

称号及び氏名	博士（獣医学）秋吉 秀保		
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 31 日		
論文名	「Studies on characteristic and clinical application of canine chromogranin A (犬クロモグラニンAの特性および臨床応用に関する研究)」		
論文審査委員	主査 教授	大橋 文人	
	副査 教授	津山 伸吾	
	副査 教授	久保 喜平	

論文要旨

緒言

近年、小動物臨床における高度診断医療機器の導入による疾病診断率の向上、伴侶動物の増加などにより、イヌの手術適応症例の増加が認められる。外科手術は小動物臨床において一般的治療法であり、数少ない原因療法の一つとしてきわめて有用な治療法である。しかしながら、周術期において犬に対する侵襲の程度を客観的に評価する方法は確立されていない。そのため、手術後に犬が感じている痛みなどのストレスは主観的評価に頼らざるをえない。より低侵襲な手術法の開発や、動物福祉的観点などから犬のストレスを客観的に評価するバイオマーカーを探索することは重要である。

クロモグラニンA (CgA) は副腎髄質クロマフィン顆粒内に存在し、アミノ酸残基数約 450、分子量約 49 kDa の親水性酸性糖タンパクとして同定された。CgA は SDS-PAGE では 68-75kDa のバンドとして確認されることが知られている。また、CgA は副腎髄質クロマフィン顆粒からカテコールアミンと同時に開口分泌される事が確認され、その後、広範な神経内分泌組織に分布することが確認された。CgA の生体内での役割は未だ明らかではないが、細胞内外でプロセシ

ングを受けバソスタチン、パンクレアスタチン等の生理活性ペプチドが生成される事が判明している。医学領域において、褐色細胞腫、上皮小体腫瘍および過形成、C細胞腫、小細胞肺癌、膵島細胞腫、各種カルチノイドおよびペプチド産生性神経内分泌腫瘍等の患者における血中 CgA は著しく高値を示すことが報告されており、これら腫瘍に対する血液学的、病理組織学的診断マーカーとして利用されている。また CgA は従来ストレスマーカーとして応用されてきたコルチゾールやカテコールアミンと比較し、日内変動が少ないこと、測定やサンプルのハンドリングが簡便であることなどから、ヒトやウマにおいて、身体的、精神的ストレスを反映する生理指標として応用されはじめている。しかしながら、小動物獣医臨床においてストレスマーカーとしての CgA に対する研究はほとんどなされていない。

本研究では、血中 CgA が犬のストレスの評価に応用できるか否か検討する事を目的とし、犬 CgA タンパクの一次構造解析、様々なストレス下における犬の血中 CgA の変動および犬における高感度測定系の確立のための抗犬 CgA 抗体の作成を行った。

第 1 章 犬 CgA cDNA のクローニングおよび mRNA の組織分布

犬副腎組織より、total RNA を抽出後、cDNA を作成した。これを基に犬 CgA cDNA をクローニングし、その塩基配列（開始コドンを含む 1293 bp）を解析した。塩基配列をもとに推測されたアミノ酸配列(407 残基)をすでに報告されている他の動物種（人、牛、馬）と比較したところ N 末端領域（1-77）並びに C 末端領域（314-407）において保存性が高い事が確認された。また、RT-PCR 法を用いた犬 CgA mRNA の組織分布について検討した結果、ほぼ全身の臓器・組織において発現が確認された。

犬 CgA のアミノ酸配列は人、牛、馬などの大型哺乳類と比較し相同性は高く、

人、牛などの CgA を認識する抗体と交差反応する可能性は高いと考えられた。

第 2 章 犬 CgA タンパクの抽出・精製、精製犬 CgA タンパクに対する抗人 CgA 抗体の免疫学的交差反応に関する検討

現在、入手可能な犬 CgA 抗体が存在しないため、入手が容易で測定操作が簡便な人用 ELISA キット (DAKO A/S) を用いて犬 CgA の測定が可能か否か検討した。Ujendra Kumar らの方法を用いて犬副腎よりタンパクを抽出し、この抽出物におけるウサギ抗人 CgA 抗体を用いた Western blotting の結果、陽性バンドの分子量が約 68 kDa であったことから、この 68 kDa タンパクを標的としさらに精製を行った。DEAE-Sepharose 4B および Phenyl-Sepharose 4B カラムにより分離、精製した標品を精製 68 kDa タンパクとした。この精製 68 kDa タンパクの N 末端 12 残基のアミノ酸配列の解析結果、第 1 章で明らかとなった犬 CgA アミノ酸配列と完全に一致した事から、この精製 68 kDa タンパクは犬 CgA であると同定した。

本測定キットの抗体 (ウサギ抗人 CgA 抗体) を用いた Western blotting および犬副腎組織における免疫組織学的検討の結果、人 CgA 抗体は犬 CgA に対して交差反応性を示すことが確認された。また、犬 CgA は本 ELISA キットにおいて 0.25 - 200 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲において濃度依存性に反応する事が確認された。健常犬血漿を用いて本 ELISA キットにおける inter-,intra assay および day to day variation について検討した結果、それぞれ、3.9%、5.9%および 8.6%であった。以上の結果から、本 ELISA キットを用いて血中犬 CgA は測定可能であることが示唆された。

本 ELISA キットを用い、血中犬 CgA の日内変動および基準上限値 (2 S.D. above the mean level) について検討した。日内変動率は 5.5% (range 0.4 - 9.6%) であり、有意な変化を示さなかった。また、健常ビーグル成犬 31 頭を用いて CgA を測定

し、基準上限値を 3.49 U/L と決定した。

第 3 章 人用 CgA 測定キットを用いたストレス下での犬の血中 CgA 濃度の測定

第 1 節 低血糖ストレス下における犬 CgA 濃度の変化

犬において血中 CgA がストレスマーカーとして有用どうか検討するため、インスリン投与による低血糖ストレスモデルを用いて検討を行った。無麻酔、無拘束の状態でビーグル成犬 6 頭に対して 0.2 U/kg のインスリンを静脈内投与後、経時的に採血し、血中アドレナリン、ノルアドレナリン、コルチゾールおよび CgA 濃度についてそれぞれ測定し、その変動について検討した。その結果、CgA 濃度はインスリン投与 30 分後から生理食塩水投与群と比較し有意に上昇し、この変化は 120 分後まで持続した。また、CgA 濃度の変化はアドレナリン、ノルアドレナリン、コルチゾールと高い相関性を示した。これらの結果から、CgA 濃度は低血糖ストレスを反映することが示唆された。

第 2 節 周術期における犬の血中 CgA 濃度の変化

犬血中 CgA 濃度が実際の手術症例において周術期ストレスを反映し変動するかどうかを検討した。症例は本学附属家畜病院に来院した手術適応症例 77 例を用いた。その結果、手術前と比較し血中 CgA 濃度は手術直後に有意な上昇が確認された。さらに、この上昇は手術時間が延長すると上昇率が高くなることが確認された。これら症例のうち 12 頭を用いて手術後 24 時間まで経時的な CgA 濃度の変化を観察したところ、手術直後から有意な上昇が観察された CgA は手術後 3 時間まで有意な上昇が持続することが確認された。避妊手術例 12 例を用いて行った鎮痛剤の投与による CgA 濃度の変化について検討したところ、鎮痛剤投与群において生理食塩水投与群と比較し、手術 1 時間後に血中 CgA 濃度の有意な減少が確認された。

また、腎機能低下症例（血中クレアチニン濃度 >1.5 mg/dl）について CgA 濃度を測定したところ、健常群と比較し有意に上昇することおよび基準上限値を上回ることが判明した。

これらのことから、犬において血中 CgA 濃度は周術期における痛みを含むストレス反応を反映することが確認された。また、CgA を用いてストレスを評価する場合、腎機能には注意を払う必要があると考えられる。

第 4 章 犬 CgA ペプチド抗体および抗牛 CgA 抗体の作成

第 3 章にて犬の血中 CgA 濃度はストレスマーカーとして有用である可能性が示唆されたが、第 2、3 章における結果から、人 CgA 抗体を用いた犬血中 CgA 濃度の測定結果は人の結果と比較して明らかに低いことが判明した。これは異種抗体を用いた測定法の結果であることが考えられるため、より高感度な測定系の確立を目的とし、以下に示す方法にて抗体を作成した。

第 1 章にて予測された犬 CgA アミノ酸配列を基に、抗原性検索を行い、CgA20-38、CgA48-67、CgA170-191、CgA253-275、CgA358-376 の部位を選択し、ペプチドを合成し、キャリアタンパクと結合後、ウサギに免疫することにより抗犬 CgA ペプチド抗体を作成した。

また、第 2 章において犬副腎組織より CgA の抽出および精製を行ったが、犬副腎髄質組織重量が非常に小さく得られるタンパク量が少ないこと、犬副腎組織の大量入手が困難であること、および CgA タンパクが精製過程において分解しやすいタンパクであることなどから、ウサギに免疫するための十分な抗原量の確保が困難であると判断した。そのため、犬 CgA アミノ酸配列と比較的相同性が高く、大量に副腎組織が入手可能な牛を選択し、第 2 章と同様の方法を用いて、70 kDa プロテインを抽出・精製した。さらに、この部分精製 70 kDa プロテインを SDS-PAGE にて分離し、ゲルから 70kDa のバンドを切り出した後、電

氣的に溶出して得た標品を精製 70 kDa プロテインとした。この精製 70 kDa プロテインの N 末端アミノ酸配列を解析したところ、すでに報告されている牛 CgA のアミノ酸配列と完全に一致したため、この 70 kDa プロテインを牛 CgA と同定した。精製牛 CgA を抗原として犬ペプチド抗体の作成と同様の方法でウサギに免疫することにより抗ウシ CgA 抗体を得た。

作成したすべての抗体は犬副腎を用いた免疫組織染色において副腎髄質細胞質に対して特異的な染色性を有する事が確認された。また、Western-blotting および ELISA において、CgA20-38 を除くすべての抗体は犬 CgA に対し反応すること、また、その反応性は抗人 CgA 抗体よりも高いことが確認された。これらのことから、本章にて作成した抗体はイヌの血中 CgA の高感度な測定に応用が可能であると考えられる。

総括

1. イヌ CgA の塩基配列 1293 bp およびアミノ酸配列 407 残基が明らかとなった。さらに、イヌ CgA アミノ酸配列の N 末端、C 末端側領域において他の動物と比較し高い保存性を示すこと、および犬 CgA mRNA は幅広い臓器・組織に分布する事が明らかとなった。
2. イヌ CgA タンパクを抽出・精製した。この精製イヌ CgA を用いて、イヌ CgA に対して抗人 CgA 抗体が交差反応し、この抗体を用いた ELISA キットによって犬血中 CgA は測定可能である事を確認した。本測定系において血中イヌ CgA 濃度は日内変動率が小さく、その基準上限値は 3.49 U/L であることが明らかとなった。
3. 低血糖ストレス下のイヌにおいて血中 CgA 濃度は増加し、また、手術後

のイヌにおいても増加する事および手術時間の延長に伴って高い値となることが明らかとなった。また、この手術後の上昇は鎮痛薬の投与によって抑制される事が示された。これらの結果から血中 CgA 濃度を測定する事によりストレス反応の程度を反映する事が示唆された。

4. 作成した抗犬 CgA ペプチド抗体ならびに抗牛 CgA ポリクローナル抗体は犬 CgA に対して抗人 CgA 抗体よりも高い反応性を持つことが確認された。これらの抗体はイヌ血中 CgA 濃度の測定し、臨床的にストレス反応を評価するうえで非常に有用なツールであると考えられる。

審査結果の要旨

小動物臨床における外科手術は根治のため欠く事ができない治療法であるが、同時に動物に対して侵襲を与える治療法である事も事実である。動物に与える侵襲を客観的に評価する事はより安全な手術や麻酔法の開発につながるものであり重要である。しかしながら、現在、小動物臨床において侵襲の程度を正確に測定する方法は確立されていない。

本論文は、侵襲に反応し副腎髄質クロマフィン顆粒より分泌されるクロモグラニンA (CgA) に注目し、犬において CgA の分子生物学的および免疫学的特性を明らかにするとともに、様々なストレス下における血中 CgA 濃度の変化について検討し、ストレス下の犬において高い値となる事を明らかとした。また、さらに犬 CgA に関してより詳細な検討を加えるため、犬 CgA に反応性の高い抗体を作成した。

成果は以下のように要約される。

第1章では、犬 CgA の分子生物学的特性を明らかとするため、犬副腎組織より、total RNA を抽出後、cDNA を作成した。これを基に犬 CgA cDNA をクローニングし、その塩基配列 (開始コドンを含む 1293 bp) を解析した。塩基配列をもとに推測されたアミノ酸配列(407 残基)をすでに報告されている他の動物種 (人、牛、馬) と比較したところ N 末端領域 (1-77) 並びに C 末端領域 (314-407) において保存性が高い事が確認された。また、RT-PCR 法を用いた犬 CgA mRNA の組織分布について検討した結果、ほぼ全身の臓器・組織において発現が確認された。

第2章では、現在、入手可能な抗犬 CgA 抗体が存在しないため、入手が容易で測定操作が簡便な人用 ELISA キット (DAKO A/S) を用いて犬 CgA の測定が可能か否か検討した。Ujendra Kumar らの方法を用いて犬副腎より CgA タンパクを抽出・精製した。この精製犬 CgA タンパクを用いて測定キットの抗体 (ウサギ抗人 CgA 抗体) が犬 CgA に対して交差反応性を示すことを確認し、犬 CgA は本 ELISA キットにおいて 0.25 - 200 μ g/mL の濃度範囲において濃度依存性に反応する事を確認した。健常犬血漿を用いて本 ELISA キットにおける inter-,intra assay および day to day variation の結果から、本 ELISA キットを用いて血中犬 CgA は測定可能であり、血中犬 CgA の日内変動および基準上限値について検討した結果、日内変動率は有意な変化を示さず、基準上限値を 3.49 U/L と決定した。

第3章では、犬における血中 CgA のストレスマーカーとしての有用性について検討するため、インスリン投与による低血糖ストレスモデルにおける血中 CgA 濃度の変化および実際の手術症例を用いた手術前後における血中 CgA 濃度の変化について検討を行った。その結果、低血糖ストレス下のイヌにおいて血中 CgA 濃度は増加し、また、手術後のイヌにおいても増加する事および手術時間の延長に伴って高い値となる事が明らかとなった。さらにまた、この手術後の上昇は鎮痛薬の投与によって抑制される事が示された。これらの結果から血中 CgA 濃度はストレス反応の程度を反映する事が示唆された。

第4章では、第3章において血中 CgA 濃度を測定する事で犬のストレス反応を評価できる可能性が示唆されたため、犬 CgA に反応性の高い抗体の作成を試みた。その結果、本章

において、作成した抗犬 CgA ペプチド抗体ならびに抗牛 CgA ポリクローナル抗体は犬 CgA に対して抗人 CgA 抗体よりも高い反応性を持つことが確認された。これらの抗体はイヌ血中 CgA 濃度を測定し、臨床的にストレス反応を評価するうえで非常に有用な方法になりうると考えられる。

審査委員会の所見

本研究は、これまで明らかとされていなかった、犬における CgA の塩基配列ならびにアミノ酸配列を明らかとし、犬の各組織、臓器に分布する事を明らかとした。さらに犬における血中 CgA 濃度は様々なストレス下において上昇し、ストレスマーカーとして有用である事を初めて示した。また、犬 CgA に対して反応性の高い抗体を作成し、その特性を明らかとした。

本論文の成果は、犬における CgA の特性を明らかとするとともに、血中 CgA 濃度の測定によりストレス反応を評価できる可能性を示したことである。これらの研究成果はより安全な手術・麻酔法の開発につながるものであり、これは獣医学分野、とくに獣医臨床分野に多大な貢献をなすものである、よって、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与する事を適当と認める。