

## 論文審査の結果の要旨

氏名：瀬川 太雄

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：イルカの炎症性疾患及び感染症における制御因子の同定と臨床応用に関する研究

審査委員：（主査） 教授 中西 照幸

（副査） 教授 杉谷 博士 教授 遠矢 幸伸

准教授 伊藤 琢也

日本は世界一の水族館大国であり、イルカは水族館における代表的な展示動物である。しかし、イルカの飼育に対する反対意見が増加し、水族館ではイルカの健康を適切に管理し長期間飼育することが不可欠な課題となっている。またイルカは特定の人獣共通感染症に罹患するが、一部の飼育施設ではイルカとのふれあいやセラピー等の行為によってヒトと直接接触する機会が増えている。このような背景から、展示動物であるイルカの健康管理は飼育施設において重要視されつつある。一方イルカは、陸棲哺乳動物との著しい形態学および生理学的相違により、医療および獣医療で実施される臨床検査が確立されていない場合がある。現在、イルカの展示施設において、その確立が望まれる臨床検査法は、血液疾患の原因や状態を把握するために不可欠な骨髄検査、様々な疾患において認められる炎症反応を簡易かつ迅速に評価することが可能な急性相蛋白質（APP）やサイトカインの測定が挙げられる。また多くの展示施設等において、手法が確立されていない感染症の臨床検査法として、ウイルスをはじめとする病原体遺伝子の検出がある。本研究は、展示施設等で簡易に実施できるイルカの健康管理上有用な臨床検査法の開発を目的とし、イルカにおける簡易な骨髄検査法の開発、炎症性疾患の診断やその制御への利用が期待される APP やサイトカインの同定と簡易測定法の確立、および簡易かつ迅速に展示施設等で実施できるウイルス遺伝子検出法の開発を試みた。

### 1. イルカにおける簡易な骨髄検査部位の特定

イルカは海棲環境に適応する過程で、陸棲哺乳動物の骨髄検査部位である長骨および骨盤が退化したため、検査部位は高度な技術を必要とする脊椎骨椎体への骨髄穿刺法が推奨されている。本研究は、イルカにおいて脊椎骨椎体より簡便に実施できる新たな骨髄検査部位を検討した。

イルカの骨髄検査に有用な穿刺部位として体表より触診可能な骨格を調べ、前鰭を構成する上腕骨および橈骨が候補として挙げられた。これら上腕骨および橈骨の矢状断観察では、上腕骨および橈骨内には骨髄様組織を含む微細な網状構造が認められたが、陸棲哺乳動物で認められる髄腔は存在しなかった。各々の骨内組織の構成細胞を調べるために塗抹標本を作製し、上腕骨内には多数の造血細胞様の有核細胞および多様な分化段階の血液細胞が、また橈骨内には多数の赤血球が確認された。上腕骨内で確認された多数の有核細胞が造血細胞としての機能、すなわち分化・増殖能の有無について、*in vitro* での培養および遺伝子発現解析により検討した。その結果、上腕骨内に存在する有核細胞は、末梢血白血球と比較して CD34をはじめとする造血細胞特異的な遺伝子を強く発現し、*in vitro* での培養により 3 種類のコロニー形成が確認された。これらのコロニーは、構成細胞の形態および遺伝子発現解析より、好中球、単球・マクロファージ、巨核球および好酸球に分化する造血前駆細胞の分化・増殖によって形成されていることが明らかとなった。以上、上腕骨内に存在する有核細胞は多数の造血前駆細胞を含むことから、イルカの上腕骨は脊椎骨椎体に代わる簡易な骨髄検査部位であることが示唆された。

### 2. イルカの感染症および炎症性疾患において変動するバイオマーカーの検索

感染症および炎症性疾患のイルカにおいて、その早期診断および制御に役立つバイオマーカーの同定とその簡易測定法の確立が求められている。候補となるバイオマーカーとして、炎症時に多種の動物で急増する APP であるハプトグロビン（Hp）および血清アミロイド A（SAA）、慢性炎症を呈したイルカの末梢血単核細胞（PBMC）で遺伝子の強発現が認められる IL-10 が挙げられる。そこで、これら候補となるバイオマーカーの簡易測定法を検討するために、それらの分子同定および性状解析を行った。

### 1) イルカハプトグロビン (Hp) の分子同定および性状解析

健常および炎症症例イルカの血清を SDS-PAGE により分析した結果、炎症症例の血清中に健常個体では認められない特異的バンドが検出された。そのバンドの N 末端アミノ酸配列を解析した結果、Hp であると予想された。肝臓より単離されたイルカ Hp の推定アミノ酸配列より、イルカ Hp は多くの陸棲哺乳動物で認められる Hp1 型であり、Hp の機能に関わる重要な構造は高度に保存されていた。またイルカ Hp の推定アミノ酸配列より、イルカ Hp はブタ Hp と高い相同性を示した。ウェスタンブロットにより、抗ブタ Hp 抗体はイルカ Hp と特異的に反応した。ブタ Hp ELISA 法および Hp の機能を利用した Hp-ヘモグロビン (Hb) 結合試験法の分析精度を比較したところ、両 Hp 簡易測定法はイルカ Hp の定量において共に優れた精度 (ELISA 法; アッセイ内変動係数 3.2~3.8 %, Hp-Hb 結合試験法; アッセイ内変動係数 3.3~3.5 %) と再現性 (ELISA 法; アッセイ間変動係数 9.7~15.8 %, Hp-Hb 結合試験法; アッセイ間変動係数 10.4~21.7 %) を有し、その測定値に顕著な差違はなかった。ELISA および Hp-Hb 結合試験を用いて、感染症および炎症性疾患が疑われるイルカの臨床的評価を検討し、健常および炎症徴候を示すイルカの Hp 濃度は、それぞれ ELISA 法で  $0.59 \pm 0.62$  mg/mL および  $3.96 \pm 1.35$  mg/mL、Hp-Hb 結合試験法で  $0.58 \pm 0.55$  mg/mL および  $3.52 \pm 1.17$  mg/mL であり、健常イルカと比較して炎症徴候を示すイルカの Hp 濃度は有意に高値を示した。以上、イルカ Hp は既存の Hp 簡易測定法により定量が可能であることが明らかとなり、Hp はイルカにとって有用な炎症指標になることが明らかとなった。

### 2) イルカ SAA の分子同定および性状解析

炎症時に増加する SAA には 3 つのアイソフォームが存在する。多くの哺乳動物で SAA1 と SAA2 は肝臓で合成後血中に分泌され、SAA3 は肝臓以外で合成されて局所的に存在する。一方、ブタでは SAA3 が炎症時に血中に出現するアイソフォームである。そこで、炎症症例のイルカで体循環する SAA アイソフォームの同定を試みた。肝臓から単離されたイルカ SAA の推定アミノ酸配列は、SAA3 の特徴である N 末端 TFLKモチーフおよび塩基性 (pI : 9.14) の等電点を有していた。イルカ SAA の推定アミノ酸配列はブタ SAA3 と高い相同性を示し、系統解析では SAA3 と同一系統に属した。イルカ SAA mRNA は多くの臓器で恒常的に発現し、特に肝臓で強い発現が認められたことから、本研究で単離されたイルカ SAA は主に肝臓で合成されることが示唆された。等電点電気泳動および抗組換えイルカ SAA 抗体を用いたウェスタンブロットによりイルカ血清を解析したところ、健常なイルカ血清と比較して炎症症例の血清では塩基性 (pI : ~9.5) を示す SAA が顕著に検出された。なお血清中のイルカ SAA および組換えイルカ SAA は、既知の各種動物 SAA を検出可能な抗 Multispecies SAA 抗体と交差反応を示さなかった。以上、炎症時に血中に出現するイルカ SAA は多くの動物と異なり SAA3 の特性を持ち、イルカ SAA の測定は既知の方法では困難であることが明らかとなった。

### 3) イルカ IL-10 (dIL-10) の分子同定および性状解析

抗炎症性サイトカインである IL-10 は炎症診断に有用なマーカーになる可能性が高いが、イルカでは炎症の評価や診断に適用できる免疫学的な製剤が存在しない。そこで dIL-10 の分子同定を試みたところ、dIL-10 の推定アミノ酸配列は脊椎動物で共通の IL-10 の基本構造を有し、ウマ IL-10 と高い相同性を示した。dIL-10 の組織発現を検討したところ、脾臓において高い dIL-10 mRNA 発現が認められ、これは陸棲哺乳類での報告とは異なった。HEK293 細胞を用いて作製した組換え dIL-10 蛋白質 (rdIL-10) は、Con A で刺激した PBMC における炎症性サイトカインの mRNA 発現を顕著に抑制した。以上、dIL-10 の基本的な分子構造や炎症性サイトカイン抑制作用などの機能は既知の動物と類似しているが、組織発現には特異性がみられることを明らかにした。また dIL-10 測定を目的とした免疫学的製剤の開発に有用な rdIL-10 の作製に成功した。

### 3. 現場診断に対応した超簡易迅速なウイルス遺伝子検出法の開発

感染症の迅速診断が迫られる水族館等の施設では、簡易な装置のみでイルカを含む様々な動物の血液や糞便試料から煩雑な抽出処理を行わず、直接ウイルス等の病原体遺伝子を検出できる高感度かつ迅速な検査法の確立が望まれている。そこで、一定温度で数分以内に組織中の DNA および RNA を抽出できる核酸抽出試薬 (RNAGEM) と目視にて遺伝子増幅が確認できる等温遺伝子増幅法の LAMP 法を組み合わせた GEM-LAMP 法の開発を試みた。

モデルウイルスとして DNA ウイルス (オーエスキーウイルス) および RNA ウイルス (イヌジステンパーウイルス; CDV) を用いた。RNAGEM によるウイルス遺伝子抽出の可否は PCR 法および RT-PCR 法により半定量的に確認し、75°C、5 分間の処理で両ウイルス遺伝子の抽出効率は最大となった。GEM-LAMP 法の条件は *in vitro* 合成した CDV RNA を用いて評価し、RNAGEM および RNA を加

えたマイクロチューブを 95°C で 1~4 分間処理後、直接そのチューブに特異的プライマーを含む LAMP 反応試薬を添加することで高感度な遺伝子検出が行えることを見いだした。GEM-LAMP 法は、従来の簡易なテンプレート調整法であるスピнкаラム法や熱処理法を併用した LAMP 法よりも高感度に両ウイルス遺伝子を検出した。GEM-LAMP 法による臨床材料からの直接的なウイルス遺伝子検出は、イルカを含む様々な動物の血清および糞便希釈液にモデルウイルスを混合した模擬的臨床材料を用いて評価した。その結果、GEM-LAMP 法はいかなる動物の血清および糞便希釈液を用いた場合でも 70 分以内に煩雑な抽出操作なしでウイルス遺伝子を増幅でき、高感度な検出が目視にて可能であった。以上、恒温槽と 1 チューブのみで直接臨床サンプルから高感度かつ迅速にウイルス遺伝子が検出できる遺伝子検出法“GEM-LAMP 法”を開発した。

以上、本研究よりイルカの感染症および炎症性疾患の制御に関わる複数の因子を同定した。それらの因子の分子性状や体内での局在および分布特性に基づく分析を行った結果、これまでより簡易に実施できるイルカの骨髄検査法、Hp を指標とした簡易な炎症診断法および超簡易迅速なウイルス遺伝子検出法を提案することができた。いずれの検査法も展示施設での実施は容易であり、今後、展示施設等におけるイルカの健康管理技術向上のための臨床検査法として、本検査法の応用が期待される。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 26 年 2 月 7 日