

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 南島 陽平

本論文は2章からなり、第1章はウマ血清分析法の最適化、第2章は質量分析法によるウマ腸炎バイオマーカーの探索について述べられている。ウマ腸炎は、外科的手術や食餌の変更等の様々なストレスを要因とする疾患であり、突発的で極めて進行が早く、致死率の高い疾患として知られている。ウマ腸炎は多彩な病態を示し、病態の詳細が未解明であることから、標準的な治療法が確立されていない。よって、腸炎の予後診断及び病態の解明に有用なバイオマーカーを発見できれば、ウマ臨床への貢献は大きいと考えられる。近年、バイオマーカー探索の手法として、試料中のタンパク質を質量分析装置で網羅的に解析する手法が用いられている。特に、タンパク質のトリプシン酵素分解によって得られたペプチド断片のアミノ酸配列を質量分析装置で決定し、その配列を基にタンパク質を同定する手法は一度に数百種ものタンパク質を同定可能であり、同時に定量的データも取得可能である。しかしながら、質量分析を使用した大規模分析は、試料調製や分析機器による測定的时间効率が悪く、コストの面からも臨床への導入は困難である。このため、ウマ臨床においては、迅速かつ検出感度の高いEnzyme-linked immunosorbent assayを応用した血清中タンパク質の濃度測定が汎用されている。本研究では、腸炎を発症したウマ血清中タンパク質を質量分析装置によって網羅的に解析し、その早期診断や予後の診断に有用なバイオマーカー探索を行うこと、また得られたバイオマーカータンパク質を迅速且つ簡便に定量可能な方法を開発するために、それらに対するモノクローナル抗体を作製することを目的とした。

本論文の第1章では、ウマ血清分析法の最適化を検討した。ヒトにおけるプロテオーム解析の報告等を参考として健常馬由来の血清を測定すると、ヒトとはさまざまな条件が異なりタンパク質同定数は122と少数であった。そこでタンパク質同定数向上のため、分析法の前処理及び分析条件の最適化を行い、トリプシン処理時間を12時間、液体クロマトグラフィーにおけるLCグラジエント条件の最適化を行った。また、質量分析装置に導入するペプチド量をコントロールするオートゲインコントロール (AGC) target について、Full MS については300,000、dd-MS2 においては100,000とした。さらに高濃度タンパク質存在下における低濃度タンパク質の同定率の低下を抑えるためのDynamic exclusion time 値をタンパク質同定数が最も高くなるように調節し、10 msec とした。このような最適化により、タンパク質同定数が198に改善した。また、サンプル調製前のウマ血清に内標準物質としてウシ由来 $\beta$ -ラクトグロブリンを1  $\mu$ g 添加し、これに由来するペプチドイオンTPEVDDEALEKの強度の変動係数CVが全サンプル間で20%以内に収まることを確認した。

第2章では、健常馬36頭及び腸炎発症馬12頭由来の血清を用いて、質量分析法による腸炎バイオマーカーの探索を行った。腸炎発症馬の血清は、ウマが診療所に来所した日（day 1）から、退院若しくは死亡日まで1日1回経時的に採取し、得られた血清をプロテオーム解析に供した。解析の結果、292種類のタンパク質の同定および定量的データを得た。本データに基づき、腸炎-健常群間、さらに腸炎群における生存-死亡群間でMann-WhitneyのU検定を実施した。なお、両群間で2倍以上の増減が見られ、且つ $p$ 値が0.05以下を示したタンパク質について有意差ありとした。その結果、腸炎-健常群間で有意差を示したタンパク質を8種類見出し、これらは全て腸炎群で増加していた。これら8種類のタンパク質について予後との関連性を調べたところ biliverdin reductase Bが有意に死亡群で上昇していることが分かったことから、biliverdin reductase Bが腸炎の予後診断に有用なマーカーであることが示唆された。

2章の後半では、上記で見出したバイオマーカー候補分子に対するモノクローナル抗体の作成を行った。6種類のタンパク質に対するcDNAをPCRクローニングによって単離し、発現ベクター pMXs-puroに組み込んだ。取得したcDNAのN末端側にmyc-tag、C末端側にCD8 $\alpha$ の膜貫通ドメインとCD3 $\zeta$ を繋ぎ、レポーター細胞BWZ.36に発現させた。これをラットに免疫した後、脾臓および膝下リンパ節からリンパ球を単離し、ミエローマ細胞PAIと融合させた。ハイブリドーマをクローン化することにより、培養上清にbiliverdin reductase Bと特異的に反応する抗体を取得した。これによりより簡便、かつ高感度な検査法が確立でき、ウマ腸炎の診断ならびに予後の推定に役立つものと期待された。

以上の結果は博士論文として、今まで深く検討されていなかったウマ腸炎の診断に科学的根拠のある診断法を提案するものとして十分に評価できるものであり、博士の学位を与えるに十分と考えられた。よって本論文は博士（生命科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 2,112 字