

【平成24年1月-3月授与分】博士學位論文内容の要旨 及び審査の結果の要旨

<https://hdl.handle.net/2324/25927>

出版情報：2012-12-10. 九州大学
バージョン：
権利関係：



氏名・(本籍・国籍)	やましたはる ひろ 山下晴洋 (埼玉県)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	生資環博乙第152号
学位授与の日付	平成24年2月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Effects of Estrogen against Functional Changes Induced by Retinal Neurotoxicity: An Electroretinographic Study in Rats (網膜神経毒性による機能変化に対するエストロゲンの作用 : ラット網膜電図による検討)
論文調査委員	(主査) 教授 飯田 弘 (副査) 教授 飛松 省三 准教授 市川 敏夫

論 文 内 容 の 要 旨

ヒトの臨床において網膜電図は International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) により、正確な診断、病態の進行度把握のために5つの反応(全視野刺激網膜電図; 杆体応答、最大応答、律動様小波、錐体応答及びフリッカーERG)を測定することが推奨されている。CHAPTER Iでは、白色LED光源一体型電極を用いて全視野刺激網膜電図のラットへの応用性を検討した。CHAPTER II及びIIIでは、エストロゲンの網膜神経毒性に対する保護作用のプロファイルを明らかにするため、ストレプトゾトシン誘発糖尿病雌ラット及びNMDA誘発網膜神経毒性モデルラットにおけるエストロゲンの作用を検討した。

CHAPTER I: 白色LED光源一体型電極による全視野刺激網膜電図をアルビノラットに応用し、さらに、ヨウ素酸ナトリウムによる視覚毒性について、本測定法を用いて検討した。実験1では、光刺激強度、背景光強度及び明順応時間についてラットにおける至適測定条件の検討を行い、測定条件を決定した。実験2では、ヨウ素酸ナトリウムにより網膜毒性を誘発したラットを用い、全視野刺激網膜電図測定の有用性を確認した。その結果、ヨウ素酸ナトリウムによる網膜毒性は、最初に杆体に発現し続いて錐体に発現することが示された。以上より、ラットにおける白色LED光源一体型電極による全視野刺激網膜電図は、杆体及び錐体に対する影響を分離して評価するために有用な方法と考えられた。

CHAPTER II: ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病雌ラットの網膜機能変化に対するエストロゲンの作用を全視野刺激網膜電図により評価した。雌ラットを(1)コントロール群(偽手術及び

溶媒投与)、(2) STZ 群 (偽手術及び STZ 投与)、(3) OVX 群 (卵巣摘出及び溶媒投与)、(4) OVX +STZ 群 (卵巣摘出及び STZ 投与) の 4 群に群分けし、全視野刺激網膜電図を卵巣摘出及び STZ 投与前、STZ 投与後 4 及び 12 週に測定した。STZ 投与後 4 週において、OVX 群及び STZ 群では、いずれの波形においてもコントロール群に対し差はみられなかったが、OVX+STZ 群では、錐体応答振幅の低下がコントロール群に対し有意に認められた。STZ 投与後 12 週では、本応答は STZ 群及び OVX+STZ 群で同様の傾向を示した。以上のように STZ 誘発糖尿病雌ラットにおいて、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏は、糖尿病による錐体応答振幅の低下を早期化した。しかしながら本変化は一過性の変化であった。

CHAPTER III : NMDA の単回硝子体内投与に対する β -エストラジオール (E2) の作用を機能及び組織の両面で評価した。雄ラットを (1) コントロール群、(2) NMDA 群 (5 mM NMDA の硝子体内投与)、(3) NMDA+E2 群 (5 mM NMDA の硝子体内投与及び E2 皮下埋め込みによる持続投与) の 3 群に群分けし、NMDA 投与後 7 日に全視野刺激網膜電図及び網膜病理切片を用いた定量的な組織検査を行った。全視野刺激網膜電図測定の結果、NMDA 群では、暗所閾値電位の陰性波、杆体応答 b 波、律動様小波、フリッカー-ERG b 波 (第 2 波) 及び錐体応答 b 波の振幅減弱が認められた。網膜病理切片による組織評価では、内網状層の厚さの減少、外網状層及び外顆粒層の厚さの増加、並びに、神経節細胞層における細胞数の減少が認められた。NMDA+E2 群では、NMDA 群で振幅減弱がみられた網膜電図の波形のうち OP2 を除く波形で E2 投与による保護作用が認められた。しかしながら、組織評価では NMDA 群と NMDA+E2 群の間に差は認められなかった。以上の結果より、E2 は NMDA 誘発神経毒性に対し網膜の機能保護作用を示したことから、網膜虚血や緑内障のような NMDA が関連する病態の治療において E2 の有効性が示唆された。

以上のように、CHAPTER I では、白色 LED 光源一体型電極による全視野刺激網膜電図をラットに応用した。本手法は薬物誘発視覚毒性の評価において従来の方法に比べ、より詳細な評価が可能となるものと考えられた。また、CHAPTER II 及び III の結果から、糖尿病性網膜症及び網膜神経節細胞死に関連する病態の治療におけるエストロゲンの有効性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、白色 LED 光源一体型電極による全視野刺激網膜電図をラットに応用し、糖尿病性網膜症及び網膜神経節細胞死に関連する病態の治療におけるエストロゲンの作用をラットにおいて確認したものである。

白色 LED 光源一体型電極による全視野刺激網膜電図をアルビノラットに応用し、さらに、ヨウ素酸ナトリウムによる視覚毒性について、本測定法を用いて検討した。まず、光刺激強度、背景光強度及び明順応時間についてラットにおける至適測定条件の検討を行い、測定条件を決定した。ついで、ヨウ素酸ナトリウムにより網膜毒性を誘発したラットを用い、全視野刺激網膜電図測定の有用性を確認した。その結果、ヨウ素酸ナトリウムによる網膜毒性は、最初に杆体に発現し続いて錐体に発現することが示された。以上より、ラットにおける白色 LED 光源一体型電極による全視野刺激網膜電図は、杆体及び錐体に対する影響を分離して評価するために有用な方法と考えられた。この有用性が確認された全視野刺激網膜電図によって、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病雌ラットの網膜機能変化に対するエストロゲンの作用を評価した。その結果、STZ 誘発糖尿病雌ラットにおいて、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏は、糖尿病による錐体応答振幅の低下を早期化した。また、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 誘発網膜障害モデルラットに対する β -エストラジオール (E2) の作用を機能及び組織の両面で評価した。その結果、NMDA 誘発網膜障害モデルにおいて、E2 は網膜の細胞死に対して抑制作用は示さなかつ

たが、網膜の機能低下に対して保護作用を示すことが明らかとなった。

以上要するに、本論文は白色 LED 光源一体型電極による全視野刺激網膜電図をラットに応用し、本測定法を用いて各種視覚障害モデルラットに対するエストロゲンの作用を検討したものであり、動物学及び電気生理学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	よしだ むつひろ 吉田 睦浩 (岡山県)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	生資環博乙第153号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	A fundamental study of an entomopathogenic nematode <i>Steinernema litorale</i> Yoshida, 2004 (Rhabditida: Steinernematidae) for evaluating potential as a biological control agent (Rhabditida目Steinernematidae科昆虫病原性線虫 <i>Steinernema litorale</i> Yoshida, 2004の生物防除資材としての可能性を評価するための基礎研究)
論文調査委員	(主査) 教授 高木正見 (副査) 教授 多田内 修 客員准教授 岩堀英晶

論文内容の要旨

昆虫病原性線虫はその殺虫活性の高さ、人工培養可能なこと、低温保存できること等から、欧米では古くから探索・収集および実用化に向けた研究がなされており、害虫の生物防除資材として広く使われている。わが国では欧米で既に製剤化されていた種と土着種 *S. kushidai* の利用に向けた研究が核となって、多くの研究が進められたが、現在では導入種を成分とする輸入製剤しか利用されていない。一方、日本にも多くの土着種が分布することが明らかになり、土着種の1種 *Steinernema litorale* の生物的防除への応用に向けた基礎研究として、本研究が開始された。本研究では、形態学的、分子生物学的、生物地理学および昆虫病理学的研究が行われた。

本種は以下の形態的特徴によって特徴づけられる：感染態三期幼虫の体長、頭端から排泄口までの距離、尾長、E 値（頭端から排泄口までの長さ/尾長）、側帯の形状；オス成虫の尾端・交接刺の形状、交接刺・導帯の長さ；メス成虫の陰門・尾部の形状、D 値（頭端から排泄口までの長さ/頭端から後部食道球基部までの長さ）。本種は、*S. feltiae*、*S. thanhi*、*S. ichnusae*、*S. kari*、*S. scarabaei*、*S. kraussei*、*S. oregonense*、*S. loci*、*S. diaprepesi* と形態的な類似が見られた。詳細な形態学および分子生物学的研究（rDNA の ITS 領域の RFLP 解析）の結果、本種は表形的に *S. feltiae* と最も類似することが判明した。そこで、両種の交配試験を行ったところ、両種は生殖的に隔離されていることが確認された。また、他の日本産本線虫類の形態的特徴を調査し、本種を他の日本産 *Steinernema* 属 11 種 (*S. abbasi*、*S. feltiae*、*S. kraussei*、*S. kushidai*、*S. monticolum*、*Steinernema* spp. RFLP types MY3・MY4・MY5、MY6・MY7・MY8) および *Heterorhabditis* 属 2 種 (*H. indica*、*H. megidis*) から識別するための検索表を示した。

本種は愛知県渥美半島の伊良湖崎から検出されたアイソレートを基に記載され、その後の分布調査により、北海道から長崎県対馬までの分布が確認された。本研究では、本種の分布に関する特徴を示すとともに、日本産 *Steinernema* 属 11 種および *Heterorhabditis* 属 2 種の分布パターンを本種と比較した。北海道では、本種は *S. feltiae* と同じ環境に生息しており、同じサンプリングサイトから

検出されたこともある。本州では、本種は *Steinernema* sp. RFLP type MY8 と *H. indica* と類似の環境から検出されているが、両種と同じサンプリングサイトから検出されたことはない。

上述の昆虫病原性線虫の分類研究および分布調査と同時に、本種を実際に生物防除に供しうかどうかを評価するために、*Steinernema* 属土着種 10 種とともにヤガ類幼虫に対する病原性を調査した。最初に、土着種 10 種 17 アイソレートの病原性をニセタマナヤガ中齢幼虫を使って比較した結果、*S. feltiae* と *S. litorale* が選定された。次いで、前者 2、後者 8 アイソレートの病原性をカブラヤガ中齢幼虫を使って比較した結果、えりもアイソレート (HkEr36) と北茨城アイソレート (IbKt142) がそれぞれ選定された。両種とも 25°C 以下で高い病原性を示したが、30°C では低下した。そこで *S. abbasi* 西表島アイソレート (OnIr181) を加えて、3 アイソレートのカブラヤガ・ハスモンヨトウ老齢幼虫に対する病原性を導入種 *S. carpocapsae* All 系統と比較した。*S. litorale* IbKt142 は 7~25°C で高い病原性を示し、*S. carpocapsae* All と比較して 7~15°C でカブラヤガ、7・10°C でハスモンヨトウに対し有意に高い病原性を示した。*S. abbasi* OnIr181 は *S. carpocapsae* All と比較して 30・35°C でカブラヤガ、35°C でハスモンヨトウに対し有意に高い病原性を示した。本試験の結果、*S. litorale* IbKt142 がヤガ類幼虫に対する生物防除資材として最も有望であることが判明した。さらに、*S. litorale* IbKt142 の効果が落ちる 25°C 以上の高温域で効果を発揮する種も見出した。そこで、本種の野外での利用可能性を評価するために、まず、施設内での越夏試験を行い、初夏から初冬にかけての本種の生残を確認した。次いで、晩春から秋にかけてトマトおよびナスを植栽した施設における本種の残効性を調査した。その結果、本種の残効性は秋から次年の春にかけて確認された。さらに、晩秋から春にかけて露地野菜やイチゴを植栽した畑においても、晩秋に施用された本種の残効が、次年の晩秋に確認された。本研究により、現在日本で市販されている輸入製剤にはない優れた特徴として、低温域での高い病原性と長期間の生残能力を本種が持つことが判明した。このような特性を生かす本種の利用法として、晩秋から早春における越冬害虫の防除、予防的施用、定着利用等が期待できる。

論文審査の結果の要旨

昆虫病原性線虫はその殺虫活性の高さ、人工培養可能なこと、低温保存できること等から、欧米では古くから探索・収集および実用化に向けた研究がなされており、害虫の生物防除資材として広く使われている。わが国では欧米で既に製剤化されていた種と土着種 *S. kushidai* の利用に向けた研究が核となって、多くの研究が進められたが、現在では導入種を成分とする輸入製剤しか利用されていない。一方、日本にも多くの土着種が分布することが明らかになり、土着種の 1 種 *Steinernema litorale* の生物的防除への応用に向けた基礎研究として、本研究が開始された。本研究では、形態学的、分子生物学的、生物地理学および昆虫病理学的研究が行われた。

本種は以下の形態的特徴によって特徴づけられる：感染態三期幼虫の体長、頭端から排泄口までの長さ、尾長、E 値（頭端から排泄口までの長さ／尾長）、側帯の形状（オス成虫の尾端・交接刺の形状）、交接刺・導帯の長さ（メス成虫の陰門・尾部の形状）、D 値（頭端から排泄口までの長さ／頭端から後部食道球基部までの長さ）。本種は、*S. feltiae*, *S. thanhi*, *S. ichnusae*, *S. karii*, *S. scarabaei*, *S. kraussei*, *S. oregonense*, *S. loci*, *S. diaprepesi* と形態的な類似が見られた。詳細な形態学および分子生物学的研究（rDNA の ITS 領域の RFLP 解析）の結果、本種は表形的に *S. feltiae* と最も類似することが判明した。そこで、両種の交配試験を行ったところ、両種は生殖的に隔離されていることが確認された。また、他の日本産本線虫類の形態的特徴を調査し、本種を他の日本産 *Steinernema* 属 11 種 (*S. abbasi*, *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. kushidai*, *S. monticolum*, *Steinernema* spp. RFLP types MY3, 同 MY4, 同 MY5, 同 MY6, 同 MY7, 同 MY8) および *Heterorhabditis* 属 2 種 (*H. indica*, *H. megidis*) から識別するための検索表を示した。

本種は愛知県渥美半島の伊良湖崎から検出されたアイソレートを基に記載され、その後の分布調査により、北海道から長崎県対馬までの分布が確認された。本研究では、本種の分布に関する特徴を示すとともに、日本産 *Steinernema* 属 11 種および *Heterorhabditis* 属 2 種の分布パターンを本種と比較した。北海道では、本種は *S. feltiae* と同じ環境に生息しており、同じサンプリングサイトから検出されたこともある。本州では、本種は *Steinernema* sp. RFLP type MY8 と *H. indica* と類似の環境から検出されているが、両種と同じサンプリングサイトから検出されたことはない。

上述の昆虫病原性線虫の分類研究および分布調査と同時に、本種を実際に生物的防除に供しうるかどうかを評価するために、*Steinernema* 属土着種 10 種とともにヤガ類幼虫に対する病原性を調査した。最初に、土着種 10 種 17 アイソレートの病原性をニセタマナヤガ中齢幼虫を使って比較した結果、*S. feltiae* と *S. litorale* が選定された。次いで、前者 2、後者 8 アイソレートの病原性をカブラヤガ中齢幼虫を使って比較した結果、えりもアイソレート (HkEr36) と北茨城アイソレート (IbKt142) がそれぞれ選定された。両種とも 25°C 以下で高い病原性を示したが、30°C では低下した。そこで *S. abbasi* 西表島アイソレート (OnIr181) を加えて、3 アイソレートのカブラヤガ・ハスモンヨトウ老齢幼虫に対する病原性を導入種 *S. carpocapsae* All 系統と比較した。*S. litorale* IbKt142 は 7~25°C で高い病原性を示し、*S. carpocapsae* All と比較して 7~15°C でカブラヤガ、7°C、10°C でハスモンヨトウに対し有意に高い病原性を示した。*S. abbasi* OnIr181 は *S. carpocapsae* All と比較して 30°C、35°C でカブラヤガ、35°C でハスモンヨトウに対し有意に高い病原性を示した。本試験の結果、*S. litorale* IbKt142 がヤガ類幼虫に対する生物防除資材として最も有望であることが判明した。さらに、*S. litorale* IbKt142 の効果が落ちる 25°C 以上の高温域で効果を発揮する種も見出した。そこで、本種の野外での利用可能性を評価するために、まず、施設内での越夏試験を行い、初夏から初冬にかけての本種の生残を確認した。次いで、晩春から秋にかけてトマトおよびナスを植栽した施設における本種の残効性を調査した。その結果、本種の残効性は秋から次年の春にかけて確認された。さらに、晩秋から春にかけて露地野菜やイチゴを植栽した畑においても、晩秋に施用された本種の残効が、次年の晩秋に確認された。本研究により、現在日本で市販されている輸入製剤にはない優れた特徴として、本種が低温域での高い病原性と長期間の生残能力を持つことが判明した。このような特性を生かす本種の利用法として、晩秋から早春における越冬害虫の防除、予防的施用、定着利用等が期待できる。

以上要するに、本研究は、日本土着種の昆虫病原性線虫 *Steinernema litorale* の生物的防除への応用に向けた基礎研究であり、応用動物学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位に値すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	フィフィ ユースキャンティ Vivi Yuskianti (インドネシア)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博乙第154号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Development of DNA molecular markers and their application for genetic analysis in <i>Falcataria moluccana</i> and <i>Acacia</i> spp. (モルッカネムおよびアカシアにおけるDNA分子マーカーの開発とその遺伝育種への応用)
論文調査委員	(主査) 教授 白石 進 (副査) 教授 小田 一幸 教授 吉田 茂二郎

論文内容の要旨

Acacia (アカシア) 類 (特に *A. mangium* (アカシヤマンギウム) とその種間雑種) および *Falcataria moluccana* (モルッカネム) の遺伝的解析および遺伝的改良を進める上で、DNA 分子マーカーの利用が求められている。とりわけ、品種、育種母材 (クローン) の管理技術および種間雑種の鑑定技術としては不可欠である。そこで、(1) *F. moluccana* における信頼性の高い DNA 分子マーカーである SNP (一塩基多型) マーカーおよびマイクロサテライトマーカーの開発とこれを利用した効率的なクローン鑑定法の構築、(2) *A. mangium*, *A. auriculiformis* および両種間の雑種の DNA 鑑定法の開発、(3) *A. auriculiformis* において簡便、正確で信頼性の高いクローン鑑定法の開発を行った。

まず、*F. moluccana* における SNP マーカーの開発とこれを利用した鑑定法の構築では、*F. moluccana* ゲノムから無作為に選ばれた 31 個の DNA 領域 (合計 6,262bp) において SNP の探索を行った結果、平均で 63 塩基対 (bp) 当たり 1 個の SNP が確認され、SNP がゲノム中に高い頻度で存在していることから、本樹種における SNP マーカーの開発が比較的容易であることを明らかにした。さらに変異性の高い 12 個の SNP を選抜し、各 SNP における対立遺伝子型を効率的にタイピングできる 3 組 (各組 4 個の SNP で構成) のマルチプレックス一塩基プライマー伸長 (multiplexed single nucleotide primer extension) 分析系を構築した。また、各 SNP における対立遺伝子頻度から本鑑定法の個体 (クローン) 識別能力 (discrimination power) を算出したところ 0.9999 となり、高い識別能力を有していた。さらに、高い変異性を有するマイクロサテライトマーカーの開発では、ligation-mediated suppression PCR 法を用いて 10 個の 4 塩基繰返しマイクロサテライトマーカーを開発した。これらのマーカーの多型性を評価した結果、各マーカーの対立遺伝子数は 9~16 (平均値: 12.4)、ヘテロ接合体率 (期待値) は 0.752~0.924 となり、4 塩基繰返しマイクロサテライトマーカーが極めて高い多型性を示すことを明らかにした。

次に、DNA 分子マーカーを利用した *A. mangium* と *A. auriculiformis* 間の種間雑種の鑑定法の開発では、両樹種で PCR 増幅された RAPD (random amplified polymorphic DNA) フラグメントの塩基配列解析結果を基に、*A. mangium* と *A. auriculiformis* で種特異的な対立遺伝子をもつ 5 個の SNP を明らかにした。これらの SNP を両樹種および雑種鑑定に利用し、5 個の SNP における対立遺伝子型を 1 回の DNA 分析で効率的にタイピングできるマルチプレックス一塩基プライマー伸長分析系を構築した。

最後の *A. auriculiformis* における信頼性の高いクローン鑑定法の開発では、多型性を示す RAPD フラグメントの塩基配列情報を基に、6 個の SCAR (sequence characterized amplified region) マーカーを開発した。これらをマルチプレックス PCR し、その PCR 産物の電気泳動パターンから簡便にクローン鑑定

を行うことのできる MuPS (multiplex-PCR of SCAR markers) 分析系を構築した。

論文審査の結果の要旨

林木の遺伝的改良において、品種・クローンの管理技術と種間雑種の鑑定技術は不可欠である。本論文は、熱帯産有用早成樹種であるモルッカネム (*Falcataria moluccana*) およびアカシア (*Acacia*) 類において、SNP (single nucleotide polymorphism) マーカー等の DNA 分子マーカーの開発とこれを利用した効率的な DNA 分析系の構築を行ったものである。

モルッカネムにおけるマーカーの開発とこれを利用した品種・クローン鑑定法の構築では、まず、核ゲノムから無作為に選ばれた 31 個の DNA 領域 (合計 6,262bp) から SNP の探索を行い、SNP がゲノム中に高い頻度で存在していることを明らかにした。その中から変異性の高い 12 個の SNP を選抜し、各 SNP における対立遺伝子型を効率的にタイピングできる 3 組 (各組 4 個の SNP で構成) のマルチプレックス塩基プライマー伸長 (multiplexed single nucleotide primer extension) 分析系を構築した。この分析系の個体 (クローン) 識別能力 (discrimination power) は 0.9999 であり、高い識別能力を有することを示した。さらに、高い変異性を有するマイクロサテライトマーカーの開発では、ligation-mediated suppression PCR 法を用いて 10 個の 4 塩基繰返しマイクロサテライトマーカーを開発し、多型性を評価した。その結果、各マーカーの対立遺伝子数の平均値は 12.4 個 (9~16)、ヘテロ接合体率の期待値は 0.752~0.924 となり、4 塩基繰返しマイクロサテライトマーカーの多型性が極めて高いことを明らかにした。

次に、*A. mangium* と *A. auriculiformis* の種間雑種の鑑定法の開発では、両樹種の RAPD (random amplified polymorphic DNA) フラグメントの塩基配列情報から、両種で種特異的な 5 個の SNP を明らかにし、これらの SNP を 1 回の分析で効率的にタイピングできる分析系を構築した。

最後に、*A. auriculiformis* におけるクローン鑑定法の開発では、多型性を示す RAPD フラグメントの塩基配列情報を基に、6 個の SCAR (sequence characterized amplified region) マーカーを開発した。これらをマルチプレックス PCR 化し、その PCR 産物の電気泳動パターンから簡便にクローン鑑定を行うことのできる分析系を構築した。

以上要するに、本論文は、熱帯産早成樹種における DNA 分子マーカーによる品種・クローン管理技術および種間雑種鑑定技術の進展に寄与するものであり、林木育種学および森林遺伝学上価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格があるものと認める。