

平成26年 8月25日

学 長 殿

主 査 井上 昇

学位論文審査の要旨及び結果並びに最終試験の  
結果について（報告）

26年 7月17日付けで依頼されました下記の者の学位論文審査  
の要旨及び結果並びに最終試験の結果を別紙のとおり報告いたします。

記

専 攻 畜産衛生学専攻・博士後期課程

氏 名 周 末

(別紙1)

学位論文審査の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻 (博士後期課程)
氏名	周末
審査委員署名	主査 井上 昇 副査 五丁嵐 郁男 副査 河津信一郎 副査 西川 義文 副査 玄 学南
題目	Studies on development of novel diagnostic methods and discovery of chemotherapeutic agents against animal African trypanosomosis (動物アフリカトリパノソーマ症に対する新規診断法及び化学療法薬開発に関する研究)
審査結果の要旨 (1,000 字程度)	

本学位論文の目的は動物アフリカトリパノソーマ症に対する新規診断法の開発と、化学療法薬開発のための新たな薬剤標的の評価であった。

第一章ではトリパノソーマコンゴレンセの全発育ステージに対して実施した比較プロテオーム解析の結果を検索し、動物感染ステージで他ステージより 5.36 倍発現量が上昇する 46 kDa 蛋白質を見出して TcP46 と命名した。サザンプロットの結果から TcP46 遺伝子はゲノム中に縦列に配置しており少なくとも 2 コピー存在していることが明らかとなった。組換え TcP46 (rTcP46) に対する抗血清を用いてトリパノソーマに対する間接蛍光抗体法を実施し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、TcP46 はトリパノソーマの細胞質に発現していることが明らかとなった。rTcP46 を抗原として用いた ELISA 法を感染マウスから経時的に採取した感染血清を用いて評価した結果、特異的 IgG 応答を感染 8 日目から検出することができた。同 ELISA 法はウシのパベシアおよびアナプラズマに対する交叉反応性も認められなかったことから、新たなトリパノソーマ症血清診断抗原として有望であることが示唆された。

第二章では TcP46 遺伝子を標的としたセミ-ネステッド PCR 法 (semi-nPCR) を開発した。第一段目の PCR プライマーとして同遺伝子中 816 bp の領域を増幅する特異プライマーを設計し、semi-nPCR プライマーとして第一段目の PCR と共通のセンスプライマーとネステッドアンチセンスプライマーを設計し、同遺伝子の 590 bp の領域を増幅するよう設計した。semi-nPCR の特異性をトリパノソーマ、パベシア、タイレリア、ネオスポーラならびにトキソプラズマ由来ゲノム DNA を用いて評価した結果、トリパノソーマコンゴレンセに特異的であった。次に検出限界の DNA 濃度を解析した結果、ゲノム DNA 0.7 pg、トリパノソーマ 1 細胞から増幅が可能であった。感染マウスから経時的に採取した血液由来 DNA を用いた結果では感染翌日から増幅が認められ、既存のトリパノソーマ特異的 PCR 法である Kin-PCR 法より 3 日、顕微鏡検査法よりも 6 日早く原虫を検出することができた。最後に semi-nPCR を用いて南アフリカで採取したウシ 96 検体、イヌ 29 検体の DNA サンプルを検査した。その結果、ウシで 28%、イヌでは 17% から増幅が認められ、南アフリカではウシおよびイヌのトリパノソーマ感染が高度に蔓延していることが明らかとなり、本研究で開発した semi-nPCR が新たな高感度原虫検出法として有用であることが示唆された。

第三章では 9 種類の ERAD 阻害剤の抗トリパノソーマ薬としての有用性を評価した。その結果、調べたすべての ERAD 阻害剤が抗トリパノソーマ活性を示したが、中でも 17-DMAG が最も強い活性を示し、ブルーストリパノソーマに対する  $IC_{50}$  は 0.03 nM、トリパノソーマコンゴレンセに対する  $IC_{50}$  は 0.11 nM であった。ヒト包皮由来線維芽細胞株を用いた選択性評価の結果、17-DMAG の選択指数 (SI) はブルーストリパノソーマに対して  $SI=145, 100$ 、トリパノソーマコンゴレンセに対して  $SI=39, 572$  であり、トリパノソーマに高い選択性を示すことが明らかとなった。以上の結果から ERAD は抗トリパノソーマ薬開発の標的経路として有効であり、同経路の阻害剤 17-DMAG は新規トリパノソーマ薬のリード化合物として有望であることが示唆された。

本研究の成果によって現在喫緊の課題となっている動物トリパノソーマ感染症に対する診断法と抗トリパノソーマ薬開発に対する新たな候補抗原遺伝子ならびに薬剤標的経路を提案することができた。本研究の成果をさらに発展させていくことで、流行現場でも実用可能な動物トリパノソーマ用簡易迅速血清診断法やトリパノソーマ薬の開発につながっていくことが期待される。よって審査委員全員一致で本学位論文が帯広畜産大学大学院畜産衛生学専攻博士後期課程の学位論文として申し分ないと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

題目 Identification and characterization of a *Trypanosoma congolense* 46 kDa protein as a candidate serodiagnostic antigen

著者名 Mo Zhou, Keisuke Suganuma, Ngasaman Ruttayaporn, Thu-Thuy Nguyen, Shino Yamasaki, Ikuo Igarashi, Shin-ichiro Kawazu, Yasuhiko Suzuki and Noboru Inoue.

学術雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science

(76 巻・6 号・799-806 頁)

発行年月 2014 年 7 月

(別紙2)

最終試験の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻 (博士後期課程)
氏名	周末
審査委員署名	主査 井上 昇 副査 五十嵐 郁男 副査 河津信一郎 副査 西川 義文 副査 玄 学南
実施年月日	平成26年 8月22日
試験方法 (該当のものを○で 囲むこと)	<input checked="" type="radio"/> 口頭 <input type="radio"/> 筆記
要 旨	
<p>主査及び副査の5名は、学位申請者に対し、原虫病研究センターPKホールにおいて、学位申請者本人に口頭発表による学位論文内容の説明を行わせ、その内容について質疑応答を行った。また、関連する専門知識について口頭により試問を行った。</p> <p>その結果、学位申請者が帯広畜産大学大学院畜産衛生学専攻博士後期課程の修了者としてふさわしい学力および見識を有すると判断し、博士(畜産衛生学)の学位を授与するに値すると判断した。</p>	