

平成30年9月8日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07757

研究課題名(和文) 犬猫の食事性アレルギーに関与するIgGの研究

研究課題名(英文) Study on IgG involved in dietary allergies in dogs and cats

研究代表者

西田 利穂 (Nishita, Toshiho)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：00120957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血清中に炭酸脱水酵素(CA)に対する抗体を産生した犬猫を発見した。CAはペットフード中に抗原性が保持されていた。CAはほ乳類間で共通抗原性があるため、食事性アレルギーと推察した。CA-3gG抗体をラットに筋肉注射すると筋力の低下は認めなかったが、筋重量の増加を抑制した。CA-1,2IgG抗体をラットに筋注した。投与後21日目に全採血をして、腎臓の病理標本を作製した。血液検査で高値を示したのは、BUN, IP, Na, Cl, ALT, LDH, AMY, TG, T-CHO, HDL-C、クラスタリン、GST, kIM-1が有意に上昇した。腎臓の病理検査では、近位尿細管に変性壊死が認められた。

研究成果の概要(英文)：We found a dog and cat that produced antibodies against carbonic anhydrase (CA) in serum. CA was antigenic in the pet food. Since CA is common antigenic among mammals, it is presumed that it is a dietary allergy. When the CA-3 IgG antibody was intramuscularly injected into rats, no decrease in muscle strength was observed, but the increase in muscle weight was suppressed. CA-1, IgG antibody was intramuscularly injected into rats. On the 21th day after the administration, the whole blood was taken and a pathological specimen of the kidney was prepared. BUN, IP, Na, Cl, ALT, LDH, AMY, TG, T-CHO, HDL-C, clusterin, GST and kIM-1 showed a significant increase in the blood test. In kidney pathological examination, degenerative necrosis was observed in the proximal tubule.

研究分野：獣医生理学

キーワード：炭酸脱水酵素 食事性アレルギー IgG抗体 腎疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 犬猫の高齢化に伴う疾患で重要なのは心臓疾患、腎疾患そして皮膚疾患と言われている。アトピー性の皮膚疾患の成立には抗原となる何らかの物質の感作による。なかでも、食事性のアレルギーは獣医学でも重要な問題である。2013年10月、米食品医薬品局は2007年以来全米各地で600匹のペットがペットフードを食べたために死に、約3600匹のペットから異常が見つかっていると発表した。ペットフードと病気の因果関係は明らかになっていないが、胃腸に異常が現れ、腎臓や泌尿器に問題が発生している。

BSAに対するIgEやIgG抗体がイヌの血漿で検出されたとする報告があり、IgG抗体はワクチン接種時に含まれていたBSAの感作によるとされている。BSAに対するIgG抗体はヒト医学でも注目されているが、特異的な臨床症状は明確ではない。

我々は、運動機能障害、食道拡張などの症状を呈した10頭の盲導犬の血液検査を行った結果、BSAに対するIgG抗体が増加していた。さらに、炭酸脱水酵素(CA)アイソザイムのCA-I, CA-II, CA-III, CA-VIに対するIgG抗体(以下CA抗体と略す)が著しく増加していた。動物病院に来院した100頭のイヌの血液を用いてCA抗体を測定した結果、80%のイヌにCA抗体の上昇を認めた。実験動物用のビーグル犬(3ヶ月令から2歳まで)計20頭の血液検査を行った結果、CA抗体が上昇したイヌはいなかった。一方、6ヶ月令のビーグル犬はワクチン接種の影響でBSA抗体が上昇していた。CA抗体の測定は、イヌ、ウマから精製したアイソザイムを抗原としたELISAで測定した。

(2) CAの主な存在部位は、CA-Iは消化管粘膜、CA-IIは赤血球、腎尿細管、各種腺組織、CA-IIIは骨格筋、関節軟骨、分泌腺の導管細胞、CA-VIは唾液腺、乳腺、胆嚢、胆管に多

く局在している。CA-I, CA-II, CA-VIの生理機能は体液の酸塩基平衡であり、CA-IIIには抗酸化作用があることが報告されている。各種動物から精製したCA-I, CA-II, CA-III, CA-VIに対する抗体をウサギで作製した。それらの抗体を用いて各々の共通抗原性を検索した結果、各アイソザイム間(例;抗ウマCA-IはウマCA-IIとは反応しない)では反応しなかった。一方、種間(例:抗ウマCA-IはイヌCA-Iと反応する)ではよく反応したすなわち、ペットフードに含まれていると考えられるウマ、ウシ、ブタのCAアイソザイムを食べることで感作され抗体を作った場合、そのような抗体はイヌのCAアイソザイムと反応するため、このようなイヌは自己抗体を作製したことになる。BSAに対するIgG抗体は、イヌのアルブミンとは強く反応しないため自己抗体としては作用しない。

ヒト医学でCAアイソザイムに対する自己抗体の存在が報告されているのは、エリテマトーデス、多発性筋炎、全身性硬化症、子宮内膜症、シェーグレン症候群、特発性慢性膵炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性胆管炎などである。しかし、CA抗体の生体への影響の多くは解明されていない。獣医学領域ではCA抗体の存在すら未だ報告されていない。

次に、抗原として最も疑われるペットフードは高熱乾燥処理をしているため、ペットフード中に抗原性のあるCAアイソザイムが存在するかどうか定量測定した。その結果、CA-I, CA-II, CA-III, CA-VIは高濃度に存在していた。従って、ペットフードを常食としているイヌが何らかの原因でCAアイソザイムに対する抗体を産生したことは明らかであった。

2. 研究の目的

(1) 犬の食事性のアレルギーとしてはウシアルブミン(BSA)に対するIgEの測定結果が報告されている。我々は、BSAに対するIgG

抗体が増加している症例を発見した。さらに、炭酸脱水酵素(CA)アイソザイムに対するIgG抗体も検出した。BSAに対する抗体はBSAに特異性が高いが、犬アルブミンとは反応しない。そのため、BSAに対する抗体を持つ犬は再度BSAの摂取に注意が必要だが、自己免疫疾患に陥ることはない。しかし、CAアイソザイムはほ乳類間では共通抗原性があるため、食事で摂取したCA抗原に対するIgG抗体を産生した犬は、自己のCAアイソザイムと反応すると自己免疫疾患となる危険性がある。本研究は、自己免疫疾患の原因となる危険性のあるCAアイソザイムに対するIgG抗体の発現と発症のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) IgG抗体価の測定：神奈川県下の小動物病院から、無症状の犬(17頭)、アトピー性皮膚疾患(15頭)、下痢・嘔吐(8頭)、糖尿病・膵臓疾患(7頭)、腎疾患(6頭)、肝疾患(9頭)、甲状腺疾患(10頭)の血清を入手した。健康犬として1ヶ月齢、3ヶ月齢、6ヶ月齢、12ヶ月齢、24ヶ月齢のビーグル(25頭)の血清を用いた。健康群52頭と43頭の疾病群のネコ血清を入手した。ウシ血清アルブミン(BSA)、犬血清アルブミン(CSA)、CA-1、CA-II、CA-IIIに対するIgG抗体をELISA法で測定した。CAアイソザイムの2.5µg/mLをELISA用プレートに吸着させた。POD標識抗犬IgG(H鎖)抗体は2万倍に希釈して用いた。直線性試験の結果、犬血清は100倍に希釈して測定した。

無症状のネコ(n=52)と疾病ネコ(n=43)の血清を用いて測定した。CA-1、CA-II、CA-IIIに対するネコIgG抗体を測定には、ネコ血漿を100倍に希釈し、POD標識抗ネコIgG(H鎖)抗体を5万倍に希釈して用いた。IgGの値は吸光度で表した。

(2) 抗CA-III IgGが運動機能に与える影

響：精製したCA-IIIをウサギに免疫して抗CA-III抗体を産生した。抗血清からIgGを精製した。抗CA-III IgGが運動機能に与える影響を検索するため、抗CA-III IgG投与群(n=2)と、正常ウサギIgG投与群(偽処置群n=2)、無処置群(n=2)の3群に分け、5mgのIgGをマウスに筋肉注射した。筋力の測定はTugging Force Test法で行った。7日目の測定後、腓腹筋と大腿四頭筋を採材し重量を測定した。

(3) CAアイソザイム抗体が腎機能に及ぼす影響：精製したCA-IとCA-IIをウサギに免疫して抗CA-Iと抗CA-II抗体を産生した。抗血清からIgGを精製した。CA-I、CA-IIに対するウサギIgG抗体を5mgラット(n=10)に筋注した。対照実験として正常ウサギIgG 5mgをラット(n=5)に筋注した。投与後21日目に全採血した。腎臓はホルマリン固定をして病理組織切片を作製し、顕微鏡的検査をおこなった。血液の検査は、TP, ALB, BUN, CRE, Na, K, Cl, Ca, IP, AST, ALT, LDH, AMY, r-GT, T-CHO, TG, HDL-C, T-BIL, GLU, UA, Fe, ALP, LAP, ChEを測定した。腎疾患マーカーとして、対称性ジメチルアルギニン(SDMA)、シスタチンC、クラスタリン、GST, Kidney injury molecule-1 (KIM-1)、2マイクログロブリン、L-FABPを測定した。

4. 研究成果

(1) 3ヶ月齢のビーグルでは、BSAに対する抗体価が高値を示した。これは、接種したワクチンに含まれるウシ胎児血清に含まれるBSAに感作されたことによるものであった。ビーグルの測定値からカットオフ値を算出し、各種疾患犬の値と比較した。その結果、CA-1、CA-II、CA-III、BSA、CSAに対する抗体価がそれぞれのカットオフ値以上を示した陽性率は、肝疾患の犬で、それぞれ、67%、78%、44%、0%、22%であった。甲状腺疾患

ではそれぞれ、40%、10%、10%、10%、20%であった。下痢・嘔吐の犬では、38%、25%、12%、13%、13%であった。無症状の犬では、35%、41%、12%、29%、18%であった。糖尿病・膵炎ではそれぞれ29%、43%、0%、29%、14%であった。腎疾患ではそれぞれ、17%、17%、33%、0%、33%であった。アトピー性皮膚疾患では、0%、27%、20%、7%、13%であった。CA-IとCA-IIには正の相関があり、CA-IIとBSAにも正の相関があった。犬におけるCAアイソザイムに対する抗体保有率は80%であった。

BSAに対するIgG抗体価の上昇は食事性アレルギーを発症する可能性は高いが、どのような症状かは犬では不明である。CAはほ乳類間では共通抗原性が高いため、CAに対する抗体は自己免疫疾患を引き起こすリスクが高いことが考えられる。CSAに対する抗体がなぜ犬の血清中に出現するかは不明であった。ペットフード中にCSAが含まれている可能性もある。遅延型食事性アレルギーの診断は犬の健康管理に重要な検査と考えられる。

健康群のネコのCA-I、CA-II、CA-IIIに対するIgG抗体価のカットオフ値(平均値 \pm 2SD)は0.53、0.54、0.33であった。カットオフ値を超えたネコは、CA-Iでは妊娠40日齢の1頭であった。CA-IIではいなかった。CA-IIIでは腎不全と高血糖の1頭、転移性肺腫瘍の1頭、多飲多尿の1頭、脱水症の1頭の計4頭であった。ネコにおけるCAアイソザイムに対する抗体保有率は5%であり、犬に比べ非常に少なかった。ペットフード中にもCA-IIIの抗原性は維持されているため、食事性アレルギーの可能性も考えられた。

(2) Tugging Force Test で筋力を測定した。筋力の低下傾向は抗CA-III群では1日目に見られ、偽処置群では1日目から3日目にかけて見られた。無処置群と抗CA-III群では3日目以降と偽処置群の5日目以降では筋力の

上昇傾向が見られたが、実験期間を通じて抗CA-III群と偽処置群の間に有意差は認めなかった。体重は各群増加傾向が見られた。投与後7日目での筋肉の採材の結果、右後肢の大腿四頭筋を除いたほかの3か所の採材部位で抗CA-III群の筋肉が最も軽く、次いで偽処置群の筋肉が軽く、無処置群の筋肉が最も重いという結果が得られた。抗CA-III IgGは筋肉の発育に影響を及ぼした可能性がある。CAは亜鉛を含む酵素であるから、亜鉛の欠乏が筋肉の成長に影響を及ぼしたと考えられた。抗CA-III群・偽処置群において投与後筋力の低下傾向が認められた原因は、無処置群では筋力上昇傾向が認められたことから、筋肉内注射による疼痛が原因と考えられる。7日目で各群ともに筋力が上昇したのは、実験期間中に各群の平均体重が増加していることから、成長に伴った筋力の上昇であると考えられる。

(3) CA IgG抗体5mgをラットに筋注射し、対照実験として正常ウサギIgG 5mgを筋注射した。投与後21日目に全採血をして、腎臓の病理組織切片を作製した。血液の検査の結果、CA IgG抗体の投与により高値を示したのは、BUN, IP, Na, Cl, ALT, LDH, AMY, TG, T-CHO, HDL-Cであった。唾液腺にはCAアイソザイムが存在するため、血清中のAMYの上昇は唾液腺の障害か膵臓疾患と考える。腎疾患マーカーの測定結果、クラスタリン、GST, kIM-1が血漿中に有意に上昇した。腎臓組織病理切片の顕微鏡検査結果、CA-I, CA-IIに対するIgG抗体を投与したラットの近位尿細管には軽度から中度の変性壊死が認められた。

(考察) 今回の研究から、犬と猫の血清中にCAアイソザイムに対するIgG抗体を検出した。特に、犬の場合はCAアイソザイムに対するIgG抗体は無症状の場合でも12%~41%がIgG抗体を産生していた。CAに対するIgG抗

体は細胞障害性を示すことが明らかになったため、長期的に高抗体価が持続されると健康維持に支障をきたすことが示唆された。従って、CA アイソザイムに対する IGG 抗体価の測定は、健康管理、疾病の発症の予測に有効な検査であることが明らかとなった。

<引用文献>

Nishita, T., Kondo, H., Ishida, S., Ochiai, H. and Asari, M. Isolation and measurement of carbonic anhydrase isoenzymes in erythrocytes of dogs. Am. J. Vet. Res. 61, 2000, 387-392

Nishita, T., Takahasi, M., kasuya, T., Matsui K., Ichihara, N., Murakami, M. and Asari, M. Measurement of erythrocyte carbonic anhydrase isozymes (CA-I and CA-II) in racehorse and riding horse. J.Vet. Med. Sci. 67, 2005, 63-67.

Okada, S. and Orito, K. Tugging force: A new objective index for evaluating acute changes in neuromuscular function in mice. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 76, 2015, 23-26.

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)

Toshiho, Nishita., Ruka, Miyazaki., Takae, Miyazaki., Hideharu, Ochiai., Kensuke, Orito., (2016) Antibodies reacting to carbonic anhydrase isozymes (I and II) and albumin in sera from dogs. *Research in Veterinary Science*, 査読有り、106, 2016; 180-182. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.04.010. Epub 2016 Apr 30.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田利穂 (NISHITA, Toshiho)
麻布大学・獣医学部・准教授
研究者番号：00120957