた発情誘起による体内卵子の発育促進、性腺刺激ホルモンの体外成熟卵への影響、およびコラーゲン・ゲルによる三次元培養卵子の体外成熟への影響について検討した。

第1章 発情誘起によるイヌ体内卵子の発育促進

非発情期のイヌにおける卵巣内卵子の発育・成熟促進には、発情を誘起する方法が用いられる。この方法として、従来、黄体形成ホルモン (**LH**) とほとんど同様の生物学的作用を持つヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (**hCG**)、および強い卵胞刺激ホルモン (**FSH**) 作用と弱い **LH** 作用を持つ妊馬血清性性腺刺激ホルモン (**PMSG**) 等を用いて試みられてきたが、正常な妊娠・出産を伴う発情誘起の成功率は非常に低い。この理由として **PMSG** の長期投与により、エストラジオール (**E₂**) が大量に分泌される結果、卵子の卵管通過を早め、卵管内での卵子の発育・成熟が阻害されることが想定されている。本章では下垂体ホルモン系とは異なる **GnRH 徐放剤** を用いてイヌ卵子の体内成熟促進を試みた。

第1節 **GnRH 徐放剤**による雌イヌの性成熟促進

雌イヌは通常 **7~12** カ月で初回発情を迎えるが、これを過ぎても発情のみられない個体に **GnRH 徐放剤** を用いて性成熟の促進を試みた。

生後 **1** 年を過ぎても発情のみられない未成熟イヌに、体重 **1 kg** 当たり **100 μg** の **GnRH 徐放剤** を **1** 回投与し、その後、発情が誘起された日に排卵を促進するために体重 **1 kg** 当たり **3 μg** の **GnRH-A** を投与して雄イヌと交配した。分娩に至るまでの観察期間中、継時的に血中 **E₂** および **progesterone (P)** 濃度を測定した。その結果、**GnRH 徐放剤** 投与後約 **10** 日に、ほとんどのイヌが発情を開始し、そのうちの **83%** が正常な妊娠および分娩に至った。妊娠した個体の血中ホルモン動態は、自然発情のものと同様であった。一方、妊娠しなかった個体では血中 **P** 濃度の上昇期間が短いことがわかった。

以上の結果より、**GnRH 徐放剤** は性成熟の開始が遅延している雌イヌに発情を誘起させ、卵子の体内発育・成熟を促進させるのに有用であることが示唆された。

第2節 **GnRH 徐放剤**と **Prostaglandin F_{2α}**の併用による雌イヌの次回発情回帰の短縮

成熟したイヌにおける卵子の体内成熟促進法としては、雌イヌの発情が年に **1~2** 回のために、発情を人為的に誘起することが試みられてきた。本節では、発情休止期の雌イヌに **prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α})** を投与して黄体期間を短縮させ、その後に **GnRH 徐放剤** を用いて、発情回帰の短縮を試みた。

発情休止期の雌イヌに、排卵後 **15** 日または **30** 日より、体重 **1 kg** 当たり **250 μg** の

PGF_{2α}を1日2回、4日間連日投与した。**PGF_{2α}**投与開始後50日に前節と同量の**GnRH**徐放剤を1回投与し、その後、発情が誘起された日に**GnRH-A**を投与して雄イヌと交配した。分娩に至るまでの観察期間中、継時的に血中**P**濃度を測定した。その結果、**PGF_{2α}**投与開始後血中**P**濃度は急激に減少し、処置終了時には基底値まで減少した。**PGF_{2α}**処置開始後50日に**GnRH**徐放剤を投与すると、発情の回帰が観察され、発情間隔は有意に短縮された。発情誘起時に雄イヌとの交配により、排卵後15日または30日に**PGF_{2α}**を処置開始した群では、それぞれ71%および83%のイヌが妊娠し、正常子イヌを分娩した。

以上の結果より、発情休止期の雌イヌに**PGF_{2α}**を投与することにより、黄体の早期退行を引き起こすことが可能であり、その後、**GnRH**徐放剤を併用することにより、次回発情開始を早めてイヌ卵子の体内発育・成熟を促進できることが明らかとなった。

第2章 イヌ卵子の体外成熟に及ぼす性腺刺激ホルモンの影響

哺乳類の卵子は、その周囲の卵丘細胞と複合体(**COCs**)を形成し、卵丘細胞からエネルギーの供給や、代謝産物の交換を受け、その発育は**FSH**や**LH**などの性腺刺激ホルモンによって促進されると考えられている。しかし、イヌ**COCs**における**FSH**受容体(**FSHR**)および**LH**受容体(**LHR**)の発現動態や、**IVM**における**FSH**および**LH**の効果の有無については未だよく分かっていない。

本章では**IVM**の改善を目的として、イヌ卵丘細胞の**FSHR**および**LHR**の発現を調べた。また、**FSH**および**hCG**を**IVM**培地に添加し、卵子の**IVM**の効率について検討した。

第1節 卵丘細胞における性腺刺激ホルモンレセプターの発現

イヌ卵丘細胞における**FSHR**と**LHR**の発現について調べた。

非発情期のイヌ卵巣から**COCs**を回収した。本**COCs**を**FSH**含有**M199**培地で12~48時間培養した後、卵丘細胞を回収した。本卵丘細胞から**total RNA**を抽出し、リアルタイム**PCR**法により、**FSHR**および**LHR**の**mRNA**発現量を調べた。その結果、イヌ卵丘細胞において、**FSHR**および**LHR**の発現が認められた。**FSHR**の発現量は培養12時間後と比較し、培養36時間後で有意に増加した。また、**LHR**の発現量は培養12および24時間後と比較し、培養48時間後で増加する傾向がみられた。

以上の結果より、イヌ卵丘細胞において、**FSH**を含む培地で培養することで、**FSHR**の増加とそれに続く**LHR**の増加が確認できた。

第2節 卵子の体外成熟に及ぼす性腺刺激ホルモンの影響

本節では、第1節の知見を応用し、**FSH**および**LH**が卵子の核成熟に及ぼす影響について検討した。

非発情期のイヌ卵巣から **COCs** を回収し、**10%FBS** 含有 **M199** 培地に **FSH** を添加して培養した。**24** 時間後、培地交換の際に **FSH** を添加(**FSH** 群)、あるいは **FSH** に加えて **hCG** を添加(**FSH+ hCG** 群)し、さらに培養した。合計 **48** あるいは **72** 時間培養後、**COCs** の直径を計測し、オルセイン染色により卵子の核成熟を比較した。その結果、**COCs** の直径は、**48** 時間培養した群と比較し、**72** 時間培養した群で有意に増加した。また、成熟(**MII**)卵子の割合は、**FSH** 群と比較し、**FSH+hCG** 群で増加する傾向にあった。

以上の結果より、**FSH**、**LH** などの **2** ステップの培養方法だけでは、卵子の核成熟率の大きな改善に繋がらないために、更なる培養方法の検討が必要であると考えられた。

第 3 章 イヌ卵子の体外発育・体外成熟に及ぼす三次元培養の影響

現在、多くの哺乳動物において **IVM** 後に核成熟しているにも関わらず、受精やその後の発生能力が体内で成熟した卵母細胞よりも劣る原因として、細胞質の発育不十分が挙げられている。本章では、前章の知見を応用し、**IVM** の前に卵巣から回収した卵母細胞を **FSH** および核成熟抑制因子の **hypoxanthine (HX)** を用いて体外発育 (**IVG**) させることを試みた。

第 1 節 卵子の体外発育に及ぼす三次元培養および **Hypoxanthine** の影響

イヌ **COCs** の立体構造を長期間保ち、卵母細胞を大きく発育させるために、コラーゲン・ゲルによる三次元培養を行い、**HX** 添加が卵母細胞の **IVG** に及ぼす影響について検討した。

非発情期のイヌ卵巣から未成熟卵母細胞を回収し、コラーゲン・ゲルに包埋した。**10 %FBS** 含有 **M199** 培地に **0~4 mM** の **HX** を添加した培養液を重層し、**7** 日間培養した。培養後、卵母細胞の直径、生存率、卵丘細胞付着卵子率、卵母細胞の核成熟を比較した。その結果、三次元培養により **COCs** の形態は培養期間中保持され、卵母細胞の直径は培養後で有意に増加した。卵丘細胞付着卵子および卵核胞 (**GV**) 期の割合は **HX 4 mM** 添加群で有意に高値を示した。

以上の結果より、**HX** 存在下のコラーゲン・ゲルによる三次元培養では、**COCs** の立体構造を長期間維持し、卵母細胞の発育に有効であることが示唆された。

第 2 節 三次元培養卵子の体外発育に及ぼす卵胞刺激ホルモンの影響

HX を添加した状態で **FSH** が **IVG** に及ぼす影響について検討した。

前節と同様に、卵母細胞をコラーゲン・ゲルに包埋し、**4 mM** の **HX** と **0~5 µg/ml** の **FSH** を添加した培養液で、**7** 日間培養した。培養後、生存率、卵丘細胞付着卵子率、核成熟を比較した。その結果、**FSH** 添加により、卵丘細胞付着卵子の割合は有意に高値を示し、卵胞様の構造 (疑似卵胞) が観察された。また生存率および **GV** 期の割合に

は、**FSH** 添加による影響は認められなかった。

以上の結果より、培養液に **HX** を添加することで、卵母細胞の核の成熟を **GV** 期の状態に保ちながら、その細胞質の発育を促進させ、さらに、**FSH** を添加することで疑似卵胞を作製できることが分かり、**HX** と **FSH** はより効果的に卵母細胞の発育を促進することが示唆された。

第3節 三次元培養した体外発育卵子の体外成熟

第1および2節で得られた知見をもとにして、三次元体外発育培養が体外成熟の改善につながるかを検討した。

非発情期のイヌ卵巣から回収した卵母細胞を、**FSH** および **hCG** 含有培地で **48** 時間 **IVM** した群 (**IVM** 群) と、**HX 4 mM** および **FSH 0.5 µg/ml** 添加培養液で **7** 日間コラーゲン・ゲル前培養後に **IVM** した群 (**IVG+IVM** 群) の核成熟を比較した。その結果、**MII** 卵子の割合は **IVG+IVM** 群で有意に高値を示した。

以上の結果より、三次元培養による卵母細胞の発育は、その後の核成熟に効果的であることが示唆された。

総括

イヌ卵子の体内および体外における発育・成熟技術の改良を目的として、**GnRH** 徐放剤を用いた発情誘起による体内卵子の発育促進、性腺刺激ホルモンによる卵子の体外成熟への影響、および **FSH** を用いたコラーゲン・ゲルによる三次元培養卵子の体外発育・成熟法を検討し、以下のことを明らかにした。

1. **GnRH** 徐放剤は性成熟の開始が遅延している雌イヌに発情を誘起させ、卵子の体内発育・成熟を促進させるのに有用であることが示唆された。
2. 発情休止期の雌イヌに **PGF_{2α}** を投与することにより、黄体の早期退行を引き起こすことが可能であり、その後、**GnRH** 徐放剤を併用することにより、次回発情開始を早めて卵子の体内発育・成熟を促進できることが明らかとなった。
3. イヌ卵丘細胞において、**FSH** を含む培地で培養することで、**FSHR** の増加とそれに続く **LHR** の増加が確認でき、また体外成熟卵子を得る上で、**FSH** とそれに続く **hCG** の添加が有用と思われた。
4. 三次元培養は、**HX** と **FSH** の添加により、イヌ卵母細胞の発育を促進し、その後の核成熟率を増加することで、イヌ卵子の体外成熟に効果的であることが示唆された。

以上、本研究により、**GnRH** 徐放剤の投与および三次元培養法と組み合わせた **FSH** 処置により、イヌ卵子の体内発育・成熟の促進および体外成熟率の改善が期待できることが示唆された。今後、これらの基盤技術により、雌イヌの繁殖機能の人為的調節法の確立や体外受精技術の開発に新たな可能性が開けると考えられる。

審査結果の要旨

近年、イヌについてのゲノムの解析が完了し、イヌはマウスよりもヒトに近い遺伝子を持っていることが明らかにされた。また、イヌはヒトと類似した癌の自然発症がみられる唯一の動物種であることから、疾病研究、臨床応用、実験モデル等に多くの需要がある。しかしながら、発情休止期間が長く、年に**1~2**回の繁殖期をもつイヌ特有の繁殖生理学的特徴から、イヌにおける細胞工学的技術の開発は遅れている。現在、イヌ受精卵を用いた胚性幹細胞 (**ES** 細胞) の樹立、優秀な盲導犬の遺伝子保護、イヌ科希少動物保護等において、雄および雌イヌの優良遺伝子を有効に利用する体外受精が重要視されている。体外受精あるいはその研究を推進するには、多くの良質な成熟卵子 (卵細胞) が必要となる。

一般に、成熟卵子を得る方法として、発情誘起処置により体内で成熟させた卵子を回収する方法 (体内成熟法) と、卵巣から未成熟な卵子 (卵母細胞) を採取し、体外で発育・成熟させる方法 (体外成熟法) があるが、いずれの方法でも、イヌの成熟卵子を得ることは極めて困難であり、他の動物種で確立されている技術をそのままイヌに応用することはできない。

そこで本研究では、性腺刺激ホルモン放出ホルモン類似体の徐放剤 (**GnRH** 徐放剤) を用いた発情誘起による体内卵子の発育促進、卵子の体外成熟に及ぼす性腺刺激ホルモンの影響、および卵胞刺激ホルモン (**FSH**) を用いたコラーゲン・ゲルによる三次元培養卵子の体外発育・成熟法を検討し、以下の成果を得た。

1. **GnRH** 徐放剤は性成熟の開始が遅延している雌イヌに発情を誘起させ、卵子の体内発育・成熟を促進させるのに有用であることが示唆された。
2. 発情休止期の雌イヌに **prostaglandin F_{2α}** を投与することにより、黄体の早期退行を誘起することが可能であり、その後、**GnRH** 徐放剤を併用することにより、次回発情開始を早めて卵子の体内発育・成熟を促進できることが明らかとなった。
3. 培養イヌ卵丘細胞において、培地への **FSH** の添加は、**FSH** 受容体とそれに続く黄体形成ホルモン (**LH**) 受容体の遺伝子発現を増加したことから、**FSH** に続く **LH** の培地への添加が体外成熟卵子を得る上で有用と思われた。
4. 核成熟抑制因子の **hypoxanthine** と **FSH** を添加する三次元培養は、イヌ卵子の成熟発育を促進し、その後の核成熟率を増加することで、イヌ卵子の体外成熟に効果的であることが示唆された。

以上のように本研究では、**GnRH** 徐放剤の投与および三次元培養法と組み合わせた **FSH** 処置により、イヌ卵子の体内発育・成熟の促進および体外成熟率の改善が期待できることを実証した。本研究の成果に基づく雌イヌの繁殖機能の人為的調節法や体外受精技術の開発は、獣医学の発展のみならずヒト再生医学の発展にもつながるものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与すること

を適当と認める。