

# 2021年度日本獣医生命科学大学 特色ある研究プロジェクトに係る実績報告書

## 1 糖尿病リスクとしての腎臓アンバランスに関する研究

### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医学科  
教授 鈴木浩悦

### 2. 研究の目的

腎臓サイズの増大を伴う非肥満性2型糖尿病（DEK）ラットにおいて、糖尿病の発症メカニズムを明らかにするために、腎臓と膵臓の遺伝子発現を網羅的に解析する。

### 3. 研究の計画・方法

1年目に動物を生産し、糖尿病発症の有無を確認しながら、腎臓と膵臓を採取・凍結した。2年目に当たる本年度も、昨年度と同様に、糖尿病発症を発症する雄と雌を交配することで、糖尿病発症動物を生産し、糖尿病の発症の前後で動物を屠殺し、腎臓と膵臓の組織を凍結保存した。これらのサンプルから高純度のRNAを採取し、RNA-seq解析を外注した。

### 4. 研究の特色

新規の糖尿病ラットを用い、糖尿病の発症に関する新規の仮説を検証しようとする点に特色があり、本研究から病態に関わる遺伝子が同定される可能性がある。

### 5. 研究の成果

予算が限られているため、腎臓のRNA-seq解析を優先して行った。DEKの糖尿病発症個体の腎臓では、細胞外基質、組織損傷治癒、細胞増殖（E2Fターゲット、細胞周期チェックポイント）、低酸素応答、上皮間葉転換に関わる遺伝子群に発現の上昇が見られた。一方、個別の遺伝子では、一次繊毛で機能し、その欠損が嚢胞腎の原因となる遺伝子（X）の発現が低下していた。本研究と同時に進んでいるDEKの別の研究において、DEKラットでD-アミノ酸を代謝分解するD-アミノ酸酸化酵素の遺伝的欠損が同定され、それがDEKの腎臓サイズの増大と遺伝的に関連していることが示された。このため、外部機関との共同研究を進め、血漿および腎組織中のD-serineが糖尿病の発症と関連する可能性があることを見出した。今後、Xの発現低下とD-serineがどの様に本症ラットの病態と関連するのかを調べることで、新たな非肥満性2型糖尿病の発症機構が明らかになる可能性がある。

### 投稿論文

- 1) Cellular Expression and Subcellular Localization of Wwox Protein During Testicular Development and Spermatogenesis in Rats (J Histochem Cytochem 2021, 69: 2576-270)
- 2) Empagliflozin ameliorates symptoms of diabetes and renal tubular dysfunction in a rat model of diabetes with

enlarged kidney (DEK) (PloS One 2021, 16: e0251135)

- 3) Characterization of Enlarged Kidneys and Their Potential for Inducing Diabetes in DEK Rats. (Biology (Basel) 2021, 10: 633)

## 2 動物園飼育下ネコ科動物の精巣の病理組織学的解析

### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医学科  
准教授 道下正貴

### 2. 研究の目的

動物園では、チーター、トラ、ライオンなどのネコ科動物が飼育されており、種の保存のために繁殖が行われている。レッドリストの絶滅危惧II類であるチーターは、飼育下における自然繁殖が極めて難しいことから、繁殖技術の向上、開発などの取り組みが行われている。チーターの繁殖が困難な要因を明らかにするためには、雌雄の両側面からアプローチする必要がある。飼育下におけるチーターの雌の繁殖能力は初妊娠の時期が極めて重要であり、初妊娠の遅延は生殖老化を引き起こす。また、雄の繁殖率は約18%と低く、飼育環境により正常な運動性精子およびアンドロゲン産生の発達に関連した精巣機能が低下する。これまで、雄では、種の保存を目的とした精子回収、精液性状解析、凍結保存などが取り組まれているが、精巣の病理組織学的特徴は明らかにされていない。

本研究の目的は、ネコ科動物の雄生殖腺に着目し、チーターおよび他のネコ科動物の精巣を病理組織学的に比較検討し、チーターに特有の精巣病変を明らかにすることである。研究成果はチーターの雄側の要因の解明の一助となることが期待される。

### 3. 研究の計画・方法

検査材料は申請者が所属している研究室に組織検査依頼された動物園飼育下のネコ科動物（チーター、ライオン、アムールトラ、ジャガー、ピューマなど）、様々な年齢のイエネコの精巣を用いる。ホルマリン固定された精巣は最大割で切り出しし、定法に従い、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）標本作製し、形態学的評価を行う。さらに、HE標本をランダム100倍10視野で選択し、精細管と間質の割合を算出し、各ネコ科動物間で比較検討する。これまでの組織診断の実績より、チーターは他のネコ科動物の精細管萎縮が顕著で、間質における脂肪細胞増生が観察されていることから、間質における脂肪細胞の割合についても算出し、比較検討する。

### 4. 研究の特色

動物園飼育下ネコ科動物の精巣の精液性状および精子保存、精巣の病理組織検査は日本獣医生命科学大学で主に実施

されており、他の国内機関では、このような研究活動は行われていない。チーターの精巢の形態学に着目した研究は、オリジナリティーが高く、かつ病理組織診断に卓越した申請者ののみが取り組むことができる研究である。それゆえ、本研究は、本大学の特色ある研究にふさわしい研究テーマである。本研究成果は、日本獣医生命科学大学から国内および国外に向けて情報を発信し、チーターの自然繁殖の向上に貢献できる。

## 5. 研究の成果

チーターでの間質の割合は約 40% 以上を占め、他のネコ科動物と比較して有意に高かった。さらにチーターの間質では間細胞に加え、脂肪細胞増生が認められたが、チーター以外のネコ科動物では主に間細胞から構成されていた。精細管萎縮は検索したネコ科動物ではチーターで著しく、精子形成は認められなかった。またイエネコの間質の面積は年齢依存的に高値を示し、年齢と正の相関がみられた。

チーターの精巣間質の割合の増加および脂肪細胞増生は、チーター特有の組織学的特徴と考えられる。チーターにおける精細管萎縮および間質における脂肪細胞増生の要因は不明であるが、間質の変化は重度の精細管萎縮による代償性変化と考えられる。

## 3 犬の脂肪由来間葉系幹細胞に存在する多能性幹細胞の探究

### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医学科  
准教授 手嶋隆洋

### 2. 研究の目的

脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) は、モノクローナルな細胞集団ではなく、複数の異なる細胞集団によって構成される幹細胞である。この性質が ADSC の特徴である多種多様な液性因子の分泌能に起因しており、優れた増殖能と合わさって、抗炎症効果や免疫調節能を期待した幹細胞治療の細胞ソースとして注目されている。一方で、幹細胞の特徴である分化能に関しては、iPS 細胞や ES 細胞のような多分化能は有しておらず、中胚葉系細胞への分化に限定されるため、組織再生を目的とした幹細胞ソースとしては敬遠されてきた。しかし、ADSC を構成する細胞集団の中には、胚葉を超えた分化能 (多分化能) をもつ細胞が存在することが近年明らかになりつつある。実際、申請者の研究においても、内胚葉由来であるインスリン産生細胞へと分化誘導可能な細胞が、わずかではあるが犬の ADSC に存在することを確認している。

そこで本研究では、多能性を備えた犬の ADSC を探究するとともに、適切な分離培養法を確立することで、ADSC を細胞ソースとする組織再生に向けた基盤構築を目指す。

### 3. 研究の計画・方法

① ADSC に備わる多能性の検討：iPS 細胞などで汎用されている多能性幹細胞マーカーの発現をフローサイトメトリー (SSEA1、SSEA3、SSEA4、TRA-1) や、免疫染色 (Sox2、

Oct3/4)、アルカリフォスファターゼ活性によって確認する。

② 多能性マーカー陽性 ADSC の分離：フローサイトメトリーで多能性マーカーの発現が確認された ADSC を磁気ビーズによって分離する。

③ ストレス耐性 ADSC の多能性マーカー発現の検討：低栄養、低酸素、トリプシン処置といったストレス条件下に曝すことで、多能性幹細胞を選別できることが報告されている。そこで、様々なストレス条件下で選別培養した ADSC の多能性マーカーの発現を確認する。

④ 三胚葉分化能の検討：中胚葉系として骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能を確認することに加えて、外胚葉系として神経細胞とグリア細胞、内胚葉系として肝細胞と膵β細胞への分化能を免疫染色によって確認する。

## 4. 研究の特色

現在の獣医療における幹細胞療法は、ADSC の分泌因子による抗炎症効果や免疫調整効果が中心であり、組織再生分野についてはほとんど進捗がない。組織再生を目指すうえで、多分化能をもった iPS 細胞は非常に魅力的な細胞ソースであることは数多くの研究報告からも明らかであり、すでに犬の iPS 細胞も樹立されている。しかし、iPS 細胞の作製や維持にかかる費用、移植後の腫瘍形成の懸念といった障壁があるため、獣医療における iPS 細胞を用いた組織再生の報告は非常に少なく、臨床応用が期待できる段階には程遠いのが現状である。一方、ADSC は生体内に豊富に存在し、優れた増殖能という利点をもつ。そのため、多能性を備えた ADSC の細胞集団が全体の数% の存在であったとしても、適切に分離可能となれば、iPS 細胞の代替となり得る細胞ソースとして十分に利用価値があるのでと申請者は考えている。従来までの抗炎症効果や免疫調整効果だけでなく、新たに組織再生を目的とした ADSC の利用を探究する本研究は、再生医療分野全般の更なる発展に貢献しうる成果を発信できると考えている。

## 5. 研究の成果

フローサイトメトリーを用いて多能性マーカー (SSEA1、SSEA3、SSEA4、TRA-1) の発現を確認した結果、犬の ADSC ではこれら全てのマーカーの発現を検出することはできなかった。人の ADSC では 10% 未満ではあるものの、SSEA3 陽性細胞が確認されているが、今回の検討で発現解析を行った 6 サンプル全てにおいて、フローサイトメトリーでは、いずれの陽性細胞も検出することはできなかった。そのため、磁気ビーズを利用した多能性細胞の分離を検討することは不可能であった。一方で、免疫染色を利用した多能性マーカー (Sox2、Oct3/4) の検討では、ADSC に高率な発現を認めたことから、多能性を備えた ADSC の細胞集団の存在が示唆された。

次に、ストレス耐性 ADSC の多能性を検討するために、培養液中の血清濃度を制限した低栄養状態下、低酸素状態下、トリプシン処置といったストレス暴露下での選別を実施した。その結果、トリプシン処置後も生存している ADSC はわずかではあるものの、非常に高い増殖能を有しており、

継代数を重ねてもアルカリフォスファターゼ活性の低下はほとんどみられなかった。また、免疫染色を用いた多能性の確認において、SSEA1、SSEA3、Nanog、Sox2、TRA-1 といったマーカーの発現が確認できた。さらに、三胚葉系への分化能に関する検討では、未処置な ADSC と比較して、内胚葉系や外胚葉系へと分化可能な細胞割合が高まった結果であった。

現在は、最適なトリプシン処置の条件を検討するとともに、ADSC を採取する個体年齢の影響、多能性 ADSC の増殖能について追加検討中である。本研究では、犬の ADSC から多能性マーカーを利用した分離法を見出すことはできなかったが、ストレス暴露によって多能性 ADSC を分離できることが明らかとなった。今後は、多能性 ADSC を選別するための最適なストレス条件を確立するとともに、三胚葉分化能を有する細胞の特徴を詳細に検討することで、ADSC を細胞ソースとした組織再生の可能性をさらに追求したいと考えている。

#### 4 家族性自然発症性てんかんネコの繁殖における人工繁殖技術の導入

##### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医学科  
教授 長谷川大輔

##### 2. 研究の目的

獣医放射線学研究室では 2009 年に家族性自然発症性てんかんネコ (FSEC) 家系を発見し、その家系の維持を行っている。飼育スペースの問題もあり、2012 年以降 6 年間は繁殖を行わないでいたものの、研究個体が減少してきたため、2018 年より獣医臨床繁殖学研究室・堀教授の指導のもと、自然交配による繁殖を何度となく試みてきたが、全て失敗に終わっている (性格の問題、年齢の問題、着床しても妊娠が継続しないなど)。このため研究個体の高齢化も進み、自然交配は困難と判断し、人工授精あるいは受精卵移植などの人工繁殖技術を繁殖に導入し、世界的にも貴重な FSEC 家系の系統維持を目指す。

##### 3. 研究の計画・方法

これまで研究レベルにおいて、イエネコの人工授精および胚移植に関する一連の研究は、獣医臨床繁殖学研究室で行ってきており、これまでの経験およびデータをもとにして FSEC の繁殖にこれらの技術を導入していくことを計画する。

研究の方法として、まず人工授精について検討し、これを行っても繁殖に成功しない場合は、胚移植技術について考える。胚移植技術について、受精卵を提供するドナーは交配または人工授精が行われないとその技術が成立しないこと、受精卵の回収は外科的な卵管の摘出によって行われるため、それ以降は繁殖を行うことができなくなるため、最後の手段として考える。

イエネコの人工授精技術は、ホルモン製剤による誘起した発情で行う方が良いと考えられる。その理由として、自然な

発情では人工授精のタイミングをつかむことが難しいが、誘起した発情では人工授精のタイミングが把握しやすいことと過排卵を行うことが可能であるため、卵子が受精し、着床する可能性が高いことが挙げられる。また、人工授精においては雄から性状の良い精子の採取も必要である。まず、候補となる雄から性状の良い精子を回収することが可能であるかの確認が必要である。精子の回収方法としては、経直腸電気刺激法または尿道カテーテル法が一般に行われているため、これらの方法を行い、人工授精前に精液性状を確認しておくことが必要である。

具体的には、雌に妊馬血清性性腺刺激ホルモン製剤 (PMSG) を投与して発情を誘起し、その後、排卵を誘起するためにヒト絨毛性性腺刺激ホルモン製剤 (hCG) を投与し、子宮内人工授精を行う。このときの精液は、人工授精前に雄から採取した新鮮精液を使用する。

#### 4. 研究の特色

FSEC は世界で唯一の家族性／遺伝性てんかんのネコ家系であり、当職は 2010 年以降基本的にこの FSEC を用いた基礎臨床的てんかん研究を行い、大学院教育、ヒトおよび動物、獣医療におけるてんかん研究を進展させるとともに、小生、当研究室ひいては本学の知名度を上げてきた。当研究室の研究業績・獲得競争的資金の半数以上が FSEC を基にした、あるいは関連した研究内容である。いわば FSEC は本学の特色ある研究そのものであり、FSEC 家系が途絶えることは当職の将来的な大学院教育およびてんかん研究の大きな打撃となる。本研究は代表者として、当職からの申請であるが、上述の通り、獣医臨床繁殖学研究室・堀教授との共同研究である。

イヌにおける人工授精は、ブリーダーにおいても臨床の現場においても頻繁に行われているが、イエネコ (野生ネコ科動物を含む) における人工授精は、雄からの精液採取がやや困難であるため、そして精液注入技術に特別な技術を含むため、臨床的に一般のブリーダーなどが容易に行えるものではない。また、胚移植技術についても同様である。これらの技術は、絶滅の危機に瀕した動物および疾患モデルのような遺伝的に価値の高い動物に対して用いられる特別な技術として考えており、自然繁殖の難しく、遺伝的に貴重な FSEC の繁殖において人工授精および胚移植技術を導入することは、必要なものと考えている。この研究の成功は、その他の同様の貴重な動物の人工繁殖のために有用な結果を与えることと考えられる。

#### 5. 研究の成果

まず始めに、現在、残っている家族性自然発症性てんかんネコ (FSEC) のうち、繁殖に使用できる可能性のある猫の分析を行った。その結果、表 1 に示すように、雄猫も雌猫もやや高齢であることが明らかとなった。雌猫は一般的なブリーダーの基準では、妊娠可能であるのは原則 6 歳までとされているが、それより高齢でも妊娠できる可能性はあると思われる。また雄猫は、生殖器疾患がなければ、造精機能は高齢でも維持されていることが想定されるため、問題はないと

表 1 家族性自然発症性てんかんネコ (FSEC) リスト

	性別	個体番号	呼称	生年月日	年齢 (実験開始時)	備考
Q1	♀	N53MFC	スージー	2013/03/11	8歳2ヶ月	犬歯歯肉炎あり
Q2	♀	B45MFC	おかか	2013/05/10	8歳	
Q3	♀	C55MFC	バッシュ	2013/05/15	8歳	耳介免疫性皮膚炎あり
Q4	♀	G45MFC	スリーピー	2013/05/29	8歳	
T1	♂	G37IMC	豆乳	2009/07/11	11歳10ヶ月	交尾能あり、受胎能確認できず
T2	♂	SEC06-12-001	ガガ	2012/03/19	9歳2ヶ月	交尾能あり、受胎能確認できず
T3	♂	F18LMC	ドーピー	2012/08/27	8歳9ヶ月	交尾経験なし
T4	♂	U14MMC	グラン	2013/04/18	7歳11ヶ月	交尾経験なし

考えられた。

実験の開始として、雌猫の発情徴候のチェックを行い、タイミングをみて雄猫と交尾をさせることを試みた。その結果、Q2に発情が来たため、雄猫と交尾を試みた。まず、T1は交尾を試みたが、うまく腔内への陰茎が挿入できなかった(交尾後の腔スミア検査により精子が確認できなかった)。その後、T2と交尾が成立した(腔スミア検査でも精子が確認できた)。その後、同居をさせて様子を見た。しかし、妊娠は成立しなかった。なお、妊娠診断時の血中プロゲステロン値は高値を示しており、排卵していることは確認されていた。同時に、Q1にも発情が見られたためT2と交尾を行ったが、交尾は成立しなかった(血中プロゲステロン値が上昇しなかった)。また、T3およびT4でも交配を試みたが、両雄猫は交尾欲がないため、交尾が成立しなかった。

これらのことから、妊娠させるためには人工授精が必要と考えられた。そのため、雄猫から精液が採取できるかどうかについて確認した(ただし、T1は高齢であり、全身麻酔下での影響を考え、実験からは除外した)。精液採取の方法として、全身麻酔下での尿道カテーテル法および経直腸電気刺激法で行った。その結果、T2～T4の3頭からは、良好な性状の精液が採取できた。特に、T2の精液性状が最も良好であった。

雌猫は、PMSG製剤で発情誘起(過排卵誘起)し、発情開始後、hCG製剤で排卵誘起を行って、その後、外科的に子宮内人工授精(子宮内精液注入)を行うことを計画した。そのため、自然な発情にて卵胞が活動的であると、ホルモン製剤による反応が悪くなることが明らかとなっているため、日照時間を12時間以下に設定し、無発情期の状態になるように調整した。その後、まずQ2にホルモン投与を行い、人工授精を行うことを計画した。雄猫は、精液性状の良好なT2とした。しかし、T2から精液を回収し、その後にQ2の開腹を行ったところ、両子宮角が水腫状に腫大していることが明らかとなり(子宮水症を発症)、今後、受胎することが難しいと判断し、生殖器(卵巣および子宮)を摘出した。今回は、手術を行う前に腹部超音波検査を行っていなかったため、子宮の異常に気がつかなかった。そのため、今後は、手術前に腹部超音波検査を行う必要があると考えられた。なお、T2から採取した精液は人工授精には使用しなかったため、凍結精液を作成した。

また摘出した卵巣はまだ排卵前で、卵胞が多数形成されて

いたため、その卵胞から卵子を回収し、体外成熟培養および体外受精を行うことを試みたが、事前の準備がうまくいかず、卵子は回収できたものの、培養にて成熟せず、体外受精を行うことはできなかった。

次に、Q4に同様の人工授精を行うことを計画した。雄猫は、前回と同様にT2とした。実験前にまずQ4の腹部超音波検査を実施し、子宮と卵巣の状態を確認したところ、子宮は少し腫大しているが、液体の貯留はなく、問題はないと考えた。T2からかなり良好な精液が採取され、Q4の開腹手術を行ったところ、子宮が少し太く、正常な猫の2倍ぐらいに腫大していることが明らかとなった。子宮内には液体の貯留はなく、子宮壁が厚くなっていたため、この変化は高齢性の変化と考え、左右の子宮角に精液を注入した。しかし、その後妊娠は確認できなかった。なお、妊娠診断時の血中プロゲステロン値は高値を示しており、排卵していることが確認された。

これらの所見から、7歳以上の高齢猫で妊娠を成立させることは難しいと考えた。そこで、同じFSEC家系の若い猫の入手が可能であるかについて、入手元に問い合わせを行ったところ、同家系の雌猫(1歳、Q5)がいることがわかり、この猫を購入して、現在いるFSEC家系の雄猫との繁殖を行うことを計画した。この猫は、若い猫であるため、今後、まず自然交配を試みて、その後、もし自然交配ができない場合は、人工授精を行うことを計画した。

## 5 伴侶動物の悪性腫瘍に対する分子標的治療の開発とその個別化応用の構築

### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医学科  
教授 盆子原誠

### 2. 研究の目的

現在の伴侶動物の悪性腫瘍に対する化学療法には、次の大きな2点の問題がある：1) 獣医臨床で用いられている抗がん剤のほとんどはDNA合成や微小管重合を阻害する非特異的殺細胞性の抗がん剤である。このような抗がん剤は増殖の活発な正常細胞を傷害するため、骨髄毒性や消化器毒性と言った副作用が生じ、QOLの低下や治療の継続が困難となることが多い。2) 悪性腫瘍は病理学的に同一種の腫瘍であっても個体間で著しい多様性があり、各症例によって異なる増殖機構や生存機構を有することが多い。臨床では多くの

	SHP2				
	Wild-type	p.Ala72Gly	p.Glu76Ala	p.Glu76Gln	p.Gly503Val
Predicted conformation (in silico)	Closed	Closed	Open	Open	Closed
Activation status (recombinant protein)	Not-activated	Activated	Activated	Activated	Not-activated
Downstream signaling affected by SHP099	Not identified (non-ERK/AKT/STAT3)	Not identified (non-ERK/AKT/STAT3)	ERK	Not identified (non-ERK/AKT/STAT3)	Not identified (non-ERK/AKT/STAT3)
Susceptibility to SHP099					
Protein level	-	Moderate	High	High	-
Cell level	Non-susceptible	Moderate	High	High	Non-susceptible
In vivo (xenograft)	ND	ND	High	ND	ND
Abbreviations: -, not applicable; ND, not determined.					
<sup>a</sup> Tani et al., 2020.					

場合は病理学的な診断名（腫瘍名）に基づいて抗がん剤が選択されている。このため、同じ腫瘍の症例に同じ抗がん剤を用いても、症例により効果が異なり、効果が得られる症例が存在する一方で、効果が見られず副作用ばかりが生じる無益な治療となっている場合もある。

そこで本研究では、犬および猫において臨床的に重要な2つの難治性悪性腫瘍（組織球性肉腫と扁平上皮癌）に注目し、腫瘍細胞がその増殖・生存において強く依存する分子機構（oncogene addiction）を探索・同定し、それを標的とした新たな分子標的治療を生み出すことを目的とした。

### 3. 研究の計画・方法

【組織球性肉腫】これまでの研究において、一部の症例では細胞増殖シグナル伝達分子である SHP2 遺伝子に変異を持つことを明らかにしている。また、変異には様々なタイプが存在し、*in silico* 解析で変異部位により SHP2 の立体構造への影響に違いがあることを明らかにしている。本研究ではこれらの知見をもとに、変異 SHP2 組換え蛋白を作製し、変異による増殖シグナル強度の変化を明らかにすることとした。また、SHP2 のアロステリック阻害剤 (SHP099) の SHP2 変異陽性組織球性肉腫細胞に対する毒性を *in vitro* および組織球性肉腫マウスモデルで検討した。

【扁平上皮癌】近年、株化細胞において一部の細胞株 (3/10 株) は EGFR/HER2 阻害剤 アファチニブに高い感受性を有することを明らかにした。一方、感受性細胞株には EGFR/HER2 の変異や過剰発現は見られず、これらの細胞株では未知のアファチニブ標的分子が増殖ドライバーになっていることが示唆された。そこで、本研究ではアファチニブ感受性細胞株を用いてアファチニブ存在下/非存在下でキナーゼプロファイリングを行い、標的候補分子を抽出した。また、標的候補分子については、アファチニブの作用機構を検討した。さらに、犬の扁平上皮癌移植マウスモデルを用いて、アファチニブの *in vivo* での効果を評価した。

### 4. 研究の特色

本学では、以前より oncogene addiction の研究が活発に行われており、これにより分子標的治療の臨床導入が先駆的

に行われてきた。本研究ではこの特色をさらに深化させ、難治性悪性腫瘍に対する新たな分子標的治療の開発と応用を試みるものである。

### 5. 研究の成果

【組織球性肉腫】株化細胞より4種類の SHP2 変異 (p.Ala72Gly, p.Glu76Ala, p.Glu76Gln, p.Gly503Val) を同定した。これらの変異 SHP2 の解析結果 (*in silico*、組換え蛋白の活性、下流シグナル経路の活性化状態、蛋白・細胞・マウスレベルでの SHP099 感受性) を Table 1 に示した。SHP2 p.Glu76Ala および p.Glu76Gln は、*in silico* 解析および組換え蛋白の解析のいずれにおいても恒常的に活性化することが示され、またいずれも蛋白および細胞レベルで SHP099 に感受性を有することが示された。SHP2 p.Glu76Ala については、マウスモデルにおいても SHP099 の明らかな抗腫瘍活性が認められた。一方、SHP2 p.Gly503Val は非活性化型であり、SHP099 に非感受性であることが示された。SHP2 p.Ala72Gly は恒常的に活性化するが、SHP099 に対する感受性は中等度であった。犬の組織球性肉腫において、SHP099 は SHP2 p.Glu76Ala あるいは p.Glu76Gln を標的とした新たな治療薬となる可能性が考えられた。

【扁平上皮癌】アファチニブ感受性株化細胞では、非感受性細胞株と異なり膜蛋白 A のリン酸化が亢進していることが示された。また、このリン酸化は、アファチニブにより強く抑制された。さらに犬扁平上皮癌のマウスモデルを作製し、アファチニブ投与を行ったところ、著しい抗腫瘍効果が認められた。一方、アファチニブ感受性株化細胞において膜蛋白 A の変異解析を行ったところ、変異は認められなかった。この株化細胞では、膜蛋白 A と相互作用することが知られている膜蛋白 B が過剰発現していることが示された。また、この株化細胞において膜蛋白 B を siRNA でノックダウンすると、膜蛋白 A のリン酸化が抑制され、細胞死が誘導されることが示された。以上の事から、特定の犬の扁平上皮癌では膜蛋白 B の過剰発現が膜蛋白 A のリン酸化を誘導しており、アファチニブこのリン酸化を阻害することで抗腫瘍効果をあらわすと考えられた。犬の扁平上皮癌にはこのよ

うな増殖機構を有する場合があり、そのような扁平上皮癌についてはアフアチニブが新たな治療薬となる可能性が考えられた。

## 6 シェルターメディスンの確立のための獣医疫学研究

### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医学科  
講師 田中亜紀

### 2. 研究の目的

日本の獣医科大学には、まだ「シェルターメディスン」の分野が発展していない。シェルターメディスンは、犬や猫の集団管理に対する獣医学「集団獣医学」、動物虐待の科学的評価や獣医学的対応に関わる獣医学「法獣医学」、災害時の動物管理や平時の動物に関わる防災対策を講じる「災害獣医学」からなる。具体的には、動物シェルター（行政の愛護センターや保健所、民間団体を含む）等に収容された伴侶動物、ブリーダーやペットショップ、オークションに対する群管理や集団適正飼養および動物福祉の向上、動物虐待に対する獣医学的知見の検証、災害時の動物管理等や地域防災を獣医学的にアプローチを研究する分野である。犬や猫の殺処分の問題、動物虐待に対する獣医師の報告の義務化、また、多様な発災リスクが高まる中での被災動物の管理等、獣医師の社会に求められるニーズは多様化している。獣医師および獣医科大学の社会貢献および社会連携が求められる中、「シェルターメディスン」の分野を獣医疫学研究の基に確立し、人と動物と地域の安全を守る獣医学の発展を本研究の目的とする。

### 3. 研究の計画・方法

#### 1. 集団獣医学【伴侶動物の集団適正飼養および動物福祉の向上】

##### ①行政動物愛護センターにおける獣医疫学調査

動物の引き取り理由（放浪、飼育放棄、迷子）、収容期間中の疾患発生の有無、結末（安楽死、譲渡、返還）等のデータを収集し、獣医疫学的解析を実施することにより、多頭飼育施設における適正な集団飼養および疾患管理プロトコルを確立する。

本年度計画：行政動物愛護センターでのデータ収集（10カ所確約済み）、聞き取り調査、現場視察

##### ②ブリーダー／オークションにおける獣医疫学調査

ブリーダーやオークションで飼養される動物の飼養管理状況、疾病発生状況、問題行動の発生状況の獣医疫学調査を行い、動物愛護法改正で設置された犬猫繁殖業者の適正飼養管理基準の実態を把握する。

本年度計画：ブリーダーおよびオークション（埼玉県）での現場視察、データ収集

#### 2. 法獣医学【動物虐待に対する獣医学的アプローチ】

・日本で起きた動物虐待事例を、警察庁および環境省（既に連携確約済み）との連携で集積し、動物虐待実態調査を行う。動物虐待の疑いのある不審死体の解剖検査、毒性検査、CT撮影等を実施し、動物虐待に対する獣医学的評価基準を

獣医疫学的に検証する。動物虐待の疑いのある生きた事例に対しての獣学的処置および対応策について講じる。

本年度計画：事例の集積、不審死体の解剖検査、現場視察（多頭飼育崩壊、動物カフェ等を含む）

#### 3. 災害獣医学【災害時における動物管理および獣医師の役割】

①災害時の被災動物管理の体制を検証するために、過去の災害事例および被災動物の実態調査を行う。米国では、災害時に対応する獣医師のチームが獣医科大学においても発展している。日本での実態調査を踏まえながら、海外事例を取り入れ、日本独自の災害時の獣医療体制の確立を目指す。

②自治体での災害シミュレーション訓練を実施し、その効果を検証する

本年度計画：行政等での災害対策や被災動物管理体制の実態調査、災害シミュレーション訓練の開発

#### 4. 研究の特色

本研究は、新しい獣医学的分野を本学で発展し、日本の獣医学を牽引するという大きな特色を持つ。動物福祉に対する関心は社会的にも高まっており、動物愛護法の改正や動物虐待への厳罰化を受け、獣医師の担う社会的なニーズは多様化している。シェルターメディスンを通して、社会のニーズに応える獣医学的研究を実施することは、本学の特色にもなり、また、学生にも獣医師の社会貢献や地域の動物問題についての実践的な教育を行うことが可能である。

#### 5. 研究の成果

##### 1. 集団獣医学【伴侶動物の集団適正飼養および動物福祉の向上】

###### ①行政動物愛護センターにおける獣医疫学調査

2021年においては、新潟県動物愛護センター、岡山県動物愛護センター、船橋市動物愛護センターにおいて、データ収集を開始した。コロナ禍のため、現地視察は実施していない。引き続き、次年度においても行政愛護センターのデータ収集を引き続き実施する。

###### ②ブリーダー／オークションにおける獣医疫学調査

2021年度においては、ブリーダー8カ所、オークション1カ所において、動物の飼養環境、動物の管理状況、外観所見に関するデータを収集した。引き続きブリーダー視察を実施し、データの収集を実施する。

##### 2. 法獣医学【動物虐待に対する獣医学的アプローチ】

2021年度においては、動物虐待の疑われる不審死体について、195検体の解剖検査を実施した。そのうち、人為的な外傷が疑われたのが88検体、中毒が疑われたのが37検体、ネグレクトが疑われたのが43検体、交通事故が13検体、内因死が示唆されたのが14検体であった。

##### 3. 災害獣医学【災害時における動物管理および獣医師の役割】

2021年度は、東京都および岐阜県において、災害時の動物管理に関わる研修会およびオンラインシミュレーション実習を実施した。

東京都における災害シミュレーション実習については、第

1 回、第 2 回に分けて実施し、シミュレーションの効果を検証した。区市町村の災害担当部署および動物愛護推進委員との連携を図ることを目的とし、遠隔でのオンライン形式で行ったが、実際の想定に則した形式であったとの評価が多かった。

## 7 Ca 拮抗薬による細胞内ネココロナウイルス複製阻害作用の解析

### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医学科  
教授 田中良和

### 2. 研究の目的

ネココロナウイルス (FCoV) の強毒株 (FIPV) 感染によって起こる猫伝染性腹膜炎 (FIP) は致死率の高い感染症である。このため、国内外において、FIP に対し様々なワクチンや抗ウイルス薬の開発研究が行われてきたが、承認薬で著効を示すものはなかった。FIPV はマクロファージに吸着後、エンドソーム内で分解されずに脱殻し、ウイルス増殖するのが特徴である。エンドソーム内の分解酵素が pH 依存性に作用するため、申請者はカルシウム (Ca) イオンが pH を制御することに着目し、Ca 拮抗薬の FIPV 複製阻害効果を検証した。その結果、いくつかの Ca 拮抗薬が FIPV の複製を阻害することを発見した。本研究の目的は、FIPV 複製に影響を及ぼす各 Ca 拮抗薬がどのような分子機構によって作用しているのかを明らかにし、さらに、標的 Ca チャンネルシグナルカスケードに関わる阻害剤の検索により、FIP 予防薬・治療薬開発への研究基盤を構築することを目指す。

### 3. 研究の計画・方法

Ca 拮抗薬によるウイルス複製阻害作用がウイルス増殖のどのステップの阻害によるものかを明らかにする。各実験において共焦点レーザー顕微鏡を用いて Ca 拮抗薬による Ca 量の変化を定量化・モニターリングしつつ以下の実験を行う。①ウイルス吸着・侵入阻害効果の解析：ルシフェラーゼを発現するレンチウイルスベクターを構築し、外被蛋白質に FIPV のスパイク蛋白質をもつシュードタイプウイルス粒子を作製する。Ca 拮抗薬存在下でのウイルス吸着阻害効果を解析するため、細胞融合が起こらない 4℃ 条件でウイルスを細胞に感染後、細胞表面での吸着効率を共焦点レーザー顕微鏡で解析・評価する。また、Ca 拮抗薬存在・非存在下でウイルス侵入効率をルシフェラーゼ活性で比較解析する。②細胞内ウイルス遺伝子複製阻害効率の解析：Ca 拮抗薬存在・非存在下での FIPV 感染細胞内のウイルス遺伝子複製効率を定量 PCR 法で比較解析する。

### 4. 研究の特色

申請者の予備実験で阻害効果を認めた L 型 Ca 拮抗薬の一部が SARS-CoV2 (COVID-19) においてもウイルス複製阻害効果をもつことが示された (Ou et al, Nat Commun. 11:1620 2020)。すなわち、ある種の Ca 拮抗薬が全ての CoV 科に対し効果を示す薬剤である可能性が高い。このため、本研究では Ca 依存性小胞輸送システムにおけるウイルス増殖

機構を解析することで未知の研究成果を得ることができる。また、ウイルス増殖機構に必要な宿主蛋白質を標的とした耐性ウイルスの産生も少ない新たな予防薬・治療薬の開発に役立てることができる。本研究の利点は国内外ですでに認可済みの Ca 拮抗薬をドラッグリポジショニングし、ウイルス複製阻害剤として利用することで、迅速な臨床応用が可能である。同時に COVID-19、SARS を含む重症ヒトコロナウイルス感染症や経済的損失の大きい産業動物コロナウイルス感染症にとって有効な創薬研究の展開が期待できる。したがって、本研究は、医学・獣医学領域の横断的なトランスレーショナルリサーチのモデルとなりうる。

### 5. 研究の成果

Ca 拮抗薬によるウイルス複製阻害作用がウイルス増殖のどのステップの阻害によるものかを明らかにするため、外被蛋白質に FIPV の S 蛋白質を有し、ルシフェラーゼ遺伝子を発現するレンチウイルスベクターの構築を試みた。ネコ細胞株 fcwf4 細胞に感染 48 後にルシフェラーゼ解析を行なった結果、15,406 LU を発現する組換えウイルスの構築に成功した。しかし、作成したウイルスの力価が不安定で、ウイルス精製過程で不活化されるものが多く今後、安定した組換えウイルスの精製法を検討する余地があることがわかった。一方、ウイルス阻害効果が、細胞内 Ca イオン濃度に大きく作用されることが予備実験で明らかになったため、エンドソームに特異的に発現する TPC-1 および TPC-2 Ca チャンネルのノックアウト (KO) 細胞を CRISPR-Cas9 システムにて樹立した。この各 KO 細胞に FIPV を感染させた後、ウェスタンブロット法にてウイルス蛋白質の発現量を解析した。その結果、TPC-1 および TPC-2 の各々の KO 細胞において FIPV の増殖が、ほぼ完全に抑制された。次いで、この 2 種類の細胞に各遺伝子を強制発現させ、ウイルスを感染させた後、ウェスタンブロット解析を行なったところ、ウイルスの増殖が回復した。このことは、両 TPC Ca チャンネルがウイルス増殖に大きく関与していることを示した。さらに TPC-1 および TPC-2 Ca チャンネル発現を制御している PIK-FYVE カイネースを特異的阻害剤である apilimod および YM-201636 で fcwf4 細胞を処理したところ、各々、1  $\mu$  M 以下の濃度で完全にウイルス増殖を阻害した。

今後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、各 Ca 拮抗薬の存在下および両 TPC-KO 細胞の細胞内 Ca の濃度を数値化し、ウイルス増殖における Ca 濃度の影響を解析する必要がある。

## 8 イヌの乳腺腫瘍易罹患性と品種多様性の関連を明らかにする研究

### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医学科  
准教授 落合和彦

### 2. 研究の目的

イヌ (イエイヌ: *Canis Lupus Familiaris*) は数万年前にオオカミから家畜化されて以来、ごく短期間に爆発的な品種

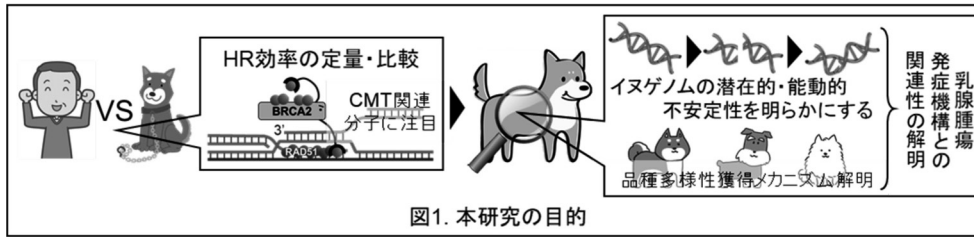


図1. 本研究の目的

多様性を獲得した。生物の多様性を生み出す原動力は、配偶子形成時に能動的に起こる DNA 2 本鎖切断 (Double Strand Break: **DSB**) と相同組み換え修復 (Homologous Recombination: **HR**) だと考えられている。HR に関与する遺伝子群の構成因子として、RAD51 と BRCA2 があるが、**BRCA2 の変異**による HR 機能の喪失はヒトで**遺伝性乳がん発生の**起点となることが知られている。雌イヌの乳腺腫瘍発症率は非常に高く、**ヒト女性の約 3 倍**であり、イヌが乳腺腫瘍易罹動物種であることは疑いない。以上の事実を総合すると、イヌは進化の原動力である HR が起こりやすい反面、乳腺腫瘍に罹患しやすくなった稀有な動物種であることが考えられる。申請者は、この仮説を立証するために、これまで、ヒトとイヌの BRCA2、RAD51 の分子機能解析を行ってきた。本研究では、ヒトとイヌの BRCA2、RAD51 構造比較から同定した機能ドメインと HR 効率の関係性を細胞生物学的的手法により解析し、「**イヌの乳腺腫瘍易罹患性と品種多様性の関連を明らかにする**」ことを目的とした (図 1)

3. 研究の計画・方法

本研究では、イヌ乳腺腫瘍症例から引き続きイヌ乳腺腫瘍関連遺伝子の変異検索を行いつつ、ヒト型 BRCA2 および RAD51 にイヌ型アミノ酸構造を導入して、HR 効率の定量・比較を行い、イヌ CMT 関連分子群の独自性を明らかにする。具体的には

- ① 外科手術によりイヌ乳腺腫瘍症例から摘出された腫瘍組織の BRCA2、RAD51 変異検索を行い、病理プロファイルと遺伝子変異の相関について解析する。また、新規変異については、*in silico* 分子構造改変シミュレーションにより、機能変化予測を行う。これは、データベース上に存在するタンパク質立体構造解析が行われた CMT/HR 関連分子にイヌ型アミノ酸を外挿し、分子内で起こりうる立体構造変化を予測し、機能変化を類推できる研究手法である。

- ② 発見したイヌ CMT 由来 BRCA2、RAD51 遺伝子変異および、ヒトとイヌの構造比較で発見した推定機能アミノ酸をヒト型→イヌ型に改変したキメラ分子を作製する。
- ③ ②で作製したキメラ分子を培養細胞に強制発現し、HR 効率を定量する方法の一つである Direct-Repeat-GFP Assay (DR-GFP Assay) で定量・比較する (図 2 左)
- ④ DR-GFP Assay で明らかとなった HR 効率に有意な差を生み出す BRCA2/RAD51 構造改変分子を用いて、Assay for Site-Specific HR Activity (ASHRA) を行う (図 2 右)。本研究手法で用いる CRISPER/Cas9 マーカー配列挿入部位は ASHRA 開発者が用いている ACTB 遺伝子 ( $\beta$ -actin をコード) を第一選択とするが (Yoshino *et al.*, 2019, *Sci Rep*)、我々の研究でヘテロ接合性の消失 (LOH) の発生が確認されている BRCA2 配列も候補とする (Yoshikawa *et al.*, 2008, *Am J Vet Res*)。

4. 研究の特色

本研究計画の発端は、遺伝性乳がん関連遺伝子として知られていた BRCA2 と RAD51 の相互作用に着目したことである。申請者はこれまでに、乳腺腫瘍罹患が非常に多いイヌで BRCA2 および RAD51 をクローニングし、CMT 罹患症例での変異検索およびその機能を研究する過程で、両者がイヌ独自の相互作用様式を示すことを発見した。本研究の学術的独自性は、BRCA2-RAD51 相互作用が①「DNA 二本鎖切断時の HR 反応開始に関与する」②「ゲノム安定性維持に関与し、その破綻がゲノム不安定化～乳がん発症に繋がる」というこれまでの研究結果と、イヌの乳腺腫瘍易罹患性と品種多様性という現象を結び付けた点にある。この着想は、哺乳動物全般を医療の対象とし、生命現象解明の対象として主体的に研究する獣医師ならではの発想である。この着想に基づき、イヌ CMT 関連分子群による HR 効率を定量することによって、HR 効率を高める分子構造を検索することは、分子

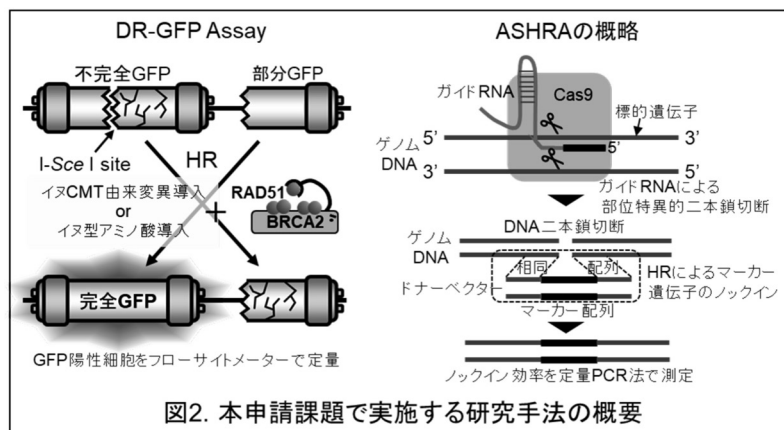


図2. 本申請課題で実施する研究手法の概要



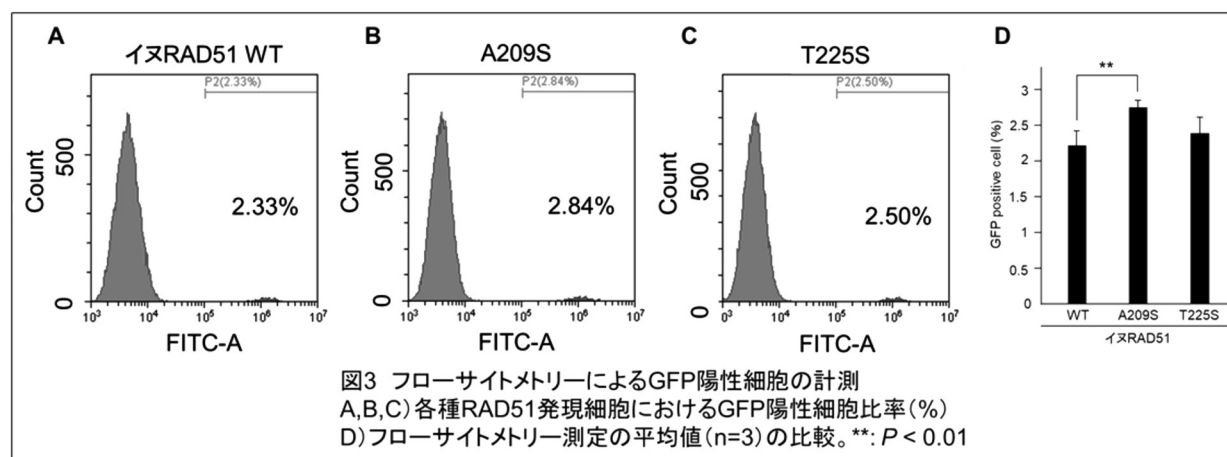


図3 フローサイトメトリーによるGFP陽性細胞の計測  
A,B,C)各種RAD51発現細胞におけるGFP陽性細胞比率(%)  
D)フローサイトメトリー測定の前平均値(n=3)の比較.\*\*:  $P < 0.01$

進化の原動力を解明する起点となる可能性を秘めた創造性をもつ。また、CMT 罹患がイヌ特有のゲノム不安定性に起因する事が証明されれば、新たな予防・治療戦略創出につながる可能性があり、獣医療の発展に寄与することは間違いなく、本学の特色ある研究の一翼を担う。

## 5. 研究の成果

DR-GFP assay を行うために、HeLa 細胞に pDR-GFP を導入し、puromycin 添加培地中で限界希釈培養を行った結果、7 クローンの細胞株が得られた。これらに pCBASceI を強制発現させ、I-SceI による DSB 惹起に伴う HR を誘導し、GFP 陽性細胞を観察した結果、最も多くの GFP 陽性細胞が観察されたクローン No. 4 を続く実験に供した。DR-GFP HeLa 細胞株に各種イヌ RAD51 と pCBASceI をトランスフェクションし、フローサイトメトリーにより GFP 陽性細胞数を測定したところ、WT 発現細胞に対し、A209S 導入細胞で GFP 陽性細胞数の有意な増加が観察された (図 3)。本研究で得られた成果と、これまでの先行研究を併せて今後の研究計画を推敲し、本学特色ある研究を引き続き推進する予定である。

本研究に関連し、2021 年度中に発表した業績を以下に列挙する。

- 1) Subleukaemic T-Lymphoblastic Leukaemia in a Horse. Michishita M, Shibata R, Machida Y, Matsumoto M, [Ochiai K](#), Azakami D. *J Comp Pathol.* 2021 Oct;188:21-25. doi: 10.1016/j.jcpa.2021.08.002.
- 2) Phenotypic and Genetic Characterization for Incompatible Cross-Match Cases in the Feline AB Blood Group System. Uno Y, Yaguchi M, Kobayashi T, Onozawa E, [Ochiai K](#), Yoshida K, Nakamura C, Udagawa C, Omi T. *Front Vet Sci.* 2021 Sep 13;8:720445. doi: 10.3389/fvets.2021.720445.
- 3) Gastric Plasmacytoma with Immunoglobulin Lambda Light Chain Deposition in a Dog. Hanari N, Nagashima T, Machida Y, Kubo Y, Hamamoto Y, Kamiie J, [Ochiai K](#), Azakami D, Michishita M. *J Comp Pathol.* 2021 Aug;187:7-10. doi: 10.1016/j.jcpa.2021.06.005.
- 4) Involvement of Nestin in the Progression of Canine

Mammary Carcinoma. Yoshimura H, Moriya M, Yoshida A, Yamamoto M, Machida Y, [Ochiai K](#), Michishita M, Nakagawa T, Matsuda Y, Takahashi K, Kamiya S, Ishiwata T. *Vet Pathol.* 2021 Sep;58(5):994-1003.

- 5) Identification of the core motif of the BRCA2 C-terminal RAD51-binding domain by comparing canine and human BRCA2. Yoshikawa Y, Morimatsu M, [Ochiai K](#), Ishiguro-Oonuma T, Morioka R, Okuda K, Orino K. *J Vet Med Sci.* 2021 May 9;83(5):759-766. doi: 10.1292/jvms.21-0006.
- 6) The number of glutamines in the N-terminal of the canine androgen receptor affects signalling intensities. [Ochiai K](#), Sutijarit S, Uemura M, Morimatsu M, Michishita M, Onozawa E, Maeda M, Sasaki T, Watanabe M, Tanaka Y, Omi T. *Vet Comp Oncol.* 2021 Jun;19(2):399-403.

## 9 新規に同定した盲導犬適正遺伝マーカーの実装に関する研究

### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医保健看護学科  
教授 近江俊徳

### 2. 研究の目的

盲導犬は、重度の視覚障がい者が戸外を歩行する際の安全性を確保するために訓練された犬で、全国にある盲導犬施設で育成されている。盲導犬を希望している視覚障がい者は約 8,000 名 (推定) とも言われるが、現在実働している盲導犬は約 1000 頭とその数は不足している。理由の一つに盲導犬訓練に対する合格率が約 30% に留まっていることが挙げられる。近年、盲導犬の合格率を向上させるアプローチの一つとして、盲導犬の適正を早期に予測するため気質関連遺伝子の中から盲導犬の適正に関連した遺伝的マーカーが報告され、一部訓練犬や繁殖犬の選別に用いられている。一方で、気質は多因子遺伝であるため、多くの関連遺伝子が存在すると推測されるが、報告されている遺伝子はごく限られている。我々はゲノムワイド関連解析 (GWAS) を端緒に、盲導犬の適正に関連した新規の遺伝子及びその遺伝子型を同定した。そこで、本研究では、当該遺伝子の遺伝的マーカーを

用いて、盲導犬の合格率の向上及気質の選別など、科学的研究で得られた成果を社会に還元することを目的に、今年度は、当該 SNP の多様性と品種差について検討した。

### 3. 研究の計画・方法

我々がゲノムワイド関連解析 (GWAS) を端緒に見出したイヌ第 28 番染色体上に位置する盲導犬適正関連遺伝子 X の SNPA>G をマーカーとして、当該 SNP を包含する遺伝子領域を PCR 法により増幅後、ダイレクトシーケンシング法にて遺伝子型を決定した。材料は、臨床病理学研究室より分与された血液関係のない、ラブラドル・レトリバー 50 例とゴールデン・レトリバー 33 例の血液から抽出したゲノム DNA を用いた。また、各種臓器由来の RNA (市販) を用いて、RT-PCR 法により遺伝子 X の遺伝子発現を解析した。

### 4. 研究の特色

分子遺伝学的解析技術を応用し、より盲導犬に適した訓練犬を選抜することで、盲導犬の訓練合率を向上させ、盲導犬不足の問題の解決の寄与することを目的としている。本研究では、これまでに報告されていない新規の盲導犬関連遺伝子を応用するオリジナリティーの高い研究である。

### 5. 研究の成果

SNPA>G の遺伝子型を決定した結果、ゴールデン・レトリバー 50 例では、GA 型が 60%、AA 型が 30%、GG 型が 10% で、対立遺伝子頻度は、A が 0.800、G が 0.200 であった。一方、ゴールデン・レトリバー 33 例においては、AA 型が 93.9%、GA 型が 6.1% であった。対立遺伝子頻度は A が 0.030、T が 0.970 であった。2 品種間の遺伝子型を GG 型 +GA 型と AA 型に分類し、 $\chi^2$  検定した結果、統計学的な有意差が見出された ( $p=3.59E-08$ )。我々のこれまでの解析で、G アレルを有する GA 型及び AA 型が盲導犬の適正に関連があることを見出している。今回の結果、盲導犬に多いラブラドル・レトリバーは、盲導犬に適正が認められる CC 型、CT 型が高頻度に分布している事が初めて明らかにされた。この結果は、ラブラドル・レトリバーが盲導犬に適正があることを遺伝学的にも裏付けた。一方で、同じレトリバーでも、ゴールデン・レトリバーは、ほとんどが盲導犬の適正と関連ない AA 型に固定されていた。このことは、SNPA>G は、ゴールデン・レトリバーとラブラドル・レトリバーの気質の違いに関与していることが示唆された。同時に、盲導犬にゴールデン・レトリバーが少ない遺伝的要因となっていると考えられた。

一般に気質 (盲導犬) 関連遺伝子は、脳に発現する遺伝子であることが知られている。そこで、遺伝子 X が脳に発現しているかどうか各種臓器由来の RNA (市販) を用いて、RT-PCR 法により解析した。その結果、遺伝子 X は脳での発現が認められた。

本研究の実施により、150 例以上で構成される盲導犬群と非盲導犬群の解析で見出された遺伝子 X の SNPA>G 座位における盲導犬の適性をさらに支持する結果となり、今後、本遺伝子マーカーを社会に還元する基礎的な知見を得ることができた。今後、GA 型及び AA 型のラブラドル・レトリ

バーを訓練候補犬に多用することで、盲導犬合格率の向上が期待される。

## 10 NVLU Amami Project ~奄美群島の稀少な野生動物の死因究明体制の確立~

### 1. 研究者の所属・氏名等

獣医学部 獣医保健看護学科学科  
講師 吉村久志

### 2. 研究の目的

奄美群島は鹿児島と沖縄のほぼ中間に位置する亜熱帯気候に属する離島で、大陸ではすでに絶滅した種が遺存し、さらに島嶼間の種分化も生じて、世界的にも稀少で固有な野生動物が生息する生物多様性保全上重要な地域である。奄美群島には特別天然記念物のアマミノクロウサギをはじめ、天然記念物のトゲネズミ、ケナガネズミ、ルリカケス、オオトラツグミなどの固有種が存在するが、いずれも生息数が限られており絶滅が危惧されている。近年、国内の飼育ウサギで兎ウイルス性出血病 2 型が発生するなどしており、島内に新たな伝染病が侵入すれば稀少な野生動物に大きな打撃を与える可能性がある。奄美群島では地元住民からの通報により環境省が野生動物の死亡個体を回収しているが、それらの死因を調査する体制は整っていなかった。そこで申請者らは 2017 年から、環境省奄美野生生物保護センターや島内の動物病院と協力し、本学獣医寄生虫学研究室と共に野生下で斃死した個体や保護後に亡くなった個体の病理検査を実施している。本研究プロジェクトは、奄美群島の稀少な野生動物の死因究明による伝染病の侵入の早期発見と、病理学的データの蓄積、それらの情報を現地にフィードバックする体制を確立することを目的とする。

### 3. 研究の計画・方法

野生下斃死個体に関しては病理検査、微生物検査、寄生虫検査を実施し、伝染病の発生・蔓延の監視を行う。傷病保護個体に関しては、生体試料や剖検材料の検査を行い、病理学的基礎データを蓄積する。重要な疾病や病原体に関しては学内外の研究者と共に詳細な解析を行い、学会で報告を行う。また島内の担当者に疾病情報のフィードバックを行い、島内の疾病対策や臨床治療に還元する。

### 4. 研究の特色

本研究プロジェクトは「特色ある研究プロジェクト」が掲げる、“人と動物が安心できる暮らしの実現”、“都市と地方をつなぐ”、“One Health に貢献する研究拠点の形成”などのテーマをすべて内包しており、本学の特色を生かした社会貢献性の高い内容である。本活動は、当研究室を中心に獣医



NVLU Amami Project

寄生虫学研究室とも連携して「NVLU Amami Project」と題した学科をまたいだ体制を整えつつあり、奄美群島が世界自然遺産に登録される見込みとなるなかで、本学に注目を集める大きなプロジェクトになると考えている。

## 5. 研究の成果

2021年度は、奄美大島において2020年～2021年の間に野生下で斃死した状態で見つかった、あるいは傷病鳥獣として動物病院に保護された後に死亡した野生動物の剖検例の病理検査を実施した。

検査を行った動物とその死因あるいは主要な病理所見は下記の通りである（計27個体）。

### 【哺乳類】

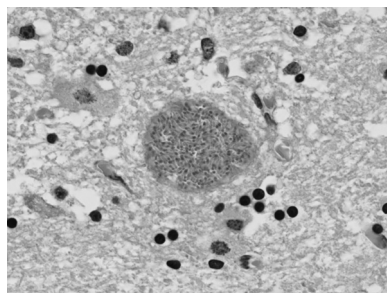
アマミノクロウサギ *Pentalagus furnessi* 特別天然記念物、国内希少野生動植物種、絶滅危惧IB類（EN）

- ① 20-024 細菌性尿路感染症、肝塊状壊死、他
- ② 20-050 レプトスピラ症、小葉中心性肝細胞壊死、他
- ③ 20-051 真菌性肺炎・肝炎、化膿性盲腸炎、腸条虫寄生、他
- ④ 20-097 事故による脊髄損傷、他
- ⑤ 20-105 子宮破裂、細菌性腹膜炎、他
- ⑥ 20-150 敗血症細菌感染症、脳トキソプラズマ寄生、他
- ⑦ 20-175 事故による股関節脱臼
- ⑧ 21-075 事故
- ⑨ 21-169 検査中
- ⑩ 21-205 誤嚥性肺炎、他

ケナガネズミ *Diplothrix legata* 天然記念物、国内希少野生動植物種、絶滅危惧IB類（EN）

- ① 20-032 肝臓帯状囊尾虫（猫条虫）寄生、他
- ② 20-161 脱水によるショック

### 【鳥類】



オオトラツグミ *Zoothera dauma major* 天然記念物、国内希少野生動植物種、絶滅危惧II類（VU）

- ① 21-095 腺胃マイクロテトラメレス寄生、他
- ② 21-178 腸コクシジウム寄生、他

ルリカケス *Garrulus lidthi* 天然記念物

- ① 21-021 食滞、他
- ② 21-022 食滞
- ③ 21-023 食滞
- ④ 21-041 アスペルギルス症、他

アマミヤマシギ *Scolopax mira* 国内希少野生動植物種、絶滅危惧II類（VU）

- ① 21-238 腺胃テトラメレス寄生、他
- トラツグミ *Zoothera dauma*

- ① 21-264 腺胃マイクロテトラメレス寄生、肝臓吸虫寄生、他
- リュウキュウズアカアオバト *Treron formosae permagnus*

- ① 20-026 結晶性関節炎、小腸条虫寄生、他

- ② 21-252 検査中

イソヒヨドリ *Monticola solitarius*

- ① 21-222 検査中

オオミズナギドリ *Calonectris leucomelas*

- 21-223 検査中

### 【爬虫類】

アオウミガメ *Chelonia mydas* 絶滅危惧II類（VU）

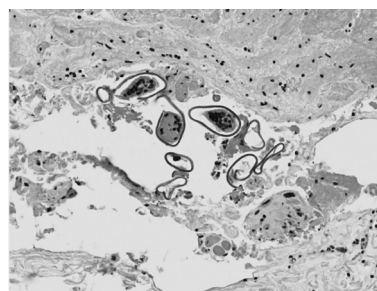
- ① 20-025 住血吸虫寄生
- ② 21-211 肺真菌症（黒色菌糸症を疑う）、他
- ③ 21-253 アニサキス症、他

哺乳類で注目すべき所見として、アマミノクロウサギの脳におけるトキソプラズマのシストや、ケナガネズミの肝臓における帯状囊尾虫（猫条虫）などのネコに由来する寄生虫の感染が挙げられる。これらの寄生虫は、これまでも本プロジェクトにおいて検出されており、2019年には奄美大島の天然記念物アマミトゲネズミがトキソプラズマの感染による肝臓壊死で死亡したことを報告している（Tokiwa et al. *Int J Parasitol Parasites Wildl.*）。近年、奄美群島ではペットとして持ち込まれたネコが野生化したノネコが問題となっているが、ノネコはアマミノクロウサギなどの希少種を直接捕食するだけではなく、外来の病原体を蔓延させることでもその生存を脅かしていることを示している。

もう一つ注目すべきなのは、アマミノクロウサギで今回初めてレプトスピラの感染が確認されたことであった。奄美大島では以前よりヒトにおけるレプトスピラ感染が散発しているが、2019年にはペットのイヌで感染が確認され、その後の調査で野生のリウキュウイノシシや外来種であるクマネズミからも検出された。島内の野生動物にレプトスピラ感染が広がっている可能性もあり、アマミノクロウサギにおける浸淫と病原性について今後も調査を続けていく必要がある。

鳥類では複数種で腺胃におけるテトラメレス科線虫の寄生が初めて確認された。テトラメレス科線虫は通常は不顕性感染だが、重度寄生の場合は死亡する例が知られており、潜在的に保護増殖のリスクとなりうる寄生虫であると考えられる。

このように、本年の調査によっていくつかの注視すべき病原体を確認した。これらの情報は島内の獣医師に提供し、保護治療に役立てている。今後も調査を続け、奄美群島の野生動物の疾病の実態を解明し、その保全につなげていく予定である。



## 11 二酸化炭素マイクロバブルによる酵素失活に関わる変性作用の解析

### 1. 研究者の所属・氏名等

応用生命学部 食品科学科

准教授 小林史幸

### 2. 研究の目的

食品中の一部の酵素は、保存・流通過程において食品の品質劣化を招くため失活させる必要がある。従来、食品の酵素失活は加熱により行っているが、その熱により少なからず食品の品質低下を生じる。その代替法として、加圧二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)を用いた常温での酵素失活に関する研究は世界中の多くの研究者により行われているが、その失活メカニズムは明確になっておらず、実用化もされていなかった。近年申請者が考案した低加圧 CO<sub>2</sub> マイクロバブル (CO<sub>2</sub>MB) は強力な殺菌・酵素失活 (タンパク質変性) 効果を有しており、2016 年に清酒の殺菌・酵素失活技術として世界初の加圧 CO<sub>2</sub> の実用化を達成した。これまでに、CO<sub>2</sub>MB による酵素失活は高次構造の変性・凝集が関与しており、従来の加熱とは異なるメカニズムによることを報告しているが、CO<sub>2</sub>MB が酵素タンパク質にどのように作用するのかわかっていない。また、CO<sub>2</sub>MB による不可逆的な酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) の殺菌には、解糖系酵素の 1 つである glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の失活が関与していることを示唆している。このことから、CO<sub>2</sub>MB による不可逆的殺菌には菌体内の生命維持に関わる酵素の失活が関与していると考えている。このように、CO<sub>2</sub>MB の酵素タンパク質の変性作用は CO<sub>2</sub>MB のカギとなる効果であり、そのメカニズムを解明することによりさらなる発展が期待できる。そこで本研究では、CO<sub>2</sub>MB による酵素失活における変性作用を加熱処理と比較し、その違いについて検討した。

### 3. 研究の計画・方法

1. 試料：市販の  $\alpha$ -アミラーゼ (3.2.1.1) 粉末を 0.2 mol/L 酢酸緩衝液 (pH7) に懸濁させた溶液を用いた。
2. CO<sub>2</sub>MB 処理：表 1 に示す条件で行った。

表 1 CO<sub>2</sub>MB の処理条件

	温度 (°C)	圧力 (MPa)	処理時間 (分)
混合槽	10	2	5
加熱処理槽	55	4	2-30

3. 加熱処理：55 および 75°C で CO<sub>2</sub>MB 処理と同じ処理時間で行った。
4. 失活効果の検討： $\alpha$ -アミラーゼの残存活性は市販の活性測定キット (キッコーマンバイオケミファ株式会社) を用いて測定した。測定結果は減少率の対数値として表し、失活効果を速度論的解析により検討した。
5. 変性の解析：CO<sub>2</sub>MB および加熱処理した  $\alpha$ -アミラーゼ溶液を Native-PAGE により測定した。さらに、各処理した  $\alpha$ -アミラーゼ溶液に SDS を加えて 95°C で 5 分間加熱し、SDS-PAGE により測定した。

6. リフォールディング：CO<sub>2</sub>MB 処理後の  $\alpha$ -アミラーゼを還元剤としてジチオトレイトール (DTT) および 2-メルカプトエタノール (2ME) または変性剤として尿素を SDS と同時に加えて 95°C で 5 分間加熱し、SDS-PAGE により測定した。

7. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量：CO<sub>2</sub>MB および加熱処理後の  $\alpha$ -アミラーゼ溶液を HPLC により測定した。さらに、 $\alpha$ -アミラーゼ溶液に SDS を加えて 95°C で 5 分間加熱し、HPLC により測定した。測定結果は減少率の対数値として表した。

8. トリプシン消化：CO<sub>2</sub>MB および加熱処理後の  $\alpha$ -アミラーゼをトリプシンにより消化させて HPLC により測定した。

### 4. 研究の特色

本研究により CO<sub>2</sub>MB の酵素失活作用が従来の加熱とは全く異なることを明らかにすることで、より効率的な失活システムが構築できる。

### 5. 研究の成果

1. CO<sub>2</sub>MB 処理および加熱処理の  $\alpha$ -アミラーゼに対する失活効果

55°C での CO<sub>2</sub>MB 処理および 75°C での加熱処理により  $\alpha$ -アミラーゼ活性は加熱時間に伴って 1 次反応式に従い減少したが、55°C での加熱処理ではほとんど減少しなかった。また、55°C での CO<sub>2</sub>MB 処理の  $\alpha$ -アミラーゼに対する失活効果は 75°C での加熱処理よりも高かった (図 1)。

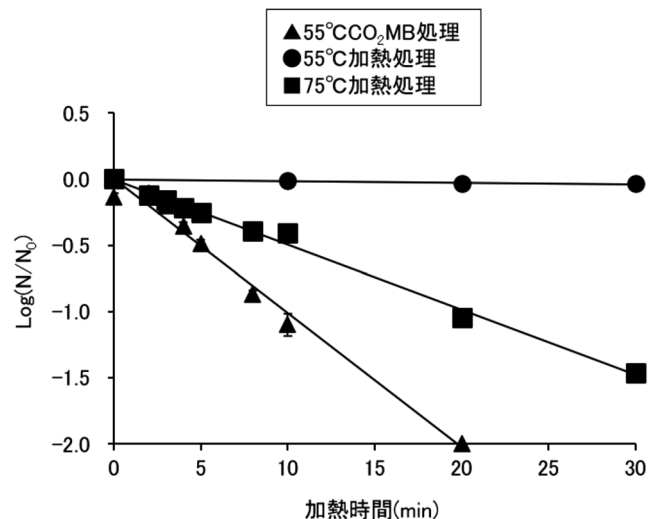


図 1 55°C での CO<sub>2</sub>MB 処理および 55°C および 75°C での加熱処理による  $\alpha$ -アミラーゼの失活

2. CO<sub>2</sub>MB 処理および加熱処理した  $\alpha$ -アミラーゼの Native-PAGE および SDS-PAGE による測定

75°C で加熱処理した  $\alpha$ -アミラーゼの Native-PAGE による測定では、バンド濃度は加熱時間に伴い減少したが、SDS-PAGE による測定ではバンド濃度はほとんど変わらなかった。しかしながら、55°C で CO<sub>2</sub>MB 処理した  $\alpha$ -アミラーゼのバンド濃度は Native-PAGE および SDS-PAGE とともに加熱時間に伴い減少した。そのため、55°C で CO<sub>2</sub>MB 処理した

$\alpha$ -アミラーゼに DTT、2ME または尿素を SDS と同時に加えて加熱し、SDS-PAGE を行ったが、バンド濃度はほとんど変わらなかった。

### 3. CO<sub>2</sub>MB 処理および加熱処理した $\alpha$ -アミラーゼの HPLC による定量

55°C で CO<sub>2</sub>MB 処理および 75°C で加熱処理した  $\alpha$ -アミラーゼを HPLC により定量した結果、Native-PAGE と同様に、 $\alpha$ -アミラーゼの濃度は両処理共に加熱時間に従い減少した。しかしながら、各処理した  $\alpha$ -アミラーゼ溶液に SDS を加えて加熱したものを HPLC で測定すると、75°C で加熱処理した  $\alpha$ -アミラーゼの濃度はほとんど減少せず、55°C で CO<sub>2</sub>MB 処理した  $\alpha$ -アミラーゼの濃度は SDS を添加していない時よりも著しく増加した (図 2)。

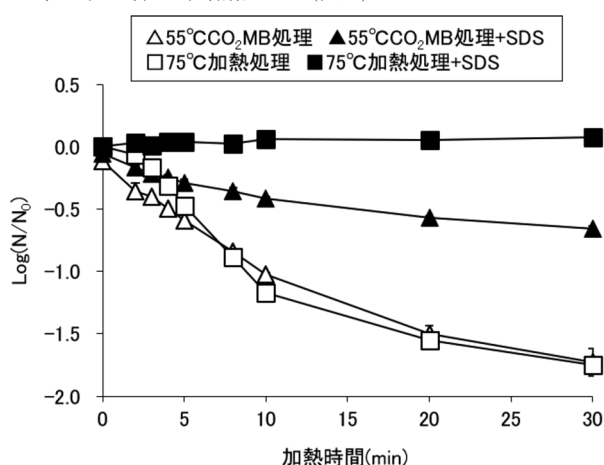


図 2 55°C で CO<sub>2</sub>MB 処理および 75°C で加熱処理した  $\alpha$ -アミラーゼの HPLC による定量

### 4. CO<sub>2</sub>MB 処理および加熱処理した $\alpha$ -アミラーゼのトリプシン消化

55°C で CO<sub>2</sub>MB 処理および 75°C で加熱処理した  $\alpha$ -アミラーゼをトリプシン消化して HPLC により測定した結果、両処理共にピーク数は加熱時間に伴い減少した。また、55°C での CO<sub>2</sub>MB 処理した  $\alpha$ -アミラーゼから得られたピーク数は 75°C での加熱処理よりも少なかった。

### 5. まとめ

以上の結果から、55°C での CO<sub>2</sub>MB 処理の  $\alpha$ -アミラーゼに対する失活効果は処理温度が 20°C 高い 75°C での加熱処理よりも高いことが認められた。さらに、55°C での CO<sub>2</sub>MB 処理による  $\alpha$ -アミラーゼの変性は 75°C での加熱処理よりも強力であり、その作用も異なることが示唆された。

## 12 緑茶カテキンの生理活性発現機構に対するビタミン C の影響

### 1. 研究者の所属・氏名等

応用生命科学部 食品科学科  
准教授 奈良井朝子

### 2. 研究の目的

茶には抗がん効果・抗肥満効果など、様々な健康機能性を示す茶ポリフェノール (緑茶カテキンやその重合体) が豊富

に含まれている。それらは中性からアルカリ性の条件で酸化されやすく、酸化物が褐変や濁りを生じて飲料の外観と品質を劣化させる。それを防ぐために、市販茶飲料の多くは酸化防止剤のアスコルビン酸 (ビタミン C) が添加されている。1985 年に飲料化された緑茶はこれまでその市場規模を伸ばしているが、市販緑茶飲料と茶葉から淹れた茶では、飲用時の緑茶カテキンの安定性が異なり、緑茶カテキンが生体内で発揮する健康機能性にも違いが生じる可能性がある。

ビタミン C が緑茶カテキンの安定性向上に寄与することは周知の事実だが、緑茶カテキンの生理活性に及ぼす影響を解明しようとする、ビタミン C 自身の強い抗酸化力を無視できず、実験結果の解釈が複雑となる。こうした背景から、ビタミン C が緑茶カテキンの生理活性発現機構に及ぼす影響を明確に示した報告はない。

一方で、申請者はこれまでに、緑茶カテキンの中でも生理作用が強いとされる (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) が、ホスファチジルコリンで調製したリン脂質二重層 (リポソーム) に強く相互作用し、リポソームを凝集させることを報告している [Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 82:466-475 (2018)]。EGCg は細胞膜上の 67-kDa ラミニンレセプター (67LR) のリガンドとして抗がん作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用などを発揮することが知られているが、申請者の見出した結果から、口腔~消化管に存在する管腔側上皮細胞の細胞膜を構成するリン脂質二重層は、EGCg が 67LR に到達するためのプラットフォームになりうると考えられた。さらに、口腔~消化管内に存在しうる食品由来のビタミン C は、EGCg の安定性と生体成分との相互作用に多大な影響を及ぼすと予想された。そこで、本研究では、EGCg とリポソーム (細胞膜モデル) との分子間相互作用、ならびに EGCg が培養細胞に及ぼす生理活性に対するビタミン C の影響を調べることを目的とした。

### 3. 研究の計画・方法

EGCg 濃度に依存的なリポソーム凝集能を試料液の濁度で評価する。また遠心分離で回収した沈殿中の EGCg またはその酸化物を抽出し、RP-HPLC にて分析する。リポソーム凝集能を示す EGCg 酸化物については、精製または LC-MS による同定を試みる。

### 4. 研究の特色

ビタミン C の有無による緑茶カテキンの生理活性発現機構の違いは十分に解明されていない。本研究ではまず、単純な細胞膜モデルであるリポソームと EGCg との相互作用を指標としてビタミン C の影響を調べる。既にこの無生物系実験において、生理的 pH 条件ではビタミン C の有無によって EGCg のリポソーム凝集能が変化することを見出している。

従来の研究では、茶カテキンの抗酸化性を指標として生理活性を解析することが多く、抗酸化力強いビタミン C が共存する中でその影響を評価することは困難であった。しかし、本研究は抗酸化生とは別の生理活性に着目することでその問題を克服している。また、無生物系実験と培養細胞を用

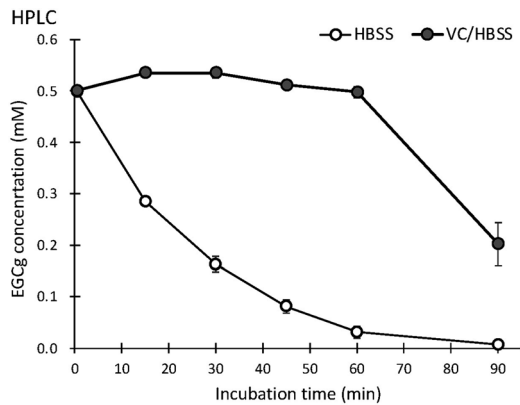


図1 HBSS中37°Cインキュベーション中のEGCgの安定性  
ビタミンCなし (○) とあり (●) の結果を  
平均値±SD (n=3) で示した。

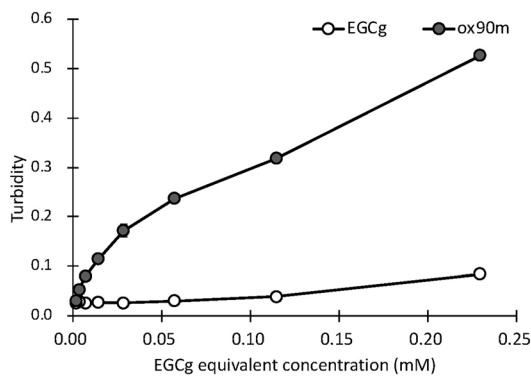


図2 EGCgとox90mによる濃度依存的なりポソーム凝集  
EGCg (○) とox90m (●) をビタミンC入りHBSSで調製  
したリポソーム溶液に添加し、濁度を測定し平均値±SD  
(n=3) で示した。

いる実験のいずれにおいても、ビタミンCの有無をEGCgとその酸化物の違いに置き換えて解析することを検討している。これは従来にない独創的な解析方法と言える。

## 5. 研究の成果

培養細胞実験で使用されるハンクス緩衝液 HBSS (+) (Ca, Mg 入り、フェノールレッドなし) に EGCg を初濃度 0.5 mM で溶解し、37°C でインキュベーションしたところ、90 分間でほぼ全ての EGCg が減少した (図 1)。5 mg/100 mL のビタミン C を添加したところ、EGCg は 60 分間、初濃度を維持した (図 1)。このことから、ビタミン C の抗酸化作用によって EGCg の酸化が抑制されることが確認された。

次に、単純な細胞膜モデルとして、卵黄由来ホスファチジルコリンを用いて HBSS 中でリポソームを調製した。このリポソーム溶液に 5 mg/100 mL のビタミン C を添加し、そこへ EGCg もしくはあらかじめ HBSS 中で 90 分間酸化した EGCg (ox90m) を混合した。その結果、EGCg ではリポソーム溶液が濁るリポソーム凝集能が見られなかったのに対し

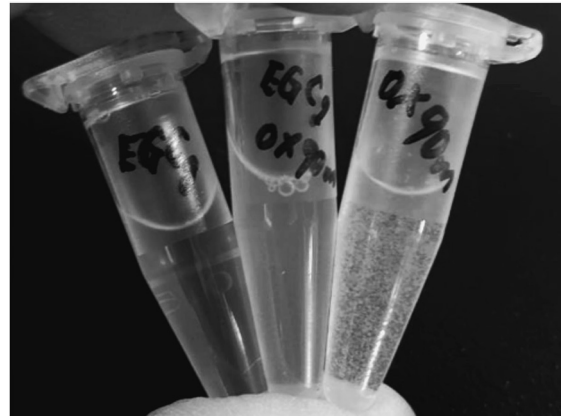


図3 EGCgとox90mを添加したリポソーム溶液  
EGCgとox90mを左から4:0, 4:1, 0:4の濃度比で添加  
した時の溶液の様子を示した。

ox90m では濃度依存的に強いリポソーム凝集能が確認された (図 2)。

リポソーム溶液に EGCg:ox90m を 4:0, 4:1, 0:4 の濃度比で添加したところ、[4:1] と [0:4] でリポソーム凝集物が目視で観察された (図 3)。これらの試料を遠心分離によって上清と沈殿に分けたのち、LC/MS 分析に供したところ、[4:0] については大半の EGCg が上清に残存していたが、[0:4] では上清に EGCg あるいは EGCg 酸化物が検出されず、沈殿に EGCg 酸化物と思われるピーク成分が検出された (以下、図を省略)。また、[4:1] では上清と沈殿に同程度の EGCg が検出され、EGCg 酸化物は沈殿のみに検出された。EGCg 酸化物として目立つピーク成分の m/z に着目すると、 $[M-H]^- = 913$  を示す溶出時間が近接する 2 成分と、 $[M-H]^- = 883$  を示す溶出時間の遅い 1 成分が存在し、前者は Theasinensin A または Theasinensin D、後者は P2 と呼ばれる既知の EGCg 酸化縮合物に該当すると考えられた。これらの結果は、強いリポソーム凝集能を示すのはこれら EGCg 酸化縮合物である一方で、EGCg 自身もリポソームと弱い相互作用で吸着しており、リポソーム凝集の際には共沈殿することを示唆している。

さらに、ox90m を HPLC で分画した試料を用いてリポソーム凝集能を測定したところ、Theasinensin A/D と P2 をそれぞれ含む画分において活性が認められた。濃度依存性は求めているが、いずれの EGCg 酸化物にもリポソーム凝集能があることを確認した。

今回の成果を基に今後は、培養細胞を用いた実験系において、EGCg 酸化物が細胞膜に結合し、EGCg で既知の細胞応答あるいは新規の応答を惹起する可能性について検証を進める。

末筆ではありますが、当プロジェクトによる採択・ご支援に深謝いたします。