

## 論文審査の要旨および担当者

学位申請者	小笠原 聖悟 (4DV11001 獣医外科学)
学位論文題目	イヌ末梢血単核球の組織因子発現およびマイクロパーティクル放出に関する研究
担当者	主査 北里大学教授 伊藤 直之 副査 北里大学教授 渡辺 清隆 副査 北里大学教授 胡 東良

### 論文審査の要旨

感染症や重度の炎症性疾患に続発する播種性血管内凝固症（DIC）は、獣医療において未だ高い死亡率を示し、また、前 DIC 段階ともいえる血管内血栓形成でも、時に重篤な臓器不全を起こす。ヒトの感染症や炎症性疾患では、血液中組織因子濃度の増加が起こり、これが血管内血栓形成や DIC 開始の一因となると考えられている。

組織因子（TF）は二次止血の開始物質であり、第VII/VIIa凝固因子と複合体を形成することで、血液凝固カスケードを活性化し、フィブリン血栓を形成する。感染症や炎症性疾患では、末梢血単核球（PBMCs）や血管内皮細胞がTFを発現することで血液内濃度の増加が起こり、血管内凝固能を亢進させる。また、これらの細胞は小型細胞膜断片であるマイクロパーティクル（MPs）を放出することでも、血管内凝固能を亢進させる。特に、ヒトにおけるPBMCs由来MPsは、TFを発現し強力な凝固活性を示すことで注目されている。

イヌにおけるPBMCsのTF発現やMPs放出に関する研究は限定的であり、

DIC 発症や血管内血栓形成との関連も未だ明確にされていない。本研究は、炎症性疾患や感染症に続発するイヌの血管内凝固異常が、PBMCs の TF 発現や MPs 放出に関連があるかを明確にし、感染性物質や様々な炎症性サイトカインと PBMCs との関係を検証したものである

## 第 1 章 イヌ末梢血単核球における組織因子発現の経時的変化および新たな機能性組織因子の測定系確立に関する検討

イヌ PBMCs の TF 発現に関する基礎的な情報収集のため、イヌ PBMCs の TF 発現の経時的変化を調べ、また、機能性 TF の測定系の確認を行った。いずれの評価にも凝固活性法を用いている。イヌ PBMCs の TF 発現の経時的変化は、LPS 刺激および非刺激群に対し各時間における凝固活性値を測定することで評価している。その結果、非刺激群と比較し、LPS 刺激群は各時間において、TF 発現の有意な増加が認められた。また、TF 発現は LPS 刺激群、非刺激群共に 24 および 36 時間にピークが認められた。

TF の測定系の確立には、正常ヒトプール血漿、ヒト第 VII/VIIa 因子欠損血漿、およびヒト第 VII/VIIa 因子欠損血漿に組み換え型第 VII/VIIa 因子を添加した群を用意した。ヒト第 VII/VIIa 因子欠損血漿を用いた群では、著しい凝固活性値の減少が認められたものの、他の 2 群間には有意な差は認められなかった。これにより、正常ヒトプール血漿での測定が、機能性 TF に依存する凝固活性値であることが示された。

## 第 2 章 HMGB-1 のイヌ末梢血単核球の組織因子発現に関する検討

遅延型炎症性サイトカインとして知られる HMGB-1 (High Molecular Group Box-1) は、マクロファージ等の炎症性細胞から放出されるだけでなく、壊死組織からも放出される。そのため、炎症性疾患だけではなく

重度の組織壊死を伴う症例でも、血中 HMGB-1 濃度の増加が認められる。本章では HMGB-1 のイヌ PBMCs の TF 発現への影響を検討した。また、細菌や真菌感染症モデルとして、LPS やザイモサンを用い、HMGB-1 共刺激時における変化も検討した。その結果、イヌ PBMCs は HMGB-1 の濃度依存的に TF 発現の増加を示した。また、LPS と HMGB-1 共刺激下では、HMGB-1 もしくは LPS 単独刺激下に比べ、著しい TF 発現の亢進が認められた。しかし、ザイモサンとの共刺激下では、同様の作用は認められなかった。このことから、イヌにおいて重度の組織壊死や慢性炎症等の存在により、血中 HMGB-1 濃度の上昇が起こる状態では、PBMCs の TF 発現の増加が起こり、またこれらにエンドトキシン血症が加わった場合、血管内血栓形成/DIC 発症のリスクはより高まることが示唆された。

### 第 3 章 イヌ末梢血単核球の LPS 刺激時におけるマイクロパーティクル放出に関する検討

マイクロパーティクル (MPs) は、活性化した細胞や壊死細胞から放出される小型細胞膜小胞体である。ヒトの重症感染症では、活性化した単球が TF 含有 MPs を放出し、血管内凝固亢進の原因となる。本章ではイヌの PBMCs 由来 MPs の検出を試み、LPS 刺激下における PBMCs 由来 MPs の増加の有無を検討した。MPs の検出には ELISA 法および凝固活性法、そして FACS 法を用いた。その結果、LPS 刺激群および非刺激群の両者において、MPs が検出された。また、ELISA 法および凝固活性法では、LPS 刺激群は非刺激群に比べ、有意な MPs の増加がみられた。このことから、イヌにおいてもヒトと同様に、感染症時には、PBMCs 由来 MPs の放出が起こり、それが血管内血栓形成ならびに DIC を誘発することが示唆された。

#### 第 4 章 DH82 細胞における組織因子発現と同細胞由来マイクロパーテイクル放出に関する検討

本章では継続的な実験使用細胞の供給や、各検体間の個体差などを最小限に抑えることを目的とし、イヌ単球系株化細胞（DH82）が PBMCs の代替細胞として利用可能かを検討した。DH82 細胞はイヌの組織球性肉腫細胞を株化した単球由来株化細胞であり、単球やマクロファージと類似点が多い。DH82 細胞の TF 発現の検出には、凝固活性法および FACS 法を用いた。DH82 由来 MPs の検出は、凝固活性法、FACS 法、そして ELISA 法を用いた。その結果、DH82 細胞は LPS 刺激により、TF 発現の有意な増加は認められたが、フローサイトメトリー法では発現増加は認められなかった。また、MPs はその存在を確認することはできたものの、LPS 刺激に対し有意な増加を示さなかった。これらの結果から、DH82 細胞をイヌ PBMCs の代替細胞として使用することは困難であることが示された。

#### 第 5 章 組み換え型イヌ IL-6 および IL-8 の末梢血単核球および単球の組織因子発現に関する検討

全身性炎症反応症候群患者では、高サイトカイン血漿となることが知られており、この時、血液中 TF 濃度増加や DIC を含む凝固異常がしばしば認められる。本章では炎症性サイトカインである IL-6 や IL-8 がイヌ単球系細胞の TF 発現を誘導するか検討した。組み換え型イヌ（rc）IL-6 と rcIL-8 を用い、また FBS や自己血漿添加培地や低用量 LPS 供刺激など様々な条件におけるイヌ単球系細胞の TF 発現を検討した。その結果、いずれの条件でも、今回使用した crIL-6 や crIL-8 の濃度では、イヌ PBMCs や単球の TF 発現の増加は認められなかった。これらの結果より、IL-6 や IL-8 は犬の炎症性疾患において、血管内凝固異常の原因となり難いこ

とが示された。

## 第 6 章 組み換え型イヌ IL-10 による末梢血単核球の組織因子発現抑制に関する検討

DIC 等の凝固系疾患に対する治療薬として、抗凝固作用を示す複数の組み換え型蛋白が使用される。但し、イヌ組み換え型蛋白を利用した治療法の検討は殆ど行なわれていない。本章では抗炎症性サイトカインである rcIL-10 を用い、イヌ PBMCs の TF 発現抑制効果を検討した。その結果、rcIL-10 は LPS 誘導性イヌ PBMCs の TF 発現を抑制し、LPS 刺激開始より 1 時間以内であれば十分に抑制することが明らかにされた。

以上の研究により、イヌ PBMCs は TF 発現のピークが他の動物種と異なること、凝固活性を示す MPs を放出することが明らかとなった。また、LSP と HMGB-1 共刺激時にはより強い反応がみられ、感染と重度の高サイトカイン血症もしくは組織壊死が存在する場合には、イヌ PBMCs の TF 発現が相乗的に増加するため、血管内血栓形成や DIC 発症のリスクはより高まることが新たに示された。さらに、抗炎症性サイトカインである IL-10 は、イヌ PBMCs の TF 発現を抑制することから、今後、血栓症や DIC 発症の予防・治療薬になる可能性が示された。

本研究成果は、臨床獣医学特に小動物臨床において貴重な知見を提示したものであり、最終試験の成績と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。