



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	捕殺個体を利用したエゾヒグマ (<i>Ursus arctos yeasoensis</i>) の繁殖および栄養状態評価に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	森脇, 潤
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第13071号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70464
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jun_MORIWAKI_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学） 氏名：森 脇 潤

審査委員	主査	教授	坪 田 敏 男
	副査	教授	片 桐 成 二
	副査	准教授	下 鶴 倫 人
	副査	自然環境部長	間 野 勉

(北海道立総合研究機構 環境・地質
研究本部 環境科学研究センター)

学位論文題名

捕殺個体を利用したエゾヒグマ (*Ursus arctos yezoensis*) の
繁殖および栄養状態評価に関する研究

エゾヒグマ (*Ursus arctos yezoensis*) は北海道に生息する最大の陸生哺乳類である。地域個体群の個体群動態の詳細は明らかにされていないが、個体数は増加しており、農作物被害や都市への出没といった人とエゾヒグマの軋轢は年々増大している。本年度には、北海道における人とエゾヒグマの軋轢の低減と地域個体群の存続を目指してエゾヒグマ管理計画が策定された。北海道の適正な保護管理に向けて、エゾヒグマの生態、行動、生理、疾患、人とエゾヒグマの関係等に関連する科学的情報の蓄積が必要である。特に、栄養状態と繁殖との関連性として、冬眠前の栄養状態が雌エゾヒグマの繁殖の成功や失敗を決める要因とされており、エゾヒグマの栄養状態や繁殖を正確に推定する有用な手法が求められている。本研究では、捕殺個体を利用してエゾヒグマの繁殖および栄養状態を評価することを目的とした。

第一章では、繁殖パラメータの年次変化を詳細に調べた。2010年から2013年の間に、北海道で有害駆除により捕殺されたエゾヒグマの雌性生殖器を用いた。まず、卵巢から黄体 (CL) および子宮角から胎盤痕 (PS) の有無および数を調べた。次に、輪郭や色調による形状に基づき、PS を 0-5 の段階にスコア分類した。スコア分類により、当歳子を連れていることから当年出産と判定したものと、1歳子を連れていることから前年出産と判定したものの関連を明確にした。これにより、全128頭の観察から、それぞれの繁殖カテゴリーは44頭が当年出産、39頭が前年出産、45頭が2年を超えて出産していない単独個体の3つに分けられた。排卵数は 2.21 ± 0.55 (平均 $\pm$ SD、以下同様)、着床数は 1.91 ± 0.74 、連れ子数は $1.54 \pm$

0.51 と求められた。2011-2012 年の間で着床数が排卵数に比べて有意に少なかった。エゾヒグマには着床前後の胚消失あるいは胎子死が起こっていることが強く示唆された。PS および CL の体系的な観察から、エゾヒグマの繁殖歴並びに繁殖パラメータを推定し、それらの年次変化を明らかにした。

第二章では、性差や成長を考慮しつつ、エゾヒグマの胸囲と体重から栄養状態を評価する方法を検討した。1991-2012 年に北海道で捕殺されたエゾヒグマを対象に、胸囲と体重から栄養状態を評価する方法を確立し、性別、月別、年次別および連れ子状況別に栄養状態を比較した。体重が計測されていない場合、胸囲から体重を推定した。体重の測定値および推定値を合わせて、年齢毎に体重を推定する成長曲線から平均漸近体重（雄で 247 kg、雌で 110 kg）と 95%漸近体重時の年齢（雄で 13.3 歳、雌で 6.7 歳）を求めた。エゾヒグマの栄養状態指標値を、捕殺時の体重から成長曲線で推定した標準体重を減じて (kg) 推定したところ、雄で栄養状態指標値は夏に低下し、雄雌の両方で過食期にあたる秋に高まる季節変化を示した。また、栄養状態指標値の年次変化が認められた。一方、単独雌と連れ子を有する雌（当歳子、1 歳子、あるいは連れ子年齢が不明）の間での栄養状態指標値に有意な差は認められなかった。性差や成長を考慮しつつエゾヒグマの胸囲と体重を用いて栄養状態を評価する本手法は、年次差や季節差を調べるのに有用であることが分かった。ただし、本研究では連れ子の目撃情報に基づく繁殖状況が、捕殺時点であることに留意する必要がある。出産したのに子殺しや餓死によって単独雌とみなされることがあるためである。

以上、本研究により、捕殺個体を利用した繁殖履歴や栄養状態の評価法を確立し、その上で繁殖パラメータや栄養状態の変化に関して基礎的な知見を得ることができた。本手法を使うことにより、狩猟や有害駆除から得られた個体について、繁殖履歴や栄養状態を個体毎に評価できることがわかった。さらに、エゾヒグマの保護管理の適正化に役立てることができる知見を提供している。よって審査員一同は、上記学位論文提出者森脇 潤氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：石井千尋

審査委員	主査	教授	石塚真由美
	副査	教授	坪田敏男
	副査	准教授	市居修
	副査	准教授	池中良徳

学位論文題名

Evaluation of the lead exposure situation in wild birds and
identification of novel avian renal biomarkers

（国内に生息する鳥類における鉛汚染状況の解明と、
鳥類種横断的に利用可能な新規腎障害マーカーの探索）

本研究では、鳥類保全を最終目的とし、日本全国の猛禽類および水鳥における鉛汚染状況と汚染原因の解明と、海鳥における金属蓄積特性の解明、および臨床応用を目指しての鳥類に有用な新規腎障害マーカーの探索を行った。

北海道では鉛弾使用規制がなされているにも関わらず、希少種であるオオワシやオジロワシにおいて未だに被害が生じている。本研究より、鉛安定同位体比の結果から、その原因が違法に使用されている鉛ライフル弾や鉛散弾であることが示された。さらに、本州以南の地域では、鉛弾使用規制がごく一部の地域に限られており、鉛中毒があまり問題視されていなかったが、絶滅が危惧されているイヌワシをはじめとした猛禽類種が鉛に曝露されていることが明らかとなり、中には鉛中毒と診断される高濃度の鉛が検出された個体も認められた。水鳥においても、北海道内だけではなく、茨城県でハクチョウが次々と死亡した際にも、胃内からの鉛散弾の検出と、肝臓中の高濃度の鉛蓄積濃度が確認されたことから、猛禽類と同様に全国的に鉛弾による被害を受けている可能性が考えられる。

また本研究において骨における鉛分布を分析した結果、骨の構造の違いや骨髄の有無によって鉛の蓄積過程が異なることが明らかとなり、鳥類の鉛曝露評価における骨の有用性を提示した。急性曝露の場合は、海綿骨主体であり、かつ骨髄を含有する骨において鉛蓄積が特に大きくなる可能性が高い。そして慢性曝露の場合は、皮質骨主体の骨においても鉛濃度が高くなると考えられる。各種骨における鉛蓄積を解析し、比較することで、急性や慢性などの曝露状況や、曝露時期の推定に役立つと思われる。

ベーリング海の水鳥に関して本研究の結果を既報と比較した結果、全種で水銀濃度が約2倍に上昇しており、ベーリング海において水銀汚染が進行している可能性が示唆された。また栄養段階の指標である窒素安定同位体比や食性を示す炭素安定同位体比と、水銀の蓄積濃度との

間に高い相関が認められ、海鳥における水銀蓄積が食性に由来し、水銀が生物濃縮されていることが示された。天売島の鳥類において初の調査となった金属汚染の実態把握では、他地域の同種と比較して金属類の蓄積濃度が低く、現時点では天売島周辺の海域において金属汚染による鳥類への影響は少ないと考えられる。これまで天売島に生息する海鳥を対象とした金属類の汚染調査は行われておらず、本研究は、渡り鳥の重要な繁殖地である天売島における、海鳥の金属蓄積の基礎データを提供した。

これら金属をはじめとする環境汚染により障害を受ける腎臓のマーカー探索では、2 種の腎毒性薬剤（ジクロフェナク、シスプラチン）を用い、ニワトリにおいて異なる 2 タイプの腎障害モデルの作製を試みた。バイオマーカー探索のための網羅的糖鎖解析の結果、血漿中から 40 種類の N 型糖鎖が検出され、特にジクロフェナク投与群ではコントロール群と比較して 14 種の糖鎖で投与後の発現増加が認められた。これら糖鎖はシアリル化され、かつフコシル化されていない構造を持つものが多く、シアリル化やフコシル化はゴルジ体における糖鎖修飾の最終段階で行われるため、最終合成過程が腎臓の障害により影響を受けた可能性が考えられた。これらの結果から、糖鎖が様々なタイプの腎臓疾患に対するマーカーとなり得ることは難しいものの、間質性腎炎においては障害マーカーとして有用な可能性が示唆された。

遺伝子発現解析の結果、マイクロアレイ解析ではジクロフェナク投与群、シスプラチン投与群において障害度依存的に発現が増加した遺伝子が数種認められ、中でも Vanin-1 (VNN1) の発現量はリアルタイム PCR による定量においても、両投与群においてほぼ障害度依存的に増加した。さらに、VNN1 は病理検査で障害度のごく僅かと診断された個体においても発現上昇が認められ、これらの個体においては尿酸値の変動も生じていないため、尿酸値よりも早期に上昇することが示された。これらの結果から、VNN1 が尿細管壊死および間質性腎炎を共に反映する早期腎障害マーカー候補と考えられた。

以上の結果より、本研究により、野生鳥類、特に希少種における金属汚染の実態が把握され、また新たな腎障害マーカーの確立につながる知見を得ることができた。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者石井千尋氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：和 泉 雄 介

審査委員	主査	教授	滝口	満喜
	副査	教授	木村	享史
	副査	准教授	今内	覚
	副査	准教授	高木	哲

学位論文題名

イヌの血管内皮細胞および腫瘍移植マウスを用いた血管破壊剤 CA4P の腫瘍血管選択的遮断機序の解明

Combretastatin A-4 phosphate (CA4P) は、腫瘍血管を選択的に遮断することで抗腫瘍効果を発揮する。CA4P は血管内皮細胞の Rho/ROCK 経路を介して細胞骨格に作用し、細胞収縮を起こす。この細胞収縮効果により、血管が狭小化することで血流が遮断されると考えられているが、腫瘍血管選択的に血流が遮断される詳細な機序は明らかとなっていない。

近年、腫瘍血管内皮細胞 (TEC) は、正常血管内皮細胞 (NEC) と比較して、様々な特異的性質を有することが明らかとなりつつある。CA4P の選択的遮断機序は、この TEC の特異的性質に起因する可能性が示唆されているものの、TEC を CA4P の研究に用いた報告は存在しない。また、獣医領域における TEC の研究はこれまでのところ存在しない。TEC を用いて CA4P の *in vitro* 実験を行うことで、TEC の特異的性質と CA4P の選択的遮断機序との関連が解明可能であると考えた。また、イヌの血管内皮細胞および腫瘍細胞を用いることで、獣医領域での CA4P の臨床応用へ向けた基礎的知見を得ることが可能である。

以上の背景から、本研究では、イヌの血管内皮細胞および腫瘍移植マウスを用いて、CA4P の腫瘍血管選択的遮断機序を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、イヌの TEC および NEC の分離、培養法の確立を試みた。イヌの頸静脈から NEC の分離を試み、イヌの甲状腺癌および肛門周囲腺上皮腫組織から TEC の分離を試みた。それぞれ、血管内皮マーカーである抗 CD31 抗体を用いた免疫磁気細胞分離法による分離を行った。得られた細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、CD31 およびイソレクチン B4 の 2 種類の血管内皮マーカーに陽性であった。また光学顕微鏡で観察したところ、血管内皮細胞に特徴的な敷石状の

配列が認められた。これらの結果から、免疫磁気細胞分離法により、高純度のイヌの NEC および TEC を分離、培養が可能であることが明らかとなった。

第 2 章では、第 1 章で得られた細胞に対する CA4P の細胞収縮効果を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。100%コンフルエントの NEC に CA4P (1 μ M, 3 時間) を添加しても細胞収縮は起こらなかった。しかし、100%コンフルエントの NEC に、EGTA を投与することで VE カドヘリンを阻害した後に、同濃度の CA4P を投与すると、細胞収縮が起こり、細胞間隙の拡大が認められた。このことから、VE カドヘリンは CA4P の細胞収縮効果に拮抗的に作用することが明らかとなった。100%コンフルエントの TEC は、同濃度の CA4P を添加することで細胞収縮が起こり、細胞間隙の拡大が認められた。また、TEC における VE カドヘリンの発現様式が、NEC とは異なる zigzag pattern を示していた。この zigzag pattern を示す VE カドヘリンは機能が低下していると報告されていることから、TEC において VE カドヘリンの機能不全が起こっている可能性が示唆された。以上の結果から、VE カドヘリンの接着活性の低下により、腫瘍血管では CA4P の血流遮断効果に抵抗できなくなり、腫瘍血管は遮断され、一方で VE カドヘリンが機能している正常血管では、CA4P の血流遮断効果に拮抗的に作用するため、血流が遮断されないのではないかという仮説が得られた。

第 3 章では、第 2 章で得られた仮説を、イヌの骨肉腫細胞株移植マウスに CA4P および VE カドヘリン中和抗体 (VEC NAb) を投与し、血流遮断効果および抗腫瘍効果を解析することで検証した。低濃度 CA4P (30 mg/kg) 投与群における移植腫瘍組織では、部分的な血流遮断しか認められず、また VEC NAb を単独投与した群における移植腫瘍組織でも、血流遮断領域は認められなかった。しかし、両薬剤を投与した併用群における移植腫瘍組織では、大部分の血流が遮断された。この結果は、腫瘍血管における脆弱な VE カドヘリンが、VEC NAb によりさらに阻害され、CA4P の細胞収縮効果に対してより易感受性となり、CA4P の血流遮断効果が増強されたためであると考えられた。

本研究により、イヌの TEC の分離、培養法が確立された。また、第 2、第 3 章の結果から、CA4P の選択的遮断効果は、腫瘍血管における VE カドヘリンの脆弱性に起因する可能性が強く示唆された。今後、*in vivo* において腫瘍血管の VE カドヘリンを観察し、その脆弱化の機序を解明していくことで、より効果的な CA4P を用いた抗腫瘍血管療法樹立のための一助となると思われる。また、VE カドヘリンに着目して腫瘍血管の異常性を明らかとしていくことで、新規抗腫瘍血管療法の開発に貢献できるかもしれない。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者○和泉雄介氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：菅 野 智 裕

審査委員	主査 教授	片 桐 成 二
	副査 教授	坪 田 敏 男
	副査 講師	坂 本 健 太 郎
	副査 准教授	永 野 昌 志

学位論文題名

Evaluation of bovine semen quality based on sperm organelle functions and motility subpopulation structures

（精子の細胞小器官機能および運動様式を指標にした
牛精液品質評価法の検討）

乳牛および肉牛のほとんどは凍結融解精液を用いた人工授精により生産されているが、凍結融解過程で精子は傷害を受け、受精能が低下することが知られている。一方、精子の受胎性には多くの精子機能が複雑に関連するため、従来行われてきた顕微鏡下における運動性の主観的検査のみでは受胎性を正確に評価することは困難である。このため、複数の精子機能を同時に評価できる方法の開発が求められ、近年、フローサイトメトリー（FCM）や精子運動能自動解析装置（CASA）が用いられるようになった。しかし、これらの機器を用いても、精子受胎性の正確な予測方法は未だ確立されていない。そこで本研究では、精子の細胞小器官機能および運動様式を指標とした精子の品質評価方法を検討した。

第Ⅰ章では、牛精子において細胞膜および先体の正常性とミトコンドリア活性を客観的かつ同時に評価する手法を検討した。SYBR-14、ヨウ化プロピジウム（PI）、PE-PNA および MitoTracker Deep Red により精子を染色（4重染色）し、FCM を用いて細胞膜正常性、先体正常性およびミトコンドリア活性を同時に評価した。その結果、個々の機能を別々に評価した場合と同様の結果が得られ、本研究で検討した4重染色法は、従来の染色方法と同程度以上の検査精度で精子の複数の細胞小器官機能を同時に評価できることが示された。

第Ⅱ章では、凍結過程における精子細胞小器官機能の傷害を4重染色により同時に評価した。本章ではヘキスト 33342、PI、FITC-PNA および JC-1 を用いて、蛍光顕微鏡下で精子機能を評価した。その結果、凍結前の冷却過程でミトコンドリア活性の低下する精子の増加が認められ

た。凍結過程は精子を直接的に傷害すると報告されてきたが、冷却過程におけるミトコンドリア機能低下の後に先体傷害および細胞死が誘起されることが示唆された。

第 III 章では、クラスター解析を用いて運動様式の異なる精子サブポピュレーション構成と受胎性との関係を検討した。CASA により同一採精日の第 1 射出精液（高運動・低受胎性）と第 2 射出精液（低運動・高受胎性）中の精子の運動様式を比較した結果、精子は 4 群に分類された。精子サブポピュレーション構成を射出順序間で比較したところ、受精能獲得精子に特徴的なハイパーアクチベーション様の運動を示し寿命が短いと推察される精子群、および頭部を細かく頻繁に振動する、雌生殖道内での寿命が長いと考えられる精子群の割合に差異を認めた。これらの精子群の割合が精液の受胎性に関与すると考えられた。

第 IV 章では、精液の受胎性予測へのクラスター解析の応用を検討した。まず、精子の寿命を短縮させると考えられるハイパーアクチベーション様運動の評価に適した培地および CASA による撮影速度の影響を検討した。凍結融解精子を体外受精培地 (BO) あるいは合成卵管液 (SOF) に浮遊させ、受精能獲得処理群 (A23187 添加) および非処理群の精子運動性を、撮影速度 150 フレーム/秒 (fps) で評価した。その結果、A23187 添加 BO 群においてハイパーアクチベーション様の運動精子の割合が増加したが、SOF では A23187 添加の場合もその割合は低かった。また、30、50、75 および 150 fps で撮影した精子運動性を解析したところ、撮影速度が高いほど、精子運動をより正確に捉えることが示された。次に、低受胎性モデルとして、通常精液より受胎率が 10%程度低いと報告されている性選別精液の機能評価を行った。BO に浮遊させた A23187 添加群と非添加群の通常精子を 150 fps で撮影した運動性データをリファレンスとして、通常精液と性選別精液の精子サブポピュレーション構成を比較した。その結果、性選別精液では融解直後にハイパーアクチベーション様の運動精子群の割合が高く、直進運動精子群は少なかった。また、4 重染色により、性選別精液にはミトコンドリア活性は高いものの細胞膜および先体に傷害を受けた精子が多く含まれることが示された。以上の結果から、性選別過程はミトコンドリアではなく精子膜を直接傷害し、これによりハイパーアクチベーション様の運動が誘起された寿命の短い精子が増加するため、受胎率が通常精液よりも低くなることが示唆された。

本研究の結果から、細胞小器官機能および運動様式に着目した精子品質評価方法は、凍結保存過程における精子の傷害や性選別精液等の低受胎精液における精子機能の変化を客観的かつ詳細に評価可能であり、精子の受胎性予測および精液保存方法の改良・開発に寄与すると考えられた。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 菅野 智裕 氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：酒井 友里

審査委員	主査	教授	稲波 修
	副査	教授	稲葉 睦
	副査	講師	岡松優子
	副査	准教授	安井博宣

学位論文題名

NADPH oxidase が放射線によるストレス誘発性早期老化に伴う活性酸素種産生に与える影響およびその生理的役割に関する研究

がんの放射線治療は各種限局照射法や新規の制がん剤との併用治療などの新しい技術の目覚ましい近年の発展によって、医療のみならず獣医療でも重要ながんの治療法となってきている。しかしながら、放射線治療の副作用として疾患近傍の正常組織における予期せぬ有害事象の発生が臨床上の問題となっており、克服すべき課題となっている。医療ならび獣医療では粘膜炎、口腔乾燥症ならびに肺線維症などの有害事象が知られている。これらの有害事象の発生は放射線による直接的な細胞死が古くからその有力な原因と考えられてきたが、近年、放射線照射された細胞がストレス誘発性早期老化(Stress-Induced Premature Senescence [SIPS])を起こし、この早期老化細胞（SIPS 細胞）から発生する活性酸素種（Reactive Oxygen Species[ROS]）や炎症性サイトカインの分泌による炎症反応が有害事象の発生に深く関与していることが報告されている。しかし、この ROS 上昇とサイトカイン分泌との因果関係や細胞内の ROS 発生源については現在までのところ明確になっていない。

そこで酒井氏は細胞内の主要な ROS 産生酵素である NADPH オキシダーゼ (NOX) ファミリータンパク質に着目し、その SIPS 細胞における ROS 産生への関与を明らかにすると共に、ROS と炎症応答との関連性についても検討を行った。まず、酒井氏は初代培養のマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) に X 線照射を行うと、照射後 4 日以降に有意に細胞老化の増加が起こり、照射後 7 日目で細胞全体の約 54% から約 65% が老化細胞となることを明らかにした。また、細胞内 ROS についても照射後 7 日目で有意な上昇が起きていることを示した。次に 6 つの NOX アイソフォーム (NOX1～NOX4, DUOX1 ならびに DUOX2) の mRNA 発現に着目し、定量的 PCR で検討したところ、*NOX4* 発現のみの発現が検出され、他の NOX アイソフォームの発現は検出限界以下であった。さらに

NOX4発現のみが照射1日後には有意な上昇を示し、照射7日後には非照射MEFと比較して約4.5倍まで上昇することを見いだした。また、NOX4欠損MEFでは、野生型MEFと比較して、X線照射後に観察されるROS産生の増加応答が有意に低下していたが、一方ではNOX4欠損MEFでも、照射後の老化細胞の誘導が野生型MEFと同様に起きる事も明らかにした。以上の結果から、放射線による細胞内ROSの増加はNOX4の発現誘導に起因しているが、NOX4発現と細胞内ROS増加は細胞老化の誘導に必須ではないことが示された。

次に酒井氏は、NOX4と炎症応答との関連性を明らかにする目的で、X線照射したMEFの7日間培養後の条件培地がヒトリンパ芽球U937細胞の遊走能に及ぼす影響について検討した。X線照射した野生型MEFの条件培地を用いた場合、U937細胞の遊走能の有意な増加を起こすことが明らかとなった。しかし、NOX4欠損MEF由来の条件培地を用いた時のU937細胞の遊走能の放射線応答は、野生型MEF由来の培地の場合と比較して有意に低下していた。さらに、酒井氏はX線照射した野生型MEF由来の条件培地にカタラーゼ添加処理を行い、NOX4が産生する O_2^- の代謝物である H_2O_2 を培地中から消去しても、遊走細胞の放射線応答に全く影響を与えなかったことを明らかにした。この結果は遊走細胞の増加はROSのU937細胞に対する直接的な作用でなく、サイトカイン等の炎症性物質を介した間接的な作用であることを示唆していた。そこで、酒井氏は炎症性サイトカインである*IL6*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL5*, *CCL7*ならびに*CXCL12*の発現を定量PCR法にて検討したところ、野生型MEFではX線照射後に*CCL7*と*CXCL12*の発現の増加が見られ、NOX4欠損MEFでは*CXCL12*の発現増加反応が有意に低下している事を明らかにした。

以上の結果は、放射線照射は老化細胞を誘導し、NOX4発現を増加させることでROSの産生増加を導いていること、さらに、この放射線によるROSの増加がサイトカイン増加を促し、これが炎症細胞の遊走に関与している可能性を初めて示したものであり、放射線治療における炎症が関与する有害事象発生の機序の解明と今後の予防法の開発にとって重要な情報を含むものである。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者酒井友里氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：鈴木 瑞穂

審査委員	主査	教授	迫田	義博
	副査	教授	大橋	和彦
	副査	教授	高田	礼人
	副査	准教授	岡松	正敏

学位論文題名

Study on the pandemic influenza vaccines prepared from
avian influenza viruses
(鳥インフルエンザウイルスを用いたパンデミックインフルエンザ
ワクチンの研究)

A型インフルエンザウイルスは人獣共通感染症であるインフルエンザの原因ウイルスである。A型インフルエンザウイルスの自然宿主である野生水禽の間で維持されているウイルスが、ブタの体内でヒトのインフルエンザウイルスと遺伝子再集合を起こし、新型インフルエンザウイルスが出現すると考えられている。また近年、H5 および H7 亜型の鳥インフルエンザウイルスが家禽からヒトへ直接感染した例が数多く報告されており、公衆衛生上の問題となっている。すなわち、ヒトにおけるインフルエンザの制御と将来起こりうるパンデミックに備えたワクチンの準備には、野生水禽、家禽およびブタを含めた、動物から分離されるウイルスの性状を調べる必要がある。

H2 亜型のウイルスは 1968 年以降ヒトからの分離報告がなく、現在では多くのヒトが H2 亜型のウイルスに対する免疫を有していない。そのため、H2 亜型のウイルスが鳥からブタを介してヒトに伝播した場合、世界的大流行（パンデミック）となる可能性がある。また 2013 年から 2014 年にかけて、中国で H10N8 亜型の鳥インフルエンザウイルスがヒトから分離され、2 人の死亡が報告された。ヒトから分離された H10N8 亜型のウイルスと遺伝的に近縁なウイルスは、現在も中国の野鳥や家禽から継続的に分離されており、再びヒトへ伝播する可能性がある。

そこで鈴木瑞穂氏は、将来起こりうるインフルエンザのパンデミックに備えるために、現在野鳥で維持されている H2 および H10 亜型インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性を解析した。さらに将来ヒトでの流行に備えたワクチンの準備に資するため、H2 および H10 亜型のウイルスの不活化全粒子ワクチンを試製し、その有効性をマウスモデルで評価した。

H2 亜型のウイルスの HA 遺伝子はユーラシア系統と北米系統に大別されるが、鈴木氏は、ユーラシア系統に属するウイルスの HA 遺伝子はさらに 4 つのクラスターに分類され、遺伝的に多様であることを示した。さらに現在アジアで野鳥の間で循環している H2 亜型のウイルスは、過去にアジア風邪を起こしたウイルスとは遺伝的に異なることを明らかにした。一方、H2 亜型のウイルスの抗原性は、遺伝子の多様性によらず広く保存されていることがわかった。さらに、北海道で野生のカモから分離された A/duck/Hokkaido/162/2013 (H2N1)を用いて不活化全粒子ワクチンを試製した。このワクチンを接種したマウスでは、ワクチン株および A/swine/Missouri/2124514/2006 (H2N3)に対する中和抗体が誘導された。またこのマウスを A/swine/Missouri/2124514/2006 (H2N3)で攻撃したところ、肺でのウイルス増殖が有意に抑制された。以上より、野鳥から分離された H2 亜型のウイルスから試製した不活化全粒子ワクチンが、H2 亜型のウイルスの感染に対して有効であることを示した。

また、ヒトから分離された H10N8 亜型のウイルスと遺伝的に近縁な HA 遺伝子をもつウイルスが近年アジアの野鳥から分離されていることを示した。さらに H10 亜型のウイルスの抗原性は、近年分離されたウイルスの間で広く保存されていることを明らかにした。また、ヒトから分離された H10N8 亜型のウイルスと遺伝的に近縁であり、野生のカモから分離された A/duck/Mongolia/245/2015 (H10N3)を用いて不活化全粒子ワクチンを試製した。このワクチンを接種したマウスでは、ワクチン株および A/duck/Hokkaido/W87/2007 (H10N2)に対する中和抗体が誘導された。またこのマウスを、マウスに対する病原性の高い A/duck/Hokkaido/W87/2007 (H10N2)で攻撃したところ、肺でのウイルス増殖が抑制され、体重の減少も緩和された。以上より、野鳥から分離された H10 亜型のウイルスを用いて試製した不活化全粒子ワクチンが、H10 亜型のウイルスの感染に対して有効であることを示した。

以上の鈴木氏の研究により得られた H2 および H10 亜型のウイルスの遺伝子と抗原性についての知見、および野鳥から分離されたウイルスのワクチン候補株としての有用性についての知見は、将来起こりうるインフルエンザのパンデミックへの迅速な対策に資することが期待される。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者鈴木瑞穂氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：Suranji Wijekoon

審査委員	主査	教授	奥村	正裕
	副査	教授	昆	泰寛
	副査	准教授	細谷	謙次
	副査	講師	坂本	健太郎

学位論文題名

Pentosan polysulfate: an effective treatment for model of rheumatoid arthritis and a novel candidate for inhibition of cytokines-induced osteoclastogenesis

（多硫酸ペントサン：関節リウマチの効果的な治療法およびサイトカイン誘発破骨細胞分化制御の新規薬剤としての検討）

炎症性関節症では、滑膜の異常増殖と関節を構成する骨軟骨の著しい破壊がみられる。関節リウマチなど、関節炎における関節破壊は、肥厚した滑膜内や滑液中に増加するマクロファージの数に比例して悪化する。炎症を発現した関節構造の生物学的な反応に対する多角的な研究は、関節の病理学的変化を理解することとそれによる治療法の開発には不可欠である。本研究は、次の二つ事象について検討した。すなわち、犬の関節炎において重要な役割を持つ滑膜細胞と破骨細胞の分化能を解明すること、破骨細胞分化および炎症性関節症における多硫酸ペントサン（PPS）の病態修飾効果を評価することを目的にした。

滑膜には、変形性関節症、関節リウマチ、前十字靱帯断裂や膝蓋骨内方脱臼などに関連した関節疾患における主要な病態生理が存在する。検討の結果、前十字靱帯断裂や膝蓋骨内方脱臼に関連した関節炎では、それらによって誘導される関節内の炎症の度合いによって滑膜に存在する多分化能を有する細胞の分化度が変化することが証明された。さらに、炎症性因子によって刺激を受けた間葉系幹細胞はその分化能が高まることが示された。関節リウマチ罹患関節内の滑膜細胞からは炎症性プロスタグランディンや、インターロイキン（IL）-1、腫瘍壊死因子- α 、IL-17などの炎症性サイトカインが産生されることがわかっており、それらはすべて破骨細胞による骨破壊を誘導する因子であるが、ここでは IL-1 β による犬破骨細胞分化抑制、骨破壊における IL-17 のメカニズムの解明に加え、IL-17 によるマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 発現抑制の根拠が明らかにされた。

PPS は半合成硫酸化多糖であり、西洋ブナから硫酸エステル化によって薬剤として製造されている。過去の *in vitro* や *in vivo* の研究成果から、PPS には関節軟骨・骨の保護効果や滑膜炎の制御など変形性関節症に対する病態修飾薬としての能力があることが示されている。本研究では、PPS は破骨細胞分化を抑制し、骨粗鬆症や他の過剰な骨吸収を伴う骨疾患の治療薬になる可能性および臨床試験における薬理作用の検討に有益な情報が示された。PPS はその長期間投与における高い安全性から、炎症性病態への治療に活用しうることが示されてきた。本研究では、コラーゲン誘発性関節炎（ラット）に対する抗関節炎効果について検討した。その結果、PPS は関節炎による関節破壊を抑制し、関節炎の進行を遅らせることができることが強く示唆された。

以上の結果から、関節リウマチモデル動物における PPS の特筆すべき抗関節炎効果が示され、このことは PPS の破骨細胞分化抑制効果と関連していると考えられた。このことを結論付けるため、本研究では滑膜細胞や破骨細胞の分化様式を再現し、それにおける PPS の関与を明らかにした。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 Suranji Wijekoon 氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：Tapiwa Lundu

審査委員	主査	教授	荻和	宏明
	副査	教授	澤	洋文
	副査	教授	迫田	義博
	副査	准教授	好井	健太郎

学位論文題名

Studies on the epidemiology of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection and the role of glycoproteins in the intracellular transportation of viral structural proteins
(重症熱性血小板減少症候群ウイルス感染の疫学およびウイルス構造タンパク質の細胞内輸送における糖蛋白質の役割に関する研究)

重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）は人の重要な新興感染症である重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の原因ウイルスで、ダニ媒介性のフェニユウイルス科に属している。日本において、SFTSV は西日本において常在しており、フタトゲチマダニ、タカサゴキララマダニなどのマダニがベクターとなっている。SFTSV ゲノムは SFTS の発生のない地域でも検出されている。したがって、SFTSV が日本の野生動物の間で流行域が拡大しているかどうかを調べることは重要である。

本論文の第 1 章において、Lundu 氏は日本の様々な地域のシカやげっ歯類などの血清学的調査を実施した。SFTS の非流行地である北海道と SFTS の流行地である宮崎県から得られたシカの血清とげっ歯類の血清を検体に用いた。北海道のシカは一例も抗体を保有していなかったが（0%, 0/315）、宮崎では 2 例のシカが抗体を保有していた（4.9%, 2/41）。この抗体保有率の違いは SFTS 患者の発生状況と一致していた。中国においてはげっ歯類から抗 SFTSV 抗体が検出されているが、本研

究においてはげっ歯類から抗体は検出されなかった (0%, 0/910)。今後も日本において SFTSV の流行状況や自然界での存続様式を調べるために疫学調査を継続する必要があると考えられる。

第2章では、Lundu 氏は SFTSV の L 蛋白質 (L) と核蛋白質 (NP) の細胞内分泌経路への輸送に係る糖タンパク質 (GP) の役割について解析を行った。ブニヤウイルス目のウイルスではウイルスの出芽がゴルジ装置の膜において起こることが知られている。最近ハンタウイルス科のウイルスにおいて小胞体 - ゴルジ中間領域 (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment: ERGIC) がウイルスの出芽において重要であることが明らかになった。ウイルス粒子の産生にとって、ウイルスの構築が起こる細胞内器官に構造タンパク質が集積することは非常に重要である。しかし、これまで SFTSV 構造タンパク質の各種細胞内器官における局在については明らかにされていなかった。そこで、SFTSV の構造タンパク質の細胞内局在について、感染細胞と構造タンパク質を発現させた細胞において解析を行った。また、NP と L の各種細胞内器官への輸送における GP の役割についても解析を行った。

GP、NP、および L の小胞体 (endoplasmic reticulum: ER)、ERGIC、およびゴルジ装置における局在について感染細胞を IFA により解析を行ったところ、GP と L は ER、ERGIC、およびゴルジ装置のいずれにも局在することが明らかになった。NP は ER にはほとんど局在せず、ERGIC、およびゴルジ装置に局在していた。構造蛋白質を単独で細胞内に発現させた場合、GP のみが細胞の分泌経路に輸送された。L は GP と共発現した場合には ERGIC およびゴルジ装置に輸送されたが、NP は GP と共発現させても ERGIC およびゴルジ装置に輸送されなかった。NP にヘマグルチニン (HA) タグを付加させて感染細胞で発現させたところ、HA 付加 NP は ERGIC およびゴルジ装置に局在した。したがって、NP の出芽部位への輸送にはさらに別の因子が必要であることが示唆された。NP の ERGIC やゴルジ装置への輸送に関与するウイルスの因子についてさらなる解析が必要である。SFTSV のウイルス粒子産生における ERGIC やゴルジ装置の役割についても今後明らかにすることが重要で

あると考えられた。

本研究で得られた知見は SFTSV の流行状況やウイルスの複製を理解する上で有用であるとともに、ウイルスの阻害剤を開発する上での基礎的情報を提供するものである。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 Tapiwa Lundu 氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：平野 港

審査委員	主査 教授	荻和 宏明
	副査 教授	澤 洋文
	副査 准教授	好井 健太郎
	副査 講師	長谷部 理絵

学位論文題名

Studies on the replication and pathogenic mechanisms of tick-borne
encephalitis virus in neuron

（ダニ媒介性脳炎ウイルスの神経細胞における複製および
病原性発現機序の研究）

脳炎フラビウイルス（ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス：TBEV など）によって引き起こされる神経疾患は、その高い致死率、後遺症発生率故に、患者の生活の質を大きく損なう重大な疾病である。しかし、これらのウイルスの神経病原性発現機序の詳細は殆ど明らかになっていない。そこで本研究では TBEV を中心とする脳炎フラビウイルスの神経細胞内複製および病原性発現機構の解明を試みた。

本論文の第 1 章において、平野氏は脳炎フラビウイルスの神経病原性発現機序の解明を目的とし、マウス初代培養神経細胞における神経向性フラビウイルスの比較解析を行った。ウイルス抗原と細胞内小器官マーカーを用いた間接蛍光抗体法により、感染神経細胞内におけるウイルス抗原分布解析を行った。その結果、ダニ媒介性ウイルスと蚊媒介性ウイルスの間にウイルス抗原分布の差異が在ることが示された。TBEV の感染では感染後 24-48 時間において、樹状突起上に結節状のウイルス抗原の集積が形成されたが、蚊媒介性ウイルス（日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルス）の感染では、樹状突起上の抗原集積は起こらなかった。細胞内小器官マーカーの染色により、この TBEV の抗原集積は樹状突起の ER に存在することが示された。また、ウイルス因子特異的抗体を用いた解析により、TBEV の構造タンパク質、非構造タ

ンパク質、ウイルスゲノム複製時に産生される 2 本鎖 RNA の全てが樹状突起上の抗原集積部位に存在することが示された。ウイルスゲノムの構造タンパク質領域をゲノムから欠損させた単回感染性ウイルス様粒子の感染においても、同様のウイルス抗原集積は観察された。したがって、TBEV の神経細胞の感染時には、ウイルスゲノム RNA はゲノム RNA 単体もしくは非構造タンパク質との複合体の形で樹状突起へと輸送され、輸送されたウイルスゲノム RNA は樹状突起上にて局所的なウイルス複製を行い、抗原集積を形成していることが明らかになった。感染細胞の電子顕微鏡観察により、TBEV の複製は神経突起上にウイルス粒子を含む層状の膜構造を形成することが明らかになった。これらの実験結果により、ダニ媒介性フラビウイルスは神経細胞の樹状突起上へとウイルスゲノムを輸送した上で局所複製を行い、膜構造の変性を引き起こしていることが明らかになった。

第 2 章において、平野氏は樹状突起でのウイルス複製を可能とするウイルスゲノム RNA 輸送のメカニズムの解明と TBEV 神経病態への影響の探索を目的とし解析を行った。神経細胞モデルである PC12 細胞と RNA 発現系を用いて、樹状突起へのウイルスゲノム輸送を担うウイルス因子について解析を行った。その結果、この輸送にウイルスタンパク質の発現は不要であり、ゲノム RNA 依存性に行われていることが示された。また、ウイルスゲノムの 5'非翻訳領域 (5' UTR) 中の SL-2 領域がウイルス側の責任因子として同定された。リバーシジェネティクス法により特定された領域への変異導入を行い、ゲノム輸送能が欠損した変異ウイルスを作出した。輸送能欠損ウイルスをマウスモデルに脳内接種した際には、野生型ウイルスと比較しマウスに生じた神経症状の有意な減弱が観察された。ウイルスゲノム輸送およびそれに伴った樹状突起におけるウイルス複製は、TBEV の神経症状へと関与することが示された。輸送の宿主因子として神経細胞内 RNA 輸送機構である神経顆粒に着目し解析を行った。樹状突起において神経顆粒を構成する複数のタンパク質 (FMRP、RNG105、Staufen) とウイルスゲノム RNA の共局在が認められた。また、この中でも FMRP はウイルス感染時に樹状突起上のウイルス複製部位に蓄積していた。免疫沈降法を用いた実験により、FMRP の RNA 結合ドメインと TBEV ゲノムの 5' UTR の SL-2 領域に相互作用が認められた。神経顆粒は神経細胞において樹状突起 mRNA と呼ばれる様々な RNA を輸送することが知られている。ウイルス感染神経細胞におい

て樹状突起 mRNA の分布を観察したところ、樹状突起における減少が認められた。これらの実験結果により、TBEV はウイルスゲノム 5'UTR 中の SL-2 領域と FMRP の相互作用により RNA 輸送機構である神経顆粒を乗っ取ってゲノムを輸送し、神経機能阻害を引き起こしているという新規の病態モデルが提唱された。

本研究で得られた知見を応用することで、樹状突起 mRNA 輸送異常に起因する神経変性疾患に対する新規の治療戦略の開発へと繋がることが期待される。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者平野港氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：武藤 芽未

審査委員	主査	教授	荻和	宏明
	副査	教授	木村	享史
	副査	准教授	今内	覚
	副査	准教授	好井	健太郎

学位論文題名

Studies on epidemiology and virus-host interaction in pathogenicity of
Tick-borne encephalitis virus

(ダニ媒介性脳炎ウイルスの疫学および病原性発現に關与する宿主因子の研究)

ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) はフラビウイルス属に分類され、人に重篤な脳炎を起こす人獣共通感染症の原因ウイルスである。自然界において、*Ixodes* 属のマダニと、げっ歯類を中心とした哺乳類動物の間で本ウイルスの感染環が成立している。ヒトは主に感染マダニの吸血によって TBEV に感染する。ヨーロッパ諸国とロシアを中心に年間約 10,000 人の患者が報告されているが、TBEV の病原性発現メカニズムはほとんど明らかになっておらず、未だ生ワクチンやウイルス特異的な治療法はない。また本ウイルスにはヨーロッパ型、シベリア型、極東型の 3 つのサブタイプが存在し、それぞれ異なる病態を示す他、同一のサブタイプにおいても株間で異なる病原性を有する株が報告されている。しかしそれらの病原性の相違を決定するウイルス側因子は、現在特定されていない。

本論文の第 1 章において、武藤氏はモンゴルにおける TBEV の疫学調査及び、分離されたウイルスの性状解析を行った。モンゴルでは過去に行われた調査においても、病原性の異なる 2 つのサブタイプが分布していることが示唆されているが、分離例も少なく病原性等の生物学的性状も不明であった。そこで本研究では、モンゴル北部におけるダニ媒介性脳炎の疫学的危険度を評価するため、現在流行している

ウイルスの分離及び生物学的性状の解析を試みた。モンゴル北部の Selenge 州において 26 プール (680 匹) の *I. persulcatus* 乳剤を接種した BHK-21 細胞において、9 プールが TBEV 遺伝子及びウイルス抗原陽性を示した。分離株のエンベロープ (E) タンパク質領域の遺伝子を解析したところ、全ての株が同一クラスターを形成し、シベリア型に分類されることが明らかとなった。このうち MGL-Selenge-13-12 および MGL-Selenge-13-14 の 2 株の分離ウイルスの全ゲノムを決定し、生物性状解析を行ったところ、両株は培養細胞においては同様の増殖性を示したが、マウスモデルにおいては異なる病原性を示した。全ゲノム解析から、2 株間では 13 個のアミノ酸の相違があり、これらのアミノ酸自然変異が TBEV のマウスにおける病原性に参与していることが示唆された。

第 2 章において、武藤氏は低病原性を示す TBEV Oshima 5-10 株および、高病原性を示すロシアの脳炎患者由来である標準株の Sofjin-HO 株の病態発現機構における宿主との相互作用についての解析を試みた。TBEV の 3'-UTR variable region は株間での多様性が高く、ヒトの患者由来株や、実験室継代を繰り返した株においては、本領域における欠損や polyA の挿入が見られることが知られている。Oshima 5-10 株の 3'-UTR variable region 内には、7 つの stem loop (SL) 構造が存在することが知られており、これらのうち Sofjin-HO 株では 3、4 及び 5 番目の SL 構造 (SL3、SL4 及び SL5) が欠損している。先行研究から、Oshima 5-10 株の 3'-UTR variable region へ Sofjin-HO 株の 3'-UTR variable region を導入したウイルスでは、マウスにおける病原性が上昇する事が報告されている。このことから、ウイルス感染時における宿主応答が病態発現機構において役割を果たしていることが示唆された。本研究では、本領域と宿主との相互作用を調べるため、Oshima 5-10 株の 3'-UTR variable region に特異的に結合するタンパク質として CSDE1、FMRP、ILF3、STRBP を同定した。また、Sofjin-HO 株と同様の SL3-5 の欠損によっていずれのタンパク質とも結合が減少し、SL 領域の部分的な欠損では宿主タンパク質との結合能が保持されることが示された。CSDE1 及び FMRP は RNA 代謝、ILF3 は免疫系の制御に関わる事が知

られており、他のフラビウイルスの増幅においてもウイルス RNA と結合し作用することが報告されている。

本研究結果から、TBEV の株間の病原性の相違は、ウイルス側因子の変化および宿主との相互作用が重要であることが明らかとなった。これらの成績は、今後 TBEV をはじめとするフラビウイルスの病態発現機構の解明と、ワクチン及び予防・治療法の開発に大きく貢献するものと期待される。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者武藤芽未氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：森 田 智 也

審査委員	主査	教授	滝口	満喜
	副査	教授	稲葉	睦
	副査	准教授	中村	健介
	副査	講師	大田	寛

学位論文題名

Application of the assessment of right ventricular function by echocardiography in dogs with heart disease

（犬心疾患への心エコー図法を用いた右心室機能評価の応用）

心エコー図検査は心疾患の重症度評価、予後推定に有用な検査である。これまではその主な対象は左心室機能であったが、近年医学では右心室機能低下が主に右心室が障害される肺高血圧症（PH）患者のみならず、左心疾患患者においても予後不良因子であることが明らかになり、その評価が注目されている。しかし心エコー図検査では、右心室の複雑な構造のため従来左心室に適用されていた心エコー図検査指標を用いて評価することは困難とされてきた。そこで今回これらの制限を受けにくい指標として右室 Tei index および Speckle Tracking (STE)法を用いた右心室機能評価に着目した。

右室 Tei index は収縮能と拡張能を合わせた総合的な心機能を評価可能な心エコー図検査指標であり、人医療および犬においてその有用性が示されている。しかしながら従来法である pulsed-wave Doppler 法による測定では同一心周期での測定を行うことができず、犬に一般的に存在する呼吸性不整脈の影響を受けて再現性が低下する可能性が指摘されている。そこで同一心周期にて測定可能な Dual pulsed-wave Doppler (DPD)法による右室 Tei index 測定に注目した。

STE 法は単一心周期において心筋の動きを自動的に追跡することにより正確に心筋運動を定量化できる新たな心エコー図手法である。医学においては STE 法による右心室機能評価は PH 患者において侵襲的に評価した血行動態と良好に相関し、予後推定にも有用であることが明らかとなってきた。さらに STE 法を用いることで右心室自由壁と心室中隔の収縮のタイミングのずれ「同期障害」を評価することも可能であり、PH 患者において同期障害の発生が重症化および予後不良と関連していることが示されてきている。

しかしながら、犬においてはこれらの心エコー図検査手法に関する研究は乏しく、基礎的な知見を欠いている。そこで DPD 法による右室 Tei index および STE 法による右心室機

能、同期障害評価の犬心疾患における臨床的有用性を確立するために3段階からなる実験を行った。

第1段階として、従来の方法である pulsed-wave Doppler 法および DPD 法を用いた測定の実験的再現性について検討した。その結果、DPD 法による右室 Tei index 測定は日内、日間ならびに検者間変動係数が全て 20%以下であり、検査再現性は良好であった。一方、pulsed-wave Doppler 法による測定は日内、日間ならびに検者間再現性が低かった。以上の結果から、DPD 法を用いた右室 Tei index 測定は、犬において応用可能であることが示された。

続いて第2段階として、STE 法による右心室機能および同期障害評価の再現性と正常値について検討した。STE 法では右心室収縮能評価指標である右室 strain および右心室同期障害指標である RV-SD6 を算出した。これらの指標の再現性および体重、心拍数、年齢ならびに血圧との関連性を検討した。右室 strain および RV-SD6 はともに良好な日内再現性を有していた。さらに右室 strain は良好な日間および検者間再現性を示したものの、RV-SD6 の日間および検者間再現性は低かった。またこれらの指標は体重の影響を受けることも明らかとなった。以上より、右室 strain および RV-SD6 は犬においても臨床応用可能であるものの、体重の影響を受けることを考慮する必要があることが明らかとなった。

次いで第3段階として、心エコー図検査による右心室機能評価指標が急性右心室圧負荷条件下において重症度評価に応用可能かを検討するために、健常犬を用いて選択的肺動脈収縮薬である U46619 の持続投与による急性右心室圧負荷の影響を調べた。すべての右心室機能評価指標が急性右心室圧負荷により悪化し、心臓カテーテル検査にて測定した平均肺動脈圧、肺血管抵抗および心拍出量と有意に相関した。さらに重回帰分析において右室 strain および RV-SD6 は平均肺動脈圧、肺血管抵抗の、右室 Tei index は心拍出量の、独立した規定因子であることが明らかとなった。これらの結果から、急性右心室圧負荷条件下において右室 strain、RV-SD6 および右室 Tei index が重症度評価に有用であることが示された。

今後明らかにすべき研究課題の1つとして、慢性右心室圧負荷条件下における右心室機能評価指標と血行動態指標の関連の検討が挙げられる。そのためには、慢性右心室圧負荷モデル犬を用いた実験研究や慢性 PH 犬の右心室機能評価指標の経時的変化を観察する追跡研究が必要である。加えて、PH 犬の内科療法の治療効果判定における右心室機能評価の有用性についても明らかにしていきたい。さらには、様々な原因による PH 症例やモデル犬を用いて右心室機能評価指標の変化の違いを検討することで、原因診断における右心室機能評価の有用性も明らかにしたいと考えている。

最後に、本研究により右心室機能評価指標、特に右室 Tei index、STE 法を用いた右室 strain 解析や右心室同期障害評価 (RV-SD6) が犬における右心室圧負荷の重症度評価に有用である可能性が示された。今後、心エコー図検査による正確な右心室機能評価を通して、犬心疾患のより適切な管理・治療の実現が期待される。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者森田智也氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：リサ・アンジェラ・トンプソン

審査委員	主査	教授	石塚真由美
	副査	教授	坪田敏男
	副査	准教授	久保田彰
	副査	准教授	池中良徳

学位論文題名

Health risk assessment and molecular biological characteristics associated with organochlorine insecticides sprayed for control of pests and vector-borne diseases: One Health aspects

（有機塩素系殺虫剤散布による病原性媒介生物および疾患のコントロールが及ぼす分子生物学的特徴と健康リスク評価に関する研究）

DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane)はその生態系への影響の観点から、先進国ではすでに使用が禁止されている有機ハロゲン殺虫剤である。しかし、WHO は、マラリアを媒介する蚊の駆除のため、これらの流行国では殺虫剤 DDT の屋内限定散布 (Indoor Residue Sprayed : IRS) を推奨している。屋内散布のため環境負荷が小さいと考えられている IRS であるが、一方で DDT は発がんや内分泌攪乱、近年ではⅡ型糖尿病との関連性など生体影響が疑われており、ヒトや野生動物への健康影響は不明な点が多い。そこで本研究は、DDT によるマラリアコントロールが積極的に行われ、その消費量がアフリカで多い南アフリカで、DDT が引き起こす毒性影響を明らかにする事を目的に、調査研究を実施した。IRS が実施されている住宅で家禽であるニワトリを採材し、蓄積する DDT の分析とバイオマーカーの変化についてマイクロアレイ解析により明らかにすることを目的とした。

南アフリカ Kwazulu-Natal 州より野外飼育のニワトリとブロイラーのニワトリを採集し、蓄積する DDT を分析した。この地域より採集した卵では、DDT 類は中央値 9,500 ng/g 湿重量を示し、最大蓄積量は 97,000 ng/g 湿重量であった。ニワトリの主要な可食部である筋肉に比しても蓄積量は高く、また市販のブロイラーの卵の値 (中央値 1.3 ng/g 湿重量、最大 4.6 ng/g 湿重量) に比べて顕著に高い蓄積量であった。ニワトリは現地住民にとって重要なタンパク源である。本研究で得られた DDT の濃度データを基に推定一日摂取量を計算すると、現地住民は 0.00018 mg/kg 体重の DDT を摂取している計算になる。これは DDT の耐容一日摂取量で

ある 0.01 mg/kg 体重よりも大きく下回っていた。しかし、一方で、DDT 散布地域で採取したニワトリおよび卵の化学分析を行い、特に、卵を摂食した際には、ヒトへの発がんリスクが推奨値の 8000 倍に達することを明らかにした。

次に、マイクロアレイおよびリアルタイム PCR により、DDT が引き起こす生体リスクについて、ニワトリ及びヒトで解析したところ、以下の結果を得た。

ニワトリについては、実際に環境で DDT にばく露されている野外飼育群を用いて解析した。マイクロアレイ解析により、肝臓において、CYP17 (シトクロム P450 の 17 サブファミリー)や SQLE (スクワレンモノオキシゲナーゼ)等、特に副腎皮質におけるステロイド合成に関与する遺伝子群、および ELOVL2 (Elongation of very long chain fatty acids protein 2)等の脂肪酸生合成に関与する遺伝子群に、DDT ばく露が強い影響を与える事が明らかとなった。また、免疫に関与する因子として、マイクロアレイ解析により β ディフェンシンが DDT ばく露により影響を受ける遺伝子候補となったことから、リアルタイム PCR により解析したところ、DDT の蓄積濃度依存的にこの遺伝子群が有意に発現レベルが抑制されることが分かった。

一方、DDT のヒト乳ガンに対するリスク評価も MCF-7 を用いて行ったところ、CYP1A サブファミリーなどの薬物代謝酵素に加え、ヘムオキシゲナーゼ-1 などの酸化ストレスマーカーについても変動が認められた。

以上の結果より、南アフリカにおける DDT の IRS 散布地域をモデルとして、飼育動物ニワトリおよびヒトに対する影響についてアセスメントを行い、また DDT の標的となる新たな分子を明らかにした。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者リサ・アンジェラ・トンプソン氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：和田 雄治

審査委員	主査 教授	澤 洋文
	副査 教授	迫田 義博
	副査 准教授	好井 健太郎
	副査 講師	大場 靖子

学位論文題名

Discovery of a novel antiviral agent for chikungunya virus
(新規抗 chikungunya virus 化合物の探索と解析)

チクングニア熱（CHIKF）は、トガウイルス科アルファウイルス属に属するチクングニアウイルス（CHIKV）の感染により惹起される蚊媒介性の人獣共通感染症である。2004 年から現在まで続く CHIKF の流行は世界中の広範な地域（アフリカ、アジア、欧州、中南米等）で発生しており、甚大な数の感染例が報告されている。CHIKF の主症状として発熱、発疹、関節痛があげられる。特に、激しい痛みを伴い長期間（数ヶ月から数年以上）持続する関節痛は最も特徴的であり、重症例ではリウマチ様関節炎に移行する事が報告されている。この様に、CHIKF は世界中の罹患者の quality of life 及び経済活動に大きな被害を及ぼし、再興感染症として注目を集めている。

しかしながら、CHIKF に有効な予防法や治療法は未だ確立されていない。特に、治療薬の開発研究は途上段階にあり、抗 CHIKV 活性を有する化合物・成分等の報告は一定数存在するが、殆どの場合でその作用機序が解析されていない。そこで、本研究では、CHIKF 治療薬の開発に寄与する知見を獲得する事を目的として、CHIKF 治療薬の候補と成り得る新規抗 CHIKV 化合物の探索とその作用機序の解明を試みた。

第一章では、CHIKV 感染による細胞障害を指標とする細胞生存性試験により、化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した。本スクリーニングにより、複数の CHIKV 株の感染を低濃度で阻害するベンゾイミダゾール系化合物である Compound-A を見出した。更に、Compound-A は、CHIKV と同じトガウイルス科アルファウイルス属に属するシンドビスウイルスの感染を阻害するが、フラビウイルス科フラビウイルス属に属するデングウイルスの感染は阻害しない事が明らかとなった。以上の結果から、Compound-A の抗ウイルス活性はアルファウイルス特異的である可能性が示唆された。また、Compound-A と非常に類似

した化学構造を有する化合物を解析した結果、Compound-A が有する抗 CHIKV 活性には末端の 2-Pyrrolidone 構造が必須である事を明らかとした。

第二章では、Compound-A 耐性 CHIKV を用いて、Compound-A の抗 CHIKV 活性作用機序の解明を試みた。最初に、野生型 CHIKV を Compound-A 存在下で複数回継代培養する事により Compound-A 耐性 CHIKV クローン (res-CHIKV-1) を分離し、全ゲノム配列を解析した。続いて、res-CHIKV-1 が有するアミノ酸変異を単独、もしくは組み合わせで導入した遺伝子組換え CHIKV を作出し、Compound-A が有する抗 CHIKV 活性に対する感受性の変化を解析した。その結果、Compound-A は非構造タンパク質である nsP4 に位置するアミノ酸残基 (M2295) を標的として抗 CHIKV 活性を示す事が明らかとなった。一般的に、アルファウイルスの nsP4 は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) として機能する事が知られている。Compound-A が RdRp の機能を阻害する可能性を調査する為に、CHIKV レプリコンを作出し、Compound-A 存在下における CHIKV のゲノム複製効率を評価した。その結果、Compound-A は M2295 を標的として CHIKV のゲノム複製を阻害する事から、RdRp 阻害剤として作用する可能性が示唆された。更に、種々の RNA ウイルスのアミノ酸配列を解析した結果、M2295 は RdRp の機能的モチーフである Motif B 内に位置し、アルファウイルスで広範に保存されている事が明らかとなった。

本解析により得られた結果は、Compound-A がアルファウイルス特異的に抗ウイルス活性を示す可能性、及び RdRp 阻害剤として作用する可能性を支持するものである。また、Compound-A と同様のベンゾイミダゾール骨格を有する他の化合物の抗 CHIKV 活性を解析した結果、M2295 を標的とする抗 CHIKV 活性は Compound-A に特異的な性質である事が明らかとなった。これより、ベンゾイミダゾール骨格は Compound-A の抗 CHIKV 活性に必須ではない可能性が示唆された。

以上の結果から本研究で得られた知見は CHIKF の治療法開発において、基礎的な知見を提供するものと考えられた。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 和田雄治氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：Wallaya Phongphaew

審査委員	主査	教授	澤	洋文
	副査	教授	高田	礼人
	副査	准教授	好井	健太朗
	副査	講師	大場	靖子

学位論文題名

The valosin-containing protein is implicated in West Nile virus replication and an examination of the pathogenicity of a novel West Nile virus strain isolated in Zambia

（ウエストナイルウイルスの複製に関与するバロシン含有タンパク質に関する研究とザンビアで単離されたウエストナイルウイルスの病原性の検索）

ウエストナイルウイルス（WNV）は、ウエストナイル熱、ウエストナイル脳炎をヒト、ウマなどに起こすフラビウイルス科フラビウイルス属に属する、蚊媒介性の人獣共通感染症の病原体である。WNV は 1937 年にウガンダの症例から最初に単離され、現在ではアフリカ、アジア、中東、ヨーロッパ、オーストラリア、北米等、多くの国々にその感染が広まっている。米国では 1999 年から 2015 年の間に、約 44,000 人が感染したことが報告されている。

WNV は少なくとも 5 つの lineage に分類され、lineage 1 に属するウイルスはアフリカ、アジア、中東、ヨーロッパ、オーストラリア、南北アメリカで確認されている。lineage 2 に属するウイルスはサハラ砂漠以南のアフリカ、マダガスカル、近年はヨーロッパ、ユーラシアで検出されている。lineage 3 に関してはチェコで単離された株、lineage 4 はロシアで分離された株、lineage 5 はインドで分離された株が属している。

WNV は細胞にクラスリン依存性のエンドサイトーシスで細胞内に侵入し、エンドソームに輸送される。その後、エンドソーム膜の融合及び脱殻により細胞質内にウイルスゲノムが放出される。WNV のゲノムは小胞体膜由来の小胞内で複製すると考えられている。ウイルス粒子は小胞体内に出芽し、エクソサイトーシスにより細胞外に放出される。

valosin-containing protein (VCP)は II 型の adenosine triphosphatase-associated with diverse cellular activities (AAA+ ATPase)であり、シャペロンとして ER-associated degradation (ERAD)によるタンパク質の分解過程におけるタンパク質の輸送、または小胞輸送・融合等の機能を有するタンパク質

である。VCP は幾つかの RNA ウイルスの増殖過程に関与していることが報告されており、ポリオウイルスやアイチウイルスの複製を亢進させること、また、シンドビスウイルスのエントリー受容体の細胞内輸送に関与して、シンドビスウイルスの増殖を亢進させること、伝染性気管支炎ウイルスの細胞内侵入過程に関与していることが示唆されている。さらに VCP はフラビウイルスに属する C 型肝炎ウイルスの複製複合体と共局在を示しウイルスゲノムの複製を亢進させることが報告されている。

本研究の第一章では VCP が WNV の増殖過程にどの様に関与するかを検索した。最初に VCP の阻害剤である Eer I および MDBN で細胞を処理した際に、WNV の感染効率が低下することを確認した。次に、VCP を knockdown した細胞に WNV を感染させた際に、感染効率が低下することを確認した。さらに、多段階増殖能を持たない組み換え WNV を VCP-knockdown 細胞に接種した場合でも、感染が抑制されることが分かった。以上の結果から、VCP は WNV の細胞への侵入段階およびウイルスゲノムの複製段階において重要であることが推察された。

第二章では、アフリカのザンビアに生息する蚊におけるアルボウイルスの調査の結果、ネッタイエカから単離された WNV 株のマウスに対する病原性を調べた。今回ザンビアで単離された WNV 株は南アフリカで確認されている株に類似しており、遺伝子型は lineage 2 であった。本 WNV 株を、6 週齢の C57BL/6JCr Slc マウスの腹腔内または脳内に接種し、ウイルス増殖と病原性を調べた。両投与法において、ウイルス接種後 8 日目から死亡するマウスが観察され、本 WNV 株はマウスに致死感染を引き起こすことが分かった。また、腹腔内投与 6 日および 9 日後に安楽殺したマウスの脳から感染性を有する WNV が検出された。以上の結果から、アフリカで採集した蚊から単離した WNV 株は、実験動物であるマウスに対して致死性であり、感染マウス個体において、抹消から脳血管関門を通過し中枢神経内に侵入することが示された。

本研究で得られた知見は、現在治療法が確立されていない WNV 脳炎の治療法を開発する上での基礎的知見を提供するとともに、WNV の感染対策確立において重要な疫学的およびウイルス学的知見を提供した。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 Wallaya Phongphaew 氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。