

# 平成25年度日本獣医生命科学大学若手研究者研究支援経費 (研究成果報告書)

## 1. 外来・在来中型食肉目における時間的空間的解析による感染症リスク評価に関する研究

研究代表者 野生動物学分野 助教 加藤卓也

### 研究実績の概要

外来生物による共通感染症の伝播リスクへの懸念は高まっているが、その行動生態が感染症の伝播にどのように影響するか、特に我が国の在来種との関連性は検討されていない。そこで本研究では、外来生物アライグマとホンダタヌキ等の在来種における、生息密度、活動時間帯、行動域利用などの背景からみた共通感染症の高リスク要因を明らかにすることを計画した。

本調査は、群馬県高崎市において、アライグマならびにその他の中型食肉目(アカギツネ、タヌキ、ニホンアナグマ、イヌ、ネコ、ハクビシン)を対象とした。赤外線式センサーカメラによる継続的な動画撮影を行い、撮影データから動物種を判定カウントし、撮影日時や日照状況、他の動物種との関係性を解析した。また、捕獲調査を実施し、血清等の標本を収集するとともに、アライグマが捕獲された場合は、首輪型発信機を装着して行動域利用について検討した。

調査地におけるアライグマの撮影頻度(x100回/CN)は1.30で、前年の0.76に比べ有意に高い値を示した( $p < 0.05$ )。活動時間帯について、イヌ、ネコ、キツネ以外の種では、日没後の撮影頻度が有意に増加した(全て $p < 0.05$ )。一方、アライグマの生息地利用は、オスでは夜間に田や農用地を多く利用し、メスでは建物用地などの人間の生活圏に侵入していた。雌雄ともに活動時間帯である夜間に人間の生活圏内やその周辺を多く利用している傾向が認められた。トキソプラズマの血清学的検査を実施したが、その抗体陽性率はアライグマで14.3% (1/7)、ホンダタヌキで0% (0/10)、ハクビシンで0% (0/1)であった。

アライグマはその生息密度、活動時間帯、行動域利用の実態から、イヌ、ネコを含む他種動物への感染症伝播を引き起こす可能性があると考えられる。今後はさらに同調査地での血清学的検査を進めるとともに、感染症の伝播に関わる要因と仮定した上記のパラメータがどのように関与するかを検討する。

### 研究発表

[学会発表]

池田直弥, 小林甲斐, 加藤卓也, 關義和, 羽山伸一, 感染症疫学の観点でみた自動撮影調査による中型食肉目の行動特性, 第19回日本野生動物医学会大会, 平成25年8月31日, 京都大学.

## 2. 一塩基多型 (SNP) 解析による犬の潜在精巢関連遺伝子の変異同定

研究代表者 獣医臨床繁殖学研究室 助教 小林正典

### 研究実績の概要

精巢は、左右の腎臓直下に形成され、胎生期から出生時にかけて陰嚢内に下降する。精巢下降に過程において、ライディッヒ細胞より分泌される Insulin-like peptide 3 (*Insl3*) と、そのレセプターである Relaxin/insulin-like family peptide receptor 2 (*Rxfp2*) が重要な役割を果たしていると考えられている。潜在精巢は、片側または両側の精巢が陰嚢内に下降しない疾患であり、遺伝性に発症する可能性が示唆されているが、その詳細な遺伝的背景については明らかにされていない。

そこで本研究では、健常犬および潜在精巢罹患犬の genome DNA を用いて、潜在精巢に関連する可能性のある一塩基多型 (SNP) の網羅的スクリーニングを実施した。本研究には、正常犬4頭および潜在精巢犬7頭より得られた血液から genome DNA を抽出し、実験に用いた。*Rxfp2* は、DNA 全長は約 60,000bp と長大であるため、約 1,500bp の PCR 増幅産物が得られるように、*Rxfp2* 遺伝子全域に 41 種類の Primer を設計し、その Primer を用いて目的とする DNA 領域を増幅し、PCR 産物を得た。SNP のスクリーニングには、遺伝子変異検出キット (SURVEYOR, Transgenomic 社) を用い、アガロースゲル電気泳動にて切断断片解析を行い、潜在精巢の発症に関連する SNP の有無について検討した。

本年度実施した 41 領域中、7 領域から得られた正常犬群および潜在精巢犬群の PCR 産物の切断断片を比較したところ、これら 2 群間に差は認められず、これらの領域には潜在精巢の発症に関連する SNP がないことが示唆された。今後、残りの 34 領域について解析を進め、潜在精巢関連 SNP の同定と潜在精巢の遺伝子診断への応用につなげていきたいと考えている。

### 研究発表

[雑誌論文]

Kobayashi M, Hori T, Kawakami E, Changes in prostaglandin E2 levels in seminal plasma during ejaculation and the effect of exogenous prostaglandin E2 on semen volume in the dog, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75, 1249-1252, 2013, <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.13-0053>.

[学会発表]

小林正典, 和田美帆, 堀達也, 河上栄一, 犬の卵管および子宮腔内灌流液中 Superoxide Dismutase (SOD) 活性

と犬精子に対する SOD の影響，第 156 回日本獣医学会学術集会，平成 25 年 9 月 22 日，岐阜大学。

### 3. 酪農経営における自家育成牛生産費と能力評価に関する研究

研究代表者 富士アニマルファーム 講師 長田雅宏

#### 研究実績の概要

本研究は，酪農経営における自家育成牛の初産分娩までの生産費を算出し，収益性を明らかにするとともに，初産分娩牛の能力的評価額を推定し，能力水準の向上が酪農経営に及ぼす経済効果を解明することを目的とした。研究内容は，自家育成牛の育成費用および優良後継牛の能力的評価額が，飼料自給を含む酪農経営に及ぼす影響を静岡県西富士開拓地域の実態調査からその要因と経営経済性を比較検証することである。

調査研究の結果，自家育成の有利性を実証して学会発表および報告論文掲載に至ったが，現況酪農経営における後継牛確保に関わる問題点を抽出した。ここでは，自家育成による後継牛確保と併せて，乳牛初妊牛価格の高騰による経営収益性の悪化，これに伴う公共育成牧場への預託ニーズの動向を究明することが新たな課題となり，研究を継続した。

追加課題として設定した「後継牛確保の得策と公共育成牧場の存立条件」では，静岡県全戸の酪農経営体に対し，後継牛確保に関わるアンケート調査を実施し，26 年 3 月に独立行政法人農畜産業振興機構へ調査報告として提示している。

今回の研究支援を受けて行った調査研究では，自家育成牛生産費と預託育成の課題を整理することができた。酪農経営の要ともいえる，後継牛確保の得策をテーマとした研究は，農業経営経済の分野において未だ解明できていないことから，有意義であると確信している。

#### 研究発表

〔雑誌論文〕

長田雅宏，小淵智子，牛島仁，小澤壯行，酪農経営における自家育成牛生産費と能力評価に関する研究－西富士開拓地域の事例分析より－，農業経営研究 日本農業経営学会，第 51 巻第 2 号，PP.43-48，2013.

小淵智子，長田雅宏，牛島仁，小澤壯行，酪農経営における性判別受精卵の受容性に関する研究，日本畜産学会報 日本畜産学会，第 84 巻第 1 号，PP.43-50，2013.

〔学会発表〕

小淵智子，長田雅宏，牛島仁，小澤壯行，酪農家は性判別受精卵を受け入れるのか？，第 115 回日本畜産学会 講演要旨集 PP.209，平成 24 年 3 月 29 日，名古屋大学。

長田雅宏，小淵智子，牛島仁，小澤壯行，酪農経営における自家育成牛生産費と能力評価に関する研究－西富士開拓地域の事例分析より－，平成 24 年度日本農業経営学会研究大会 個別報告 報告要旨 PP.128-129，平成 24

年 9 月 22 日，宮崎大学農学部。

〔調査報告〕

長田雅宏，牛島仁，小澤壯行，静岡県における後継牛確保の得策と公共育成牧場の存立条件，独立行政法人農畜産業振興機構，2014 年 3 月，畜産の情報。

### 4. ネコ鼻腔内リンパ腫を用いた放射線感受性関連因子探索の基礎的研究

研究代表者 臨床獣医学部門治療学分野 I 助教 藤原亜紀

#### 研究実績の概要

本研究においては放射線感受性関連因子探索の基礎的研究としてまずネコ鼻腔内リンパ腫症例における低分割放射線治療効果の回顧的調査を実施した。2005～2012 年に本学付属動物医療センターに来院したネコを対象に，シグナルメント・予後・効果・放射線障害の回顧的調査を行い予後に対し関連する因子を探索した。研究対象となったのは 29 頭，最も多く認められた初診時の臨床徴候は鼻汁であり，続いて眼脂・流涙，食欲不振という非特異的な徴候であった。臨床徴候は 89.6% の症例で改善し，生存期間の中央値は 412 日（範囲：20～2391 日），無増悪生存期間の中央値は 1718 日であった。予後に関連する因子として，体重が独立した因子として検出された。放射線障害については，急性障害としては脱毛・眼脂などが多く認められいづれも許容可能なものであった。一方放射線治療開始後 6 ヶ月以降に認められた晩発障害としては白内障が最も多く，3 年以上の長期生存した症例において眼球萎縮・腫瘍形成といった障害が認められた。本研究より長期生存の可能性のある若齢の症例に対しては従来の照射方法ではなく一回線量を減らし回数を増やす必要があると考えられた。また生存期間 1 年未満の短期生存群と，1 年以上の長期生存群の存在が明らかとなり，ネコ鼻腔内リンパ腫において放射線感受性の異なる 2 群が存在することが示唆された。本研究結果は現在海外誌に投稿中である。

続いてネコリンパ腫細胞株を用いた放射線感受性試験を実施した。動物由来腫瘍細胞を研究材料として樹立されたネコのリンパ腫細胞株 7 種に対し，さまざまな線量を照射し線量-生存率曲線を作製した。それぞれの細胞株における D50（50% 生存線量値）を算出し，放射線高感受性株と抵抗性株を決定した。次年度以降は 2 種細胞株において網羅的解析を行い，放射線感受性に関連するとされる候補配列を決定した後，症例サンプルを用いて検証を実施予定である。

#### 研究発表

〔雑誌論文〕

Fujiwara-Igarashi, A. et al., Prognostic significance of the expression levels of the p16, p15, and p14 genes in dogs with high-grade lymphoma, *The Veterinary Journal*, **199** (2), 236-44, 2014, 10.1016/j.tvjl.2013.11.004.  
Fujiwara-Igarashi, A. et al., Inhibition of p16

tumor suppressor gene expression via promoter hypermethylation in canine lymphoid tumor cells, *Research in Veterinary Science*, In press, 2014, 10.1016/j.rvsc.2014.04.008.

[学会発表]

藤原亜紀, 放射線治療の適応症例と治療効果～日獣大の場合～, 日本獣医内科学アカデミー, 2014年2月8日, 横浜.

## 5. 脳組織障害を伴うてんかんモデルラットの確立

研究代表者 獣医学部獣医学科 助教 栃木裕貴

### 研究実績の概要

【目的】腫瘍抑制因子として知られる Wwox は, 中枢神経系では神経細胞やアストロサイトにその発現が確認されており, 神経系の発達やアルツハイマー病への関与が示唆されている。最近の研究では硬直性-間代性てんかんと精神遅滞を伴うヒトの遺伝性疾患の原因として Wwox 遺伝子の変異が報告された。我々が維持している LDE ラットは Wwox 遺伝子に変異を持ち, 矮小や早期死亡に加え, 特徴的な聴原性てんかん発作を呈する。病理学的には中枢神経系での神経細胞の減少と海馬 CA1 領域における空胞形成が観察される。本研究では中枢神経系における Wwox の生理機能を明らかにするために LDE ラットの脳病変の病理学的解析を行った。

【結果】LDE ラットの海馬 CA1 領域での空胞形成は, 生後 15～24 日で日齢の進行に伴い悪化した。アポトーシスの増加は見られなかったが, 生後においても神経新生が観察される海馬歯状回顆粒細胞下層 (SGZ) で細胞増殖の顕著な低下が観察され, 神経幹細胞マーカー Nestin に対する免疫組織染色においても同様の結果が得られた。さらに GFAP 陽性のアストロサイトと Pan Neuronal Marker 陽性の神経細胞の減少が観察され, CNpase 陽性のオリゴデンドロサイトの減少は特に著しかった。

【考察】LDE ラットの中枢神経系の発達途上で, 細胞増殖活性の低下と構成細胞群の減少が観察されたことから, Wwox は神経幹細胞を含む比較的未熟な細胞群の増殖と分化において役割を果たす可能性がある。オリゴデンドロサイトは脳での正常な軸索伝導に必要なため, 同細胞の減少は LDE ラットのでんかんや歩行異常の発症と関連しているのかもしれない。

### 研究発表

[学会発表]

栃木裕貴, 中枢神経系における腫瘍抑制因子 Wwox の新たな機能, 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月, 岐阜大学.

## 6. 植物酵素パパインをを用いたチロシンオリゴペプチドの合成およびその機能性評価

研究代表者 農産食品学教室 講師 奈良井朝子

### 研究実績の概要

パパイヤ由来プロテアーゼの Papain とチロシン (Tyr) エチルエステルを緩衝液中で反応させると, 抗高血圧作用を有する重合度 2～4 の Tyr オリゴペプチドが合成された。煩雑な工程や特殊溶剤を用いて化学合成されるペプチド試薬に代わり, 機能性評価等への活用が期待される。これまでに効率的にペプチドを回収できる反応 pH は 6.5 付近であることを見出したが, 基質の初濃度が高くなると高重合ペプチドが不溶性生成物として沈殿しオリゴペプチドの収量が低下した。反応機構を詳細に解析した結果, 初期反応産物の高重合化への関与が示唆された。そこで本研究では, 初期反応産物の分離を可能とする固定化 Papain を用いた Tyr オリゴペプチド合成を目的とし, 固定化 Papain の調製と利用について検討を進めた。また, Tyr ジペプチドについては実験中に一定量を回収できることから, 新規機能性の探索としてチロシナーゼ活性への影響を調べた。

【固定化酵素の調製】CNBr-Sepharose 樹脂に対してシステイン共存下 pH8.3 で Papain を固定化した。1.0g の樹脂 (3.5mL 容積に膨潤) に対し 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M の Papain 溶液を室温で 1hr 作用させたところ, タンパク質量から求めた酵素吸着率は 67%, 63%, Azocasein Assay で求めたプロテアーゼ活性の吸着率は 58%, 53% であった。すなわち, 固定化酵素量は今回の処理濃度の範囲において濃度に比例し, 樹脂側にある結合用官能基の量に依存していなかった。次に 1.0mL の Papain 固定化樹脂を空カラムに充填し, Tyr エチルエステル溶液を 1 回通過させ, 通過液成分を RP-HPLC で分析したが, 0.9～15mL/min の流速では生成物は検出されなかった。固定化された酵素量はバッチ式反応系とはほぼ同程度存在することから, 基質と酵素の作用時間が十分確保されていないと考えられた。酵素の活性中心まで基質が拡散する過程, あるいは, 酵素基質複合体の形成が律速になっている可能性がある。

【Tyr ジペプチドがチロシナーゼ活性に及ぼす影響】チロシナーゼはモノフェノールおよびジフェノールを酸化する酵素で, Tyr から DOPA, さらに Dopaquinone を生成し, これが非酵素的に重合すると黒色メラニンが形成される。マッシュルーム由来チロシナーゼと DOPA の反応に対し Tyr ジペプチドの添加は阻害効果を示さなかったが, 自身を基質にした反応では赤褐色系の色素を形成した。RP-HPLC を用いて酸化による Tyr 残基の構造変化を確認するとともに, Tyr ジペプチドまたはその酸化生成物が他の生体成分に対して抗酸化作用を示すのか更に解析を試みたい。

### 研究発表

[学会発表]

三橋純, 奈良井朝子, 中山勉, パパインによるオリゴチロシンペプチドの合成, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月, 明治大学.