

平成26年度日本獣医生命科学大学若手研究者研究支援経費 (研究成果報告書)

1. 高速液体クロマトグラフィーによる環境水中のクロムの分別定量法の確立と保存方法の検討

研究代表者 獣医学部 講師 小林 淳

研究実績の概要

環境中あるいは生体中において、クロム (Cr) は主に6価 (Cr (VI)) あるいは3価 (Cr (III)) の形態で存在している。興味深いことに、同じCrという元素でありながら、Cr (III) は人や動物にとって必須であると考えられ、他方Cr (VI) は高い毒性を示すことが知られており、有害物質として水質汚濁などの環境規制の対象となっている。この両者は、存在条件により容易に相互変換されると考えられる。これらのことは、環境水や飲料水、工場排水などの安全性を考える上で、Crの形態別分析を高精度に行う必要があることを示す。

我々は、このようなCrの形態別分析に、Cr (III) がEDTAと陰イオン性キレートを生成すること、Cr (VI) も重クロム酸やクロム酸など陰イオンとして水中に存在していると考えられるため、陰イオンとして同時分析する方法を創案した。また検出法として、HPLCの繁用検出器であるUV-VIS検出器を用いた吸光度検出イオンクロマトグラフィーに着目した。吸光度検出する方法としては、対象化合物とカラムで置換された溶離液イオンの間接吸光度を検出する方法もあるが、対象とした化合物はいずれも有色なため、直接吸光度検出を行うことにした。酸性pHで、対象化合物の可視部の光吸収をとらえることにより、良好な分離・検出が可能であることを確認した。

他方、今回利用したCr (III)-EDTAは生成に時間を要する。これは解離も起こりにくいことを示すものであり、一度生成したものはカラム上などで分解しにくく、分析に適用しやすいと考えることが可能である一方、一度キレート状態になると、空気酸化等による形態変化を防ぐ可能性も考えられる。今回は、採取した試料の前処理として、pH調整とEDTA化合物添加を行うことで、Crの形態分析のための試料保存安定化を可能とした。

研究発表

[雑誌論文]

J. Kobayashi, K. Ikeda, H. Terada, M. Mochizuki, H. Sugiyama, HPLC Determination of Caffeine Using a Photodiode Array Detector and Applying a Derivative Processing to Chromatograms, *Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ.*, **63**, 2014.

J. Kobayashi, K. Ikeda, H. Sugiyama, Changes in the Concentrations of Inorganic Compounds in Domestic Bath Water in Japan with Re-use of the Water, *Bull.*

Nippon Vet. Life Sci. Univ., **63**, 2014.

[学会発表]

小林淳, 池田啓一, 寺田宙, 杉山英男, ICP-MSによるペットフード中金属の一斉分析, 日本分析化学会第63年会, 平成26年9月19日, 広島大学東広島キャンパス.

小林淳, 小林茉由奈, 池田啓一, 杉山英男, 食品抽出液内での亜硝酸の安定性向上, 日本薬学会第135年会, 平成27年3月28日, 神戸サンボーホール

※本研究の成果は、助成金採択時期の問題もあり、平成26年度中には公表できなかった。しかし、平成27年度の日本分析化学会第64年会(9月に九州大学伊都キャンパス)において発表予定であることを申し添える。

2. 精製ラクtofエリン画分に存在する酸性ホスファターゼの機能性について

研究代表者 乳肉利用学教室 講師 三浦孝之

研究実績の概要

【研究背景および目的】申請者は牛乳から精製したラクtofエリン画分(または市販ラクtofエリン標品)の中に酒石酸耐性型ホスファターゼ(TRAP)ファミリーに属する「ウテロフェリン様タンパク質(UF-AcP)」が存在することを明らかにした(平成23年度報告)。また昨年度はUF-AcPが「破骨細胞の増殖・分化」に関わるかどうかを検討したところ、UF-AcPが破骨細胞の分化を抑制する可能性を見いだしている。一方、近年では精製ラクtofエリン画分にラクtofエリン結合性の微量タンパク質が複数混在することが報告されている。申請者らが単離精製したUF-AcP画分は約37 kDaのシングルバンドを確認しているが、同じ分子量域で他の微量成分が夾雑している恐れがある。夾雑分子の有無を明らかにするため、本研究ではLC-MS/MS分析を用いて、上記画分中タンパク質の同定を試みた。【方法】陽イオン交換クロマトグラフィー、およびゲル濾過クロマトグラフィーを用い、生乳からUF-AcP画分を得た。同画分をSDS電気泳動後、ゲルを銀染色した。染色されたタンパク質のバンド(37 kDa)をゲルから切り出し、トリプシンでゲル内消化した試料をLC-MS/MSに供した。

【結果】LC-MS/MS分析で得られたスペクトルデータはMASCOT Serverを用いてNCBIデータベースから該当するタンパク質を検索した。データベースに100%合致したタンパク質はおおよそ18種類。このうち、ヒト由来あるいは試料作成時の混入と思われるタンパク質(ケラチンなど)を除くと、ラクtofエリン(78 kDa)、β-ラクtofグロブリン(20 kDa)、リポプロテイン(27 kDa)、UF-AcP

(38 kDa) および FGF-binding プロテイン (26 kDa) 等、ウシ由来のタンパク質が 6 種類推定された。今回推定されたタンパク質の分子量は様々であるが、本実験では約 37 kDa のバンドを切り出しているため、夾雑するタンパク質の相対量としては UF-AcP が多いと考えられる。本研究の結果は、これまでの研究で得られた UF-AcP 画分の生理的機能性を立証するためにも重要な結果であると考えられる。

3. 新規共抑制分子 DC-HIL を標的とした犬悪性黒色腫に対する新たな免疫療法の確立

研究代表者 獣医臨床病理学研究室 助教 田村恭一
研究実績の概要

抗原提示細胞が発現する共抑制分子として最近同定された DC-HIL はマウスおよびヒトの悪性黒色腫細胞においても発現していることから、悪性黒色腫細胞が発現する DC-HIL が腫瘍増殖および免疫系に与える影響について検討した。はじめに、野生型悪性黒色腫株化細胞および DC-HIL ノックダウン悪性黒色腫株化細胞をマウスに皮下接種し、腫瘍体積を継続的に測定し、また同時に IL-2 や IFN-g などの活性化サイトカインおよび IL-10 や TGF- β などの抑制性サイトカインの血清中濃度を ELISA 法で測定した。次いで、野生型マウスおよび DC-HIL ノックアウトマウスに悪性黒色腫株化細胞を皮下接種し、腫瘍体積を継続的に測定し、種々の血清サイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。これらの結果から、悪性黒色腫細胞が発現する DC-HIL は T 細胞の活性化を抑制し、免疫寛容を引き起こしていることが明らかとなった。

さらに、悪性黒色腫細胞は細胞表面上に DC-HIL を発現しているだけでなく可溶性 DC-HIL を産生していることを明らかにした。そこで、腫瘍細胞が産生する可溶性 DC-HIL がどのように腫瘍増生の促進に関与しているのかを検討した。その結果、担癌個体において悪性黒色腫細胞が産生する可溶性 DC-HIL は血液中にも存在し、免疫細胞の活性化を抑制することを示した。このことから、悪性黒色腫細胞は細胞表面上に DC-HIL を発現することにより腫瘍局所における T 細胞の不活化を誘導するだけでなく、可溶性 DC-HIL を循環血液中に放出することで全身性に腫瘍免疫応答の抑制を引き起こしていると考えられた。また、犬の悪性黒色腫においても腫瘍細胞に DC-HIL を発現している例が存在し、DC-HIL が発現している症例では DC ワクチンによる免疫誘導が十分認められないことを明らかにした。このことから、犬の悪性腫瘍においても DC-HIL は免疫誘導効果を阻害すると推測された。これらのことから、犬の悪性腫瘍に対する免疫療法においても、DC-HIL の機能を制御することで、より効果的な抗腫瘍免疫応答の誘導が可能になると考えられる。

研究発表

〔雑誌論文〕

Chung JS, Tamura K, Cruz PD Jr, Ariizumi K, DC-HIL-Expressing Myelomonocytic Cells Are Critical Promoters of Melanoma Growth, *Journal of Investigative Dermatology*, 134, 2784-94, 2014, doi: 10.1038/jid.2014.254. 2014.

Turrentine J, Chung JS, Nezafati K, Tamura K, Harker-Murray A, Huth J, Sharma RR, Harker DB, Ariizumi K, Cruz PD Jr, DC-HIL+ CD14+ HLA-DR $^{\text{no}}$ /low Cells Are a Potential Blood Marker and Therapeutic Target for Melanoma, *Journal of Investigative Dermatology*, 134, 2839-42, 2014, doi: 10.1038/jid.2014.248. 2014.

〔学会発表〕

田村恭一、血液塗抹のセルフチェック、日本獣医臨床病理学会 2014 年大会、平成 26 年 6 月 1 日、東京

田村恭一、犬のがん細胞における免疫抑制因子と免疫病態、第 3 回動物臨床免疫療法研究会、平成 26 年 10 月 4 日、大阪

4. ネコ鼻腔内リンパ腫を用いた放射線感受性関連因子探索と検証

研究代表者 臨床獣医学部門治療学分野 I 助教 藤原亜紀
研究実績の概要

申請者（藤原）は昨年度の研究において、ネコ鼻腔内リンパ腫症例における低分割放射線治療効果の回顧的調査を実施した（研究課題名：ネコ鼻腔内リンパ腫を用いた放射線感受性関連因子探索の基礎的研究）。その結果、研究対象となったのは 29 頭であり、生存期間 1 年未満の短期生存群と、1 年以上の長期生存群の存在が明らかとなり、ネコ鼻腔内リンパ腫において放射線感受性の異なる 2 群が存在することが示唆された。本研究結果は *The Veterinary Journal* 誌に掲載された。

これら背景より何らかの分子の発現や分子機構の違いが放射線感受性を決定づけていると仮説を立て、ネコリンパ腫細胞株を用いた放射線感受性試験を実施した。動物由来腫瘍細胞を研究材料として樹立されたネコのリンパ腫細胞株 7 種に対し、さまざまな線量を照射し線量-生存率曲線を作製した。それぞれの細胞株における D50 (50% 生存線量値) を算出し、放射線高感受性株と抵抗性株を決定した。またすでに予後が判明している猫鼻腔内リンパ腫症例由来腫瘍細胞を 3 サンプルずつ、放射線放射線高感受性株と抵抗性株をトランスクリプトーム解析に供試し現在解析中である。網羅的解析の後、放射線感受性に関連すると考えられる候補遺伝子を決定した後、複数の症例サンプルを用いて検証を実施予定である。

本研究において決定された放射線感受性関連分子を猫リンパ腫細胞における機能解析・ジェネティックおよびエピジェネティックな制御機構を解明することで、病態解明の

一助となる事が期待できる。また将来的には症例個々に対する照射計画の提供・遺伝子治療・エピジェネティック治療などオーダーメイド治療の提供を行うことを最終目的とする。

研究発表

[雑誌論文]

Fujiwara-Igarashi, A. et al., Evaluation of outcomes and radiation complications in 65 cats with nasal tumours treated with palliative hypofractionated radiotherapy, *The Veterinary Journal*, **202** (3), 455-61, 2014, 10.1016/j.tvjl.2014.09.016.

Fujiwara-Igarashi, A. et al., Expression profile of circulating serum microRNAs in dogs with lymphoma, *The Veterinary Journal*, In press, 2015, 10.1016/j.tvjl.2015.04.029.

[学会発表]

藤原亜紀, リンパ腫を制覇する 鼻腔内リンパ腫の治療アップデート, 第1回猫の集会, 2014年6月29日, 品川

藤原亜紀, 犬リンパ系腫瘍における癌抑制遺伝子 p16 のジェネティックおよびエピジェネティックな異常, 第12回日本獣医がん学会, 2015年1月24日, 大阪

藤原亜紀, 鼻腔疾患に挑む～私はこうしている～鼻腔腫瘍の治療, 第11日本獣医内科学アカデミー, 2015年2月21日, 横浜

藤原亜紀, CT画像の基礎のきそ, 第11日本獣医内科学アカデミー, 2015年2月21日, 横浜

藤原亜紀ら, 猫高悪性度リンパ腫症例における末梢血中の微小残存病変 (MRD) 測定の有効性検討, 第11日本獣医内科学アカデミー, 2015年2月21日, 横浜

5. 僧帽弁閉鎖不全症患者の手術時における非観血的血圧測定法の評価

研究代表者 付属動物医療センター 助手 鈴木周二

研究実績の概要

付属動物医療センターで全身麻酔下にて外科手術を行う21症例で手術中に観血的および非観血的な血圧測定を行った。観血的測定に関しては、手術内容により観血的測定が必要な症例は大動脈から侵襲的に行う。それ以外の症例ではほぼ侵襲のない足背動脈の留置を行った。術中の観血的測定は24Gの留置針を大動脈または足背動脈に挿入した後、麻酔モニタ (動物用モニタ BSM-5192 ライフスコープ A, 日本光電株式会社) につないで実施した。同時に携帯型の非観血的血圧測定装置 (petMAP, 株式会社 AVS) の2種類の装置を用いて実施した。非観血的血圧の測定部位は前肢に統一した。観血的血圧測定値と非観血的血圧値の値を統計処理した結果はいずれも有意な正の相関関係を示し、以下の通りとなった。

収縮期血圧 ($r=0.784$, $p<0.001$), 平均血圧 ($r=0.438$, $p<0.001$), 拡張期血圧 ($r=0.162$, $p<0.001$)。

本研究結果より非観血的測定の数値は収縮期, 平均, 拡張期いずれも有意な相関を示すが, その信頼性は収縮期, 平均, 拡張期の順に乏しくなることが示唆された。また, この結果において, 圧が低くなればなるほど測定値に差が生じやすい可能性が示された。そのため, 本研究結果は手術中に血圧が低下しやすい重症な床例では非観血的血圧測定は測定値に誤差が生じやすく, その値の解釈については注意しなければならないと考えられる。

本研究結果の一部は招待講演において発表を行っているが (2014年9月: 日本獣医学会学術集会), 予定している症例数にまだ達していないため ($n=40$), 今後も症例数を重ねてゆき, 発表および論文としてまとめ報告したいと考えている。

研究発表

[雑誌論文]

Nakata TM, Tanaka R, Hamabe L, Yoshiyuki R, Kim S, Suzuki S, Aytemiz D, Huai-Che H, Shimizu M, Fukushima R, Transarterial coil embolization of an abdominal aortocaval fistula in a dog, *Journal of veterinary internal medicine*, **28** (2), 656-660, 2014, 10.1111/jvim.12308.

[学会発表]

鈴木周二, 犬僧帽弁閉鎖不全症における左心房圧の実測値に基づいた治療薬の選択, 第157回日本獣医学会学術集会, 2014年9月11日, 北海道大学

6. 身体障害者補助犬の腫瘍死に関する調査及び腫瘍死の抑制に向けたがん関連遺伝子の解析

研究代表者 獣医保健看護学臨床部門 講師 皆上大吾
研究実績の概要

平成26年度は身体障害者補助犬の腫瘍死に関する調査の基盤形成を中心に研究を実施した。補助犬育成施設は多数あるが, 本学より最も近い場所に位置する日本盲導犬協会より調査を開始している。日本盲導犬協会にて保存されている死亡した盲導犬の全カルテを調査し, 疫学調査 (各個体の個体情報, 死亡原因, 死亡時年齢の調査) を実施中である。また, 死亡個体および現存の補助犬 (訓練犬, 現役犬, 引退犬) 各個体の血統証明書より本犬, 両親犬, 両親父母犬および曾祖父母犬の血統を遡り, 3世代までの情報から家系図を作成中である。これらの結果より, 腫瘍性疾患により死亡した個体を当てはめて腫瘍の好発家系を抽出し, 調査する予定である。さらに, 日本盲導犬協会に在籍している盲導犬30頭の血液からゲノムDNAを抽出し, 個体番号を付与して補助犬のゲノムバンクを作成している。前述の方法で得られた腫瘍好発家系の情報とゲノムバンクを用い, 腫瘍好発家系におけるがん関連遺伝子変異・SNPの解析を実施する予定である。集積されたゲノムバンクを用いて一部の遺伝子解析を行っているが, ほとんどの研究項目に関しては現在のところデータ集積を行っている

る段階であり，成果については今年度以降に発表する予定である。

研究発表

〔雑誌論文〕

Miyabe M, Gin A, Onozawa E, Daimon M, Yamada H,

Oda H, Mori A, Momota Y, Azakami D, Yamamoto I, Mochizuki M, Sako T, Tamura K, Ishioka K, Genetic variants of the unsaturated fatty acid receptor GPR120 relating to obesity in dogs, *Journal of Veterinary Medical Science*, 2015, Epub ahead of print.