

学位論文題名

イヌの炎症性サイトカインと急性相タンパク
産生機序に関する研究

学位論文内容の要旨

生体に侵襲が加わると血液循環、代謝および免疫系は内因性メディエーターを介して変化し、侵襲に対して複雑に反応する。急性相反応はほとんど全ての侵襲に対して認められる非特異的の生体反応であり、侵襲後数時間から数日以内に出現する。近年、ヒトにおいてサイトカインが従来の急性相タンパクより早く、侵襲後ごく早期の血中に一過性に増加することが報告された。また、インターロイキン（IL）-1、IL-6および腫瘍壊死因子（TNF）といった炎症性サイトカインがヒト肝癌細胞株および初代培養ヒト肝細胞の急性相タンパク合成を誘導することが示され、急性相反応のメカニズムが明らかにされつつある。しかしながら、獣医臨床において対象となる動物のサイトカインに関する研究は乏しく、炎症におけるサイトカインの血中動態と従来の急性相反応物質に関する研究は皆無に等しい。以上のことから、本研究ではイヌの急性相反応における諸現象を調べ、サイトカインと急性相タンパク産生の関連を追究した。

第1章では、イヌ血清中のIL-1、IL-6およびTNF様活性の測定に、これまでに他の動物で報告されているヒトメラノーマA375S1細胞、IL-6依存性マウスハイブリドーマMH60.BSF2細胞およびWEHI164マウス肉腫subclone28-4細胞を用いた生物学的測定法をそれぞれ応用し、基礎的測定条件とその有用性について検討した。これらの測定法はエンドトキシンショック下および局

所炎症下のイヌ血清中の各サイトカイン活性を検出できた。イヌ血清中にはこれらの生物学的測定法に影響を及ぼす何らかの因子が存在しており、この影響を最小限にするためには血清検体を60~180倍に希釈する必要があった。

第2章では、イヌにテレピン油を筋肉内投与して実験的局所炎症を作出し、第1章で確立した生物学的測定法を用いて血清IL-1、IL-6およびTNF様活性を経時的に測定した。また、同時に従来急性相反応物質の変動を経時的に観察した。局所炎症を引き起こしたイヌでは、臨床的に典型的な急性相反応を示した。C-反応性タンパク（CRP）および α_1 酸性糖タンパク（ α_1 AG）といった急性相タンパクの血清濃度は処置後増加した。一方、血清アルブミン濃度は低下し、負の急性相タンパクとして変動した。血清IL-6様活性は処置後2時間目に劇的に上昇した。血清TNF様活性は処置後2~24時間目に低レベルで検出されたが、対照と比較して統計学的に有意な変動は認められなかった。これらサイトカインの変動はCRP、 α_1 AGおよびアルブミンといった急性相タンパクの反応に先行していた。IL-1様活性は検出されなかった。イヌにおいても血清中のIL-6が急性相反応の制御機構に重要な役割を演じていることが示唆された。

第3章では、初代培養イヌ肝細胞の急性相タンパク合成におけるサイトカインの影響を免疫組織学的および免疫生化学的に観察した。アルブミン合成はTNFにより抑制されたが、 α_1 AGの合成はTNFによって増加した。CRPの合成はIL-1、IL-6およびTNFにより増加した。第2章で観察した急性相タンパクの血清濃度の変動を*in vitro*で再現することができた。肝細胞における各タンパクの合成誘導は個々のサイトカインに対し異なった反応性を示した。

以上のことから、イヌにおいても、炎症性サイトカインが急性相タンパクの合成にシグナルとして働くと考えられた。多くの炎症性疾患では、炎症性サイトカインを中心としたサイトカインネットワークを介して病態が進行するとされている。本研究により、イヌにおける炎症性疾患にもサイトカインが重要な役割を演じていることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 永 徹
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 齊 藤 昌 之
副 査 教 授 前 出 吉 光

学位論文題名

イヌの炎症性サイトカインと急性相タンパク 産生機序に関する研究

感染や外科手術などの侵襲に対する急性相反応期に多くのサイトカインが関与することが近年明らかにされつつある。しかし、獣医臨床で対象となる動物種において、急性相反応にかかわる炎症性サイトカインと急性相タンパクに関する情報はほとんどないことから、申請者はイヌの急性相反応期における急性相タンパク合成誘導への炎症性サイトカインの関与について検討し、次のことを明らかにした。

まず、これまでヒト、ラットおよびマウスに用いられてきた生物学的測定法のイヌの血中サイトカイン活性検出への応用を検討し、ヒトメラノーマA375S1細胞、マウスハイブリドーマMH60.BSF2細胞およびWEHI164マウス肉腫細胞によりそれぞれイヌのIL-1、IL-6およびTNF様活性の検出が可能であることを示し、その測定条件を確立した。

つぎに、イヌに実験的に局所炎症を引き起こし、急性相反応期における諸現象を観察した。先に確立したサイトカイン測定法によって炎症刺激後の血清中にIL-6様活性が高レベルで検出されること示した。また、その経時的変化が急性相タンパクの変化に先行することを明らかにした。

そこで、*in vivo* で観察されたサイトカイン活性の変動と急性相タンパク濃度の変動の関連性を明らかにするため、初代培養イヌ肝細胞を用いて *in vitro* で検討した。リコンビナントヒトサイトカインでイヌ肝細胞を刺激することにより、*in vivo* で観察された結果に相応するタンパク合成の誘導が *in vitro* で再現された。

以上のとおり、申請者はイヌにおいても急性相タンパク合成に炎症性サイトカインが関与することを明らかにした。本研究の結果は、イヌにおける炎症性疾患の病理発生の解明に大きく貢献するものと判断された。よって、審査員一同は山下和人氏が博士（獣医学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。