

称号及び氏名 博士(獣医学) 竹鼻 一也

学位授与の日付 2021年2月20日

論文名 飼育下の若齢アジアゾウにおける骨代謝評価法とゾウ血管
内皮ヘルペスウイルス血症の簡易診断法の開発

論文審査委員 主査 山岸 則夫
副査 小川 和重
副査 川手 憲俊
副査 嶋田 照雅

論文要旨

緒言

アジアゾウ (*Elephas maximus*) は絶滅が危惧されている大型草食動物である。飼育下の繁殖が急務であるが、仔ゾウの成育率は低い。成長期の仔ゾウでは骨代謝疾患は重要な疾患であり、日本で繁殖した仔ゾウ 13 頭のうち、少なくとも 3 頭は骨に関連疾患が原因で死亡している。近年では、ゾウ血管内皮ヘルペスウイルス (EEHV) 関連出血病による仔ゾウの死亡例が世界中で報告されており、日本でも上述の 13 頭のうち 2 頭が EEHV 関連出血病により死亡している。本研究では、飼育下アジアゾウの個体数の維持ならびに出生個体の成育率向上に貢献することを最終目標として、若齢アジアゾウの健全な成育を妨げている要因である骨代謝障害ならびに EEHV 血症の早期診断を可能にするため、血中骨代謝マーカー測定と血中 EEHV 検出法に関する検討を行なった。

第 1 章 アジアゾウにおける血中骨代謝マーカーを用いた骨代謝の評価

動物における骨代謝疾患の診断やリスク評価には、血中の骨代謝マーカー測定が有用であり、アジアゾウにおいても骨代謝マーカーを利用して骨代謝疾患の診断とリスク評価が可能であると考えられる。本章ではアジアゾウの年齢別の血中骨代謝マーカー値の基準範囲の把握ならびに骨形成マーカーの新たな測定法の確立を行なった。

第 1 節 年齢別の血中骨代謝マーカー値

アジアゾウ 10 頭の血清を用いて骨吸収マーカーである酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b (TRAP 5b) と骨形成マーカーである骨型アルカリホスファターゼ (BAP) の活性値を測定し、年齢による変動を分析した。両骨代謝マーカーの活性値には年齢と有意な負の相関関係が認められた。15 歳以下の若齢ゾウの活性値は成獣ゾウの活性値よりも有意に高く、加齢に伴う破骨細胞数と骨芽細胞活性の低下が示唆された。各個体の TRAP5b および BAP 活性値の間には有意な正の相関関係が認められた。BAP と TRAP5b の比 (B/T index) を算出したところ、10 頭中 8 頭で 6.0–10.8 の範囲内に収まり、骨芽細胞と破骨細胞による骨代謝バランスの指標になると考えられた。以上より、アジアゾウにおける血清 TRAP5b と BAP は、他の動物種と同様、骨吸収および骨形成を反映する骨代謝マーカーとして有用であると考えられた。

第 2 節 アガロースゲル電気泳動法を用いた血中骨型 ALP 活性の測定

従来法 (小麦胚芽レクチン沈殿法) ならびにアガロースゲル電気泳動法 (AGE) による骨型 ALP 活性値 (本節ではそれぞれ BAP および ALP3 と呼称する) の比較を

行った。AGE 法にはヒトの医療分野で使用されている市販キットを用いた。4 頭のアジアゾウから得られた血清 51 検体の BAP と ALP3 の活性値は近似し、有意な正の相関関係が認められた。Bland-Altman 分析において、両活性値は測定法の一致基準を満たし、アジアゾウにおいて血清 ALP3 活性値は BAP 活性値に代替可能と考えられた。AGE 法は全自動装置で測定が可能のため測定者による誤差が少なく、血清中の ALP2（肝型分画）と ALP3 活性値を同時に測定できる利点もある。

第 2 章 人工哺育仔アジアゾウの血中骨代謝マーカー値の推移

育児放棄により人工哺育された仔アジアゾウは、栄養失調や代謝性骨疾患による成長不良に陥り、死亡の転帰を迎えるものが多い。本章では、1 歳 2 ヶ月齢で急死した人工哺育個体が転帰不良となった要因を明らかにするために、健康管理記録簿上の体格測定および血液検査所見ならびに凍結保存されていた血清を用いて回顧的研究を行った。併せて、自然哺育個体における健康管理記録簿上の各種データと凍結保存血清、さらに人工哺育ならびに自然哺育に用いた凍結保存乳汁の分析も行った。人工哺育個体の体重および体高の推移は自然哺育個体と同等であったが、骨代謝マーカーである血清 TRAP5b および ALP3 活性値は常に低値であった。アジアゾウの初乳中 TRAP5b および ALP3 活性値は常乳より高く、人工哺育に用いた 2 種類の代用乳の骨代謝マーカー活性値は、アジアゾウの常乳と同等もしくは低値であった。以上の結果から、人工哺育個体は骨代謝の低下が示唆され、新生仔ゾウへの初乳摂取の重要性が再認識された。

第 3 章 LAMP 法による血中ゾウ血管内皮ヘルペスウイルス EEHV 診断とモニタリング

EEHV は、若齢アジアゾウに急性致死性出血病を引き起こす原因ウイルスである。本章では臨床現場で実施可能な EEHV 診断法の開発を目的とし、新たに設計した EEHV1 型検出用のプライマーを使用する LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法による EEHV 診断を試みた。既に陽性/陰性が診断されている全血 21 サンプルを材料に検討したところ、陽性 1 サンプルと陰性 20 サンプルを正確に検出した。人工 EEHV1 型 DNA を添加した全血サンプルを用いた検討では、検出限界は $10^{1.2}$ コピー/ μL となり、既存の PCR 法よりも 100 倍以上高感度であった。若齢アジアゾウ 5 頭に対して本法を用いて、週に 1 回の血中 EEHV1 型のモニタリングを約 2 年間実施したところ、1 度も検出されなかった。また、死亡後に採取した第 2 章の人工哺育個体の組織サンプルを検査したところ、EEHV1 型陽性の所見が得られ、

PCR 法による診断と一致した。LAMP 法は迅速・高感度で増幅産物を直ちに目視できる比較的簡易な検査方法である。以上の結果から、本章で開発した LAMP 法を使い、若齢アジアゾウの EEHV 血症をモニタリングし早期に診断することで早期治療への臨床応用が期待できる。

総括

1. アジアゾウの血清において、骨代謝マーカーである TRAP5b と BAP 活性値を測定した。両活性値は年齢と負の相関関係を有し、加齢に伴い低下した。他の動物種と同様に、血中 TRAP5b と BAP 活性値は骨吸収と骨形成を反映する指標となると考えられた。
2. 医療分野で普及している AGE キットを用いてアジアゾウの血清 ALP3 活性値を測定した。計 51 検体の ALP3 と BAP 活性値は正の相関関係を有し、測定法の一致基準を満たしたことから、骨形成マーカーとして ALP3 は BAP に代替可能と考えられた。
3. 1 歳 2 ヶ月齢で死亡した人工哺育のアジアゾウの生前の潜在的問題を探るため、個体管理記録上のデータに凍結保存血清の骨代謝マーカー測定値を加え回顧的検討を行った。人工哺育個体の体格は健常な自然哺育個体と同等であったが、血液検査所見から栄養不足と低免疫状態が疑われた。人工哺育個体の血清 ALP3 と TRAP5b 活性値は自然哺育個体より低く、骨代謝の低下が示唆された。
4. 迅速・高感度で増幅産物を目視で判定できる LAMP 法を使ったアジアゾウ EEHV 血症の簡易診断法を開発した。全血サンプルを用いた検証では、LAMP 法の結果は既存の PCR 法と一致し、検出限界は 100 倍以上高感度であった。LAMP 法では死亡個体の凍結組織片からの EEHV 検出も可能であった。今後、LAMP 法を若齢アジアゾウの EEHV 血症の診断に適用し、早期治療による救命率向上が期待される。

審査結果の要旨

アジアゾウ (*Elephas maximus*) は絶滅が危惧されており、飼育下での繁殖が急務であるが、仔ゾウの成育率は低い。これまで日本で繁殖した仔ゾウ13頭のうち、少なくとも3頭は骨代謝疾患、2頭はゾウ血管内皮ヘルペスウイルス (EEHV) 関連出血病により死亡しており、世界的にもこれらの疾患は仔ゾウの順調な成育を妨げる危険要因である。本研究では、若齢アジアゾウの健全な成育を妨げる骨代謝障害ならびにEEHV血症の早期診断を可能にするため、血中骨代謝マーカー測定と血中EEHV検出法に関する検討を行なっている。

第1章では、血中骨代謝マーカーを利用した骨代謝障害の診断を想定し、アジアゾウの血中骨代謝マーカー値の基準範囲ならびに骨形成マーカーの測定法を検討している。第1節では、アジアゾウ10頭の血清について、骨吸収マーカーである酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b) と骨形成マーカーである骨型アルカリホスファターゼ (BAP) の活性値を測定し、これらは年齢と負の相関を有すること、15歳以下の若齢ゾウの活性値は成獣ゾウに比べ有意に高いことを確認している。以上の成果は、アジアゾウにおける血清TRAP5bとBAPは、他の動物種と同様、骨吸収および骨形成を反映する骨代謝マーカーとして利用できることを示している。第2節では、アジアゾウ4頭から得た血清51検体を用いて、従来法 (小麦胚芽レクチン沈殿法) ならびに市販ヒト用アガロースゲル電気泳動 (AGE) キットにより測定した骨型ALP活性値 (それぞれBAPおよびALP3と呼称する) を比較している。両活性値は正の相関を有し、Bland-Altman分析では測定法の一致基準を満たし、アジアゾウにおいて血清ALP3活性値はBAP活性値に代替可能であることを明らかにしている。

第2章では、1歳2ヵ月齢で急死した人工哺育個体が転帰不良となった要因を明らかにするために、健康管理記録簿上の体格測定および血液検査所見ならびに凍結保存されていた血清を用いて回顧的に研究を行っている。併せて、自然哺育個体における健康管理記録簿上の各種データと凍結保存血清、さらに人工哺育ならびに自然哺育に用いた凍結保存乳汁も分析している。人工哺育個体の体重および体高の推移は自然哺育個体と同等であるが、骨代謝マーカーである血清TRAP5bおよびALP3活性値は常に低値である。乳汁中の骨代謝マーカー活性値は初乳で最も高く、次いで常乳の順であり、人工哺育に用いた2種類の代用乳の活性値は常乳と同等もしくは低値である。以上の成果は、人工哺育個体では骨代謝が低下していたことを明らかにし、さらに初乳摂取が新生仔ゾウの健全発育に重要であることを示唆するものである。

第3章では、臨床現場で実施可能なEEHV診断法の確立を目指し、EEHV1型検出用のプライマーを用いるLAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法の開発を行なっている。既存のPCR法により陽性/陰性が予め診断されている全血21サンプルの検査では、LAMP法は陽性 (1サンプル) と陰性 (20サン

プル)を正確に判定している。人工EEHV1型DNAを添加した全血サンプルでは、LAMP法の検出限界は $10^{1.2}$ コピー/ μ Lであり、既存PCR法の100倍以上の感度である。臨床現場での利用を想定し、2年間にわたり飼育下の若齢アジアゾウ5頭に対してLAMP法による週1回の血中EEHV1型のモニタリングを実施したところ、EEHVは1度も検出されていない。以上の成果は、今回開発したLAMP法が若齢アジアゾウのEEHV血症の経時的モニタリングと早期診断に臨床応用可能であることを示唆するものである。

以上の本研究の成果は、飼育下の若齢アジアゾウの健全な成育を妨げる危険要因である骨代謝障害ならびにEEHV血症の新たな早期診断法を確立しただけでなく、哺乳期アジアゾウの飼育技術向上の端緒を開くものと考えられる。したがって、本論文の審査ならび学力確認の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。