

ペット遺伝子診断について

住化テクノサービス株式会社 応用動物センター 臨床科学部
川添 亮 城之内 達也 尾崎 正和 中野 実

はじめに

昨今のペットブームにより、伴侶動物として人と共に暮らす動物の数は増加の一途をたどり、それらの動物の治療ニーズを満たすために動物病院数も年々増加している。加えて、飼い主の伴侶動物に対する健康への意識もますます高まり、動物の長寿命化、高齢化が進行している。その結果、動物においても、がんなどの生活習慣病に罹患する割合が増加し、ペット医療の充実化を求める声に応えるように動物医療も日々高度化している。

住化テクノサービス(株)では、1999年よりペット病理診断事業を立ち上げ、病理組織学的な検査を実施してきた。確かな技術を迅速に安価に提供することをモットーにインターネットによる受注、報告システムの構築や作業自動化を推進した結果、現在では全国約300病院の会員を持ち、依頼件数も月あたり1000件前後と好調に推移している。そして今回さらなる高度医療に対応し、より正確な診断をサポートするためのツールとして遺伝子診断事業を立ち上げた。

ペット遺伝子診断の概略

現在のヒトの医療では遺伝子検査は一般的になりつつあり、保険の対象となっている検査も少なくない。一方伴侶動物における医療においても、従来の検査手法に遺伝子診断を組み合わせることで、これまで診断できなかった病態が解析され、その結果、より高度な治療が可能となっている。そのため、遺伝子検査に対する期待と需要が増えている。現在当社で受託している検査はリンパ球クロナリティ解析(イヌ)、肥満細胞腫*c-kit*変異検査(イヌ、ネコ)、バベシア・ギブソニ検査(イヌ)である。以下に各検査の概略について説明する。

1. リンパ球クロナリティ解析

リンパ腫はイヌ、ネコにおいて代表的な悪性腫瘍の一つであり、その由来となる細胞種によって、B細胞

性、T細胞性、および非BT細胞性に分けることができる。特に細胞タイプを分類することで、治療方針や予後の大きな判断材料となる。一般的に、B細胞性のリンパ腫は抗がん剤に対する反応がよく、予後が比較的良好である一方、T細胞性のは抗がん剤に対する反応が悪いため、予後不良であることが多いことが報告されている。通常のリンパ腫の診断は細胞診や病理組織検査などの形態学的評価によって行われているが、反応性過形成などの非腫瘍性に増殖したリンパ球との区別が難しいケースが多く、B細胞性/T細胞性であるかの診断は困難である。しかし、形態学的評価に遺伝子検査によるクロナリティ解析を組み合わせることによって、リンパ腫の確定診断が可能となり、さらにB細胞性/T細胞性の分類も可能になるなど診断の精度が著しく向上する。

リンパ球クロナリティ解析ではPCR (polymerase chain reaction) 法を用いて細胞に含まれるイムノグロブリン遺伝子 (IgH) およびT細胞レセプター遺伝子 (TCR) を増幅し、電気泳動法によってそれらの遺伝子のクローン性を解析する。獲得免疫系において多種多様な病原体を認識し、除去するための主要な役割を担うリンパ球は、幹細胞から成熟細胞へ分化する過程において、B細胞ではIgH、T細胞ではTCRの遺伝子領域に再構成が起こり、個々のリンパ球でそれぞれ異なる遺伝子配列を持つようになる。その結果、健康な個体のリンパ球のIgHおよびTCRをPCR法によって増幅するとこれら多様な再構成を受けた遺伝子群が検出されるため、その電気泳動像は単一のバンドを形成せず、「スメア」となる (Fig. 1, Normal lymphocyte population参照)。一方、リンパ球が腫瘍化する際には、多くの場合単一のリンパ球を起源とし、当該細胞が際限なく分裂してクローンを作り出すため、PCR法により増幅した際、腫瘍の起源となったリンパ球由来の遺伝子がバンドとして検出される (Fig. 1, Neoplastic lymphocyte population参照)。

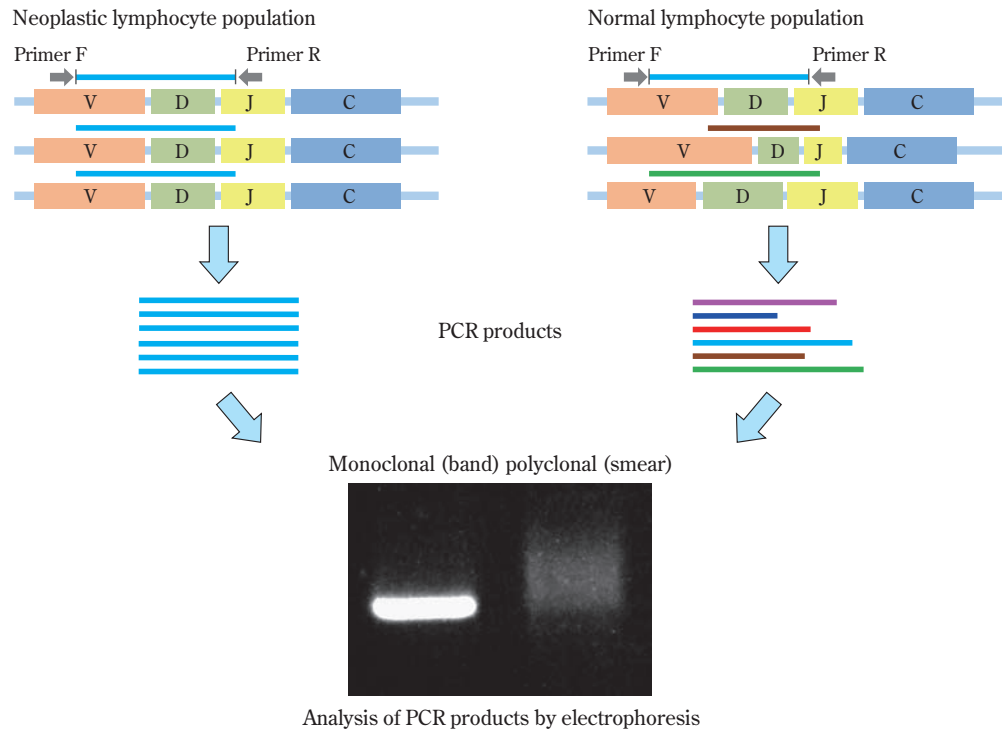


Fig. 1 Summarized diagram of genetic analysis of canine B lymphocyte clonality

2. 肥満細胞腫 *c-kit* 変異検査

肥満細胞は主に皮膚の結合組織に分布する細胞であり、名前の印象とは異なり脂肪貯蔵には関与せず、自然免疫系の重要な役割を担う細胞である。また、主要なヒスタミン放出細胞であることから、アレルギーの発現にも深く関わっていることで知られる。この肥満細胞が腫瘍化した肥満細胞腫は特にイヌでは頻繁に見られる腫瘍であり、皮膚腫瘍の中では最も多い疾患である。肥満細胞腫は非常に多様な形態を呈する腫瘍であり、イヌの肥満細胞腫は臨床的な悪性度が高く、治療が非常に難しい症例もしばしば見られる。これら多様な表現系を持つ肥満細胞腫の悪性度や予後を左右する遺伝子マーカーとして、近年 *c-kit* 遺伝子が注目され、研究が進んでいる。

c-kit は膜貫通受容体型チロシンキナーゼの1種である KIT をコードしている遺伝子であり、リガンドと結合して活性化されると細胞に増殖シグナルを送り、細胞分裂を促すことが知られている。肥満細胞腫の中でも悪性度の高い細胞において、KIT が高発現している傾向にあることが報告されており、その多くは遺伝子配列が改変され、リガンドに依存せずに常に増殖シグナルを送るように変異していることがわかってきた。*c-kit*

遺伝子配列の変異は膜近傍部位で起こり、代表的なものは重複配列挿入変異 (ITD; Fig. 2 参照) および点突然変異である。これら変異 *c-kit* の活性を阻害する分子標的薬としてイマチニブが市販されている。イマチニブは *c-kit* のキナーゼ活性を特異的かつ効果的に阻害することによって変異 *c-kit* が「垂れ流す」増殖シグナルを押さえ込み、その結果腫瘍細胞は増殖能を奪われて死滅していく。実際に悪性度の高い肥満細胞腫を罹患した動物に対してイマチニブを投与した結果、著効することが報告されている。その一方で、イマチニブは薬価が高く、しかも継続的に投薬する必要があること、さらに変異 *c-kit* が高発現している症例にしか効果がないという問題点も持っている。そのため罹患動物に対するイマチニブの効果を予想するために *c-kit* 遺伝子の変異の有無を遺伝子検査によって調べるのが投与可否の判断材料として有用である。

当社の *c-kit* 変異検査ではイヌにおける exon11 の ITD およびネコにおける exon8 の ITD を PCR 法によって、またネコにおける exon9 の点突然変異を PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) 法によって検出している。例えば ITD 検査の場合、電気泳動によって、正常な遺伝子では単一のバンドが検出される

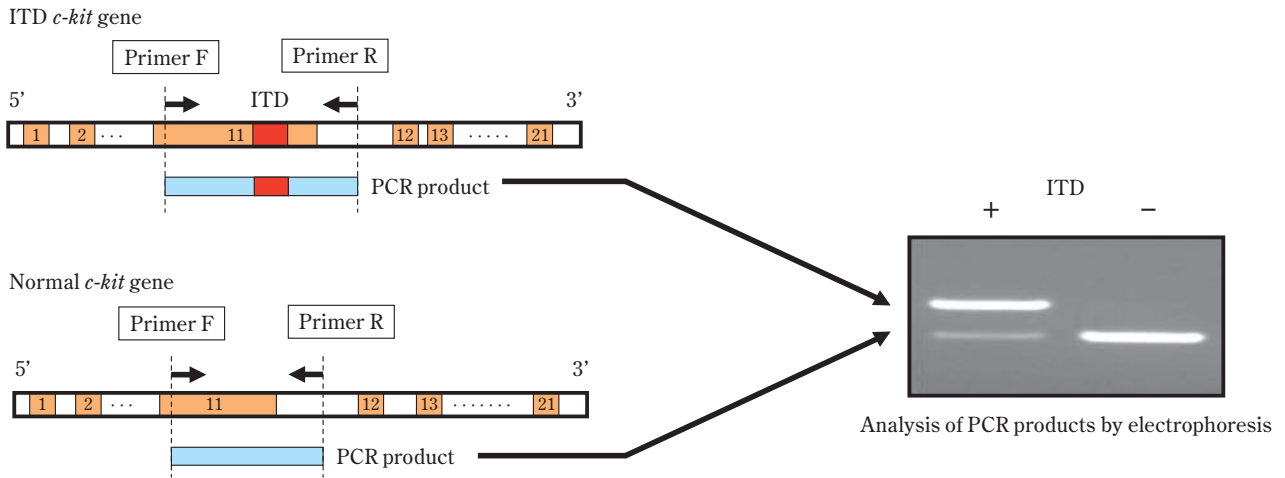


Fig. 2 Summarized diagram of genetic test for canine *c-kit* mutation

のに対して、変異遺伝子では重複配列の分だけ分子量が大きくなり、その結果通常バンドより上流にもう1本別のバンドが検出されることで変異の有無がわかる (Fig. 2)。

3. バベシア・ギブソニ検査

バベシア・ギブソニはマラリア原虫に近縁な寄生性の原生生物であり、マダニを通じて媒介され、赤血球に寄生し、増殖することによってイヌにバベシア症を引き起こすことで知られる。「原虫」と呼ばれているものの、驚いたことに近年の分子系統解析によって、実はコンブやワカメなどの褐藻類と進化的に姉妹系統であることが分かってきており、それら遺伝子解析によって新たな防除薬の開発も期待されている。バベシア症の主な症状は発熱と溶血性貧血であり、罹患動物の血液を調べると赤血球内にバベシア原虫が侵入している

のが見られる (Fig. 3 赤血球染色像の 矢印部分)。日本におけるバベシア症の多くはバベシア・ギブソニおよびバベシア・カニスによるものであることが知られているが、中でもバベシア・ギブソニによる感染が圧倒的に多い。また、本来バベシア・ギブソニの分布は西日本に限られていたが、分布域は年々北上してきており、地球温暖化の影響も指摘されている。さらに近年旅行にペットを同伴することが多くなっており、東日本においても必ずしも安心とはいえなくなっている。

バベシア・ギブソニ遺伝子診断は血液から抽出したDNAを鋳型にPCR法によってバベシア・ギブソニ特異的な遺伝子配列を増幅する (Fig. 3)。バベシアに罹患している場合は特異的なDNAの増幅が見られるが、健康な動物の血液からは増幅されない (Fig. 3)。

遺伝子検査は血中のバベシア・ギブソニを高い精度

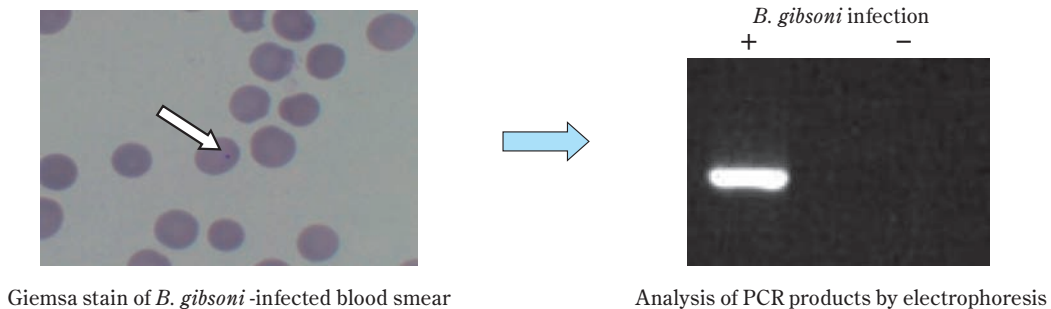


Fig. 3 Summarized diagram of genetic test for *Babesia gibsoni* infection

で検出することができる。そのため、これからは細胞診断に代わって遺伝子検査が主流となっていくと考えられる。

今後の展開

検査項目拡充のため、現在ネコリンパ球コロナリ
ティ解析検査、ネコウイルス検査、ネコヘモプラズマ
検査を受託できるよう検討中である。遺伝子検査は疾
患の予後の推定や感染症の特定だけでなく、雌雄の判
別や遺伝病の予測など適用できる範囲は広く、これか
らも需要が伸びていくことが期待される。当社として
はそれらのニーズを探り、お客様の期待に応えられる
新しい検査を開発していく予定である。

日本のペット市場は1兆円規模であり、拡大傾向にあ
る。また、日本の犬猫飼育数は2千万頭を超え、この数
字は現在の不況下でも減少しておらず堅実に推移して

いる。更に動物病院数は9000以上である。現在当社が
顧客としているのはそのごく一部であり、これからも
確かな技術、迅速、安価を武器に検査項目を拡充し、
より高いシェアを目指し、ペット医療の充実化に貢献
していきたいと考えている。

住化テクノサービス株式会社 アニマルクリニック
臨床検査センター ホームページ
URL <http://acsc.sc-sts.co.jp/>

お問い合わせ先：
住化テクノサービス株式会社 応用動物センター
臨床科学部
〒554-8558 大阪市此花区春日出中3-1-98
TEL：06-6466-6965
e-mail：med@sc-sts.co.jp