

称号及び氏名 博士（獣医学） 曾根 勝仁

学位授与の日付 平成25年3月31日

論文名 イヌにおけるサーファクタントプロテイン A (SP-A) の  
肺特異的診断マーカーとしての有用性に関する研究

論文審査委員 主査 大橋 文人  
副査 笹井 和美  
副査 久保 喜平

## 論文要旨

### 緒言

**SP-A** は分子量約 **28~36 kDa** のコレクチン・ファミリーに属する糖タンパク質で、主に肺胞 **II** 型上皮細胞で合成と分泌が行われ、肺における自然免疫に  
関与している。医学領域では肺に特異的な非侵襲的検査として血中バイオマ  
ーカーが研究され、その中で **SP-A** は様々な肺疾患において血中濃度が上昇し、肺  
疾患の診断、病態の把握や予後の指標として臨床応用されている。また **SP-A** は  
病理組織検査で肺腺癌のマーカーとしても使用され、**SP-A** の発現が肺癌の予後  
に関連するという報告もあることから、癌増殖、進展との関連性が示唆されて  
いる。

肺実質に疾患を持つイヌはしばしば拡散障害、シャント、換気/灌流不均衡  
によって低酸素血症を呈し、全身麻酔下での **CT**、気管支鏡、バイオプシーや気  
管支肺胞洗浄 (**BAL**) といった侵襲的検査は実施困難な場面が多く、非侵襲的  
な検査が望まれている。

そこで本研究では、イヌにおいて、**SP-A** の肺疾患バイオマーカーとしての  
臨床応用を目的とし、以下の実験を行った。第 **1** 章ではイヌの肺から **SP-A** を精  
製し、イヌ **SP-A** に対する抗体を作製した。第 **2** 章では第 **1** 章で作製した **3** つ

の抗体を用いて血清中 **SP-A** 濃度を測定するための **ELISA** 法を確立した。第 3 章では肺実質疾患を持つイヌの血清 **SP-A** を測定した。最後に第 4 章では肺実質疾患における血清 **SP-A** の経時的変化について検討した。

## 第 1 章 イヌ SP-A の精製と抗イヌ SP-A 抗体の作製

ビーグル成犬の肺から **BAL** 液を採取し、**SP-A** を分離、精製した。精製したタンパク質を還元状態で **SDS-PAGE** を行ったところ、**28**、**32**、**36 kDa** および **64 kDa** にバンドが認められ、これまでの報告と一致した。またこの精製 **32 kDa** タンパク質の **N** 末端 **5** 残基のアミノ酸配列解析の結果、既報のイヌ **SP-A** アミノ酸配列と完全に一致したことから、この精製タンパク質はイヌ **SP-A** であると同定した。

イヌ **SP-A** 分子のアミノ酸配列を基に抗原性検索を行い、**Gly<sup>34</sup>-Asp<sup>45</sup>**、**Gly<sup>80</sup>-Gly<sup>98</sup>**、**Glu<sup>172</sup>-Val<sup>190</sup>**、**Val<sup>190</sup>-Met<sup>201</sup>**、**Gly<sup>218</sup>-Asn<sup>237</sup>** の部位を選定し、ペプチドを合成した。キャリア蛋白と結合後、ウサギに免疫することにより、抗ペプチド抗体を作製した。また精製したイヌ **SP-A** を抗原としてウサギに免疫することにより抗精製イヌ **SP-A** 抗体も作製した。これらの抗体について精製イヌ **SP-A** との反応性を **ELISA** および **Western-blotting** を用いて確認したところ、抗ペプチド抗体の抗 **SP-A<sub>190-201</sub>** 抗体と抗 **SP-A<sub>218-237</sub>** 抗体、そして抗精製イヌ **SP-A** 抗体が精製イヌ **SP-A** と反応し、最終的に **3** つの抗体を得ることができた。

## 第 2 章 イヌ血清 SP-A 濃度の測定とその評価

第 1 章で作製した **3** つの抗体をそれぞれビオチン化して検出抗体とし、またビオチン化していないものを捕捉抗体として **Sandwich ELISA** 法を行った。その結果抗精製イヌ **SP-A** 抗体を捕捉および検出抗体の両方に使用した時に、精製イヌ **SP-A** を測定することができた。

次に健常犬 **6** 頭および肺実質疾患犬 **3** 頭から血清を採取した。肺実質疾患は重度の心原性肺水腫 **1** 頭、肺葉捻転 **1** 頭、肺炎 **1** 頭であった。血清サンプルは **3% TritonX-100** の入った **0.67% BSA** 溶液で **10** 倍に希釈した。標準液は精製 **SP-A** をこの同じ溶液で **50~0.05 ng/mL** に **2** 段階希釈して作製した。

**ELISA** の性能評価は、検出限界、測定精度（日内変動）、再現性（日差変動）および正確度（添加回収率）を調べることによって行った。本測定系の検出限界は **2.0 ng/mL** であった。日内変動の変動係数は **3.8~14.1%**、日差変動では **15.5**

～**35.6%**であった。添加回収率は**77.1～89.8%**であった。また、健常犬**6**頭の血中 **SP-A** 濃度は**≤2.3 ng/mL** であり、最低検出濃度に近い値を示した。それに対して心原性肺水腫、肺炎、肺葉捻転ではそれぞれ **25.6、8.3、10.1 ng/mL** と高値を示し、これらの結果から、本章にて作製した **ELISA** 法を用いて血清 **SP-A** を測定できることが判明した。

### 第3章 イヌの肺実質疾患における血清中 SP-A 濃度

次に肺実質疾患犬 **32** 頭、非呼吸器疾患犬 **34** 頭と健常犬 **57** 頭の血清 **SP-A** 濃度を測定した。肺実質疾患の内訳は誤嚥性肺炎 **11** 頭、原発性肺腫瘍 **9** 頭と鈍的外傷性肺損傷 **12** 頭で、非呼吸器疾患は子宮蓄膿症 **21** 頭、小腸閉塞 **9** 頭、肺炎 **4** 頭であった。健常犬の血清 **SP-A** 濃度の中央値（範囲）は**<2.0 (<2.0～3.4) ng/mL** であった。誤嚥性肺炎、原発性肺腫瘍および鈍的外傷性肺損傷のイヌの血清 **SP-A** 濃度の中央値はそれぞれ **3.1 (<2.0～10.1, p<0.001)**、**7.2 (<2.0～62.5, p<0.001)**、**2.6 (<2.0～4.2, p<0.001) ng/mL** であり健常犬群と比べ有意に上昇していた。非呼吸器疾患の中央値はどれも **<2.0 ng/mL** であり健常犬群と比較し有意な差はなかった。また鈍的外傷性肺損傷のイヌの X 線写真を重傷度に応じてスコア化したところ、血清 **SP-A** 濃度との間に有意な相関が認められた。これらのことから血清 **SP-A** 濃度の測定は肺実質疾患とそれ以外の疾患との鑑別診断に使用できる可能性があると考えられた。

### 第4章 イヌ肺実質疾患症例における血清 SP-A 濃度の経時的変化

症例 1 好酸球性肺炎：7 歳、避妊済みメスのラブラドルレトリバー。血清 **SP-A** 濃度、血漿 **CRP** 濃度および血中好酸球数を経時的に測定したところ、**SP-A** のみについて症状および X 線写真上の異常陰影の推移と相関がみられた。

症例 2 肺腺癌：9 歳、オスのバーニーズマウンテンドッグ。初診時 **61 ng/mL** だった血清 **SP-A** 濃度は腫瘍切除後急速に減少し、術後 **16** 日目から **52** 日目までは検出限界付近だったが、食欲不振や咳といった再発症状が出始めた術後 **87** 日目には **3.4 ng/mL** と上昇し、病態をよく反映していた。

症例 3 鈍的外傷性肺損傷：4 歳、避妊済み雌のシベリアンハスキー。30 分前に車にはねられたとのことで来院した。X 線検査により肺挫傷および気胸

が認められ、胸腔穿刺による空気の抜去などを行った結果、入院 3 日後には退院することが出来た。血清 **SP-A** 濃度は事故翌日に急激に上昇したが、その後は症状の改善と共に低下し、病状とよく相関していた。

以上のことから、血清 **SP-A** 濃度の測定によって病態の把握ができ、かつ治療効果の指標を得られる可能性が示唆された。

## 総括

1. イヌの肺から **SP-A** を精製した。この精製 **SP-A** を抗原にして家兎で抗体を作製した。またイヌ **SP-A** 分子のアミノ酸配列に基づいて作製した合成ペプチド抗原を用いて、家兎で 5 種類の抗体を作製した。
2. 捕捉抗体および検出抗体として抗イヌ精製 **SP-A** 抗体を用いたサンドイッチ **ELISA** 法で、イヌ血清中の **SP-A** を測定することに成功した。
3. イヌの実質疾患における血清 **SP-A** 濃度を測定した。血清 **SP-A** 濃度はイヌ肺実質疾患において特異的に上昇し、またその経時的変化を調べることにより病態把握や治療効果の判定ができる可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨

**SP-A** は分子量約 28~36kDa のコレクチン・ファミリーに属する糖蛋白であり、肺胞 II 型上皮細胞とクララ細胞で合成と分泌が行われ、肺における自然免疫に関与し、様々な肺疾患において血中濃度が上昇する。そのため、医学領域では、血中 **SP-A** は、X 線 CT 検査や気管支鏡検査法とともに、肺疾患の診断、病態の把握や予後の指標を得るための非侵襲的検査として臨床応用されている。

一方、小動物臨床においても肺疾患に遭遇することは少なくなく、全身麻酔下での CT、気管支鏡、バイオプシーや気管支肺胞洗浄といった侵襲的検査は実施困難な場面が多く、非侵襲的な検査法が望まれている。本研究では、イヌの肺疾患バイオマーカーとしての **SP-A** の臨床応用を目的として、イヌ **SP-A** に対する抗体を作製して血清中 **SP-A** 濃度を測定するための **ELISA** 法を確立し、肺疾患症例の血清 **SP-A** を測定して、その有用性を評価して下記の結果を得た。

第 1 章では、ビーグル成犬の肺から気管支肺胞洗浄液を採取し、SP-A を分離、精製した。精製蛋白の SDS-PAGE では、28、32、36kD および 64kD にバンドを認め、またこの精製 32kD 蛋白の N 末端 5 残基のアミノ酸配列解析の結果、既報のイヌ SP-A アミノ酸配列と完全に一致したことから、この精製蛋白はイヌ SP-A であると同定した。さらに、イヌ SP-A 分子のアミノ酸配列を基に抗原性検索を行い、5 種類のペプチドを合成し、それらの合成ペプチドおよびイヌ精製 SP-A の抗体を作製して、精製イヌ SP-A との反応性の高い 3 種の抗体を得ることができた。

第 2 章では、前述した 3 種の抗体をそれぞれ、補足抗体並びにビオチン化検出抗体とした Sandwich ELISA 法を行った結果、抗精製イヌ SP-A 抗体を捕捉および検出抗体の両方に使用した場合に良好な検出ができることを明らかにした。また、健常犬および肺実質疾患犬の血清を用いて同 ELISA 法の性能評価（検出限界、日内変動、日差変動および添加回収率）を実施し、同測定法によりイヌの血清 SP-A の測定が可能であることを明らかにした。

第 3 章では、肺実質疾患犬 32 頭、非呼吸器疾患犬 34 頭と健常犬 57 頭の血清 SP-A 濃度を測定し、健常犬の血清 SP-A 濃度の中央値（範囲）は $<2.0$  ( $<2.0 \sim 3.4$ ) ng/mL であり、肺疾患犬を疾患別に分類した結果、誤嚥性肺炎、原発性肺腫瘍および鈍的外傷性肺損傷の血清 SP-A 濃度の中央値は、 $3.1$  ( $<2.0 \sim 10.1$ ,  $p<0.001$ )、 $7.2$  ( $<2.0 \sim 62.5$ ,  $p<0.001$ )、 $2.6$  ( $<2.0 \sim 4.2$ ,  $p<0.001$ ) ng/mL であり健常犬群と比べ有意に上昇した。また、非呼吸器疾患の中央値は $<2.0$  ng/mL であり健常犬群と比較し有意な差はなく、このことから血清中 SP-A 濃度の測定は肺実質疾患とそれ以外の疾患との鑑別診断に使用できる可能性があることを明らかにした。

第 4 章では、好酸球性肺炎、肺腺癌および鈍的外傷性肺損傷の症例犬を用いて、諸検査に加えて経時的に血清 SP-A 濃度の測定を行い、その有用性を評価した結果、血清 SP-A は各々の病態を反映し、かつ手術等の治療効果の指標ともなることを示唆した。

本研究は、イヌの臨床では不可能であった肺実質疾患の非侵襲的評価法である Sandwich ELISA 法による血清イヌ SP-A 測定法を開発し、その性能評価ならびに臨床応用を行い、その有用性を明らかにした。これらの成績は、臨床獣医学、獣医胸部外科学並びに救急獣医学に大きく貢献するものと評価する。

本論文の審査および最終試験と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。