

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20380174

研究課題名（和文） 体外成熟卵胞由来イヌ ES 細胞の樹立と再生医療への応用

研究課題名（英文） Establishment of embryonic stem cell lines from *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes and their application to regenerative veterinary medicine

研究代表者

稲葉 俊夫 (INABA TOSHIO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00137241

研究成果の概要（和文）：イヌ卵子の発育・成熟促進、および体外受精から胚性幹細胞（ES 細胞）の樹立、および再生医療への応用を目的に検討し、以下の成果を得た。①雌イヌの性成熟の促進および次回発情回帰の短縮により卵子の発育・成熟を促進できた。②イヌ卵子をコラーゲン・ゲル中で培養することにより、体外成熟率が改善できた。③子宮内胚盤胞期胚の内部細胞塊から分離したイヌ ES 様細胞コロニーは 10 継代程度まで未分化な状態を維持できた。④サル ES 細胞を代用して神経細胞へ簡便に分化誘導できた。⑤骨髄間質細胞を代用した脊髄損傷イヌの細胞治療により、その安全性と有効性を評価したが、ES 細胞の利用についてはさらに検討が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to establish embryonic stem (ES) cell lines from *in vitro* matured and fertilized dog oocytes for regenerative veterinary medicine, and the following results were obtained. ①We successfully enhanced oocyte growth and maturation by controlling the induction of fertile oestrus in immature and dioestrous bitches. ②The *in vitro* maturation rate of canine oocytes was improved by embedding and culturing in collagen gels. ③Canine ES-like cell colonies were formed by culturing inner cell masses collected from blastocysts in uterine horns, and maintained their proliferation and morphology beyond passage 10. ④Neurons could be induced simply from primate ES cells. ⑤Bone marrow stromal cell transplantation caused no complications and could have beneficial effects on functional recovery of dogs with spinal cord injury, and further studies are required to apply canine ES cells for the treatment of these dogs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 臨床獣医学

キーワード：獣医学、トランスレーショナルリサーチ、バイオテクノロジー、移植・再生医療、発生・分化、ES 細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療が注目され、組織工学とい

う呼称も作られており、特に胚性幹細胞 (ES 細胞) はその多分化能から再生医療の主役となっている。ES 細胞は、胚盤胞期胚の内部細胞塊から分離したもので、培養液中で未分化状態を保ったまま増殖し続ける細胞で、あらゆる細胞に分化できる全能性、多分化能を持っている。これまでに実験小動物を用いた ES 細胞に関する基礎研究において、多くの優れた成果が報告されてきたが、とりわけ、ヒト ES 細胞が樹立されて以来 (Thomson *et al.* Science 1998;282:1145-7, Reubinoff *et al.* Nat Biotechnol 2000;18:399-404)、ES 細胞から作り出される組織細胞を移植することでさまざまな疾患の治療が可能になると期待されるようになってきた。しかしながら、ヒトにおけるこのような治療法の有効性、安全性については未知のものであり、実際の医療応用に際しては慎重なトランスレーショナル・リサーチ (基礎研究と臨床応用の橋渡しの研究) が必要とされる。

本研究は、ヒトと共通の生活習慣病が自然発症する唯一の動物種であり、性質が温厚で取り扱いが容易である等の利点があるイヌに着眼し、イヌの ES 細胞を増殖および維持させることを試み、本細胞を用いた再生医療を推進するものである。イヌ ES 細胞の樹立はまだ世界でも類がなく、マウスやサルの中間的な位置にあるイヌの研究データは、ES 細胞治療のヒト臨床応用への有効性を検討するための信頼性の高い情報を提供できるものとする。

ES 細胞を樹立するために必要となる胚盤胞期胚の供給源として、ウシやブタでは、卵巣に存在する胞状卵胞から卵核胞期 (GV 期) の卵子を採取し、体外成熟させた後、受精させて胚盤胞期胚を得ることができる。一方、イヌの発情はおよそ半年に 1 回で、胞状卵胞を得ることがきわめて難しい。イヌの卵巣には、数千から数十万もの卵母細胞が含まれているが、大部分は生殖に寄与することなく退行していく。そのために、イヌでは、卵巣から未成熟卵子を採取し、体外成熟および体外受精を行い、胚盤胞期胚にまで发育させる方法が期待されるが、これらの技術はいまだ確立されていない。そのために、本研究では、イヌ ES 細胞を樹立するために必要となる胚盤胞期胚を得るために、発情誘起による卵巣内卵子の发育・成熟を促進する技術、および避妊手術により摘出された卵巣内に存在する前胞状卵胞から作製する技術を開発する。

本研究の成果がもたらすイヌ卵子の体外成熟および体外受精技術の確立およびイヌ ES 細胞の樹立により、ヒトにおける再生医療の実用化を円滑に進め得るための有効性や安全性の情報が提供され、さらに、潜在的な遺伝子資源の高度利用が可能になれば、盲導犬等のヒトの生活補助犬の増産やイヌの再

生医療などさまざまな分野への応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト再生医療の実用化を円滑に進め得るトランスレーショナルリサーチの 1 つとして、ヒトと同様な生活習慣病の自然発症がみられるイヌに着目し、イヌ ES 細胞の樹立を行い、本細胞を用いてイヌの再生医療モデルを確立することを目的に、以下の項目について検討した。1) ES 細胞樹立に必要な胚盤胞期胚を、卵巣内卵母細胞から定常的かつ安定に供給できる方法の検討、2) イヌ ES 細胞の培養法の検討、3) ES 細胞から機能細胞への分化誘導と再生医療への応用の検討。

3. 研究の方法

(1) 発情誘起によるイヌ体内卵子の发育促進

①性成熟促進：雌イヌは通常、生後 1 年未満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、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) (100 μ g/kg bw) 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 GnRH-A (3 μ g/kg bw) を投与して雄イヌと交配した。

②次回発情回帰の短縮：発情休止期の雌イヌに排卵後 15 または 30 日より、PGF_{2 α} (250 μ g/kg bw) を 1 日 2 回、4 日間連日投与した。PGF_{2 α} 投与開始後 50 日に GnRH 徐放剤による発情誘起を行い雄イヌと交配した。

(2) 優良卵子の選別方法

①卵丘細胞の付着状態の Grade 分類：ネコ卵巣から未成熟卵子を回収し、卵丘細胞の付着状態により 2 つに分類した。各卵子を 30 時間体外成熟および 18 時間体外受精を行った。その後、卵丘細胞をはがし、0.3%ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 Only・one 培地で 6 日間、あるいは後半の 4 日間を 0.3%BSA の替わりに 5%ウシ胎児血清 (FBS) 含有培地で培養した。

②Brilliant cresyl blue (BCB) 染色法：ネコ未成熟卵子を、①と同様に Grade 分類し、さらに BCB 染色の陽性または陰性によって 4 群に分類した。体外成熟および体外受精後、①の FBS 含有培地と同じ条件で培養した。

(3) イヌ卵子の体外成熟に及ぼす性腺刺激ホルモンの影響

①非発情期のイヌ卵巣から卵子・卵丘細胞複合体 (COCs) を回収した。本 COCs を卵胞刺激ホルモン (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。リアルタイム PCR 法により、卵丘細胞の FSH レセプター (FSHR) および黄体形成ホルモン (LH) レセプター (LHR) の mRNA 発現量を調べた。

②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 に加えてヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (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、卵子の核成熟を比較した。

(4) 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

① 卵子の体外発育に及ぼす三次元培養および hypoxanthine (HX) の影響: 非発情期のイヌ卵巣から未成熟卵子を回収し、コラーゲン・ゲルに包埋した。10%FBS 含有 M199 培地に 0~4 mM の核成熟抑制因子の HX を添加した培養液を重層し、7 日間培養した。培養後、卵子の直径、生存率、卵丘細胞付着卵子率、卵子の核成熟を比較した。

② 三次元培養卵子の体外発育に及ぼす FSH の影響: ①と同様に、卵子をコラーゲン・ゲルに包埋し、4 mM の HX と 0~5 $\mu\text{g/ml}$ の FSH を添加した培養液で、7 日間培養した。

③ 三次元培養した体外発育卵子の体外成熟: 非発情期のイヌ卵巣から回収した卵子を、FSH および hCG 含有培地で 48 時間体外成熟した群 (体外成熟群) と、HX 4 mM および FSH 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 添加培養液で 7 日間コラーゲン・ゲル前培養後に体外成熟した群 (体外発育+体外成熟群) の核成熟を比較した。

(5) 胚盤胞期胚から ES 細胞の作製

① イヌ子宮から胚盤胞期胚を回収後、物理的に内部細胞塊を分離し、白血球抑制因子 (LIF) 添加培地を用いて、マウス胎子線維芽細胞 (MEF) と共培養した。

② 材料採取の簡便なネコ卵巣から未成熟卵子を回収し、30 時間体外成熟、18 時間体外受精を行った。体外受精後、5%FBS 含有 Only-one 培地で体外培養し、得られた胚盤胞期胚から内部細胞塊を分離して MEF と共培養した。

③ イヌ ES 細胞に適した培養方法を調べるために、イヌ胎子線維芽細胞に 4 つのヒト多能性関連転写因子 (Oct4、Sox2、Klf4 および c-Myc) を導入した iPS 細胞を代用して検討した。

(6) ES 細胞から神経細胞へ分化誘導の検討

① サル ES 細胞の培養と神経幹細胞への分化誘導: カニクイザル由来 ES 細胞株 (CMK6) を、霊長類 ES 細胞培養液を用いて、MEF と共培養した。形成した ES 細胞コロニーをアストロサイト培養上清中で浮遊培養を行った。その後、B27 培養液に移して接着培養を行い、増殖した細胞について神経幹細胞のマーカーを調べた。

② 神経幹細胞から神経系細胞への分化誘導: ①で得た細胞を、アストロサイト培養上清で継続して培養し、幼若ニューロンおよびアストロサイトのマーカーを調べた。一方、①で得た細胞を、B27 培養液にインスリン様成長

因子 I (IGF-I) を添加して培養し、オリゴデンドロサイト (OL) のマーカーを調べた。

(7) 骨髄間質細胞を利用した脊髄損傷イヌの治療

イヌ ES 細胞を利用した治療の予備実験として、骨髄間葉系幹細胞を含む骨髄間質細胞 (BMSC) を用いて検討した。

① 重度脊髄損傷を受傷後 1 週間以内で、感覚および運動機能を欠如した胸腰部椎間板ヘルニアのイヌを用いて、脊髄の減圧・整復術を行うとともに、自己の骨髄細胞を回収した。1~3 週間の培養により細胞を増殖させた後、椎間より脳脊髄液中へ細胞を移植し、運動機能の改善および副作用の有無について、術後 29~62 カ月間観察した。運動機能の評価は、Texas Spinal Cord Injury Scale 法を用いて行った。

② 胸腰部椎間板ヘルニアで、脊髄の減圧術後 1 カ月の時点で感覚および運動機能に改善の認められない慢性期の脊髄損傷イヌに対して、前記と同様にして自己の骨髄細胞を回収し、培養増殖後に脳脊髄液中へ移植し、運動機能の改善および副作用の有無について、術後 6 カ月間観察した。

4. 研究成果

(1) 発情誘起によるイヌ体内卵子の発育促進

① 性成熟の開始が遅延している雌イヌに GnRH 徐放剤投与後約 10 日で、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 progesterone (P) 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。

② 発情休止期の雌イヌに $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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 または 30 日に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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。

(2) 優良卵子の選別

ネコ卵巣から回収した未成熟卵子の胚盤胞期胚への発生率は、卵丘細胞の付着状態の良い、BCB 染色陽性卵子 (図 1) を 0.3% BSA 含有 Only-one 培地で 2 日間、その後 5% FBS 含有培地で 4 日間培養した群で最も高く、約 20% を示した。これより、優良卵子の選別法として Grade 分類に加えて BCB 染色法が有用である

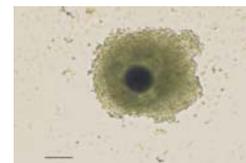


図 1 BCB 染色陽性卵子

ことが示唆された。

(3) イヌ卵子の体外成熟に及ぼす性腺刺激ホルモンの影響

① 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。

② 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+hCG 群で増加する傾向にあったが、5%にも及ばなかった。

(4) 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

① 三次元培養により COCs の形態は培養期間中保持され、卵子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。

② 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(図2))が観察された。

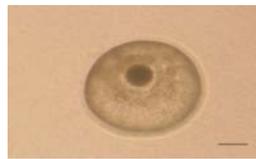


図2 疑似卵胞

③ MII 卵子の割合は体外発育+体外成熟群で有意に高値(15%以上)を示した。

(5) 胚盤胞期胚からES細胞の作製

① イヌ脱出胚盤胞期胚の内部細胞塊を分離して培養を行った結果、細胞質が少なく、核の占める割合が多い、マウスとヒトES細胞の中間的な形態を示すコロニー(図3)が約68%の効率で得られ、10継代程度まで未分化な状態を維持できた。

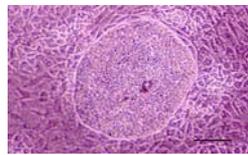


図3 ES様細胞コロニー

② ネコの胚盤胞期胚から内部細胞塊を分離して培養を行った結果、細胞間境界が明瞭で、核に対して細胞質が少なく核小体が明瞭な、ヒトES細胞に類似した形態を示すコロニーが約25%の効率で得られたが、3継代を過ぎると変性・死滅して、培養を継続することが困難となった。

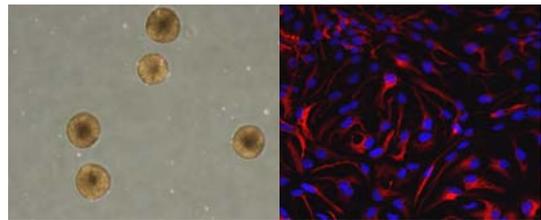
③ イヌiPS様細胞コロニー(図4)は、MEFをフィーダー細胞としてノックアウト血清代替物(KSR)含有ES培地で25継代以上まで維持できた。



図4 iPS様細胞コロニー

(6) ES細胞から神経幹細胞へ分化誘導の検討

① サルES細胞の培養と神経幹細胞への分化誘導：サルES細胞コロニーをアストロサイト培養上清中で10日間浮遊培養した際、神経幹細胞類似の浮遊細胞塊(neurosphere)を形成した(図5)。その後、B27培養液に移して14日間接着培養すると神経幹細胞マーカーであるnestinに陽性(図6)を示した。

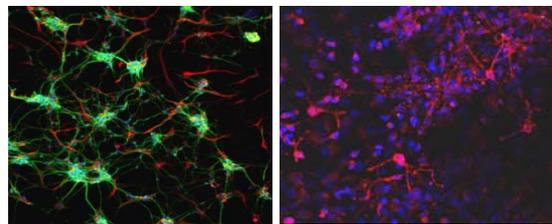


(図5) neurosphere (図6) nestin 陽性

② 神経幹細胞から神経系細胞への分化誘導：

① の nestin 陽性細胞は、アストロサイト培養上清で培養することで幼若ニューロンやアストロサイトのマーカーである Class III β -tubulin (Tuj 1)、および glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性を示した(図7)。

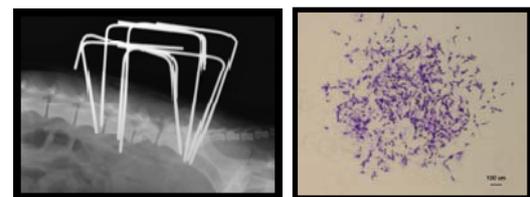
一方、nestin 陽性細胞は、B27 培養液に IGF-I を添加して培養することで、OL のマーカーである O4 陽性を示した(図8)。



(図7) Tuj 1 陽性(緑) (図8) O4 陽性 GFAP 陽性(赤)

(7) 骨髄間質細胞を利用した脊髄損傷イヌの治療

① 早期に脊髄減圧固定術(図9)とBMSC(図10)治療を行った7例中2例は歩行可能となり、全例で観察期間中に感覚機能の改善は見られなかったが、副作用も認められなかった。



(図9) 脊髄減圧固定術 (図10) 骨髄間質細胞

② 慢性期にBMSC治療を行った10例中6例は、投与後約2カ月で歩行可能となり、1例は感覚機能を改善し、非投与群と比較して、運動機能スコアの有意な上昇が観察された。一方、非投与群の13例中2例は歩行可能となったが、感覚機能の改善は認められなかった。

本研究の結果より、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、イヌES細胞の作製、およびサルES細胞から選択的に神経系細胞へ分化誘導することに成功した。さらに、骨髄間質細胞を代用した脊髄

損傷イヌの細胞治療により、その安全性と有効性を評価したが、イヌ体外成熟卵から ES 細胞の作製や ES 細胞の臨床応用については、今後、さらに検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ①Nishida H, Shoji Y, Nakamura M, Hatoya S, Sugiura K, Yamate J, Kuwamura M, Kotani T, Nakayama M, Suzuki Y, Ide C, Inaba T. Methods for cell harvesting and the biological properties of canine bone marrow stromal cells at successive passages. *Am. J. Vet. Res.* 査読有、2012、印刷中. DOI:10.2460/ajvr.72.8.1118
- ②Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Harada Y, Suzuki Y, Ide C, Inaba T. Safety of autologous bone marrow stromal cell transplantation in dogs with acute spinal cord injury. *Vet. Surg.* 査読有、2012、印刷中. DOI:10.1111/j.1532-950X.2011.00959.x
- ③Pathirana IN, Yamasaki H, Kawate N, Tsuji M, Büllersbach EE, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. Plasma insulin-like peptide 3 and testosterone concentrations in male dogs: changes with age and effects of cryptorchidism. *Theriogenology* 査読有、77 巻、2012、550-557. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.08.030
- ④Pathirana IN, Kawate N, Tsuji M, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. In vitro effects of estradiol-17 β , monobutyl phthalate and mono-(2-ethyl hexyl) phthalate on the secretion of testosterone and insulin-like peptide 3 by interstitial cells of scrotal and retained testes in dogs. *Theriogenology* 査読有、76 巻、2011、1227-1233. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.05.027
- ⑤Ohmura M, Torii R, Hatoya S, Sugiura K, Tamada H, Kawate N, Takahashi M, Sawada T, Inaba T. Induction of fertile oestrus in dioestrous bitches by prostaglandin F2 α and a GnRH-agonist. *Vet. Rec.* 査読有、168 巻、2011、669. DOI:10.1136/vr.d1183
- ⑥Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Suzuki Y, Ide C, Inaba T. Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cell into the cerebrospinal fluid

for treatment of chronic spinal cord injury in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 査読有、72 巻、2011、1118-1123.

DOI:10.2460/ajvr.72.8.1118

⑦Pathirana IN, Ashida Y, Kawate N, Tanaka K, Makoto T, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. Comparison of testosterone and insulin-like peptide 3 secretions in response to human chorionic gonadotropin in cultured interstitial cells from scrotal and retained testes in dogs. *Anim. Reprod. Sci.* 査読有、124 巻、2011、138-144. DOI:10.1016/j.anireprosci.2011.02.014

⑧Sugiura K, Wijewardana V, Fujimoto M, Akazawa T, Yahata M, Mito K, Hatoya S, Inoue N, Inaba T. Effect of IL-12 on the canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 査読有、137 巻、2010、322-326.

DOI:10.1016/j.vetimm.2010.06.006

⑨Tamada H, Kawate N, Kawata N, Inaba T, Kida K, Hatoya S, Akune A, Nakama K, Kohsaka T, Sawada T. Detection of relaxin mRNA in the corpus luteum, uterus, and uterine cervix in the bitch. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有、72 巻、2010、1383-1386. DOI:10.1292/jvms.09-0485

⑩Mito K, Sugiura K, Ueda K, Hori T, Akazawa T, Yamate J, Hatoya S, Inaba M, Inoue N, Ikehara S, Inaba T. INF γ markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. *Cancer Res.* 査読有、70 巻、2010、7093-7101. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0600

⑪Pathirana IN, Tanaka K, Kawate N, Tsuji M, Kida K, Hatoya S, Inaba T, Tamada H. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 3' region of the estrogen receptor 1 gene in normal and cryptorchid miniature dachshunds and chihuahuas. *J. Reprod. Dev.* 査読有、56 巻、2010、405-410.

DOI:http://dx.doi.org/10.1262/jrd.09-195T

⑫Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N. Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. *PLoS One* 査読有、4 巻、2009、e6318. DOI:10.1371/journal.pone.0006318. g001

⑬Hatoya S, Sugiyama Y, Nishida H, Okuno T, Torii R, Sugiura K, Kida K, Kawate N, Tamada H, Inaba T. Canine oocyte

maturation in culture: significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. Theriogenology 査読有、71 巻、2009、560-567.

DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.08.013

⑭ Sugiura K, Akazawa T, Fujimoto M, Wijewardana V, Mito K, Hatoya S, Taketani S, Komori M, Inoue N, Inaba T. Construction of an expression vector for improved secretion of canine IL-18. Vet. Immunol. Immunopathol. 査読有、126 巻、2008、388-391. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.07.011

〔学会発表〕(計 12 件)

①稲葉俊夫、ネコ受精卵の体外培養法の改善、第 137 回日本生殖医学会関西支部集談会、2012 年 3 月 3 日、大阪

②稲葉俊夫、イヌ ES 細胞の研究から再生獣医療に向けて、第 17 回滋賀県獣医学会(招待講演)、2012 年 2 月 26 日、滋賀

③稲葉俊夫、イヌ骨髄間質細胞の神経幹細胞に及ぼす影響、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 20 日、大阪

④稲葉俊夫、ES 細胞の樹立に向けたネコ受精卵の体外培養法に関する研究、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 20 日、大阪

⑤稲葉俊夫、イヌ顆粒球減少症に向けたイヌ造血因子の作製、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 19 日、大阪

⑥稲葉俊夫、FSH および hCG によるイヌ卵子の体外成熟率の改善、第 136 回日本生殖医学会関西支部集談会、2011 年 3 月 5 日、大阪

⑦稲葉俊夫、サル ES 細胞からのオリゴデンドロサイトへの簡便な分化誘導法、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 16 日、北海道

⑧鳩谷晋吾、再生医療の最前線—幹細胞：犬 ES 細胞(胚性幹細胞)の開発、2010 年 3 月 26 日、第 149 回日本獣医学会学術集会(招待講演)、東京

⑨稲葉俊夫、ES 細胞によるパーキンソン病モデル動物の治療に関する基礎的研究、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 26 日、東京

⑩稲葉俊夫、イヌ骨髄間質細胞の継代に伴う特性変化、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 27 日、鳥取

⑪稲葉俊夫、コラーゲン・ゲルを用いたイヌ卵母細胞の体外発育、2009 年 3 月 14 日、第 134 回日本生殖医学会関西支部集談会、大阪

⑫稲葉俊夫、コラーゲン・ゲル培養イヌ卵母細胞の体外発育に及ぼす hypoxanthine と FSH の影響、2008 年 9 月 24 日、第 146 回日本獣医学会学術集会、宮崎

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：腫瘍治療用組成物およびその応用

発明者：杉浦喜久弥、水戸 凱、稲葉俊夫

権利者：公立大学法人大阪府立大学

種類：特許

番号：特願 2008-143465 号、特開 2009-13166 号

出願年月日：平成 20 年 5 月 30 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyoindb.acs.osakafu-u.ac.jp/profile/out.cudjDYHfHMO.PEVGDxV-iw==.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 俊夫 (INABA TOSHIO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：00137241

(2) 研究分担者

杉浦 喜久弥 (SHUGIURA KIKUYA)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30171143

鳩谷 晋吾 (HATOYA SHINGO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：40453138

桜川 宣男 (SAKURAGAWA NORIO)

北里大学・医療衛生学部・研究員

研究者番号：70183374

鳥居 隆三 (TORII RYUZO)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：50106647

玉田 尋通 (TAMADA HIROMICHI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：10155252

川手 憲俊 (KAWATE NORITOSHI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：80221901

喜田 加世子 (KIDA KAYOKO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：50405362

谷 浩行 (TANI HIROYUKI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00305658

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：