

(別紙1)

学位論文審査の結果の要旨	
専攻	獣医学専攻博士課程
氏名	Wanlop Atcharaphan
審査委員署名	主査 西川 義文 副査 河津信一郎 副査 玄 学命 副査 井上 昇 副査
題目	Studies on Modification of Miracidium Hatching Technique (MHT) for Preparation of Single-Genome DNA for Use in Population Structure Analysis of <i>Schistosoma japonicum</i> and Development of ELISA for Diagnosis of <i>S. mekongi</i> Infection in Humans
審査結果の要旨 (1,000 字程度)	
<p>住血吸虫症は <i>Schistosoma</i> 属吸虫の寄生を原因とする水系感染症である。ヒトをはじめとする哺乳類宿主（終宿主）への感染源は、中間宿主となる水棲巻き貝から放出されるセルカリアで、この寄生虫ステージが農作業や水浴などで水中に暴露された手足から経皮感染する。アジアに認められる住血吸虫症（アジア型住血吸虫症）は、日本住血吸虫（<i>S. japonicum</i>）及びメコン住血吸虫（<i>S. mekongi</i>）の感染によって引き起こされる。アジア型住血吸虫症はヒト以外の哺乳類宿主（保虫宿主）にも感染する人獣共通感染症で、寄生虫の集団構造の把握が、ヒトと保虫宿主の相互関係や、寄生虫病の疫学を理解する上で重要な情報になる。一方、この病気の診断には、糞便中に排出される虫卵を光学顕微鏡で検出する、セロハン厚層塗抹法が一般に用いられているが、流行地住民への集団投薬（MDA）が積極的に推し進められた結果、この病気の有病率が著しく低下した流行地では、セロハン厚層塗抹法に替わる、より高感度・高精度の診断法の導入が必要になっている。そこでこの研究では、アジア型住血吸虫症の排除に向けた取り組みに必須となる情報を得るための手法として、寄生虫の集団構造解析に使用するシングルゲノム DNA の調整を目的としたミラシジウムふ化法（MHT）の改良及び、メコン住血吸虫症の患者の診断を目的とした ELISA の開発を行った。</p>	

第一章では、日本住血吸虫の集団構造解析で使用するシングルゲノム DNA の調整を目的として、専用フラスコを使用する既存の MHT プロトコールを 96 穴プラスチック ELISA プレートでの簡易法に改良した。また、ミラシジウムのふ化率に与える光照射の影響についても検討を加えた。その結果、日光（太陽光）下でミラシジウムのふ化を誘導した時に最も高い孵化率が得られた。このことから、通常は蛍光灯下行う MHT を日光下で行っても、効率的にミラシジウムのふ化が誘導できることが初めて明らかになった。この手法で採取したミラシジウムから調整したシングルゲノム DNA を鋳型にした PCR では、18S rRNA 遺伝子及びマイクロサテライトマーカー遺伝子が増幅され、MHT の改良法が寄生虫の集団構造解析の研究にも十分応用可能であることが確認できた。MHT の改良法を、日本住血吸虫症の対策に導入することで、流行地での寄生虫の集団構造解析が可能になる。

第二章では、これまでに開発された日本住血吸虫由来の組換え体抗原及び虫卵由来の可溶性粗抗原 (SEA) の、メコン住血吸虫症を診断する ELISA における有用性を評価した。その結果、低濃度 SEA を抗原とする ELISA に、組換え体抗原を用いる ELISA を上回る優れた診断性能が認められた。日本住血吸虫由来の SEA を抗原とする ELISA を導入することで、より効率的な MDA の運用が期待できるが、同時に、組換え体抗原を用いる ELISA の開発も待たれるところである。

第三章では、メコン住血吸虫のチオレドキシシペルオキシダーゼ-1 (SmTPx-1) 遺伝子を単離して、組換え体タンパク質 (rSmTPx-1) を作製し、ELISA に応用した。その結果、rSmTPx-1 抗原を用いた ELISA の感度と特異性は、それぞれ、89.3%と 93.3%であった。rSmTPx-1 抗原を用いた ELISA とセロハン厚層塗抹法間のカッパ係数 (κ 係数) は 0.82 で、両者には高い相関が認められ、rSmTPx-1 抗原を用いた ELISA では、虫卵を排泄する Active な患者の検出が可能なのも示唆された。組換え体抗原を用いる ELISA は、抗原の大量供給と品質管理が容易なことから、大規模調査への応用が期待できる。

これらの結果より、住血吸虫症の排除に向けた、疾病流行状況の監視と MDA 効率的な運用に有用な二種類の手法を提案することが出来た。これらの手法の導入によって、アジア型住血吸虫症の監視と排除に向けた寄生虫病対策が更に進展することが予想される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が帯広畜産大学大学院畜産学研究科博士課程の学位論文として十分価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

題目 A simple and efficient miracidium hatching technique for preparing a single-genome DNA sample of *Schistosoma japonicum*.

著者 Wanlop A, Dang-Trinh MA, Kirinoki M, Suguta S, Shinozaki K, and Kawazu, S.

学術雑誌 Journal of Veterinary Medical Science

(巻・号・頁) 84・8・1108-1110

発行年月 2022年7月

(別紙2)

最終試験の結果の要旨	
専攻	獣医学専攻博士課程
氏名	Wanlop Atcharaphan
審査委員署名	主査 西川 義文 副査 河津信一郎 副査 玄 学南 副査 井上 昇 副査
実施年月日	令和5年 1月26日
試験方法 (該当のものを○で 囲むこと)	<input checked="" type="radio"/> 口述 <input type="radio"/> 筆記
要 旨	
<p>主査および副査の合計4名は、学位申請者に対し、帯広畜産大学原虫病研究センターにおいて、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学研究科博士課程の修了者としてふさわしい学力および識見を有すると判断し、博士（獣医学）の学位を授与するに値すると判断した。</p>	