

2019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. 造血組織及びリンパ性器官形態形成及び形態維持 におけるヒスタミンの機能に関する研究

研究代表者 獣医学科 獣医解剖学研究室
講師 大塚裕忠

研究実績の概要

ヒスタミンは多様な機能を示す生理活性アミンの1つであり、その合成酵素である Histidine decarboxylase (HDC) は造血組織を含む様々な組織での発現が知られている。しかしながら、造血組織形成とヒスタミンの関係を論じた報告はなく、今回、HDC を遺伝的に欠損したマウスを用いて、造血組織の形態学的特徴を解析した。

マウスにおいては、出生後、骨髄及び脾臓で恒常的に造血が行われる。しかしながら、出生後わずかな期間は、肝臓においても造血が行われ、離乳期（生後3週齢）には完全に消失する。

今回、出生後の1週齢、2週齢、3週齢（離乳）及び6週齢（若成体）マウスについて、造血組織の形態学的解析を進めたところ、骨髄及び脾臓での造血については、野生型と HDC-KO マウスで有意な変化は認められなかった。その一方で、2週齢及び3週齢の HDC-KO マウスでは造血コロニーが多数検出された。さらに、この時期の肝臓内での造血サイトカインは、野生型と比較して有意に増加していた。本研究の結果は、ヒスタミンが出生後の肝臓内造血に必要な造血微小環境の形成に関与している可能性を示唆している。これまでにヒスタミンが造血微小環境の形成に関わることを示した報告はなく、ヒスタミンの新たな機能を示すことで、造血異常疾患や HDC 発現性の癌に対する新たな治療ターゲット開発の基盤となる可能性を有している。

なおこれらの結果については、論文を作成し、投稿中である（2020年3月 submit）ほか、第125回日本解剖学会全国学術集会・総会で研究報告を行った（COVI-19の関係で誌上開催）。

研究発表

[雑誌論文]

- 1) Noguchi S, Araki M, Nakajima K, Koh M, Kokado Y, Kubo Y, Otsuka H, Yasuda A, Yokosuka M, Soeta S. Expression of Tumour Endothelial Marker 8 in Canine Mammary Gland Tumour Cells. *Journal of comparative pathology*: 173, 2019, 30-40. doi: 10.1016/j.jcpa.2019.10.001.
- 2) Yu Z, Shibasaki M, Otsuka H, Takada H, Nakamura M, Endo Y. Dynamics of Platelet Behaviors as Defenders and Guardians: Accumulations in Liver, Lung, and Spleen in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*:

42, 2019, 1253-1267.10.1248/bpb.b18-00975.

- 3) 中村雅典, 八木秀樹, 大塚裕忠, 遠藤康男. 造血組織と骨、ビスフォスフォネートの関与. *炎症と免疫*, 27, 2019, 463-467.

2. Wwox の欠損に起因した WOREE 症候群の病態発生メカニズムを探索する

研究代表者 獣医学科 獣医生理学研究室
講師 栃木裕貴

研究実績の概要

WW domain containing oxidoreductase (WWOX) 遺伝子の変異に起因する WOREE (WWOX related epileptic encephalopathy) 症候群は、早期死亡やてんかん発作、精神遅滞などを呈するヒトの遺伝性疾患群である。本研究では、WOREE 症候群モデル動物である Lethal Dwarfism with Epilepsy (LDE) ラットを用いて、中枢神経系での病態発生メカニズムの解明を目的とした。

これまでの研究では生後成長期の LDE ラットの脳において、著しい髄鞘の低形成が生じることが明らかとなっている。そこで、同様に髄鞘が存在する小脳、視神経、ならびに末梢神経系の座骨神経において髄鞘形成の程度を調査したところ、小脳では明らかな髄鞘の低形成が観察されたが、視神経や座骨神経では正常動物と同程度の髄鞘化が観察された。加えて、中枢神経系の髄鞘化を担うオリゴデンドロサイトの増殖と分化を精査するため、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分布を調査した。オリゴデンドロサイト前駆細胞は LDE ラットの脳皮質においても分布し、髄鞘形成のピークである 10-15 日齢においてわずかに増加していたが、その後正常と同程度に減少した。

髄鞘の低形成はオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖不良や分化障害に起因する。本研究で観察された結果は、Wwox の欠損がオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を阻害することを示唆する。一方で、21 日齢の LDE ラットにおいて髄鞘の形成が不十分であるにもかかわらず、オリゴデンドロサイト前駆細胞が正常動物と同程度に減少した事は、当該細胞の分化障害に伴う細胞死に起因するかもしれない。以上の結果より、髄鞘形成において重要な役割を果たすオリゴデンドロサイト前駆細胞の運命決定において、Wwox がその制御因子として働く可能性を見出すことが出来た。

研究発表

[雑誌論文]

- 1) Tochigi Y, Takamatsu Y, Nakane J, Nakai R, Katayama K, Suzuki H. Loss of Wwox Causes

Defective Development of Cerebral Cortex with Hypomyelination in a Rat Model of Lethal Dwarfism with Epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*: 20, 2019, E3596. doi: 10.3390/ijms20143596.

3. 密度変化をもたらす外来種アライグマの繁殖率および集団構造に及ぼす影響

研究代表者 獣医学科 野生動物学研究室
講師 加藤卓也

研究実績の概要

アライグマは、国内で広く分布拡大がみられる外来種である。各地で個体群の低減化や分布拡大の抑制に向けた対策として捕獲除去が行われている。しかしながら、個体群の成長を効果的に抑制できた事例はない。そこで本研究では、一定地域での経年的な生息密度の推移下において、メスの繁殖参加について、年齢、相対的な生息密度 (CPUE)、栄養状態などの因子がどのような関係性を示すかを検討した。

神奈川県横須賀市および葉山町における CPUE の推移に基づいて、2008-2010 年を高密度相、2015-2017 年を低密度相として定義し、それぞれ捕獲された個体の解剖調査を実施した。メスの繁殖参加の割合と各要因との関係性を調べるために、メスの繁殖参加の有無を応答変数に、logCPUE、年齢、体長、BMI を説明変数に設定して、高密度相と低密度相それぞれの期間で多変量ロジスティック回帰分析を用いて検討した。また、時空間的クラスター分析により、メスの繁殖参加個体が集中的に捕獲された地域の検出を試みた。

調査期間中、591 個体 (高密度相 :293、低密度相 298) のアライグマが回収された。成獣メスの繁殖参加割合は、高密度相で 84.6% (33/39)、低密度相で 86.8% (33/38) であった。高密度相においては、年齢、logCPUE および体長が、全て繁殖参加割合に正の影響を与える因子として選択された。一方、低密度相では年齢と logCPUE が選択されたが、年齢は正の因子であったのに対し、logCPUE は負の因子として示された。また、高密度相においてはメスの繁殖参加個体の捕獲が集中した 1 つのクラスターが検出された。

原産地の北米および国内の既存研究で、2 才以上のメスは 1 才より繁殖参加割合が高いことが報告されている。本研究成果より、生息密度相が異なってもその特性は変化しないことが明らかとなった。さらに、高密度相においては集団化することで繁殖機会の獲得に好条件となり、低密度相では生息個体数の減少により、繁殖成功に必要な資源 (例えば、巣や餌資源) の獲得に有利となる可能性が示唆された。

研究発表

[学会発表]

1) 友野雅未, 加藤卓也, 土井寛大, 吉村久志, 山本昌美, 羽山伸一, 外来種アライグマにおける卵巣の組織学的評価

に基づく Second estrus 発現の検討. 日本哺乳類学会 2019 年度大会: 2019 年 9 月 17 日, 中央大学後楽園キャンパス.

2) Kato, T., Doi, K., Tanaka, A., Moriguchi, S., and Hayama, S. Difference in the factors of effect on reproductive rate of feral raccoon (*Procyon lotor*) between high- (2008-2010) and low- (2015-2017) density terms in Kanagawa Prefecture, Japan. *GeoVet* 2019: 10 October 2019, U.C. Davis.

4. 幼雛期におけるポリアミンシグナルと初期成長の関連解析

研究代表者 動物科学科 動物生産化学教室
助教 白石純一

研究実績の概要

【目的】本研究では、幼雛期のポリアミンシグナルと初期成長の関連について調査することを目的とした。

【方法】実験 1 では、各成長ステージのニワトリ (孵卵開始 15 日～孵化後 42 日) の間脳、肝臓、心臓、浅胸筋、縫工筋、十二指腸、膵臓、腎臓、直腸、精巣を採取して、ポリアミン輸送体 (*SLC3A1*) の遺伝子発現量を qPCR 法で相対定量した。実験 2: 孵卵開始 18 日目にポリアミン (カダベリン、スベルミジン、スベルミン) を卵内投与 (*in ovo* injection) し、孵化を待った。孵化したヒナは体重を測定し、安楽と殺後、肝臓、浅胸筋、縫工筋重量を測定するとともに血液を採取した。採取した血液は血漿グルコース濃度 (Gluc) および遊離脂肪酸濃度 (FFA) の測定に用いた。

【結果】*SLC3A1* 遺伝子は、今回調査したすべての器官において発現が確認できた。器官ごとでみると、肝臓での発現量が最も高く、次いで間脳、膵臓および直腸で高かった。一方、*SLC3A1* 遺伝子の発現時期については、孵卵開始 15 日にはすでに発現し、その発現は孵化後 3 日で最も高く、その後、徐々に減少し、孵化後 42 日での発現量は 3 日齢時の約 1/40 となった。ニワトリ胚へのポリアミン投与によって、孵化時体重、肝臓、浅胸筋および縫工筋重量は、対象区との差はなかった。血液性状についてみると、カダベリン投与によって Gluc は高くなる一方で FFA は低くなった。

【まとめ】ニワトリにおけるポリアミンシグナルは、全身的に作用し、孵化直後のヒナの糖・脂質代謝と深く関連している可能性が推察された。今後は、各器官におけるポリアミンシグナルとグルコースおよびインスリン応答性との関連について調査することによって、ポリアミンの機能がより明らかにできるとともに、飼養管理技術への応用が期待できると考えられた。

研究発表

[雑誌論文]

1) Jun-ichi Shiraiishi, Hikari Shimada, Ryuzo Matsuda, Yoshiyuki Ohta. Effect of Stereotaxic Surgery of the

Third Ventricle on Growth Performance in Neonatal Chicks. The Journal of Poultry Science: 57, 2020, 229-235. doi: <https://doi.org/10.2141/jpsa.0190114>

- 2) Takehiko Hayakawa, Jun-ichi Shiraishi, Yoshiyuki Ohta. Effects of In Ovo Vitamin D3 Injection on Subsequent Growth of Broilers. The Journal of Poultry Science: 56, 2019, 220-223. doi: <https://doi.org/10.2141/jpsa.0180109>

〔学会発表〕

- 1) Shiraishi J-i., Ohgaki K., Watanabe H, Ichikawa T, Ohta Y, Bungo T. Glycolytic enzymes hexokinase activities in Japanese Native Chicken (YAKIDO) during neonatal nutritional conditions. 2nd international conference on native chicken. 2019, July 9-12, 2019, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

5. 缶詰牛肉製品の嗜好性に寄与する特徴的な香りの生成機構の解明

研究代表者 食品科学科 食品化学教室
助教 小林優多郎

研究実績の概要

申請者が所属する教室では、赤身牛肉由来の好ましい香りを解明するために、様々な食肉製品の香り分析をしてきた。先行研究で、缶詰牛肉製品（コンビーフ）にはレトルト加熱で生じる香ばしい、コクのある香り（レトルト加熱牛肉香）があることを報告した。その香りの一部であるピラジン類の生成機構には、牛肉の糖類含量が関与することが示唆された。本研究では、牛肉糖類を指標として、レトルト加熱牛肉香の生成条件の解明を試みた。

まず、畜種の違い（牛肉、豚肉、鶏肉）がレトルト加熱牛肉香に与える影響を評価した。レトルト加熱した牛肉試料では、豚肉および鶏肉試料よりも有意に強いレトルト加熱牛肉香が感じられた。また、牛肉試料では、2,6-dimethyl-pyrazine、3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazineなどのピラジン類の生成量が有意に多い結果となった。そして、ピラジン類の生成にはアミノ酸と糖類によるメイラード反応が関与するため、総アミノ酸量と糖質量を測定した。アミノ酸総量には有意な差は見られなかったが、全糖含量は牛肉で最も多いことが判明した。そのため、レトルト加熱牛肉香の強さには全糖含量が関与することが示唆された。そこで、レトルト加熱牛肉香に重要な糖質を決定するために、PMP誘導体化HPLC法を新たに構築して、主要糖質であるグルコース、リボース、マンノースの定量分析を行った。畜種間で大きな差が見られるのは、グルコース含量であった。さらに、豚肉にグルコースを3倍量（豚肉のグルコース量に対して）添加した試料をレトルト加熱すると、2,6-dimethyl-pyrazine、3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazineの生成量がもとの豚肉試料に比べて、有意に多

い結果となった。また、これら試料の官能評価試験を行ったところ、グルコース添加により香ばしい香りが強くなる傾向にあった。以上のことから、本教室が発表したレトルト加熱牛肉香には、グルコース量の違いが香り強度のファクターとなることを初めて明らかにした。