

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 登石 裕子

学 位 の 種 類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 Hormonal Evaluation for Reproductive Management and Treatment with Anti-viral Drug and Epidemiological Study for Equine Coital Exanthema in Thoroughbred Stud
(サラブレッド種馬所における内分泌学的評価を用いた繁殖管理及び馬媾疹に対する抗ウイルス薬による治療と疫学調査)

審 査 委 員

主査 教 授 桐澤 力雄（獣医ウイルス学）

副査 教 授 翁長 武紀（獣医栄養生理学）

副査 教 授 田島 誉士（生産動物内科学Ⅰ）

博士学位論文

学位論文要旨

氏名 登石 裕子

専攻 獣医学専攻
研究分野 基礎獣医学 感染・病理学 獣医ウイルス学

学位論文の題名 Hormonal Evaluation for Reproductive Management
and Treatment with Anti-viral Drug and
Epidemiological Study for Equine Coital Exanthema
in Thoroughbred Stud
(サラブレッド種馬所における内分泌学的評価を用いた
繁殖管理及び馬媾疹に対する抗ウイルス薬による
治療と疫学調査)

学位論文要旨

日本国内のサラブレッドの生産牧場及び種馬所は北海道に集中しており、約半年間でその交配のすべてを行う。種馬所に求められることは、種牡馬を適切に管理し、安全に交配業務を行い、受胎に結び付けることである。そのためには、発情期の適切な時期の雌ウマと交配をさせること、雄ウマの繁殖能力に異常が生じた場合は迅速に診断すること、交配によって伝播する伝染病 (Sexually Transmitted Disease、以下 STD) の蔓延を防止することが求められる。そこで本研究では、サラブレッドの生産現場において迅速かつ簡便に繁殖能力の診断を行うことを目的に、ヒト用の移動式免疫発光測定装置を使用した内分泌学的評価の手法を検討した。また、近年サラブレッドの生産地で散発的に発生し、経済的な損失を与えている STD の 1 つである馬媾疹 (Equine Coital Exanthema、以下 ECE) の臨床症例について治療方法を検討するとともに疫学調査を行った。

雌ウマの交配適期の評価や、雄ウマの生殖能力の診断には、内分泌学的検査が有効である。しかし、従来は大学などの研究機関に血液サンプルを送る必要があり、結果を得るまでに数日を要した。近年ヒト用に開発された移動式免疫発光測定装置 (PATHFAST, LSI Medience Corporation) は、カートリッジに検体を添加するだけで、カートリッジに内蔵された試薬を用いて 30 分以内に chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) で、ホルモン濃度の結果を得ることができる。ステロイドホルモンは、蛋白ホルモンとは異なり動物種差は小さいが、血中の結合蛋白質などによる干渉作用が懸念されるため、動物種ごとに測定系を検証する必要がある。第 1 章では、黄体退行時の雌ウマのプロジェステロン動態、妊娠期の雌ウマのエストラジオール動態、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) 負荷及びテストステロン製剤投与時の雄ウマのテストステロン動態を CLEIA で測定し、従来使用していた測定法と比較した。いずれも両測定間の結果に高い相関関係が認められ、CLEIA がウマの血中プロジェステロン、エストラジオールおよびテストステロン測定に使用可能であることが明らかとなった。また、全血および血清を材料として測定した各ホルモン濃度の間に強い相関関係が認められたことから、全血を測定サンプルとして使用することが可能であることが示された。CLEIA によって迅速にホルモン濃度の結果が得られるようになり、種馬所においてプロジェステロン濃度の結果から交配に来た雌ウマの発情の状態の評価が可能となった。また、テストステロン濃度の結果から雄ウマの生殖能力の診断や、テストステロン製剤投与時の血中テストステロン濃度のモニタリングが可能となった。エストラジオール濃度については、測定限界値より雌ウマの発情状態の評価への使用は不可能であったが、妊娠馬の胎盤機能の評価に使用可能であることが示唆された。

第 2 章では、ECE を発症した 2 頭の雄ウマの症例を報告した。2 頭からはウマヘルペスウイルス 3 型 (EHV-3) が分離され、日本国内で雄ウマから EHV-3 が分離された初めての報告

となった。抗ヘルペスウイルス薬であるバラシクロビルに EHV-3 の抑制効果があることを確認し、同薬を用いて 2 頭の治療試験を行ったが治癒期間の短縮は認められなかった。2 頭の雄ウマから分離された EHV-3 のウイルス DNA の酵素切断パターンが完全に同じものではなかったため、複数のゲノムタイプの EHV-3 が日本国内に存在していることが明らかとなった。また、血清疫学調査により、日本国内に EHV-3 に対する抗体を保有しているウマが広く存在していることが明らかとなった。抗体保有率は雌ウマと比較して雄ウマの方が高く、本研究で経時的に抗体価を評価した 4 頭すべてで 5 月以降の繁殖期に抗体価の陽転が認められた。

本研究では、CLEIA によるホルモン濃度の迅速測定により、交配前の雌ウマの発情の診断や繁殖能力に問題のある雄ウマの鑑別診断が可能となり、種馬所運営の改善に有用であることが示された。培養系で EHV-3 に対する抑制効果が認められたバラシクロビルを用いた治療では臨床症状の明確な改善は認められず、投与時期や投与量についてさらに検討を行う必要があることが示された。日本国内においても EHV-3 の抗体陽性馬が認められたことから、今後も種馬所で発生するリスクが存在することが明らかとなった。交配前に雌ウマの外部生殖器を注意深く観察し、発症した場合には早期発見と治療により、損失を最小限に抑える必要がある。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

サラブレッドの生産現場において迅速かつ簡便に繁殖能力の評価を行うことを目的に、プロゲステロン、エストラジオールとテストステロンの血中濃度測定にヒト用の移動式免疫発光測定装置を使用した内分泌学的検査の手技を検討した。また、近年、サラブレッドの生産地で散発的に発生し、経済的な損失を与えているウマヘルペスウイルス3型（EHV-3）を原因とする性感染症の馬瘡疹の臨床例2例について、抗ヘルペスウイルス薬を用いた治療方法を検討するとともに同症例から分離した EHV-3 の遺伝子レベルでの解析と日本国内での EHV-3 の浸潤状況の調査及び感染時期の推定を血清学的手法で行った。

研究の背景と目的

日本国内のサラブレッドの生産牧場及び種馬所は北海道に集中しており、約半年間でその交配の全てを行う。種馬所に求められることは、種牡馬を適切に管理し、安全に交配業務を行い、受胎に結び付けることである。そのためには、適切な発情期の牝馬と交配させること、牡馬の繁殖能力に異常が生じた場合は迅速に診断すること、交配によって伝播する伝染病の蔓延を防止することが求められる。

牝馬の交配適期の評価や牡馬の生殖能力の評価には内分泌学的な検査が有効である。その検査は通常、大学などの研究機関に血液サンプルを送る必要があり、結果を得るまでに数日を要する。近年、ヒト用に開発された移動式免疫発光測定装置は、カートリッジに検体を添加するだけで30分以内に化学発光免疫測定法（CLEIA）によりホルモン濃度を測定することができる。ステロイドホルモンは蛋白ホルモンとは異なり、動物種差は小さいが、血中の結合蛋白質などによる干渉作用が懸念されるため、動物種ごとに測定系を検証する必要がある。本研究では、プロゲステロン、エストラジオールとテストステロンの血中濃度を CLEIA で測定し、従来法と比較し、その有用性を確認し、牝馬の発情の状態評価や牡馬の生殖能力の評価への応用を試みた。

日本国内で馬の性感染症の一つである馬瘡疹の正式な発生報告は2002年のみで、臨床的に馬瘡疹を疑う症例は散発的にみられているが、ウイルス学的な検査法は標準化されていないため、確定診断はなされてこなかった。2015年に2カ所の牧場で牡馬各1頭が馬瘡疹を発症し、両症例から EHV-3 が分離された。これは、我が国で牡馬から EHV-3 が分離された初報告となった。本研究では、2症例を用いて抗ヘルペスウイルス薬を用いた治療法の検討と日本では EHV-3 に関する研究がほとんどなされていないため、分離ウイルスの DNA 解析と分離ウイルスを用いた中和試験による血清疫学調査を行った。

研究の成果

第1章では、黄体退行時の牝馬のプロジェステロン動態、妊娠期の牝馬のエストラジオールとヒト絨毛性ゴナドトロピン負荷及びテストステロン製剤投与時の牝馬のテストステロン動態をCLEIAで測定し、現在使用されている測定法と比較した。いずれも両測定間の結果に高い相関関係が認められ、CLEIAが馬の血中プロジェステロン、エストラジオール及びテストステロン測定に使用可能であることが明らかになった。また、全血及び血清を材料として測定した各ホルモン濃度の間に強い相関関係が認められたことから、全血を測定サンプルとして使用することが可能であることが示された。CLEIAによって迅速にホルモン濃度の結果が得られるようになり、種馬所においてプロジェステロン濃度の結果から交配にきた牝馬の発情の状態の評価が可能となった。また、テストステロン濃度の結果から牝馬の生殖能力の評価やテストステロン製剤投与時の血中テストステロン濃度のモニタリングが可能となった。エストラジオール濃度については、測定限界値が高かったため牝馬の発情状態の評価への使用は不可能であったが、妊娠馬の胎盤機能の評価に使用可能であることが示唆された。

第2章では、馬痘疹を発症した2頭の牝馬の症例を報告した。2頭からはEHV-3が分離され、日本国内で牝馬からEHV-3が分離された初めての報告となった。抗ヘルペスウイルス薬のアシクロビルのプロドラッグであるバラシクロビルにEHV-3の抑制効果があることをin vitroで確認し、同薬を用いて2頭の治療試験を実施した。病巣の拡大は認められなかったが、治療期間の短縮もみられなかった。2頭の牝馬から分離されたEHV-3のウイルスDNAの制限酵素切断パターンが一致しなかったため、複数のゲノムタイプのEHV-3が日本国内に存在していることが示唆された。また、血清疫学調査により、日本国内にEHV-3に対する抗体を保有している馬が広く存在していることが明らかとなった。抗体保有率は牝馬と比較して牝馬の方が高く、抗体陽性馬のうち回顧的調査が可能であった4頭について抗体価の推移を調べたところ、全て5月以降の繁殖期に抗体の陽転が認められた。このことから感染時期は繁殖シーズンであることが示唆された。

研究の評価

本研究では、CLEIAによるホルモン濃度の迅速測定により、交配前の牝馬の発情の評価や繁殖能力に問題のある牝馬の鑑別が可能となり、種馬所運営の改善に有用であることが示された。抗ヘルペスウイルス薬のバルトレックスを用いた馬痘疹の臨床例の治療では、臨床症状の明確な改善は認められなかったものの、病巣の拡大はなかったことから、体外へのウイルス排泄量の低下が推察され、ウイルス汚染の軽減に貢献していると思われる。今後は、投与時期や投与量等について検討を行う必要があるものと思われる。日本国内にEHV-3の抗体陽性馬が多数認められ、回顧的調査の結果、感染時期は繁殖シーズンと考えられた。これらの成績は、種馬所で馬痘疹の感染リスクが高いことを示唆し、種馬所において交配前に牝馬の外部生殖器を注意深く観察し、発症した場合には早期発見と治療により、経済損失を最小限に抑える必要性を示した。

以下に公表論文を示すが、3年半の在籍で学位論文の提出資格を満たした。

- 1) *J. Equine Sci.* 24: 47-51. 2013. (FA)
- 2) *J. Reprod. Dev.* 62: 631-634. 2016. (FA, IF: 1.424)

- 3) *J. Vet. Med. Sci.* 79: 632-635. 2017. (FA, IF: 0.845)
- 4) *J. Vet. Med. Sci.* 79: 636-643. 2017.
- 5) *J. Reprod. Dev.* Doi: 10.1262/jrd.2017-099. 2017.(FA, IF: 1.424)
- 6) *Jpn. J. Vet. Res.* (Accepted on Nov. 16, 2017) (FA, IF: 0.703)

FA 論文の IF 合計 : 4.396

以上のことから、登石 裕子氏は博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 3 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2018年2月8日

審査委員

主査	教 授	桐澤	力雄
副査	教 授	翁長	武紀
副査	教 授	田島	誉士