

学位論文題名

ウマにおけるストレス指標物質としての  
クロモグラニンAに関する研究

学位論文内容の要旨

ウマの交感神経機能およびストレスに対する生体応答を簡便かつ客観的な方法で測定することができれば、競走馬の運動適応状態や精神状態の把握が可能となり、飼養管理上、極めて有用な情報として活用できる。現在、ストレス状態を評価する指標として主にカテコールアミン（CA）やコルチゾールの測定が行われているが、CA やコルチゾールの測定は、測定方法の特殊性から臨床現場ではあまり普及していない。一方、クロモグラニンA（CgA）は副腎髄質や交感神経系の分泌顆粒内に多量に存在し、ストレス反応時に CA と共に放出されるタンパク質である。血中 CgA 値は運動や心理的ストレス負荷により上昇することが知られている。さらに近年、CgA が唾液中にも存在し、心理的ストレスによって唾液中濃度が上昇することから、非観血的な指標としても有用である。

そこで、本研究では競走馬の簡便なストレス評価法を確立することを目的に、CgA に着目し、その生化学的性状を明らかにするとともに、免疫学的測定系（EIA系）を導入することにより臨床応用上の意義を明らかにした。

第1章では、ウマ CgA cDNA のクローニングを行い、そこから推定されるアミノ酸配列および分子生化学的特徴を明らかにした。その結果、448 個のウマ CgA アミノ酸翻訳領域を有する、全長 1,842bp のウマ CgA cDNA を得た。解読したウマ CgA cDNA の塩基配列から翻訳されるアミノ酸配列は CgA に特徴的である両末端部分で高い相同性を示し、切断修飾部位も動物種間で良く保存されていた。さらに、ノザンプロット解析と RT-PCR を行った結果、CgA の発現量が多い副腎髄質と下垂体を中心にさまざまな臓器における発現を認めた。In situ hybridization を行った結果、副腎髄質のほぼ全ての内分泌細胞、下垂体前・中葉の一部の細胞での発現を細胞レベルで示すことができた。今回、解読したウマ CgA の cDNA 塩基配列およびアミノ酸配列に関する情報は、今後、CgA の研究を遂行していく上で有用な手段になると思われた。

第2章では、ウマ CgA EIA 系の確立を目的として、前章で明らかにしたウマ CgA アミノ酸配列を基にペプチド抗原を合成し、部位特異抗体の作製および EIA 系の

開発を行った。抗原ペプチドは、ヒトにおいて血中での安定性が報告されているヒト CgA (359-389) に相当するウマ CgA (335-365) を用いた。得られたウサギ抗体は高い抗原結合能力を有し、ウエスタンブロット解析では副腎髄質や唾液腺組織中の CgA を高感度に認識した。本抗体と標識および標準抗原としてウマ CgA (335-365) 合成ペプチドを用いて、競合法による EIA 系の確立を行った結果、ウマ血漿および唾液中 CgA を高感度に認識する測定系を確立することができた。この測定系は同時再現性、日差再現性および添加回収試験の結果においても良好な成績が得られた。さらに、ゲル濾過法により血漿および唾液中の反応物質を解析したところ、ウエスタンブロット解析の反応産物とほぼ同じ分子量を持つ物質であることが示され、本測定系がウマ CgA に特異的であることが確認された。また、免疫組織化学的検索により、CgA が唾液腺の分泌顆粒内に局在していることを明らかにし、ウマ唾液中に高濃度に存在する CgA は唾液腺で産生されることが示された。

第 3 章では、第 2 章で確立したウマ CgA 定量系の臨床応用を行うことを目的に、耳下腺および顎下腺の CgA 分泌動態、血中および唾液中 CgA の日内変動とストレス負荷時の変動に関する基礎的研究を行った。

全身麻酔下のサラブレッドを用いて耳下腺および顎下腺を薬物（ノルアドレナリン:NA、アセチルコリン:Ach）刺激し、各唾液腺導管に分泌される唾液中の CgA 濃度を測定したところ、Ach-NA 混合溶液の刺激により高濃度の CgA を含む粘液性の唾液が多量に分泌される様子が観察された。このことより、自律神経の興奮により唾液中 CgA 濃度が上昇する可能性が示された。

血中 CgA 濃度は日内変動を示し、交感神経活動の高まる日中に高くなり、夜間に低くなった。一方、唾液中 CgA 値は各時点での変動が大きいことから、周期的な変動を示さなかった。

運動刺激により、血中および唾液中 CgA 濃度は有意に上昇した。特に、唾液中 CgA 濃度は運動刺激により敏感に上昇することが明らかになり、肉体的ストレスに対する非侵襲的な指標として有用であることが示された。

新奇環境ストレス負荷により、血中 CgA 濃度は上昇する傾向を示し、唾液中 CgA 濃度は有意な上昇を示した。新奇環境刺激による心拍数の上昇程度の低い群、中程度の群、高い群に分けて解析すると、血中アドレナリン濃度および唾液中 CgA 濃度は心拍数上昇率の高い群ほど高くなった。このことから、唾液中 CgA 濃度は普段からの交感神経-副腎髄質系の活性状態を反映していると考えられ、ウマの気質を評価する新しい指標として有用であることが示唆された。

本研究で確立した血中および唾液中の CgA 測定系は、CA 測定に比較して再現性が良く簡便な方法であるとともに、ウマの肉体的および精神的ストレスを客観的に評価する方法となりうることを示された。競走馬のストレス応答に関する研究は優れた競走能力を解明する手がかりとなるばかりでなく、各個体の気質の判断

やコンディションづくりにも応用できると考えられる。今後、この分野の研究はますます重要性が高くなると考えられることから、本研究の成果にさらなる検討を重ね、CgAに関する研究が発展していくことを期待する。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之  
副 査 教 授 藤 永 徹  
副 査 教 授 岩 永 敏 彦 (医学研究科)  
副 査 助 教 授 木 村 和 弘

## 学位論文題名

### ウマにおけるストレス指標物質としての クロモグラニンAに関する研究

ウマの交感神経機能およびストレスに対する生体応答を、簡便かつ客観的な方法で測定することができれば、競走馬の運動適応状態や精神状態の把握が可能となり、飼養管理上、極めて有用である。本学位論文は、競走馬の簡便なストレス評価法を確立することを目的に、副腎髄質や交感神経から分泌されるクロモグラニン (CgA) に着目し、その分子性を明らかにし、免疫学的測定系 (EIA) を確立して臨床応用上の意義を検討したものである。

第1章では、ウマ CgA cDNA をクローニングし、448 アミノ酸の翻訳領域を有する全長 1,842bp の cDNA を得た。推定されるウマ CgA のアミノ酸配列を他動物種と比較すると、CgA に特徴的である両末端部分で高い相同性を示し、切断修飾部位も良く保存されていた。さらに、ノザンプロットや In situ hybridization 解析などにより副腎髄質と下垂体を中心にさまざまな臓器における発現を確認した。

第2章では、前章で明らかにしたウマ CgA アミノ酸配列を基にペプチド抗原を合成し、部位特異抗体をウサギで作製した。得られた抗体は高い抗原結合能力を有し、ウエスタンプロット解析では副腎髄質や唾液腺組織中の CgA を高感度に認識した。そこで本抗体を用いて競合法による EIA を作成し、ウマ血漿および唾液中 CgA を定量する条件を確立した。更に、免疫組織化学的検索により、CgA が唾液腺の分泌顆粒内に局在しており、ウマ唾液中に高濃度に存在する CgA は唾液腺で産生されることを明らかにした。

第3章では、確立したウマ CgA の EIA を用いて、唾液腺の CgA 分泌動態、および種々の生理的条件下での血中と唾液中 CgA 濃度の変動について検討した。全身麻酔下のサラブレッドを用いて、耳下腺および顎下腺をノルアドレナリンやアセチルコリンで刺激し、唾液中の CgA 濃度を測定したところ、高濃度の CgA を含む粘性性の唾液が多量に分泌されることがわかった。一方、血中 CgA 濃度は日内変動を示し、交感神経活動の高まる昼間に高値となり、夜間に低下した。また、運動刺激や新奇環境ストレス負荷により、血中および唾液中 CgA 濃度が上昇し、特に、唾液中 CgA 濃度の変化が顕著であった。こ

これらの結果から、唾液中 CgA 濃度は交感神経-副腎髄質系の活動状態を反映しており、ウマの気質を評価する新しい指標となりうることが示された。

以上のように、本研究で確立したウマの血中および唾液中の CgA 測定系は、再現性が良く簡便であり、ウマの肉体的および精神的ストレスを客観的に評価する方法の一つであることが示された。よって審査員一同は、上記学位論文提出者佐藤文夫氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。