

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780310

研究課題名(和文) 犬におけるSIRSの重症度・予後評価法の確立ならびに血液浄化療法の検討

研究課題名(英文) Evaluation for the prognostic index of SIRS and a target for blood purification therapy in dogs

研究代表者

下川 孝子(Shimokawa, Takako)

山口大学・獣医学部・助教

研究者番号：50594404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：犬の炎症反応症候群(SIRS)の予後指標および血液浄化療法の治療ターゲットとしてのプロカカルシトニンの可能性を探索した。ELISAを用いたプロカカルシトニン測定系確立のため、犬のプロカカルシトニンcDNAのクローニングを行い、組換え蛋白を作成し、プロカカルシトニン断片に対するペプチド抗体の作製を行った。本実験で得られた抗体は、ウェスタンブロット法により犬のリコンビナント蛋白を特異的に認識することが明らかとなった。また、作出抗体を用いて行ったELISAにおいても犬のプロカカルシトニンを検出できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the possibility of procalcitonin as a prognostic index of SIRS and a target for blood purification therapy in dogs, a measuring system for canine procalcitonin using ELISA has been established. A recombinant canine procalcitonin protein and polyclonal antibodies were obtained by cloning canine procalcitonin gene cDNA. These antibodies specifically recognized canine procalcitonin and was able to detect canine procalcitonin by ELISA.

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：SIRS プロカカルシトニン

### 1. 研究開始当初の背景

SIRS は、様々な感染性、非感染性の原因によって引き起こされる致死性の高い病態である。特に感染性原因によって引き起こされる SIRS は敗血症と定義され、その死亡率は 33-50% に達し (Gebhardt C et al, J Vet Emerg Crit Care, 2009)、SIRS の主要な原因の一つとなっている。

SIRS では、侵襲によって引き起こされる過剰な炎症性サイトカインによる組織障害と、それに伴う臓器不全が主な死因と考えられている。従って、SIRS の重症度をできるだけ早い段階で評価し、不可逆的な多臓器不全へ進行する前に治療介入することができれば、重症患者の救命率を上げることにつながると考えられる。

SIRS は表 1 に示す項目のうち 2 項目以上を満たした場合に診断される (Gebhardt C et al, J Vet Emerg Crit Care, 2009)。しかしながら、ストレスなどにより呼吸数や心拍数が変化しやすい小動物の場合には、比較的軽症例も SIRS と診断されてしまう可能性がある。従って、多臓器不全へ移行する可能性のある症例を見落とさないためには、重症度を的確に評価するための客観的な指標が必要不可欠である。

これまで、犬における代表的な炎症マーカーとして急性相蛋白である C-reactive protein (CRP) が用いられてきた。CRP は炎症性疾患を検出する感度は高いものの、SIRS 以外の病態でも非特異的に上昇が見られるため、単独で重症度判定や予後指標として用いるには不十分であると考えられる。一方、人医領域で SIRS の新規血清マーカーとして注目されているプロカルシトニン (PCT) および HMGB1 は、近年、獣医領域でも炎症マーカーとしての可能性が示唆されている (Kuzi S et al, J Vet Diagn Invest, 2008, Ishida A et al, J Vet Med Sci, 2008)。しかしながら、SIRS の重症度評価や予後指標としての十分な検索はなされていない。そこで、今回、PCT による SIRS の重症度・予後評価法の確立を目指した研究を計画した。

### 2. 研究の目的

カルシトニン は、分子量約 13kDa のペプチドであり、通常はカルシトニンの前駆体として甲状腺 C 細胞で合成されるが、細菌感染などにより重度の炎症が惹起された場合、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの刺激を受け、肺、腎臓、肝臓、脂肪細胞、筋肉といった全身の臓器で産生され血中に分泌される。現在では、ヒトの細菌、寄生虫、真菌感染症に特異的な血清マーカーとして、さらに敗血症重症度の指標として用いられている (Schuetz et al, BMC Med, 2011)。

血液浄化療法は SIRS を始めとする重症患者の治療の選択肢の一つである。血液浄化療法の代表的なものは慢性腎不全の患者に対し

て実施される間欠的な血液透析であり、腎機能の代替を目的として行われる。一方、重症患者に対する血液浄化療法は、1) 循環動態に与える影響が少ない、2) 組織内に広く分布した不要物質の除去効率が良い、3) 電解質、酸塩基平衡の緩徐な補正が可能である、4) 中分子量以上の物質 (炎症性メディエーターなど) の除去が可能であるという理由から、人工的腎補助療法以上の有効性を期待して用いられている (Bellomo R et al, Crit Care Med, 1993, 平澤ら, 日集中医誌, 1998 他)。しかしながら、獣医領域では腎補助療法以上のメリット (特に炎症性サイトカインの制御) を期待した血液浄化療法の臨床的有用性は検討されていない。PCT は炎症マーカーとしての有用性だけでなく、炎症性メディエーターとして抗メディエーター療法の対象としても注目されている。血液浄化療法において、PCT を制御することによって SIRS の予後が改善する可能性は十分に考えられる。

以上の様な経緯から本研究では、SIRS 症例に対する、1) 重症度評価ならびに予後予測マーカーとしての PCT の有用性を検討し、2) 炎症性メディエーター制御を目的とした血液浄化療法への応用を試みることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 犬 PCT 組換え蛋白の発現と精製

##### 犬 PCT cDNA のクローニング

健常犬の甲状腺から total RNA を抽出し、得られた total RNA を鋳型とし、一本鎖 cDNA を合成した。得られた一本鎖 cDNA を鋳型とし、犬 PCT mRNA (GenBank accession No. NM\_001003266) の塩基配列をもとに、プライマーを設計し PCR を行った。得られた PCR 産物をクローニングベクターに挿入し、大腸菌を形質転換した。形質転換後の大腸菌はカナマイシンを加えた LB 寒天培地で培養し、PCR 法によるインサートチェックを行った後、候補コロニーを液体 LB 培地で増殖させた。プラスミドを抽出し、プラスミド内に挿入されている遺伝子断片の塩基配列を決定した。

##### 犬 PCT 組換え蛋白の発現と精製

クローニングした犬 PCT cDNA を組換え酵素をもちいて、His タグ付き蛋白発現プラスミドベクターに挿入し、大腸菌を形質転換した。その後、前述と同様の方法で発現ベクターに挿入した遺伝子断片の塩基配列とフレームを確認した。さらにこのプラスミドを蛋白発現用大腸菌で形質転換させ、発現誘導を行い、0~12 時間培養後の大腸菌ペレットを採取した。大腸菌ペレットはサンプルバッファーと混合し、100 で 5 分間熱処理を行った。得られたサンプルを 18% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、泳動後のゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色液で染色し、目的とする分子量の蛋白が得られているかを確認した。

目的の蛋白発現が確認されたクローンにつ

いては、その後 500ml の液体 LB 培地でラージカルチャーを行った。L-arabinose による発現誘導後、大腸菌ペレットを採取し、ペレットに 10ml のリン酸緩衝液を加え超音波破碎後、遠心し、その上清を PBS 画分とした。この沈渣に蒸留水 10ml を加え超音波破碎後、15000 rpm、4 で 30 分間遠心し、その上清を蒸留水画分とした。さらにこの沈渣に Urea 溶液 (20mM Tris-HCl [pH7.5], 500mM NaCl, 6M Urea) 10 ml を加え超音波破碎後、4 で一晚、振盪したのち、15000 rpm、4 で 30 分間遠心した上清を Urea 画分とした。また、沈渣に Urea 溶液 10 ml を加えたものは Urea 不溶性画分とした。各画分のサンプルを前述と同様の方法で電気泳動を行い染色後、目的蛋白がどの画分にあるのかを確認した。最も収率の良好であった画分の溶液を、Ni カラムを通して精製した。

#### (2) ウサギ抗犬 PCT ポリクローナル抗体の作出

犬 PCT アミノ酸配列をもとに、犬 PCT アミノ酸配列の 112-130 の領域に相当するペプチドを合成した。これをウサギに免疫し、このペプチドに対するウサギ抗犬 PCT ポリクローナル抗体を作出した。作出された抗体は AB112-130 と命名した。

#### (3) ウサギ抗犬 PCT ポリクローナル抗体の性状解析

犬 PCT 組換え蛋白との反応性の確認  
犬 PCT 発現ベクターで形質転換した大腸菌を用い、発現を誘導した、あるいはしていない大腸菌と、精製後の犬 PCT 組換え蛋白を前述と同様の方法で電気泳動を行い、ウエスタンブロッティングを行った。

検出限界の測定  
精製した犬 PCT 組換え蛋白の濃度を Bradford 法で測定し、サンプルバッファーで 2 倍階段希釈列 (640 倍~10240 倍) を作成し、サンプルは 1 レーンあたり 5  $\mu$  l としウエスタンブロッティングに供した。メンブレンはブロッキングした後洗浄し、TBS-T で 40000 倍希釈した AB112-130 抗体と 4 で 6 時間以上反応させた。その後洗浄し、TBS-T で 10000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cayman Chemical, MI, USA) と室温で 1 時間反応させ洗浄した。ECL Prime Western Blotting (GEヘルスケア・ジャパン株式会社, Tokyo, Japan) を用いて発光させ、FluorChem FC2 (Alpha Innotech, CA, USA) で解析した。

#### (4) マウス抗ヒト PCT モノクローナル抗体の犬 PCT 組換え蛋白への交差性

作出抗体を用いてサンドイッチ ELISA を行うためには、ウサギとは異なる免疫動物によって作出した犬 PCT を認識する抗体が必要となるため、ヒトの N 末端側の PCT を認識するマウス抗ヒト PCT モノクローナル抗体 (6f10) (GeneTex, CA, USA) の犬 PCT 組換え蛋白へ

の交差性をウエスタンブロット法により確認した。

#### (5) ELISA による犬 PCT 組換え蛋白の測定

N 末端側を認識する 6f10 モノクローナル抗体、および C 末端側を認識する AB112-130 を用いてサンドイッチ ELISA を行い、ヒトおよび犬 PCT 組換え蛋白を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 犬 PCT 組換え蛋白の発現と精製

犬 PCT の予想される分子量は約 11.4 kDa であり、付加されている His の分子量は 2.6 kDa であることから、作出した組換え蛋白の分子量は合計約 14 kDa である。発現誘導しなかった大腸菌では組換え蛋白の発現は確認されなかったが、発現誘導させた大腸菌では目的の分子量である 14 kDa の位置にバンドが確認された。発現誘導させたもののみ、目的位置にバンドが認められたことから犬 PCT 組換え蛋白が発現されたものと考えられた。

組換え蛋白の溶出画分の解析では、その他の画分と比較し特に Urea 画分の溶液で約 14 kDa の濃いバンドが検出され、目的蛋白は Urea 可溶性であることが示された。

Urea 画分の溶液をカラムで精製後の溶液を SDS-PAGE で確認したところ、Elution1 において 14 kDa 付近に特に濃いバンドが認められ、かつ目的蛋白のみがほぼ溶出され、精製されたことが確認された。

#### (2) ウサギ抗犬 PCT ポリクローナル抗体の犬 PCT 組換え蛋白への反応性の確認および検出限界の検索

免疫前の血清を一次抗体として用いた場合、特異的なバンドは検出されなかった。一方、AB112-130 を一次抗体として用いた場合は 14 kDa 付近にバンドが確認された。このことより AB112-130 は犬 PCT 組換え蛋白を認識する抗体であることが確認された。

交差性を示した AB112-130 を用いてウエスタンブロットを行い、段階的に希釈した PCT 組換え蛋白の検出を行ったところ、AB112-130 では 1 レーンあたりの蛋白量が 0.5 ng までバンドが検出された (図 1)。

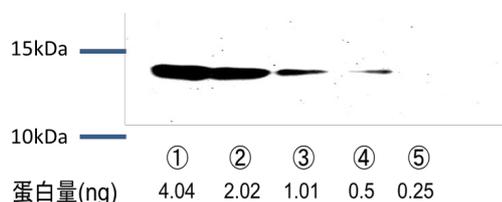


図1 AB112-130を用いたウエスタンブロットによる犬組換えPCT蛋白の検出限界の解析

#### (3) マウス抗ヒト PCT モノクローナル抗体と犬 PCT 組換え蛋白の交差性

N 末端側を認識するマウス抗ヒト PCT モノ

クローナル抗体である 6f10 抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、陽性対照として用いたヒト組換え PCT に加え、犬 PCT 組換え蛋白の 14 kDa 付近にバンドが検出され、マウス抗ヒト PCT モノクローナル抗体が犬 PCT 組換え蛋白を認識することが確認された

#### (4) ELISA による犬 PCT 組換え蛋白の測定

前述の結果より、マウス抗ヒト PCT モノクローナル抗体である 6f10 抗体が犬 PCT 組換え蛋白に結合することが示されたため、N 末端側を認識する 6f10 抗体および C 末端側を認識する AB112-130 を用いて、サンドイッチ ELISA を行った。ヒトおよび犬 PCT 組換え蛋白を測定した結果、ヒト PCT 組換え蛋白ではどの蛋白濃度においても吸光度にほとんど変化が認められなかったのに対し (図 2a)、犬 PCT 組換え蛋白の場合では、定量下限である 82.8 ng/ml 以上の濃度域において蛋白濃度依存性に吸光度の上昇が認められた (図 2b)。

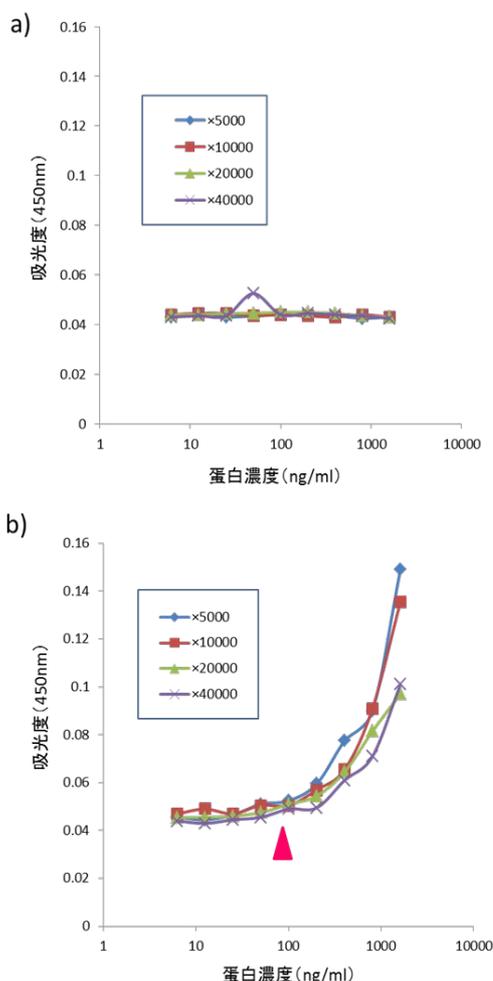


図2 6f10およびAB112-130を用いたELISAによるヒト組換えPCT蛋白および犬組換えPCT蛋白量の測定。a)はヒトPCT組換え蛋白を測定した結果、b)は犬組換え蛋白を測定した結果を示す

本研究において、犬 PCT 組換え蛋白および抗犬 PCT 抗体を作出し、サンドイッチ ELISA による犬 PCT 測定系を確立したことは、実際の犬の臨床例における血中 PCT を検出するという目的に対しては大きな進展であると言える。現在、PCT が SIRS の重症度評価ならびに予後予測マーカーになり得るかどうかについて臨床例を用いて検討中である。

#### 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)

Domori A, Sunahara A, Tateno M, Shimokawa Miyama T, Setoguchi A, Endo Y. The clinical utility of two human portable blood glucose meters in canine and feline practice. *Vet Clin Pathol.* 2014, 43(1):55-62. doi: 10.1111/vcp.12115. (査読有)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

下川 孝子 (SHIMOKAWA, Takako)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：50594404