

演題番号：

## 組み換えイヌアレルゲン Can f1、Can f2 およびその抗体作成とこれを用いたイヌアレルギー診断法の検討

○宮野前亜希<sup>1)</sup>、星 英之<sup>1)</sup>、鎌田洋一<sup>1)</sup>、宮野前 健<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 大阪府大・獣医公衆衛生、<sup>2)</sup> 国立病院機構・京都南病院

1. **はじめに**：近年、イヌを室内で飼育する家庭が増加、また身体障害者補助犬法の整備などから、年々イヌとヒトとが直接接触する機会が増えつつあり、イヌアレルギーは今後大きな問題となってくることが予想される。本研究ではこれらのイヌアレルゲン組み換え体と、それに対する抗体を作成、唾液中の f1、f2 量を測定、またイヌアレルギー診断用犬毛抽出液中のアレルゲンについて調べた。2. **材料および方法**：ビーグル犬の耳下腺から cDNA を合成、f1 および f2 の塩基配列から設計したプライマーを用いた PCR により増幅、発現用ベクターにクローニングした後、塩基配列を確認、大腸菌発現系を用いて組み換えタンパク rf1、rf2 を発現させ、これらを精製した。この組み換え体でウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を作成した。得られた抗体と組み換え体、イヌの唾液および唾液腺抽出物、ヒトのアレルギー診断用犬毛抽出物（鳥居薬品）との反応を ELISA とウエスタンブロットで確認した。得られた抗体の一部をビオチン標識し、未標識抗体を固層化抗体、ビオチン標識抗体を二次抗体として組み換え体と反応させる Sandwich ELISA およびドットブロットを試みた。3. **成績**：クローニングした f1、f2 の推定アミノ酸配列は、Konieczny の報告と f1 で 2 アミノ酸残基が異なったが、f2 では一致したものが得られた。SDS 電気泳動では、rf1 は約 18 kDa、rf2 は約 20 kDa の分子量を示した。ウエスタンブロットにおいて抗 f1 抗体は唾液、犬毛抽出物中の約 18、22 kDa の 2 本のバンドと、また抗 f2 抗体は唾液、耳下腺、犬毛抽出物中の約 20、23 kDa の 2 本のバンドと反応した。Sandwich ELISA において、ウサギ抗体は rf1、rf2 と濃度依存的に反応、それぞれ最小検出量 1 ng/ml までを測り取ることができた。4. **結論**：f1、f2 に対する抗体は、犬毛抽出液、唾液、耳下腺中の f1、f2 を検出した。これらの抗体を用いて唾液中のアレルゲンを測定することが可能となった。今後はイヌアレルギー患者の血清を用いて実験を行い、rf1、rf2 による新たな診断法の構築を検討したい。