

博士論文

腸炎を発症したウマ血清中バイオマーカー探索と  
その迅速測定系の構築

南島 陽平

# 目次

略語表 .....	1
序論 .....	4
第一章 .....	9
背景と目的 .....	10
第1節 ウマ血清プロテオーム解析法の確立 .....	13
第2節 プロテオーム解析法条件の最適化 .....	19
第3節 腸炎発症馬のプロテオーム解析 .....	23
第二章 .....	36
背景と目的 .....	37
第1節 ウマタンパク質を発現するレポーター細胞の作製 .....	38
第2節 ウマタンパク質に対する抗体を産生するハイブリドーマ作製 .....	50
総括 .....	59
謝辞 .....	61
引用文献 .....	63
表・図	

## 略語表

2-ME : 2-mercaptoethanol

aa : amino acid

ACN : Acetonitrile

AGC : Auto gain control

ALT : Alanine transaminase

AST : Aspartate aminotransferase

BSA : Bovine serum albumin

BUN : Blood urea nitrogen

CV : Coefficient of variation

CPRG : Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside

CRE : Creatinine

CRP : C-reactive protein

DNA : Deoxyribonucleic acid

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid

EGFP : Enhanced green fluorescent protein

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ESI : Electrospray ionization

FACS : Fluorescent activated cell sorter

FBS : Fetal bovine serum

FDR : False discovery rate

Fw : forward

GAM-PE : Goat Anti-Mouse IgG (H+L) PE Conjugate

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HR : Heart rate

IAM : Iodoacetamide

Ig : Immunoglobulin

IL : Interleukin

IRES : Internal ribosome entry site

JRA : Japan Racing Association

LC : Liquid chromatography

LC/MS/MS : Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MEM : Minimum Essential Medium

MS : Mass spectrometry

PBS : Phosphate buffered saline

PCA : Principal component analysis

PCR : Polymerase chain reaction

PCV : Packed cell volume

PC1 : Principal component 1

PC2 : Principal component 2

PI : Propidium iodide

PTS : Phase transfer surfactant

PSM : Peptide spectrum match

RNA : Ribonucleic acid

RR : R-R intervals

Rv : Reverse

SAA : Serum amyloid A protein

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SIRS : Systemic inflammatory response syndrome

SNP : Single nucleotide polymorphism

SSID : Strangulating small intestinal disease

TFA : Trifluoroacetic acid

TP : Total plasma protein

WBC : White blood cell count

## 序論

草食動物であるウマは、胃や小腸で消化できなかったセルロースなどの繊維成分を、大腸に棲息する多種多様な細菌の助けによって発酵分解し、生成した酢酸等の揮発性脂肪酸をエネルギー源として利用している (1, 2)。このため、多くの植物を消化してエネルギー源とするための大腸が発達しており、その容量は 100 L 以上に達する (3)。大型動物であるウマの生命維持には、大腸からのエネルギー摂取が欠かせず、そのために大腸に係る疾患はしばしば致命的となる (4, 5)。

ウマの腸内では、繊維成分を発酵させるための腸内細菌叢が形成されている (2)。腸内の細菌構成叢のバランスは、様々な要因（競走や輸送によるストレス、外科的手術、食餌の変更、抗菌剤及び駆虫薬の使用など）により崩れてしまうことが知られ、腸炎発症の一因となる (6-8)。正常な細菌叢が維持されなくなると、本来低い割合に抑えられている細菌が増殖し、一部の細菌が分泌するエンドトキシンなどによって腸管粘膜が傷害される (5)。腸炎の原因となる細菌は多数知られており、*Salmonella spp.*, *Clostridium spp.* 及び *Ehrlichia risticii* などが同定されているほか、重篤度の高い急性出血性大腸炎（別名 X 大腸炎）の原因菌として知られる *Clostridioides difficile* がその代表例である (4, 9, 10)。

ウマ腸炎は、国内外に関わらず発生することで知られ、発症が突発的で重篤な経過を辿るケースが多い疾病である (4, 11)。主症状は、悪臭を伴う水様性の下痢、激しい腹痛、これに伴う顕著な血液濃縮と脱水症状などであり、その後、急速に虚脱状態に陥って死亡する (4, 11, 12)。ウマ腸炎の致死率は、日本中央競馬会（JRA）繋養馬において約 30% と報告されており、特に、X 大腸炎の原因菌 *Clostridioides difficile* 陽性であった場合、80% 超と非常に高い致死率を示す (12)。国外では、その原因となる細菌の違いや、それらに対するホストの感受性によって、致死率が 10%~70% と上下することが報告されている (4)。

このように非常に高い致死率を示す理由としては、症状の進行が極めて速いこと、並びに腸炎が多彩な病態を示すことが理由である。例えば、ウマ腸炎が進行すると、腸壁細胞が壊

死して腸粘膜バリアが脱落した結果、細菌由来の毒素が体循環に侵入し、全身性炎症反応症候群（SIRS）や播種性凝固症候群（DIC）なども引き起こすことが知られている（13, 14）。また、これらを起因として肺水腫や心内及び外膜下出血を合併し得ることが知られている。このような状況にあって、腸炎の治療法は、電解質液若しくは膠質液の輸液や抗炎症薬の投与といった対症療法が主となっており、標準的な治療法は未だ確立されていないのが現状である（15）。

疾患の状態や変化を把握し、適切な治療法を選択するためには、血液や尿などの体液及び組織に含まれるバイオマーカーを測定することが一般的である。ヒト臨床においては、疾患の種類に応じて、Aspartate aminotransferase（AST）/Alanine transaminase（ALT）比、C-reactive protein（CRP）、White blood cell（WBC）及び Total protein（TP）などの生化学検査や、試料中の遺伝子（DNA, RNA）の測定が診断マーカーとして臨床導入されている（16, 17）。一方、ウマ臨床においても、血液検査値である PCV、WBC 等の測定が行われている（13, 17-20）。これまでに、Packed cell volume（PCV）、WBC、hematocrit、乳酸値といった血液検査値について、ウマ腸炎診断への有用性や予後との関連性が調査されている（13, 14, 21, 22）。しかし、腸炎の病態は個体差が大きく、早期及び予後診断への有用性について、十分な科学的根拠は得られていない。また、炎症マーカーとしてウマ臨床で用いられている血清アミロイド A（SAA）や CRP、ハプトグロビン及びフィブリノーゲンなどは、細菌及びウイルス性感染症やその他炎症性疾患においても非特異的に上昇することが知られており、腸炎に特異的なマーカーとしては不適であるとされる（13, 23-25）。よって、これらの既存のマーカーに比較して、腸炎の早期及び予後診断に有用な新規バイオマーカーを発見すれば、ウマ臨床に大きく資することができる。ウマ腸炎に関しては、これまでに血液中のタンパク質を対象に網羅的な分析を行った例は無く、バイオマーカー候補となる未知のタンパク質の発見が期待できる。そこで本研究では、腸炎発症馬の血液を対象としたプロテオーム解析に基づくバ

イオマーカー探索を行うこととした。

試料中のタンパク質の分析法には、Mass spectrometry (MS) が汎用されている。MS を用いた標準的なタンパク質分析法には、大きく分けてトップダウン法及びボトムアップ法と呼ばれる手法が存在する (26-28)。トップダウン法は、測定対象となるタンパク質をそのまま MS に導入して分析する方法である。本法は前処理が比較的容易であるが、タンパク質溶解液の選定や液体クロマトグラフィーによる分離条件などを十分に検討しなければならず、特にタンパク質が糖鎖修飾やリン酸修飾を受けている場合、得られるデータ量が膨大且つ複雑となることから、現在販売されているソフトウェアでは解析が困難となっている。このことから、数多くのタンパク質を同時分析するような網羅的な分析には適さず、抗体医薬品などの品質管理などに応用されている (29,30)。一方、ボトムアップ法は、タンパク質をトリプシンなどの酵素によって分解して得られたペプチドのアミノ酸配列を MS で決定し、その配列を基にタンパク質を同定する手法である (31-33)。近年、高感度且つ高分解能分析が可能なフーリエ変換型質量分析計 Orbitrap が導入され、ボトムアップ法のタンパク質同定率が飛躍的に向上した (26)。例えば、血漿のような複雑なマトリクスであっても、一度の分析で数百以上のタンパク質の同定が可能となっている。さらに、バイオインフォマティクスの発達に伴い、同定したタンパク質については、同時に定量的データを取得して解析できるようになった (32,36)。

ボトムアップ法においてタンパク質の定量的データを得る場合、ペプチドの N 末端などを同位体標識し、その存在量の比較を行う手法 (34,35) が主流であった。ペプチドのアミノ酸配列の同定には高感度分析が求められることから、同位体標識に用いる化合物にはイオン化を促進する官能基が導入されており、同位体標識とペプチドの高感度化が同時に行われていた。しかし、フーリエ変換型質量分析計をはじめとする MS の高感度化によって、現在は同位体標識を行わずにペプチド由来のイオン強度を測定し、定量的データとするラ



ベルフリー定量法が広く用いられている (36-38)。

ボトムアップ法におけるラベルフリー定量法によって、複雑なマトリクス中のタンパク質を大規模に分析可能であり、誘導体化することなく定量的データを取得することが可能となった。本手法はタンパク質の網羅的な解析に向いており、現在、バイオマーカー探索のスタンダードとなっている。既に報告されているプロテオーム解析に関する論文は、その殆どがボトムアップ法に基づくものであり、例えばヒトにおいては、ボトムアップ法によるプロテオーム解析を応用したバイオマーカー探索の関連研究が数多く行われており、癌マーカーの探索などに大きく貢献している (33, 34, 38, 39)。ウマにおいても同様に、血漿、唾液、蹄部組織及び軟骨細胞中等の様々なマトリクス中のタンパク質を網羅的に解析した報告が見られるようになった (40-43)。

質量分析法によるタンパク質の大規模分析の利便性が見出される一方で、ボトムアップ法に基づく MS を用いた分析は、タンパク質を加水分解によってペプチドとし、得られたサンプルの脱塩及びペプチド精製を行うことから、試料調製が非常に煩雑となる (31,32)。また、液体クロマトグラフィー (LC) 装置に多量のペプチドを導入し、できるかぎりこれらを分離して測定しなければならないことから、LC グラジエントに時間を要する (35, 38, 40)。さらに、多量のペプチドは LC 装置やカラムに残存し、キャリーオーバーを引き起こして定量値に影響を与えうる (44, 45)。このことから、サンプルの測定間にシステムブランクの測定を幾度も挟まねばならず、さらに時間効率を悪化させる原因となっている。このような時間効率の悪さに加え、機器そのものの購入やメンテナンスにかかる莫大なコストの観点から、臨床現場などへの導入は非常に困難であろうと考えられる。

以上の問題点から、ウマ臨床においては、質量分析計を使用したタンパク質分析は稀となっている。臨床現場において、タンパク質の測定に専ら用いられている手法は、免疫学的測定法の一つである Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を応用したプレートアッセ

イである (13, 14, 16, 46-48)。ELISA は、試料中に含まれる測定対象となる物質を抗原抗体反応で捕捉して検出する手法であり、その特異性の高さによって高感度分析が可能である (49, 50)。また、ELISA は 96 ウェルプレート上で実施され、プレート上に抗原若しくは抗体を固相化し、これを抗原抗体反応によって検出した後、最終的に標識した抗体を用いて酵素反応によって検出を行う。このため MS に比較して前処理が簡便であり、データのばらつきが少なく、アッセイが迅速に完了する。また、多数の検体の同時測定も可能である。しかしながら、抗原抗体反応を応用するため、1 分析について単一のタンパク質のみを測定可能であるため、網羅的解析には適さないと考えられる。

このような背景を踏まえ、本研究では腸炎の診断に有用なバイオマーカーを探索することを目的とし、まず、質量分析計を用いたタンパク質の分析法のうち、ボトムアップ法に基づいて、ウマ臨床で最も汎用される血清検体を対象としたタンパク質の網羅的解析法を確立した。これを腸炎発症馬及び健常馬の血清に適用し、同定した血清タンパク質の定量的データをラベルフリー定量法によって取得し、群間比較を行うことによって、バイオマーカーの候補となるタンパク質の探索を行った。続いて、解析によって見出したバイオマーカー候補となるタンパク質を迅速且つ簡便に測定可能な ELISA 法に基づいた分析法を開発するために、各タンパク質に対する抗体作製を試みた。

## 第一章

ウマ腸炎のバイオマーカー探索を目的とした  
質量分析法による大規模分析

## 背景と目的

質量分析法によるタンパク質の同定には、測定対象とする試料の種類や、タンパク質の特徴によって、最適な前処理法を選定すべきである。しかしながら、本研究で使用するウマ血清について、プロテオーム解析を実施した例は非常に少ない。プロテオーム解析においては、前処理法がタンパク質の同定効率に大きく影響することから、まず、本研究ではウマ血清の分析に適する前処理法について検討した。

血清中には血清アルブミンや免疫グロブリンといった高濃度タンパク質が存在し、プロテオーム研究においては、これらがバイオマーカーの候補となるような低濃度タンパク質の検出を妨害することが知られている。血清中タンパク質全体の約 75%を占めるこれらの高濃度タンパク質は、測定可能なタンパク質濃度のダイナミックレンジを狭めてしまうため、タンパク質同定率を向上させるためには、これらを除去することが重要となる (51)。血清中の高濃度タンパク質を効率的に除去する方法として、ヒトアルブミンや免疫グロブリンに対する抗体を固相化したカラムで前処理し、除去を行うイムノディプリーションが知られている (52,53)。ヒトにおいては、血清アルブミンや免疫グロブリンに加え、存在量の多いアンチトリプシン、トランスフェリン、ハプトグロビン及びフィブリノーゲンなどを併せて除去可能な固相カラムが販売されている (54)ものの、ウマ血清中の高濃度タンパク質を除去可能なキットは販売されていない。過去に固相ビーズに特定のタンパク質に吸着するヘキサペプチドが固定化されたもので前処理し、高濃度タンパク質を吸着してウマ血清中のタンパク質同定率を改善したとの報告 (55)があるが、タンパク質の固相への非特異的な吸着等、定量的データに影響を与えることが懸念される (56)。また、トリクロロ酢酸を使用したタンパク質沈殿により、血清アルブミンや免疫グロブリンを効率的に除去する方法が報告されているが (57)、強酸性下でバイオマーカー候補となるタンパク質も沈殿して除去され、同様に定量性を損なう恐れがある。本研究においては、高濃度タンパク質によるタンパク質測定のダイナミックレンジの低下を、フーリエ変換型質量分析計 orbitrap の優

れたダイナミックレンジで補うこととし、イムノディプリーションによる高濃度タンパク質除去は実施しないこととした。

プロテオーム解析において、タンパク質の抽出効率が不十分であると、網羅性の高いプロテオミクス解析を達成することが困難となる。特に炎症や感染を伴う場合は、破壊された細胞内から漏出した膜タンパク質などが血清中に含まれ、そのタンパク質の疎水性は幅広いと予測される (58)。これらのタンパク質を網羅的に定性及び定量するためには、前処理によってそれらのタンパク質をできる限り可溶化する必要がある。タンパク質の可溶化には通常、SDS などの界面活性剤が使用されるが、ボトムアップ法においてはタンパク質を酵素加水分解して測定することから、添加した界面活性剤によって酵素活性が阻害されてしまう問題が生じる。この問題を解決するため、プロテオーム解析には、試料中のタンパク質をアセトンやトリクロロ酢酸などを使用して抽出したタンパク質を SDS 電気泳動したものに酵素を添加し、SDS ゲル内でタンパク質を加水分解する **In-gel digestion** 法が行われている (53,59)。しかしながら、定量的データを取得する場合においては、ゲル内からペプチドを抽出する際に回収率に大きなばらつきが生じることが報告されており (60)、定量分析には適さないと判断した。代わりに、血清中のタンパク質をそのまま加水分解する **In-solution digestion** 法を採用することとした。**In-solution digestion** 法は **In-gel digestion** 法に比較して、SDS 電気泳動といった時間のかかる工程も省略できることから、操作が簡便であり、データのばらつきを防ぐことができる。**In-gel digestion** 法及び **In-solution digestion** 法の前処理法概要を図 1 に示す。

**In-solution digestion** 法における難溶性のタンパク質の可溶化、またはタンパク質の還元アルキル化といった前処理過程においてタンパク質が析出するのを防ぐために、酵素加水分解を妨害せず、タンパク質の溶解力の強い界面活性剤としてデオキシコール酸を使用することとした。デオキシコール酸は、ボトムアップ法で最も汎用される酵素であるトリプシンの活性を向上させる働きがあるほか、加水分解終了後に酢酸エチルを使用した液液抽出法

によるクリーンアップにて、その 99%以上を取り除くことが可能である (61)。本手法は PTS (Phase transfer surfactant) 法と呼ばれ、MS を汚染しない手法として広くプロテオーム解析に用いられている。本研究ではこれに倣い、In-solution digestion 法のタンパク質可溶化にデオキシコール酸を用い、加水分解に使用する酵素にはトリプシンを用いることとした。

## 第1節 ウマ血清プロテオーム解析法の確立

本研究において過去の知見などを基に、ウマプロテオーム解析法の前処理法として、In-solution digestion 法及び PTS 法を選択した。続いて、前処理法の詳細及び LC/MS/MS 条件について検討する。

まず、使用するウマ血清量について検討した。ウマ血清に含まれる総タンパク質量は、51.0~72.0 µg/µL であると報告されている (62)。通常、プロテオーム解析に供するタンパク質量は 100 ~ 300 µg が適用される (40, 42, 43) ことから、血清量を 5 µL に設定した。ウマ血清中のタンパク質を分析するため、ヒト血清のプロテオーム解析法の条件 (63, 64) を参考に条件設定を行い、健常馬 3 頭由来の血清中のタンパク質同定を実施した。また、分析法の再現性を確認するために、各サンプルを 3 回ずつ測定し、代表的なタンパク質として、全てのサンプルから高濃度で検出されたタンパク質である serotransferrin、中程度の濃度で検出された apolipoprotein C2、低濃度に検出された CD14 から得られた面積値 (signal intensity) を比較した。再現性の検討にあたっては、分析のキャリーオーバーによる影響がないことも併せて確認するために、同定されたタンパク質のうち、最も高濃度に検出された serum albumin の定量値をキャリーオーバーの有無の評価に用いた。

### 試料・方法

#### 実験に使用した試薬及び試料

##### 超純水

超純水製造装置 Milli-Q (Merck Millipore) により製造された超純水を使用した。今後、特別に記載の無い限り、本研究で水と記載したものは超純水を使用した。

##### ウマ血清

JRA 美浦トレーニング・センターにおいて、JRA 所属の獣医師によって健康と診断されたサラブレッド種（牡 2 歳、牝 2 歳及び牝 3 歳）から凝固促進剤入り真空採血管（栄研化学）に血液を採取した（Animal Care and Use Committee of Japan Racing Association; 承認番号 20180425、2018 年 4 月 25 日承認）。採取後、室温で 3 時間インキュベートし、1940×g で 30 分間遠心分離し、得られた上清を血清とした。採取した血清は、分析まで -80℃以下で保管した。

#### 実験操作及び条件

##### 血清の前処理法（In-solution digestion 法）

血清 5  $\mu$ L をタンパク質低吸着プロセオセーブチューブ（AMR）に分注し、10  $\mu$ L の 7.5 mM DTT（富士フィルム和光純薬）を含む 5 %デオキシコール酸（富士フィルム和光純薬）水溶液を加えた。これを 80℃にて 10 分間インキュベートし、45 mM の DTT 水溶液を加え、60℃で 20 分間インキュベートした。続いて、5  $\mu$ L の 100 mM IAM（富士フィルム和光純薬）水溶液を添加し、暗条件下、20 分間室温でインキュベートした。これに対して 100 ng/ $\mu$ L のブタ膵臓由来トリプシン（質量分析グレード、富士フィルム和光純薬）を含む 100 mM 重炭酸（富士フィルム和光純薬）水溶液を 10  $\mu$ L 添加し、さらに 100 mM 重炭酸緩衝液を 10  $\mu$ L 添加して 37℃で 12 時間インキュベートした。その後、5  $\mu$ L の 0.1 %TFA（富士フィルム和光純薬）を加えて酵素反応を停止させ、500  $\mu$ L の酢酸エチル（富士フィルム和光純薬）を加えた。5 分間振盪した後、14,000×g で 5 分間遠心して、上層の酢酸エチルを除去し、遠心濃縮器（TOMY）の high temperature モードにより 30 分間濃縮した。これに 100  $\mu$ L の 4 %ACN（富士フィルム和光純薬）を含む 0.1 %TFA 水溶液を加え、1 分間振盪し、14,000×g で 5 分間遠心した。得られた上清 100  $\mu$ L を、SEP C-tip（日京テクノス）を使用して脱塩濃縮した。SEP-C-tip の操作手順はマニュアルに従って行い、10  $\mu$ L の 60 %ACN を含む 0.1 %TFA 水溶液で溶出した。得られた溶出液の 5  $\mu$ L を LC/MS/MS 分析に供した。



## LC 溶出条件

LC 装置には Easy-nLC 1200 (ThermoFisher scientific) を使用した。LC 分離に使用する移動相として、以下の溶液を用いた。

移動相 A : 0.1 %ギ酸 (質量分析グレード、富士フィルム和光純薬) 水溶液

移動相 B : 0.1 %ギ酸/ACN (質量分析グレード、富士フィルム和光純薬) (1:4) 混液

移動相 S : 0.1 %ギ酸水溶液

LC 分離に使用するカラムは逆相カラムである EASY-Spray C18 LC カラム (ThermoFisher scientific) 及びトラップカラムである PepMap<sup>TM</sup> 100 nanoViper C18 カラムを用いた。なお、サンプル注入直前に移動相 S 12  $\mu$ L でトラップカラムの平衡化、6  $\mu$ L で LC カラムの平衡化を実施した。移動相 S 5  $\mu$ L、流量 20  $\mu$ L/min でサンプルをトラップカラムに導入し、得られたペプチドをトラップカラムに保持させた。保持させたペプチドを移動相 A 及び B によって LC カラムに通し、以下の条件の通りに溶出させた。

0-2 min (98%A、2%B)、2-17 min (40%A、60%B)、17-19 min (0%A、100%B)、19-29 min (0%A、100%B)、流量 300 nL/min

なお、分析にあたっては、LC 装置のオートサンプラー並びにトラップカラムに残存するペプチドのキャリーオーバーを防ぐために、システムブランクとして水 5  $\mu$ L の測定を以下の LC 条件で 3 回測定するシーケンスをサンプル分析間に挿入することとした。

0-3 min (95%A、5%B)、3-8 min (0%A、100%B)、8-9 min (95%A、5%B)、9-12 min (95%A、5%B)、12-17 min (0%A、100%B)、17-18 min (95%A、5%B)、18-21 min (0%A、100%B)、26 min (0%A、100%B)、流量 300 nL/min

## MS 測定条件

LC 装置に接続する MS には、Q-Exactive HF (ThermoFisher scientific) を使用した。MS 条

件を以下に記す。なお、MS 条件の各パラメーターは Thermofisher scientific 社が推奨するプロテオーム解析条件に準じて設定した。プリカーサーイオンのプロダクトイオンスキャンには、設定した閾値 (Intensity threshold) を超えたイオンを強度の強い順番にコリジョンセルに導入してプロダクトイオンを得ることが可能な dd-MS<sup>2</sup> モードを使用した。測定時間は逆相条件において、殆どのペプチドが溶出されると予想される 0 ~ 15 min に設定した。

#### イオンソース条件

測定時間 : 15 min

極性 : 正イオンモード (1.9 kV)

In-source CID : 0 eV

#### Full MS 条件

分解能 : 60,000 ( $m/z$  200 FWHM)

AGC target : 1,500,000

Maximum IT : 50 ms

質量範囲 : 400 ~ 2000  $m/z$

#### dd-MS<sup>2</sup> 条件

分解能 : 15,000 ( $m/z$  200 FWHM)

AGC target : 50,000

Maximum IT : 22 msec

TopN : 20

質量範囲 : 200 ~ 2000  $m/z$

Minimum AGC target : 500

Intensity threshold : 20,000

Charge exclusion : unassigned、1、 $\geq 6$

Dynamic exclusion : 10 秒間

#### データプロセッシング

ペプチドのアミノ酸配列同定には、Proteome discoverer version 2.2 (ThermoFisher scientific) を用いた。ペプチドの同定に係る設定値は、ThermoFisher scientific 社の Proteome discoverer 使用マニュアルの推奨プロトコールに準じた。

タンパク質データベース : Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)

taxonomy ID 9796 (*Equus caballus*)

登録数 49,800 (2019/12/27 にダウンロード)

酵素 : トリプシン

Missed cleavage : 2

Minimum peptide length : 6

Maximum peptide length : 144

Precursor mass tolerance : 10 ppm

Fragment mass tolerance : 0.02 Da

Dynamic modification : Oxidation

Static modification : Carbamidomethyl

FDR ( $q$ -value) : 0.05

定量法 : ラベルフリー (Summed Abundance Based)

タンパク質同定の基準

質量分析法に基づくタンパク質同定基準は、Human proteome organization により推奨され

ている基準 (65) であるタンパク質に特異的なペプチド (ユニークペプチド) 数が 2 以上であることとした。

## 結果

健常馬 3 頭より得られた血清について、合計で 122 のタンパク質が同定された (表 1)。キャリーオーバーの有無を確認するため、各サンプルのシステムブランク測定前後における serum albumin の強度を比較した (表 2)。結果、洗浄後の面積値が 3% 以下となったため、定量値に影響は少ないと判断し、以降のサンプル分析には、システムブランクを 3 回測定するシーケンスを挿入することとした。また、同定されたタンパク質の定量データから、各タンパク質量の定量値の分布をボックスプロットにて図 2 に示した。本結果より、本定量法によるタンパク質定量範囲のダイナミックレンジは約  $10^5 \sim 10^6$  であると予測できた。

分析法の再現性を確認するために、各サンプルを 3 回ずつ測定し、serotransferrin、apolipoprotein C2、CD14 の面積値を比較した (表 3)。3 つのタンパク質由来の面積値は測定間の変動係数 (CV)  $<20\%$  を示し、良好な再現性を示した。

以上の結果の通り、本定量法についてキャリーオーバーや再現性に問題は認められないものの、タンパク質同定数が比較的少数であると考えられたため、次章にて分析法の条件最適化を実施することとした。

## 第2節 プロテオーム解析法条件の最適化

第1節にて確立した分析法を基に、タンパク質同定数の改善を目的として、条件の最適化を実施した。まず、トリプシン処理時間（6, 12, 18 時間）におけるタンパク質同定数を比較した。続いて、設定した試料前処理法に対して、LC/MS/MS 条件の最適化を実施した。フーリエ変換型の MS を使用した血清タンパク質の網羅的解析を実施する場合、LC 装置から溶出されるペプチド由来のイオンが MS の許容限界を超えて導入されると、高分解能分析が困難となり、定量値の精度が悪化する（66）。よって、性能を損なわない程度に LC 装置からのペプチドの溶出速度を調節する必要がある。今回、LC グラジエント条件におけるペプチドの溶出時間（移動相 B5%→100%）を 15, 30, 60, 120, 180 分間で検討し、タンパク質の同定数を比較した。

また、試料中ペプチドの溶出時間はそれぞれ異なるため、LC から導入される試料濃度は変化する。この試料濃度の変化に対応して自動的に MS に導入するイオン量を Auto gain control (AGC) target によって調節可能である（図 3）。AGC target とは、MS のイオントラップに蓄積するイオン量を設定する値であり、AGC target を超えた場合、検出器に送り込むイオン量を抑制することによって、試料濃度に合わせた測定を実施する（67）。今回、タンパク質同定率の向上を目的に、イオン量の制御に係る AGC target の最適化によるタンパク質同定数の評価を Full MS 及び MS2 に対して行った。

dd-MS<sup>2</sup> モードにおいて、Intensity threshold を超えたプリカーサーイオンについて、強度の強いものからプロダクトイオンスキャンが順次実施されるが、あるペプチドから同一イオンが長時間強い強度で検出された場合、他のペプチド同定の妨害となってしまうことがある（68）。このため、Dynamic exclusion time によって同一イオンを検出する最長時間を設定することが可能である（図 4）。本研究においては、Dynamic exclusion time の最適化も行った。

最適化を実施した分析法について、第1節に使用した血清を使用してプロテオーム解析

を実施し、結果を比較した。さらに、最適化を実施した分析法による定量値の精度管理のため、内標準物質による精度管理の評価方法を検討した。内標準物質の選定は、ヒトプロテオーム解析に関連する研究（64）において、内標準物質としてウシ由来  $\beta$ -lactoglobulin を 1  $\mu$ g 添加するプロトコールについて報告があったため、これに準ずることとした。

## 試料・方法

### ウマ血清

分析法最適化に使用する血清は、JRA 美浦トレーニング・センターに繋養されている第 1 節と同じサラブレッド種 3 頭から第 1 節に記載の方法に準じて血清を採取したものをプールした血清、若しくは別々に使用した。

### 血清の前処理及び LC/MS/MS 条件

最適化を実施する項目を除いて、第 1 節における試料・方法の項に準じた。

### データプロセッシング

第 1 節における試料・方法の項に準じた。内標準物質であるウシ  $\beta$ -lactoglobulin 由来ペプチドの探索には Proteome discoverer version 2.2 (ThermoFisher scientific) を使用し、下記のタンパク質データベース及び検索条件を適用した。

タンパク質データベース : Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)

taxonomy ID 9796 (*Equus caballus*)

登録数 49,800 (2019/12/27 にダウンロード)

酵素 : トリプシン

Missed cleavage : 2

Minimum peptide length : 6

Maximum peptide length : 144

Precursor mass tolerance : 10 ppm

Fragment mass tolerance : 0.02 Da

Static modification : Carbamidomethyl

FDR (*q*-value) : 0.05

## 結果

プール血清を使用したトリプシン加水分解時間（6, 12, 18 時間）によるタンパク質同定数の比較を表 4 に示した。加水分解時間による同定数の大きな改善は無く、6 時間から 12 時間で若干の増加が見られた。12 時間から 18 時間では再現性に若干の低下が見られたことから、加水分解時間を 12 時間に設定した。続いて、プール血清を使用して LC グラジエントによるタンパク質同定数の変化を調べたところ、60 分間で 188 となり、120 分間及び 180 分間では殆ど増加が見られなかった。よって、60 分間に設定することとした。

設定した LC グラジエント条件において AGC target を変化させ、プール血清を使用してタンパク質同定数の比較を行った（表 6）。結果、AGC target (Full MS) が 300,000、AGC target (dd-MS<sup>2</sup>) が 100,000 においてタンパク質同定数が最高値となった。また、Dynamic exclusion についても最適化を行ったところ、10 秒間で最も高い同定数を示した（表 7）。

最適化を実施した分析法によって、健常馬 3 頭の血清を分析した。結果、タンパク質の同定数が 122 から 190 に増加した（表 8）。同定されたタンパク質の定量的データから、各タンパク質量の定量値の分布をボックスプロットにて図 5 に示した。分析法の最適化後はタンパク質量のダイナミックレンジの改善が見込まれたものの、最適化前の約  $10^5 \sim 10^6$  と殆ど変化がなかった。しかしながら、serum albumin が外れ値となり、それ以外のタンパク質のダイナミックレンジが低濃度側にシフトしていることが確認できた。これは分析法の最

適化によってより低濃度タンパク質が検出可能となったことを示し、LC 装置から MS に導入されるペプチド量を効率良く制御できていることが、タンパク質同定率の改善につながったと考えられた。一方、serum albumin の定量値である signal intensity は依然として  $10^{11}$  付近と頭打ちになっており、これはイオン量の制限を実施しても、なお MS 内の検出器が飽和していることを意味している。すなわち、serum albumin が除去されれば、さらにタンパク質同定数の大幅な向上が期待できると考えられる。最適化後の分析法の再現性を確かめるために、serotransferrin、apolipoprotein C2 及び CD14 について、繰り返し再現性を確認したところ、変動係数 (CV) <20%以下を示し、最適化前と比較してほぼ同等の結果が得られた (表 9)。

内標準物質であるウシ  $\beta$ -lactoglobulin にユニークな配列のペプチドとして、以下のペプチド由来のイオンが同定された。

TPEVDDEALEK ( $m/z$  623.2959)

健常馬 3 頭由来の血清に対してウシ  $\beta$ -lactoglobulin 1  $\mu$ g を添加し、本ペプチド由来のイオンの定量値を比較したところ、CV<20%と良好な再現性を示した (図 6)。このことから、取得する定量的データの再現性の受け入れ基準として、本ペプチド由来のイオン ( $m/z$  623.2959) 定量値の CV<20%に設定した。

以上の検討結果により、ウマ血清タンパク質のプロテオーム解析法の最適化を終了した。



### 第3節 腸炎発症馬のプロテオーム解析

第2節までにおいて、ウマ血清タンパク質を網羅的且つ定量的に解析可能な方法について検討した。本分析法を用いて、ウマ腸炎のバイオマーカー候補となるタンパク質を探索する。

本研究では、JRA において繋養されているサラブレッド種の競走馬を対象として検討を行った。ウマ腸炎はストレスや外科手術などを要因とする疾患であるが、ウマは生来ストレスを感じやすく、とりわけ競走馬は日常的にトレーニングや長距離輸送を課せられているため、ストレス因子が多く、腸炎の発症例が多いことで知られている。競走馬トレーニングが行われている JRA 栗東トレーニング・センター及び美浦トレーニング・センターにおいて、2004 年から 2014 年までに 158 例の腸炎発症馬が報告されている (14)。本疾患の致死率が約 30%であることを考慮すれば、ウマ腸炎が競馬産業に及ぼす影響は大きく、臨床上重要な疾患であると言える。

日本国内において、競走馬としてトレーニングされているサラブレッド種が入院する場合、診療所で体温、心拍数及び呼吸数などといった体外から観察可能な項目のほか、生化学的検査を受ける。検査には主に PCV, WBC, TP が選択され、ウマに重篤な所見が見られれば、尿素窒素 (BUN) , クレアチニン (CRE) などが要時追加される。これらは全て血液検査項目であり、診療所に入院した殆どの競走馬から血液が採取され、血清を使用した検査が実施される。このことから、競走馬臨床において最も使用される試料が血清であり、血清タンパク質を精査することによって腸炎のバイオマーカーとなるタンパク質を発見できれば、臨床への応用が容易である。

以上のことから本節では、競走馬の臨床上重要な疾患である腸炎を発症した馬及び健康馬由来の血清に含まれるタンパク質を網羅的に解析し、同定されたタンパク質について得られた定量的データを群間比較することで、バイオマーカーの候補となるタンパク質を探索することとした。

まず、腸炎の早期腸炎の早期及び予後診断に重要なバイオマーカーを探索する目的から、腸炎発症馬の診療所来所日（day1）における血清タンパク質と健常馬の血清タンパク質を比較した。また、腸炎発症馬群における生存及び死亡群間の比較も併せて行った。その後、見出したバイオマーカー候補となるタンパク質の経時的な変化（入院日から退院若しくは死亡するまで）について観察した。また、これらのタンパク質が腸炎に特異的に変動するかどうかを確認するために、呼吸器疾患を発症した馬由来の血清についても同様に解析し、腸炎発症馬と比較を行った。

## 試料・方法

### 腸炎の診断基準

腸炎診断の臨床所見（68）を基に水様性下痢及び発熱（ $T > 38.6^{\circ}\text{C}$ ）、頻拍（ $\text{HR} > 60 \text{ bpm}$ ）、頻脈（ $\text{RR} > 30 \text{ bpm}$ ）、白血球増加若しくは減少（ $\text{WBC} > 12,500 \text{ or } < 4500$ ）を示したウマを腸炎と診断した。

### 呼吸器疾患の診断基準

気管支鏡で肺胞からの浸出液の確認若しくはエコーでの肺炎所見を認め、さらに発熱（ $T > 38.6^{\circ}\text{C}$ ）及び白血球増加（ $\text{WBC} > 12,500$ ）であったウマを呼吸器疾患と診断した。

### ウマ血清

JRA 美浦トレーニング・センター及び JRA 栗東トレーニング・センターにおいて、JRA 獣医師に健康と診断されたサラブレッド種 36 頭、呼吸器疾患若しくは腸炎と診断されたサラブレッド種各 12 頭（表 10）から血液を凝固促進剤入り真空採血管に採取した（Animal Care and Use Committee of Japan Racing Association; 承認番号 20180425、2018 年 4 月 25 日承認）。腸炎発症馬血液は診療所入院時（day 1）から退院若しくは死亡する日（last day）まで

一日一回経時的に採取した。血液採取後、室温で 3 時間インキュベートし、 $1940\times g$  で 30 分間遠心分離し、得られた上清を血清とした。採取した血清は、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で保管した。

#### 血清の前処理法 (In-solution digestion 法)

血清 5  $\mu\text{L}$  をタンパク質低吸着プロセオセーブチューブ (AMR) に分注し、10  $\mu\text{L}$  の 7.5 mM DTT (富士フィルム和光純薬) 及び 100 ng/ $\mu\text{L}$  ウシ  $\beta$ -lactoglobulin (富士フィルム和光純薬) を含む 5 %デオキシコール酸 (富士フィルム和光純薬) 水溶液を加えた。これを  $80^{\circ}\text{C}$  にて 10 分間インキュベートし、45 mM の DTT 水溶液を加え、 $60^{\circ}\text{C}$  で 20 分間インキュベートした。続いて、5  $\mu\text{L}$  の 100 mM IAM (富士フィルム和光純薬) 水溶液を添加し、暗条件下、20 分間室温でインキュベートした。これに対して 100 ng/ $\mu\text{L}$  のブタ膵臓由来トリプシン (質量分析グレード、富士フィルム和光純薬) を含む 100 mM 重炭酸 (富士フィルム和光純薬) 水溶液を 10  $\mu\text{L}$  添加し、さらに 100 mM 重炭酸緩衝液を 10  $\mu\text{L}$  添加して  $37^{\circ}\text{C}$  で 12 時間インキュベートした。その後、5  $\mu\text{L}$  の 0.1 %TFA (富士フィルム和光純薬) を加えて酵素反応を停止させ、500  $\mu\text{L}$  の酢酸エチル (富士フィルム和光純薬) を加えた。5 分間振盪した後、 $14,000\times g$  で 5 分間遠心して、上層の酢酸エチルを除去し、遠心濃縮器 (TOMY) の high temperature モードにより 30 分間濃縮した。これに 100  $\mu\text{L}$  の 4 %ACN (富士フィルム和光純薬) を含む 0.1 %TFA 水溶液を加え、1 分間振盪し、 $14,000\times g$  で 5 分間遠心した。得られた上清 100  $\mu\text{L}$  を、SEP-C-tip (日京テクノス) を使用して脱塩濃縮した。SEP-C-tip の操作手順はマニュアルに従って行い、10  $\mu\text{L}$  の 60 %ACN を含む 0.1 %TFA 水溶液で溶出した。得られた溶出液の 5  $\mu\text{L}$  を LC/MS/MS 分析に供した。

#### LC 溶出条件

LC 装置には Easy-nLC 1200 (ThermoFisher scientific) を使用した。LC 分離に使用する移動

相として、以下の溶液を用いた。

移動相 A : 0.1 %ギ酸（質量分析グレード、富士フィルム和光純薬）水溶液

移動相 B : 0.1 %ギ酸/ACN（質量分析グレード、富士フィルム和光純薬）（1:4）混液

移動相 S : 0.1 %ギ酸水溶液

LC 分離に使用するカラムは逆相カラムである EASY-Spray C18 LC カラム（Thermofisher scientific）及びトラップカラムである PepMap™ 100 nanoViper C18 カラムを用いた。なお、サンプル注入直前に移動相 S 12 µL でトラップカラムの平衡化、6 µL で LC カラムの平衡化を実施した。移動相 S 5 µL、流量 20 µL/min でサンプルをトラップカラムに導入し、得られたペプチドをトラップカラムに保持させた。保持させたペプチドを移動相 A 及び B によって LC カラムに通導し、以下の条件の通りに溶出させた。

0-2 min（98%A、2%B）、2-62 min（40%A、60%B）、62-64 min（0%A、100%B）、64-74 min（0%A、100%B）、流量 300 nL/min

なお、分析にあたっては、LC 装置のオートサンプラー並びにトラップカラムに残存するペプチドのキャリーオーバーを防ぐために、システムブランクとして水 5 µL を以下の LC 条件で 3 回測定をサンプル分析間に挿入した。

0-3 min（95%A、5%B）、3-8 min（0%A、100%B）、8-9 min（95%A、5%B）、9-12 min（95%A、5%B）、12-17 min（0%A、100%B）、17-18 min（95%A、5%B）、18-21 min（0%A、100%B）、26 min（0%A、100%B）、流量 300 nL/min

#### MS 測定条件

LC 装置に接続する MS には、Q-Exactive HF（Thermofisher scientific）を使用した。MS 条件を以下に記す。なお、MS 条件の各パラメーターは Thermofisher scientific 社が推奨するプロテオーム解析条件に準じて設定した。プリカーサーイオンのプロダクトイオンスキャンには、設定した閾値（Intensity threshold）を超えたイオンを強度の強い順番にコリジョンセ

ルに導入してプロタクトイオンを得ることが可能な dd-MS<sup>2</sup>モードを使用した。

イオンソース条件

測定時間 : 62 min

極性 : 正イオンモード (1.9 kV)

In-source CID : 0 eV

Full MS 条件

分解能 : 60,000 ( $m/z$  200 FWHM)

AGC target : 3,000,000

Maximum IT : 50 ms

質量範囲 : 400 ~ 2000  $m/z$

dd-MS<sup>2</sup> 条件

分解能 : 15,000 ( $m/z$  200 FWHM)

AGC target : 150,000

Maximum IT : 22 msec

TopN : 20

質量範囲 : 200 ~ 2000  $m/z$

Minimum AGC target : 500

Intensity threshold : 20,000

Charge exclusion : unassigned、1、 $\geq 6$

Dynamic exclusion : 10 秒

## データプロセッシング

ペプチドのアミノ酸配列同定には、ThermoFisher scientific 社の Proteome discoverer version 2.2 を用いた。タンパク質同定に係る条件は下記の通りとした。

タンパク質データベース : Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)

taxonomy ID 9796、登録数 48,800 (2019/12/27 にダウンロード)

酵素 : トリプシン

Missed cleavage : 2

Minimum peptide length : 6

Maximum peptide length : 144

Precursor mass tolerance : 10 ppm

Fragment mass tolerance : 0.02 Da

Dynamic modification : Oxidation

Static modification : Carbamidomethyl

FDR ( $q$ -value) : 0.05

定量法 : ラベルフリー (Summed Abundance Based)

タンパク質同定の基準

タンパク質に特異的なペプチド (ユニークペプチド) 数が 2 以上とした。

## タンパク質濃度の群間比較

各タンパク質由来ペプチド全ての signal intensity の合計を定量値として用いた。得られた定量値を基に、Proteome discoverer version 2.2 を使用して、主成分分析 (PCA) による健康馬及び腸炎発症馬の群間比較を実施した。群間比較には、統計解析ソフトウェア R version 4.0.3 (<http://www.r-project.org>) を用いて Mann-Whitney  $U$  test を行い、 $p$ -value を算出した。

各タンパク質について、群間で  $p\text{-value} < 0.05$  及び定量値が 2 倍以上の変動を示した場合に有意差ありと判定した。有意差を示したタンパク質について、健常及び腸炎群内の性差について同様に Mann-Whitney  $U$  test を行い、 $p\text{-value}$  を算出した。

さらに、見出したバイオマーカー候補となるタンパク質の腸炎の予後診断への有用性を検証する目的で、腸炎群における生存及び死亡群間の濃度比較を行い (day 1 及び last day)、Mann-Whitney  $U$  test によって  $p\text{-value}$  を算出した。

## 結果及び考察

健常馬及び腸炎発症馬血清の全検体から、計 292 種のタンパク質が同定された (表 11)。これらのタンパク質を変数とし、PCA による解析を実施した。結果を図 7 に示す。腸炎群と健常群は PC1 及び PC2 で明確に区別可能であった。

同定した 292 種のタンパク質について、得られた定量値から健常馬及び腸炎発症馬血清 (day 1) の量的比較を実施した。その結果、8 種のタンパク質 (hemoglobin subunit alpha、clusterin、GAPDH、carbonic anhydrase 1、peroxiredoxin 2、lysozyme、lipopolysaccharide binding protein、biliverdin reductase B) が有意差を示すことが分かった (表 12)。また、これらのタンパク質に由来する 2 種のユニークペプチドとそのマスペクトルを図 8 に示す。興味深いことに、有意差を示したこれらのタンパク質は、全て腸炎群において健常群よりも高濃度であり、健常群において腸炎群よりも有意に高濃度であったタンパク質は見出されなかった。なお、見出したタンパク質について、性差による検定を健常群及び腸炎群内で実施したところ、腸炎群内の biliverdin reductase B にのみ見出された (表 13)。

Biliverdin reductase B は biliverdin を bilirubin に変換する酵素であり、ヒトにおいて、赤血球や肝臓に存在していることが知られている (69, 70)。Biliverdin reductase B はヒトにおいてプラーク内血腫の早期診断のマーカーとしての有用性が既に報告 (71) されており、本タンパク質の濃度上昇は溶血を意味すると予測される。また、biliverdin reductase B には腸炎

群内において性差に有意差が観測されたが、これまでに biliverdin reductase B に関して性差に関する報告は見当たらず、健常群において性差は見出されなかった。腸炎群は頭数が少ないため、サンプルサイズを拡大した上での考察が必要であると考えられる。

Hemoglobin subunit alpha は赤血球の構成タンパク質であるヘムのサブユニットの一つである (72)。序論で述べたように、ウマ腸炎においては腸上皮細胞の壊死により腸内細菌やそれ由来の毒素が全身循環に侵入し、SIRS や敗血症を引き起こすことが知られている (4, 14, 73)。また、既報において腸炎による SIRS がヘモグロビン濃度の上昇に関与することが指摘されている (74)。以上の事柄を合わせて考察すると、biliverdin reductase B 及び hemoglobin subunit alpha が腸炎群血清において健常馬と比較して高濃度傾向を示したのは、腸炎の重篤化に伴う SIRS や敗血症が原因の一つとなった可能性がある。

GAPDH、carbonic anhydrase 1 及び peroxiredoxin 2 はそれぞれ細胞内に局在する酵素であり、様々な生物学的反応を担っている (75-77)。これらの酵素が腸炎群血清中から高濃度に検出されているのは、細胞内の成分が漏出していることを示唆している。腸炎の病態の一つとして、腸壁細胞の壊死を引き起こすことが知られているため (13)、細胞の壊死に基づく細胞内成分の漏出が血清中の濃度上昇に繋がったのではないかと考えられる。しかしながら、これらのタンパク質は腸壁細胞に局在するものではないため、他の部位における炎症や細胞壊死に由来する血清中濃度上昇も起こりうることを考慮しなければならない。

Clusterin は体内に恒常的に発現しているタンパク質であり、炎症及び酸化ストレスへの応答によって分泌され、細胞のアポトーシスにも関わりとされる (78, 79)。腸炎は激しい炎症を引き起こす疾患であり、これに対する応答として clusterin 分泌が促進され、血清中濃度が上昇したと推測される。これまでに clusterin が腸細胞において高発現しているという科学的な証拠はないものの、ヒトにおいては慢性的な炎症性腸疾患であるクローン病において血液中の clusterin 濃度が上昇したとの報告がある (80, 81)。このことから、ウマ腸炎においても血清中濃度が特異的に上昇するマーカーである可能性がある。



Lipopolysaccharide binding protein はグラム陰性菌のリポ多糖に対して結合するタンパク質であり、急性期タンパク質の一つとして知られる (82,83)。また、lysozyme は抗菌作用を持つペプチドタンパク質であり (84-86)、グラム陽性菌の細胞壁を加水分解する。これらは共に細菌感染などの免疫応答としてマクロファージや好中球から分泌されるタンパク質である。よって、健常馬に比較して腸炎発症馬血清中においてこれらのタンパク質濃度が上昇している所見は、細菌感染を意味していると予測され、先述の biliverdin reductase B や hemoglobin subunit alpha の濃度上昇において考察した腸炎に由来する敗血症や、これに伴う SIRS 発症を裏付けるものではないかと推測される。

以上の 8 種類のタンパク質のうち、lipopolysaccharide binding protein は腸炎馬において健常馬より最も高い濃度上昇 (9.8 倍) を示したタンパク質であり、他のタンパク質の変動がおおよそ約 2 倍から 4 倍であったことを考慮すると、特に腸炎のバイオマーカーとして優れている可能性がある。

本プロテオーム解析法において、腸炎のバイオマーカーとして見出された 8 種類のタンパク質以外に、ウマ臨床において汎用されている他のタンパク質マーカーである CRP、haptoglobin 及び serum amyloid A protein (SAA) が検出された (表 14)。しかしながら、CRP 及び haptoglobin は共に腸炎発症馬において健常馬に比較して濃度上昇を認めたものの、 $p$ -value>0.05 であった。Haptoglobin については、ウマ腸炎において有意に上昇しているとの報告がある (87) が、今回得られた結果も、濃度変化が 1.66 倍、 $p$ -value は 0.051 と有意な差に近い値が観測され、結果に大きな相違は無いと考えられる。CRP は腸炎群において 3.88 倍もの濃度変化が見られているが、 $p$ -value が 0.26 となっていた。このような結果が得られた原因は、健常群にも CRP の濃度が上昇し、腸炎群と同等の濃度を示す個体が複数見られたためである。CRP はヒトやイヌにおいて長距離走後や強度の高いマラソン後にも 3 倍から 10 倍の発現上昇が報告されている (88,89)。競走馬は日常的にトレーニングを受けてお

り、今回血清を採取した健常群の競走馬には運動後の個体もあったことから、CRP 上昇が観測されたのではないかと推測される。

一方、SAA は腸炎発症馬において健常馬よりも約 60 倍も高濃度を示し、 $p$ -value<0.001 と非常に大きな有意差を示すことが明らかとなった。バイオマーカー候補として見出した 8 種類のタンパク質のうち、最も大きな変動を示した lipopolysaccharide binding protein の変動が約 10 倍であったことを考慮すると、SAA は腸炎における最も高感度なマーカーであると考えられる。しかしながら、SAA はユニークペプチドが 2 種以上同定されず、タンパク質同定基準を満足しなかったことから、本研究における解析ではバイオマーカー候補として選択されなかった。この理由は、SAA が本研究で選択したボトムアップ法に適さなかったためである。SAA は比較的サイズの小さなタンパク質 (9,000~11,000 Da) であり (90)、得られるペプチドが比較的少なく、ユニークな配列を持つペプチドが得づらかったと予想される。さらに、ウマ SAA は 3 つのサブタイプが知られているが、その等電点が全て 8 以上と塩基性であり、分子内にアルギニンやリジンといった塩基性アミノ酸を豊富に含んでいる (91)。今回のボトムアップ法ではトリプシンを使用しているため、それらのアミノ酸の C 末端側でトリプシンによる切断を受けた結果、特異性の低い短鎖ペプチドとなり、さらにユニークペプチドの同定が困難となっていたと推測される。

SAA は腸炎に比較して軽症である腹痛から急性腸炎、重篤な閉塞性の腸疾患である SSID まで、様々な腸疾患で顕著な血清中濃度の増加が報告され (83, 92-95)、既知の炎症マーカーで最も高感度であるとされていることから、今回の結果は既報に準ずるものであった。しかしながら、SAA は気道の炎症や慢性肺気腫においても血清中濃度が上昇することで知られ、腸炎を特異的に検出するバイオマーカーとしては不十分と考えられる (96, 97)。ただし、これらの結果については、SAA の各サブタイプの量的関係が勘案されていないことを考慮すべきである。SAA はサブタイプによって生産される細胞に違いがあり、異なる機能を持つことが明らかとなっている。例えば、マウス SAA1 及び 2 は腸管上皮細胞における免疫

の活性化の後、肝細胞において産生されるが、マウス SAA3 は腸管及び中枢神経系の骨髄性細胞によって産生され、自己免疫性脳脊髄炎の病態に関与することが報告されている (98)。本研究において同定された SAA に由来するペプチドについても、各サブタイプを区別して測定できるものではなく、得られた定量値が複数のサブタイプの合算値となっている可能性がある。以上のことから、各 SAA 濃度とバイオマーカーとしての有用性を評価するにあたってはサブタイプの同定が必要であり、特にボトムアップ法に基づくプロテオーム解析においては、各サブタイプに特有の長鎖ユニークペプチドを同定し易い条件とするため、トリプシンとは異なる酵素特異性を持つキモトリプシンなどの使用が適すると考えられる。

腸炎群内における生存及び死亡群の比較において、バイオマーカー候補となる 8 種のタンパク質について、入院初日 (day 1) に有意差を示したタンパク質及び退院若しくは死亡日に有意差を示したタンパク質を表 15 に示した。解析の結果、day 1 においては biliverdin reductase B のみが有意差を示し、その後、last day においては biliverdin reductase B に加え、hemoglobin subunit alpha、clusterin、GAPDH 及び lipopolysaccharide binding protein が有意差を示す結果となった。なお、有意差が見られたタンパク質は、全て死亡群において生存群よりも高濃度であった。よってこれらの 5 種のタンパク質の濃度上昇が、腸炎の予後との関連性を示すことが明らかとなった。

これらのうち、day 1 で有意差を示した biliverdin reductase B は特に腸炎の早期診断に有用であると予想される。前述したように、biliverdin reductase B はヒトにおいてプラーク血種の早期診断に有用であるとされ、さらに予後にも関わりを示したと報告されている (71)。生存及び死亡群間の比較において、本タンパク質が day 1 及び last day において有意差を示し、さらに hemoglobin subunit alpha が last day において有意差を示したことを合わせて考えると、腸炎の重篤度の指標として、溶血所見を確認することが有効な手段であり、溶血を起こすことで知られる敗血症や SIRS が主に死亡率の高さに寄与しているのではないかと考察

される。

続いて、腸炎のバイオマーカー候補として見出した 8 種のタンパク質の定量値について、入院日から退院若しくは死亡日まで経時的な変化を示した (図 9)。8 種のタンパク質は実験期間を通して、死亡群において生存群よりも高濃度傾向であることが明らかとなった。また、biliverdin reductase B、hemoglobin subunit alpha、clusterin、lipopolysaccharide binding protein 及び lysozyme は生存群の DAY1 において健常群よりも高濃度であり、経時的に減少する傾向が見られた。これらのタンパク質は、回復期に減少していると予測され、疾患の重篤度に相関性を示す腸炎のバイオマーカー候補と予測される。さらに興味深いことに、biliverdin reductase B 及び hemoglobin subunit alpha は濃度の増減が全ての個体で同じ変動を示していた。このことから、これらのタンパク質の変動はウマにおける同一の病態を示すことが予想される。

以上の 8 種のタンパク質は、実験期間を通して死亡群、生存群、健常群の順に高濃度傾向であることが明らかとなったが、死亡群において全てのタンパク質が高濃度を示すわけではなかった。また、生存群においても必ずしもこれらのタンパク質が経時的に減少傾向ではなく、carbonic anhydrase 1 や peroxiredoxin 2、lipopolysaccharide binding protein において観察されるように生存群において退院日にあたる個体に顕著な濃度上昇が見られる場合があった。これらは腸炎が複雑な病態を示すことを示唆する結果であり、単一のマーカーでウマ腸炎の病態を把握するのは困難であり、複数のマーカーを組み合わせる必要があると考えられる。

これらのタンパク質が腸炎に特異的なバイオマーカーであるかどうかを確かめるために、呼吸器疾患を発症したウマ血清における濃度を定量し、腸炎発症馬の day 1 における血漿中濃度と比較した。結果を表 16 に示す。これらのタンパク質の中で有意差を示したのは

carbonic anhydrase 1 のみであり、その他のタンパク質は腸炎に特異的な診断マーカーとしての有用性は示されなかったものの、全てのタンパク質は腸炎において呼吸器疾患群よりも高濃度であることが明らかとなった。

以上の検討結果を踏まえ、観測された大きな個体差については、今後、カルテ情報などを参照し、個体別の病態と各タンパク質濃度との関連性を精査する必要がある。また、本研究で用いたサンプル数では不十分と考えられるため、より信頼性の高い結果を得るためにも、サンプルサイズを拡大すべきであると考えられる。このため、次章にて多検体を同時に測定可能な ELISA 法に基づく測定系の開発を目的とした抗体作製を実施する。

## 第二章

### バイオマーカー候補となるタンパク質の ELISA 法を応用した測定系の開発

## 背景と目的

第一章において、腸炎のバイオマーカー候補となるタンパク質を見出した。本章においては、これらを迅速且つ簡便に測定可能であり、同時に多検体を処理可能な測定系の構築を目的とする。ウマ臨床への応用にあたっては、SAAをはじめとする炎症マーカーの測定において実績のある ELISA 法 (46, 47, 83, 94, 95) に基づくプレートアッセイの導入が容易である。ELISA 法は、抗原-抗体反応に基づいて測定を行うため (50)、測定対象とするタンパク質に対して高い親和性を持ち、特異性の高い抗体の作製が必要である。

抗体には、複数の抗原を認識するポリクローナル抗体と単一の抗原を認識するモノクローナル抗体が用いられている。ポリクローナル抗体は作製が容易であるが、作製バッチ毎に抗原-抗体間の親和性が異なり、十分な定量の精度が得られない場合がある。一方、単一の抗原を認識するモノクローナル抗体は高度に特異的な結合性を示し、バックグラウンドの影響を受けにくく、高い定量の再現性を得ることができる (99)。本研究では、安定的な抗体の供給及び分析法の高感度化、再現性を考慮し、モノクローナル抗体の作製を目的とした。

モノクローナル抗体作製を実施する対象タンパク質として、第一章の解析結果における健常及び腸炎群間比較において、特に大きな有意差 (濃度差>2 倍、 $p$ -value<0.01) を示した clusterin、lipopolysaccharide binding protein 及び lysozyme、腸炎群内における生存及び死亡群間比較において day 1 で有意差を示した biliverdin reductase B、呼吸器疾患群との比較において有意差を示した carbonic anhydrase 1 を選定した。

これらのタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製は、以下の手順に従うこととした。

1. ラットに免疫するための免疫原となるウマタンパク質発現レポーター細胞の作製
2. 抗ウマタンパク質抗体を産生するハイブリドーマ作製とクローニング及び抗体の取得

## 第 1 節 ウマタンパク質を発現するレポーター細胞の作製

本節では、抗体作製を実施する際のラットに免疫する免疫原とするための clusterin、lipopolysaccharide binding protein、lysozyme、biliverdin reductase B、carbonic anhydrase 1 を発現するレポーター細胞の作製を目指すこととした。レポーター細胞作製のため、ウマ肝臓及び腎臓組織を使用して cDNA を作製し、抗体作製を行うタンパク質の遺伝子を PCR で増幅した。また、増幅した遺伝子を pBluescript II SK (+) に挿入して塩基配列を確認し、uniprot (<https://www.uniprot.org/>) に公開されている遺伝子配列と比較した。続いて、遺伝子を pMXs レトロバイラルベクター（東京大学医科学研究所 北村俊雄博士より供与）に挿入した（図 10）。これをパッケージング細胞である Platinum-E 細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をウイルス上清としてマウス T 細胞由来の BWZ.36 細胞に振りかけて感染させ、ウマタンパク質を細胞表面に発現するレポーター細胞を作製した。

なお、レポーター細胞に組み込む pMXs ベクターは、図 10 に示すように N 末端から順に myc タグ、I 型膜貫通タンパク質であるマウス CD8 $\alpha$  (Genbank : BC030679) の膜貫通領域 aa143-181)、IL-2 シグナルを伝達するマウス CD3 $\zeta$  (Genbank : BC052824) 鎖細胞内領域 aa52-164) を発現するように設計されたベクターである。このことから、抗 myc 抗体を使用して、FACS により作製したレポーター細胞表面上のウマタンパク質発現確認を行った。

さらに、本研究で用いた BWZ.36 細胞は、IL-2 プロモーターの制御下で  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するレポーター遺伝子が導入されており、レセプター分子への抗体やリガンドの結合が引き金となって架橋刺激が入り、細胞内に  $\beta$ -ガラクトシダーゼが産生亢進されるレポーター細胞である。よって、細胞表面のレセプター分子の発現を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ基質の分解によって検出することが可能である（図 11）。これを利用したレポーター細胞上のウマタンパク質発現確認（レポーターアッセイ）も併せて行った。



実験に使用した試薬及び試料

PBS (-)

137 mM NaCl (キシダ化学)、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (和光純薬)、2.68 mM KCl (和光純薬)、1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (和光純薬) となるように超純水で調製した。

EDTA/PBS (-)

終濃度 0.5 mM になるように 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (同仁化学研究所) (pH8.0) を PBS (-) に加えた。

FACS Buffer

0.1% (w/v) BSA [017-15124] (和光純薬)、0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub> (和光純薬)、0.35 g/L NaHCO<sub>3</sub> (和光純薬) を含む フェノールレッド不含 Hank's balanced salt solution (日本製薬)

R10 培地

25 mM HEPES 及び 2 mM glutamine を含む RPMI 1640 medium (Invitrogen) 500 mL に 57 °C、30 分でインキュベートすることで非働化した fetal calf serum (FCS, Intergen) を 10% (V/V) になるように 56 mL、100 mM 2-mercaptoethanol を 280 µL、penicillin (10,000U/mL) -streptomycin (10,000 µg/mL) (Sigma-aldrich) を 2.8 mL を加えた。

ハイブリドーマ培地

マウス IL-6 発現細胞 X63 の培養上清を 0.5%、1% (v/v) 100×非必須アミノ酸溶液 (Sigma-aldrich)、1% (v/v) 100 mM ピルビン酸ナトリウム (和光純薬) を含む R10 培地。

D10 培地

2 mM glutamine を含む D-MEM (Invitrogen) 500 mL に FCS を 10% (v/v) になるように 56 mL、100 mM 2-mercaptoethanol を 290  $\mu$ L、1 M HEPES (同仁化学研究所) -NaOH (pH 7.5)、を 14.5 mL、penicillin (10,000 U/mL) -streptomycin (10,000  $\mu$ g/mL) を 5.6 mL 加えた。

#### HAT 培地

0.1 mM ヒポキサンチン (Sigma-aldrich) と 0.4  $\mu$ M アミノプテリン (Sigma-aldrich) と 16  $\mu$ M チミジン (Sigma-aldrich) を含むハイブリドーマ培地。

#### HT 培地

$1 \times 10^{-4}$  M のヒポキサンチンと  $1.6 \times 10^{-5}$  M のチミジンを含むハイブリドーマ培地。

#### LB 培地

Bacto Trypton Pepton 10 g、Bacto Yeast Extract 5 g、NaCl 5 g を超純水で 1 L にメスアップし、オートクレーブ滅菌した。

#### LB プレート

Bacto Trypton Pepton 10 g、Bacto Yeast Extract 5 g、NaCl 10 g、Bacto Agar 10 g を超純水で 1 L にメスアップし、オートクレーブ滅菌した。60°C 以下になったところで、抗生物質を添加して petridish (BIO-BIK) に注ぎ、固まるまで無菌下で常温静置した。

#### CPRG Reaction buffer

100 mM 2-mercaptoethanol、9 mM magnesium chloride、0.125% (v/v) NP-40 を含む PBS (-)

#### 50×TAE

Tris 242 g、酢酸 57.1 mL、0.5 M EDTA (pH8.0) 100 mL を超純水で 1L にメスアップした。

実験に使用した細胞及び動物

BWZ.36 細胞

University of California N.Shastri 博士より供与して頂いたものを用い、R10 培地で培養した。

Platinum-E 細胞

東京大学医科学研究所 北村俊雄博士より供与して頂いたものを用い、D10 培地で培養した。

PAI 細胞

100  $\mu$ M 8-azaguanine (Sigma-aldrich) を含む R10 培地で培養した。

ラット

日本エスエルシー (株) から LEW/SsNSlc ♀ のラット (5 週齢) を購入し、実験に用いた。  
ラットは購入後、本研究室の SPF 動物室で飼育し、動物実験も SPF 動物室で行った。

一般的な実験操作

アガロースゲル電気泳動

1×TAE (50×TAE を水で 50 倍希釈したもの) を用いて終濃度 0.1  $\mu$ g/mL ethydiumbromide (Sigma-aldrich) を含む 1% アガロースゲル (SeaKem GTG agarose、BMA) を作製した。  
MupidII (ADVANCE) を使用して、作製したアガロースゲルを用いて 1×TAE 中、電圧 100 V で電気泳動を行った。なお、DNA サイズ及びマスマーカーとして、Marker 2 ( $\lambda$ /Hind3・

EcoR1 double digest) 及び Marker 4 (φ0174/Hae3 digest) (ニッポン・ジーン) を使用した。DNA のゲルからの抽出は、目的のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用い、説明書に記載のプロトコールに従って行った。

## PCR

PCR は KOD-Plus-DNA polymerase (TOYOBO) を用いて説明書に記載のプロトコールに従って行った。サーマルサイクラーは、Veriti 96-well サーマルサイクラー (Applied Biosystem) または、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) を使った。プライマーは Sigma Aldrich 社に合成を依頼し、購入したものを用いた。PCR 反応は総量 40 µL で 94°C 2 分間、(変性 98 °C 15 秒間、アニーリング 58 °C 30 秒間、伸長 68 °C 45 秒間) ×35 サイクル、68 °C 7 分間の条件で行った。

## プライマーのリン酸化

T4-Polynucleotide Kinase (Takara) を用いてリン酸化を行った。100 µM Forward primer を 2 µL, 100 µM Reverse primer を 2 µL, 10×kinase buffer を 2 µL、10 mM ATP を 2 µL、T4-Polynucleotide Kinase (9 units/µL) 1 µL を混合し、20 µL に超純水でメスアップし、37 °C で 30 分反応させた。その後、70°Cで 20 分間置くことで T4-Polynucleotide Kinase を失活させた。

## 制限酵素処理

制限酵素は全て TOYOBO 製のものを扱い、反応は全て説明書に従って行った。

## ライゲーション反応

インサート DNA とベクターDNA のモル比が 10:1 となるように混合した溶液を 5 µL 用

意し、Ligation Mix (TaKaRa) を 5  $\mu$ L 添加し、合計 10  $\mu$ L になるように混合した。この溶液を 16°C で 2 時間または一晩反応させた。

#### 大腸菌 DH5 $\alpha$ コンピテトセルへの形質転換

5  $\mu$ L のライゲーション産物に 30  $\mu$ L の DH5 $\alpha$  コンピテントセルを加え、氷上で 20 分間静置した。その後、ウォーターバスを用いて 42°C で 90 秒間温めてヒートショックを与え、氷上 30 分間置いた。Ampicillin 100  $\mu$ g/mL を含む LB プレートに 100 mM IPTG (isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactosidase) (富士フィルム和光純薬) を 5  $\mu$ L, 20 mg/mL X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) (富士フィルム和光純薬) を 50  $\mu$ L 塗布し、氷上にて 2 分間インキュベートしたサンプルを植菌し、37°C で 14 時間培養した。

#### シークエンスの確認

1  $\mu$ L の 100 ng/mL プラスミド溶液、1  $\mu$ L の 1  $\mu$ M の M13 Fw primer 若しくは Rv primer (Takara)、水 8  $\mu$ L を混合し、反応液とした。DNA シークエンスは、ユーロフィンゼノミクス株式会社の DNA シークエンス受託サービスに委託して解析した。

#### 実験操作

##### ウマ肝臓及び腎臓組織由来 cDNA ライブラリ作製

ウマ肝臓及び腎臓組織約 30 mg を液体窒素中で凍結させ、すり潰したものをを用いた。RNA の抽出には Fast gene™ RNeasy Mini kit (QIAGEN) を使用し、説明書に記載のプロトコールに準拠して total RNA を抽出した。本 total RNA 1  $\mu$ g を基に、ReverTra Ace® qPCR RT Mix (TOYOBO) を使用して、説明書に記載のプロトコールに従って cDNA ライブラリの作製を行った。

## ウマタンパク質のクローニングとシーケンス配列の確認

ウマ肝臓及び腎臓組織由来 cDNA を鋳型に、clusterin、lipopolysaccharide binding protein、lysozyme、biliverdin reductase B、carbonic anhydrase 1 の全長を含む cDNA を PCR にてクローニングした。なお、下記のプライマーを予めリン酸化したものを用い、PCR を行った。

### clusterin

Fw: 5'- ATGAAGACTCTCCTGCTGTTGGTG – 3'

Rv: 5'- TCATTCCTCCCGGTTCTTCTGG – 3'

### lipopolysaccharide binding protein

Fw: 5'- AATCCAGGATGGAGGCCTCG – 3'

Rv: 5'- TCAGACTTTCGTGTACTGGATGTTGG – 3'

### lysozyme

Fw: 5'- ATGAAGGTTCTCCTGACTCTGGG – 3'

Rv: 5'- TTACACTCTGCAACCCTTGACATAC – 3'

### biliverdin reductase B

Fw: 5'- ATGGTCGTCAAGAAGATTGCGC – 3'

Rv: 5'- CTACTCGTACTGGTGGGAGGG – 3'

### carbonic anhydrase 1

Fw: 5'- TCATGGCAAGTCACGACTGG – 3'

Rv: 5'- TCAGAAGAAAGCTCTCACAGTTCTGC – 3'

増幅された DNA 断片を pBluescript II SK (+) (制限酵素 *Sma*I (Takara) 及び alkaline phosphatase (Takara) 処理済み) の *Sma*I 部位に挿入した後に、シーケンス配列の確認を行い、BLAST 検索 (nucleotide blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) によって遺伝子を同定

した。なお、clusterin は Genbank : 100034172、lipopolysaccharide binding protein は Genbank : 100070103、lysozyme は Genbank : 100052143、biliverdin reductase B は Genbank : 100068145、carbonic anhydrase 1 は Genbank : 100050192 を参照した。

#### ウマタンパク質発現レトロウイルスベクターの作製

ウマタンパク質を細胞表面にマウス CD3 $\zeta$  鎖とのキメラタンパク質として発現するためのレトロウイルスベクターを作製した。作製プロトコルの概略を図 12 に示す。5 種のウマタンパク質の cDNA を組み込んだ pBluescript II SK (+) ベクターを各々テンプレートとして、以下に記すプライマーを使用して PCR を行った。なお、clusterin (aa22-448)、lipopolysaccharide binding protein (aa26-455)、lysozyme (aa19-147) はシグナル配列と終止コドンを除いた配列、biliverdin reductase B (aa2-230)、carbonic anhydrase 1 (aa2-259) は開始及び終止コドンを除いた配列を増幅可能であるようにプライマーを設計した。

#### clusterin

Fw: 5'- GCACATCAATTGGACAAGGCAGTGTCTCAGACAGA - 3'

Rv: 5'- ACAGTTCTCGAGTTCCTCCCGGTTCTTCTG - 3'

#### lipopolysaccharide binding protein

Fw: 5'- ATACATCAATTGTCCAACCCCGGCCTGG - 3'

Rv: 5'- ACAGTTCTCGAGGACTTTCGTGTACTGGATG - 3'

#### lysozyme

Fw: 5'- GCGCCTGAATTC AAGGTCTTTGAAAGATGTGAG - 3'

Rv: 5'- ACAGTTCTCGAGCACTATGCAACCCTTGAC - 3'

#### biliverdin reductase B

Fw: 5'- AGAGGTGAATTCGTCGTCAAGAAGATTGCG - 3'

Rv: 5'- ACA ATTGTCGACCTCGTACTGGTGGGAGG – 3'

carbonic anhydrase 1

Fw: 5'- GCATATCAATTGATGGCAAGTCACGACTGG – 3'

Rv: 5'- ACAGTTCTCGAGGAAAGAAAGCTCTCACAGTTC – 3'

下線で示した配列は制限酵素 *EcoRI*、*MunI*、*XhoI*、*SalI* の何れかの認識配列を示す (図 13)。

PCR により得られた DNA 断片をアガロース電気泳動後、ゲル抽出した。ゲル抽出後の DNA 断片について、*EcoRI* の認識配列が存在するタンパク質は *EcoRI* の代わりに *MunI* を、*XhoI* の認識配列が存在するタンパク質は *SalI* を用いて処理した。使用した制限酵素の組み合わせを下記に記す。

	制限酵素	
	5'側	3'側
clusterin	<i>MunI</i>	<i>XhoI</i>
lipopolysaccharide binding protein	<i>MunI</i>	<i>XhoI</i>
lysozyme	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>
biliverdin reductase B	<i>EcoRI</i>	<i>SalI</i>
carbonic anhydrase 1	<i>MunI</i>	<i>XhoI</i>

得られた DNA 断片を当研究室卒業生柳原が作製した pMXs/myc-mCoch-NKp46-CD  $\alpha$ -CD3 $\zeta$  (柳原修士論文) を制限酵素 *EcoRI* (Takara)、*XhoI* (Takara) 及び alkaline phosphatase (Takara) で処理し、マウス由来タンパク質 Cochlin のシークエンス配列 mCoch を切り出した pMXs-Neo ベクター (pMXs ベクターにネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれており、薬



剤セレクションが可能) にライゲーションし、それぞれのウマタンパク質 cDNA を組み込んだ。

#### レトロウイルスの作製と BWZ.36 細胞への感染

レトロウイルスパッケージング細胞 Platinum-E 細胞を  $5.0 \times 10^5$  cells/mL になるように D10 培地に懸濁した後、6-well plate (corning) に 2 mL ずつ分注して培養し、約 7~9 割コンフルエントとした。続いて、ウマタンパク質の遺伝子配列を組み込んだ 2.5  $\mu$ g の各 pMXs レトロウイルスベクター及び lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を Opti-MEM (Invitrogen) と混合 (各 well に約 500  $\mu$ l、この時 DNA : lipofectamine 2000=1 : 2.5) し、室温で 30 分間インキュベートし、Platinum-E 細胞にトランスフェクションした。2 日後に培養上清を回収し、500 $\times$ g、10 分間遠心した上清をレトロウイルス液として得た。このレトロウイルス液を 2 mL の R10 培地に懸濁した BWZ.36 細胞 ( $5.0 \times 10^4$  cells/mL) に加えて 8  $\mu$ g/mL の polybrene (富士フィルム和光純薬) 存在下で感染させ、2 日間培養したものをレポーター細胞とした。

#### FACS によるウマタンパク質の発現確認

作製した BWZ.36 レポーター細胞 ( $4.0 \times 10^5$  cells) を 96-well U 底プレートに入れ、プレートを 510 $\times$ g で 3 分間遠心分離を行い、100  $\mu$ L の FACS バッファーで 2 回洗浄した後、上清を除去した。50  $\mu$ L/well の抗 myc 抗体 (10  $\mu$ g/mL in PBS (-)) を加え、4 $^{\circ}$ C のインキュベーターで 15 分間静置した。200  $\mu$ L の FACS バッファーで 2 回洗浄した後、100  $\mu$ L の 2.5  $\mu$ g/mL Goat Anti-Mouse IgG (H+L) PE Conjugate を加え、4 $^{\circ}$ C のインキュベーターで 15 分間静置した。100  $\mu$ L の FACS バッファーで 2 回洗浄した後、100  $\mu$ L の FACS バッファーに懸濁し、100  $\mu$ L の 3  $\mu$ g/mL PI を加え、1.2 mL チューブに細胞懸濁液を移した。FACS Calibur (BD Biosciences) で測定し、Flowjo (Tree Star Inc.) でデータ解析を行った。

## レポーターアッセイ

96-well ELISA plate (Greiner bio-one) に、PBS (-) で 5 µg/mL に希釈した抗 myc 抗体※を 50 µL/well で加え、4°Cで一晩静置し、固相化を行った。翌日、200 µL/well の PBS (-) で 3 回洗浄し、R10 培地で希釈したレポーター細胞  $1.0 \times 10^5$  cells を 200 µL/well で加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 16 時間インキュベートした。その後、510×g、4°C、5 分間遠心し、上清を除いて 200 µL/well の PBS (-) で洗浄した。同様に 2 回同量の PBS (-) で洗浄し、ボルテックスで細胞塊を崩し、CPRG reaction buffer に溶解した 0.15 mM chlorophenolred β-D-galactopyranoside (CPRG) (富士フィルム和光純薬) を 150 µL/well 加え、37°Cで 1 時間静置した。プレートリーダー装置 Multiscan JX (Labsystem) にて 630 nm の吸光度をリファレンスとし、570 nm の吸光度を測定した。

※ 抗 myc 抗体 (9E10) は、ハイブリドーマ (CRL-1729) を ATCC ; The Global Bioresource Center より購入し、当研究室卒業生の胡博士が培養上清からプロテイン A カラムで精製したものを使用した。

## 結果及び考察

クローニングした 5 種類のタンパク質のシーケンス解析結果を図 14 に示す。lysozyme、biliverdin reductase B 及び clisterin については、参照した塩基配列と全て一致していた。Carbonic anhydrase 1 は 633 番目の塩基がアデニンであり、参照した配列ではシトシンであった。しかしながら、翻訳された際のアミノ酸配列に変化は無かった。一方、lipopolysaccharide binding protein については、参照した塩基配列において、319 番目のアラニンであった塩基がグアニン、769 番目のアラニンがチミンとなっていた。これにより、106 番目の残基がアスパラギンからアスパラギン酸、257 番目の残基がアルギニンからシステインと互いに大きく性質の異なるアミノ酸残基となっていることを確認した。Lipopolysaccharide binding protein はヒトにおいて数多くの一塩基多型 (SNP) が報告されて

いる (100) ため、これらの塩基の相違が SNP である可能性もあるものの、これまでにウマについては lipopolysaccharide binding protein の SNP に関する報告は無い。また、これらの相違が PCR のエラーに由来する可能性もあるため、再度クローニングを実施して塩基配列を確認する必要がある。

作製した 5 種類のレポーター細胞のウマタンパク質発現を確認するために、FACS によるタンパク質発現の確認を行った。結果を図 15 に示す。これらの結果から、レポーター細胞が clusterin、lipopolysaccharide binding protein、lysozyme、biliverdin reductase B、carbonic anhydrase 1 を BWZ.36 細胞の表面に発現していることを確認した。しかしながら、lipopolysaccharide binding protein については発現率が非常に低く、pMXs レトロウイルスベクターに組み込まれたネオマイシン耐性遺伝子を使用したネオマイシン耐性細胞株のセクションが必要であると考えられる。

また、これらのレポーター細胞について、FACS による発現確認ではレポーターアッセイに必要な抗 myc 抗体を用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の検出が確認できないと考えられる。このため、作製したレポーター細胞の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の検出のためのレポーターアッセイを行った。結果を図 16 に示す。lipopolysaccharide binding protein 以外のレポーター細胞についてはその活性を確認することができたことから、lipopolysaccharide binding protein を除く 4 種のレポーター細胞を免疫原としてラットに免疫し、これらのタンパク質に対する抗体を産生するハイブリドーマの作製を行うこととした。

## 第2節 ウマタンパク質に対する抗体を産生するハイブリドーマ作製

モノクローナル抗体は、抗体を作り出す B 細胞と、無限に増え続ける能力を持った特殊な細胞であるミエローマ細胞を融合したハイブリドーマから作製する (100,101)。この手順に従い、モノクローナル抗体を作製することとした。

第 1 節において作製したレポーター細胞をラットに免疫し、免疫したラットから得られた血清中抗体のスクリーニングをレポーターアッセイにて実施した。これにより、ウマタンパク質に対するモノクローナル抗体を産生する B 細胞が存在することを確認し、ラットから得られた B 細胞をミエローマ細胞と融合させ、ウマタンパク質に対する抗体を産生するハイブリドーマの作製を試みた。

### 試料・方法

実験に使用した試薬及び試料は、第 1 節と同様のものを用いた。

#### ラットへのレポーター細胞の免疫

ウマタンパク質を発現するレポーター細胞を免疫原として用いた。各レポーター細胞を  $1.0 \times 10^7$  cells ずつ PBS (-) に懸濁し、混合して免疫の前に  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結した。免疫は計 3 回行い、各回とも、各レポーター細胞 ( $1.0 \times 10^7$  cells) をラット (LEW/SsNSlc ♀) の後肢足蹠にそれぞれ皮下注射した。1 回目の免疫では、各  $1.0 \times 10^7$  cells の細胞を含む凍結融解した細胞懸濁液 400  $\mu\text{L}$  と 400  $\mu\text{L}$  のフロイントコンプリートアジュバント (Adjuvant Complete Freund, Difco) を混合してエマルジョンを作製した。注射筒 2 本とコネクターを用いて、5-15 分間細胞が温まらないように氷上で冷やしながら混合した。ジエチルエーテル (昭和エーテル) で麻酔したラットの各後肢足蹠にそれぞれ 400  $\mu\text{L}$  ずつ皮下注射した。2 回目の免疫では、細胞懸濁液とフロイントインコンプリート (Adjuvant Incomplete Freund, Difco) を体積比 1 : 1 で混合し、エマルジョンを作製した。それ以外の操作は 1 回目の

免疫と同様に実施した。3 回目の免疫ではアジュバントを用いずに、細胞懸濁液 400  $\mu$ L のみをラットの後肢足蹠に皮下注射した。2 回目の免疫は 1 回目の免疫の 2 週間後、3 回目の最終免疫は 2 回目の免疫の 4 週間後に行った。

#### ラット血清を用いたウマタンパク質発現レポーター細胞への抗体産生の確認

免疫を実施したラット 2 匹に対し、免疫前の血清と、2 回免疫後の血清を比較し、作製したレポーター細胞に対する抗体が産生されているかを確認した。96-well ELISA プレートに 5  $\mu$ g/mL の Goat Anti-Rat IgG 抗体を各 well に 50  $\mu$ L 加え、4°Cで一晩静置することで固相化した。その後、 $4.0 \times 10^5$  cells の各レポーター細胞に 100 倍希釈した 0.22  $\mu$ m フィルター滅菌済みの血清 500  $\mu$ L を加え、4°Cで 30 分間静置した。これに R10 培地を 3 mL 加え、510 $\times$ g、4 °C、3 分で遠心することで洗浄した。上清を捨て、800  $\mu$ L の R10 培地を加え懸濁した。固相化した 96-well ELISA プレート上清をアスピレートし、PBS (-) を 100  $\mu$ L/well で加え、再度同じ操作を行うことで各 well を洗浄した。洗浄した後に、レポーター細胞の懸濁液を 50  $\mu$ L/well で加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 16 時間培養した。その後、510 $\times$ g、4 °C、3 分で遠心して上清を除去し、PBS (-) を各 well に 200  $\mu$ L 加え、再度 510 $\times$ g で 3 分間遠心し、上清を除いた。同様の操作で 2 回繰り返して PBS (-) で洗浄した。洗浄後、0.15 mM CPRG を含む CPRG Reaction Buffer を 100  $\mu$ L/well で加え、37°C、2 時間インキュベートした。プレートリーダー (Multiscan JX; Labsystems) で 630 nm の吸光度をリファレンスとして 570 nm の吸光度を測定した。

#### ウマタンパク質に対する抗体産生ハイブリドーマ細胞の作製

細胞融合法により、レポーター細胞を免疫したラット由来のリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞である PAI 細胞からなるハイブリドーマ細胞を作製した。事前に PAI 細胞を培養している培地に 8-azaguanine 溶液を加え、数日間培養することで、HGPRT 欠損株を選択

した。さらに 8-azaguanine を培地から除去した状態で数日間培養した。最終免疫の 3 日後、ラットをエーテル麻酔死させた後に、膝窩リンパ節と鼠径リンパ節と腸骨リンパ節を摘出し、それぞれ RPMI 1640 が 10 mL 入った 10 cm dish に入れて回収した。セルストレイナー (Becton Dickinson) 上で組織を破碎し、細胞懸濁液を得た。細胞を 20 mL の RPMI 1640 に懸濁し、50 mL チューブ (Griener) に移した。280×g、室温で 7 分間遠心分離し、上清を除去後、RPMI 1640 を 20 mL 加えてさらに 2 回洗浄したのち、再度凝集した細胞を除くためにセルストレーナーに通して、得られたリンパ節細胞の数を数えた。融合するミエローマ細胞 (PAI) も同様に RPMI 1640 で洗浄し、細胞数を数えた。リンパ球とミエローマの細胞数の比が 2:1 になるように混ぜ、280×g、室温で 7 分間遠心し、上清を完全に取り除いた。37°C 水浴上で、ペレットに 1 mL の 50 % Polyethylene Glycol 1500 (PEG 1500, Roche) をゆっくりと攪拌しながら 1 分間かけて滴下した後、1 分間 37°C で静置することで、ミエローマ細胞とリンパ球の細胞融合を行った。ここに、1 mL の RPMI 1640 を攪拌しながら 1 分間かけてゆっくり加え、さらに 3 mL の RPMI 1640 を攪拌しつつ 3 分間以上かけて加えた。最後に 10 mL の RPMI 1640 を攪拌しつつゆっくり加え、37°C の恒温槽で 5 分間静置した。融合した細胞を 280×g、室温で 7 分間遠心した後、 $5.0 \times 10^5$  cells/mL となるように HAT 培地で懸濁した。96-well flat-bottom プレートの各 well に 200  $\mu$ L ずつ細胞懸濁液を添加し、37°C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

レポーターアッセイによる抗 biliverdin reductase B 及び clusterin 抗体産生ハイブリドーマの一次スクリーニング

ハイブリドーマ上清中に含まれる抗体と、細胞表面上の biliverdin reductase B 若しくは clusterin に対する結合を、biliverdin reductase B 若しくは clusterin を発現するレポーター細胞を用いたレポーターアッセイで検出した。96-well ELISA プレートに 5  $\mu$ g/mL のヤギ抗 Rat IgG 抗体を各 well に 50  $\mu$ L 加え、常温で 7 時間、静置することで固相化した。上清をアス

ピレートし、PBS (-) を各 well に 150  $\mu$ L 加え、アスピレートし、再度同じ操作を行うことで各 well を洗浄した。洗浄した後に、100  $\mu$ L ハイブリドーマ細胞の培養上清を加え、4  $^{\circ}$ C、3 時間反応させた。なお、ネガティブコントロールとして PBS で処理した well、ポジティブコントロールとして 1  $\mu$ g/mL の抗 myc 抗体を含む PBS で処理した well を用意した。インキュベート後、上清を取り除き、PBS (-) を各 well に 150  $\mu$ L 加え、アスピレートした。R10 培地を 50  $\mu$ L /well に  $3.5 \times 10^4$  cells/well の各レポーター細胞を混合・懸濁して加え、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 18 時間培養した。その後、前述した方法で CPRG による発色と吸光度の測定を行った。

#### レポーターアッセイによる抗 biliverdin reductase B 及び clusterin 抗体産生ハイブリドーマの二次スクリーニング

一次スクリーニングで陽性を示したハイブリドーマの培養上清について、biliverdin reductase B 及び clusterin に対する結合をレポーターアッセイで再度評価した。方法は前述した方法に準じた。

#### FACS による抗 biliverdin reductase B 及び clusterin 抗体産生ハイブリドーマの三次スクリーニング

二次スクリーニングのレポーターアッセイで陽性を示したハイブリドーマの培養上清について、biliverdin reductase B 及び clusterin への結合性を FACS によって解析した。biliverdin reductase B 及び clusterin を発現するレポーター細胞（各  $1.0 \times 10^6$  cell/mL）を 96-well U 底プレートに 200  $\mu$ L/well 入れ、プレートを 510 $\times$ g で 3 分間遠心分離を行い、200  $\mu$ L の FACS バッファーで 2 回洗浄した後、上清を除去した。50  $\mu$ L /well のハイブリドーマの培養上清を加え、4 $^{\circ}$ C で 15 分間静置した。200  $\mu$ L の FACS バッファーで 2 回洗浄した後、20  $\mu$ L の 5  $\mu$ g/mL Goat Anti-Mouse IgG (H+L) PE Conjugate を加え、4 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。200  $\mu$ L の

FACS バッファーで 2 回洗浄した後、200  $\mu$ L の FACS バッファーに懸濁し、1.2 mL チューブに細胞懸濁液を移した。測定直前に 100  $\mu$ L の 3  $\mu$ g/mL PI を加え、FACS Calibur (BD Biosciences) で測定し、FlowJo (Tree Star Inc.) でデータ解析を行った。

#### 限界希釈法によるクローン化

三次スクリーニング後に拡大培養したハイブリドーマを回収し、細胞数をカウントした。細胞懸濁液の濃度が 1 cell/well (5 cells/mL) となるようにハイブリドーマ培地で希釈した。細胞懸濁液を 96-well flat-bottom プレートに 200  $\mu$ L ずつ播き、37°C、インキュベーターで 10 日間培養した。その培養上清を用いて、biliverdin reductase B 及び clusterin に対する結合のスクリーニングを FACS により行い、クローン化された抗 biliverdin reductase B 抗体産生ハイブリドーマを得た。

#### FACS による抗 clusterin 及び biliverdin reductase B 抗体産生ハイブリドーマの四次スクリーニング

限界希釈法によってクローン化を行ったハイブリドーマの培養上清について、clusterin 及び biliverdin reductase B に対する結合を FACS で再度評価した。方法は前述した方法に準じた。



## 結果及び考察

レポーター細胞で 2 回免疫した後のラット血清中に含まれるウマタンパク質に対する抗体の有無をレポーターアッセイにより評価した。結果を図 17 に示した。発現ベクターが導入されていない BWZ.36 細胞、lysozyme 及び carbonic anhydrase 1 を発現するレポーター細胞には  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が見られず、biliverdin reductase B 及び clusterin を発現するレポーター細胞には  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が見出された。これにより、ラット血清中に biliverdin reductase B 及び clusterin に対する抗体が産生されていることが示唆された。この結果を受け、これらのタンパク質に対する抗体を産生する B 細胞（ラット A の膝窩リンパ節、鼠径リンパ節及び腸骨リンパ節由来）とマウスミエローマ細胞である PAI 細胞を融合させることにより、ハイブリドーマ作製を試みた。ハイブリドーマの作製後、ハイブリドーマの培養上清を使用して、biliverdin reductase B 及び clusterin に対して特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選定する一次スクリーニングをレポーターアッセイにより実施した。なお、一次スクリーニングにおいては実験にかかる時間を短縮するため、biliverdin reductase B 及び clusterin を発現するレポーター細胞を同じ比率で混合したものを用いた。結果を一部抜粋の上、図 18 に示した。これにより、スクリーニングポジティブな計 47 well を得た。

一次スクリーニングの結果から、biliverdin reductase B 若しくは clusterin を発現するレポーター細胞に対して、培養上清中の抗体が特異的に結合することを示唆する結果が得られた。次に、biliverdin reductase B と clusterin のどちらのタンパク質に対する抗体が存在しているかを確かめるため、一次スクリーニングポジティブであった培養上清を使用し、各レポーター細胞に対する結合性を別々にレポーターアッセイにて解析した。結果を図 19 に示した。本結果から、全ての培養上清は、発現ベクターが導入されていない BWZ.36 細胞に対して  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を認めず、biliverdin reductase B 及び clusterin を発現するレポーター細胞に対しては活性を認めた。このことから、スクリーニングポジティブであった全て

の培養上清において、biliverdin reductase B 及び clusterin に対して特異的に結合する抗体が含まれることを示唆する結果となった。ただし、今回使用した各レポーター細胞の発現ベクターには共に myc タグが組み込まれており、myc タグに対する抗体が産生されている可能性がある。

レポーターアッセイによる二次スクリーニングがポジティブであったもののうち、特に高い  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した計 24 well について、その培養上清を使用し、FACS によって biliverdin reductase B 及び clusterin を発現するレポーター細胞に対する結合性を解析した（三次スクリーニング）。解析の結果、全ての well の培養上清について、ウマタンパク質に対する明らかな結合の増加を認めなかった（図 20-1 及び 20-2）。このような結果が得られた理由としては、選定した well にウマタンパク質とは異なる物質に結合する抗体を産生する多種類のハイブリドーマが混在していたためと考察した。例えば、図 20-1 における control（2 次抗体のみで処理した発現ベクターが導入されていない BWZ.36 細胞）の示す蛍光強度に比較して、青色のヒストグラム（12-D-12 の培養上清で処理した発現ベクターが導入されていない BWZ.36 細胞）が強い蛍光強度を示している。これは、ウマタンパク質以外の BWZ.36 細胞の表面に存在する物質に対する抗体が結合していることを示している。今回、これらに対する結合が主として FACS で観測されており、結果的にウマタンパク質に対する特異的な結合を区別して解析しづらくなっているものと考えられた。なお、これに類似した結果が 2-F-9 や 4-F-5 をはじめとした他の well の培養上清においても観測されている（図 20-2）。これらのことから、ハイブリドーマのクローン化を行った上で FACS による抗体の結合性を再度評価する必要があると考え、三次スクリーニングにおいて、発現ベクターが導入されていない BWZ.36 細胞に比較し、biliverdin reductase B を発現するレポーター細胞に対して若干の強い結合性を示す結果（図 20-1）が得られた 12-D-12 の well に含まれるハイブリドーマについて、限界希釈培養を実施した。

限界希釈培養を実施して得られた 16 種のハイブリドーマのクローン培養上清について、

FACS により biliverdin reductase B 及び clusterin を発現するレポーター細胞に対する結合性を評価した（四次スクリーニング）。その結果、クローン培養上清（2-E-12）が、発現ベクターが導入されていない BWZ.36 細胞及び clusterin を発現するレポーター細胞に対して結合性を示さず、biliverdin reductase B を発現するレポーター細胞に対して特異的に結合することを示す結果が得られた（図 21-1）。レポーター細胞のヒストグラムについて、発現ベクターが導入されていない BWZ.36 細胞のヒストグラムと完全に分離しなかった理由として、図 15 に示すように、biliverdin reductase B を発現するレポーター細胞は約 50%程度であり、biliverdin reductase B を発現しない細胞群が蛍光強度の増加を示さなかったためと推測される。また、本培養上清に含まれる抗体は、clusterin を発現するレポーター細胞に対して結合性を示さなかったことから、myc タグに対する抗体が産生されている可能性も否定された。しかしながら、本培養上清において処理した発現ベクターが導入されていない BWZ.36 細胞において、二次抗体のみで処理した control に比較し、若干の蛍光強度の増加が観測されている。これについて、培養上清中に含まれる不純物によって BWZ.36 細胞に対する非特異的な結合が観測された可能性もあることから、今後は、培養上清中の抗体をプロテイン A カラムなどによってアフィニティー精製し、結合性を再度評価する必要がある。なお、他のクローン由来の培養上清を用いた場合、蛍光強度の明らかな増加は見られなかった。図 21-2 に結果を示した。

今回、FACS による四次スクリーニングにおいて、限界希釈培養により取得したどのクローンにおいても clusterin に対する結合性を見出すことが出来なかった。図 21-2 に示す 2-F-1 のクローン培養上清の結果をはじめとして、若干の結合性を示すハイブリドーマ培養上清が見られるものの、その結合は非常に弱いものと考えられる。これについて、培養上清に含まれる抗体が非常に低濃度であり、結合が観測できなかった可能性があることから、培養時間を延長して十分数のハイブリドーマの増殖を確認し、再度結合性を解析する必要があると考えられる。また、限界希釈培養によって得られたクローン数は 16 種と少ないため、

clusterin に対して強い結合性を示す抗体を産生するハイブリドーマが、限界希釈培養によって選択されたハイブリドーマから漏れてしまった可能性が高い。再び限界希釈培養を再度実施し、より多くのクローン化したハイブリドーマ培養上清について、結合性解析の検討が必要である。

以上の検討により、抗体作製を目的とした 5 種のウマタンパク質（clusterin、lipopolysaccharide binding protein、lysozyme、biliverdin reductase B、carbonic anhydrase 1）のうち、biliverdin reductase B に対して特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを得ることができた。今後は得られたハイブリドーマを拡大培養し、その培養上清から回収した抗体のアイソタイプの特異性、プロテイン A カラムによるアフィニティー精製を行い、抗体の純度確認などを実施する必要がある。

## 総括

本研究によって、ウマ血清中のタンパク質を網羅的に解析可能な質量分析法に基づく定量法を確立した。本法により 200 種以上のウマ血清タンパク質を同時に測定することが可能である。ウマの重篤な疾病の一つである腸炎を発症したウマ血清に本法を適用し、その早期及び予後診断に有用と考えられるバイオマーカー候補となる 8 種のタンパク質を同定した。8 種のタンパク質に対して、腸炎発症群内の生存及び死亡群間の濃度比較や経時的な濃度変化の観察、呼吸器疾患発症馬由来血清と量的比較を実施し、ウマ腸炎に対する早期及び予後診断などといった目的に応じた各タンパク質の有用性が示された。その一方で、各タンパク質の濃度変化には大きな個体差がみられ、単一のバイオマーカーをもってウマ腸炎の病態を把握することは困難と予測された。このことに関して、多彩な病態を示すウマ腸炎においては、これらのタンパク質を組み合わせることで測定することが、病態の把握する上で重要ではないかと考えられる。例えば、各タンパク質の濃度変化から予想される病態（溶血、細胞の壊死及び細菌感染等）を基に適切な治療法を選択すれば、ウマ腸炎の生存率を改善できる可能性がある。

これらの予測を検証するためには、サンプルサイズを拡大した検討が必要である。本研究で実施した網羅的解析は、実験にかかる時間や手間、コストの観点から多数の検体を分析することが困難であるため、多検体測定に適した測定系を構築しなければならない。そこで ELISA 法に基づく測定系の確立を目的とし、バイオマーカー候補となるタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。検討の結果、biliverdin reductase B に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができた。biliverdin reductase B は本研究の第一章において、特にウマ腸炎の死亡群において発症初期から有意に上昇しており、予後の診断にも有用なタンパク質であることを示す結果が得られている。これを立証するため、まずは得られた抗体の精製や、臨床検体を用いた抗体の特異性確認等、実用化に向けた検討を実施する必要がある。また、本抗体を用いて確立した ELISA 法に基づく測定系によ

って、より多くのウマ腸炎血清検体中の biliverdin reductase B 濃度データを収集し、これにカルテ情報に基づく臨床所見などを加味し、バイオマーカーとしての有用性を証明することを目的としたい。

## 謝辞

本研究は多くの方々のご協力のもと、行われました。

本研究の機会を充実した環境の下に与えて下さり、終始親切なご鞭撻を賜りました、  
東京大学大学院新領域創成科学研究科 山本一夫教授に、深く感謝いたします。

本研究の実施にあたり、常に有意義且つ適切なご指導、ご助言を下さいました、  
東京大学大学院新領域創成科学研究科 松本直樹准教授に、深く感謝いたします。

研究を進める上での心構えや研究に取り組む姿勢をご指導下さいました、  
東京大学大学院新領域創成科学研究科 小浪悠紀子 非常勤講師に深く感謝いたします。

プロテオーム解析結果の解釈や取りまとめの方針、特に結果の統計解析法について、適切な  
ご指導、ご助言を頂きました、東京大学大学院新領域創成科学研究科 永田晋治准教授に、  
深く感謝いたします。

実験結果の統計解析の実施にあたって、適切なご助言を頂きました、公益財団法人 競走  
馬理化学研究所 遺伝子分析部 戸崎晃明博士に、深く感謝いたします。

研究に関して有益な議論を交わし、研究をサポートして頂きました東京大学大学院新領  
域創成科学研究科 医薬デザイン工学研究室の岡田亮修士、村上果林修士に深く感謝いたし  
ます。

研究室セミナーを通し、研究に関して多大なアドバイス、ご意見を頂きました東京大学大

学院新領域創成科学研究科 医薬デザイン工学研究室の皆様にご場を借りて心から感謝いたします。

最後に、長期にわたる学生生活を支援してくださいました公益財団法人 競走馬理化学研究所、並びに研究所役職員の方々に御礼を申し上げます。



## 引用文献

1. Alexander F. Some functions of the large intestine of the horse. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* 1952;37 (4) :205-14.
2. Santos AS, Rodrigues MA, Bessa RJ, Ferreira LM, Martin-Rosset W. Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. *Animal.* 2011 Jan;5 (1) :48-56.
3. Horse digestive system.  
<https://hygain.com.au/blogs/library/horses-digestive-system>
4. Larsen J. Acute colitis in adult horses. A review with emphasis on aetiology and pathogenesis. *Vet Q.* 1997 Jun;19 (2) :72-80.
5. Uzal FA, Diab SS. Gastritis, Enteritis, and Colitis in Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2015 Aug;31 (2) :337-58.
6. Metcalf ES. The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Anim Reprod Sci.* 2001 Dec 3;68 (3-4) :229-37.
7. Wilson DA, MacFadden KE, Green EM, Crabill M, Frankeny RL, Thorne JG. Case control and historical cohort study of diarrhea associated with administration of trimethoprim-potentiated sulphonamides to horses and ponies. *J Vet Intern Med.* 1996 Jul-Aug;10 (4) :258-64.
8. Schoster A, Mosing M, Jalali M, Staempfli HR, Weese JS. Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. *Equine Vet J.* 2016 Sep;48 (5) :595-602.
9. B  verud V. Clostridium difficile infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q.* 2002 Dec;24 (4) :203-19.
10. Kelly CM. Colitis X in the horse. *N Z Vet J.* 1972 Oct;20 (10) :190-2.
11. Nomura M, Kuroda T, Tamura N, Muranaka M, Niwa H. Mortality, clinical findings, predisposing factors and treatment of Clostridioides difficile colitis in Japanese thoroughbred racehorses. *Vet Rec.* 2020 Jul 25;187 (2) :e14.

12. Whitlock RH. Colitis: differential diagnosis and treatment. *Equine Vet J*. 1986 Jul;18 (4) :278-83.
13. Nomura M, Mizobe F, Kato T, Kuroda T, Urayama S, Muranaka M. Evaluating continuous blood coagulopathy in assessing the severity of acute colitis in Thoroughbred racehorses. *J Equine Sci*. 2018 Sep;29 (3) :79-85.
14. Urayama S, Arima D, Mizobe F, Shinzaki Y, Nomura M, Minamijima Y, Kusano K. Blood glucose is unlikely to be a prognostic biomarker in acute colitis with systemic inflammatory response syndrome in Thoroughbred racehorses. *J Equine Sci*. 2018;29 (1) :15-19.
15. Shaw SD, Stämpfli H. Diagnosis and Treatment of Undifferentiated and Infectious Acute Diarrhea in the Adult Horse. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2018 Apr;34 (1) :39-53.
16. 日本衛生検査所協会 臨床検査とは ([http://www.jrcla.or.jp/atoz/wexm\\_01.html](http://www.jrcla.or.jp/atoz/wexm_01.html))
17. Bhatt AN, Mathur R, Farooque A, Verma A, Dwarakanath BS. Cancer biomarkers - current perspectives. *Indian J Med Res*. 2010 Aug;132:129-49.
18. van der Linden MA, Laffont CM, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM. Prognosis in equine medical and surgical colic. *J Vet Intern Med*. 2003 May-Jun;17 (3) :343-8.
19. Ellis CM, Lynch TM, Slone DE, Hughes FE, Clark CK. Survival and complications after large colon resection and end-to-end anastomosis for strangulating large colon volvulus in seventy-three horses. *Vet Surg*. 2008 Dec;37 (8) :786-90.
20. Reck C, Menin Á, Pisetta NL, Batista F, Miletto LC. First outbreak of autochthonous "surra" in horses in Santa Catarina State, Brazil: Parasitological, hematological and biochemical characteristics. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2020 Jul;21:100427.
21. El-Deeb W, Fayed M, Elsohaby I, Mkrtchyan HV, Alhaider A. Changes in blood biomarkers in Arabian horses with *Clostridium difficile*-induced enterocolitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2020 Aug 7;73:101525.

22. Petersen MB, Tolver A, Husted L, Tølbøll TH, Pihl TH. Repeated measurements of blood lactate concentration as a prognostic marker in horses with acute colitis evaluated with classification and regression trees (CART) and random forest analysis. *Vet J*. 2016 Jul;213:18-23.
23. Mittelman NS, Stefanovski D, Johnson AL. Utility of C-reactive protein and serum amyloid A in the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. *J Vet Intern Med*. 2018 Sep;32 (5) :1726-1730.
24. Alonso JM, Schmidt EMS, Eckersall PD, Kjølgaard-Hansen M, Alves ALG, Rodrigues CA, Watanabe MJ, Crescencio AP, Hussni CA. Inflammatory Response of Healthy Horses Subjected to Small Colon Enterotomy and Treated or Not With Heparin. *J Equine Vet Sci*. 2020 Jul;90:102989.
25. Aitken MR, Stefanovski D, Southwood LL. Serum amyloid A concentration in postoperative colic horses and its association with postoperative complications. *Vet Surg*. 2019 Feb;48 (2) :143-151.
26. Bogdanov B, Smith RD. Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. *Mass Spectrom Rev*. 2005 Mar-Apr;24 (2) :168-200.
27. Gregorich ZR, Chang YH, Ge Y. Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up? *Pflugers Arch*. 2014 Jun;466 (6) :1199-209
28. Han X, Aslanian A, Yates JR 3rd. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2008 Oct;12 (5) :483-90.
29. Gregorich ZR, Ge Y. Top-down proteomics in health and disease: challenges and opportunities. *Proteomics*. 2014 May;14 (10) :1195-210.
30. Armirotti A, Damonte G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics*. 2010 Oct;10 (20) :3566-76. doi: 10.1002/pmic.201000245. PMID: 20859958.
31. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev*. 2013 Apr 10;113 (4) :2343-94.
32. Ma44nes NP, Nita-Lazar A. Application of targeted mass spectrometry in bottom-up proteomics for systems biology research. *J Proteomics*. 2018 Oct 30;189:75-90.

33. Dupree EJ, Jayathirtha M, Yorkey H, Mihasan M, Petre BA, Darie CC. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of this Field. *Proteomes*. 2020 Jul 6;8 (3) :14.
34. Moulder R, Bhosale SD, Goodlett DR, Lahesmaa R. Analysis of the plasma proteome using iTRAQ and TMT-based Isobaric labeling. *Mass Spectrom Rev*. 2018 Sep;37 (5) :583-606.
35. Pappireddi N, Martin L, Wühr M. A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics. *Chembiochem*. 2019 May 15;20 (10) :1210-1224.
36. Abbade LPF, Ferreira RS Jr, Dos Santos LD, Barraviera B. Chronic venous ulcers: a review on treatment with fibrin sealant and prognostic advances using proteomic strategies. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020 Jun 22;26:e20190101.
37. Gouveia D, Grenga L, Pible O, Armengaud J. Quick microbial molecular phenotyping by differential shotgun proteomics. *Environ Microbiol*. 2020 Aug;22 (8) :2996-3004.
38. Li N, Zhan X. MASS SPECTROMETRY-BASED MITOCHONDRIAL PROTEOMICS IN HUMAN OVARIAN CANCERS. *Mass Spectrom Rev*. 2020 Sep;39 (5-6) :471-498.
39. Sathyan S, Ayers E, Gao T, Weiss EF, Milman S, Verghese J, Barzilai N. Plasma proteomic profile of age, health span, and all-cause mortality in older adults. *Aging Cell*. 2020 Oct 22:e13250.
40. Chiaradia E, Pepe M, Sassi P, Mohren R, Orvietani PL, Paolantoni M, Tognoloni A, Sforza M, Eveque M, Tombolesi N, Cillero-Pastor B. Comparative label-free proteomic analysis of equine osteochondrotic chondrocytes. *J Proteomics*. 2020 Sep 30;228:103927.
41. Campolo A, Frantz MW, de Laat MA, Hartson SD, Furr MO, Lacombe VA. Differential Proteomic Expression of Equine Cardiac and Lamellar Tissue During Insulin-Induced Laminitis. *Front Vet Sci*. 2020 Jun 12;7:308.
42. Bardell D, Milner PI, Goljanek-Whysall K, Peffers MJ. Differences in plasma and peritoneal fluid proteomes identifies potential biomarkers associated with survival following strangulating small

intestinal disease. *Equine Vet J*. 2019 Nov;51 (6) :727-732.

43. Jacobsen S, Top Adler DM, Bundgaard L, Sørensen MA, Andersen PH, Bendixen E. The use of liquid chromatography tandem mass spectrometry to detect proteins in saliva from horses with and without systemic inflammation. *Vet J*. 2014 Dec;202 (3) :483-8.

44. Mitulović G, Stingl C, Steinmacher I, Hudecz O, Hutchins JR, Peters JM, Mechtler K. Preventing carryover of peptides and proteins in nano LC-MS separations. *Anal Chem*. 2009 Jul 15;81 (14) :5955-60.

45. Bian Y, Zheng R, Bayer FP, Wong C, Chang YC, Meng C, Zolg DP, Reinecke M, Zecha J, Wiechmann S, Heinzlmeir S, Scherr J, Hemmer B, Baynham M, Gingras AC, Boychenko O, Kuster B. Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by micro-flow LC-MS/MS. *Nat Commun*. 2020 Jan 9;11 (1) :157.

45. Gy C, Leclere M, Vargas A, Grimes C, Lavoie JP. Investigation of blood biomarkers for the diagnosis of mild to moderate asthma in horses. *J Vet Intern Med*. 2019 Jul;33 (4) :1789-1795.

46. Turło A, Cywińska A, Czopowicz M, Witkowski L, Niedźwiedz A, Słowikowska M, Borowicz H, Jaśkiewicz A, Winnicka A. The Effect of Different Types of Musculoskeletal Injuries on Blood Concentration of Serum Amyloid A in Thoroughbred Racehorses. *PLoS One*. 2015 Oct 14;10 (10) :e0140673.

47. Erol E, Jackson C, Horohov D, Locke S, Smith J, Carter C. Elevated serum amyloid A levels in cases of aborted equine fetuses due to fetal and placental infections. *Theriogenology*. 2016 Sep 1;86 (4) :971-975.

48. Stack JD, Cousty M, Steele E, Handel I, Lechartier A, Vinardell T, David F. Comparison of Serum Amyloid A Measurements in Equine Synovial Fluid With Routine Diagnostic Methods to Detect Synovial Infection in a Clinical Environment. *Front Vet Sci*. 2019 Oct 1;6:325.

49. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific

- antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol.* 1972 Jul;109 (1) :129-35.
50. Crowther JR. ELISA. Theory and practice. *Methods Mol Biol.* 1995;42:1-218.
51. Chandramouli K, Qian PY. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics.* 2009 Dec 8;2009:239204.
52. Schlich KM, Herren AW, Selvaraj V. Analysis of differential strategies to enhance detection of low-abundance proteins in the bovine serum proteome. *Anim Sci J.* 2020 Jan-Dec;91 (1) :e13388.
53. Dowling P, Ohlendieck K. DIGE Analysis of Immunodepleted Plasma. *Methods Mol Biol.* 2018;1664:245-257.
54. Shen Z, Want EJ, Chen W, Keating W, Nussbaumer W, Moore R, Gentle TM, Siuzdak G. Sepsis plasma protein profiling with immunodepletion, three-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry, and spectrum counting. *J Proteome Res.* 2006 Nov;5 (11) :3154-60.
55. Lepczyński A, Ożgo M, Dratwa-Chałupnik A, Robak P, Pyć A, Zaborski D, Herosimczyk A. An update on medium- and low-abundant blood plasma proteome of horse. *Animal.* 2018 Jan;12 (1) :76-87.
56. Poltep K, Tesena P, Yingchutrakul Y, Taylor J, Wongtawan T. Optimisation of a serum albumin removal protocol for use in a proteomic study to identify the protein biomarkers for silent gastric ulceration in horses. *J Equine Sci.* 2018 Sep;29 (3) :53-60.
57. Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr.* 2009 May;23 (5) :480-7.
58. ASCHHEIM E, ZWEIFACH BW. Kinetics of blood protein leakage in inflammation. *Circ Res.* 1961 Mar;9:349-57.
59. Yimpring N, Roytrakul S, Jaresitthikunchai J, Phaonakrop N, Krobthong S, Suriyaphol G.

Proteomic profiles of unilateral cryptorchidism in pigs at different ages using MALDI-TOF mass spectrometry and in-gel digestion coupled with mass spectrometry (GeLC-MS/MS) approaches. *BMC Vet Res.* 2020 Oct 2;16 (1) :373.

60. Speicher KD, Kolbas O, Harper S, Speicher DW. Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies. *J Biomol Tech.* 2000 Jun;11 (2) :74-86.

61. Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res.* 2008 Feb;7 (2) :731-40.

62. Riond B, Wenger-Riggenbach B, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Serum protein concentrations from clinically healthy horses determined by agarose gel electrophoresis. *Vet Clin Pathol.* 2009 Mar;38 (1) :73-7.

63. Masuda O, Ishihama Y. 相間移動溶解剤を用いたショットガンプロテオミクス用試料調製法, *Proteome Letters.* 2016;1: 95-100.

64. Cominetti O, Núñez Galindo A, Corthésy J, Valsesia A, Irincheeva I, Kussmann M, Saris WHM, Astrup A, McPherson R, Harper ME, Dent R, Hager J, Dayon L. Obesity shows preserved plasma proteome in large independent clinical cohorts. *Sci Rep.* 2018 Nov 19;8 (1) :16981.

65. Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik YK, Yoo JS, Ping P, Pounds J, Adkins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW, Hanash SM. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics.* 2005 Aug;5 (13) :3226-45.

66. Liu K, Zhang J, Wang J, Zhao L, Peng X, Jia W, Ying W, Zhu Y, Xie H, He F, Qian X. Relationship between sample loading amount and peptide identification and its effects on quantitative proteomics. *Anal Chem*. 2009 Feb 15;81 (4) :1307-14.
66. 窪田雅之. 電場型フーリエ変換質量分析計 Orbitrap の仕組みと性能、そして LTQ Orbitrap について. *生物物理化学* 2007;51:53
67. Hodge K, Have ST, Hutton L, Lamond AI. Cleaning up the masses: exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS. *J Proteomics*. 2013 Aug 2;88:92-103.
68. Epstein KL, Brainard BM, Gomez-Ibanez SE, Lopes MA, Barton MH, Moore JN. Thrombelastography in horses with acute gastrointestinal disease. *J Vet Intern Med*. 2011 Mar-Apr;25 (2) :307-14.
69. Wu S, Li Z, Gnatenko DV, Zhang B, Zhao L, Malone LE, Markova N, Mantle TJ, Nesbitt NM, Bahou WF. BLVRB redox mutation defines heme degradation in a metabolic pathway of enhanced thrombopoiesis in humans. *Blood*. 2016 Aug 4;128 (5) :699-709.
70. Paukovich N, Xue M, Elder JR, Redzic JS, Blue A, Pike H, Miller BG, Pitts TM, Pollock DD, Hansen K, D'Alessandro A, Eisenmesser EZ. Biliverdin Reductase B Dynamics Are Coupled to Coenzyme Binding. *J Mol Biol*. 2018 Sep 14;430 (18 Pt B) :3234-3250.
71. Matic LP, Jesus Iglesias M, Vesterlund M, Lengquist M, Hong MG, Saieed S, Sanchez-Rivera L, Berg M, Razuvaev A, Kronqvist M, Lund K, Caidahl K, Gillgren P, Pontén F, Uhlén M, Schwenk JM, Hansson GK, Paulsson-Berne G, Fagman E, Roy J, Hultgren R, Bergström G, Lehtiö J, Odeberg J, Hedin U. Novel Multiomics Profiling of Human Carotid Atherosclerotic Plaques and Plasma Reveals Biliverdin Reductase B as a Marker of Intraplaque Hemorrhage. *JACC Basic Transl Sci*. 2018 Aug 1;3 (4) :464-480.
72. Mollan TL, Yu X, Weiss MJ, Olson JS. The role of alpha-hemoglobin stabilizing protein in redox chemistry, denaturation, and hemoglobin assembly. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Feb;12 (2) :219-31.



73. Taylor S. A review of equine sepsis. *Equine Vet Educ.* 2015 Feb;27 (2) :99-109.
74. Kyaw WO, Uhlig A, Köller G, Sack U, Schusser GF. Freies Hämoglobin und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha im Blut von Pferden mit Kolik oder akuter Kolitis Free hemoglobin and tumor necrosis factor-alpha in the blood of horses with colic or acute colitis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2008 Nov-Dec;121 (11-12) :440-5.
75. White MR, Garcin ED. D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Structure and Function. *Subcell Biochem.* 2017;83:413-453.
76. Lindskog S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther.* 1997;74 (1) :1-20.
77. Rhee SG. Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells.* 2016 Jan;39 (1) :1-5.
78. Garcia-Aranda M, Serrano A, Redondo M. Regulation of Clusterin Gene Expression. *Curr Protein Pept Sci.* 2018;19 (6) :612-622.
79. Wilson MR, Zoubeidi A. Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 2017 Feb;21 (2) :201-213.
80. Vaiopoulou A, Gazouli M, Papadopoulou A, Anagnostopoulos AK, Karamanolis G, Theodoropoulos GE, M'Koma A, Tsangaris GT. Serum protein profiling of adults and children with Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015 Jan;60 (1) :42-7.
81. Gazouli M, Anagnostopoulos AK, Papadopoulou A, Vaiopoulou A, Papamichael K, Mantzaris G, Theodoropoulos GE, Anagnou NP, Tsangaris GT. Serum protein profile of Crohn's disease treated with infliximab. *J Crohns Colitis.* 2013 Nov;7 (10) :e461-70.
82. Stasi A, Intini A, Divella C, Franzin R, Montemurno E, Grandaliano G, Ronco C, Fiaccadori E, Pertosa GB, Gesualdo L, Castellano G. Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Jan 1;32 (1) :24-31.
83. Vandenplas ML, Moore JN, Barton MH, Roussel AJ, Cohen ND. Concentrations of serum amyloid

- A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. *Am J Vet Res*. 2005 Sep;66 (9) :1509-16.
84. Pellegrini A, Waiblinger S, Von Fellenberg R. Purification of equine neutrophil lysozyme and its antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Vet Res Commun*. 1991;15 (6) :427-35.
85. Bruhn O, Grötzinger J, Cascorbi I, Jung S. Antimicrobial peptides and proteins of the horse--insights into a well-armed organism. *Vet Res*. 2011 Sep 2;42 (1) :98.
86. Reitamo S, Klockars M, Adinolfi M, Osserman EF. Human lysozyme (origin and distribution in health and disease) . *Ric Clin Lab*. 1978 Oct-Dec;8 (4) :211-31.
87. Westerman TL, Tornquist SJ, Foster CM, Poulsen KP. Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with inflammatory disease examined at a tertiary care hospital. *Am J Vet Res*. 2015 Oct;76 (10) :882-8.
88. Neubauer O, König D, Wagner KH. Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. *Eur J Appl Physiol*. 2008 Oct;104 (3) :417-26.
89. Wakshlag JJ, Stokol T, Geske SM, Greger CE, Angle CT, Gillette RL. Evaluation of exercise-induced changes in concentrations of C-reactive protein and serum biochemical values in sled dogs completing a long-distance endurance race. *Am J Vet Res*. 2010 Oct;71 (10) :1207-13.
90. Husebekk A, Husby G, Sletten K, Marhaug G, Nordstoga K. Characterization of amyloid protein AA and its serum precursor SAA in the horse. *Scand J Immunol*. 1986 Jun;23 (6) :703-9.
91. Hultén C, Sletten K, Foyn Bruun C, Marhaug G. The acute phase serum amyloid A protein (SAA) in the horse: isolation and characterization of three isoforms. *Vet Immunol Immunopathol*. 1997 Jul;57 (3-4) :215-27.
92. Souto PC, Fonseca LAD, Orozco AMO, Lopez CJR, Ermita PAN, Carvalho Filho WP, Girardi FM. Acute-Phase Proteins of Healthy Horses and Horses Naturally Affected by Colic Syndrome. *J Equine*

*Vet Sci.* 2019 Sep;80:1-4.

93. Dondi F, Lukacs RM, Gentilini F, Rinnovati R, Spadari A, Romagnoli N. Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: Association with common clinicopathological variables and short-term outcome. *Vet J.* 2015 Jul;205 (1) :50-5.
94. Aitken MR, Stefanovski D, Southwood LL. Serum amyloid A concentration in postoperative colic horses and its association with postoperative complications. *Vet Surg.* 2019 Feb;48 (2) :143-151.
95. Bardell D, Milner PI, Goljanek-Whysall K, Peffers MJ. Differences in plasma and peritoneal fluid proteomes identifies potential biomarkers associated with survival following strangulating small intestinal disease. *Equine Vet J.* 2019 Nov;51 (6) :727-732.
96. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Acute phase proteins in racehorses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 2015 May-Jun;29 (3) :940-5.
97. Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Lemos K, Wagner B, Lavoie JP. Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *J Vet Intern Med.* 2012 Nov-Dec;26 (6) :1419-26.
98. Lee JY, Hall JA, Kroehling L, Wu L, Najar T, Nguyen HH, Lin WY, Yeung ST, Silva HM, Li D, Hine A, Loke P, Hudesman D, Martin JC, Kenigsberg E, Merad M, Khanna KM, Littman DR. Serum Amyloid A Proteins Induce Pathogenic Th17 Cells and Promote Inflammatory Disease. *Cell.* 2020 Jan 9;180 (1) :79-91.e16.
99. Gao Y, Huang X, Zhu Y, Lv Z. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. *J Immunoassay Immunochem.* 2018;39 (4) :351-364.
100. Eckert JK, Kim YJ, Kim JI, Gürtler K, Oh DY, Sur S, Lundvall L, Hamann L, van der Ploeg A, Pickkers P, Giamarellos-Bourboulis E, Kubarenko AV, Weber AN, Kabesch M, Kumpf O, An HJ, Lee JO, Schumann RR. The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity.* 2013 Oct 17;39 (4) :647-60.
101. Posner J, Barrington P, Brier T, Datta-Mannan A. Monoclonal Antibodies: Past, Present and

Future. *Handb Exp Pharmacol*. 2019;260:81-141.

102. Parray HA, Shukla S, Samal S, Shrivastava T, Ahmed S, Sharma C, Kumar R. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int Immunopharmacol*. 2020 Aug;85:106639.

表 1-1. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2I2E9	Serum albumin	ALB	86	85	85
F6RI47	Alpha-2-macroglobulin	A2M	67	91	60
A0A5F5PRC5	Serotransferrin	TF	77	56	51
A0A3Q2HWQ6	Uncharacterized protein	LOC100060505	65	87	74
F6Z2L5	Apolipoprotein A1	APOA1	82	36	36
H9GZT5	Uncharacterized protein	ND	39	22	4
A0A3Q2HRX3	Apolipoprotein B	APOB	25	67	63
F7CS60	Fibronectin	FN1	34	49	49
F6PQ46	Ceruloplasmin	CP	45	38	38
F6VJR6	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	58	22	22
F7CSL8	SERPIN domain-containing protein	LOC100065068	52	23	10
F6T0P6	GC vitamin D binding protein	GC	76	29	29
A0A5F5PLA4	Uncharacterized protein	ND	44	19	2
A0A3Q2IDD2	Uncharacterized protein	CFB	46	32	32
F6QX36	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 1	ITIH1	50	31	31
Q95M34	Immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region (Fragment)	IGHC1	64	18	15
H9GZQ9	Uncharacterized protein	ND	48	15	8
F7BFJ1	Prothrombin	F2	53	29	29

表 1-2. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シークエンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
H9GZU8	Uncharacterized protein	ND	46	15	8
H9GZN9	Uncharacterized protein	ND	45	20	20
B5BV09	Alpha-1-antitrypsin	Spi2-10	49	18	4
B5BV12	Alpha-1-antitrypsin	Spi2-13	36	13	5
F7CYR1	Serpin family C member 1	SERPINC1	63	24	24
A0A5F5PZ87	Uncharacterized protein	LOC100065068	43	15	2
B5BV04	Alpha-1-antitrypsin	Spi2-5	40	16	5
F6XWM5	Haptoglobin G	LOC100067869	56	17	17
F6USP9	Plasminogen G	PLG	45	28	28
F6REX3	Uncharacterized protein	LOC100061763	35	30	30
A0A3Q2H3F6	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4	ITIH4	41	26	26
A0A3Q2H1L4	Gelsolin	GSN	42	20	20
F6W4R2	Angiotensinogen	AGT	63	20	20
F7BTW7	Uncharacterized protein	LOC100060539	58	18	6
H9GZV1	Uncharacterized protein	ND	47	15	15
F6UL68	Transthyretin	TTR	63	12	12
F7DAF6	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	ITIH2	30	18	18
F7C450	Alpha 2-HS glycoprotein	AHSG	43	12	12
F6ZI35	Histidine rich glycoprotein	HRG	38	16	16

表 1-3. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F7CZW9	Serpin family G member 1	SERPING1	31	11	11
F6ZQ77	Uncharacterized protein	CFH	35	28	20
F6PKE1	Serotransferrin	TF	40	19	15
F6X1I8	Hemopexin	HPX	54	20	20
F6RM73	Apolipoprotein A-II	APOA2	55	6	6
F7C0D9	Kininogen 1	KNG1	39	14	14
A0A5F5Q393	Uncharacterized protein	ND	38	10	9
F6Z041	Apolipoprotein H	APOH	41	12	12
A0A5F5PEG5	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	AMBP	45	13	13
A0A0A1E487	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	35	5	2
F7A692	Complement C5	C5	20	17	17
A0A3Q2H1D2	Ig-like domain-containing protein	G-CONTAINING	35	7	7
A0A3Q2H875	Hemoglobin subunit alpha	HBA	82	8	8
A0A5F5PGW4	Uncharacterized protein	ND	42	10	5
A0A3Q2IDC4	Carboxylic ester hydrolase	LOC100050840	9	3	2
F6QFD9	Carboxypeptidase N subunit 2	CPN2	26	12	12
F7DTV1	Paraoxonase 1	PON1	44	9	9
F7B3I5	Afamin	AFM	36	16	16
A0A1K0FUE2	Globin A1	GLNA1	77	8	8

表 1-4. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2L3I3	Clusterin	CLU	35	11	11
F6PUW3	Maltase-glucoamylase	MGAM	12	14	14
F6UFT2	Complement component C9	C9	21	7	7
A0A3Q2HVB6	Uncharacterized protein	C4BPA	25	12	12
F7A1W7	Apolipoprotein C2	APOC2	37	3	3
F7BM31	Serpin family D member 1	SERPIND1	24	9	9
A0A0A1E4E7	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	30	6	2
F7APU2	Uncharacterized protein	CFI	21	9	9
F6ZRH8	Uncharacterized protein	ND	18	12	4
A0A3Q2I0V8	Apolipoprotein C-III	APOC3	30	4	4
A0A5F5PXB8	Uncharacterized protein	ND	22	6	6
G5CW75	Apolipoprotein B (Fragment)	ApoB	31	8	4
F6V881	Vitronectin	VTN	11	4	4
F7DRS2	Serpin family A member 6	SERPINA6	18	6	6
A0A5F5PEE6	Apolipoprotein A4	APOA4	27	10	10
A0A3Q2I8Y6	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	AZGP1	32	8	8
F7DGR1	Coagulation factor XII	F12	23	8	8
F7BKE1	Serpin family F member 1	SERPINF1	23	6	6
F6ZLR1	Serpin family A member 3	SERPINA3	12	3	3



表 1-5. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A5F5PWY1	Fetuin B	FETUB	30	8	8
A0A5F5PQS3	Complement C8 alpha chain	C8A	20	8	8
A0A3Q2I427	Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1	LRG1	30	7	7
F7BQD6	Complement C1s	C1S	19	7	7
A0A3Q2HC10	CD5 molecule like	CD5L	16	5	5
F7BUV8	Adiponectin A	C1QB	25	5	5
F6Z5L1	Complement C1r	C1R	25	8	8
A0A5F5PW18	Serpin family F member 2	SERPINF2	23	5	5
F6QYS3	Extracellular matrix protein 1	ECM1	25	6	6
A0A3Q2HDF1	Retinol-binding protein 4	RBP4	10	2	2
A0A3Q2HR98	Ig-like domain-containing protein	G-CONTAINING	45	2	2
A0A3Q2HW24	Joining chain of multimeric IgA and IgM	JCHAIN	22	5	5
A0A3Q2I4S4	Complement C7	C7	10	6	6
A0A5F5Q4D2	Serpin family A member 10	SERPINA10	13	4	4
A0A5F5PUU0	Uncharacterized protein	ND	46	4	3
F7AE68	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3	ITIH3	7	2	2
F6QDQ1	Peptidoglycan recognition protein 2	PGLYRP2	20	3	3
A0A5F5PLA5	Amine oxidase copper containing 3	AOC3	8	4	4
A0A3Q2HNN0	Microfibril associated protein 4	MFAP4	16	2	2

表 1-6. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シークエンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F6VZ73	Hyaluronan binding protein 2	HABP2	5	2	2
A0A3Q2KUV4	Phospholipase A2 group VII	PLA2G7	6	2	2
F6TDH5	Coagulation factor X	F10	5	2	2
F6SIE2	Intercellular adhesion molecule 3	ICAM3	5	2	2
A0A3Q2GT53	C-type lectin domain family 3 member B	CLEC3B	13	2	2
F6YWC0	Uncharacterized protein	LOC106783161	8	2	2
A0A5F5PST7	Uncharacterized protein	GPX3	6	2	2
A0A3Q2LG05	Glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	GPLD1	6	2	2

ND : not determined

表 2. serum albumin のキャリーオーバーの評価

		ウマ 1	ウマ 2	ウマ 3
signal intensity (serum albumin)	洗浄前	1.078E+11	1.108E+11	1.046E+11
	洗浄後	2.297E+09	2.133E+09	5.454E+08
	洗浄後/洗浄前 (%)	2.131%	1.925%	0.521%

表 3. serotransferrin、apolipoprotein C2 及び CD14 の signal intensity の繰り返し再現性 (n=3)

	CV (%)		
	Horse 1	Horse 2	Horse 3
serotransferrin	6.24	6.93	12.4
apolipoprotein C2	7.86	12.3	17.3
CD14	15.3	19.3	9.75

表 4. トリプシン処理時間によるタンパク質同定数比較 (n=3)

	トリプシン加水分解時間		
	6 時間	12 時間	18 時間
タンパク質同定数	178 ± 9.9	190 ± 13	194 ± 22

表 5. LC グラジエント時間によるタンパク質同定数比較 (n=3)

	LC グラジエント時間				
	15 分間	30 分間	60 分間	120 分間	180 分間
タンパク質同定数	144 ± 3.3	158 ± 14	188 ± 13	187 ± 12	193 ± 19

表 6. AGC target によるタンパク質同定数比較

		AGC target (dd-MS <sup>2</sup> )				
		50,000	100,000	200,000	300,000	500,000
AGC target (Full MS)	50,000	131	148	141	181	162
	100,000	129	167	138	174	153
	200,000	145	173	158	157	164
	300,000	164	190	182	188	134
	500,000	183	184	182	143	112

表 7. Dynamic exclusion によるタンパク質同定数比較 (n=3)

		Dynamic exclusion				
		2 秒	5 秒	10 秒	20 秒	50 秒
タンパク質同定数		150 ± 8.1	180 ± 9.1	185 ± 1.0	177 ± 8.7	176 ± 3.1

表 8-1. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2I2E9	Serum albumin	ALB	90	111	106
F6RI47	Alpha-2-macroglobulin	A2M	74	114	76
A0A3Q2HWQ6	Uncharacterized protein	LOC100060505	76	118	101
A0A5F5PRC5	Serotransferrin	TF	82	72	64
A0A3Q2HRX3	Apolipoprotein B	APOB	47	151	123
F6XSF7	Uncharacterized protein	LOC100059239	70	78	78
F7CS60	Fibronectin	FN1	53	85	85
A0A5F5PU06	Alpha-2-macroglobulin	A2M	53	65	27
F6PQ46	Ceruloplasmin	CP	57	54	54
F6Z2L5	Apolipoprotein A1	APOA1	89	48	48
F6T0P6	GC vitamin D binding protein	GC	82	36	36
F6REX3	Uncharacterized protein	LOC100061763	57	57	57
F7BFJ1	Prothrombin	F2	56	35	35
F6QX36	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 1	ITIH1	51	39	39
A0A3Q2IDD2	Uncharacterized protein	CFB	53	39	39
H9GZT5	Uncharacterized protein	ND	42	27	5
F6VJR6	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	59	24	24
F6USP9	Plasminogen	PLG	69	45	45
F7CYR1	Serpin family C member 1	SERPINC1	70	31	31

表 8-2. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F6UL68	Transthyretin	TTR	63	23	12
F6ZI35	Histidine rich glycoprotein	HRG	57	28	25
A0A5F5Q393	Uncharacterized protein	ND	55	33	16
A0A3Q2L3I3	Clusterin	CLU	51	25	23
F7C450	Alpha 2-HS glycoprotein	AHSG	45	26	14
F7B3I5	Afamin	AFM	44	31	25
F6PUW3	Maltase-glucoamylase	MGAM	28	36	34
A0A3Q2HVB6	Uncharacterized protein	C4BPA	33	18	18
A0A5F5PEG5	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	AMBP	48	23	19
F6Z041	Apolipoprotein H	APOH	48	26	15
A0A1K0FUE2	Globin A1	GLNA1	90	25	14
F6RZ27	Apolipoprotein A4	APOA4	60	34	27
A0A5F5PW18	Serpin family F member 2	SERPINF2	47	18	14
A0A3Q2I8Y6	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	AZGP1	50	19	16
F7APU2	Uncharacterized protein	CFI	36	20	17
F7DGR1	Coagulation factor XII	F12	39	19	16
F7BQD6	Complement C1s	C1S	43	27	20
A0A5F5PGW4	Uncharacterized protein	ND	48	14	7
F6ZV64	Desmoplakin	DSP	13	30	26

表 8-3. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F6UL68	Transthyretin	TTR	63	23	12
F6ZI35	Histidine rich glycoprotein	HRG	57	28	25
A0A5F5Q393	Uncharacterized protein	ND	55	33	16
A0A3Q2L3I3	Clusterin	CLU	51	25	23
F7C450	Alpha 2-HS glycoprotein	AHSG	45	26	14
F7B3I5	Afamin	AFM	44	31	25
F6PUW3	Maltase-glucoamylase	MGAM	28	36	34
A0A3Q2HVB6	Uncharacterized protein	C4BPA	33	18	18
A0A5F5PEG5	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	AMBP	48	23	19
F6Z041	Apolipoprotein H	APOH	48	26	15
A0A1K0FUE2	Globin A1	GLNA1	90	25	14
F6RZ27	Apolipoprotein A4	APOA4	60	34	27
A0A5F5PW18	Serpin family F member 2	SERPINF2	47	18	14
A0A3Q2I8Y6	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	AZGP1	50	19	16
F7APU2	Uncharacterized protein	CFI	36	20	17
F7DGR1	Coagulation factor XII	F12	39	19	16
F7BQD6	Complement C1s	C1S	43	27	20
A0A5F5PGW4	Uncharacterized protein	ND	48	14	7
F6ZV64	Desmoplakin	DSP	13	30	26

表 8-4. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F6ZRH8	Uncharacterized protein	ND	24	17	6
F7BM31	Serpin family D member 1	SERPIND1	46	27	20
F7DTV1	Paraoxonase 1	PON1	52	17	14
F6WDW3	IF rod domain-containing protein	KRT10A	20	16	11
A0A3Q2H875	Hemoglobin subunit alpha	HBA	84	20	10
F6QFD9	Carboxypeptidase N subunit 2	CPN2	35	18	14
G5CW75	Apolipoprotein B (Fragment)	ApoB	54	26	5
F6UFT2	Complement component C9	C9	34	16	14
F6RM73	Apolipoprotein A-II	APOA2	66	20	9
F7DU87	BPI fold containing family A member 2	BPIFA2	73	14	2
A0A3Q2I4S4	Complement C7	C7	26	19	14
F6VBP9	Apolipoprotein E	APOE	45	13	12
A0A3Q2HC10	CD5 molecule like	CD5L	27	10	10
A0A3Q2LCW0	Uncharacterized protein	KRT6C	23	14	6
A0A3Q2I0V8	Apolipoprotein C-III	APOC3	50	17	7
F7BKE1	Serpin family F member 1	SERPINF1	47	14	12
A0A0A1E6P5	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	44	9	2
F6QYS3	Extracellular matrix protein 1	ECM1	41	17	13
F6Z5L1	Complement C1r	C1R	36	16	13



表 8-5. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A5F5PQS3	Complement C8 alpha chain	C8A	25	14	10
A0A3Q2HTG2	Fibrinogen alpha chain	FGA	21	12	11
F7DRS2	Serpin family A member 6	SERPINA6	26	8	8
A0A5F5Q4D2	Serpin family A member 10	SERPINA10	36	11	11
F7DZ01	Coagulation factor V	F5	12	19	17
A0A5F5PZX4	Attractin	ATRN	12	15	14
A0A3Q2I427	Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1	LRG1	36	10	9
F6PPQ0	Complement C2	C2	34	18	15
F6RRV1	Fetuin B	FETUB	39	16	13
F6ZLR1	Serpin family A member 3	SERPINA3	19	8	7
A0A3Q2LBE4	Insulin like growth factor binding protein acid labile subunit	IGFALS	27	10	9
A0A3Q2I6F9	IF rod domain-containing protein	KRT6C	23	9	6
A0A5F5PXB8	Uncharacterized protein	ND	27	9	8
A0A3Q2GT53	C-type lectin domain family 3 member B	CLEC3B	28	13	8
A0A3Q2LBD1	Complement C8 beta chain	C8B	28	13	10
A0A3Q2IDC4	Carboxylic ester hydrolase	LOC100050840	9	10	2
F6SHJ8	IF rod domain-containing protein	KRT2	12	11	4
F7A1W7	Apolipoprotein C2	APOC2	45	8	4
A0A5F5PLV2	Carboxypeptidase B2	CPB2	33	13	12

表 8-6. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F7BUV8	Adiponectin A	C1QB	27	10	6
F6V881	Vitronectin	VTN	19	11	6
A2Q0Z2	Lumican	LUM	25	17	8
F6S8W6	Keratin 75	KRT75	13	10	2
A0A5F5Q220	Junction plakoglobin	JUP	19	12	12
A0A5F5PUU0	Uncharacterized protein	ND	55	14	4
A0A3Q2HDF1	Retinol-binding protein 4	RBP4	21	6	6
F7A5E3	Actin gamma 1	ACTG1	37	9	6
A0A3Q2HI93	Phospholipid transfer protein	PLTP	24	15	7
F7AE68	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3	ITIH3	17	13	7
F7DBT2	Complement C1q C chain	C1QC	24	9	6
F7ATL5	Keratin 13	KRT13	19	7	7
F7CVH6	Plakophilin 1	PKP1	11	7	6
A0A5F5Q2J1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1	31	8	8
A0A3Q2HW24	Joining chain of multimeric IgA and IgM	JCHAIN	34	9	8
F6TDH5	Coagulation factor X	F10	22	8	7
F6Y0C1	Complement C8 gamma chain	C8G	47	8	6
F6Z129	Vanin 1	VNN1	16	8	4
F6VZ73	Hyaluronan binding protein 2	HABP2	19	14	8

表 8-7. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3B0ITS7	Adiponectin C	ADIC	23	8	3
A0A3Q2GXX5	Fibulin-1	FBLN1	15	8	2
F7AWQ9	Interleukin 1 receptor accessory protein	IL1RAP	17	13	9
F6QDQ1	Peptidoglycan recognition protein 2	PGLYRP2	26	8	5
A0A5F5PI45	Uncharacterized protein	LOC100059994	10	8	2
A0A061DBP6	von Willebrand factor	VWF	4	7	6
A0A3Q2LAH2	Multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1	MINPP1	27	8	6
B3IVM0	Pyruvate kinase	PKM	29	15	10
F7C6S0	Matrix metalloproteinase 19	MMP19	24	6	6
A0A3Q2L2R4	Lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein	LOC100051562	26	8	3
A0A5F5PYS7	Keratin 1	KRT1	7	8	2
F6PZG1	Pentaxin	CRP	41	10	6
A0A3Q2H075	Vitamin K-dependent protein C	PROC	14	7	6
F6XM13	Apolipoprotein D	APOD	31	5	5
A0A3Q2H8G8	Carboxylic ester hydrolase	LOC100050764	9	3	2
F7DZE7	Adiponectin D	ADIPOQ	13	8	3
F6UEG9	Apolipoprotein M	APOM	30	10	4
A0A5F5Q0H5	Lymphocyte cytosolic protein 1	LCPI	15	7	6
A0A3Q2LFB3	Actin alpha cardiac muscle 1	ACTC1	30	7	2

表 8-8. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A5F5PST7	Uncharacterized protein	GPX3	32	7	6
A0A5F5Q0B3	Eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	10	7	6
A0A5F5PGY6	Complement C6 GN=C6	C6	10	7	5
O97677	Transferrin (Fragment)	TF	57	12	2
F6PR90	Kallikrein B1	KLKB1	12	6	6
A0A5F5Q197	Uncharacterized protein	ND	21	6	2
F6RMK1	C-X-C motif chemokine	LOC100630489	33	8	4
A0A3Q2HAN3	Protein S	PROS1	7	7	7
F6PVG3	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1	EFEMP1	14	10	5
F6RFT9	Coagulation factor IX	F9	16	12	5
F6YWC0	Uncharacterized protein	LOC106783161	23	7	6
F6YR34	Thrombospondin 1	THBS1	8	6	6
F6WZA8	Carboxypeptidase N subunit 1	CPN1	16	12	4
F6VB94	Transforming growth factor beta induced	TGFB1	10	7	4
A0A3Q2HCW6	Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	LOC100069029	8	6	2
A0A3Q2LPE6	Annexin	ANXA2	14	7	3
F6YXS1	Colony stimulating factor 1 receptor	CSF1R	5	7	3
A0A3Q2LG05	Glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	GPLD1	10	6	5
A0A3Q2GYK6	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	YWHAZ	21	10	4

表 8-9. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2KUV4	Phospholipase A2 group VII	PLA2G7	11	4	4
F7C7J6	Coagulation factor XIII B chain	F13B	11	6	6
F6SP74	Complement factor properdin	CFP	11	8	3
A0A3Q2I5T2	Cystatin C	CST3	46	8	3
F6Y2H3	Peptidase D	PEPD	11	4	3
F6ZPQ6	Serum amyloid A protein	SAA1	46	7	5
F7CC84	Carboxylic ester hydrolase	BCHE	9	6	3
F6RGN2	Fatty acid binding protein 5	FABP5	26	4	2
A0A3Q2HNN0	Microfibril associated protein 4	MFAP4	16	8	2
F7CI62	Mannose binding lectin 2	MBL2	13	4	3
A0A3Q2LBP6	Peptidase S1 domain-containing protein	CFD	13	7	3
A0A5F5PFW3	Transferrin receptor protein 1	TFRC	4	6	3
A0A3Q2I3K2	Keratin 20	KRT20	3	9	2
A0A5F5Q1G3	Heparan sulfate proteoglycan 2	HSPG2	1	5	2
A0A3Q2I2D6	Neural EGFL like 2	NELL2	4	6	3
F6SIE2	Intercellular adhesion molecule 3	ICAM3	5	6	2
A0A3Q2HCA6	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	6	6	3
A0A3Q2HN78	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA	14	10	3

表 8-10. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F7C0D2	Lipopolysaccharide binding protein	LBP	11	6	3
A0A5F5PQA2	Uncharacterized protein	APOC4	35	3	3
A0A5F5PZ33	Uncharacterized protein	ND	6	4	2
A0A3Q2HQ85	Glycoprotein Ib platelet subunit alpha	GP1BA	11	6	2
F7BHV8	Tubulin beta chain	TUBB4A	9	6	3
A0A3Q2I1X0	Vanin 1	VNN1	7	5	2
F6VK89	CD14 molecule	CD14	6	3	2
A0A3Q2I0F0	Dihydropyrimidinase	DPYS	7	3	3
F7ANC9	Tubulin alpha chain	TUBA1C	7	3	3
F7C349	Pentaxin	APCS	10	4	2
A0A3Q2HYR4	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	ENPP2	5	6	2
A0A5F5PPB8	Fibrinogen gamma chain	FGG	6	8	2
A0A3Q2LEZ9	Mannan binding lectin serine peptidase 1	MASP1	4	6	2
F6SR87	Protein Z, vitamin K dependent plasma glycoprotein	PROZ	5	5	2
F6YQM5	Prosaposin	PSAP	8	4	2
F7E0P3	Thrombospondin 4	THBS4	4	6	2
A0A3Q2HID2	Coagulation factor XIII A chain	F13A1	4	5	2
A0A3Q2I8H8	Galectin 3 binding protein	LGALS3BP	6	6	2
F7AWX3	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	RACK1	9	3	2

表 8-11. 健常馬 3 頭から採取した血清より同定されたタンパク質（分析法最適化後）

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シークエンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F7D917	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD	6	2	2

ND: not determined

表 9. 最適化後の分析法における serotransferrin、apolipoprotein C2 及び CD14 定量値の繰り返し再現性（n=3）

	CV (%)		
	ウマ 1	ウマ 2	ウマ 3
serotransferrin	5.31	7.44	9.90
apolipoprotein C2	8.89	9.3	15.7
CD14	16.7	18.1	13.2

表 10. 健常馬、腸炎発症馬及び呼吸器疾患発症馬の性別及び年齢

	健常馬	腸炎発症馬	呼吸器疾患発症馬
頭数（牝の頭数）	36(18)	12(8)	12(5)
年齢	3(2-10)	3(2-5)	2(2-5)

年齢は中央値を示し、括弧内は範囲を示す

表 11-1. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2I2E9	Serum albumin	ALB	91	116	111
F6RI47	Alpha-2-macroglobulin	A2M	77	132	86
A0A3Q2HWQ6	Uncharacterized protein	LOC1000650505	84	147	128
A0A3Q2HRX3	Apolipoprotein B	APOB	49	162	133
A0A5F5PRC5	Serotransferrin	TF	83	86	78
F7CN11	Fibronectin	FN1	59	101	101
F6XSF7	Uncharacterized protein	LOC100059239	71	89	89
A0A3Q2HTG2	Fibrinogen alpha chain	FGA	62	72	72
F6PH38	Fibrinogen beta chain	FGB	85	61	61
A0A5F5PU06	Alpha-2-macroglobulin	A2M	58	75	29
F6PQ46	Ceruloplasmin	CP	64	63	63
F6T0P6	GC vitamin D binding protein	GC	85	45	45
F6Z2L5	Apolipoprotein A1	APOA1	91	56	56
F6ZQ77	Uncharacterized protein	CFH	66	57	43
A0A3Q2H3F6	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4	ITIH4	59	56	5
A0A3Q2IDD2	Uncharacterized protein	CFB	60	52	52
F6USP9	Plasminogen	PLG	72	59	59
F6REX3	Uncharacterized protein	LOC100061763	58	59	59
H9GZT5	Uncharacterized protein	ND	42	32	9



表 11-2. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F7BFJ1	Prothrombin	F2	57	38	38
F6QX36	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 1	ITIH1	56	43	43
F7CYR1	Serpin family C member 1	SERPINC1	72	37	37
F6VJR6	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	61	26	26
F7DAF6	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	ITIH2	46	37	37
A0A5F5PPB8	Fibrinogen gamma chain	FGG FGGSV	72	39	39
F7BTW7	Uncharacterized protein	LOC100060539	82	37	19
F6XWM5	Haptoglobin	LOC100067869	66	31	31
F6X1I8	Hemopexin	HPX	72	35	35
F7CSL8	SERPIN domain-containing protein	LOC100065068	63	33	13
F6W4R2	Angiotensinogen	AGT	75	28	28
A0A1K0FUE2	Globin A1	GNA1LN	90	25	24
F7DXM5	SERPIN domain-containing protein	LOC100065068	54	28	2
Q95M34	Immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region (Fragment)	IGHC1	69	25	3
B5BV09	Alpha-1-antitrypsin	Spi2-10	60	26	4
H9GZQ9	Uncharacterized protein	ND	49	17	10
F7A692	Complement C5	C5	53	56	56
A0A5F5PLA4	Uncharacterized protein	ND	56	27	5
A0A3Q2H1L4	Gelsolin	GSN	51	29	29

表 11-3. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F7CZW9	Serpin family G member 1	SERPING1	43	25	25
A0A5F5PT94	Uncharacterized protein	ND	47	24	2
H9GZV1	Uncharacterized protein	ND	71	24	24
B5BV12	Alpha-1-antitrypsin	Spi2-13	48	22	10
A0A3Q2L3I3	Clusterin	CLU	54	27	27
F6PKE1	Serotransferrin	TF	76	43	39
H9GZN9	Uncharacterized protein	ND	55	28	28
H9GZU8	Uncharacterized protein	ND	49	20	13
B5BV02	Alpha-1-antitrypsin	Spi2-3	51	26	2
A0A5F5PW18	Serpin family F member 2	SERPINF2	63	20	20
F7BQD6	Complement C1s	C1S	56	30	30
A0A3Q2H875	Hemoglobin subunit alpha	HBA	85	13	9
F6ZI35	Histidine rich glycoprotein	HRG	59	28	28
A0A3Q2HVB6	Uncharacterized protein	C4BPA	51	27	27
F7B3I5	Afamin	AFM	60	30	30
A0A3Q2I8Y6	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	AZGP1	58	24	24
F6UL68	Transthyretin	TTR	74	13	13
F7C450	Alpha 2-HS glycoprotein	AHSG	46	16	16
A0A5F5Q393	Uncharacterized protein	ND	57	21	19

表 11-4. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F6RZ27	Apolipoprotein A4	APOA4	63	34	34
F6PUW3	Maltase-glucoamylase	MGAM	30	37	37
F6Z041	Apolipoprotein H	APOH	50	17	17
F6ZRH8	Uncharacterized protein	ND	34	22	8
A0A5F5PEG5	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	AMBP97	56	21	21
F6UFT2	Complement component C9	C9	39	19	19
A0A5F5PGW4	Uncharacterized protein	ND	61	15	10
F7C0D9	Kininogen 1	KNG1	51	21	2
F7APU2	Uncharacterized protein	CFI	39	22	22
F6Z5L1	Complement C1r	C1R	52	27	26
Q2Z1P9	Anion exchange protein	SLC4A1	36	25	25
F7AE68	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3	ITIH3	34	21	21
F7DGR1	Coagulation factor XII	F12	39	16	16
F6ZLR1	Serpin family A member 3	SERPINA3	37	15	15
F7DZ01	Coagulation factor V	F5	19	28	28
F7BM31	Serpin family D member 1	SERPIND1	52	22	22
F7C0D2	Lipopolysaccharide binding protein	LBP	41	19	19
A0A5F5Q4D2	Serpin family A member 10	SERPINA10	44	15	15
F7DTV1	Paraoxonase 1	PON1	63	16	16

表 11-5. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F6VBP9	Apolipoprotein E	APOE	45	13	13
F7BKE1	Serpin family F member 1	SERPINF1	54	16	16
F6RM73	Apolipoprotein A-II	APOA2	77	13	13
A0A3Q2HWY9	Uncharacterized protein	SAA	59	11	2
F6QFD9	Carboxypeptidase N subunit 2	CPN2	35	14	14
A0A3Q2H1D2	Ig-like domain-containing protein	IGL	32	6	6
F6ZV64	Desmoplakin	DSP	13	24	24
F6T3Y8	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	64	17	2
A0A3Q2I427	Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1	LRG1	46	14	14
F7AAK7	Actin gamma 1	ACTG1	65	17	2
G5CW75	Apolipoprotein B (Fragment)	ApoB	55	18	6
A0A3Q2I4S4	Complement C7	C7	29	17	17
A0A5F5PQS3	Complement C8 alpha chain	C8A	37	15	15
A0A3Q2LBE4	Insulin like growth factor binding protein acid labile subunit	IGFALS	35	12	12
F7DU87	BPI fold containing family A member 2	BPIFA2	79	18	2
A0A3Q2I0V8	Apolipoprotein C-III	APOC3	50	7	7
F6WDW3	IF rod domain-containing protein	KRT10A	20	13	11
A0A3Q2HC10	CD5 molecule like	CD5L D5LCD	27	11	11

表 11-6. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A0A1E927	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	58	7	5
A0A0A1E6E2	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	63	9	2
A0A3Q2LCW0	Uncharacterized protein	KRT6C	27	18	8
F6TIR2	Lipocalin 2	LCN2	42	12	12
F6QYS3	Extracellular matrix protein 1	ECM1	46	14	14
F6PPQ0	Complement C2	C2	37	19	19
A0A3Q2HKG3	Lactotransferrin	LTF	39	19	17
Q0PMN3	Parotid secretory protein	ND	79	18	2
A0A5F5PGY6	Complement C6	G=C6N=	29	18	18
A0A0A1E6I7	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	43	7	2
A0A5F5PLV2	Carboxypeptidase B2	CPB2	64	17	17
F7DRS2	Serpin family A member 6	SERPINA6	31	10	10
F6RRV1	Fetuin B	FETUB	47	15	15
A0A5F5PZX4	Attractin	TRNAT	14	16	16
A0A3Q2HI93	Phospholipid transfer protein	PLPTP	37	10	10
A0A0A1E470	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	GN=IGL	43	9	2
A0A0A1E406	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	GN=IGL	45	9	2
A0A5F5PXB8	Uncharacterized protein	ND	32	10	10
A0A061DBP6	von Willebrand factor	VWF	10	18	18

表 11-7. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A0A1E4L2	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	38	8	2
A0A3Q2LBD1	Complement C8 beta chain	C8B	32	13	13
A0A3Q2HMJ3	Ig-like domain-containing protein	ND	53	9	2
F6QDQ1	Peptidoglycan recognition protein 2	PGLYRP2	47	9	9
O97678	Transferrin (Fragment)	ND	59	6	4
A0A3Q2L2R4	Lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein	LOC100051562	44	6	6
A0A0A1E6Q9	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	52	8	2
A0A0A1E6Q6	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	52	8	2
A0A0A1E9D0	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	33	8	2
A0A3Q2IDC4	Carboxylic ester hydrolase	LOC1005084000	9	4	3
F6PZG1	Pentaxin	CRP	49	9	9
A0A3Q2HW24	Joining chain of multimeric IgA and IgM	JCHAIN97	51	10	10
F6V881	Vitronectin	VTN	22	8	8
A0A3Q2I6F9	IF rod domain-containing protein	KRT6C	22	13	4
F7A1W7	Apolipoprotein C2	APOC2	60	6	6
A2Q0Z2	Lumican	LUM	33	10	10
A0A3Q2GT53	C-type lectin domain family 3 member B	CLEC3B79	28	8	8
A0A3Q2HJE2	Ig-like domain-containing protein	ND	27	6	2
F6VTD3	Uncharacterized protein	PRG4	38	15	15

表 11-8. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2LFB3	Actin alpha cardiac muscle 1	ACT1C1	41	12	4
F7BUV8	Adiponectin A	C1QB	27	6	6
A0A3Q2HDF1	Retinol-binding protein 4	RBP4 PBP4E=	29	8	8
A0A5F5PUU0	Uncharacterized protein	ND	65	6	5
F7E2N9	Uncharacterized protein	ND	30	8	6
F6SHJ8	IF rod domain-containing protein	KRT2	12	10	4
F6S8W6	Keratin 75	KRT75	15	11	2
F7E0P3	Thrombospondin 4	THBS4	17	10	8
F6VK89	CD14 molecule	CD14	38	8	8
O62841	Myeloid cathelicidin 2	eCATH-2	55	9	9
F7DBT2	Complement C1q C chain	C1QC	26	8	6
F6Z129	Vanin 1	VNN1	24	6	6
F6WZA8	Carboxypeptidase N subunit 1	CPN1	38	10	10
K9K497	Beta-2-microglobulin	ND	64	5	5
A0A5F5Q220	Junction plakoglobin	JUP SVJUP=1	17	10	10
F6Y0C1	Complement C8 gamma chain	C8G	47	6	6
A0A3Q2GXX5	Fibulin-1	FLN1BL	19	8	2
A0A5F5PI45	Uncharacterized protein	LOC1000599499	10	6	2
A0A3B0ITS7	Adiponectin C	DICAD	31	6	4

表 11-9. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F6VZ73	Hyaluronan binding protein 2	HABP2	24	9	9
O97966	Transferrin (Fragment)	ND	43	4	2
F6YS25	Carbonic anhydrase 2	CA2	49	10	10
F7ATL5	Keratin 13	KRT13	19	9	6
A0A3Q2IC05	Leukocyte elastase inhibitor	SERINB1PI	35	10	10
A0A5F5Q0H5	Lymphocyte cytosolic protein 1	LCP1	23	8	8
F7C6S0	Matrix metalloproteinase 19	MMP19	30	8	8
F7BFT1	Peroxiredoxin 2	PRDX2	58	8	8
A0A1K0FUK6	Globin B2	GNB2LN	15	3	2
F6ZBG0	Carbonic anhydrase 1	CA1	46	8	8
F6XH19	Nidogen 1	NID1	12	9	9
A0A5F5Q2J1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1	31	8	8
A0A3Q2I1X0	Vanin 1	VNN1	29	8	8
F6TDH5	Coagulation factor X	F10	22	7	7
A0A3Q2H075	Vitamin K-dependent protein C	PRCOC	17	8	8
F7CVH6	Plakophilin 1	PKP1	10	5	5
H9GZV0	Uncharacterized protein	ND	33	7	7
A0A3Q2I5T2	Cystatin C	CST3	58	6	6



表 11-10. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シークエンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2LAH2	Multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1	MINPP1	27	6	6
F6UEG9	Apolipoprotein M	APOM	38	5	5
F7AWQ9	Interleukin 1 receptor accessory protein	IL1RAP	16	9	9
F7DZE7	Adiponectin D	ADIPOQ	17	4	4
F6VB94	Transforming growth factor beta induced	TGFBI	26	9	9
F6PR90	Kallikrein B1	KLKB1	17	9	9
A0A3Q2H8G8	Carboxylic ester hydrolase	LOC100050764	10	4	3
F7D1W9	Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	LOC100069029	22	5	4
O97677	Transferrin (Fragment)	TF	57	3	2
A0A5F5PYS7	Keratin 1	RT1KR	7	5	3
A0A3Q2I196	Pyruvate kinase	PKM	22	9	9
F6YR34	Thrombospondin 1	THBS1	11	9	9
A0A3Q2HR98	Ig-like domain-containing protein	ND	48	3	3
F6XM13	Apolipoprotein D	APOD	31	5	5
A0A5F5PST7	Uncharacterized protein	GPX3 PE= SV4	35	7	7
F7CU94	Lysozyme	LYZ	35	3	3
F7BR99	Creatine kinase, M-type	CKM	28	7	7
F6PVG3	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1	EFEMP1	19	7	7
A0A3Q2I574	Olfactomedin 4	OFM4LF	16	5	5

表 11-11. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2H4X1	Ig-like domain-containing protein	ND	25	2	2
F6PN89	Talin 1	TLN1	4	6	6
A0A3Q2LBP6	Peptidase S1 domain-containing protein	CFD79	18	4	4
F6VP61	Serpin family B member 10	SERPINB10	36	9	9
A0A3Q2LG05	Glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	GPLD1	19	8	8
A0A3Q2HZX9	Azurocidin 1	ZU1AZ	37	6	6
F6QXN5	Transgelin	TAGLN2	17	4	4
F6RFT9	Coagulation factor IX	F9	16	5	5
F7B504	Apolipoprotein F	APOF	18	4	4
A0A5F5Q197	Uncharacterized protein	ND	21	3	2
F7DNT0	Tubulin alpha chain	TUBA4A	23	6	2
F7ANC9	Tubulin alpha chain	TUBA1C	25	8	4
A0A5F5Q0B3	Eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	10	6	6
Q95480	MHC class I antigen	Eqca-16	9	4	2
A0A3Q2I0F0	Dihydropyrimidinase	DPYS	13	5	5
F6RA08	Stomatin	STOM	29	5	5
A0A3Q2HHD6	Uncharacterized protein	ND	22	4	4
F6RMK1	C-X-C motif chemokine	LOC100630489	33	4	4

表 11-12. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2HAN3	Protein S	POS1RO	7	7	7
A0A3Q2HCK9	Ankyrin 1	NK1AN	6	6	6
F6ZSZ5	Vinculin	VCL	7	5	5
A8HDR2	MMP9	MMP9	11	6	6
F6YWC0	Uncharacterized protein	LOC106783161	23	6	6
F7D2D9	Biliverdin reductase B	BLVRB	31	5	5
A0A5F5PTP6	Collagen type VI alpha 3 chain	CL6A3OL	4	7	7
A0A3Q2GVV2	Vascular cell adhesion molecule 1	V=VCAM1	12	5	5
F7C349	Pentaxin	APCS	36	5	5
F6SN37	Protein S100 GN	S100A8	38	2	2
F6R7B4	Interstitial collagenase	MMP1	11	4	2
F7CQ86	Lipoaln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein	LOC100050034	26	4	4
F7CI62	Mannose binding lectin 2	MBL2	20	5	5
F6SP74	Complement factor properdin	CFP	13	4	4
A0A3Q2HNN0	Microfibril associated protein 4	MMFAP4=M	16	3	3
F6WNQ7	Vasorin	VASN	12	3	3
F7C7J6	Coagulation factor XIII B chain	F13B	10	5	5
A0A3Q2KYS2	Bactericidal permeability increasing protein	BPI	12	4	4
A0A3Q2H396	Elastase, neutrophil expressed	EANELA	22	4	4

表 11-13. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A452GEN9	Myoglobin	MB	27	4	4
F6Y2H3	Peptidase D	PEPD	16	4	4
F6RGN2	Fatty acid binding protein 5	FABP5	26	2	2
A0A3Q2LPE6	Annexin	AXA2NX	14	3	3
A0A3Q2HY77	Chitinase 3 like 1	CHI3L1	17	5	5
F6YXS1	Colony stimulating factor 1 receptor	CSF1R	5	3	3
A0A3Q2IHD2	Selectin L	ELLSE	12	4	4
A0A3Q2KUV4	Phospholipase A2 group VII	PLA2G7	11	4	4
A0A3Q2GYK6	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	YWHAZ	21	5	4
A0A5F5PFW3	Transferrin receptor protein 1	TRCFR	8	5	5
F7BZ88	Myeloperoxidase	MPO	6	4	4
A0A3Q2GX00	Uncharacterized protein	LOC1000667216	18	3	3
F7BH02	Filamin A	FLNA	3	5	5
F6R5Y2	Serpin family A member 5	SERPINA5	10	2	2
A0A3Q2H7F5	Ig-like domain-containing protein	ND	19	3	3
F6ZDW1	Erythrocyte membrane protein band 4.2	EPB42	9	4	4
A0A3Q2I8H8	Galectin 3 binding protein	LGALS3BP	12	4	4
F7CC84	Carboxylic ester hydrolase	BCHE	9	3	3
F7A1L2	Complement C1r subcomponent like	C1RL	15	5	4

表 11-14. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2HRL2	Cartilage oligomeric matrix protein	GN=COMP G	8	4	2
A0A5F5PQA2	Uncharacterized protein	APOC4 PE4 S=4	43	4	4
A0A3Q2I3K2	Keratin 20	KRT20	3	3	2
A0A3Q2HN78	Fructose-bisphosphate aldolase	ADOALD	14	4	3
A0A3Q2I6E8	Catalase	CAT	8	3	3
F6TZX9	Triosephosphate isomerase	TPI1	12	2	2
A0A5F5Q1G3	Heparan sulfate proteoglycan 2	HSPG2	1	3	3
A0A3Q2HQ85	Glycoprotein Ib platelet subunit alpha	GP1BA79	11	2	2
A0A3Q2GTT0	Ig-like domain-containing protein	ND	30	2	2
F6YV40	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	22	4	4
A0A3Q2LDF3	Tenascin C	GNTNC=T	3	4	4
A0A3Q2HX90	Uncharacterized protein	LOC1000319741	22	4	3
F6VSN2	Glutathione S-transferase pi 1	GSTP1	15	2	2
A0A3Q2I2D6	Neural EGFL like 2	NELL2	4	3	3
A0A5F5PZ33	Uncharacterized protein	ND	6	2	2
F6QXW2	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	PEBP1	19	2	2
F6YG82	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	HSPA5	6	3	2
F6SIE2	Intercellular adhesion molecule 3	ICAM3	5	2	2

表 11-15. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
A0A3Q2KKM2	Mannose receptor C-type 1	MRC1	3	3	3
F6ZRF6	Serpin family A member 7	SERPINA7	10	3	3
A0A3Q2LEZ9	Mannan binding lectin serine peptidase 1	MASP1	4	2	2
F7ABW7	Coagulation factor VII	F7	7	2	2
F6YQM5	Prosaposin	PSAP	8	2	2
A0A3Q2H306	Ig-like domain-containing protein	ND	27	2	2
F7BHV8	Tubulin beta chain	TUBB4A	9	3	3
F6SR87	Protein Z, vitamin K dependent plasma glycoprotein	PROZ	8	3	3
A0A3Q2HCA6	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8N	6	3	2
A0A3Q2GSM3	Uncharacterized protein	ENO1	6	3	2
A0A5F5PYE5	Insulin-like growth factor II	IG2F2	6	2	2
A0A3Q2HYR4	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	ENPP2	6	3	3
F6QKR7	Myocilin	MYOC	9	3	3
A0A3Q2HJN8	Interleukin-1	I1RNL	21	2	2
F7DQG1	Uncharacterized protein	LOC100071039	10	2	2
A0A3Q2I0A5	Actinin alpha 1	ACTN1	2	2	2
F6ZJP9	Lecithin-cholesterol acyltransferase	LCAT	11	2	2
A0A5F5PVK6	Versican	CANVC	1	2	2
F7BK76	Macrophage stimulating 1	MST1	4	2	2

表 11-16. 健常馬及び腸炎発症馬から採取した血清から同定したタンパク質

アクセッション番号	タンパク質名	遺伝子名	シーケンス coverage [%]	同定した ペプチド数	同定した ユニークペプチド数
F7DXG8	Cofilin 1	CFL1	23	3	3
A0A3Q2HID2	Coagulation factor XIII A chain	I3A1F1	4	2	2
F6PWV1	Histone H2B	ND	12	2	2
A0A3Q2HNV2	Peptidase S1 domain-containing protein	ND	32	2	2
F6Y0G5	Periostin	POSTN	4	2	2
F6X485	Myosin heavy chain 9	MYH9	2	2	2
F6UP61	Semaphorin 4B	SEMA4B	3	2	2
F6Q666	Tubulin beta chain	TUBB1	7	2	2
F6RP73	Uncharacterized protein	LOC100064703	14	2	2
A0A3Q2HNV2	Insulin like growth factor binding protein 2	IGFBP2	8	2	2

ND: not determined

表 12. 健常及び腸炎群間で有意差を示したタンパク質 (day 1)

$p$ -value < 0.05 を青字、 $p$ -value < 0.01 を赤字で示した。

アクセッション番号	タンパク質名	ユニークペプチド 数	シークエン ス coverage (%)	健常馬 VS 腸炎発症馬	
				濃度変化	$p$ -value
A0A3Q2H875	hemoglobin subunit alpha	9	85%	4.08	0.046
A0A3Q2L3I3	clusterin	27	54%	2.07	0.0003
F6YV40	GAPDH	4	22%	2.42	0.031
F6ZBG0	carbonic anhydrase 1	8	46%	2.91	0.013
F7BFT1	peroxiredoxin 2	8	58%	2.34	0.017
F7CU94	lysozyme	3	35%	3.73	0.0013
F7C0D2	lipopolysaccharide binding protein	19	41%	9.80	0.0002
F7D2D9	biliverdin reductase B	5	31%	2.40	0.041



表 13. バイオマーカー候補タンパク質の性差の検定

$p$ -value < 0.05 を赤字で示した。

タンパク質	$p$ -value ( 牝 vs 牝)	
	健常群	腸炎群
biliverdin reductase B	0.825	0.017
hemoglobin subunit alpha	0.164	0.610
carbonic anhydrase 1	0.752	0.308
GAPDH	0.486	0.497
peroxiredoxin 2	0.242	0.396
clusterin	0.950	0.734
lipopolysaccharide binding protein	0.155	0.308
lysozyme	0.195	0.497

表 14. 既知の炎症マーカーの健常及び腸炎発症馬群間比較

$p$ -value < 0.05 以下を赤字で示した。

アクセッション番号	タンパク質名	ユニークペプチド数	シークエンス coverage (%)	健常馬 VS 腸炎発症馬	
				濃度変化	$p$ -value
F6P2G1	pentaxin (CRP)	6	41%	3.38	0.26
F6XWM5	haptoglobin	25	60%	1.66	0.051
F6ZNL9	serum amyloid A protein	1	83%	62.9	0.0004

表 15. 生存及び死亡群間で有意差を示したタンパク質

a. day 1

アクセッション番号	タンパク質名	生存群 vs 死亡群	
		濃度変化	<i>p</i> -value
F7D2D9	biliverdin reductase B	4.56	0.005

b. last day

アクセッション番号	タンパク質名	生存群 vs 死亡群	
		濃度変化	<i>p</i> -value
A0A3Q2H875	hemoglobin subunit alpha	2.36	0.042
A0A3Q2L313	clusterin	3.15	0.012
F6YV40	GAPDH	5.90	0.005
F7C0D2	lipopolysaccharide binding protein	4.59	0.007
F7D2D9	biliverdin reductase B	4.62	0.019

表 16. バイオマーカー候補タンパク質の腸炎及び呼吸器疾患発症馬における群間比較

$p$ -value < 0.05 を赤字で示した。

アクセッション番号	タンパク質名	呼吸器疾患発症馬 vs 腸炎発症馬	
		濃度変化	$p$ -value
A0A3Q2H875	hemoglobin subunit alpha	1.45	0.067
A0A3Q2L3I3	clusterin	1.23	0.13
F6YV40	GAPDH	1.34	0.17
F6ZBG0	carbonic anhydrase 1	2.91	0.041
F7BFT1	peroxiredoxin 2	1.59	0.087
F7CU94	lysozyme	1.50	0.093
F7C0D2	lipopolysaccharide binding protein	1.82	0.052
F7D2D9	biliverdin reductase B	1.40	0.074

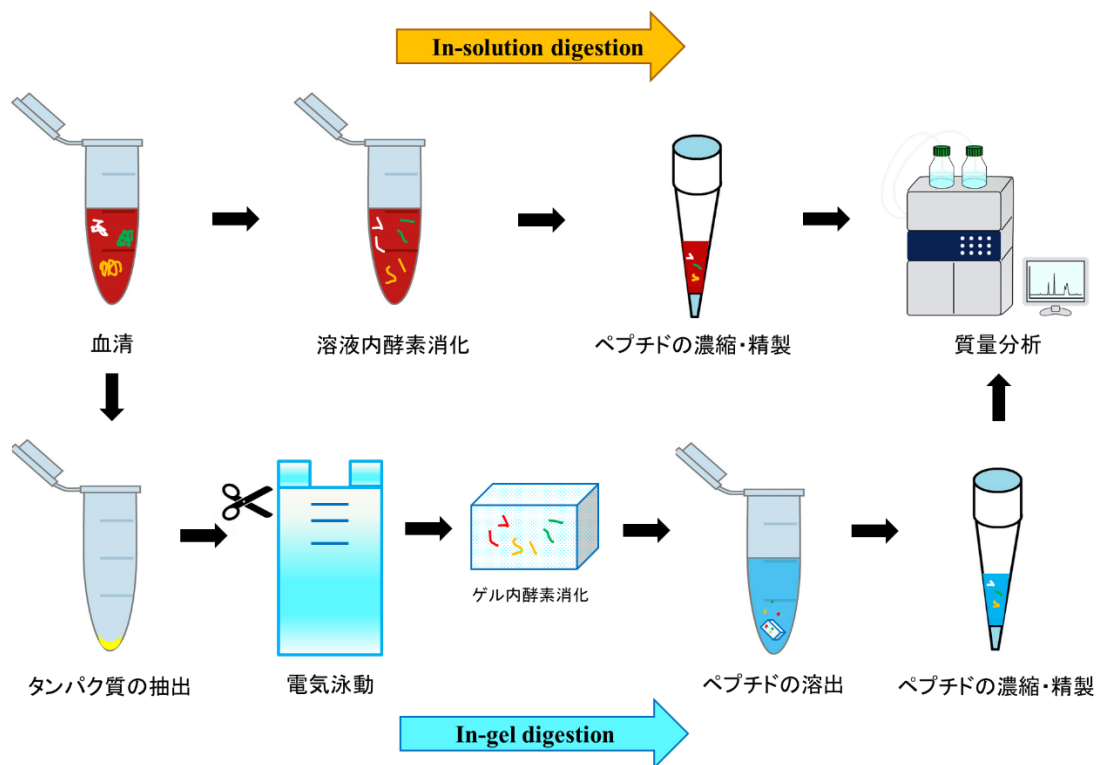


図 1. In-solution digestion 及び In-gel digestion プロトコールの概要

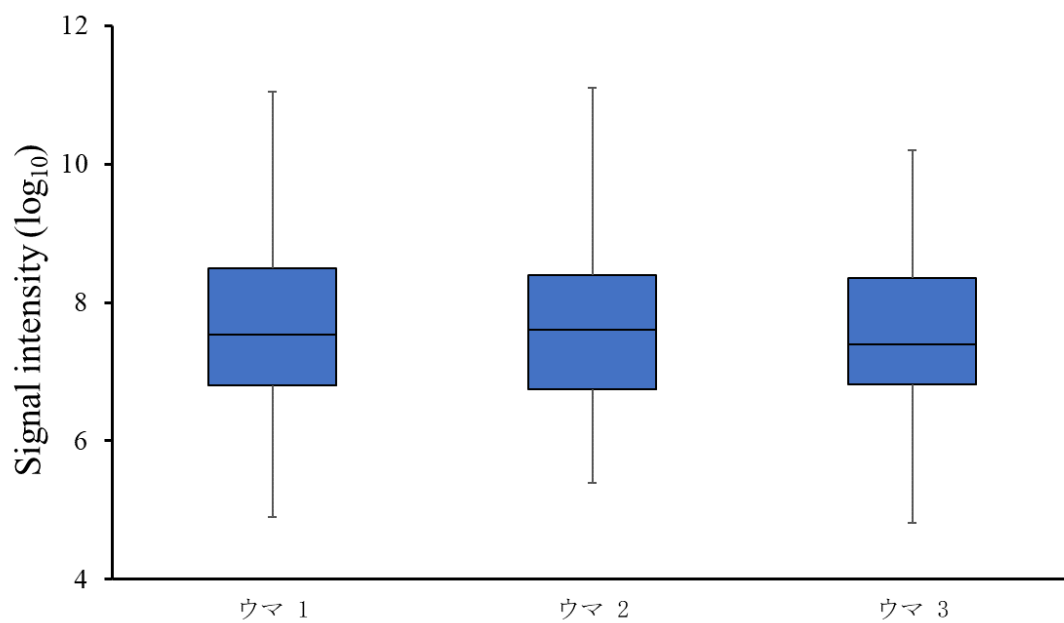


図 2. 健常馬 3 頭におけるタンパク質量の分布  
ウマ 1 (牡 2 歳)、ウマ 2 (牝 2 歳) 及びウマ 3 (牝 3 歳) を示す。

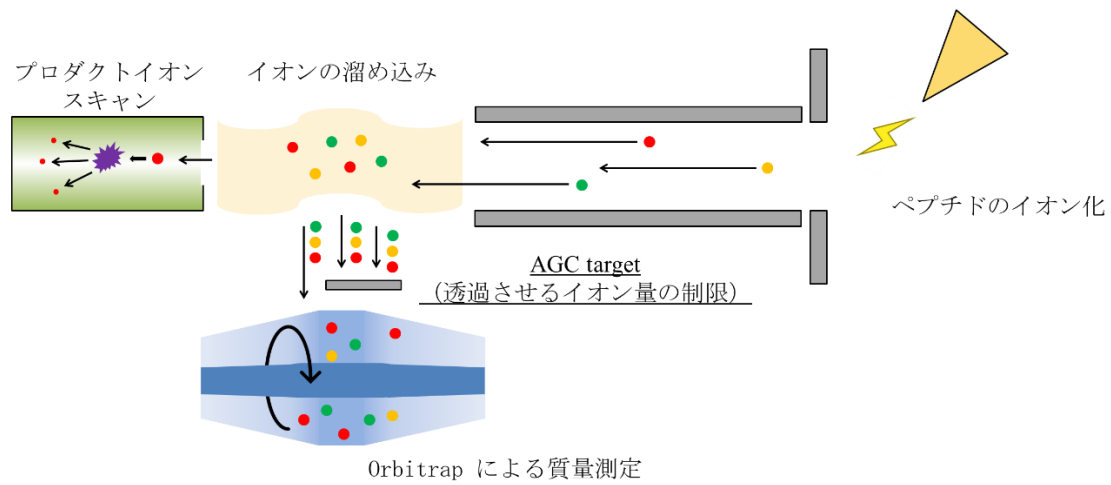


図 3. AGC target の概念図

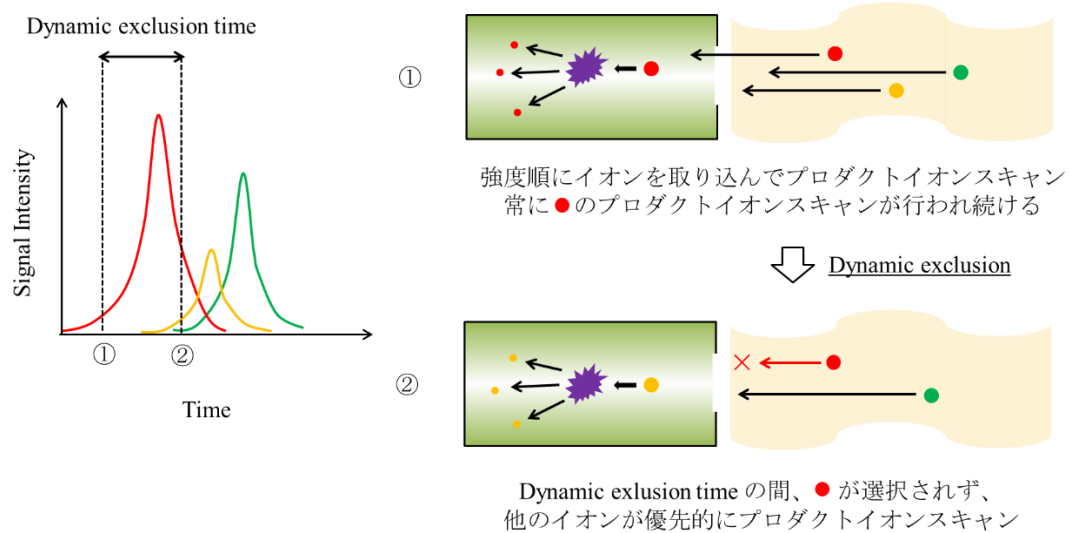


図 4. Dynamic exclusion の原理

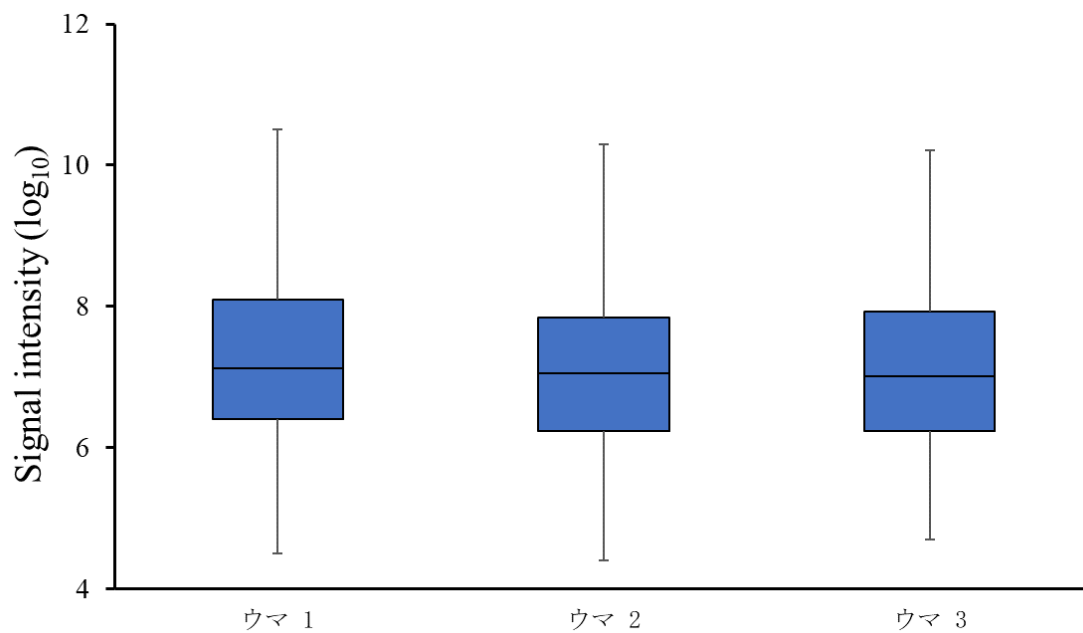


図 5. 健常馬 3 頭におけるタンパク質量の分布（分析法最適化後）

○は外れ値を示し、何れのサンプルにおいても serum albumin（アクセス番号 A0A3Q2I2E9）であった。

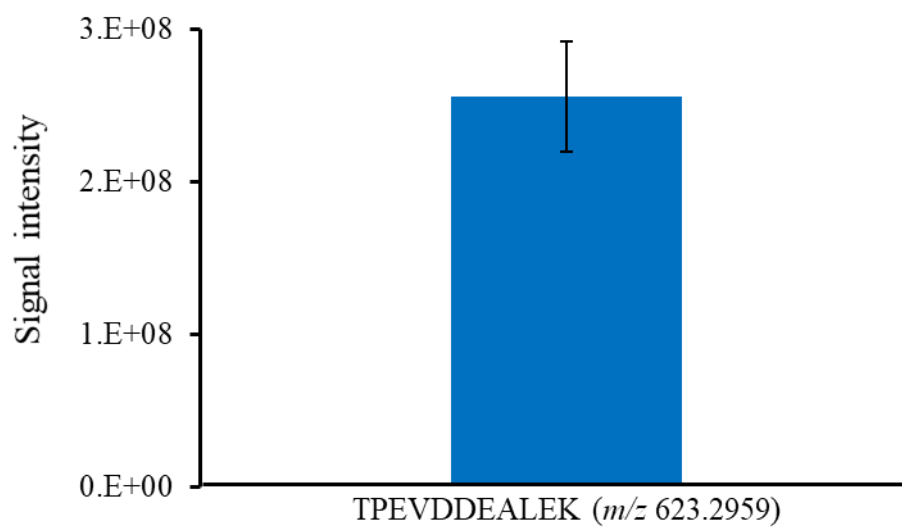


図 6. ウシ  $\beta$ -lactoglobulin 由来ペプチド定量値の再現性 (n=3)

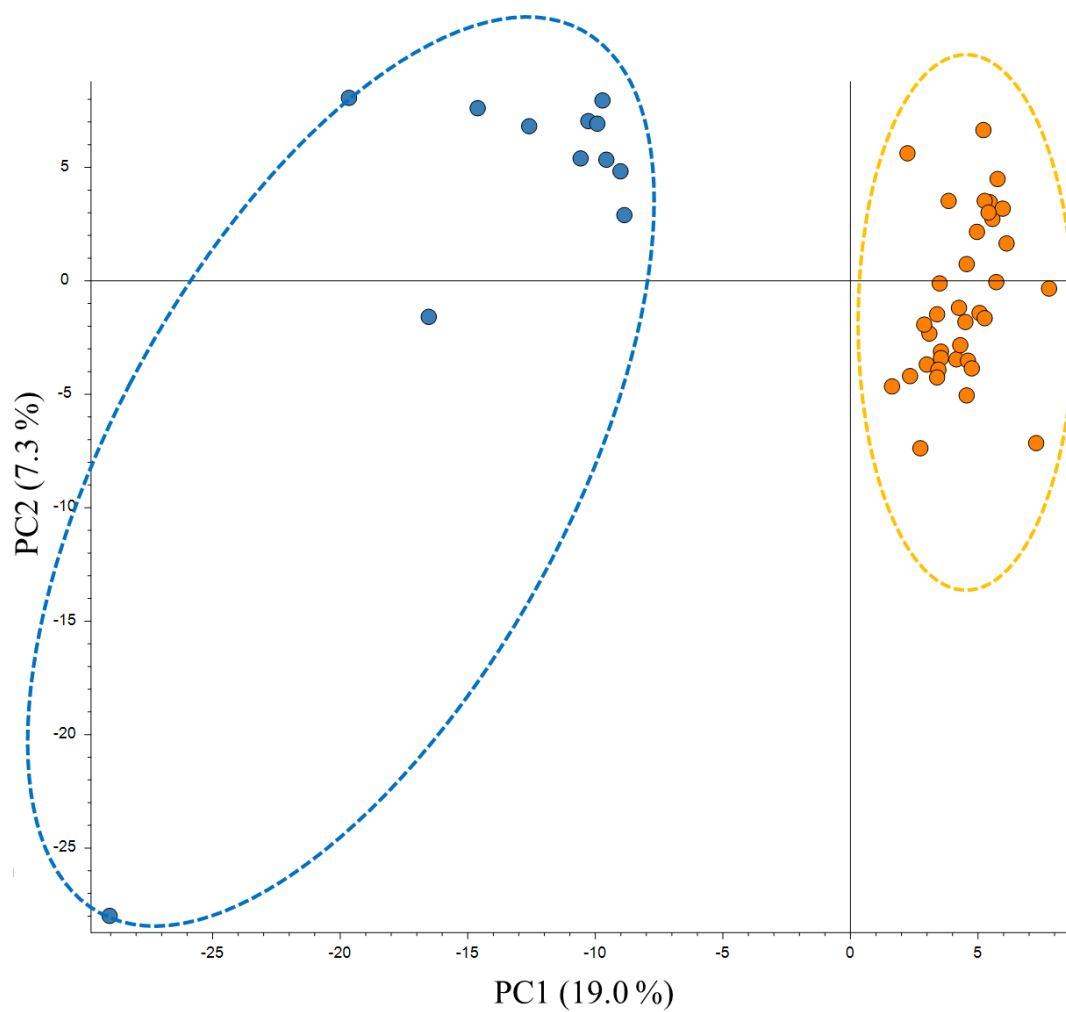
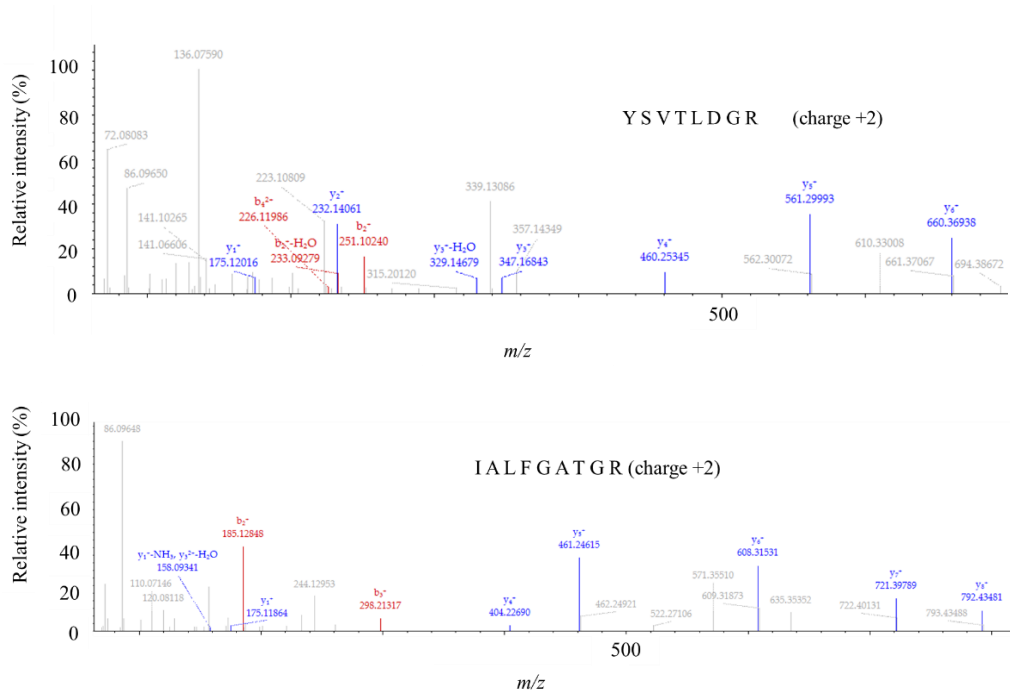


図 7. PCA による群間比較

黄線で囲まれたものは健常群を示し、青線で囲まれたものは腸炎群を示す。

PC1 は成分 1、PC2 は成分 2 を示し、括弧内は各成分の寄与率を示す。

biliverdin reductase B



hemoglobin subunit alpha

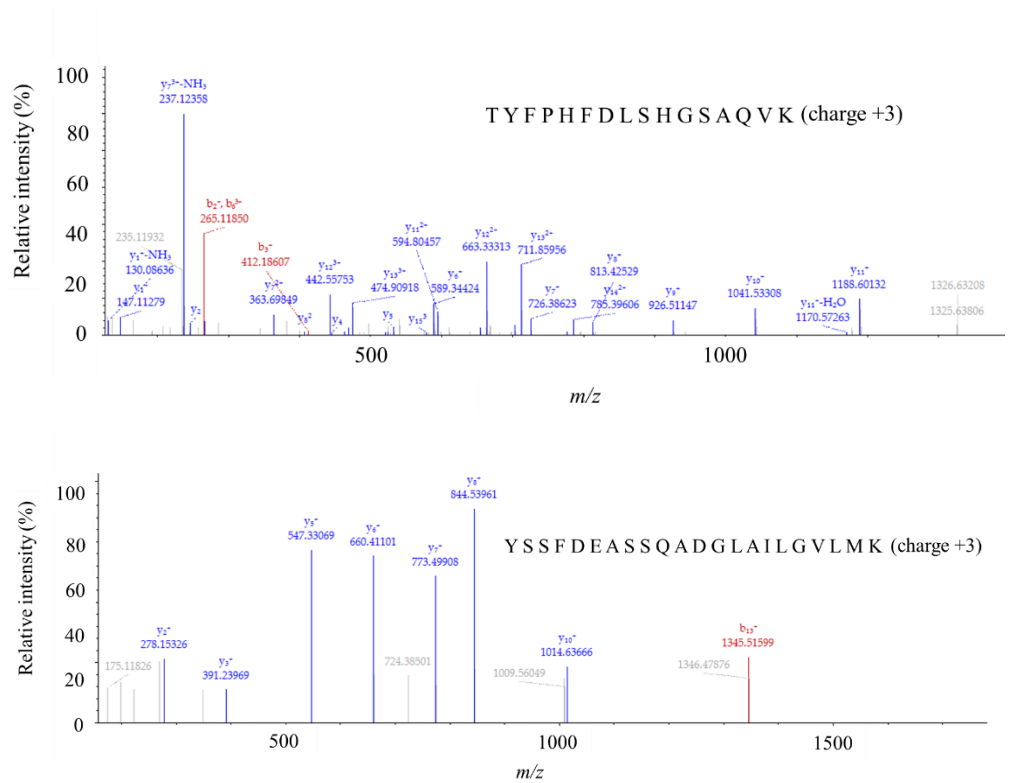
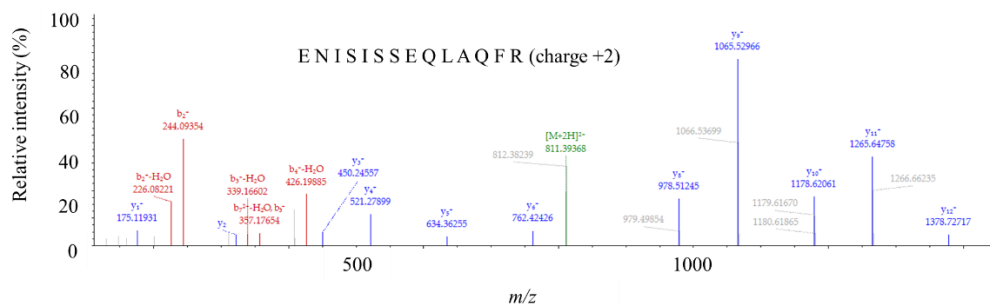
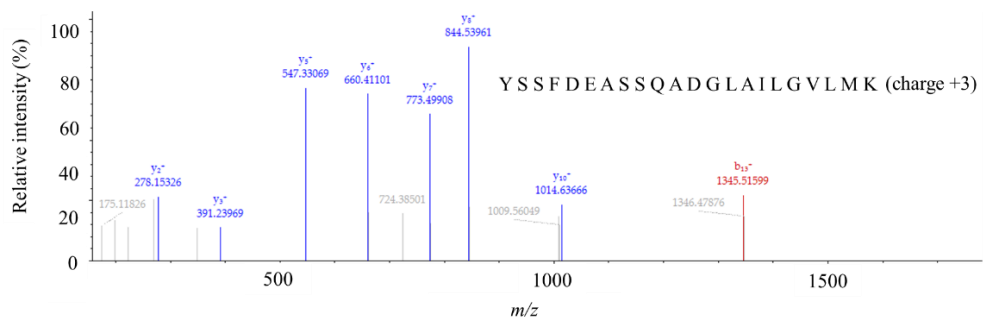


図 8-1. バイオマーカー候補タンパク質のユニークペプチドの MS/MS スペクトル  
赤文字は b イオン、青文字は y イオンを示す。緑文字は分子イオンを表す。



carbonic anhydrase 1



GAPDH

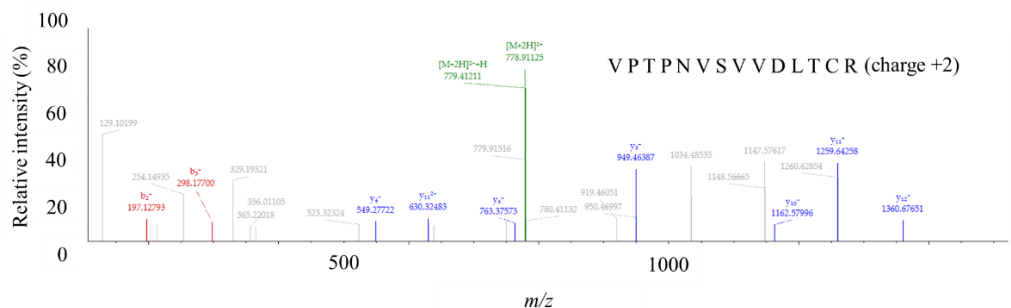
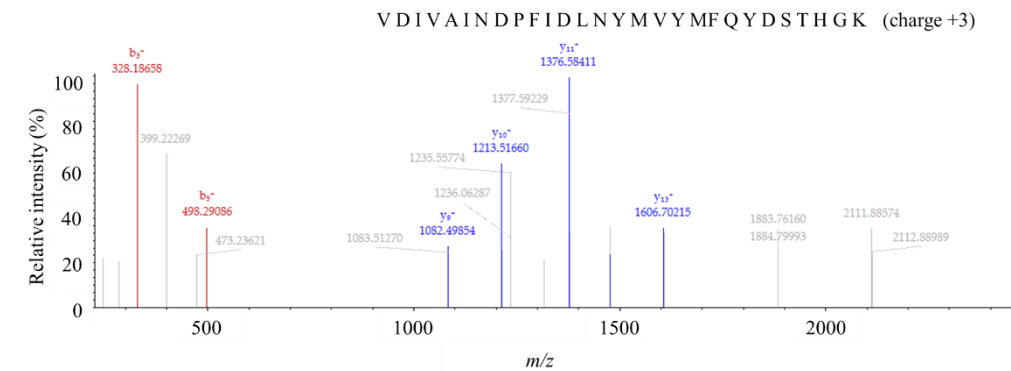
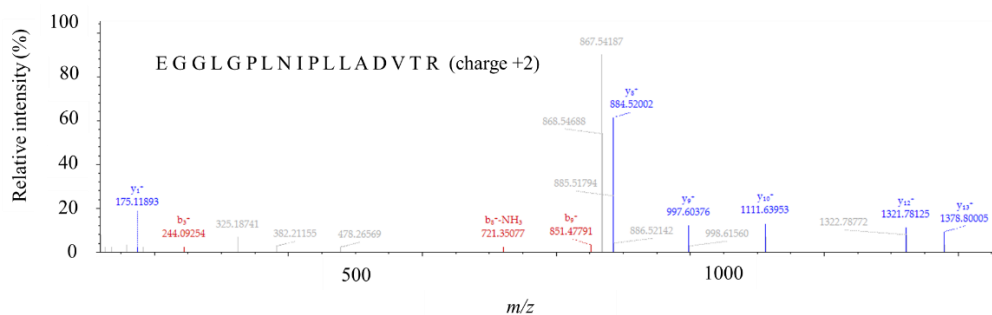
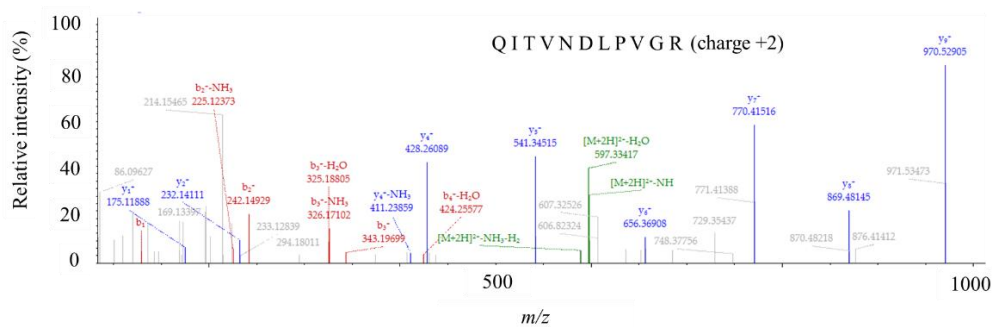


図 8-2. バイオマーカー候補タンパク質のユニークペプチドの MS/MS スペクトル  
赤文字は b イオン、青文字は y イオンを示す。緑文字は分子イオンを表す。

## peroxiredoxin 2



## clusterin

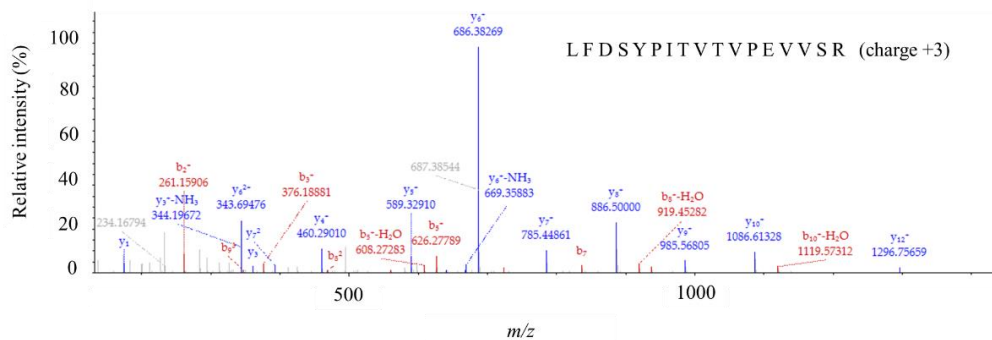
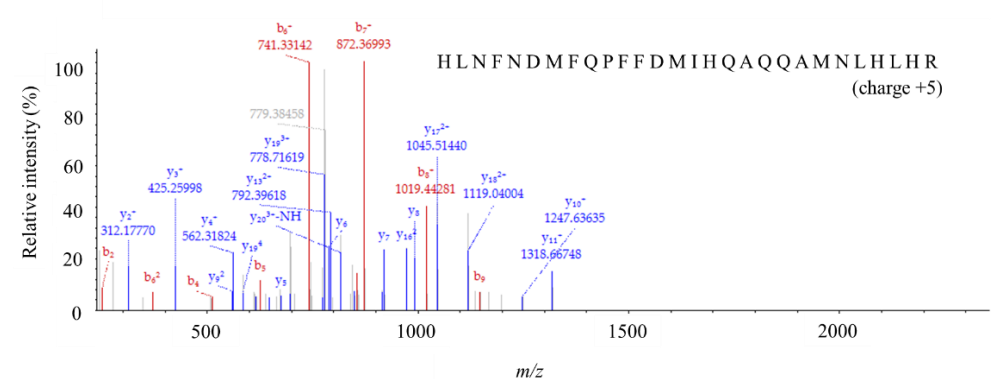
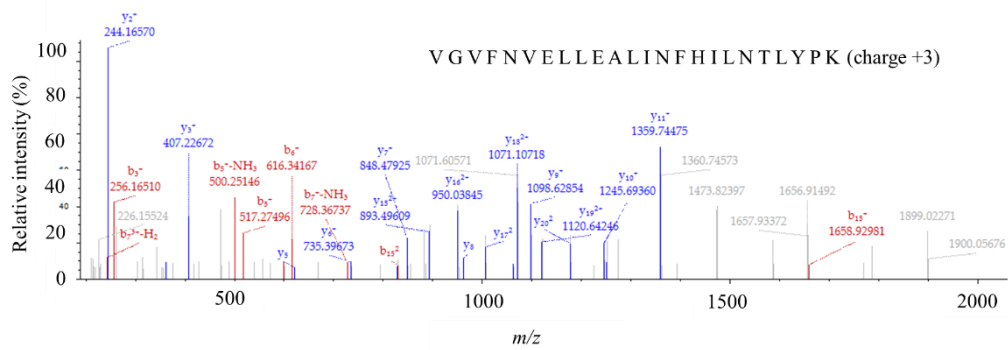
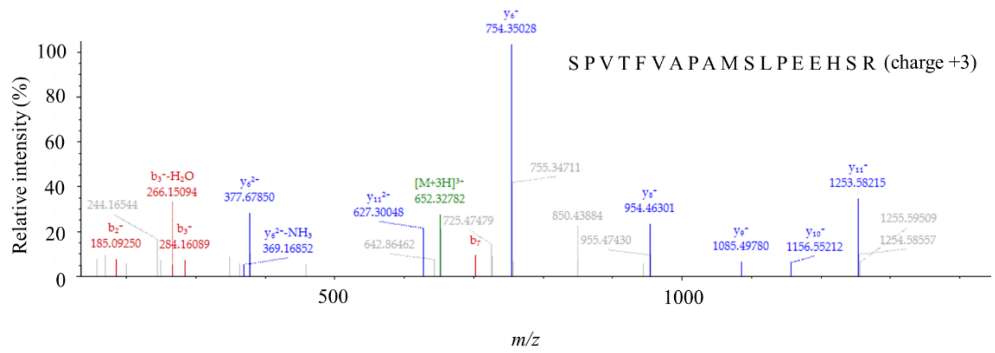


図 8-3. バイオマーカー候補タンパク質のユニークペプチドの MS/MS スペクトル  
赤文字は b イオン、青文字は y イオンを示す。緑文字は分子イオンを表す。

## lipopolysaccharide binding protein



## lysozyme

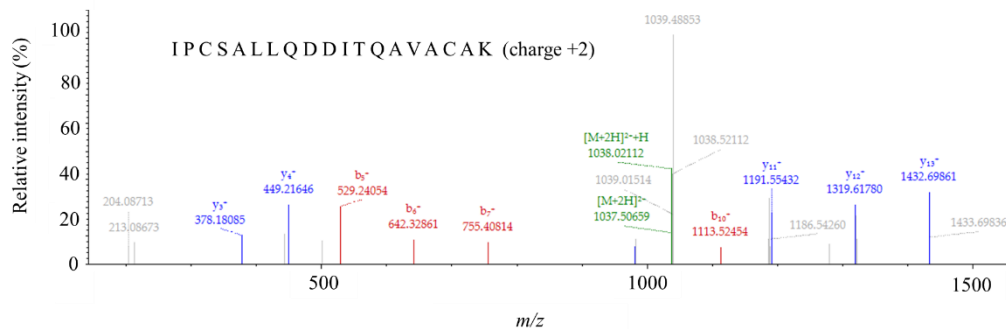
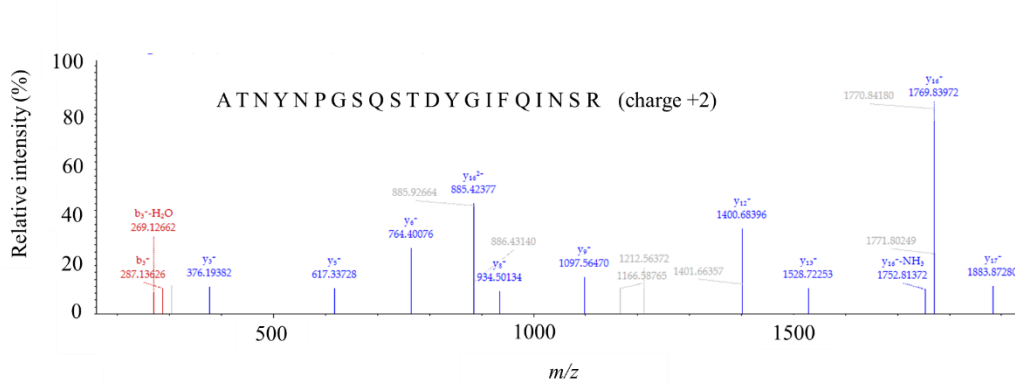
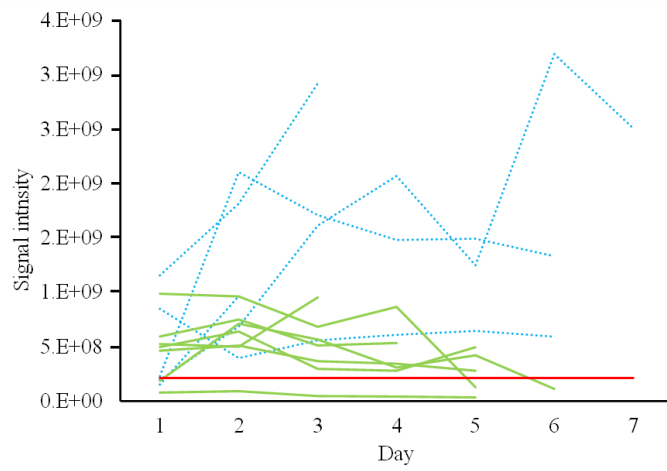
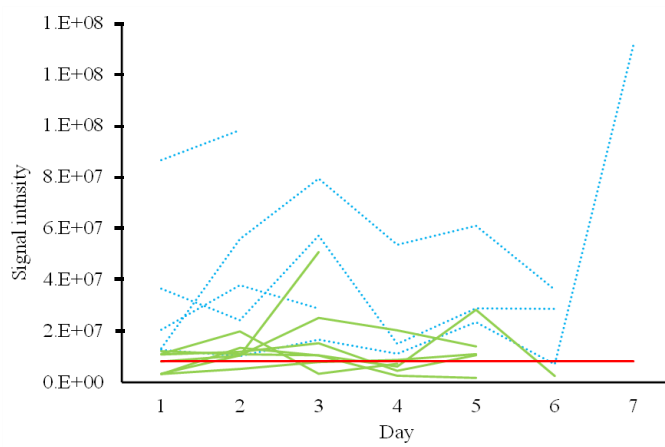


図 8. バイオマーカー候補タンパク質のユニークペプチドの MS/MS スペクトル  
赤文字は b イオン、青文字は y イオンを示す。緑文字は分子イオンを表す。

### biliverdin reductase B



### hemoglobin subunit alpha



### carbonic anhydrase 1

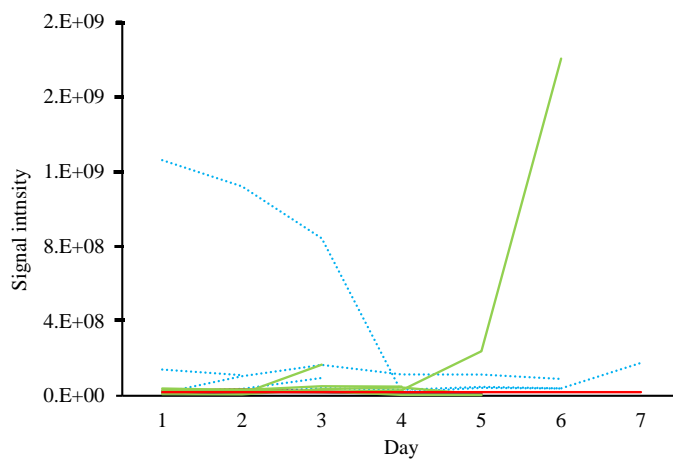
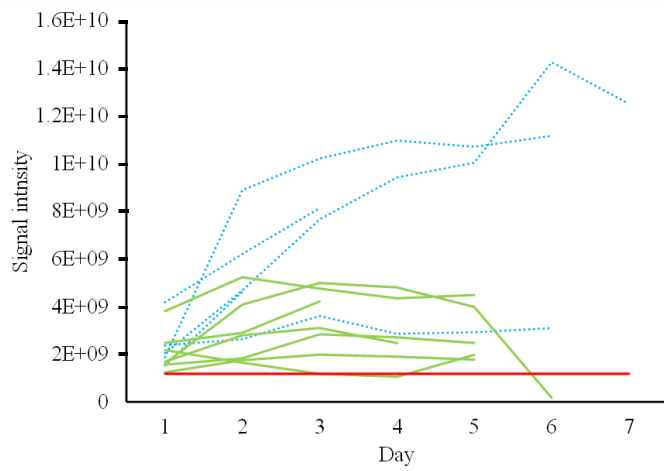
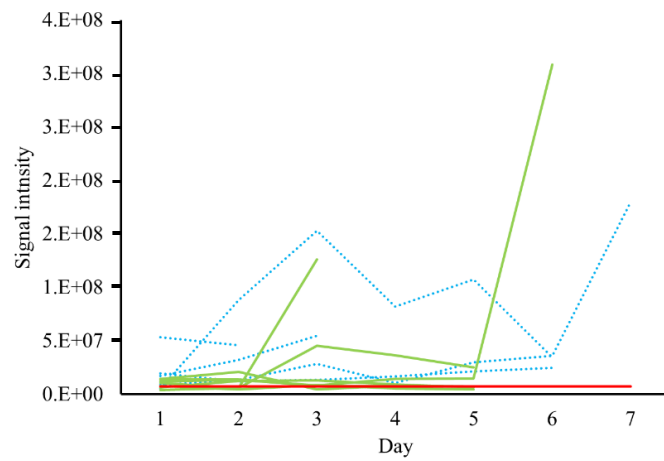


図 9-1. バイオマーカー候補タンパク質の経時的変化 (day 1 ~ day 7)  
 緑実線は生存群、青点線は死亡群を示す。赤実線は健常馬の平均値を示す。

## GAPDH



## peroxiredoxin 2



## clusterin

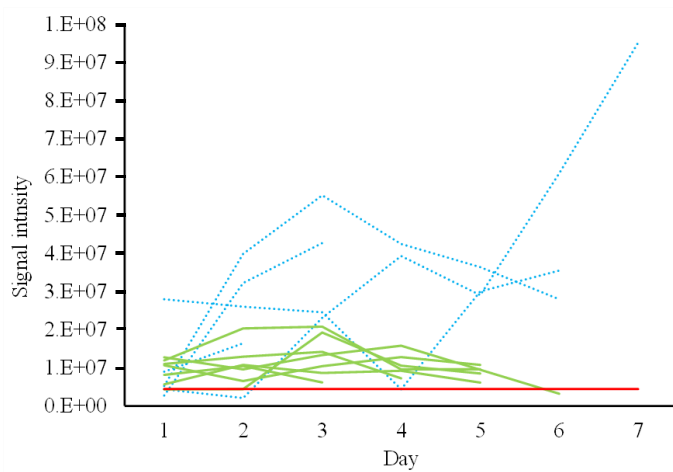
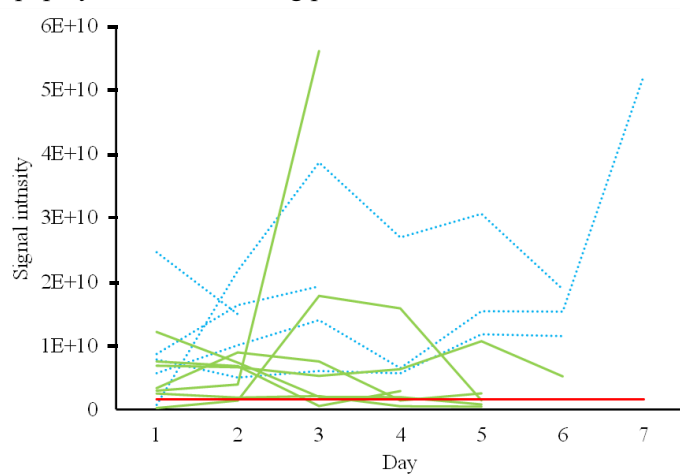


図 9-2. バイオマーカー候補タンパク質の経時的変化 (day 1 ~ day 7)

緑実線は生存群、青点線は死亡群を示す。赤実線は健常馬の平均値を示す。

### lipopolysaccharide binding protein



### lysozyme

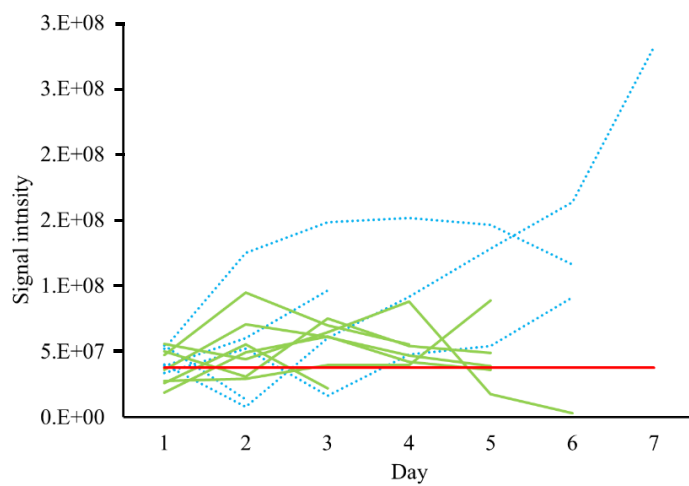


図 9-3. バイオマーカー候補タンパク質の経時的変化 (day 1 ~ day 7)  
 緑実線は生存群、青点線は死亡群を示す。赤実線は健常馬の平均値を示す。

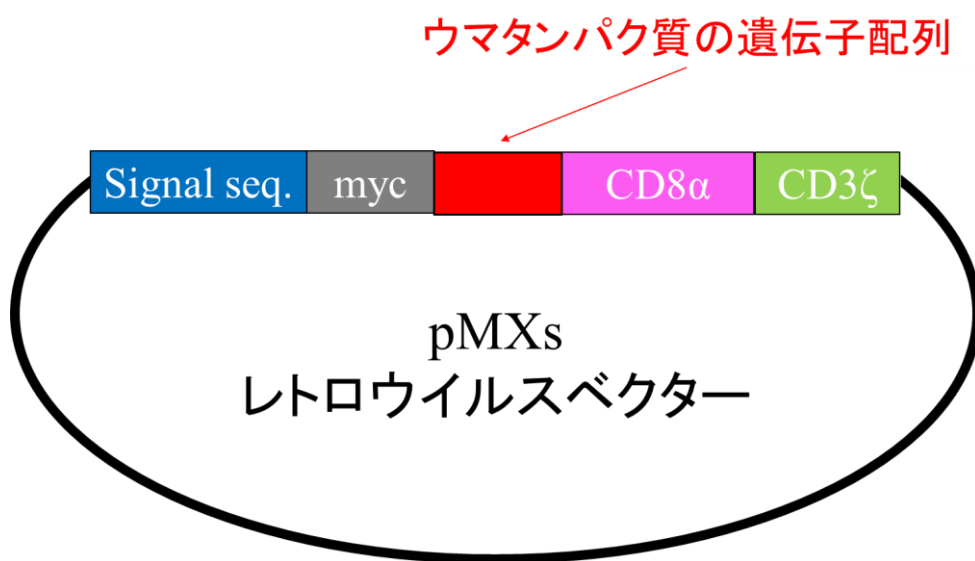


図 10. ウマタンパク質発現ベクターのコンストラクト

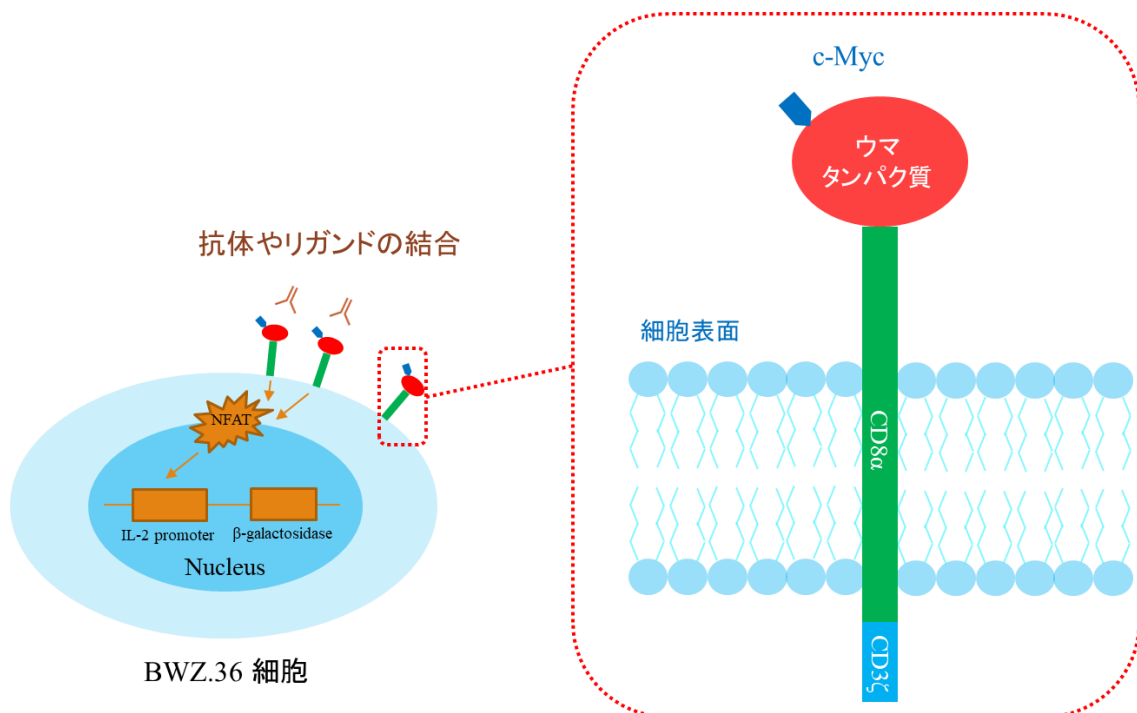


図 11. レポーター細胞の β-ガラクトシダーゼ発現機構

Uniprot データベースを基に  
プライマー設計、プライマーのリン酸化

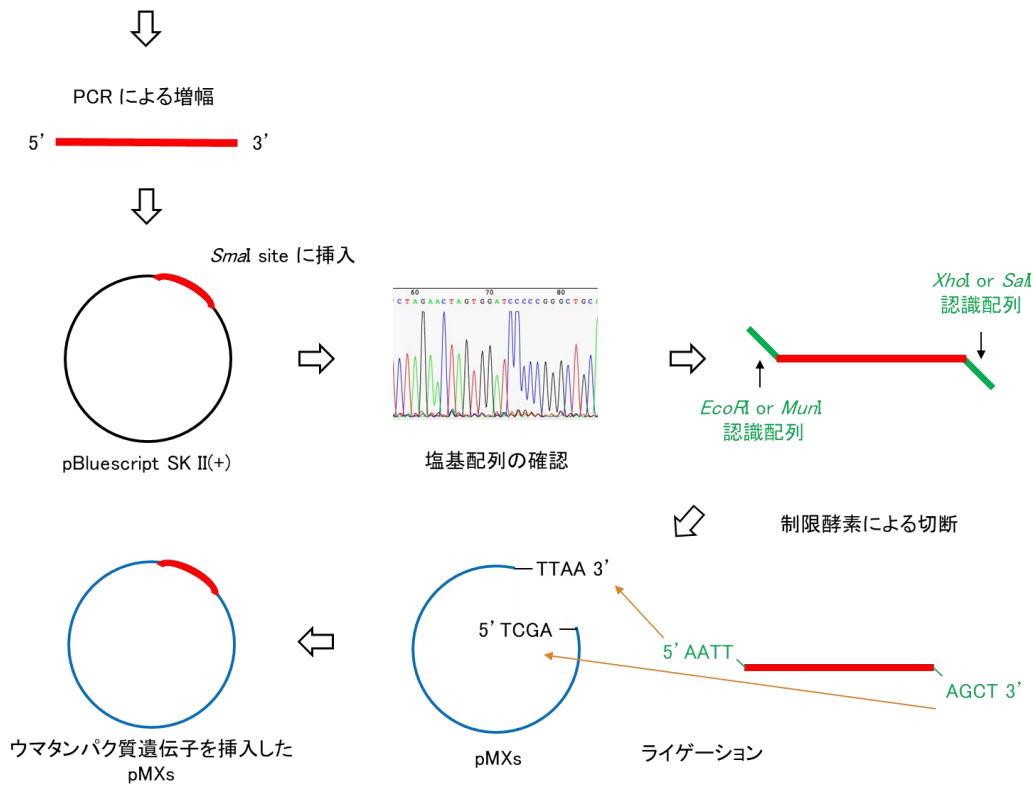


図 12. ウマタンパク質遺伝子の pMXs レトロウイルスベクターへの組み込み

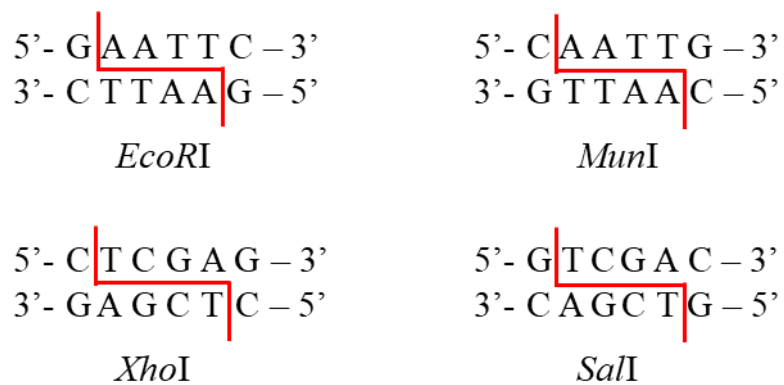


図 13. 使用した制限酵素の認識配列



a. lysozyme

atgaagggttcctgactctgggcttctcctgctgtctgtcactgtccagggcaaggctttgaaagatgtgagctggccagaacgctgaaaagac  
ttgactggacggctttagggagtcagcctgccaaactgggtctgttggccagatgggaaagtaattacaacacacagactacaaactacaat  
cctggaagtcaaagcactgattatgggatatttcagatcaacagccgctactgggtcaatgatggcaaaacccacagcagtgatgcctgtcg  
gattccctgcagcgctctgtgcaagatgacatcactcaagccgtggcgtgtgcaaagcgggtggtcagtgaccacagggcatccgagcatg  
ggtggcgtggagaaatcgtgtcagaaccagacctcactcagtatgtcaagggttcagagttaa

b. lipopolysaccharide binding protein

atggaggcctcggtgggacctgttctctactcctgatattgctgttcacgtccacccgggagctctgggctccaacccggcctggtgcc  
aggatcaccgacaagggcctggagtatgtggcaaggagggggcaatggttctgcagagaaagctgctggaatttctgtcccgaactcactg  
gggactcaagatccgccacttggccgtgtgcaactatgattccacagcctggacatctccagctgtgagctgctcggtctgtctgatgcctct  
ccccggccagggcctgaggtcacctctacGactctttcatcggggccacggcaagtgaagggtgcgcaagtcattcttgaaactagatggc  
tcttttgactgggggtcaaggacatcaccatttcggtcgacctcctcctgggcagcgagccctcggggaggccacagtcactgtctccagctg  
cagcagccacatctctgacgtggaggtggacatatcaggagattgggggtggctgctgaatctctccacagccagatcgagtcagggtccaag  
aagcattagagagcaagattgtgaaaagatccagaattcagtgacctccgacctacagccttatctcaaactctaccagtcacaacagagattg  
acaatctcaccagcatcgactacagcttaatggaggccccctcgggtaacagaccacgtgctggatgtaaggtttaagggtgaaattttaacatg  
atcacTgctccccagttacctttgtgtcctgcatgagtctcctgaggaacacagccgaatggtctactttgccatctcgattatgtcttaaca  
cagccagcctagtttatcaagaggcgggtacctgaacttctccatcacagatgacatggttccgctgactctccatccgactgaccactaagt  
ccttccgctctttgtccccaggttagccaagctctacccaacatgaacttggagctccagggagcagtggtccccggccccattcctgaactca  
gccctgggaatctgtccttggcccccaacatggagattgacgcctttgtgtcctgcccagctctgccagggagcctgtcttccggcttggtgtgac  
cactaatgtgtccgccgtgttgaccttaacactaccaagatcactgggttctgaagccaggaaaggtacaagtggaaactgaaagagtccaaag  
ttggagtattcaatgtggagctgttggaggcgtgatcaactccacattctcaacacctctaccccaaaatcaacgataagtggcaaaaggcct  
ccccctcctctgtgaagcatattcggtctacgacctgttctccagatccacaaggacttctgttcttgggctccaacatccagtacacgaaag  
tctg

c. biliverdin reductase B

atggtcgtcaagaagattgcgtcttcggcgccaccggcagaaccgggctcaccacactggcgagcggtgcaagcaggttatgaagtgaca  
gtgctggtgctgggacgcctccaagctgccctcagaggggccccagccagccacgtggtagtggcgacgttcggcagggcgccgatgtgg  
acaagaccgtggctgggacggcgtgtcgtgtgtgtgtgggcaccggcagtgacctcagtcctaccacagtgatgtccgaggggtgcccga  
acattgtggcagccatgaaggccatggcgtggacaaggctgtggcgtgcacctcggccttctgtacgggacctggccaccgtgccccac  
gactgcaggctgtgaccgatgaccacatccggatgcacaacgtgtgaaggagtcgggcctgaagtacgtggccgtgatgccaccacacatag  
ccggagaccagccgctgactgggaagtactcagtgacctggatggacgagggccctcaggggtcatcttaaacacgacctgggccacttca  
tgtgcactgctgaccaccgatgagtatgacggccacagacacctacccctcccaccagtacgagtag

図 14-1. 各タンパク質のシーケンス配列

下線で示した配列は開始コドン若しくはシグナル配列を示す。

赤字は参照したシーケンス配列との不一致が認められた箇所を示す。

d. carbonic anhydrase 1

atggcaagtcacgactgggatacagacgccccaaatggctcctgaagaatgggtcaagctgtaccccatcgcgaaatggaaataaccagtcctc  
ttgatattaaaaccagtgaacccaacatgacacttccctaaaaccttcagtgctcctacgatccagccacagctaaagaaattgtcaacgtggg  
acactcctccaggtaaaatcgaggacagcgataaccgatcagtgctgaaagacggctcctcctcctggaagctacaggtctccagttccattt  
cactggggcagcacagatgactatggttctgagcacaccgtggatggagtgcaaatattctgcagagcttcacctagttcactggaattctcaaagt  
actccagcttgatgaagccagctcacaggccgatggcttgccattctcggtgtttgatgaaggtgggtgaggccaacccaaaactgcagaaag  
tacttgatgccctgaacgaagttaaaactaagggcaaaaaagccccattcaaaaatttgaccttctagtctccttcatccccggattactgga  
cctactccggtctttgactcactcctcttattagagtgtaacctggatAgtctgtaaggaaaacatcagtatcagctcagaacagctggcgca  
gttccgcagctcttctgcaatgttgaggggggtaaaagctgtccccatccagcacaataaccgaccgccccagcctctgaagggcagaactgtga  
gagctttctctga

e. clusterin

atgaagactctcctgctgttgggtgggctgctgctgaccttggagaatggacaggtgctgggagacaaggcagtgctcagacagagagctccag  
gaaatgtccacgcaggggagtaactacattaataaggaaattaaaaatgccctcaagggggtgaaacagataaagaacctaatagaacaaaca  
acgaagagcgcaagtcgctgctgggcaccttagaggaagccaagaagaagaagagggtgccttaaatgataactaaggattctgaaatgaagc  
tgaaggagtcacagggggtgtgcaatgagaccatgacagccctctgggaggagtgcaagccctgcctgaagcagacctgcatgaagttctacg  
cacgtgtctgcagaagcggtcggggctggttgccaccagcttgaggagttcctgaaccagagctctcccttctacttctggtatcaacggtgac  
cgcacgactccctgctggagaacgaccggcagcagaccacgtactggacgtcatgcaggacagcttcgaccgggctccagcatcatgga  
cgaactttccaggacagatttccaccgcgagccccaagatacttactactactgccttcagctcaccacagagggtcctctcttattca  
acccaagtcccgtctgcccgaacataatgcatttccccatgtaccgccctgaactcaacgacatgttccagcctttcttgatgatccac  
caggcccaacaggccatgaatctgcacctccacagacttccgaccagctccccatgacggaattctcagaaggagacaacctgaccgcacc  
gtctgcaaggagattcgtcacaactccacgggatgcctgaagatgaaggaccagtggtgagaagtgccaggagatcttatcagtggtgactgtcgac  
caacaacccctgcagatgcagctgcggcaggagctgaacaactccctccagctcgtgagaagttcaccaagctgtacgacgagctgctgca  
gtcctaccaggagaagatgctcaacacctcctcctgctgaagcagctcaacgagcagttcagctgggtgtcccagctggcgaaacctcacgcag  
ggcgaggaccagctactatctccaggtcaccacgggtgtcttccacaattccgactccgaggttccctctggcctcactaggggtggtgtgaagctct  
ttgattcctacccatcacgggtgacggtgccagaagtagtctccaggaacaatcctaagtttatggagacgggtggcggaaaaggctctgcaggag  
taccgccagaagaaccgggaggaatga

図 14-2. 各タンパク質のシーケンス配列

下線で示した配列は開始コドン若しくはシグナル配列を示す。

赤字は参照したシーケンス配列との不一致が認められた箇所を示す。

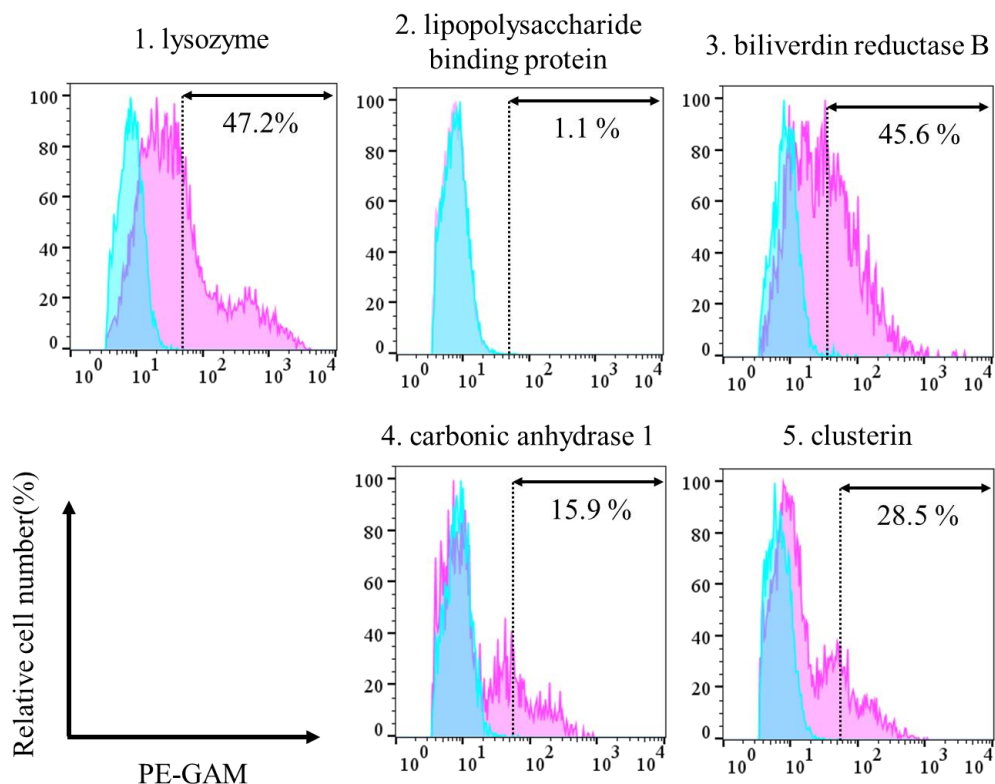


図 15. FACS を用いたウマタンパク質のレポーター細胞上の発現確認

ネガティブコントロールとして、発現ベクターが組み込まれていない BWZ.36 細胞を処理した結果を青色のヒストグラムで示し、ピンク色で示したヒストグラムは抗 myc 抗体で処理した各レポーター細胞を示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は PE による蛍光強度 (myc タグの発現) を示す。

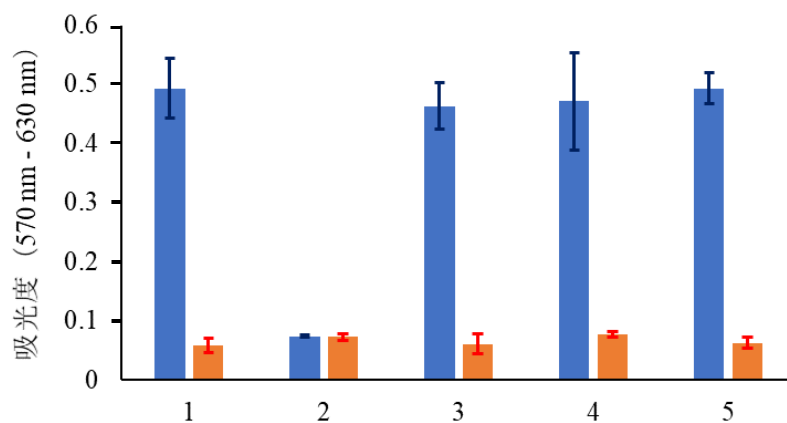


図 16. BWZ.36 レポーター細胞を用いたレポーターアッセイ

1. lysozyme、2. lipopolysaccharide binding protein、3. biliverdin reductase B、4. carbonic anhydrase 1、5. clusterin を示す。青のグラフは抗 myc 抗体を固相化した well を示し、オレンジ色はコントロールとして PBS で処理した well を示す。

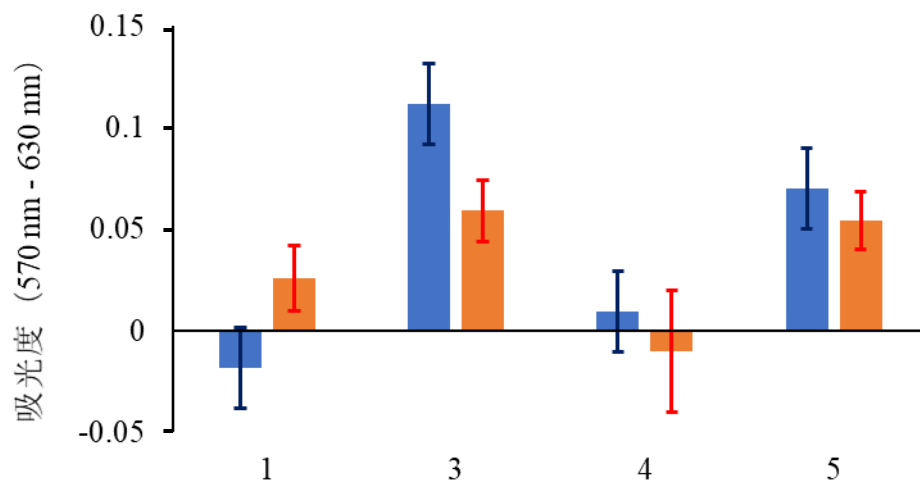


図 17. ラット血清を用いたウマタンパク質に対する抗体産生の確認

1. lysozyme、3. biliverdin reductase B、4. carbonic anhydrase 1、5. clusterin を発現するレポーター細胞を用いた結果を示す。縦軸は、免疫後の吸光度から免疫前の吸光度を減じた値を示した。なお、青で示したグラフはラット A、オレンジ色で示したグラフは異なるラット B 由来の血清を用いた結果を示す。

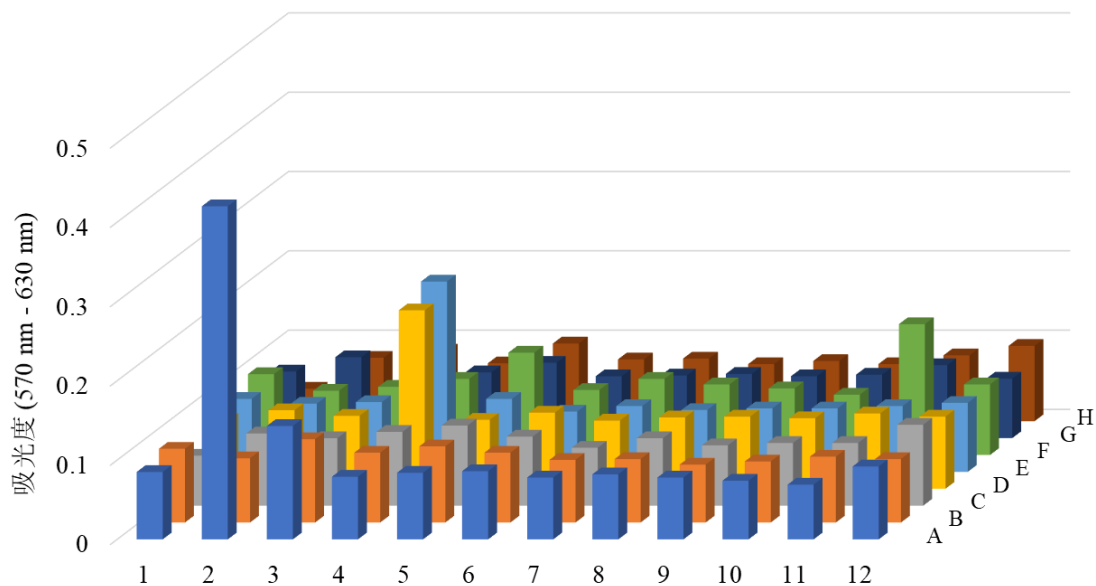


図 18. レポーターアッセイによる一次スクリーニング（一部抜粋）

A-1 はネガティブコントロール（PBS で処理した well）を示し、A-2 はポジティブコントロール（抗 myc 抗体で処理した well）を示す。

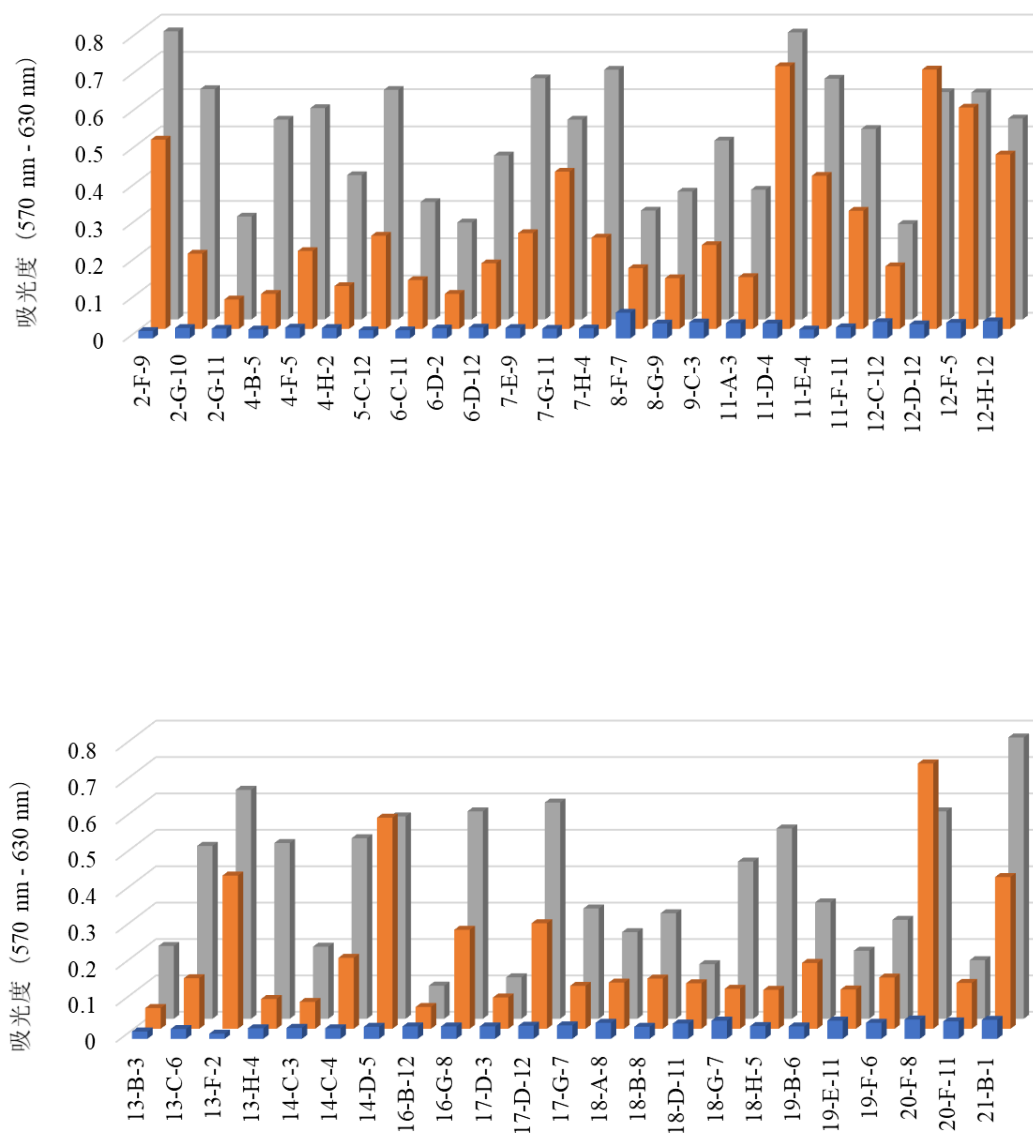


図 19. レポーターアッセイによる二次スクリーニング

青色のグラフはネガティブコントロールとしての発現ベクターを組み込まない BWZ.36 細胞、オレンジ色は biliverdin reductase B を発現するレポーター細胞、灰色は clusterin を発現するレポーター細胞を用いた結果を示す。

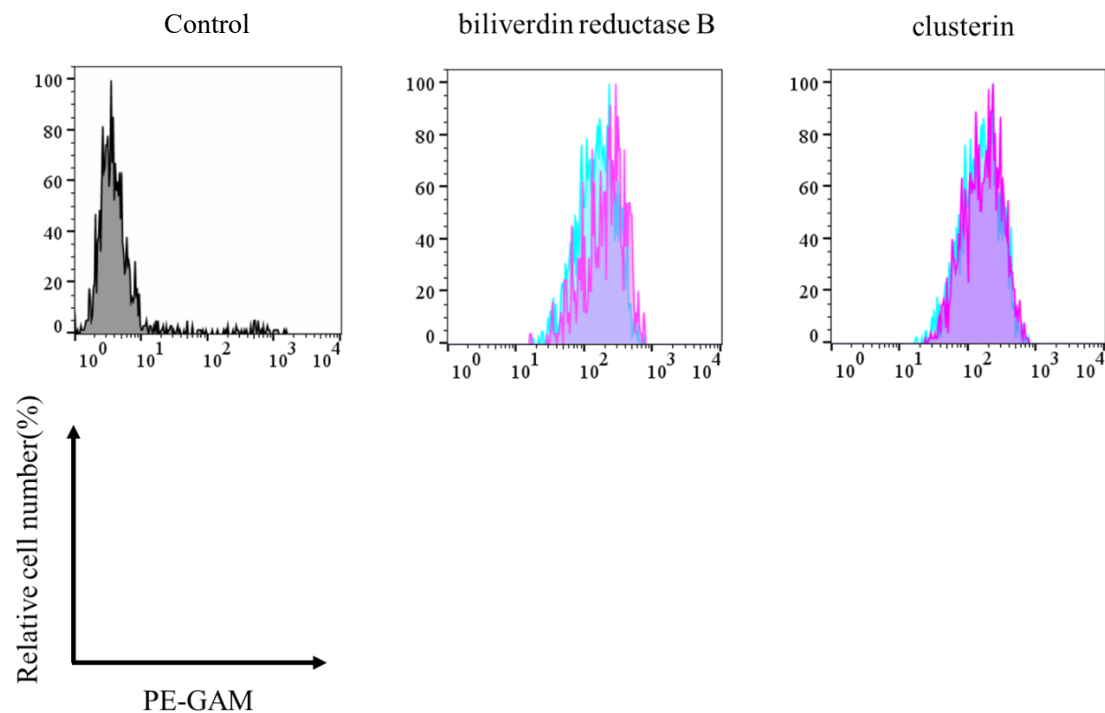


図 20-1. FACS による三次スクリーニング (12-D-12)

Control は発現ベクターを導入していない BWZ.36 細胞を二次抗体のみで処理したものを示す。ハイブリドーマの培養上清 (12-D-12) で発現ベクターを導入していない BWZ.36 細胞を処理したものを青色のヒストグラムで示し、biliverdin reductase B 若しくは clusterin を発現するレポーター細胞を処理したものをピンク色のヒストグラムで示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は PE による蛍光強度を示す。

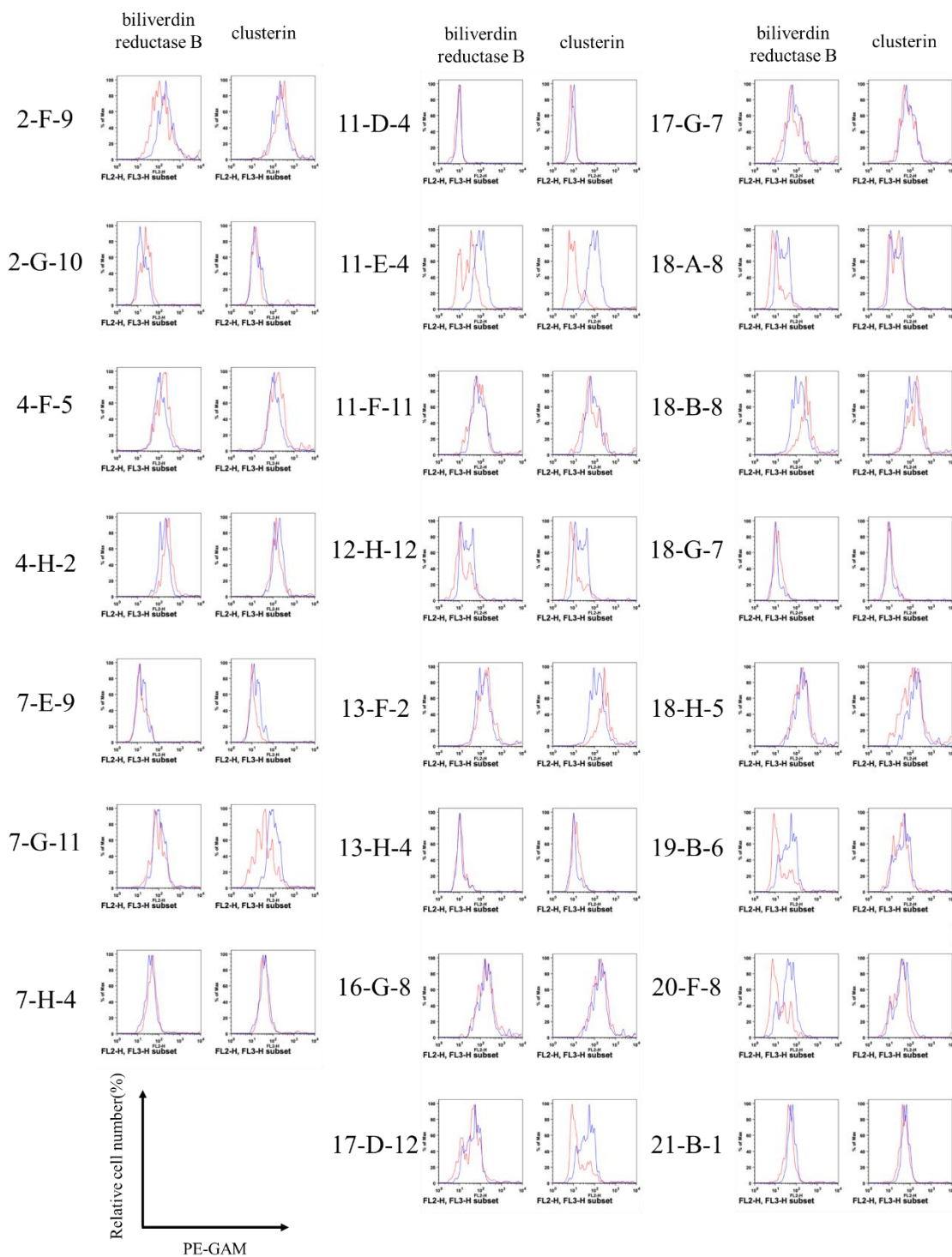


図 20-2. FACS による三次スクリーニング

発現ベクターを導入していない BWZ.36 細胞を各ハイブリドーマ培養上清で処理したものを青色のヒストグラムで示し、biliverdin reductase B 若しくは clusterin を発現するレポーター細胞を各ハイブリドーマ培養上清で処理したものを赤色のヒストグラムで示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は PE による蛍光強度を示す。

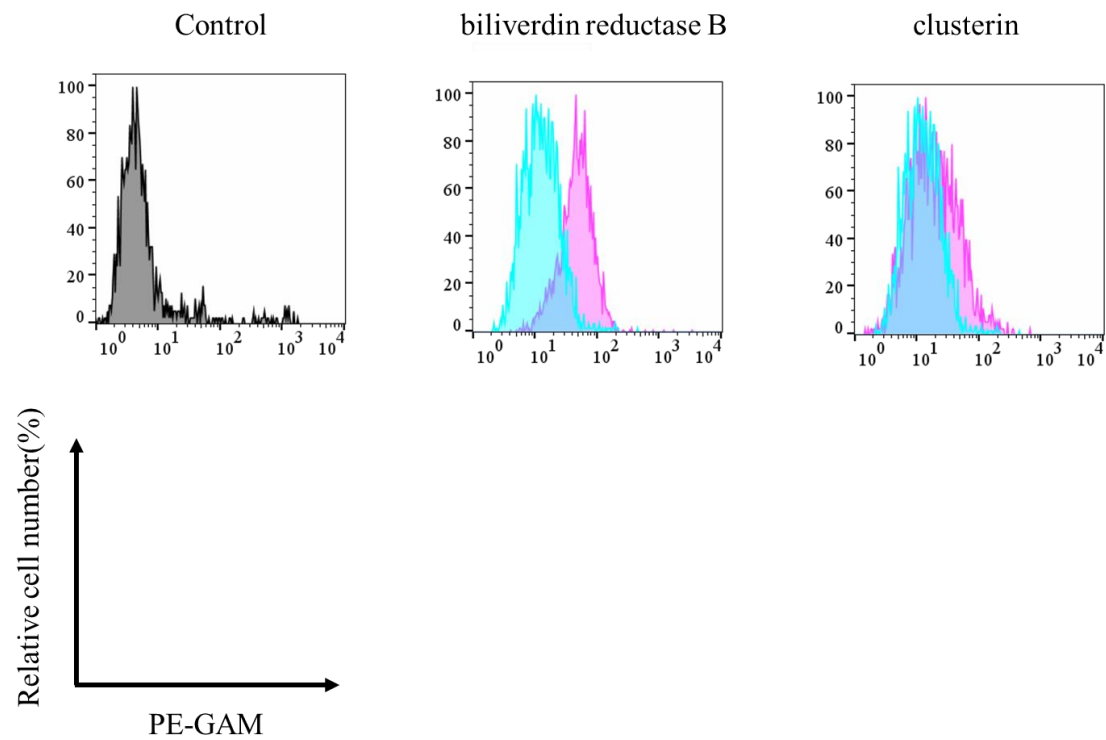


図 21-1. FACS による四次スクリーニング (2-E-12)

Control は発現ベクターを導入していない BWZ.36 細胞を二次抗体のみで処理したものを示す。ハイブリドーマの培養上清 (2-E-12) で発現ベクターを導入していない BWZ.36 細胞を処理したものを青色のヒストグラムで示し、biliverdin reductase B 若しくは clusterin を発現するレポーター細胞を処理したものをピンク色のヒストグラムで示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は PE による蛍光強度を示す。



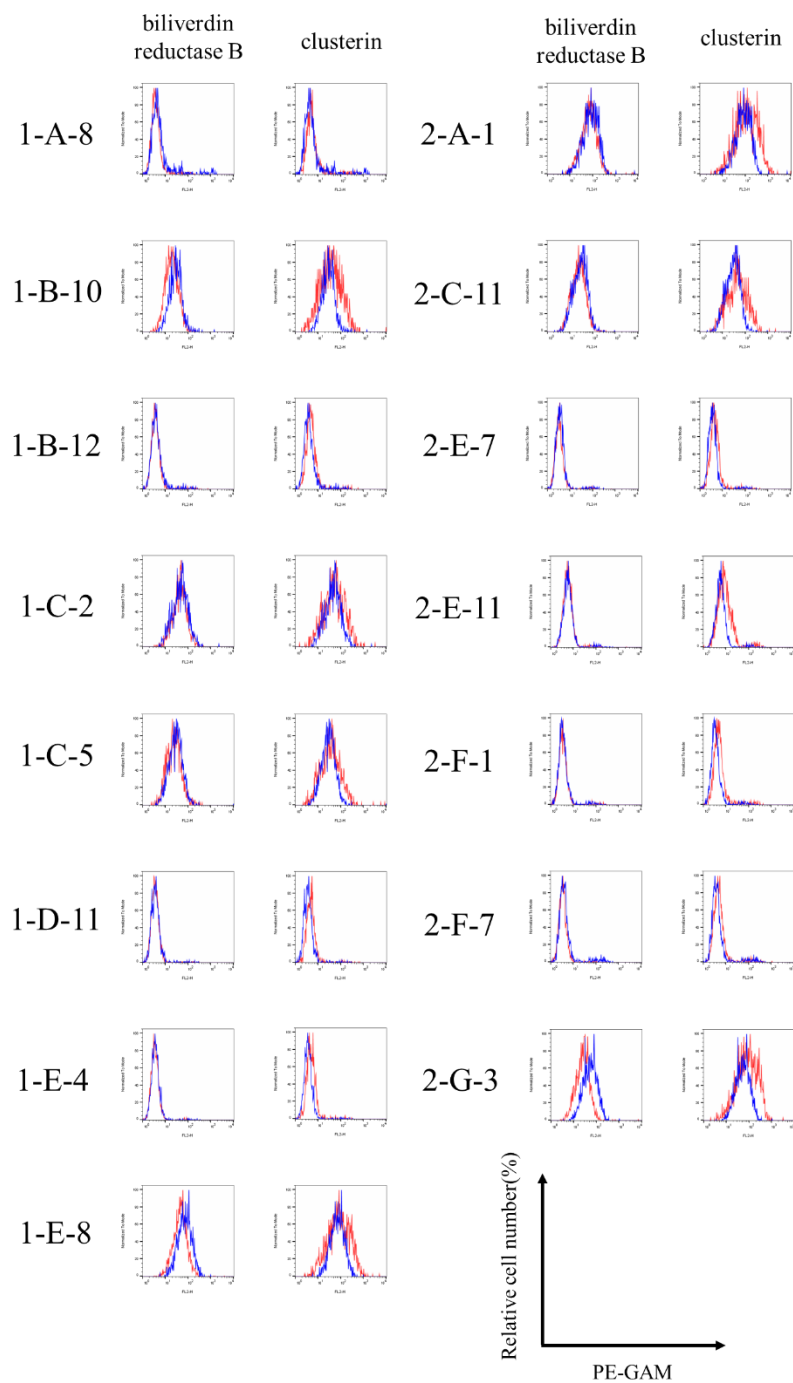


図 21-2. FACS による四次スクリーニング

各ハイブリドーマ培養上清で、発現ベクターを導入していない BWZ.36 細胞を処理したものを青色のヒストグラムで示し、biliverdin reductase B 若しくは clusterin を発現するレポーター細胞を処理したものを赤色のヒストグラムで示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は PE による蛍光強度を示す。

