

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580372

研究課題名（和文） 犬のワクチン接種後アナフィラキシーの原因検査システムの構築とその臨床応用

研究課題名（英文） Establishment of assay system for vaccination adverse reaction and its clinical application.

## 研究代表者

増田 健一（MASUDA KENICHI）

独立行政法人理化学研究所・ワクチンデザイン研究チーム・客員研究員

研究者番号：40313077

## 研究成果の概要（和文）：

牛血清アルブミンに対するマウス IgE モノクローナル抗体を作製することができなかったため、牛血清アルブミンに対する IgG モノクローナル抗体を作製し、その抗体可変領域の遺伝子配列を同定することで、将来的に組換タンパク質として犬 IgE を作製することとした。PK テストによる IgE 血清濃度と生体の発症閾値の検討については、卵アレルギーでは膨疹反応がみられず、実験に使用するアレルギーを再検討する必要があった。

## 研究成果の概要（英文）：

Recognition site of mouse IgG monoclonal antibody to bovine serum albumin was sequenced for development of recombinant canine IgE against bovine serum albumin. A threshold of serum IgE concentration to induce in vivo allergic reaction was examined with PK test; however, ideal results were not obtained. It is necessary to select allergens used for this study.

## 交付決定額

（金額単

位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：マウス、イヌ、ウシ血清アルブミン、IgE、IgG、ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

犬のワクチン接種後アナフィラキシーは

犬用ワクチン製剤の接種後数時間から数日

の間に起こる全身性の不具合を指す。その症状には、一時的な元気消失から顔面腫脹、重症例になるとアナフィラキシーショックまで様々なものがある。とくにショック死に至るものは獣医臨床現場では重要な問題であり、ワクチン接種による死亡事故となるためこれらを回避することは臨床獣医師、獣医学研究者として急務である。

犬のワクチン接種後アナフィラキシーの原因のひとつは牛血清アルブミンであることが報告されている。犬用ワクチンには牛血清アルブミンが残留しており、ワクチン接種により牛血清アルブミンに対してIgEを産生してしまう個体が存在することがわかっている。その個体が再びワクチン接種を受けた際に、すでに獲得した牛血清アルブミンに対するIgEを介してワクチン接種後アナフィラキシーが起こるとされている。

そこで、本研究においては、牛血清アルブミンに対する犬IgEの上昇を確認する検査システムを構築することを考えた。この検査によって、牛血清アルブミンに対するIgEが高い犬の個体を判別することが可能となり、臨床現場の獣医師はそれら個体へのワクチン接種について考慮することができる。また、近年我々は、抗マウス×犬IgE抗体を用いてマウスのIgE測定系を犬に応用することに成功した。このシステムによって犬においてアレルギー特異的IgE定量システムを完成させたことから、牛血清アルブミンのIgEを測定に応用できないかと考えた。それによって、牛血清アルブミンに対するIgEの血中濃度を正確に把握することができ、さらに生体におけるアレルギー反応が起こる血清IgE閾値も検討できる利点が得られる。

そこで、最初に牛血清アルブミンを認識するマウスIgEを作製し、それを標準品として用いることで抗マウス×犬IgE抗体を用いた

IgE定量測定系の構築を計画した。測定系が完成した際には、生体のアレルギー反応閾値を検討するために健常犬を用いてPrausnitz-Kustnerテスト（PKテスト）を行うことにした。

## 2. 研究の目的

牛血清アルブミンに対するIgEを定量測定することを実現させ、ワクチン接種後アナフィラキシー発症の危険性を判定する検査システムを構築することを本研究の目的とした。これによって、ワクチン接種前にワクチン接種後アナフィラキシーを発症する危険性のある個体を選別することができ、臨床現場の獣医師にとってはワクチン接種に付随する事故を未然に防ぐことが可能となる。

具体的にはマウスモノクローナル抗体で牛血清アルブミンを認識するIgEを作製し、すでに我々が構築済みの抗マウス×犬IgE抗体を用いることで牛血清アルブミンに対する犬IgEの定量検査システムを犬で構築することとした。さらに、PKテストによって生体におけるアレルギー発症のIgE閾値を決定することとした。

## 3. 研究の方法

牛血清アルブミンに対するマウスIgEモノクローナル抗体を作製することを試みた。牛血清アルブミンをBalb/cマウスに腹腔内注射することによって、免疫する。定期的にIgE抗体価を測定しながら、免疫の状態を確認する。十分な抗体価上昇が得られた時点で、これらマウスから脾臓を摘出し、ミエローマ細胞と融合することでハイブリドーマを作製することとした。作製したハイブリドーマの中から、牛血清アルブミンのIgEを産生するものを選別した。

一方、IgE値とアレルギー発症との検討を行うため、牛血清アルブミンに対する犬IgE

定量測定系が完成するまでに、まず強力な実験感作を誘導できる卵アレルギーを用いて感作犬を作成し、実験を実施することとした。卵アレルギーに感作した実験犬から卵アレルギーに対して IgE が十分に上昇した個体から血清を採取し、この血清を健常実験犬の皮内に注射する PK テストによって、IgE 値の皮内反応陽性域値を検討した。

#### 4. 研究成果

当初の計画どおり、牛血清アルブミンに対するマウス IgE モノクローナル抗体の作製に着手してきたが、免役マウス血清中に牛血清アルブミンに対する IgE は誘導できるものの、ミエローマ融合が成功せず、そのハイブリドーマ完成に至らなかった。マウスの系統を変えて (BDF1、Nc/Nga マウスなど) 同様に実施したが、いずれも最終的に目的のハイブリドーマ株を得ることができなかった。一方、牛血清アルブミンの抗体価の上昇がみられたマウス脾臓から抗牛血清アルブミン IgG を産生するハイブリドーマを作製することができた。そこで次に牛血清アルブミンに対する犬 IgE を組換タンパク質として構築することを考えた。これまでに牛血清アルブミンに対するマウス IgG を産生するハイブリドーマ株が得られていたため、それらの細胞の遺伝子を抽出した。さらに、抽出した遺伝子から抗体の抗原認識部位の遺伝子をシークエンスした。一方、凍結保存しておいた犬の脾臓細胞から犬 IgE 遺伝子をクローニングしたものを別途入手し、このクローニングした犬 IgE と先の牛血清アルブミンに対する抗原認識部位の遺伝子を組み合わせ、大腸菌を使って定法にしたがって組換タンパク質としてキメラ抗体を発現させることにしたが、発現した組換タンパク質の量が少なく、検査系構築に応用できなかった。大腸菌以外のタンパク質発現系において検討を続ける必要がある

と考えられた。非特異的犬 IgE 組換タンパク質の発現に成功しているため、発現条件を検討することにより最終的に目的の組換タンパク質を作成できようと考えた。

また、犬の生体内におけるアレルギー反応を検討するため、卵アレルギーに対する IgE 上昇が見られた血清を用いて PK テストを実施したところ、卵アレルギータンパク質濃度を上昇させても反応がみられなかった。このことは、実験犬で作成した卵アレルギーに対する血清 IgE が認識する抗原部位が一箇所であり、肥満細胞表面の IgE 架橋を起こすことができないためと推測された。よって、今後は抗原部位が多いと考えられるその他のアレルギーを用いて同様の実験を行う必要があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Miyaji, K., Suzuki, A., Shimakura, H., Takase, Y., Kiuchi, A., Fujimura, M., Kurita, G., Tsujimoto, H. and Sakaguchi, M.: Large-scale survey of adverse reactions to canine non-rabies combined vaccines in Japan. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 145, 447-452, 2012. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 宮地一樹、木内明男、藤村正人、栗田吾郎、阪口雅弘：日本における犬混合ワクチン接種後副反応に関する大規模な疫学調査. 第 87 回麻布獣医学会、相模原、2012 年 11 月 10 日
2. 藤村正人、蔵田圭吾、阪口雅弘：犬用ワクチン接種後副反応の対策と最新情報. 第 7 回日本獣医内科アカデミー、横浜、2011 年 3 月 13 日

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

なし

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 健一 (MASUDA KENICHI)

独立行政法人理化学研究所・ワクチンデザイン研究チーム・客員研究員

研究者番号：40313077

### (2) 研究分担者

阪口 雅弘 (SAKAGUCHI MASAHIRO)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：20170590

### (3) 連携研究者

なし