

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

小笠原聖悟

平成 26 年度

Study of tissue factor expression in canine peripheral blood
mononuclear cells and canine peripheral blood mononuclear cells
derived microparticles

Seigo Ogasawara

2014

目 次

緒 論	1
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	
I. 緒 論	5
II. 材料と方法	6
III. 結果	10
IV. 考察	12
V. 小括	15
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	
I. 緒 論	17
II. 材料と方法	18
III. 結果	20
IV. 考察	22
V. 小括	25
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	
I. 緒 論	26
II. 材料と方法	27
III. 結果	30
IV. 考察	30

V. 小括	33
-------	----

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ィクル放出に関する検討

I. 緒論	34
II. 材料と方法	35
III. 結果	39
IV. 考察	41
V. 小括	44

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

I. 緒論	45
II. 材料と方法	46
III. 結果	50
IV. 考察	52
V. 小括	54

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

I. 緒論	56
II. 材料と方法	57
III. 結果	60
IV. 考察	61
V. 小括	64

総括	66
謝辞	67
参考文献	68
付図および付表	82

緒論

播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation: DIC) は生体内において血液凝固系が活性化することで微小血管内に播種性の微小血栓を形成し、それに基づく虚血性臓器障害をきたすとともに、凝固因子や血小板の消費亢進による凝固能の低下や、線溶系亢進による著名な出血傾向を生ずる続発性の症候群である [38, 59, 73]。DIC を引き起こす基礎疾患としては、ショックや外傷、産科疾患、悪性腫瘍などが広く知られているが、これらと共に、感染症や炎症性疾患も、重要な基礎疾患と考えられている [38]。

感染症患者では、特に敗血症やエンドトキシン・ショックが DIC 誘導性疾患として良く知られており、人医療では、敗血症患者は高率に DIC を発症する [38]。また、細菌感染症だけではなく、全身性真菌感染症患者でも、DIC 発症が認められる [18]。炎症性疾患では、全身性炎症反応性症候群 (SIRS) 患者はしばしば DIC を起こす [20, 21]。加えて、SIRS に陥っていない炎症性疾患患者でも、DIC 発症や局所性血栓形成の報告も少なくない。これらの炎症性疾患や感染症性疾患に関連した DIC や凝固異常を示す患者では、しばしば血液中組織因子濃度の増加が認められており、血液凝固異常との関連性が注目されている [54, 59, 70]。

組織因子 (Tissue Factor: TF) は、トロンボプラスチンや第 III 因子とも呼ばれる分子質量 47kDa の糖タンパク質である [5, 54]。TF は全身の組織に存在するが、特に肺、脳、胎盤に多く存在する。正常時には血液内 TF 濃度は最小限であるものの、血管破綻による出血が起こると、血液中への TF の暴露が起こり、TF から始まる凝固カスケードが活性化する。TF は外因系凝固因子である第 VII 因子の補助因子として働き、活性化した第 VII 因

子と複合体を形成することで血液凝固カスケードを開始させる。TF-活性化第Ⅶ因子複合体は第Ⅹ因子を活性化させ、トロンビンを生成する。生成されたトロンビンは、フィブリノーゲンを活性化しフィブリンを形成するだけでなく、第Ⅴ、Ⅷ、Ⅺ等の内因系や共通系凝固因子を活性化させ、二次止血凝固カスケード全体の増幅・活性化に寄与する。このようにして、血管内における TF 発現は、トロンビン生成、ならびにそこから増幅される二次止血の最終産物であるフィブリン血栓形成に重要な役割を果たしている。

炎症性疾患や感染症性疾患に関連した DIC や血液凝固異常は、血管破綻を伴わない症例においてもしばしば認められる。これは血液中単核球系細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells : PBMCs) や血管を内張りする血管内皮細胞が、その凝固能を変化させるためと考えられている。近年、これらの細胞による凝固能の変化の一つとして、同細胞膜上における高度の TF 発現が注目されている [53, 54, 59]。PBMCs や血管内皮細胞における異常な TF 発現は、血管内フィブリン血栓形成につながり、血栓塞栓症やそれに伴う臓器不全を誘導する可能性がある。特に PBMCs は血管内を移動する細胞であるため、DIC や多臓器不全を引き起こす可能性がある。

PBMCs や単球系細胞における TF 発現は、リポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) やザイモサン等の感染性関連物質や、インターロイキン (IL)-1 や腫瘍壊死因子 (TNF)- α などの炎症性サイトカインの刺激を受けて生じる [10, 51, 76]。その中でも、LPS 刺激による TF 発現が良く知られているが、これは LPS が単球およびマクロファージ上の抗原認識蛋白である CD14 に結合し、膜輸送蛋白系の受容体である Toll-like-receptor (TLR)-4 を介して細胞内にリン酸化反応を起こし、NF- κ を

活性化することで、炎症性サイトカイン等の生理活性物質が生成されるためである。また、単球より産生された炎症性サイトカインを含む種々の炎症性サイトカインは、各レセプターを介して単球系細胞や血管内皮細胞を刺激し、それらの TF 発現を更に亢進させて、全身的な凝固活性化状態を誘導する。

一方、活性化された単球系細胞は、マイクロパーティクル (MPs) の放出を行うことでも、血液凝固系へ影響を及ぼす。MPs は $0.1\ \mu\text{m}\sim 1\ \mu\text{m}$ の微小細胞膜断片であり、活性化やアポトーシスを起こした血管内皮細胞、単球、血小板、壊死細胞等の細胞膜から遊離する膜小胞体である [54, 56]。MPs は、その表面に細胞膜内膜を構成するフォスファチジルセリン (PS) を発現しており、PS が血液凝固能を活性化させることが知られている。更に PBMCs 由来 MPs は PS と共に TF を発現し、より強力な凝固活性を示すことが示されている。そのため近年、炎症性疾患や感染症性疾患患者における DIC 発症と PBMCs 由来 MPs の関連も注目されている [41, 53, 54, 56]。

獣医小動物臨床現場においても感染症や炎症性疾患に続発する DIC はしばしば認められ、致死率の高い非常に重要な病態である。イヌにおける DIC 誘発性感染症・炎症性疾患としては、子宮蓄膿症や膿胸、パルボウイルス感染症等の感染性疾患、膵炎や免疫介在性溶血性貧血等の炎症性疾患が良く知られているものの、その詳細な発症メカニズムや効果的な治療方法は解明されていない [8, 11]。さらに、イヌ PBMCs の TF 発現や同細胞由来 MPs 放出に関する情報も非常に限定的であり、DIC 発症や血管内血栓形成との関連も未だ解明にされていない [50, 51]。

そこで本論文では、ヒトと同様にイヌにおいても感染症や炎症性疾患において、種々の感染性物質や炎症性サイトカインが、イヌ PBMCs の TF 発現を増加させ DIC や血管内血栓形成の原因となると考え検討を進めた。

第 1 章では、実験を進めるうえで必要となるイヌ PBMCs 由来 TF 発現に関する基礎的なデータを収集した。第 2 章では、遅延性サイトカインである HMGB-1 を使用し、同サイトカインの TF 発現に及ぼす影響に関して検討した。第 3 章では、イヌ PBMCs 由来 MPs 放出に関する検討を行った。第 4 章では、安定的な実験使用細胞の確保のため、イヌ PBMCs もしくはイヌ単球系細胞の代替細胞としてイヌ由来株化細胞が利用可能かを検討した。第 5 章では、急性期炎症性サイトカインである IL-6 と IL-8 を用い、それらのイヌ PBMCs に対する TF 発現に関する検討を行った。第 6 章では、DIC 治療薬の可能性として、抗炎症性サイトカインである IL-10 を用い、イヌ PBMCs における TF 発現抑制効果を検討した。

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

I. 緒論

全身性炎症性疾患や感染性疾患に続発する血管内血栓形成や播種性血管内凝固症候群（DIC）は、多臓器障害だけではなく、致死率を増加させる要因となっており、その病態解明や有効な治療法の確立が望まれている[38]。ヒトやマウスによる研究では、これらの凝固障害には、血小板や血管内皮細胞、そして末梢血単核球（PBMCs）由来の組織因子（TF）発現の増加が関与していることが証明されている[12, 41, 47, 69, 70]。しかし、イヌにおける血管内凝固障害と TF の関連に関する研究は限定的であり、その病態解明は進んでいない。

これまで *in vitro* におけるイヌ PBMCs の TF 発現に関する研究は、主に、試験開始から 6 時間後における TF 発現の変化や凝固活性値に焦点をあて行われてきた[50, 51]。しかし、これはウマにおける実験にて凝固活性が約 6 時間後に最大になるという報告を参考にしたものであり、実際にイヌの TF 発現や凝固活性のピークに関する報告はない[27]。本章では、イヌ PBMCs の TF 発現に関する基礎的な実験データ収集のため、イヌの末梢血単核球を LPS により刺激し、TF/凝固能発現の経時的変化を観察した。また LPS 添加による TF/凝固能発現が LPS 単独の刺激作用であることを証明するため、LPS 阻害剤であるポリミキシン B や、LPS とは異なり TLR2 を介して TF/凝固能発現を誘導するザイモサンを用いて検討を行った。

さらに、一般的な凝固活性値（Procoagulant activity: PCA）の測定は、血液凝固におけるグローバルな凝固能の計測を行っているに過ぎず、直接的に TF 発現を評価しているものではない。そこで新たな機能性 TF

発現量の測定系の確立についても検討した。

II. 材料と方法

1. 供試動物

臨床上健康なビーグル成犬 12 頭を用いた。供試犬の内訳は、雄 8 頭、雌 5 頭、体重 10.3 ± 1.0 kg、年齢 3.8 ± 4.0 歳である。これらの供試動物は、一定の日照時間、温度、食事条件の下、管理されていた。

2. 方法

1) イヌ PBMCs の分離

各供試犬から、3.8%クエン酸 Na 加真空採血管を用いて末梢血液を頸静脈から 20mL 採取した。各血液は 50mL 用滅菌プラスチック遠心管に移し、採血量と同量の滅菌 PBS を加え混和後、3mL の Histopaque-1077 (SIGMA) に静かに重層し、1,700rpm、20°C、30 分遠心分離した。Histopaque-1077 と血漿層の中間に形成された PBMCs 層を回収し、滅菌 PBS を加えた後、1,700rpm、20°C、5 分間遠心分離し、滅菌ピペットで上清を除去し、同様の操作を 2 回繰り返した。得られたペレットに RPMI-1640 を 1mL 加えペレットを十分溶解させ、自動血球計数装置 celltac α (MEK-6358、日本光電) にて細胞数のカウントを行った。

2-1) イヌ PBMCs における TF/凝固能発現の経時的変化

採取された PBMCs は 1.5mL マイクロチューブにて浮遊培養した。各チューブには 1×10^6 個の PBMCs を含有させ、1 mL の 10% 非働化牛胎仔血清加 RPMI-1640 にて培養した。試験群には LPS (リポポリサッカライド大腸菌 055:B5 由来: SIGMA) を最終濃度が 10ng/mL になるよう添加し

た。対照群として LPS を添加せず、10% 非働化牛胎仔血清加 RPMI-1640 浮遊液のみで培養するものを作成した。

試験材料を含んだマイクロチューブは、上蓋を開けた状態で 37℃、5% CO₂ インキュベーター内でそれぞれ 0、3、6、9、12、24、36、48 時間培養した。なお、この実験において、各時間の培養群における細胞生存率をトリパンブルーにて確認したところ、いずれの群も 90% 以上を保っていた。培養後、各群を 10,000rpm、4℃、1 分で遠心分離し、アスピレーターにて上清を除去した。これに、250μL の滅菌 PBS を加えて混和後、TF/凝固能発現の計測を行うまで -80℃ で冷凍保存した。

2-2) LPS およびザイモサン誘導性 TF 発現に対するポリミキシン B の作用

採材された PBMCs は 1.5mL マイクロチューブにて浮遊培養とした。各チューブには 1×10^6 個の PBMCs を含有させ、1 mL の 10% 非働化牛胎仔血清加 RPMI-1640 にて培養した。対照群、LPS 群、低濃度ザイモサン (Zymosan A : SIGMA) 群、高濃度ザイモサン群の 4 群を作成した。対照群は薬剤を加えず 10% 非働化牛胎仔血清加 RPMI-1640 のみで培養した。LPS 群には最終濃度が 10ng/mL となるよう LPS を添加し、低濃度ザイモサン群、高濃度ザイモサン群にはそれぞれ最終濃度が 10μg/mL、100μg/mL となるようザイモサンを添加した。また 4 群すべてに抗 LPS 薬であるポリミキシン B (Polymyxin B : SIGMA) を添加、もしくは添加しない 2 つのサブグループを作成した。添加したポリミキシン B の最終濃度は 100μg/mL とした。なお、この実験においてポリミキシン B の濃度を設定するため、あらかじめ 0.01、0.1、1、10、100μg/mL の濃度に調製したポリミキシン B を LPS10ng/mL と共に PBMCs に添加したと

ころ、100 μ g/mL で最も TF の発現を抑制し、それ以下の濃度では顕著な変化が見られなかった。したがって、ポリミキシン B の濃度を 100 μ g/mL に設定した。

試験材料を含んだマイクロチューブは、上蓋を開けた状態で 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。培養後、マイクロチューブを 10,000rpm、4 $^{\circ}$ C、1 分で遠心分離し、アスピレーターにて上清を除去した。これに、250 μ L の滅菌 PBS を加えて混和後、TF 発現の計測を行うまで -80 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。

2-3) 組織因子/凝固能発現測定 (凝固活性値測定)

サンプルカップ (バクスター株式会社) にスチールボール (AMELUNG GmbH, Lemgo) を一玉入れ、解凍後、良く混和したサンプル 100 μ L と同量のイヌプール血漿を加え、血液凝固自動測定装置 KC 1A (HAMELUNG GMBH D-32657 LENGO) にセットし 120 秒間加温した。120 秒後にあらかじめ 37 $^{\circ}$ C に加温した 0.02 M 塩化カルシウム液 (シスメックス) を加えると同時に凝固時間の測定を開始した。ウサギ脳由来であるトロンボプラスチン (トロンボプラスチン・C・プラス、シスメックス) を滅菌 PBS にて溶解し 4 倍階段希釈系を作成し、得られた凝固時間を検量線とした。得られたデータは求めた検量線より凝固活性値 (Procoagulant activity: PCA) として評価した。

3) イヌ PBMCs における新たな機能性 TF 測定系の確立

PBMCs が細胞数 1×10^6 個に値する量を細胞浮遊液からマイクロチューブに分注した。これに、最終濃度が 10ng/mL になるよう培養液で希釈した LPS (リポポリサッカライド大腸菌 055:B5 由来: SIGMA) を添加し、

全量が 1mL になるよう培養液を加え良く混和した。

対照群として LPS 無添加群を用意し、細胞浮遊液に全量が 1mL になるよう培養液を加えたものを作成した。各検体の培養時間は 24 時間とし、その他の培養条件、その後の凍結保存までの手技は本章材料と方法 2-3) と同様とした。

PCA 値の測定は本章材料と方法 2-3) の手技と同様とした。但し、使用する血漿は、正常イヌプール血漿、正常ヒト血漿（コージンバイオ株式会社）、あるいは、ヒト第 VII/VIIa 因子欠乏血漿（コスモバイオ株式会社）をそれぞれ用いた。また、ヒト第 VII/VIIa 因子欠乏血漿を使用した群には、これらに組み換え型ヒト第 VIIa 因子（Factor VIIa, Human：フナコシ株式会社）を加えた群も加え、凝固時間を測定した。得られた凝固時間は、ウサギ脳由来であるトロンボプラスチン（トロンボプラスチン・C・プラス、シスメックス）を階段希釈系から作成された検量線より PCA 値として評価した。

4. 統計学的処理

イヌ PBMCs における TF 発現の経時的変化の検討では、各項目の PCA 測定値を平均値±標準偏差で表した。各時間における対照群と LPS 群の統計学的検討は Student's paired t-test を用いて統計学的処置を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。また各群内における培養時間の違いについての統計学的検討は一元分散分析法の後 Tukey-Kramer 法を用いて統計学的処置を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

LPS およびザイモサン誘導性 TF 発現に対するポリミキシン B の作用に関する検討では、測定値を平均値±標準偏差で表した。LPS 刺激群に

については一元分散分析法を行った後、Tukey-Kramer 法を用いて統計学的処置を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。ザイモサン添加群については、各濃度のザイモサン群においてポリミキシン B 添加群と無添加群間で Student' s paired t-test を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

イヌ PBMCs における新たな機能性 TF 測定系確立の検討では、各検体の測定値は、PCA 値の平均値 ± 標準偏差で表し、一元配置分散分析法の後、Turkey-Kramer 検定法を用いて統計学的処置を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

III. 結果

1) イヌ末梢血単核球における組織因子発現の経時的变化

対照群の各培養時間（0、3、6、9、12、24、36、48 時間）の PCA 値は 1.2、27.5、116.7、353.5、909.1、1740.0、750.4、715.9 であり、24 時間の PCA 値は 0、3、6 時間の PCA 値に比べて有意 ($p < 0.05$) に増加した。LPS 群の各時間（0、3、6、9、12、24、36、48 時間）の PCA 値は 1.2、566.0、813.1、2053.4、4386.0、10706.2、10493.0、5491.3 であった。PCA 値は時間を追うごとに増加し、24 時間および 36 時間をピークとし、その後減少した。24 時間および 36 時間の PCA 値は 0、3、6、9 時間の PCA 値と比べて有意 ($p < 0.01$) に増加した。また、3、6、9、12、24、36、48 時間において、LPS 群の PCA 値は対照群のそれよりも有意 ($p < 0.05$) に増加した（図 1-A）。LPS 群における PCA 値の経時変動は、全ての検体において同様の傾向が認められたが、実数値に関しては個体間でばらつきがみられた（図 1-B）。

2) LPS およびザイモサン誘導性 TF/凝固能発現に対するポリミキシン B の作用

対照群のうち、ポリミキシン B 無添加群(以下、ネガティブ対照群)の PCA 値は 327.4、ポリミキシン B 添加群(以下、ポリミキシン単独添加群)の PCA 値は 647.5 であった。LPS 群のうち、ポリミキシン B 無添加群(以下、LPS 単独群)の PCA 値は 6573.9、ポリミキシン B 添加群(以下、ポリミキシン B 加 LPS 群)の PCA 値は 926.7 であった。LPS 単独添加群の PCA 値は、陰性対照群、ポリミキシン B 単独添加群と比較し、統計学的に有意 ($p < 0.01$) に増加した。またポリミキシン B 加 LPS 群の PCA は LPS 単独添加群と比較し有意 ($p < 0.05$) に低く、85.9% の抑制を示した(図 2-A, B)。

低濃度ザイモサン群のうち、ポリミキシン B 無添加群(以下、低濃度ザイモサン単独刺激群)と添加群(以下、ポリミキシン B 加低濃度ザイモサン群)の PCA 値はそれぞれ 745.76、718.84 であった。高濃度ザイモサン群のうち、ポリミキシン B を添加した群(以下、高濃度ザイモサン単独添加群)と添加群(以下、ポリミキシン B 加低濃度ザイモサン群)の PCA 値は、それぞれ 3372.3、2370.3 であった。いずれの濃度においてもポリミキシン B 添加群と無添加群の間に統計学的有意差は認められなかった。また、高濃度ザイモサン単独添加群の PCA 値は陰性対照群、低濃度ザイモサン単独添加群に比べ有意 ($p < 0.05$) に増加した(図 2-C)。

3) イヌ PBMCs における新たな機能性 TF 測定系の確立

各群の PCA 値はそれぞれ、LPS 添加群もしくは無添加群に正常イヌ

プール血漿を用いた群では、 11592.25 ± 5173.43 、 48.62 ± 78.07 であった（図 3-A）。同様に正常ヒトプール血漿を用いた群で、 54.83 ± 19.99 、 3.91 ± 3.42 であった（図 3-B）。LPS 添加群にヒト第 VII/VIIa 欠損血漿を用いた群で 1.04 ± 0.51 、また、この群に組み換え型ヒト第 FVII/VIIa を添加したプール血漿を用いた群で 41.22 ± 15.87 であった。

正常イヌプール血漿を用いた群では、LPS 添加群は、無添加群に比べ統計学的に有意な ($p < 0.01$) PCA 値の増加が認められた。同様の結果は、正常ヒトプール血漿を用いた LPS 添加および無添加群間においても認められた。また、ヒト第 VII/VIIa 欠損血漿を用いた群では、LPS 添加群と無添加群との間に有意差は認められず、ここに組み換えヒト第 VII/VIIa 因子を添加することで、PCA 値は正常ヒトプール血漿を用いた場合と同程度の PCA 値が得られた（図 3-B）。このことから、ヒトプール血漿を用いて測定される PCA 値は、第 VII/VIIa 因子の存在に依存しており、イヌ PBMCs の TF 発現量を示していると判断された。

IV. 考察

本章では、LPS 刺激下におけるイヌ PBMCs の TF/凝固能発現の経時的変化の確認をした。LPS の投与量は、過去のウマ PBMCs における類似の実験において使用された LPS と同等の濃度である 10ng/mL とした [27]。その結果、LPS 群では全ての検体が LPS 添加後時間経過とともに凝固活性値が上昇し、24~36 時間後にはピークとなり、48 時間後に減少した。LPS 添加から 24 時間後の PCA 値は、6 時間の PCA 値と比べ約 13 倍増加し、統計学的有意差が認められた。これまで PBMCs 由来 TF/凝固能発現のピークは、マウスで 4 時間、ヒトおよびウマで 6 時間、ウサギで 8 時間とされており、今回のイヌ PBMCs の TF/凝固能発現ピーク時間は、他の動物種と

は異なる。このことより、PBMCs の TF/凝固能発現は動物種により異なる可能性があると推測された [3, 24, 27, 42]。

LPS 添加群と比較すると、その変化は少ないものの、対照（無添加）群においても PBMCs の TF/凝固能発現は、多くの検体で培養開始後 24 時間にピークを認めた。但し、少数の検体では培養後 48 時間にピークに達した。対照群において TF 発現が増加した原因としては、イヌ PBMCs の長時間培養自身が TF 発現の刺激となった可能性や、生体内では存在した TF 発現に関する抑制性因子を失ったことによるイヌ PBMCs の TF/凝固能発現の増加などが考えられる。また、培養期間中に細胞死を起こした細胞片が凝固活性の刺激となった可能性も考えられるが、いずれの群も培養後の細胞生存率が常に 90% 以上を保っていたため、その影響は低いと考えられた。また、対照群において PCA 値の変化が大きい検体は、同一個体の LPS 群においても同様の傾向があり、イヌ PBMCs の TF/凝固能発現には個体差があると考えられた。

上記の検討においてイヌ PBMCs の PCA 値は、対照群に比べ LPS 群で有意に増加した。しかし、この結果が LPS 単独作用によるものかについては疑いの余地がある。そこで次に、LPS 拮抗剤であるポリミキシン B を用い、上記の結果が LPS 以外の作用に関連するかを検証した。ポリミキシン B は、*Bacillus polymyxa* またはその近縁菌が産生する塩基性ポリペプチドであり、LPS のうち毒素活性を有するリポド A と高い親和性で結合することで LPS を中和する作用がある。本検討では、ポリミキシン B の存在により LPS を失活させた状態でのイヌ PBMCs の TF/凝固能発現量を検討した。同検討では、陽性対照群として、ポリミキシン B の抑制作用を受けず、LPS とは異なる経路で TF を発現させるザイモサンを使用した。ザイモサンは酵母細胞壁から調製された酵素であり、タンパ

ク質 - 糖複合体である。LPS が Toll 様受容体 (TLR) -4 を介して細胞内に情報を伝達することで種々の炎症性サイトカインを誘導するのに対し、ザイモサンは TLR-2 を介することが知られている [68]。今回の検討におけるザイモサン濃度は、過去のイヌにおける類似の報告を基に 100 μ g/mL とした。ザイモサン高濃度 (100 μ g/mL) 添加群では、イヌ PBMCs の PCA 値は対照群に比べ有意に増加した。また新たに、ザイモサンは濃度依存的にイヌ PBMCs の TF/凝固能を誘導することが分かった。ザイモサン単独添加群とポリミキシン B 加ザイモサン群の PCA 値には統計学的有意差はなく、ザイモサン刺激による TF/凝固能発現はポリミキシン B により影響を受けなかった。一方で、ポリミキシン B 加 LPS 群は、LPS 単独刺激群に比べ PCA 値の有意な減少が認められ、ポリミキシン B 添加による TF/凝固能発現の抑制率は 85.9% であった。これらの結果より、本章の検討における LPS 刺激によるイヌ PBMCs の TF/凝固能発現は、LPS の単独作用に起因すると説明できる。

上述の検討において測定された PCA 値は、各検体の正常プール血漿に対する全般的な凝固能を計測しているに過ぎない。これらは多くの場合、PBMCs の TF 発現に関連しているが、これを完全に証明するものではない。そこで、本章最後の検討として、測定される PCA 値が、機能的 TF 依存性であることを証明し、今後の検討に用いる測定系として利用可能か検討した。その結果、LPS 刺激を行ったイヌ PBMCs の PCA 値は、ヒト第 VII/VIIa 因子欠損血漿を用いた場合、正常ヒト血漿に比べ統計学的に有意に低下した。また、ヒト第 VII/VIIa 因子欠損血漿に、組み換え型ヒト第 FVII/VIIa を添加した場合、正常ヒト血漿の PCA 値と同等の値を示した。このことから、正常ヒト血漿を用いて測定されるイヌ PBMCs の PCA 値が TF 発現に依存し、今後の本測定系での PCA 値を TF 発現量

と同等であると判断した。

V. 小括

敗血症は感染に関連した全身性反応であり、それに付随する播種性血管内凝固症候群（DIC）は人獣医療において認められる致死的な病態である。敗血症に伴う DIC 発症には、グラム陰性菌細胞膜物質であるリポポリサッカライド (LPS) が、血液内単球やマクロファージにおける、組織因子 (TF) 発現を増加させ、血管内フィブリン血栓形成を促進させることが、一因とも考えられている。本章では、今後の検討を行ううえで必要となる、イヌ末梢血単核球細胞 (PBMCs) の TF 発現に関する基礎的なデータを収集するための検討を行った。

初めに、LPS 刺激下におけるイヌ PBMCs の TF/凝固能の経時的変化を調べた。イヌ PBMCs を分離し、LPS 添加群 (10ng/mL) と無添加群を用意した。これらを 37°C、5% CO₂ 下で 0、3、6、9、12、24、36、48 時間の刺激培養後、PBMCs の凝固活性時間を 1 段階凝固測定法により測定し、これを凝固活性値 (PCA) とした。各時間において LPS 添加群は、無添加群と比較し有意に PCA 値の増加が認められ、これらは 24 および 36 時間でピークとなった。

また、上述の検討で得られた PCA 値は、細胞全体のグローバルな凝固状態を示しているのみであり、TF に限定的なものではない。そこでこれらの PCA 値が TF 依存性に起こり、今後、同測定系での PCA 値を TF として判断可能か検討した。PCA 値の測定には、正常ヒト血漿、ヒト第 VII/VII a 因子欠損血漿、組み換え型ヒト第 VII/VII a 因子を用いた。その結果、イヌ PBMCs の PCA 値は、正常ヒト血漿を用いた時に比べ、ヒト第 VII/VII a 因子欠損血漿を用いた場合、統計学的に有意な低下を認めた。また、これは

組み換え型ヒト第VII/VIIa 因子の添加により、正常ヒト血漿を用いた時の PCA 値と同等となった。これらの結果より、本実験系正常ヒト血漿で測定する PCA 値は、TF 依存性であることが証明された。

以上より、イヌ PBMCs の TF/凝固能発現のピークは LPS 添加から 24 ～36 時間後であり、PBMCs 由来 TF/凝固能は動物種により発現ピーク時間が異なることが示された。また、ヒトプール血漿を用いて測定する凝固活性値が、イヌ PBMCs の TF 発現に依存することを証明した。

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

I. 緒論

生体では炎症性反応として様々な炎症性サイトカインが産生される。炎症初期には、腫瘍壊死因子 (TNF) やインターロイキン (IL) -1、IL-6 などが産生され、病巣への炎症性細胞の誘導や発熱などの作用をもたらす [67]。その後、炎症の重篤/慢性化、全身性炎症への発展、重度の組織障害などが起こると、マクロファージ/単球系細胞あるいは壊死細胞より、遅発性サイトカインである High Mobility Group Box (HMGB)-1 が放出される [4, 58]。

HMGB-1 は、全ての有核細胞の核内に存在する 30kDa の非ヒストン核蛋白質であり、核内において DNA と結合しながら存在する [58]。HMGB-1 は、p53 や NF- κ B など様々な転写因子の活性を間接的に調節している。細胞からの HMGB-1 放出は、LPS や TNF- α などのサイトカイン刺激を受けたマクロファージや樹状細胞などが新たに産生・分泌する能動的放出と、アポトーシスに陥った細胞内の HMGB-1 が DNA から遊離することで細胞外へと放出される受動的放出の 2 つの機序が存在すると考えられている。放出された HMGB-1 は、周辺細胞に働き後期糖化代謝産物受容体 (Receptor for advanced glycation endproducts : RAGE) や Toll 様受容体 (TLR) -2 もしくは TLR-4 等を介して細胞内シグナル伝達を起こし、NF- κ B の活性化を経て TNF- α や IL-1 α / β 、IL-6、IL-8、Macrophage inflammatory protein (MIP) などの種々の炎症性サイトカインを誘導する [4, 58]。

ヒトの感染症や外傷、術後、悪性腫瘍性疾患では、一様に血中 HMGB-1 濃度の増加が認められ、臓器不全や DIC を併発した患者では、HMGB-1 濃度は更に増加した [25]。また、別の報告では、HMGB-1 は PBMCs の TF 発現

を誘導することが示された[30]。これらの知見から、血中 HMGB-1 濃度が増加した患者では、PBMCs 由来 TF 発現に関連して血液凝固異常を発症する可能性が高いと考えられる。

過去の報告では、イヌの腫瘍、血液、肝胆道系、消化器、呼吸器疾患などの症例の血中 HMGB-1 濃度 (0.00~174.70 ng/mL) は、正常犬のそれ (0~6.62 ng/mL) に比べ、有意に増加していた[29, 78]。しかし、イヌの HMGB-1 における研究報告は非常に少なく、その詳細な機能に関しては不明な点が多い。また、イヌの HMGB-1 と血液凝固異常に関する報告はない。そこで第 2 章では、イヌにおける HMGB-1 と血液凝固異常の関連、特に TF の発現に関して検討を行った。

本章では第 1 章の実験結果を基に、イヌ PBMCs の刺激時間を 24 時間と設定し、組み換え型ヒト HMGB-1 を用い、イヌ PBMCs の HMGB-1 に対する TF 発現の変化を検討した。また、感染症併発モデルとして、LPS やザイモサンを用い、HMGB-1 と共刺激下でのイヌ PBMCs 誘導性 TF 発現の変化も併せて評価した。

II. 材料と方法

1. 供試動物

临床上健康なビーグル成犬 13 頭を用いた。供試犬の内訳は、雄 7 頭、雌 6 頭、体重 11.2 ± 1.0 kg, 年齢 3.6 ± 3.7 歳である。これらの供試動物は、一定の日照時間、温度、食事条件の下、管理されていた。

2. 方法

1) イヌ PBMCs の分離

イヌ PBMCs の分離は第 1 章・材料と方法 2.1) での手技と同様とし

た。

2-1) 組み換え型ヒト HMGB-1 の濃度変化によるイヌ PBMCs の TF 発現量の変化

イヌ PBMCs の細胞数が 1×10^6 個に調整した量を細胞浮遊液からマイクロチューブに分注し、組み換え型ヒト (rh) HMGB-1 (HMG-1: SIGMA) を、最終濃度が 0、1、10、100、1000 ng/mL になるよう添加した。また同時に、最終濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ のポリミキシン B (PMB) も添加し、全量が 1mL になるように培養液を加え良く混和した。

陽性対照として、最終濃度が 10ng/mL になるように培養液で希釈した LPS を 100 μL 添加した群を作成した。なお、陽性対照群には PMB の添加は行っていない。培養条件及び凍結保存までの手技は、第 1 章・材料と方法 2.2-1) と同様とした。

イヌ PBMCs の TF 発現量の測定は第 1 章・材料と方法 2.3) 内での手技と同様とした。但し、使用血漿は、第 1 章での検討結果を基に、正常ヒト血漿とした。

2-2) rhHMGB-1 と LPS もしくはザイモサンの共刺激下におけるイヌ PBMCs の TF 発現量の変化

イヌ PBMCs が細胞数 1×10^6 個に値する量を細胞浮遊液からマイクロチューブに分注し、最終濃度が 0、100、1000 ng/mL になるように培養液で希釈した rhHMGB-1 を 100 μL 添加した。また、各濃度群に、最終濃度が 0、1、10 pg/mL になるように培養液で希釈した LPS もしくは最終濃度が 0、0.1、1、10 $\mu\text{g/mL}$ になるように培養液で希釈したザイモサンを添加した。その後、全量が 1mL になるように培養液を加え良く混和し

た。また、各群において、最終濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培養液で希釈した PMB を追加添加した群も作成した。陽性対照には LPS 10 ng/mL 添加群を用意した。陽性対照群には PMB の添加は行っていない。培養条件及び凍結保存、TF 発現量測定に関する手技は、本章・材料と方法 2.2-1) と同様とした。

3. 統計学的処理

イヌ PBMCs の TF 発現量は TF 依存性凝固活性 (TFPCA) 値として示した。各群の結果は TFPCA 値の平均値 \pm 標準偏差で表し、一元配置分散分析法の後、Turkey-Kramer 検定法を用いて統計学的処置を行った。 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

III. 結果

1. 組み換え型ヒト HMGB-1 の濃度変化によるイヌ PBMCs の TF 発現量の変化

rhHMGB-1 ; 0、1、10、100、1000 ng/mL の各濃度におけるイヌ PBMCs の 24 時間刺激後の TFPCA 値は、 11.55 ± 1.46 、 14.29 ± 1.00 、 15.65 ± 0.85 、 18.28 ± 1.77 、 25.82 ± 4.86 であった。rhHMGB-1 濃度 100 ng/mL 以上の群では濃度 0 ng/mL 群に比べ、統計学的に有意な TFPCA 値の増加 ($p < 0.05$) が認められた (図 4)。このことから、イヌ PBMCs は rhHMGB-1 刺激に対し、濃度依存的に TF 発現を増加させることが示された。

2. rhHMGB-1 と LPS 共刺激下におけるイヌ PBMCs の TF 発現量の変化

rhHMGB-1 単独投与群 (LPS; 0 ng/mL) では、PMB 添加の有無に関わらず、濃度 1000 ng/mL 群は濃度 0 ng/mL 群に比べ、統計学的に有意な TFPCA 値の

増加 ($p < 0.05$) が認められた (図 5)。各 rhHMGB-1 濃度 (0、1000ng/mL) における PMB 添加の有無による TFPCA 値に統計学的な差は認められなかった (図 5)。このことから、PMB は rh-HMGB-1 のイヌ PBMCs の TFPCA 値に影響を与えないことが示された。また、LPS 単独投与群に対し PMB 添加を行った場合、第 1 章での検討結果と同様に、TFPCA 値は著しく減少した (図 5)。

一定濃度の rhHMGB-1 (1000 ng/mL) に、それぞれ異なる濃度の LPS (0、1、10 pg/mL) を添加した PMB 無添加群では、LPS 濃度依存性に TFPCA 値の増加を認めた (17.93 ± 4.48 、 27.69 ± 14.25 、 44.84 ± 12.96 ; 図 5)。また、その中で、LPS 1pg/mL 加 rhHMGB-1 添加群は、rhHMGB-1 単独群 (LPS:0ng/mL、PMB:0 μ g/mL) および LPS 1pg/mL 加 rhHMGB-1 無添加群に比べ、統計学的に有意な TFPCA 値の増加を認めた ($p < 0.05$)。同様に、LPS 10pg/mL 加 rhHMGB-1 添加群 (PMB:0 μ g/mL) は、rhHMGB-1 単独群 (LPS:0ng/mL、PMB:0 μ g/mL)、LPS 1pg/mL 加 rhHMGB-1 群および LPS 10pg/mL 加 rhHMGB-1 無添加群 (PMB:0 μ g/mL) と比較し、統計学的に有意な TFPCA 値の増加 (各 $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$) を認めた (図 5)。しかし、これら各群の反応は、PMB 添加により、rhHMGB-1 単独投与群 (LPS:0ng/mL) の TFPCA 値と統計学的差異を認めなかった (図 5)。

一定濃度の LPS (10 pg/mL) 存在下において、異なる濃度の rhHMGB-1 (0、100、1000 ng/mL) を添加した各群 (PMB 無添加) では、rhHMGB-1 濃度依存的に TFPCA 値の増加 (22.06 ± 6.39 、 30.85 ± 12.44 、 44.84 ± 12.96) が認められ、rhHMGB-1 濃度 0ng/mL 群と比較し、rhHMGB-1 濃度 1000ng/mL 群では、TFPCA 値は統計学的に有意 ($p < 0.01$) に増加した (図 6)。また、これらの各群に PMB を添加した場合、各群の TFPCA 値は rhHMGB-1 の濃度依存的に増加した (11.35 ± 3.43 、 12.56 ± 4.17 、

17.30±6.71) (図 6)。但し、これは各濃度における rhHMGB-1 単独群 (LPS;0ng/mL、PMB:0 μg/mL) の TF 発現量と同様の挙動を示し、対応する各濃度群には、統計学的差異は認められなかった。

3. rhHMGB-1 及びザイモサン共刺激下におけるイヌ PBMCs の TF 発現量の変化

各濃度 (0、0.1、1、10 μg/mL) のザイモサン単独添加 (rhHMGB-1;0ng/mL) におけるイヌ PBMCs の TFPCA 値は、それぞれ 12.84±2.58、19.85±3.32、26.38±4.56、32.60±6.54 であり、ザイモサン濃度依存性に TFPCA 値の増加が認められた (図 7)。また、ザイモサン濃度 1、10 μg/mL 群は、濃度 0μg/mL 群と比較し、統計学的に有意な TFPCA 値の増加 ($p<0.01$) を認めた。

ザイモサン各濃度 (0、0.1、1、10 μg/mL) と共に rhHMGB-1 (100ng/mL) を添加した時の TFPCA 値は、17.76±2.01、15.50±2.46、16.96±1.75、17.86±1.86 であり、各群間において統計学的有意差は認めなかった。しかし、rhHMGB-1 濃度を 1000ng/mL に増加させた場合、各ザイモサン濃度群での TFPCA 値は、32.00±6.71、16.02±3.81、17.08±2.28、17.95±1.69 となった。rhHMGB-1 単独群 (1000ng/mL、ザイモサン 0μg/mL) と比較し、rhHMGB-1 (1000ng/mL) と各濃度のザイモサンの共刺激群は、有意 ($p<0.01$) に TFPCA 値を減少させた (図 7)。

IV. 考察

生体内でおこる炎症性反応は、時間経過と共に変化する。炎症性反応の極初期にはマクロファージからの TNF や IL-1 などの急性期炎症性サイトカイン放出が起こる [67]。これらの炎症性サイトカインは、肝臓におけ

る急性相蛋白の産生や、他の炎症性サイトカインの誘導、また病変部位における炎症性細胞の集簇に関与する。その後、炎症が慢性化や全身性へと波及すると、HMGB-1 等の遅発性炎症性サイトカインの放出も起こる [4]。血液中への HMGB-1 の放出は、炎症性サイトカインとして炎症性反応を調節するだけでなく、血液凝固活性を示す可能性がある。ヒトやマウスでは、HMGB-1 と DIC や血管内血栓形成等の凝固異常との関連が示されている [25, 30]。また、感染性炎症性疾患では、血管内凝固異常の発生頻度が非常に高く、人医療ではこれらの疾患と HMGB-1 との関連も示されている [17, 40]。但し、イヌにおける HMGB-1 と血液凝固異常に関する報告はない。

本章では、HMGB-1 のイヌ PBMCs 由来 TF 発現に関する検討を行った。検討ではイヌ HMGB-1 との相同性を考慮し、組み換え型ヒト HMGB-1 を使用した。本章での HMGB-1 の検討濃度は、過去に報告されたイヌの疾患時の血中 HMGB-1 濃度 (0~174.70ng/mL) を考慮し、0~1000ng/mL までの十倍階段希釈と設定した [29, 78]。また、イヌ PBMCs の HMGB-1 への刺激時間は第 1 章の結果を基に 24 時間とした。その結果、イヌ PBMCs の TFPCA 値は、rhHMGB-1 濃度依存的に増加し、rhHMGB-1 濃度 100ng/mL 以上の群では、統計学的に有意な TFPCA 値の増加が認められた。このことより、生体内で HMGB-1 濃度が上昇した場合、イヌ PBMCs は TF 発現量を増加させ、血管内血栓形成や DIC 等の血液凝固異常を引き起こすリスクを高めることが示唆された。

次に感染症炎症性疾患モデルとして、グラム陰性菌の関連物質である LPS と、真菌関連物質であるザイモサンを用い、HMGB-1 との共存下におけるイヌ PBMCs の TF 発現の変化に関して検討した。HMGB-1 と LPS の共

刺激下におけるイヌ PBMCs の TFPCA 値は、著しく増加した。これは、HMGB-1 もしくは LPS 単独添加による TFPCA 値の総和を超えており、“所謂”相乗的に TF 発現が増加したと考えられる。この結果は、子宮蓄膿症やパルボウイルス感染症、腎盂腎炎や膿胸等のエンドトキシン血症などを伴う重度の感染性炎症性疾患や、胃拡張胃捻転症候群や腫瘍性疾患等の重度の組織損傷/壊死と共に二次性細菌感染が存在した場合、血液中 HMGB-1 と LPS 濃度が増加し、イヌ PBMCs の TF 発現が著しく増加し、血管内血栓形成や DIC 発症のリスクがより増幅することを示唆している。そのため、これらの疾患では、感染のコントロールを十分に行うことや、HMGB-1 増加の原因を速やかに取り除くことで、血液凝固異常の発生を抑え、症例の予後を大きく改善させる可能性がある。

また、真菌感染性炎症を想定し、ザイモサンと HMGB-1 の共存在下でのイヌ PBMCs の TF 発現量も検討した。その結果、上述の LPS 添加群とは異なり、HMGB-1 とザイモサンの共刺激下では、HMGB-1 単独群と比較しイヌ PBMCs の TFPCA 値は変化ない、もしくは有意に減少した。これに関する明確な理由は不明である。考えられるメカニズムとしては、HMGB-1 とザイモサンが互いに結合し、レセプターへの結合ができなくなった状態や、互いに中和作用を示した可能性がある[40, 58]。以上の結果より、ザイモサンと HMGB-1 の共存が起こりうる慢性真菌感染症などでは血管内凝固異常の発生リスクは増加しないと考えられた。

以上より、本章では HMGB-1 によるイヌ PBMCs 由来 TF 発現の変化を確認した。イヌ PBMCs の TFPCA 値は HMGB-1 の濃度依存的に増加し、また LPS との共存下では相乗的に TFPCA 値が増加した。このことは、慢性・重度の感染性炎症性疾患や感染症を伴う多量の壊死性病変の存在は、DIC や血管内血栓形成等の血液凝固異常のリスクを高めることを示唆する。

V. 小括

本章では、遅延性炎症性サイトカインの一つである HMGB-1 がイヌ PBMCs の TF 発現に与える作用を検討した。HMGB-1 添加に対するイヌ PBMCs の培養時間は第 1 章の結果を基に、24 時間とした。

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、細菌や真菌感染症モデルとして、LPS やザイモサンと HMGB-1 共刺激時における TF 発現の変化も併せて検討したところ、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、イヌ PBMCs の著しい TF 発現増加（相乗効果）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 発現が増加し、さらに、エンドトキシン血症が加わった場合、血管内血栓形成/DIC などの血液凝固異常を起こすリスクは、より高くな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

I. 緒論

炎症や LPS 等の感染性物質に暴露された生体は、血管内血栓形成や DIC に続発する臓器障害を進行させる可能性が高い。これは PBMCs の TF 発現による凝固活性の亢進だけでなく、全身性の血管内皮細胞傷害や血小板の活性化などが関与しており、血管内での血液凝固・線溶系のアンバランスや接着因子を介した血管内皮細胞、白血球、血小板相互の活性化が原因と考えられている [13, 33, 70]。またこの時、活性化された血小板や白血球および血管内皮細胞は、微小な膜小胞体であるマイクロパーティクル (Microparticles:MPs) を遊離することが知られている [36, 56]。

MPs は細胞の内部顆粒や膜性微粒子、および機械的破壊によって生成された $0.1 \mu\text{m} \sim 1 \mu\text{m}$ の細胞膜断片であり [36, 56]、いずれの細胞由来 MPs も凝固活性を有する。特に単球・単核球系細胞由来 MPs は、その表面に TF を保持することでより強力な凝固活性を示すことから注目されている [56, 70]。単球・単核球系由来 MPs は、人医療において糖尿病や急性心筋梗塞、尿毒症、DIC などの血栓性疾患患者において高率に検出されており、これらの疾患に関連した血管病変のメカニズムを考えるうえで注目されている [41, 56]。一方、イヌにおいては、血小板や赤血球、株化腫瘍細胞由来 MPs の報告が少数存在するのみである [26, 28]。但し、イヌ単球・単核球由来 MPs に関する報告は存在せず、人医療域で認められるような疾患に関連した単球・単核球由来 MPs の報告もない。そこで本章では、イヌの感染症疾患における血液凝固異常に PBMCs 由来 MPs が関係するかを

確認すべくイヌ PBMCs 由来 MPs の存在を確かめ、また、同 MPs が LPS 刺激により増加するか検討を行った。

II. 材料と方法

1. 供試動物

供試犬は、臨床上健康なビーグル成犬、体重 10.7 ± 2.0 kg、年齢 3.9 ± 2.8 歳である。これらの供試動物は、一定の日照時間、温度、食事条件の下、管理されていた。

2. 方法

1) イヌ PBMCs の分離および LPS 刺激、培養

各供試犬の頸静脈より EDTA 真空採血管（ベノジェクト II 真空採血管：TERUMO）を用いて 30mL 採血を行った。各血液は、50mL 用滅菌プラスチック遠心管に移し、採血量と同量の滅菌 PBS を加え混和後、2mL の Histopaque-1077 (SIGMA) に静かに重層し、400G、20°C、30 分遠心分離した。Histopaque-1077 と血漿層の中間に形成された PBMCs 層を回収し、滅菌 PBS を加えて、250G、20°C、10 分間遠心分離し、滅菌ピペットで上清を除去した。同様の操作を 2 回繰り返した。得られた PBMCs のペレットにペニシリン・ストレプトマイシン、L-glutamate、pyruvate 加 RPMI-1640 培養液（培養液）を 1mL 加えてペレットを十分混和し、自動血球計数装置 celltac α (MEK-6358、日本光電) にて細胞数のカウントを行った。

PBMCs が細胞数 2×10^6 個に値する量を細胞浮遊液からマイクロチューブに分注した。これに、最終濃度が $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう培養液で希釈した LPS を添加し、全量が 1mL になるよう培養液を加え良く混和し LPS 添加群とした。対照群として LPS 無添加群を用意し、細胞浮遊液に全量が

1mLになるよう培養液を加えたものも調製した。各群の検体は少なくとも2本ずつ用意した。検体は37℃、5% CO₂インキュベーター内で24時間培養した。

2) イヌ PBMCs 由来 MPs 分離

PBMCs 培養後、MPs を回収した。マイクロチューブに培地上清を収集し2mL ずつとし、13,000G、15分、4℃で遠心分離し、さらにその上清を新たにエッペンドルフ・マイクロチューブに1.0mL ずつ分注し、100,000G、30分、4℃で超遠心分離を行った。その後、ELISA 法および PCA 法では上清1.3mL を除去して、残り200 μl をサンプルとした。FACS 法では上清を可能な限り除去し、ペレット状のサンプルとした。各検査実施まで、全ての検体は-80℃で冷凍保存した。

3) ELISA 法によるイヌ PBMCs 由来 MPs の検討

本検討で用いた ELISA キットは ZYMUPHEN MP-Activity (ANIARA) である。測定方法は製品の納書に記載されている方法に従って行い、吸光度(波長:405nm)を測定した。得られた吸光度は、キットに添付されているキャリブレーター階段希釈系から作成された検量線より MPs 発現量を求め評価した。

4) フローサイトメトリー (FACS) 法によるイヌ PBMCs 由来 MPs の検討

MPs ペレットは Annexin Binding Buffer (SouthernBiotech) にて 100 μL にメスアップした検体を3本のマイクロチューブにそれぞれ30 μL ずつになるように分注し、3 μL PE 標識 Annexin-V (SouthernBiotech) 添加群を用意した。陰性対照として 250mM EDTA Buffer 3 μL 添加群も併せて

用意した。これらの検体は、抗体反応後 4℃、暗所にて 20 分染色反応させ、Annexin Binding Buffer にて 380 μ L にメスアップし、十分に攪拌した。サンプルは全て FACS による計測まで 4℃、暗所にて保管した。

調製したサンプルの測定は、すべて同一のフローサイトメーター (Coulter EPICS XL ; Beckman Coulter) を使用した。フローサイトメーターによって得られた各項目のサイトグラムにおいて、前方散乱光、側方散乱光により、MPs 領域をゲーティングした。MPs のゲーティングにはサイズ 1.065 μ m のラテックスビーズ (Polysciences Inc) を用い、ビーズのサイズ以下の領域を MPs と設定した。MPs の測定は、一定速度の細胞検出速度 (High) および一定時間 (150 秒) におけるゲート内カウント MPs 数と、そのヒストグラムより得られた Annexin V 陽性 MPs 陽性率より求められた MPs 数を、MPs 数/150 秒として表した。

5) 凝固活性法によるイヌ PBMCs 由来 MPs の検討

サンプルカップ (バクスター株式会社) にスチールボール (AMELUNG GmbH, Lemgo) を一玉入れ、解凍・溶解処置後よく混和したサンプル 100 μ L と同量の正常ヒト血漿 (コージンバイオ) を加え、血液凝固自動測定装置 KC 1A (HAMELUNG GMBH D-32657 LENG0) にセットし 120 秒間加温した。120 秒後に予め 37℃ に加温した 0.02 M 塩化カルシウム液 (シスメックス) を 100 μ L 加えると同時に凝固時間の測定を開始した。得られた凝固時間は、組織因子 (TF) を階段希釈系から作成された検量線より TFPCA 値を求め、TF 発現量として評価した。

3. 統計学的処理

いずれの検査においても、計測された MPs 量、MPs 数もしくは TF 発現量は、平均値±標準偏差で表した。対照群と LPS 添加群間の差の検定は、Student' s t-test を用い、 $P < 0.05$ をもって有意差ありとした。

III. 結果

1) ELISA 法によるイヌ PBMCs 由来 MPs の検討

ELISA 法によるイヌ PBMCs 由来 MPs 量 (nM) は対照群、LPS 添加群においてそれぞれ、 0.74 ± 0.15 、 0.98 ± 0.12 であった (図 8)。LPS 添加群では対照群に比べ、統計学的に有意な MPs 量の増加が認められた ($p < 0.05$)。

2) フローサイトメトリー (FACS) 法によるイヌ PBMCs 由来 MPs の検討

FACS 法によるイヌ PBMCs 由来 MPs 数は対照群、LPS 添加群においてそれぞれ、 1031.0 ± 462.7 、 4133.3 ± 3353.4 であった (図 9)。LPS 添加群の MPs 数は対照群と比較し増加傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった ($p = 0.094$)。

3) 凝固活性法によるイヌ PBMCs 由来 MPs の検討

イヌ PBMC 由来 MPs 依存性 TFPCA 値は、対照群、LPS 添加群においてそれぞれ、 10.93 ± 6.11 、 52.01 ± 32.09 であった (図 10)。LPS 添加群では対照群に比べ、統計学的に有意な TFPCA 値の増加が認められた ($p < 0.01$)。

IV. 考察

炎症性疾患や感染症性疾患では、炎症性細胞の一つである単球・マクロファージ系細胞が、種々の炎症性サイトカイン放出

や貪食作用を示すだけでなく、様々な作用により血管内血栓形成を促進することが示唆されている [6, 41, 53]。これらの細胞による血管内血栓形成は、活性化された細胞が膜表面に TF を発現することや、TF 含有単球由来 MPs を放出することにより起こる [26, 56, 70]。

MPs は細胞膜より遊離する 1.0 μm 以下の小型小胞体であり、血小板や血管内皮細胞、単球、赤血球、腫瘍細胞、壊死細胞など、様々な細胞より放出されることが知られており、その表面にフォスファチジルセリン (PS) を発現している [26, 28, 56, 70]。PS は元来、細胞膜リン脂質の二重層の内側に存在するが、MPs として放出された小胞体では、これらの膜の反転が起こり、PS が外側に露出される。PS は凝固因子と結合し、凝固を促進する作用を持つ。これに加え単球・単核球由来 MPs は、活性化した細胞が発現した TF を保持することで、より強い凝固能を有していることが知られている [53, 56, 70]。

単球・単核球由来 MPs の存在は、人医療において様々な疾患において報告されており、炎症性疾患や感染性疾患に続発する血管内血栓形成や DIC 発症との関連が示されていた [55, 56, 70]。しかし、イヌの単球・単核球由来 MPs の存在は証明されておらず、同細胞由来 MPs が血液凝固異常の原因となるかも不明であった。

本章では 3 つの異なる測定方法により、イヌ PBMCs 由来 MPs の存在を確認し、また LPS 刺激下における MPs 放出の変化を比較検討した。本検討に使用する LPS の投与量は *in vitro* での敗血症モデル作成に十分な量とされる 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、培養時間は 24 時間に設定した。また凝固

活性 (PCA) 法による TF 発現量の測定は、本論文第 1 章で確立した方法を用いた。

その結果、全ての検出法において、イヌ PBMCs 由来 MPs を検出できた。加えて、ELISA 法では、LPS 刺激下におけるイヌ PBMC 由来 MPs 放出量は、対照群のそれに比べ統計学的に有意に増加した。これは他の動物種と同様の結果であり、LPS 刺激がイヌ PBMCs の MPs 放出を誘導したと考えられた。FACS 法では、LPS 添加により MPs 数は増加傾向が認められたものの、統計学的有意差は認められなかった ($p=0.094$)。考えられる原因としては、今回測定に用いたフローサイトメーターの測定限界値が直径 $0.5 \mu\text{m}$ であり、それ以下 ($0.1 \mu\text{m} \sim 0.4 \mu\text{m}$) の MPs を検出できなかった可能性がある。過去に類似の測定限界値を有するフローサイトメーターを用いた研究での報告があり、同様の結果となったものも少なくない [1, 26, 36]。もし、今回の測定限界値以下の MPs の検出が可能の場合には、統計学的有意差が認められたかもしれない。凝固活性法によるイヌ PBMCs 由来 MPs の TFPCA 値は、対照群に比べ LPS 添加群で有意に増加した。これは LPS 刺激下において、凝固活性を示す PBMCs 由来 MPs の放出増加が起こり、また、それらが TF を発現する可能性を示唆する。

以上の結果より、本章では、複数の実験手技により、イヌ PBMCs 由来 MPs を確認し、また LPS 刺激下におけるイヌ PBMCs 由来 MPs 発現の変化を確認した。イヌ PBMCs 由来 MPs は、LPS 刺激下において MPs 放出量や MPs 由来凝固活性が増加することが示された。これらの結果より、感染症疾患時には凝固活性を示すイヌ PBMCs 由来 MPs の放出が起こり、血管内血栓形成や DIC 等の凝固異常発生のリスクが高める可能性があると考えられた。

V. 小括

近年、単球における血液凝固活性は、細胞膜表面に発現する TF のみならず、細胞膜片であるマイクロパーティクル (MPs) の放出が起こり、これらが原因となることが知られてきた。本章では、イヌ末梢血単核球細胞 (PBMCs) に LPS 刺激を加え、PBMCs 由来 MPs 放出の有無に関して多方向的に検討した。

イヌの末梢血液から PBMCs を分離し、LPS 添加群 (10ng/mL) と無添加群を用意した。これらを 24 時間培養後、その培地から複数回の高速遠心分離法により PBMCs 由来 MPs の収集を行った。MPs の検出は ELISA 法、フローサイトメトリー法、凝固活性法により行った。

その結果、全ての測定法により MPs の検出ができた。また、ELISA 法および凝固活性法では、LPS 添加群は、対照群に比べ統計学的に有意な MPs の増加を認めた。以上より、他の動物種と同様に、イヌにおいても凝固活性を有する単核球由来 MPs が存在し、これらが LPS 刺激により増加する可能性が示唆された。

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ィクル放出に関する検討

I. 緒論

第 1 章から第 3 章までは、生体から採取した末梢血単核球 (PBMCs) を用い、*in vitro* において様々な検討を行った。このように、生体より採取し間もない実験材料を用いての研究は、実生体を用いた実験の次に有効な生体内現象を理解する手段と考えられている。しかし、このような利点とは裏腹に、採材材料の制限や各動物 (検体) の個体差、そして実験動物に対するウェルネスの観点から、時に十分な利用が困難となることがある。

この場合、代替細胞を用いた実験が非常に有効な手段となる。代替細胞の多くは、腫瘍細胞から確立された株化細胞が利用される。これにより、安定的な実験細胞の確保が可能となり、より計画的かつ効率良く実験が可能となる。

代替細胞として使用される株化細胞は、その特性が生体より採取された細胞と類似の現象を示す必要がある。これまで、単球・単核球系細胞における凝固メカニズム解析に関する研究でも、ヒトもしくはマウス由来株化細胞を使用し、生体内での現象の把握として使われてきた [14, 23, 63, 66]。

イヌにおいても数種類の単球・マクロファージ系細胞由来株化細胞が存在するが、それらの多くは単球性白血病や組織球関連腫瘍から株化された細胞である [7]。その中で DH82 細胞は、現在、市場で入手可能な組織球性肉腫由来細胞として知られている数少ない株化細胞の一つである。DH82 細胞はその貪食能や炎症性サ

イトカイン放出など、イヌ単球・マクロファージ系細胞と多くの点で類似の特徴を有しているが[7, 19, 34]、DH82細胞のTF発現やMPs放出など血液凝固に関連した研究報告はない。

本章では、今後、イヌの単球・単核球系細胞と血液凝固の関連を探るために必要となる、実験材料の安定的な代替実験使用細胞として、DH82細胞が利用可能かを検討した。まずはLPS刺激時のDH82細胞の細胞増殖及び、LPS刺激に対するTF発現に関する検討し、その後、DH82細胞並びにDH82細胞由来MPsにおけるTF発現の変化を凝固活性測定法(PCA法)、フローサイトメトリー(FACS)法、ELISA法などを用いて評価した。

II. 材料と方法

1. 培養細胞

1) DH82細胞の培養および実験用細胞散布

DH82細胞は、15%牛胎仔血清(FBS:FETAL BOVINE SERUM)および1%非必須アミノ酸(MEM NEAA:Non Essential Amino Acids、gibco)、7.5%NaHCO₃、200mg/Lストレプトマイシン、10万単位/Lペニシリンを添加したEagle's Minimum Essential Medium液(EMEM:Eagle's Modified Essential Medium, MP)を培地とし、75cm²カルチャーフラスコ(TPP)にて37℃、5%CO₂でインキュベーター内にて維持した。継代の際、細胞は上清除去後、滅菌PBSで洗浄し、トリプシン液(0.02%EDTA, 0.1%トリプシン液)を加え、37℃、5%CO₂で5分間インキュベートし、回収を行った。

実験には回収した細胞数をBulker-Turk血球計算盤を用いて計数し、6穴プレートに細胞数が 1×10^5 個/well/2mLEMEM培地、そしてTissue Culture Dish 100mm(TPP)には細胞数が 7.5×10^5 個/9mLEMEM培地となるように分注し、37℃、5%CO₂、24時間培養による細胞接着処置したもの

を使用した。

2. 方法

1) LPS 刺激下における DH82 細胞の細胞増殖の変化

DH82 細胞は 6 穴プレート (TPP) にて 24 時間培養による接着後、最終濃度が 1ng/mL、10ng/mL、100ng/mL、1 μ g/mL、になるよう培養液で希釈した LPS を添加し、全量が 2mL/well になるよう調整した培養液に入れ替えた。陰性対照として LPS 無添加の対照群を用意し、細胞浮遊液に全量が 2mL/well になるよう培養液を加えたものも作成した。また、LPS 添加 (1 μ g/mL) 群に最終濃度が 100 μ g/mL となるように培養液で希釈したポリミキシン B (SIGMA) を追加添加した群と、最終濃度が 100 μ g/mL となるように培養液で希釈したポリミキシン B のみを添加した群も作成した。

検体は 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 0、12、24 時間培養し、それぞれの培養時間における細胞数を Bulker-Turk 血球計算盤を用いてカウントした。細胞増殖は、対照群の培養開始前の細胞数を 1 とし、各培養時間における細胞増殖倍率を算出した。

2) 凝固活性測定法 (PCA 法) における DH82 細胞の TF 発現に関する検討

6 穴プレートにて DH82 細胞を 24 時間培養による接着後、最終濃度が 10 倍希釈ごとに 10⁰ - 10⁶pg/mL になるよう培養液で希釈した LPS を添加し、全量が 2mL/well になるよう調整した培養液に入れ替えた。陰性対照として LPS 無添加の対照群を用意し、細胞浮遊液に全量が 2mL/well になるよう培養液を加えたものも作成した。また、LPS 添加 (1 μ g/mL) 群に最終濃度が 100 μ g/mL となるように培養液で希釈したポリミキシン B を追加添加した群と、同濃度のポリミキシン B のみを添加した群も作成した。

各検体は 37℃、5%CO₂ インキュベーター内で 12 時間培養し、DH82 細胞はトリプシン処理により細胞を遊離させた後、同量の EMEM 培地にて無力化させた。その後、PBS でよく洗浄(1,600rpm、4℃、4 分間遠心分離を 2 回)し、細胞数を Bulker-Turk 血球計算盤を用いてカウントした。PCA 法では細胞を-80℃で凍結後、ソニケーター（株式会社トミー精工）を用いて細胞破碎を行い、PCA 測定まで 4℃で維持しサンプルとした。

DH82 細胞の TF 発現量の測定は第 1 章・材料と方法 2.3)内での手技と同様とした。但し、使用血漿は、第 1 章での検討結果を基に、正常ヒト血漿とした。その後、TF を階段希釈系から作成された検量線より TF 発現量を求めた。さらに計算盤を用いてカウントした細胞数から 1×10^5 個当たりの TF 発現量を求め、TF 発現量として評価した。

3) FACS 法における DH82 細胞の TF 発現量に関する検討

Tissue Culture Dish 100mm にて 24 時間培養による接着後、最終濃度が 1µg/mL になるよう培養液で希釈した LPS を添加し、全量が 9mL/well になるよう調整した培養液に入れ替えた。また陰性対照として LPS 無添加の対照群を用意し、細胞浮遊液に全量が 9mL/culture flask になるよう培養液を加えたものも作成した。

各検体の細胞数が 6×10^5 個/tube/200µL PBS(5%FBS 加)となるように調整し、抗体反応まで 4℃で冷蔵維持した。作成した DH82 細胞サンプルを 100µL ずつにそれぞれ分注し、100µL のサンプルに対し 1µL(100 倍)のウサギ抗ヒト TF ポリクローナル抗体(Rabbit Anti-Tissue factor/CD142/F3Polyclonal Antibody, PE-Cy5.5 conjugated, Bioss) を加え十分にピペティングし、4℃、暗所で 30 分反応させた。陰性対照として無染色のサンプルも用意した。反応後、5%FBS 加 PBS で 1mL にメスアップした

後、250G、10分、4℃で遠心分離を行い、上清除去後、5%FBS加PBSで1mLにメスアップし十分に攪拌した後、FACSによる測定まで4℃、暗所で保管した。

調製したサンプルの測定は、すべて同一のフローサイトメーター(Coulter EPICS XL; Beckman Coulter)を使用した。フローサイトメーターにより得られた各項目のサイトグラムにおいて、前方散乱光、側方散乱光により、DH82細胞領域をゲーティングした。DH82細胞の測定はゲート内細胞カウント数を20,000個に設定し、TF陽性細胞率を求め評価した。

4) PCA法におけるDH82細胞由来TF含有MPsの放出に関する検討

DH82細胞の培養条件は本章・材料と方法2-2)と同様である。その後、培地上清を2mLずつ回収して、MPsを回収した。MPs回収方法は第3章・材料と方法2-2)と同様である。

PCA法は、第3章・材料と方法2-5)と同様の手技で行い、各サンプルの凝固時間を測定した。TFを階段希釈系から作成された検量線よりTF発現量を求めた。さらに計算盤を用いてカウントしたDH82細胞数から 1×10^5 個当たりのTF含有MPs放出量を求め、DH82細胞由来MPsのTF発現量として評価した。

5) FACS法におけるDH82由来TF含有MPsの放出に関する検討

DH82細胞の培養およびMPsの回収条件は、本章・材料と方法2-4)と同様である。また、フローサイトメトリーによる、DH82由来MPsの検出方法は第3章・材料と方法2-4)と同様の手技で行った。

6) ELISA 法における DH82 細胞由来 TF 含有 MP_s の放出に関する検出

DH82 細胞の培養および MP_s の回収条件は、本章・材料と方法 2-4) と同様である。また、ELISA による、DH82 由来 MP_s の検出方法は第 3 章・材料と方法 2-3) と同様の手技で行った。

3. 統計学的処理

各種検査により計測された測定値はそれぞれ平均値±標準偏差で表した。一元配置分散分析法の後、ボンフェローニ法を用いて、もしくは t 検定を用いて統計学的処置を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

III. 結果

1) DH82 細胞の増殖

DH82 細胞は培養開始から 12 時間培養後に対照群、LPS (1ng/mL) 添加群、LPS (10ng/mL) 添加群、LPS (100ng/mL) 添加群、LPS (1 μ g/mL) 添加群でそれぞれ 1.1 ± 0.1 、 1.2 ± 0.1 、 1.3 ± 0.1 、 1.5 ± 0.3 、 1.6 ± 0.2 倍に増殖し、24 時間培養後にはそれぞれ 1.8 ± 0.4 、 2.0 ± 0.5 、 2.1 ± 0.5 、 2.1 ± 0.5 、 2.2 ± 0.4 倍にまで増殖し、LPS の濃度依存性に細胞増殖率の増加が認められた。また、LPS (1 μ g/mL) 加ポリミキシン B 添加群、ポリミキシン B 単独添加群では 12 時間培養後に 1.2 ± 0.1 、 1.2 ± 0.2 倍に増殖し、24 時間後にはそれぞれ 1.9 ± 0.5 、 1.7 ± 0.4 倍に増殖した (表 1)。12 時間培養における LPS (1 μ g/mL) 添加群の増殖細胞率は、対照群のそれと比較し、有意に ($p < 0.001$) 増加した。また、ポリミキシン B 加 LPS (1 μ g/mL) 添加群は、LPS 単独添加 (1 μ g/mL) 群に比べ、有意に細胞増殖率を抑制した ($p < 0.01$)。

また LPS 単独添加群の DH82 細胞は、対照群に比べ時間経過とともに、より多形性シート状に広がる広範な細胞質を有する細胞として認められ、

細胞の形態学的変化も著しかった(写真 1)。

2) LPS 刺激下における DH82 細胞の TF 発現

PCA 法では、LPS ($10^0 - 10^6$ pg/mL) 添加群は全ての群において、対照群と比較してそれぞれ TF 発現が増加していた。しかし、LPS (10^2 pg/mL) 添加群と対照群間 ($p < 0.05$) 以外では、統計学的に有意な増加が認められなかった(図 11)。FACS 法では DH82 細胞の TF 陽性細胞の出現が認められなかった。

3) DH82 細胞由来 TF 含有 MPs の放出

PCA 法では、DH82 細胞由来 TF 含有 MPs の PCA 値は対照群、ポリミキシン B 単独添加群、ポリミキシン B 加 LPS ($1\mu\text{g/mL}$) 添加群、LPS ($10^0 - 10^6$ pg/mL) 添加群でそれぞれ 0.9 ± 0.9 、 0.5 ± 1.1 、 0.7 ± 1.7 、 0.9 ± 1 、 1.8 ± 1.5 、 2.2 ± 1.7 、 6.2 ± 3.6 、 8.7 ± 4.1 、 14.2 ± 10.3 、 34 ± 35.5 であり、LPS 濃度依存性に TFPCA 値の増加がみられた(図 12)。LPS 10^6 pg/ml 添加群は対照群と比較し、統計学的に有意な TFPCA 値の増加がみられた ($p < 0.001$)。また、LPS (10^6 pg/ml) 添加群はポリミキシン B 単独添加群、ポリミキシン B 加 LPS (10^6 pg/mL) 添加群、LPS ($10^0 - 10^1$ pg/mL) 単独添加群それぞれと比較し、統計学的に有意な TFPCA 値の増加がみられた ($p < 0.01$)。また、LPS ($1\mu\text{g/mL}$) 単独添加群は LPS ($10^2 - 10^4$ pg/mL) 添加群それぞれと比較しても、統計学的に有意な TFPCA 値の増加がみられた ($p < 0.05$)。

FACS 法では、DH82 細胞由来 MPs 数は対照群と LPS 添加群でそれぞれ 4181.3 ± 1370 、 2776.1 ± 416.6 であり、2 群間に統計学的有意差は認められなかった(図 13)。

ELISA 法では DH82 細胞 MP 放出量 (nm) は対照群、LPS 添加群において

それぞれ、 0.371 ± 0.17 、 0.41 ± 0.20 であった（図 14）。LPS 群は対照群と比較して、MPs の発現量は増加傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった。

IV. 考察

これまでの章では、生体から採取した末梢血単核球（PBMCs）を用い、*in vitro*において様々な検討を行ってきた。これらの検討は、生体内での現象を把握する上で非常に有用な手段である。しかし、安定的な実験細胞の確保は、時に様々な理由により困難となることもあり、実験を進める上で重要な課題となる。この問題を解決するための一つの方法が代替細胞の利用である。

代替細胞の多くは、腫瘍細胞から確立された株化細胞が利用される [12, 14, 72]。代替細胞として使用される株化細胞は、その特性が生体より採取された細胞と類似の現象を示す必要がある。これまで、単球・単核球系細胞における凝固メカニズム解析に関する研究でも、ヒトもしくはマウス由来株化細胞が、TF 発現や MPs 放出を促し、PBMCs の代替細胞として、生体内での現象の把握に利用されてきた [14, 23, 63, 66]。イヌにおいても数種類の単球・マクロファージ系細胞由来株化細胞が存在するが [7]、その中で DH82 細胞は、現在、市場より入手可能な組織球性肉腫由来細胞として知られている数少ない株化細胞の一つである。

DH82 細胞は、組織球性肉腫から株化された細胞であり、その貪食能や炎症性サイトカイン放出など、イヌ単球・マクロファージ系細胞と多くの点で類似の特徴を有しているものの [7, 19, 34]、DH82 細胞の TF 発現や MPs 放出など血液凝固に関連した研究報告

はない。本章では、今後、イヌの単球・単核球系細胞と血液凝固異常との関連を探るために必要な代替細胞として、DH82細胞が利用可能かを検討した。

本検討では、まず、LPS刺激時におけるDH82細胞の細胞増殖能の変化を確認した。その後、LPS刺激に対するDH82細胞のTF発現やDH82細胞由来MPs放出に関する変化を凝固活性測定法(PCA法)、フローサイトメトリー法(FACS法)、ELISA法を用いて評価した。

その結果、DH82細胞は24時間培養まではLPS濃度依存性に増殖し、さらに培養12時間後では、LPS(1 μ g/mL)添加群は対照群に比べ、統計学的に有意な細胞増殖率の増加がみられた。また、LPS添加群は対照群に比べ形態的に明らかに拡大し、シート状の広範な細胞質を有する細胞として観察され、形態学的変化も著しかった。これはLPS刺激に対しDH82細胞が活性化したためと考えられた。

次にこれらの結果を基に、LPS刺激下でのDH82細胞のTF発現量について検討した。今回、使用したLPS投与量は、過去の報告によりDH82細胞がIL-6やTNF- α などの炎症サイトカイン誘導産生を促すために十分なLPS投与量である100ng/mLよりも多い、1 μ g/mLを最高濃度とした。培養時間は、LPSによるDH82細胞増殖に関する有意差が最大となる12時間に設定した。また、対照群とLPS(10pg/mL \sim 1 μ g/mL)添加群間において、12時間培養では、上述の通り細胞増殖速度に有意差が認められたことから、PCA法では増殖細胞数の違いによるTF発現の変化を排除するために、各群間での細胞数に対する補正を行いながらTF発現量を評価した。

その結果、LPS添加群は対照群に比べTFPCA値の増加傾向が認められたものの、統計学的有意差は認められなかった(図11)。しかし、

LPS (100pg/mL) 添加群だけは対照群と比べ、統計学的に有意な TFPCA 値の増加が認められ、TF 発現量の増加が示された。これらの結果からは、DH82 細胞は、LPS 濃度がある一定以上の高濃度になると、TF 発現に抑制がかかる可能性や、TF 発現の至適 LPS 濃度が 100pg/mL とする細胞である可能性が考えられた。

FACS 法では、対照群も LPS 添加群も DTF 抗体陽性 DH82 細胞が認められなかった。今回使用した抗体は、事前に LPS 刺激を行ったイヌ単球や PBMCs を用いた実験により、その反応を確認していたため、その生物学的活性や手技上の問題は否定的と考えられた。PCA 法において DH82 細胞の TF 依存性の凝固能は確認済みであることを併せて考慮すると、DH82 細胞における TF 抗体不応性の原因としては、DH82 細胞膜表面に発現する TF はイヌの細胞膜表面に発現する TF と同じ機能を有したまま異なる構造を有する TF 様蛋白である可能性が考えられた。これらの結果より、LPS 刺激下における DH82 細胞の TF 発現を、複数の検査系により多角的評価することは困難であることが示唆された。

DH82 細胞由来 MPs は、第 3 章と同様に ELISA 法、FACS 法、そして PCA 法により、その有無を検討した。PCA 法では、DH82 細胞由来 MPs は、LPS 濃度依存性に増加したものの、FACS 法では対照群と LPS 添加群間で MPs 数に統計学的に有意な差は認められなかった。DH82 細胞由来 MPs における PCA 法と FACS 法の結果の相違は、第 3 章におけるイヌ PBMCs 由来 MPs の結果と同様に、今回測定に用いたフローサイトメーターの測定限界値が 0.5 μ m であり、FACS 法ではそれ以下のサイズの MPs が検出不能となった可能性も考えられた。但し、ELISA 法においても LPS 刺激群に有意な増加が認められないことから、MPs 放出増加が起こっていない可能性も考えられた。

以上より、本章では複数の実験手技により、DH82 細胞 TF 発現および同細胞由来 MPs の確認を行った。DH82 細胞は LPS 刺激下において、PCA 法では TF 発現の増加を確信したものの、FACS 法では TF を検出することはできなかった。また、DH82 由来 MPs は PCA 法において増加が認められたものの、FACS 法や ELISA 法では LPS 刺激群と対照群との間に統計学的有意差は認められず、MPs 放出増加を明確にすることは困難であった。これらの点から DH82 細胞はイヌ単球マクロファージ系株化細胞ではあるものの、生体内での同系細胞に関連したイヌの血液凝固異常に関連する研究の代替細胞としては、不適當であると考えられた。

V. 小括

本章では継続的なイヌ単核球由来 TF 発現および同細胞由来 MPs に関する実験を行なう上で、イヌ単球系株化細胞 (DH82) を用い、これらの細胞がイヌ PBMCs の代替細胞として利用可能かを検討した。

DH82 細胞は LPS 添加群および無添加群に分けられた。12 時間の刺激培養後、凝固活性法およびフローサイトメトリー法により TF 発現の有無を確認した。DH82 細胞由来 MPs の収集および検出は、第 3 章と同様に行った。

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、DH82 由来 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。これらの結果からは DH82 細胞は、イヌ PBMCs の代替細胞として用いるのは困難であると考えられた。

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

I. 緒論

重度の炎症性疾患に続発する DIC では、腫瘍壊死因子 (TNF) - α やインターロイキン (IL) - 1β などの炎症性サイトカインが、単球系細胞の組織因子 (TF) 発現に関与し、全身や局所における血液凝固障害の引き金となる [69]。また、これらの炎症性疾患時には、IL-6 や IL-8 等の他の炎症性サイトカインの放出も併せて起こることが知られている。

IL-6 および IL-8 は、細菌感染や LPS、または組織損傷等の刺激により、マクロファージを含む複数の細胞から産生されるサイトカインである [22, 37, 43, 71, 77]。ヒトでは敗血症や腫瘍続発性 DIC 発症患者における血液中 IL-6 および IL-8 濃度の増加は、予後不良因子となっている [9, 49, 75]。また、イヌにおいても同様に、実験的にエンドトキシン・ショックを誘導したイヌや、炎症性疾患を有する臨床例において、血液中 IL-6 および IL-8 濃度の増加が認められ [44, 45, 64]、敗血症犬における IL-6 濃度の増加は、負の転帰となった [64]。また、組換え型ヒト (rh) IL-6 および rhIL-8 は、健常人ドナーから得られた単球系細胞の TF 発現を増加させた [48, 75]。加えて、血液中 IL-6 作用の抑制は、エンドトキシン血症を誘発させた霊長類モデルの凝固活性を低下させた [74]。

これらの報告を併せて考慮すると、イヌにおいてもヒトや他動物種と同様に、血液中 IL-6 や IL-8 濃度の増加が、単球系細胞の TF 発現を介して、炎症性疾患時の凝固異常の原因となる可能性がある。本章では、この仮説を確かめるために、組換え型イヌ (rc) IL-6 および rcIL-8 を用い、同サイトカインのイヌ PBMCs の TF 発現誘導に関する検討を行った。

II. 材料と方法

1. 供試動物

供試犬は、臨床的に健康な犬 40 頭を用いた。そのうち純血種犬は 11 頭、雑種犬は 29 頭であった。性差は認められず、平均年齢 4.8 ± 2.6 歳であった。これらの供試動物は、一般的な CBC 検査において、全ての検査値が基準範囲内であった。

2. 方法

1) PBMCs 分離

各供試犬の頸静脈より EDTA 真空採血管を用いて 10~20mL 採血を行った。各血液は 1,200g、10 分間、室温で遠心分離した。buffy coat 領域を採取し、PBS により 1:3 に希釈した後、2mL の Histopaque-1077 (SIGMA) に静かに重層し、400G、20°C、30 分遠心分離した。Histopaque-1077 と血漿層の間に形成された PBMCs 層を回収し、滅菌 PBS を加えて、250G、20°C、10 分間遠心分離し、滅菌ピペットで上清を除去した。同様の操作を 2 回繰り返した。得られた PBMCs は、インピーダンス細胞計算機 (Coulter Z2, Beckman-Coulter) を用いて数を求め、ライトギムザ染色を施したサイトスピン標本を用いて、白血球の分類を行った。

得られた PBMCs は、ペニシリン・ストレプトマイシン、L-グルタミン、ピルビン酸加 RPMI-1640 培養液 (培養液) に入れ接着性 PBMCs 用検体として使用、もしくは PBS に入れ単球単独分離に用いた。

接着性 PBMCs 用検体は 2×10^6 細胞/ウェルの濃度で 96 穴組織培養プレートに散布した。37°C、5% CO₂ にて 1 時間インキュベートし、細胞を接着させた後、ウェル中の非接着細胞を除去するために、PBS で穏やかに 2 回洗浄した。細胞は増殖培地中で一晩培養し、翌日にサイトカインの添加

を行った。

2) 単球の分離 (免疫磁気細胞分離法)

得られた PBMCs に一次抗体としてモノクローナルマウス抗ヒト CD14 抗体 (Dako) を $20\ \mu\text{L}$ と MacsBuffer (autoMACS Rinsing Solution:MACS BSA Solution) を $500\ \mu\text{L}$ 加え、混和後 4°C 、15 分間暗所で反応させた。その後、MacsBuffer を 5mL 加え、 100G 、 4°C 、5 分間遠心分離し、デカントによる上清除去後、二次抗体として抗マウス IgG_{a+b} MicroBeads を $20\ \mu\text{L}$ 加え、混和後 4°C 、15 分間暗所で反応させた。MacsBuffer を 3mL 加え、 100G 、 4°C 、5 分間遠心分離し、滅菌ピペットで上清を除去し、MacsBuffer で 3mL にメスアップ後ピペッティングを行い、サンプルを作成した。このサンプルを MACS 法に従ってカラムに流し、 100G 、 4°C 、5 分間遠心分離後、単球のみを分離した。得られたペレットにペニシリン・ストレプトマイシン、L-グルタミン、ピルビン酸加 RPMI-1640 培養液 (培養液) を 1mL 加えペレットを十分混和し、上述した細胞計算機を用いて細胞数をカウントした。また、ライトギムザ染色を施したサイトスピン標本を作製し、白血球の分類を行った。

検体は 3×10^5 細胞/ウェルの濃度で 96 穴組織培養プレートに散布した。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ にて 1 時間インキュベートし、細胞を接着させた後、ウェル中の非接着細胞を除去するために、PBS で穏やかに 2 回洗浄した。細胞は増殖培地中で一晩培養し、翌日にサイトカインの添加を行った。

3) 接着性イヌ PBMCs もしくはイヌ単球に対する rcIL-6 もしくは rcIL-8 刺激

使用した rcIL-6 (R&D Systems) または rcIL-8 (R&D Systems) は、他

実験系により、予めその生物学的活性を確認していた。

細胞分離翌日、接着させたイヌ PBMCs もしくは単独分離した単球は、rcIL-6 または rcIL-8 の各群の最終濃度が 0、10、100、1000、5000 pg/mL となるよう調整・添加した。陰性対照群として無添加群を、陽性対照群として LPS (10ng/mL) 添加群を用意した。その後、PBMCs をインキュベーター内にて 4 時間刺激培養した。

4) 異種血清または自己血漿の添加による rcIL-6 および IL-8 刺激下イヌ接着性 PBMCs の細胞膜 TFPCA 発現の変化

熱処理により非働化させたウシ胎児血清(HI-FBS)、自己イヌ血漿(ACP)、もしくは非働化自己イヌ血漿 (HI-ACP) を最終濃度が 10%となるよう調整した培養液を準備し、同様に rcIL-6 および IL-8 刺激下イヌ接着性 PBMCs の細胞膜 TFPCA 発現の変化を検討した。この時の rcIL-6 および rcIL-8 濃度は、それぞれ 0 もしくは 100pg/mL とした。その後、PBMCs をインキュベーター内にて 4 時間刺激培養した。

5) rcIL-6 および rcIL-8 と低用量 LPS 共刺激下における、イヌ PBMCs の細胞膜 TFPCA 発現の変化

低濃度 LPS により誘導される接着性のイヌの PBMCs 表面の TF 発現が、rcIL-6 または rcIL-8 (各 100pg/mL) の添加により、増強するかを評価した。通常培地を用い、LPS (0、0.1、1ng/mL) と各サイトカインの共刺激群も併せて用意した。この時の rcIL-6 および rcIL-8 濃度は、それぞれ 0 もしくは 100pg/mL とした。その後、PBMCs をインキュベーター内にて 4 時間刺激培養した。

6) 細胞表面組織因子関連凝固活性 (TFPCA) の測定

付着した PBMCs の細胞表面 TFPCA は、活性化第 X 因子 (FXa) の生成に基づいて 2 段階凝固促進活性法により解析した。刺激後、96 穴プレート中の付着 PBMCs を PBS で 1 回洗浄した。各ウェルに HEPES バッファー (10 mM HEPES、137 mM 塩化ナトリウム、5 mM 塩化カルシウム、4 mM 塩化カリウム、10 mM グルコース、0.5% 牛血清アルブミン、pH7.4) により最終濃度が 1nM とした組み換え型ヒト活性化第 VII 因子 (FVIIa) (Hematologic Technologies) と最終濃度が 75nM となるよう調整された組み換え型ヒト第 X 因子 (Hematologic Technologies) を添加後、37° C、15 分間反応させた。その後、最終濃度が 250 μ M となるよう調整された活性化第 X 因子 (FXa) 依存性発色色素 (Spectrozyme-FXa, American Diagnostica) を添加し 37° C で 10 分間反応させた。第 X 因子が活性化することにより起こる発色を、分光光度計 (測定波長 405nm: KC4, Bio-tek Instruments) を用いて測定し、TF 発現量とした。

計測終了後、接着性 PBMCs を、0.25% トリプシン、0.02% EDTA (Sigma-Aldrich) を用いて剥離し、サイトスピン標本を作製した後、ライトギムザ染色を施し各白血球の分類を行った。

3. 統計分析

得られた全てのデータは平均値 \pm 標準偏差で表した。各群間における統計学的検討は Student' s paired t-test を用いて統計学的処置を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。また各群内における比較についての統計学的検討は一元分散分析法の後 Tukey-Kramer 法を用いて統計学的処置を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した

Ⅲ. 結果

1) イヌ PBMCs、接着性 PBMCs、単独分離単球の白血球分類

各動物より採取した血液から回収された PBMCs は $1.4 \pm 0.6 \times 10^6$ 細胞/mL であった。このうち単球は 19% を占めた (表 2)。一晚培養後の接着性 PBMCs の細胞表面 TFPCA 値測定後、細胞を剥離し各白血球を分類したところ、接着性 PBMCs 中の単球の割合は、浮遊性 PBMCs のそれに比べ有意に増加した ($p < 0.05$)。

また、単独分離した単球の割合は 98% を越え、浮遊性 PBMCs や接着性 PBMCs に比べ有意に増加した ($p < 0.01$)。

2) 組み換え型イヌ IL-6 および IL-8 によるイヌ接着性 PBMCs の細胞膜 TF 発現の変化

接着性 PBMCs は、rcIL-6 または rcIL-8 を各濃度群 (0、10、100、1000、5000 pg/mL) にて添加培養した。そのうち 43% の検体で TF 発現の増加が認められたものの、同一個体からの検体において、各濃度間において一貫性がなく、いずれの濃度においても、イヌ PBMCs の TF 発現に統計学的有意差は認められなかった (表 3)。

しかし、陽性対照として使用した LPS (100 ng/mL) 単独添加群の TF 発現 (OD, 0.425 ± 0.185) は、全ての検体において無添加群のそれ (OD, 0.125 ± 0.046) と比較し、著しく増加し、統計学的有意差が認められた ($P < 0.001$)。イヌ PBMCs の TF 発現の増加率は $240 \pm 142\%$ だった。

3) 組み換え型イヌ IL-6 および IL-8 による単独分離したイヌ単球の細胞膜 TF 発現の変化

単独分離した単球における各種サイトカイン刺激後の TF 発現には、イ

又 PBMCs の結果と同様に大きな変化は認められず、個々の検体において軽度の増加傾向の変動が認められたものの、無添加群の測定値と比べ、統計学的有意差は認められなかった（表 4）。また、この時の陽性対照として使用した LPS（100ng/mL）添加群の TF 発現（OD、 0.253 ± 0.076 ）は、無添加（陰性対照）群の測定値に比べ（OD= 0.169 ± 0.038 、 $P=0.003$ ）、統計学的に有意に増加していた。その増加率は $48 \pm 20\%$ だった。

4) 異種血清または自己血漿の添加による rcIL-6 および IL-8 刺激下イヌ接着性 PBMCs の細胞膜 TFPCA 発現の変化

非働化ウシ胎児血清（HI-FBS）または自己血漿（ACP、HI-ACP）の添加により、rcIL-6 または rcIL-8 刺激に関する PBMCs 細胞標本 TF 発現には、統計学的差異は認められなかった（表 5）。但し、ACP 加培地におけるサイトカイン無添加群は、自己血漿や HI-FBS を含まない培地のサイトカイン無添加群に比べ、統計学的に有意な TF 発現の増加が認められた（OD、 0.133 ± 0.029 vs 0.111 ± 0.030 、 $P < 0.05$ ）。しかし、HI-ACP 加培地におけるサイトカイン無添加群の TF 発現（OD、 0.117 ± 0.036 ）は、自己血漿や HI-FBS を含まない培地の無添加群の TF 発現（OD、 0.122 ± 0.038 ）に比べ、有意な増加は認められなかった（ $P=0.31$ ）。

5) rcIL-6 および rcIL-8 と低用量 LPS 共刺激下におけるイヌ PBMCs の細胞膜 TFPCA 発現の変化

いずれの検体も LPS による TF 発現の増加が認められたものの、これ

らは rcIL-6 や rcIL-8 添加により増強されなかった (表 6)。

IV. 考察

今回の検討からは、いずれのサイトカイン (rcIL-6 と rcIL-8) も、イヌ単核球系細胞の TF 発現増加作用は認めなかった。しかし今回の結果とは対照的に、過去のヒトにおける報告では、組み換え型ヒト (rh) IL-6 や rhIL-8 がヒト PBMCs やヒト単球の TF 発現を増加させた [48]。この時、使用した各サイトカインの濃度は、今回の検討と同等の報告も存在する。また別の報告では、より高濃度の rhIL-6 (17ng/mL) が TF 発現を誘導したとの報告もある。これらの過去の報告と今回の結果との相違に関しては不明であるが、動物種による各種サイトカインに対する反応特異性や、サイトカイン刺激時間、刺激濃度、組織因子凝固活性測定系の相違などが考えられる。また使用したイヌ PBMCs が接着性もしくは浮遊性 PBMCs のいずれを使用したのかも影響したかもしれない。

少なくとも今回使用した 2 つの炎症性サイトカインは、事前にその生物学的活性を確認済みであり、使用した試薬自身の影響は考え難い。また、本章の検討で使用した各サイトカインの濃度は、イヌの全身性炎症反応症候群 (SIRS) 患者の平均的なサイトカイン濃度に一致している [35, 64]。少数の臨床例では、より高濃度のサイトカイン血漿を示す SIRS 患者も存在し、これらの症例はより DIC を引き起こし易いとも考えられている。もちろん、今回の用いたサイトカインの濃度以上でイヌ単核球系細胞を刺激することにより、これらの細胞が有意な TF 発現を示す可能性も完全には否定できない。

本章の検討で用いたイヌ PBMCs は、96 穴ウェルに対し接着傾向を示す細胞を用いた。一般的に、単核球細胞において接着性を示すのは単球であ

り、今回の検討からも接着後のイヌ PBMCs は、単球の割合が有意に増加した。但し、これらの細胞群でも、主体を占める細胞は未だリンパ球であり、これらのリンパ球が使用した炎症性サイトカインに対し、減弱もしくは拮抗作用を示した可能性も否定できない。そこで、リンパ球の作用を最小限にするために、免疫磁気細胞分離法により、各検討で使用する単球系細胞の割合を 95%以上とし、再度、同様の検討を行った。しかし、こちらの検討でも rcIL-6 や rcIL-8 刺激における単球の TF 発現は増加しなかった。

イヌやウマの PBMCs では、自己や他動物の血漿・血清を混入させた培養液を使用して LPS 刺激を行った場合、これらの添加がない培養液を使用した群に比べ、TF 発現が有意に増加することが知られている [50]。今回、複数の培地を用意し、rcIL-6 や rcIL-8 刺激時にも、これらと同様の現象が起こるか検討した。しかし、各血漿・血清混入培養液を用いて、サイトカイン刺激をしたものの、イヌ PBMCs の TF 発現に統計学的な差異は認められなかった。考えられる理由の一つとしては、IL-6 が細胞内へ作用する場合には可溶性 IL-6 受容体が必要となるが、これらの受容体が添加された血漿や血清に十分に存在しなかった点などである。

本論文第 2 章では、HMGB-1 と LPS の混合刺激により、個々の物質の単独刺激に比べ、イヌ PBMCs の相乗的な TF 発現増加が認められた。本章では、これと同様の現象が rcIL-6 や rcIL-8 の炎症性サイトカインと LPS 間においても発生するか検討した。しかし、HMGB-1 を用いた第 2 章での反応とは異なり、いずれのサイトカインでも、LPS との共刺激下においてイヌ PBMCs の TF 発現は増強されなかった。この現象に関する明確な原因は不明である。

以上の結果より、rcIL-6 や rcIL-8 はイヌ PBMCs や単独分離したイヌ

単球の TF 発現を増加させないことが示された。これはイヌにおける炎症に関連した血液中 IL-6 や IL-8 濃度の増加が、血管内凝固亢進や DIC 等の血液凝固異常を発生させる可能性が低いことを示唆する。但し、重度の慢性炎症発症時に起こるような、より高濃度で、より長時間、これらの炎症性サイトカインへ暴露されることにより、イヌ PBMCs や単球の TF 発現が増加し、血管内凝固異常を引き起こす可能性は未だ残されたままである。

V. 小括

全身性炎症や重度の炎症性疾患は、イヌにおける播種性血管内凝固症候群 (DIC) の主要な原因であるが、その基礎的なメカニズムは不明な点が多い。本章では、炎症サイトカインである、インターロイキン (IL) - 6 や IL-8 を用い、これらのサイトカインがイヌ単球系細胞の組織因子 (TF) 発現を誘導し、DIC などの血管内凝固異常に寄与し得るか検討した。

検討では、まずイヌ末梢血単核細胞 (PBMCs) もしくは単独分離した単球に対し、組換え型イヌ (rc) IL-6 や rcIL-8 の単独添加 (10~5000pg/mL) による TF 発現の検討を行った。各検体は一律に 4 時間刺激培養後、これらの細胞表面の TF 凝固活性を求めた。その結果、IL-6 および IL-8 は、イヌ PBMCs もしくは単球上の TF 活性を誘導しなかった。

次に、イヌ PBMCs に対し、10% 熱不活化 (HI) ウシ胎児血清 (FBS)、未処理の自家イヌ血漿 (ACP)、または HI-ACP、もしくはこれらを含まない培養液を用いて、rcIL-6 または rcIL-8 の添加実験を行った。また、低用量 LPS 存在下における rcIL-6 または rcIL-8 の添加実験も行った。その結果、HI-FBS、ACP、HI-ACP、または低濃度 LPS は、これらのサイトカ

インに対する TF 発現を増強しなかった。

これらの結果より、今回検討した rcIL-6 または rcIL-8 の濃度では、イヌ PBMCs もしくは単球上 TF 発現の誘導は起こらず、炎症性疾患に関連する凝固活性には大きな影響を及ぼさないと考えられた。

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

I. 緒論

種々の感染性物質や炎症性サイトカインは、単核球系細胞の組織因子 (TF) を発現させ、DIC や血管内血栓形成の引き金となる可能性がある。逆視点から観ると、これらの細胞における TF 発現を制御することは、血管内凝固異常を減弱させる可能性もある。事実、マウスにおける実験では、生体内での抗 TF 抗体となる組織因子経路抑制因子 (TFPI) を用いることで、TF 発現誘導性 DIC 症例の死亡率を減少させた [59]。但し、ヒトにおける組み換え型 TFPI を用いた実験では、敗血症患者に対する臨床試験において有効な結果を示せていない [2]。また現在、市場より入手可能なイヌ組み換え型 TFPI は存在せず、イヌの DIC に対する治療効果は不明のままである。そのため、新たな TF 抑制剤を探す必要がある。

IL-10 は強力な抗炎症作用を有するサイトカインであり、単球、マクロファージ、および T-リンパ球を含む様々な細胞より生産される。IL-10 は単球の接着分子の発現を減少させると同時に、炎症性メディエーターの抑制や抗炎症性メディエーター放出を刺激する重要な負の調節因子である [65]。また、IL-10 はこれらの抗炎症作用に加えてヒト単球において LPS 誘導性 TF 発現を抑制したとする報告もある [31, 52, 60, 62]。このことから、IL-10 は TFPI に変わる抗 TF 作用薬としての可能性を有していると考えられる。

本章では、抗炎症性サイトカインである IL-10 が、イヌ PBMCs の LPS 誘導性 TF 発現に続発する凝固異常に対する予防・治療薬として利用可能か否かを評価した。本検討では、組み換え型イヌ (rc) IL-10 を用い、LPS

刺激を受けたイヌ PBMCs もしくは単独分離した単球の TF 発現抑制効果を評価した。

II. 材料と方法

1. 供試動物

供試犬は、臨床上健康な様々な犬種 31 頭を用いた。性差は認められず、年齢は 6.5 ± 4.1 歳であった。これらの供試犬は、CBC 検査において、全ての検査値が基準範囲内であった。

2. 方法

1) PBMCs の分離

イヌ PBMCs の分離は第 5 章・材料と方法 2-1) での手技と同様である。

2) 単球分離（免疫磁気細胞分離法）

免疫磁気細胞分離法単球は、第 5 章・材料と方法 2-2) での手技と同様である。

3) 組み換え型イヌ IL-10 および LPS の添加

イヌ PBMCs が細胞数 5×10^5 個に値する量を、それぞれ細胞浮遊液からマイクロチューブに分注し、低用量 LPS (1ng/mL) と共に rcIL-10 (R&D Systems) の最終濃度が 0、1、10、100、1000、5000 pg/mL になるように調整し、添加した。また、rcIL-10 を一定濃度 (100 および 1000 pg/mL) とし、LPS の最終濃度が 0.1、1、10、100、1000 ng/mL となるよう調整し、添加した。全ての検体は、全量が 1mL になるように培養液を加え良く混和した。これらの検体は 37°C、5%CO₂ 下で、4 時間の刺激培養を行った。

4) 異なる時間に rcIL-10 添加を行なった場合の、LPS 刺激下 PBMCs の TF 発現の抑制効果

次に、LPS 刺激後の様々な時間における rcIL-10 が、未だイヌ PBMCs の LPS 誘導性 TF 発現を十分に抑制できるかを検討した。LPS (100ng/mL) 添加後、0、15、30、60、120 分後に rcIL-10 (100 pg/mL) の添加を行なった。これら検体は 37°C、5%CO₂ 下で、LPS 添加より 4 時間の刺激培養を行った。

5) 単独分離した単球の IL-10 に対する作用

今回の検討で採取された PBMCs 中、単球は 21±17% を占めた。その他の血球はリンパ球等により構成されるが、これらの細胞が、IL-10 とは無関係に、単球に対し直接的に TF 発現の抑制作用を示す可能性がある。そのため、イヌ PBMCs より単球を単独分離し、単球単独での IL-10 の作用を検討した。

単独分離した単球が 3×10^5 個に値する量を、それぞれ細胞浮遊液からマイクロチューブに分注し、rcIL-10 の最終濃度が 0、100 pg/mL になるように調整し、添加した。また同時に、最終濃度 0、100ng/mL の LPS も併せて添加し、全量が 1mL になるように培養液を加え良く混和した。これら準備した検体を 37°C、5%CO₂ 下で、4 時間の刺激培養を行った

6) 抗 rcIL-10 抗体使用による rcIL-10 作用の確認

イヌ組み換え型 IL-10 のイヌ PBMCs に対する LPS 誘導性 TF 発現への抑制効果が rcIL-10 単独作用に起因していることを確認するために、マウス抗イヌ IL-10 抗体 (R&D Systems) と、その対照として非特異 IgG 抗

体を段階希釈し添加（0、0.001、0.01、0.1、1、10 μ g/mL）した実験系も作成した。LPS（100ng/mL）および rcIL-10（100pg/mL）添加の1時間前に、濃度段階調節を行ったマウス抗イヌ IL-10 抗体と非特異的 IgG アイソタイプ抗体コントロールの添加をした。これら準備した検体を 37°C、5%CO₂ 下で、4時間の刺激培養を行った。

7) 細胞表面組織因子関連凝固活性（TFPCA）の測定

4時間の刺激培養後、PBSにて細胞を洗浄後、PBMCs由来もしくは単球由来 TF 発現確認のため、細胞表面組織因子関連凝固活性法（TFPCA）を用いて分析を行った。TFPCAは第5章・材料と方法 2-6) での手技と同様である。

3. 統計学的処理

すべてのデータは平均値±標準偏差で示した。各群間における統計学的検討は Student's paired t-test を用いて統計学的処置を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。また各群内における比較についての統計学的検討はボンフェローニ法を用いて統計学的処置を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

また、第1章で示したように、各検体の LPS に対する感受性は大きく異なる。これは IL-10 への感受性、すなわち TFPCA の抑制効果にも関連する可能性がある。そこで、rcIL-10 によるイヌ PBMCs の TFPCA 抑制効果が、初期の LPS 反応に相関するかを評価した。相関性は、スピアマンランク相関係数 (R_{sp}) のスピアマンランク相互関係と決意によって評価された。 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

Ⅲ. 結果

1) rcIL-10 による LPS 刺激下 PBMCs の組織因子発現の抑制効果

イヌ PBMCs に、低用量 LPS (1ng/mL) と共に異なる濃度の rcIL-10 を用いた検討では、LPS 単独添加 (rcIL-10 無添加) 群の TF 発現は、LPS 無添加群のそれに比べ、統計学的に有意な増加が認められた (図 15)。この時の TF 発現の増加率は $367 \pm 106\%$ であった

rcIL-10 は、用量依存性に LPS-誘導性 TF 発現を抑制した。抑制効果は、rcIL-10 が 10 pg/mL から始まり ($37 \pm 25\%$ 減少)、100 pg/ml で $52 \pm 19\%$ の減少、そしてより高い rcIL-10 濃度では、rcIL-10 無添加・LPS-無添加群の TF 発現よりも低くなった (1000 pg/mL: $68 \pm 8\%$ 減少、5000 pg/mL: $72 \pm 10\%$ 減少)。LPS 添加群は rcIL-10 濃度が 1000 および 5000 pg/mL の時に、LPS 無添加・同濃度の rcIL-10 添加群の TF 発現と比べても有意な増加を示さなかった (図 15)。

次に rcIL-10 を一定濃度 (100 および 1000 pg/mL) とし、異なる LPS 濃度に対する、イヌ PBMCs の TF 発現の変化を確認したところ、rcIL-10 無添加群では、LPS 濃度依存性に TF 発現の増加が認められた (図 16)。LPS 無添加群では、rcIL-10 添加および無添加群間において有意な相違は認められなかった。しかし、いずれの LPS 添加群でも、各 rcIL-10 濃度 (100 と 1000 pg/mL) 添加において、TF 発現の抑制効果を認めた。各 rcIL-10 添加群の TFPCA 値は、rcIL-10 無添加の各 LPS-刺激群の TFPCA に比べ、54-67% および 60-73% の減少を認めた。(図 16)。但し、これらはボンフェローニ法により有意差は認められなかった。

また、イヌ PBMCs の LPS 刺激による TF 発現の感受性と、IL-10 による抑制作用 (減少率 (%)) には中程度の相関が認められた ($R_{sp}=0.78$ 、 $p<0.001$)。

2) 異なる時間に rcIL-10 添加を行なった場合の、LPS 刺激下イヌ PBMCs の TF 発現の抑制効果

LPS 刺激 15、30、60 分後に rcIL-10 が添加された場合でも、培養 4 時間後の LPS 誘導性 TF 発現は、rcIL-10 無添加群に比べ、統計学的に有意な減少が認められた。しかし、LPS 刺激開始から 2 時間後に IL-10 を添加した群では、有意な TF 発現の減少は認められなかった (図 17)。

3) 単独分離した単球の IL-10 に対する作用

rcIL-10 (100pg/mL) 添加群では、LPS (100ng/mL) 誘導性 TF 発現が有意に減少し、抑制効果が認められた。IL-10 による LPS 誘導性 TF 発現の減少率は $40 \pm 31\%$ であった (図 18)。

4) 抗 rcIL-10 抗体使用による rcIL-10 作用の確認

抗イヌ IL-10 抗体を添加した群では、同抗体の濃度依存的に LPS-誘導性 TF 発現に対する rcIL-10 効果が減弱した。そして、1 および $10 \mu\text{g/mL}$ の時には、イヌの PBMCs の LPS-誘導性 TF 発現の rcIL-10 抑制効果を完全に阻止した ($92 \pm 56\%$ の抑制) (図 19)。

IV. 考察

本章では LPS 誘導性イヌ PBMCs の TF 発現に関連した凝固活性が、抗炎症性サイトカインである IL-10 により制御可能か否かを検討した。

その結果、IL-10 は LPS による刺激開始より 1 時間後までは、統計学的に有意にイヌ PBMCs や単独分離下单球の TF 発現を減少させた。これらは過去の複数のヒト単球系細胞を用いた検討と同様の結果であった

[31, 39, 52, 60, 62]。

IL-10 による単球表面の TF 発現の抑制作用には、複数のメカニズムが考えられる。これらには、TF-mRNA 転写の減少や調節性マイクロ RNA の生産亢進、生成された蛋白の細胞質内での停滞・貯留、本来発現するはずのリン脂質豊富な膜ドメインから脂質ラフトへの移動、または組織因子経路インヒビター (TFPI) 発現による TF 作用の中性化などが考えられる [16, 46, 52, 62]。ヒト単球における実験では、IL-10 は LPS 誘導性 TF 発現を減少させた [31]。またげっ歯類のマクロファージの実験では、IL-10 は TF 発現の遺伝子転写を引き起こす転写調節因子を抑制した [32]。これらは細胞膜における TF 発現の減少に起因するが、これらと共に、細胞表面における TFPI 発現の増強も併せて考慮に入れる必要がある。ヒト単球を用いた研究では、IL-10 は 48-96 時間の長期間培養における単球由来 TFPCA を抑制したが、この抑制は、TF-mRNA 合成の低下と共に、TFPI-mRNA 発現増加が関連していた [60]。また、別の報告では、LPS 刺激された単球には TFPI 発現がみとめられた。しかし、細胞表面での凝固能に関しては TF 抗原表現がより多いため、TFPCA としては凝固活性のより強い傾向へと傾いていた可能性が考えられる [39]。

今回のイヌ PBMCs や単離した単球は、ヒト単球の長期間培養の研究 [60]と比較すると、rcIL-10 添加 LPS 無添加群においても、各細胞の TF 発現効果は全く認められなかった。これは今回の検討での rcIL-10 添加時間が比較的短いためとも考えられ、これは過去にもヒト単球において報告された結果と一致した [61]。

本章で行われた検討の多くは、LPS と同時に rcIL-10 添加を行なった。しかし、実際の臨床例では、敗血症発生と同時に血液中 IL-10 が増加することは予測し難く。エンドトキシン血症の後に、血液中 IL-10 が増加

する可能性が高い。そこで、イヌ PBMCs が既に一定時間 LPS により暴露された後でも、rcIL-10 が十分な TF 発現抑制効果を示すか検討した。その結果、rcIL-10 は、LPS 刺激開始より 1 時間以内では、イヌ PBMCs の TF 発現を抑制したが、その後は十分な抑制効果を示さなかった。このことから、LPS 誘導性に一定量以上の TF mRNA が産生された場合、IL-10 はそこから合成される、もしくは蛋白として既に合成された TF 発現を抑制することができないことを示唆する。IL-10 の時間依存性の抑制作用は、ヒトにおいても報告がある [15, 39]。また、ヒトの *in vivo* におけるエンドトキシン血症に関する報告では、LPS 投与の 1 時間後に IL-10 による血液凝固活性化の抑制が起こった [57]。

IL-10 の単球の TF 発現抑制作用は、LPS 誘導性 TF 発現に限ったことではなく、ヒト単球では、IL-10 は IL-1 と C 反応性タンパク質を含む他の炎症性蛋白質により引き起こされる TF 発現も抑制した [15, 52]。また、IL-10 はこれらの抗凝固作用を比較的強く示すものの、IL-4 や IL-13、TGF- β などの他の抗炎症性サイトカインも類似の抑制作用を示すことが知られている [15, 31, 52]。

PBMCs を使用しての実験は、単球を単独分離した場合に比べ、相対的に単球の割合が低くなる。そのため、PBMCs 内に含まれる単球以外の細胞からの IL-4 などの抑制性サイトカインの放出を通じて、TF 発現抑制作用が間接的に起こっている可能性も考えられた。この問題に対処するために、抗-CD14 抗体を用いた免疫磁気細胞分離法より単球を単独分離し、rcIL-10 と LPS の関係に関する類似の検討も行った。こちらの検討でも、イヌ PBMCs の検討結果と同様に IL-10 依存性に TF 発現の減少が認められた。また、単球分離に使用した抗体（抗 CD14 抗体）は単球表面の LPS 受容器に対する抗体であるが、今回の分離作業後もイヌ単球は LPS 添加に

対し、十分な TFPCA 発現を示していた。このことから、抗 CD-14 抗体を用いた単球の陽性分離作業を行っても、この方法が凝固促進性の反応を阻害しないことが示された。

結論として、本章ではヒト単球と同様にイヌの単球系細胞でも、LPS 誘導性 TFPCA 発現に対する IL-10 の抑制作用が示された。これらの結果は、ヒトやげっ歯類のエンドトキシン血症実験の結果と同様に、イヌにおいても rcIL-10 が、敗血症に関連して起こる DIC や血管内血栓形成等の凝固異常を予防もしくは改善させることを示唆する。マウスのエンドトキシン血症の実験モデルでは、IL-10 投与により死亡率を低下させた報告もあることから、イヌにおいても IL-10 の使用が抗炎症作用や抗凝固作用により、炎症性疾患や凝固異常に関連した死亡率を減少させる可能性がある。また、第 2 章で示したように、ザイモサン等の他の感染性物質も、TF を誘導することが可能であるため、IL-10 の抗凝固効果は必ずしもグラム陰性細菌感染症に限定されないかもしれない。但し、イヌにおける治療薬としての IL-10 の薬物動態、安全性と有効性は未知であり、今後、生体を使った試験も含め更に検討する必要がある。

V. 小括

敗血症やエンドトキシン血症に続発する DIC は致命的な経過を辿る非常に重要な疾患である。人医療における DIC に関する治療には、現在、組み換え型蛋白等を利用した様々な治療が試みられている。IL-10 は抗炎症性サイトカインとしてだけでなく、抗凝固作用を示すサイトカインとしても知られており、人医療において治療薬としての可能性を有している。

本章では、組み換え型イヌ (rc) IL-10 を用い、イヌ単球系細胞の LPS 誘導性組織因子 (TF) 発現の抑制が起こるかを検討した。イヌ末梢血単核細胞 (PBMCs) もしくは単独分離した単球を LPS と IL-10 (10-5000pg/mL) の共刺激培養を行い、単球由来 TF 発現の抑制効果を検討した。また、LPS 添加後に異なる時間で IL-10 の追加添加し、同様に TF 発現の抑制作用を確認した。

その結果、rcIL-10 は用量依存的にイヌ単球上の LPS 誘導性 TF 発現を抑制した。また、LPS と IL-10 の同時投与もしくは LPS 添加後の 1 時間以内の IL-10 追加添加は、イヌ PBMCs の LPS 誘導性 TF 発現を統計学的に有意に抑制した。また、この作用は抗イヌ IL-10 抗体によって用量依存性にブロックされた。

これらの結果より、rcIL-10 はイヌ単球における LPS 誘導性 TF 発現を抑制し、潜在的にエンドトキシン血症を有するイヌの DIC 進行の抑制に有効であることが示唆された。

総括

本研究では、炎症性疾患や感染症に続発するイヌの血管内血栓形成や DIC の発症が、イヌ末梢血単核球（PBMCs）の組織因子（TF）発現やマイクロパーティクル（MPs）放出に関連があるかを検証した。

その結果、イヌ PBMCs は LPS 刺激により有意に TF 発現の増加を認め、その発現ピークは LPS 刺激後 24 および 36 時間であった。イヌ PBMCs は遅延型炎症性サイトカインである HMGB-1 の濃度依存的に TF 発現の増加し、また LPS との共存下では、より強い TF 発現を示した。イヌ PBMCs は凝固活性を示す MPs を放出し、それは LPS 刺激により増加した。イヌ単球系株化細胞である DH82 細胞は、本研究におけるイヌ PBMCs の代替細胞として用いるのは困難であると考えられた。IL-6 や IL-8 はイヌの炎症性疾患において、血管内凝固異常の原因とはなり難いと考えられた。IL-10 は LPS により誘導される PBMCs の TF 発現を抑制した。但し、これらの有意な効果は LPS 刺激開始より 1 時間以内に限定されることが分かった。

以上より、イヌ PBMCs は炎症性サイトカインや感染性物質により TF 発現が増強し、また凝固活性を示す MPs を放出することを明らかにした。また、LPS と HMGB-1 共刺激時に認められたように、感染と高サイトカイン血症もしくは組織壊死が存在する場合、イヌ PBMCs の TF 発現が相乗的に増加するため、血管内血栓症や DIC 発症のリスクはより高まることが示唆された。DH82 細胞は本実験の代替細胞としては不十分であると考えられた。他の単球系細胞の使用を検討する必要があるかもしれない。抗炎症性サイトカインである、IL-10 は PBMCs の TF 発現を抑制することから、今後、血栓症や DIC 発症予防の治療薬になる可能性も考えられた。

謝辞

稿を終わるに臨み、博士号取得への機会を与えてくださり、さらに本論文の御懇切なる御校閲と御指導を賜りました北里大学小動物外科学教室岡野昇三教授に謹んで感謝の意を表します。

また、適切な助言と御協力を頂いた、米国コーネル大学獣医学部 Tracy Stoko 准教授、北里大学獣医生理化学教室渡辺清隆教授、北里大学獣医小動物外科学教室前田賢一助教に深謝いたします。

参考文献

1. Aass, H. C., Ovstebo, R., Troseid, A. M., Kierulf, P., Berg, J. P. and Henriksson, C. E. 2011. Fluorescent particles in the antibody solution result in false TF- and CD14-positive microparticles in flow cytometric analysis. *Cytometry A*. 79:990-999.
2. Abraham, E., Reinhart, K., Opal, S., Demeyer, I., Doig, C., Rodriguez, A. L., Beale, R., Svoboda, P., Laterre, P. F., Simon, S., Light, B., Spapen, H., Stone, J., Seibert, A., Peckelsen, C., De Deyne, C., Postier, R., Pettila, V., Artigas, A., Percell, S. R., Shu, V., Zwingelstein, C., Tobias, J., Poole, L., Stolzenbach, J. C. and Creasey, A. A. 2003. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* 290:238-247.
3. Amlie, E., Lyberg, T., Kaplun, A., Hetland, O. and Prydz, H. 1981. Thromboplastin activity of mouse peritoneal macrophages. *Thromb. Res.* 24:61-71.
4. Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A. C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H. and Tracey, K. J. 2000. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J. Exp. Med.* 192:565-570.
5. Asakura, H., Suga, Y., Yoshida, T., Ontachi, Y., Mizutani, T., Kato, M., Ito, T., Morishita, E., Yamazaki, M., Miyamoto,

- K. and Nakao, S. 2003. Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation (DIC) progresses at a different rate in tissue factor-induced and lipopolysaccharide-induced DIC models in rats. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 14:221-228.
6. Bancsi, M. J., Thompson, J. and Bertina, R. M. 1994. Stimulation of monocyte tissue factor expression in an in vitro model of bacterial endocarditis. *Infect. Immun.* 62:5669-5672.
7. Barnes, A., Bee, A., Bell, S., Gilmore, W., Mee, A., Morris, R. and Carter, S. D. 2000. Immunological and inflammatory characterisation of three canine cell lines: K1, K6 and DH82. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 75:9-25.
8. Bateman, S. W., Mathews, K. A., Abrams-Ogg, A. C., Lumsden, J. H., Johnstone, I. B., Hillers, T. K. and Foster, R. A. 1999. Diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs admitted to an intensive care unit. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215:798-804.
9. Bozza, F. A., Salluh, J. I., Japiassu, A. M., Soares, M., Assis, E. F., Gomes, R. N., Bozza, M. T., Castro-Faria-Neto, H. C. and Bozza, P. T. 2007. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit. Care.* 11:R49.
10. Carlsen, E. and Prydz, H. 1988. Activation of monocytes-- more than one process. Differential effect of cytokines on monocytes. *Scand. J. Immunol.* 27:401-404.

11. de Laforcade, A. M., Freeman, L. M., Shaw, S. P., Brooks, M. B., Rozanski, E. A. and Rush, J. E. 2003. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *J. Vet. Intern. Med.* 17:674-679.
12. Drake, T. A., Ruf, W., Morrissey, J. H. and Edgington, T. S. 1989. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J. Cell Biol.* 109:389-395.
13. Egorina, E. M., Sovershaev, M. A., Bjorkoy, G., Gruber, F. X., Olsen, J. O., Parhami-Seren, B., Mann, K. G. and Osterud, B. 2005. Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:1493-1498.
14. Eperon, S. and Jungi, T. W. 1996. The use of human monocytoïd lines as indicators of endotoxin. *J. Immunol. Methods* 194:121-129.
15. Ernofsson, M. and Siegbahn, A. 1996. Platelet-derived growth factor-BB and monocyte chemotactic protein-1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor. *Thromb. Res.* 83:307-320.
16. Ernofsson, M., Tenno, T. and Siegbahn, A. 1996. Inhibition of tissue factor surface expression in human peripheral blood monocytes exposed to cytokines. *Br. J. Haematol.* 95:249-257.
17. Eskici, Z. M., Acikgoz, S., Piskin, N., Mungan, G., Can, M.,

- Guven, B. and Kokturk, F. 2012. High mobility group B1 levels in sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation. *Acta Biochim. Pol.* 59:561-566.
18. Fera, G., Semeraro, N., De Mitrio, V. and Schiraldi, O. 1993. Disseminated intravascular coagulation associated with disseminated cryptococcosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Infection* 21:171-173.
19. Fujimoto, Y., Nakatani, N., Kubo, T., Semi, Y., Yoshida, N., Nakajima, H., Iseri, T., Azuma, Y. T. and Takeuchi, T. 2012. Adenosine and ATP affect LPS-induced cytokine production in canine macrophage cell line DH82 cells. *J. Vet. Med. Sci.* 74:27-34.
20. Gando, S., Kameue, T., Nanzaki, S. and Nakanishi, Y. 1995. Cytokines, soluble thrombomodulin and disseminated intravascular coagulation in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Thromb. Res.* 80:519-526.
21. Gando, S., Kameue, T., Nanzaki, S. and Nakanishi, Y. 1996. Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome. *Thromb. Haemost.* 75:224-228.
22. Guha, M. and Mackman, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85-94.
23. Hair, G. A., Padula, S., Zeff, R., Schmeizl, M., Contrino, J., Kreutzer, D. L., de Moerloose, P., Boyd, A. W., Stanley, I., Burgess, A. W. and Rickles, F. R. 1996. Tissue factor

- expression in human leukemic cells. *Leuk. Res.* 20:1-11.
24. Hara, S., Asada, Y., Hatakeyama, K., Marutsuka, K., Sato, Y., Kisanuki, A. and Sumiyoshi, A. 1997. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in rats lungs with lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation. *Lab. Invest.* 77:581-589.
 25. Hatada, T., Wada, H., Nobori, T., Okabayashi, K., Maruyama, K., Abe, Y., Uemoto, S., Yamada, S. and Maruyama, I. 2005. Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Haemost.* 94:975-979.
 26. Helmond, S. E., Catalfamo, J. L. and Brooks, M. B. 2013. Flow cytometric detection and procoagulant activity of circulating canine platelet-derived microparticles. *Am. J. Vet. Res.* 74:207-215.
 27. Henry, M. M. and Moore, J. N. 1988. Endotoxin-induced procoagulant activity in equine peripheral blood monocytes. *Circ. Shock* 26:297-309.
 28. Herring, J. M., Smith, S. A., McMichael, M. A., O'Brien, M., Ngwenyama, T. R., Corsi, R., Galligan, A., Beloshapka, A. N., Deng, P. and Swanson, K. S. 2013. Microparticles in stored canine RBC concentrates. *Vet. Clin. Pathol.* 42:163-169.
 29. Ishida, A., Ohno, K., Fukushima, K., Nakashima, K., Takahashi,

- M., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y. and Tsujimoto, H. 2011. Plasma high-mobility group box 1 (HMGB1) in dogs with various diseases: comparison with C-reactive protein. *J. Vet. Med. Sci.* 73:1127-1132.
30. Ito, T., Kawahara, K., Nakamura, T., Yamada, S., Nakamura, T., Abeyama, K., Hashiguchi, T. and Maruyama, I. 2007. High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. *J. Thromb. Haemost.* 5:109-116.
31. Jungi, T. W., Brcic, M., Eperon, S. and Albrecht, S. 1994. Transforming growth factor-beta and interleukin-10, but not interleukin-4, down-regulate procoagulant activity and tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Thromb. Res.* 76:463-474.
32. Kamimura, M., Viedt, C., Dalpke, A., Rosenfeld, M. E., Mackman, N., Cohen, D. M., Blessing, E., Preusch, M., Weber, C. M., Kreuzer, J., Katus, H. A. and Bea, F. 2005. Interleukin-10 suppresses tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages via inhibition of Egr-1 and a serum response element/MEK-ERK1/2 pathway. *Circ. Res.* 97:305-313.
33. Key, N. S. 2008. Platelet tissue factor: how did it get there and is it important? *Semin. Hematol.* 45:S16-20.
34. Kim, S. K., Shin, M. S., Jung, B. K., Shim, J. Y., Won, H. S., Lee, P. R. and Kim, A. 2006. Effect of

- dehydroepiandrosterone on lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production in DH82 cultured canine macrophage cells. *J. Reprod. Immunol.* 70:71-81.
35. Kjelgaard-Hansen, M., Goggs, R., Wiinberg, B. and Chan, D. L. 2011. Use of serum concentrations of interleukin-18 and monocyte chemoattractant protein-1 as prognostic indicators in primary immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 25:76-82.
36. Lee, R. D., Barcel, D. A., Williams, J. C., Wang, J. G., Boles, J. C., Manly, D. A., Key, N. S. and Mackman, N. 2012. Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity. *Thromb. Res.* 129:80-85.
37. LeMay, D. R., LeMay, L. G., Kluger, M. J. and D'Alecy, L. G. 1990. Plasma profiles of IL-6 and TNF with fever-inducing doses of lipopolysaccharide in dogs. *Am. J. Physiol.* 259:R126-132.
38. Levi, M. 2005. Disseminated intravascular coagulation: What's new? *Crit. Care Clin.* 21:449-467.
39. Lindmark, E., Tenno, T., Chen, J. and Siegbahn, A. 1998. IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. *Br. J. Haematol.* 102:597-604.
40. Lv, B., Wang, H., Tang, Y., Fan, Z., Xiao, X. and Chen, F. 2009. High-mobility group box 1 protein induces tissue factor expression in vascular endothelial cells via activation of

- NF-kappaB and Egr-1. *Thromb. Haemost.* 102:352-359.
41. Mackman, N. 2006. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol. Dis.* 36:104-107.
 42. Maier, R. V. and Hahnel, G. B. 1984. Potential for endotoxin-activated Kupffer's cells to induce microvascular thrombosis. *Arch. Surg.* 119:62-67.
 43. Marie, C., Roman-Roman, S. and Rawadi, G. 1999. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins. *Infect. Immun.* 67:688-693.
 44. Miyamoto, T., Fujinaga, T., Yamashita, K. and Hagio, M. 1996. Changes of serum cytokine activities and other parameters in dogs with experimentally induced endotoxic shock. *Jpn. J. Vet. Res.* 44:107-118.
 45. Mohamed, A., Matsumoto, Y., Yoshihara, K., Matsumoto, Y., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., Onodera, T. and Hirota, Y. 1997. Establishment of a sandwich enzyme linked immunosorbent assay for canine interleukin-8. *J. Vet. Med. Sci.* 59:39-41.
 46. Monroe, D. M. and Key, N. S. 2007. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J. Thromb. Haemost.* 5:1097-1105.
 47. Moon, D. K. and Geczy, C. L. 1988. Recombinant IFN-gamma synergizes with lipopolysaccharide to induce macrophage

- membrane procoagulants. *J. Immunol.* 141:1536-1542.
48. Neumann, F. J., Ott, I., Marx, N., Luther, T., Kenngott, S., Gawaz, M., Kotzsch, M. and Schomig, A. 1997. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 17:3399-3405.
 49. Oberholzer, A., Souza, S. M., Tschoeke, S. K., Oberholzer, C., Abouhamze, A., Pribble, J. P. and Moldawer, L. L. 2005. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock* 23:488-493.
 50. Okano, S., Hurley, D. J., Vandenplas, M. L. and Moore, J. N. 2006. Effect of fetal bovine serum and heat-inactivated fetal bovine serum on microbial cell wall-induced expression of procoagulant activity by equine and canine mononuclear cells in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 67:1020-1024.
 51. Okano, S., Hurley, D. J., Bergh, M. S., Vandenplas, M. L., Budsberg, S. C. and Moore, J. N. 2006. Optimization of conditions for in vitro production of radical oxygen species and expression of tissue factor by canine mononuclear cells and granulocytes for use in high-throughput assays. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112:234-242.
 52. Osnes, L. T., Westvik, A. B., Joo, G. B., Okkenhaug, C. and Kierulf, P. 1996. Inhibition of IL-1 induced tissue factor (TF) synthesis and procoagulant activity (PCA) in purified

- human monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13. *Cytokine* 8:822-827.
53. Osterud, B. 2010. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb. Res.* 125 Suppl 1:S31-34.
54. Osterud, B. and Bjorklid, E. 2006. Sources of tissue factor. *Semin. Thromb. Hemost.* 32:11-23.
55. Ovstebo, R., Aass, H. C., Haug, K. B., Troseid, A. M., Gopinathan, U., Kierulf, P., Berg, J. P., Brandtzaeg, P. and Henriksson, C. E. 2012. LPS from *Neisseria meningitidis* is crucial for inducing monocyte- and microparticle-associated tissue factor activity but not for tissue factor expression. *Innate Immun.* 18:580-591.
56. Owens, A. P., 3rd and Mackman, N. 2011. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* 108:1284-1297.
57. Pajkrt, D., van der Poll, T., Levi, M., Cutler, D. L., Affrime, M. B., van den Ende, A., ten Cate, J. W. and van Deventer, S. J. 1997. Interleukin-10 inhibits activation of coagulation and fibrinolysis during human endotoxemia. *Blood* 89:2701-2705.
58. Park, J. S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., Kim, J. Y., Strassheim, D., Sohn, J. W., Yamada, S., Maruyama, I., Banerjee, A., Ishizaka, A. and Abraham, E. 2006. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290:C917-924.

59. Pawlinski, R. and Mackman, N. 2010. Cellular sources of tissue factor in endotoxemia and sepsis. *Thromb. Res.* 125 Suppl 1:S70-73.
60. Paysant, J., Soria, C., Cornillet-Lefebvre, P., Nguyen, P., Lenormand, B., Mishal, Z., Vannier, J. P. and Vasse, M. 2005. Long-term incubation with IL-4 and IL-10 oppositely modifies procoagulant activity of monocytes and modulates the surface expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Br. J. Haematol.* 131:356-365.
61. Poitevin, S., Cochery-Nouvellon, E., Dupont, A. and Nguyen, P. 2007. Monocyte IL-10 produced in response to lipopolysaccharide modulates thrombin generation by inhibiting tissue factor expression and release of active tissue factor-bound microparticles. *Thromb. Haemost.* 97:598-607.
62. Pradier, O., Gerard, C., Delvaux, A., Lybin, M., Abramowicz, D., Capel, P., Velu, T. and Goldman, M. 1993. Interleukin-10 inhibits the induction of monocyte procoagulant activity by bacterial lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.* 23:2700-2703.
63. Rambaldi, A., Alessio, G., Casali, B., Passerini, C. G., Donati, M. B., Mantovani, A. and Semeraro, N. 1986. Induction of monocyte-macrophage procoagulant activity by transformed cell lines. *J. Immunol.* 136:3848-3855.
64. Rau, S., Kohn, B., Richter, C., Fenske, N., Kuchenhoff, H.,

- Hartmann, K., Hartle, S., Kaspers, B. and Hirschberger, J. 2007. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Vet. Clin. Pathol.* 36:253-260.
65. Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K. and Geginat, J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21:331-344.
66. Sabatier, F., Roux, V., Anfosso, F., Camoin, L., Sampol, J. and Dignat-George, F. 2002. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 99:3962-3970.
67. Kumar, V., Abul, A. and Aster, J. C. 2009. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th ed. Sanders, Philadelphia
68. Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., Takahashi, T., Imaizumi, H., Asai, Y. and Kuroki, Y. 2003. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J. Immunol.* 171:417-425.
69. Schwager, I. and Jungi, T. W. 1994. Effect of human recombinant cytokines on the induction of macrophage procoagulant activity. *Blood* 83:152-160.
70. Shet, A. S., Aras, O., Gupta, K., Hass, M. J., Rausch, D. J., Saba, N., Koopmeiners, L., Key, N. S. and Hebbel, R. P. 2003. Sickle blood contains tissue factor-positive

- microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 102:2678-2683.
71. Shi, F., Kurzman, I. D. and MacEwen, E. G. 1995. In vitro and in vivo production of interleukin-6 induced by muramyl peptides and lipopolysaccharide in normal dogs. *Cancer Biother.* 10:317-325.
 72. Stokol, T., Daddona, J. L. and Choi, B. 2010. Evaluation of tissue factor procoagulant activity on the surface of feline leukocytes in response to treatment with lipopolysaccharide and heat-inactivated fetal bovine serum. *Am. J. Vet. Res.* 71:623-629.
 73. Toh, C. H. and Dennis, M. 2003. Current clinical practice. DIC 2002: a review of disseminated intravascular coagulation. *Hematology* 8:65-71.
 74. van der Poll, T., Levi, M., Hack, C. E., ten Cate, H., van Deventer, S. J., Eerenberg, A. J., de Groot, E. R., Jansen, J., Gallati, H., Buller, H. R., ten Cate, J. W., and Aarden, L. A. 1994. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J. Exp. Med.* 179:1253-1259.
 75. Wada, H., Tanigawa, M., Wakita, Y., Nakase, T., Minamikawa, K., Kaneko, T., Ohiwa, M., Kageyama, S., Kobayashi, T. and Noguchi, T. 1993. Increased plasma level of interleukin-6 in disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 4:583-590.

76. Wiggins, R. C., Njoku, N. and Sedor, J. R. 1990. Tissue factor production by cultured rat mesangial cells. Stimulation by TNF alpha and lipopolysaccharide. *Kidney Int.* 37:1281-1285.
77. Yamashita, K., Fujinaga, T., Miyamoto, T., Hagio, M., Izumisawa, Y. and Kotani, T. 1994. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 56:487-492.
78. Yu, D. H., Nho, D. H., Song, R. H., Kim, S. H., Lee, M. J., Nemzek, J. A. and Park, J. 2010. High-mobility group box 1 as a surrogate prognostic marker in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 20:298-302.

付図および付表

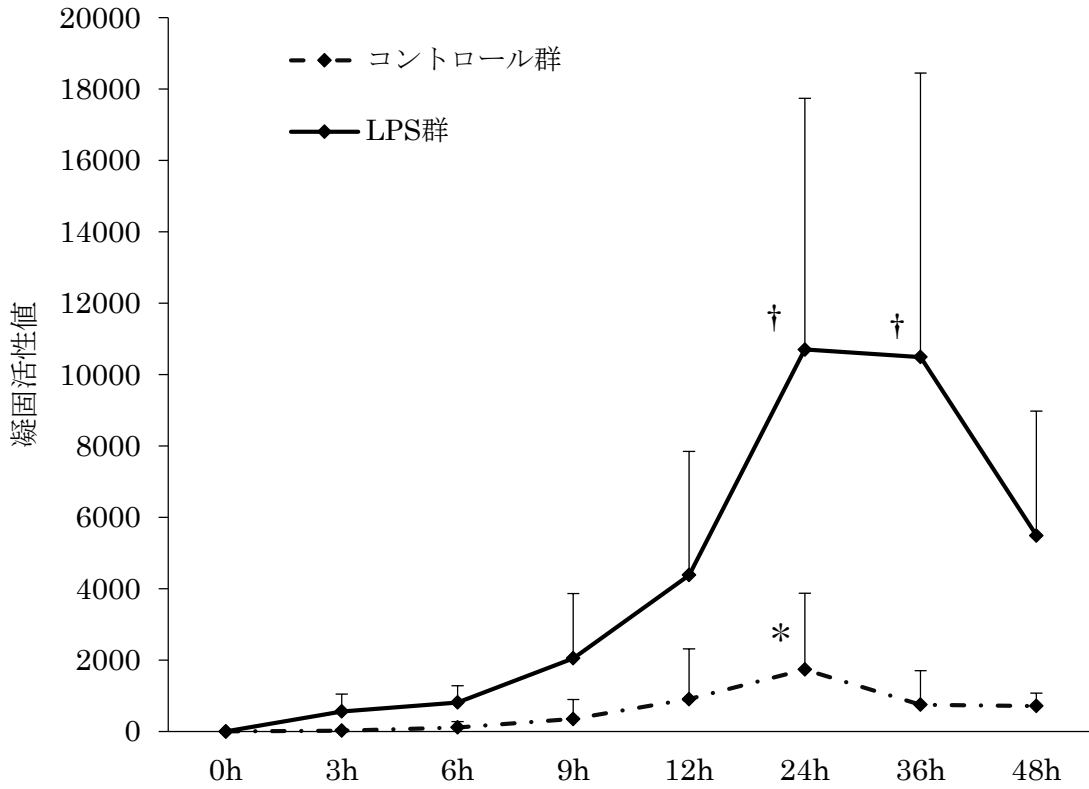


図 1-A : イヌ PBMCs の凝固活性に関する経時的変化

* $p < 0.05$ vs 0、3、6h(対照群)

† $p < 0.05$ vs 0、3、6h(LPS 添加群)

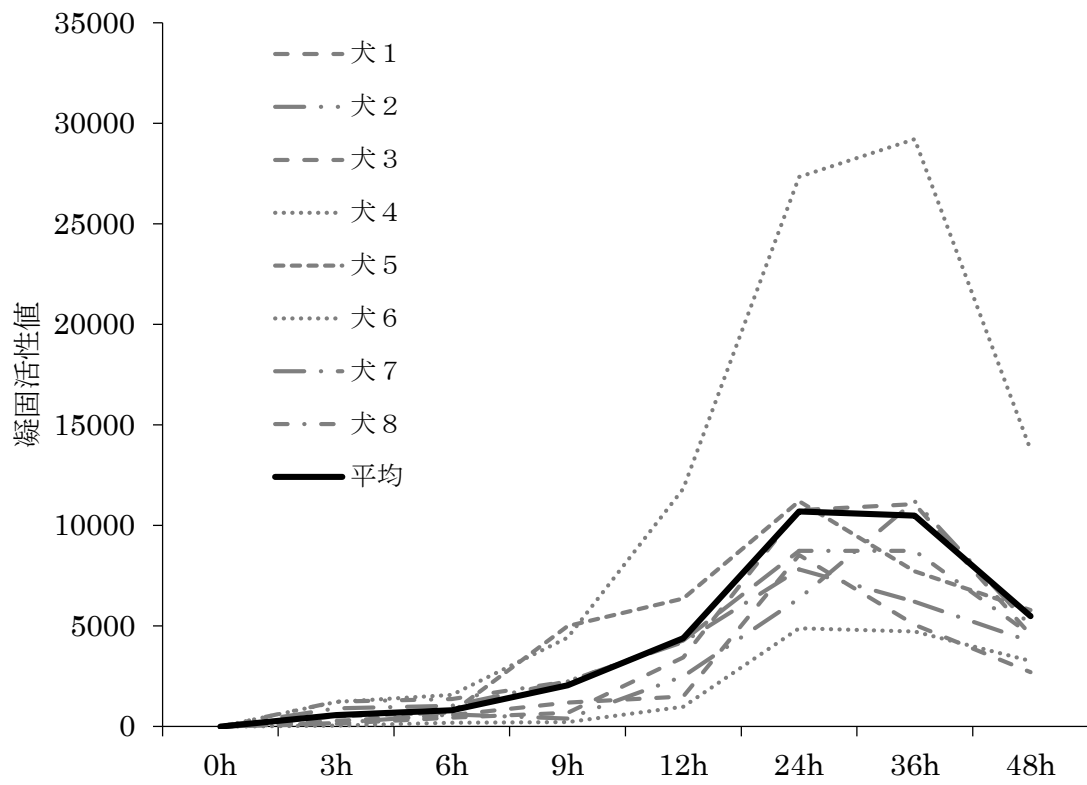


図 1-B : LPS 添加群における各検体の凝固活性の経時的変化

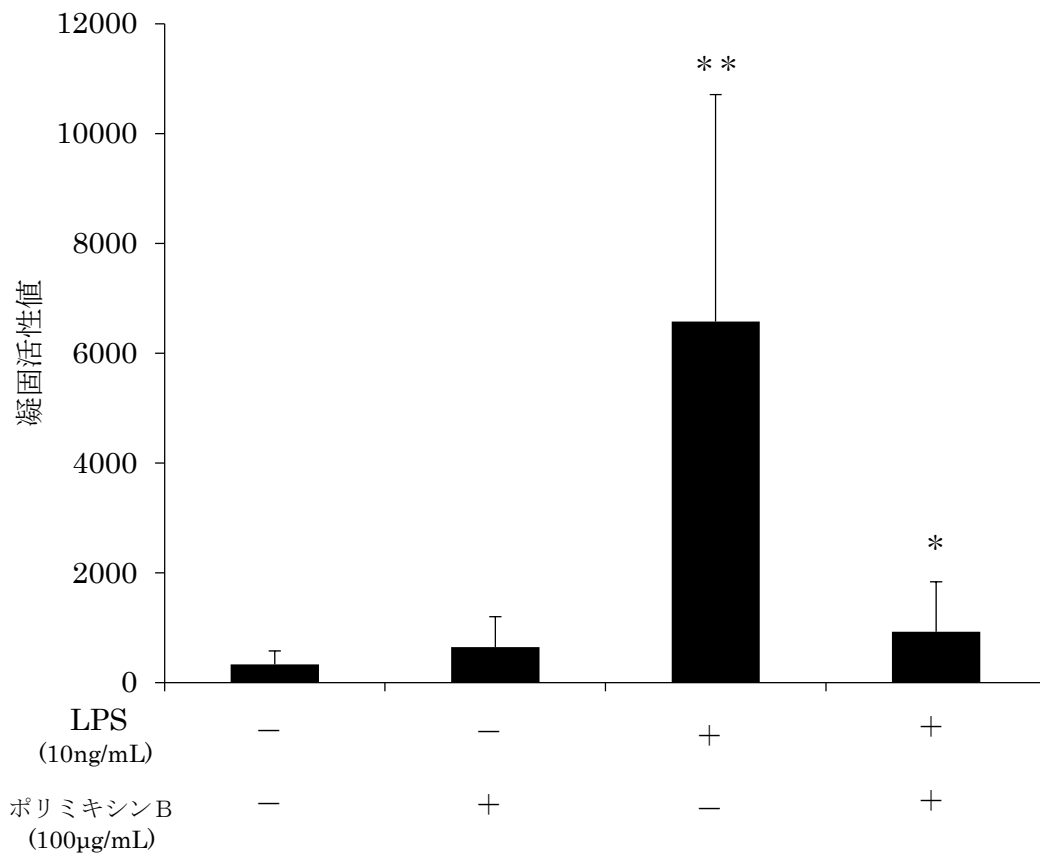


図 2-A : ポリミキシン B 添加時のイヌ PBMCs の凝固活性値

* $p < 0.05$ vs LPS 添加・ポリミキシン B 無添加群

** $p < 0.01$ vs LPS 無添加・ポリミキシン B 無添加群

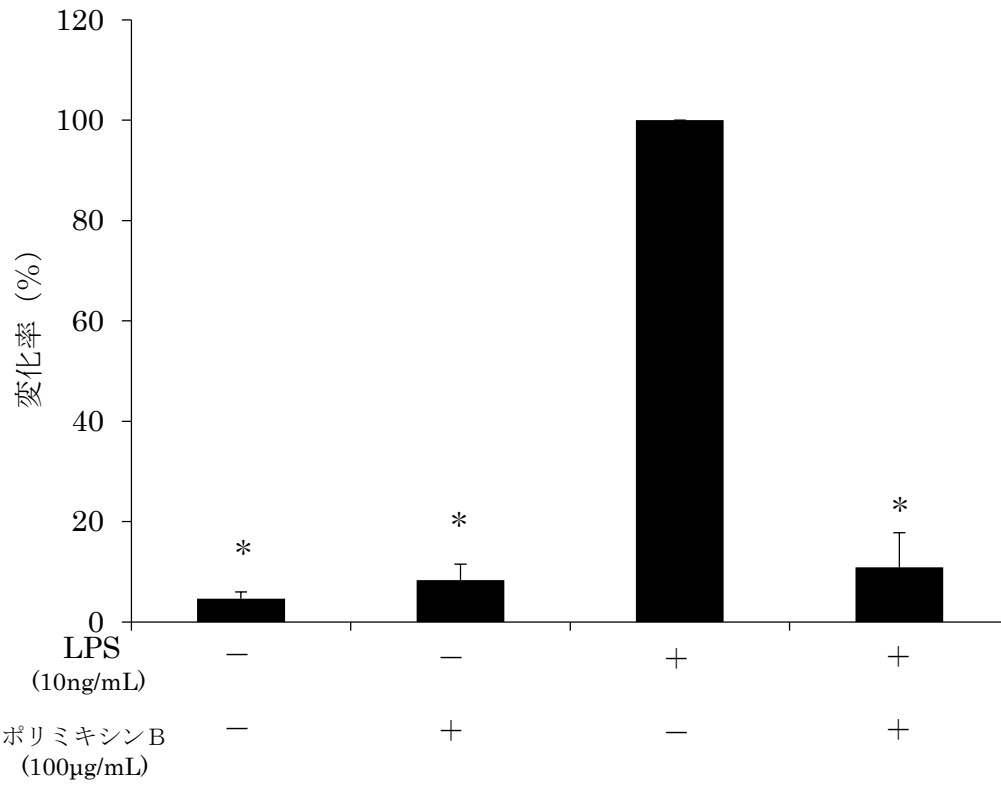


図 2-B : ポリミキシン B 添加時のイヌ PBMCs の凝固活性値変化率

*p<0.01 vs LPS 添加・ポリミキシン B 無添加群

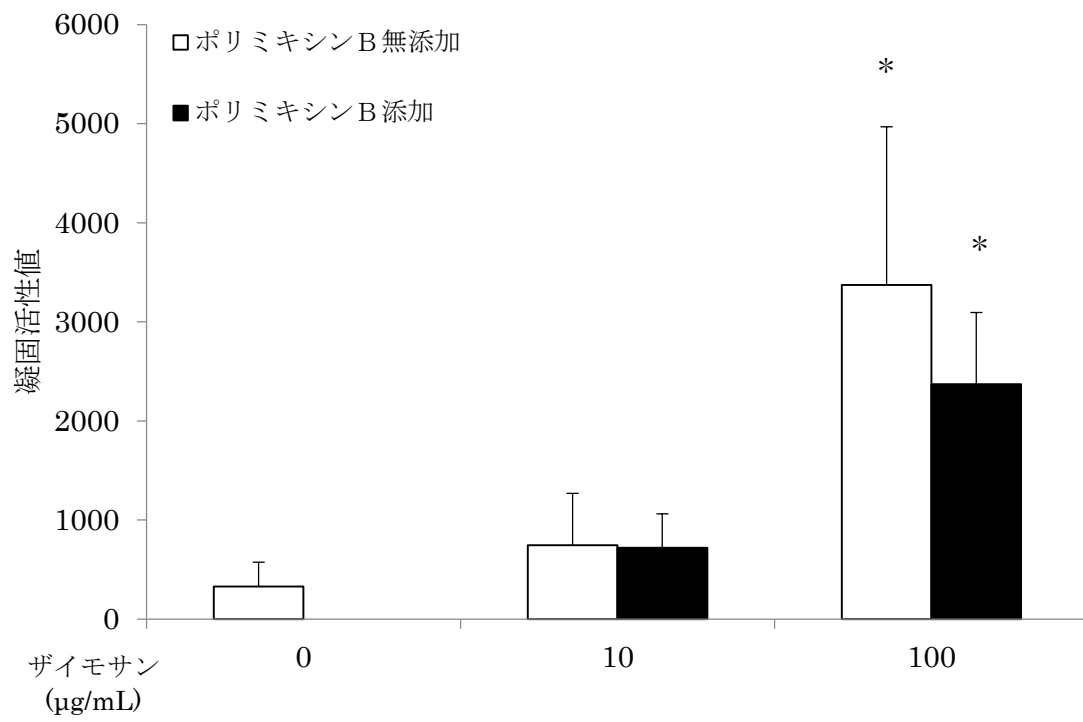


図 2-C : ザイモサン添加時のイヌ PBMCs の凝固活性値

* $p < 0.05$ vs 対照群

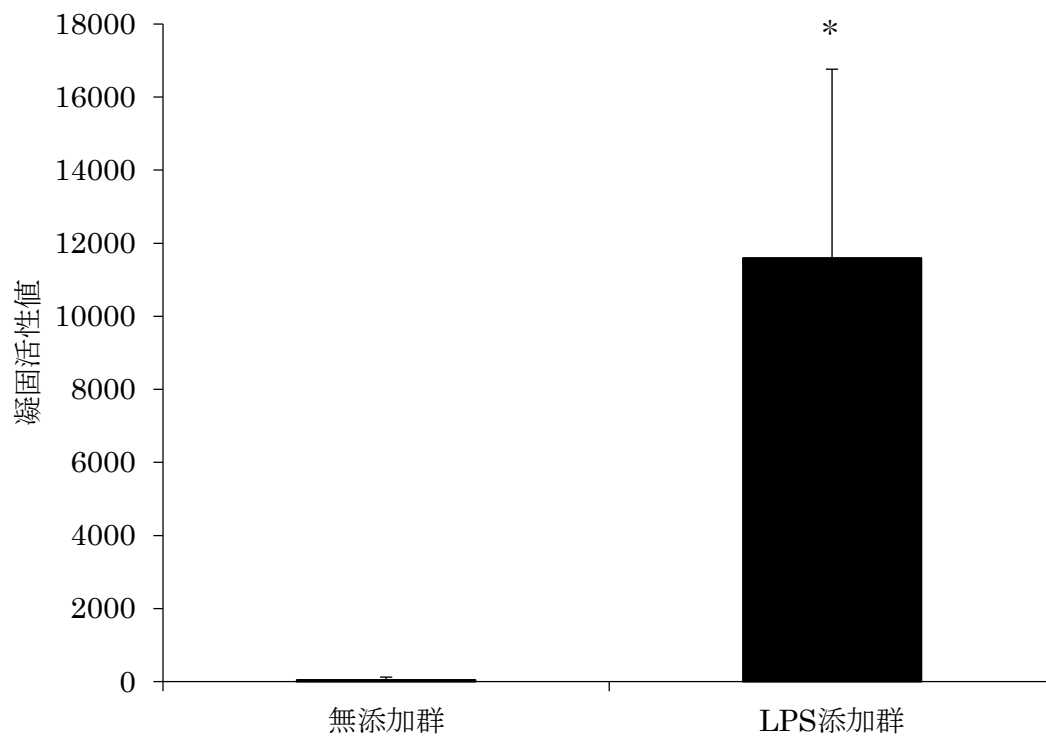


図 3-A : イヌプール血漿によるイヌ PBMCs の凝固活性値

* $p < 0.01$ vs 対照群

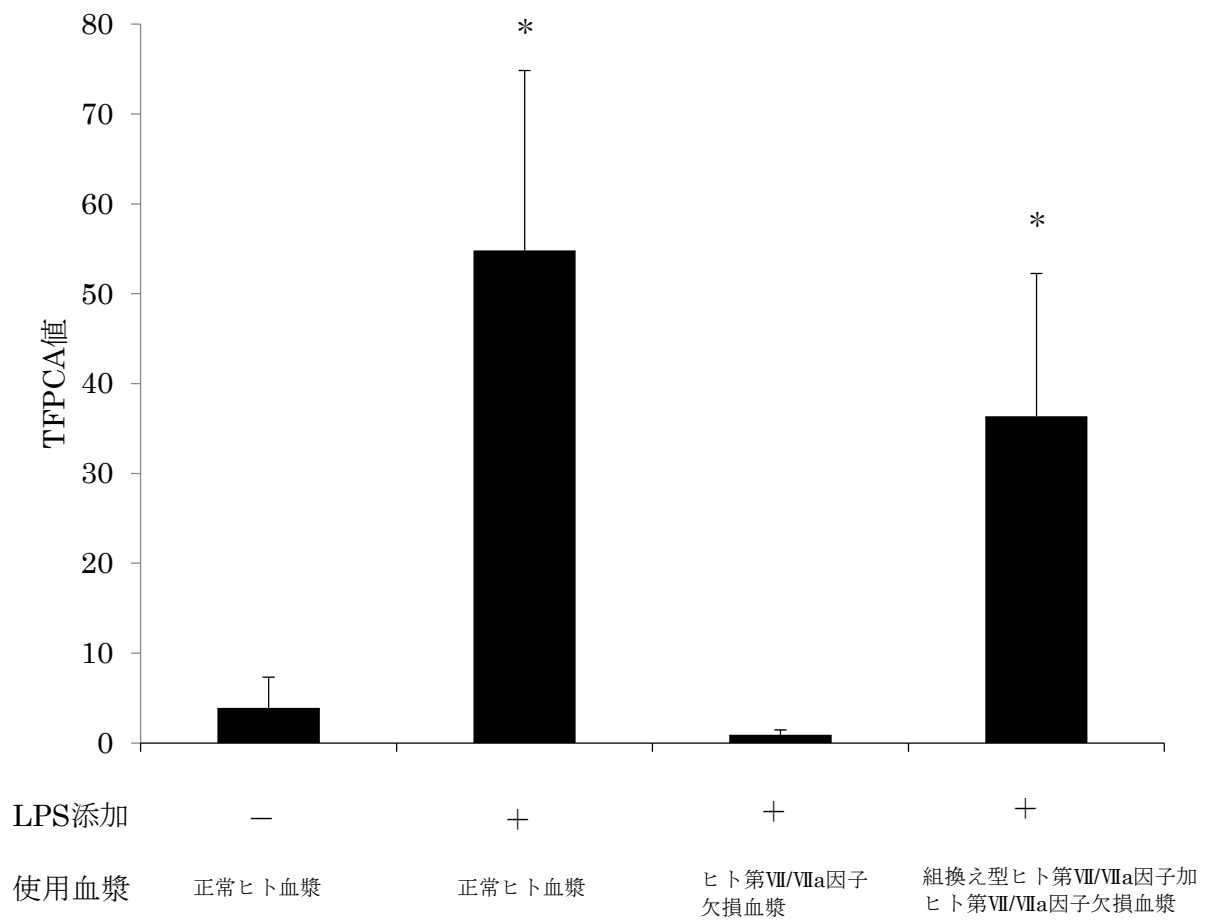


図 3-B : ヒト血漿を用いたイヌ PBMCs の凝固活性値

*p<0.01 vs LPS 添加・ヒト第VII/VIIa 因子欠損血漿群

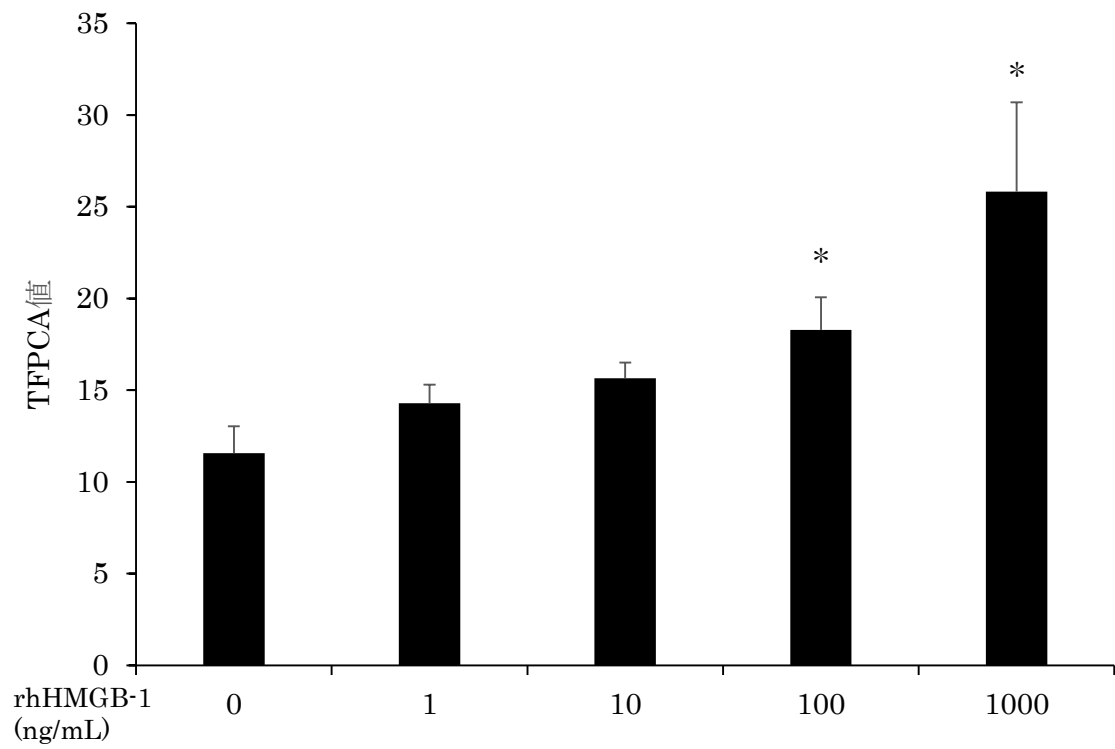


図 4: 組み換え型ヒト HMGB-1 の濃度変化によるイヌ PBMCs の TFPCA 発現量の変化

* $p < 0.05$ vs rhHMGB-1 無添加群

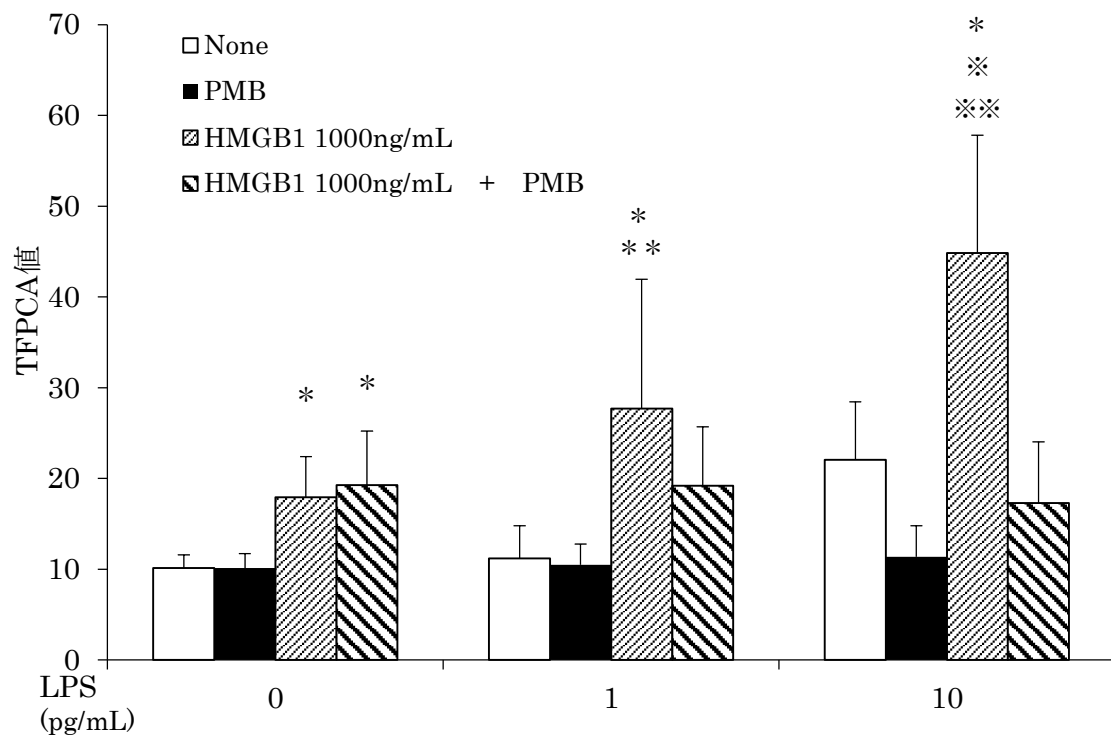


図 5 : LPS 濃度変化に対する rhHMGB-1 およびポリミキシン B の添加による TFPCA 発現量の変化

* $p < 0.05$ vs rhHMGB-1 無添加・ポリミキシン B 無添加・同濃度 LPS 添加群

** $p < 0.05$ vs rhHMGB-1(1000ng/mL)・ポリミキシン B 無添加・LPS 無添加群

※ $p < 0.05$ vs rhHMGB-1(1000ng/mL)・ポリミキシン B 無添加・LPS(1ng/mL) 添加群

※※ $p < 0.01$ vs rhHMGB-1(1000ng/mL)・ポリミキシン B 無添加・LPS 無添加群

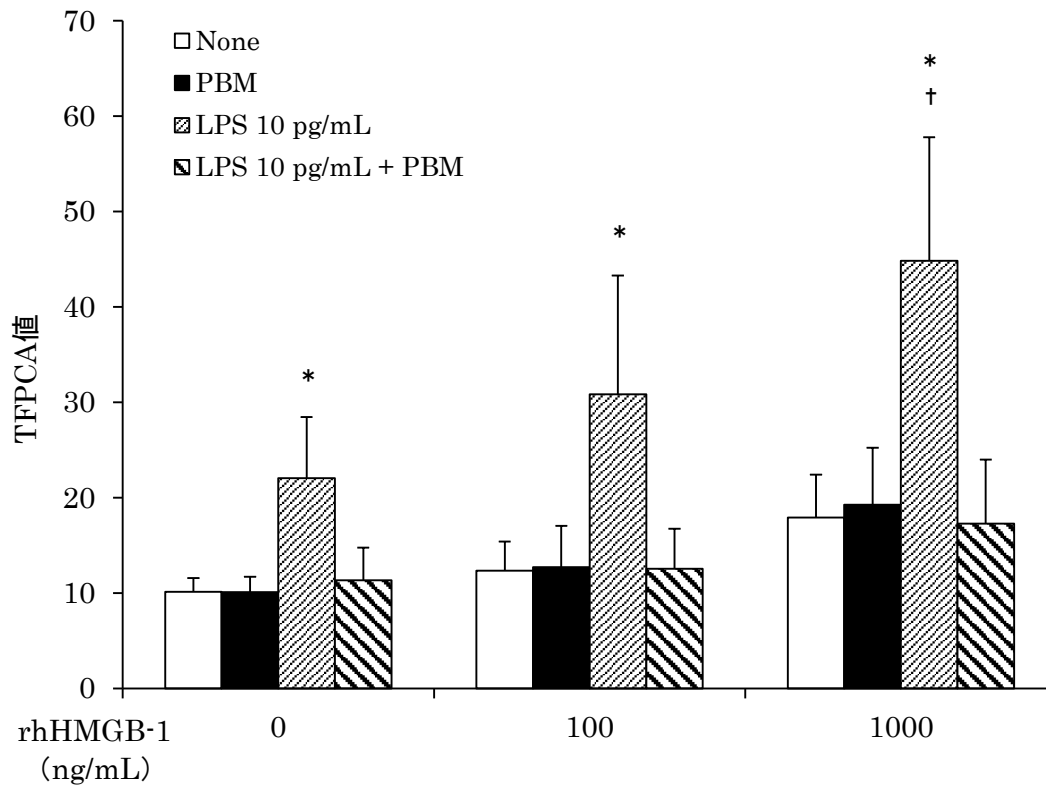


図 6 : HMGB-1 濃度変化に対する LPS およびポリミキシン B 添加による TFPCA 発現量の変化

* $p < 0.01$ vs 同濃度 rhHMGB-1・LPS 無添加・ポリミキシン無添加もしくは添加群および同濃度 rhHMGB-1・LPS 添加・ポリミキシン添加群

† $p < 0.01$ vs rhHMGB-1 無添加・LPS 添加群・ポリミキシン無添加群

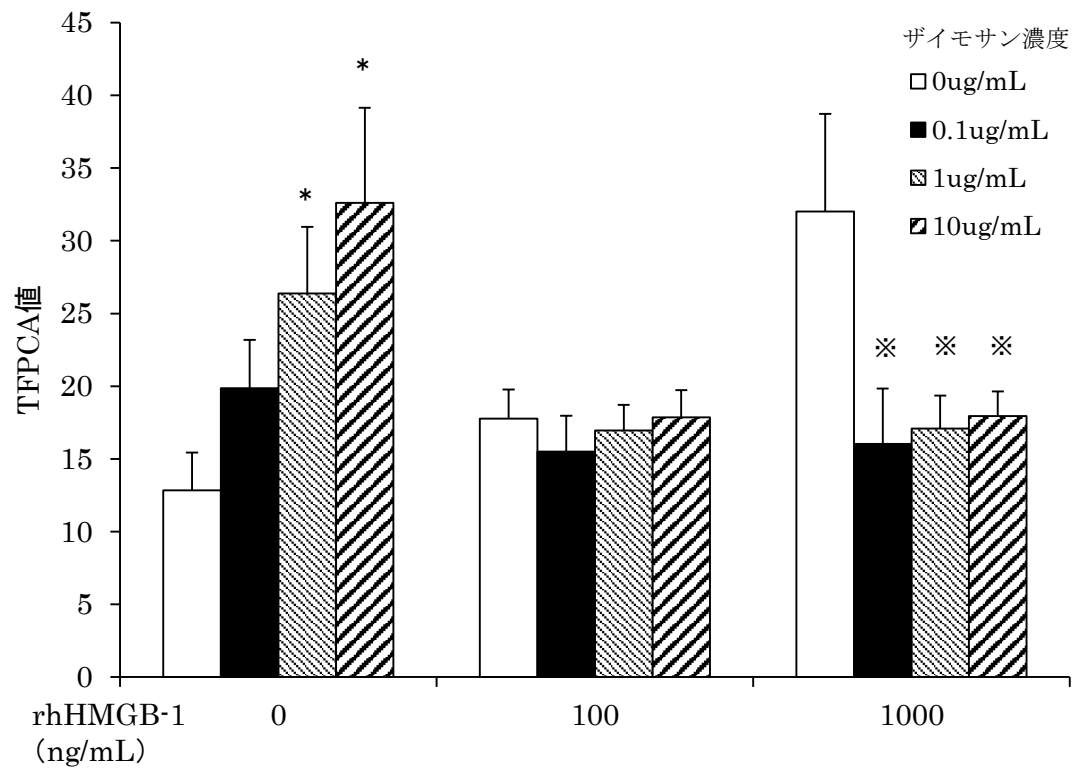


図 7: rhHMGB-1 およびザイモサンの共刺激下におけるイヌ PBMCs の TFPCA 発現量の変化

* $p < 0.01$ vs rhHMGB-1 (0 ng/mL) ・ ザイモサン (0 μ g/mL) 添加群

※ $p < 0.01$ vs rhHMGB-1 (1000 ng/mL) ・ ザイモサン (0 μ g/mL) 添加群

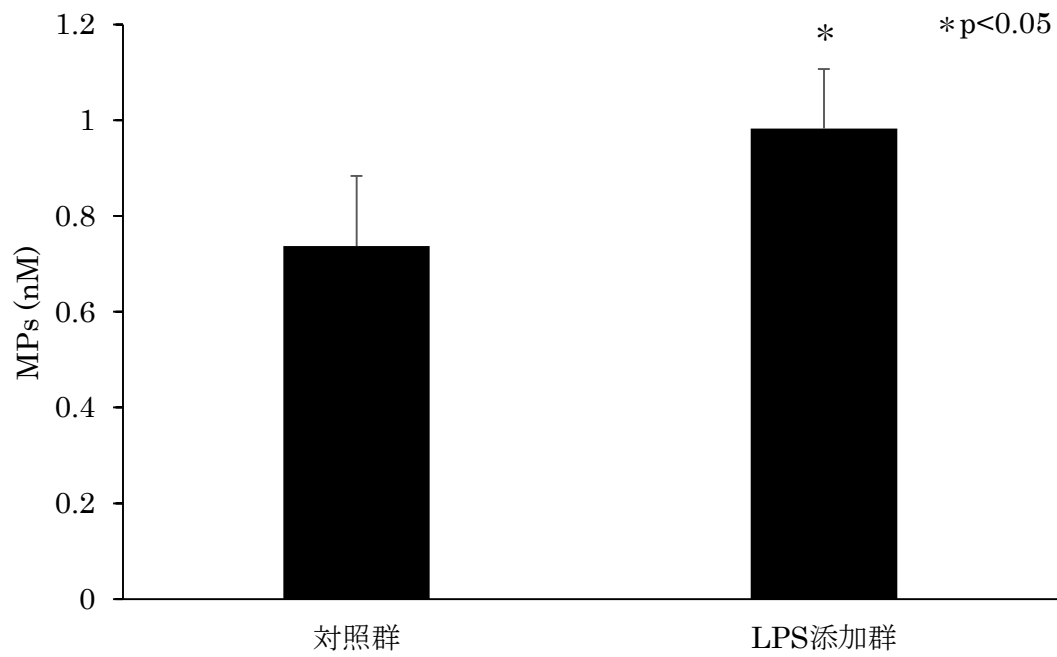


図 8 : ELISA 法による LPS 刺激下イヌ PBMCs 由来 MP_s の変化

*p<0.05 vs 対照群

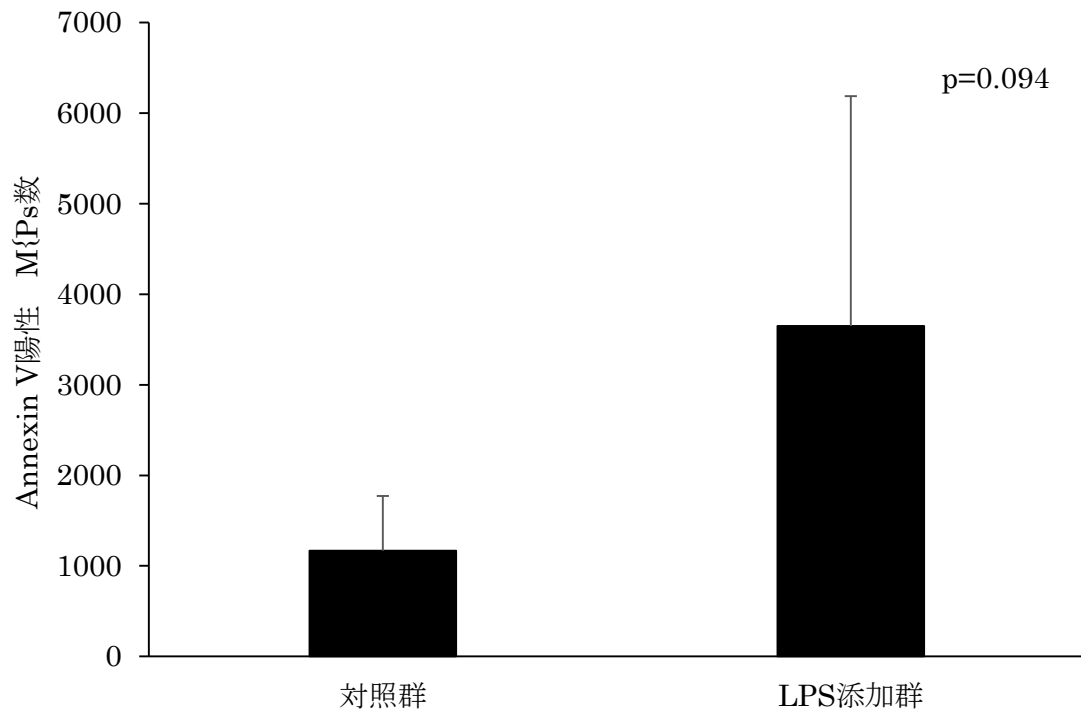


図 9 : FACS 法におけるイヌ PBMC 由来 MP_s 数の変化

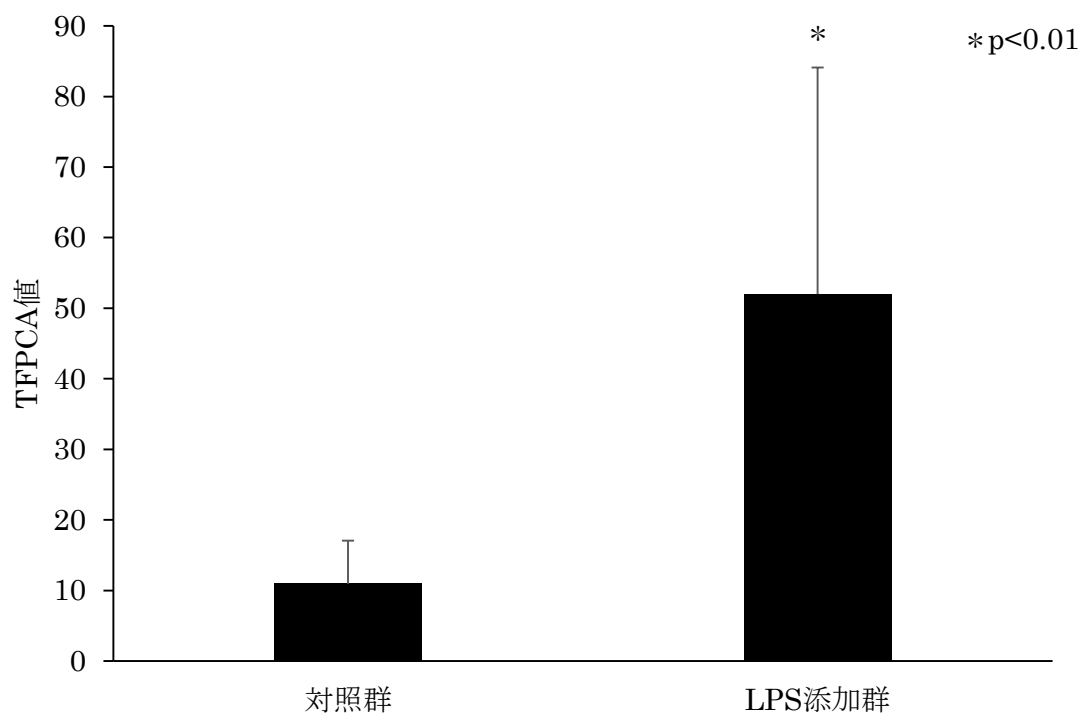


図 10 : TFPCA 法による LPS 刺激下イヌ PBMCs 由来 MPs の TFPCA 発現量の変化

* p<0.01 vs 対照群

表 1 : DH82 細胞の細胞増殖倍率

	12h	24h
対照群	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.4
LPS (1ng/mL) 添加群	1.2 ± 0.2	2.0 ± 0.5
LPS (10ng/mL) 添加群	1.3 ± 0.1	2.1 ± 0.5
LPS (100ng/mL) 添加群	1.5 ± 0.3	2.1 ± 0.5
LPS (1 μg/mL) 添加群	1.6 ± 0.2 *, **, ***	2.2 ± 0.4
PMB (100 μg/mL) + LPS (1ug/mL) 添加群	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.5
PMB (100 μg/mL) 単独添加群	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.4

数値は培養前の細胞数に対する比率で表した。

* p<0.05 vs LPS (1、10ng/mL) 添加群

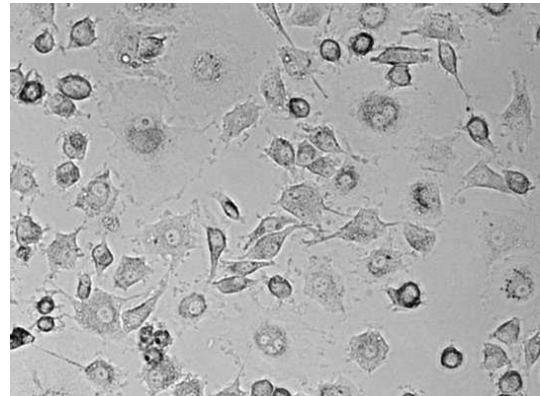
** p<0.01 vs PMB (100 μg/mL) + LPS (1ug/mL) 添加群

*** p<0.001 vs 対照群

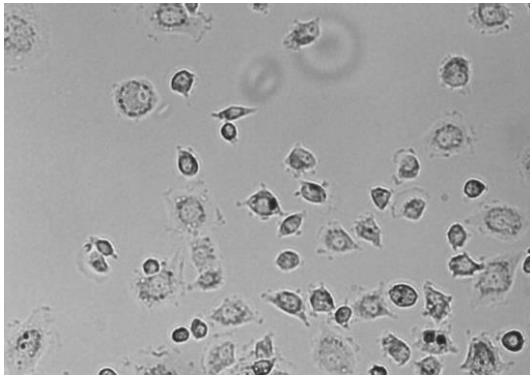
A



B



C



D

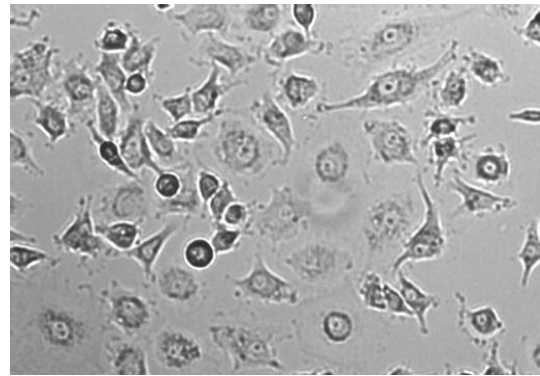


写真 1 : 12 時間及び 24 時間培養における DH82 細胞の形態変化

A-12 時間培養対象群、B-12 時間培養 LPS 添加群

C-24 時間培養対照群、D-24 時間培養 LPS 添加群

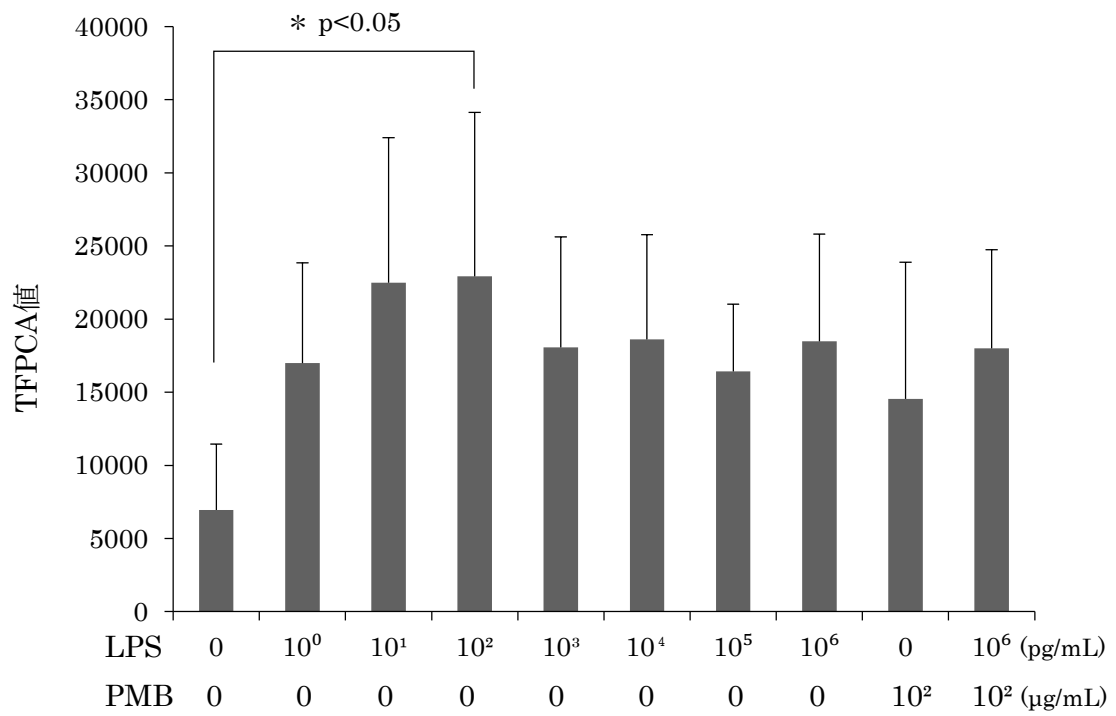


図 11 : PCA 法による DH82 細胞の TFPCA 発現量の変化

*p<0.05 vs LPS 無添加 + PMB 無添加群

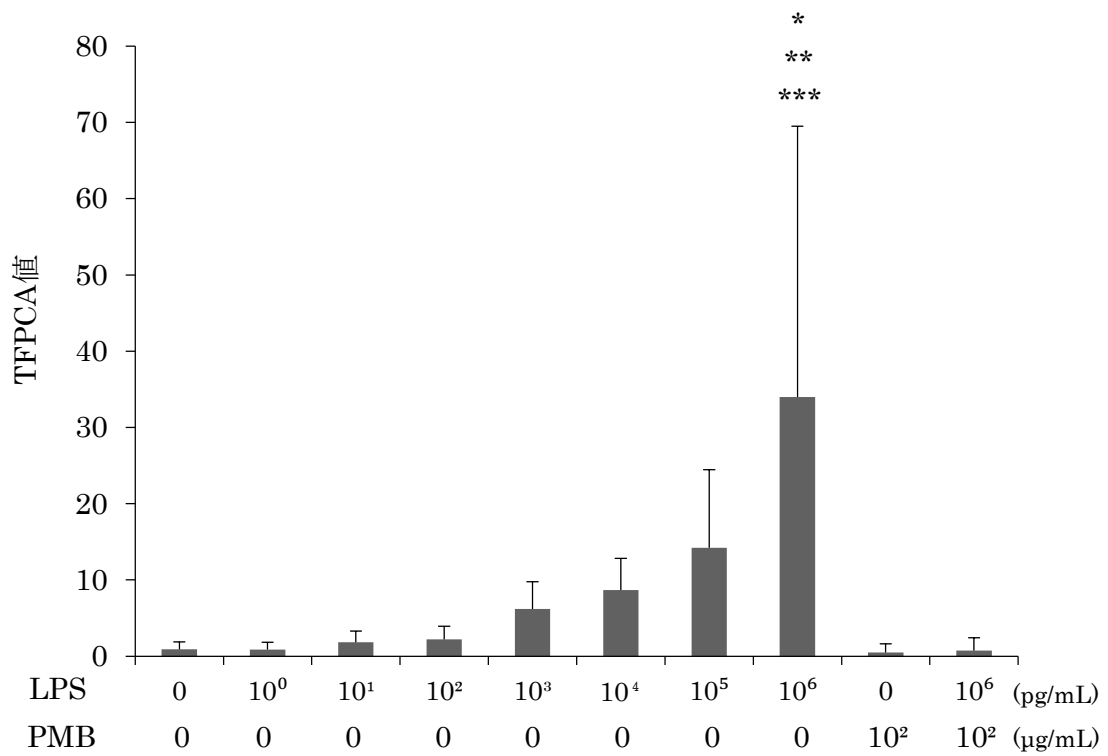


図 12 : PCA 法による DH82 細胞由来 MPsTFPCA 発現量の変化

* $p < 0.05$ vs LPS (10^2 - 10^4 pg/mL) + PMB 無添加群

** $p < 0.01$ vs LPS (10^0 - 10^1 pg/mL) 添加+PMB 無添加群および LPS (0 - 10^6 pg/mL) 添加+PMB(10^2 μ g/mL) 添加群

*** $p < 0.001$ vs LPS 無添加+PMB 添加群

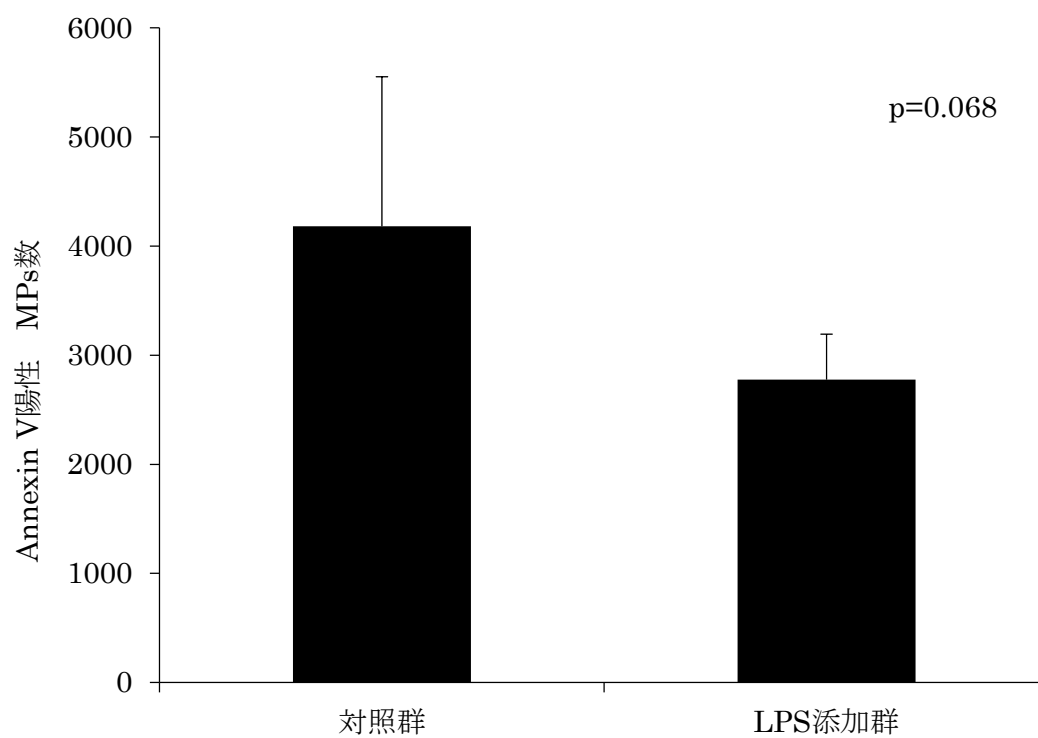


図 13 : FACS 法による DH82 細胞由来 MPs 数の変化

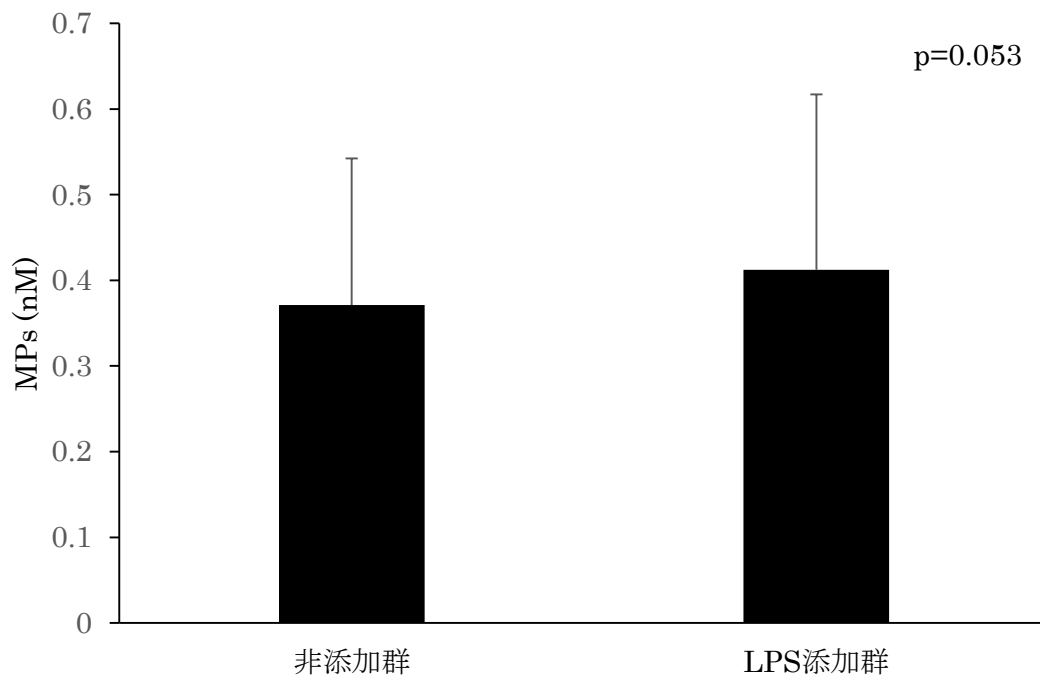


図 14 : ELISA 法における DH82 細胞由来 MP_s 数の変化

表2：イヌPBMCs、接着性PBMCs、単独分離単球の白血球分類

白血球	浮遊性PBMCs (%)	接着性PBMCs (%)	単独分離単球 (%)
好中球	9.29 ± 7.90	7.22 ± 6.76	0 ± 0
リンパ球	60.98 ± 13.07	46.5 ± 11.05	1.25 ± 0.50
単球	19.19 ± 6.20	37.72 ± 11.73*	98.5 ± 0.58**
好酸球	9.89 ± 10.01	8.54 ± 7.87	0.25 ± 0.5
好塩基球	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

* p<0.05 vs 浮遊性PBMCsの単球の割合

** p<0.01 vs 浮遊性PBMCsの単球の割合

表3 : rcIL-6 および rcIL-8 添加によるイヌ接着性PBMCs の細胞膜TFPCA 発現の変化

サイトカイン	サイトカイン投与量 (pg/mL)				
	0	10	100	1000	5000
rcIL-6	0.116 ± 0.029	0.115 ± 0.034	0.126 ± 0.032	0.116 ± 0.033	0.115 ± 0.017
rcIL-8	0.135 ± 0.060	ND	0.130 ± 0.049	0.123 ± 0.049	0.147 ± 0.050

表4 : rcIL-6 および rcIL-8 添加による単独分離したイヌ単球の細胞膜TFPCA 発現の変化

サイトカイン	サイトカイン投与量 (pg/mL)		
	0	100	5000
rcIL-6	0.169 ± 0.038	0.164 ± 0.019	0.203 ± 0.077
rcIL-8	0.163 ± 0.045	0.175 ± 0.043	0.156 ± 0.028

表5：非働化ウシ胎児血清、自己血漿、非働化自己血漿添加培地使用による、rcIL-6 および IL-8 刺激下イヌ接着性PBMCs の細胞膜TFPCA 発現の変化

血清/血漿	None		10% HI-FBS		10% ACP		10% HI-ACP	
	0	100	0	100	0	100	0	100
rcIL-6	0.114 ±	0.112 ±	0.139 ±	0.121 ±	0.124 ±	0.124 ±	0.102 ±	0.115 ±
	0.032	0.033	0.051	0.026	0.033*	0.042	0.024	0.052
rcIL-8	0.137 ±	0.121 ±	0.129 ±	0.126 ±	0.154 ±	0.159 ±	0.136 ±	0.135 ±
	0.045	0.047	0.052	0.030	0.042*	0.044	0.041	0.018

HI-FBS: 非働化ウシ胎児血清、ACP: 自己血漿、HI-ACP: 非働化自己血漿

* p<0.05 vs 血清/血漿無添加サイトカイン無添加群

表6：rcIL-6 および低用量のLPS 共刺激下におけるイヌ PBMCs の細胞膜TFPCA 発現の変化

LPS (ng/mL)	0		0.1		1	
	0	100	0	100	0	100
rcIL-6	0.105 ± 0.024	0.111 ± 0.043	0.187 ± 0.065*	0.158 ± 0.080	0.258 ± 0.151*	0.248 ± 0.144

* p<0.05 vs LPS 無添加・サイトカイン無添加群

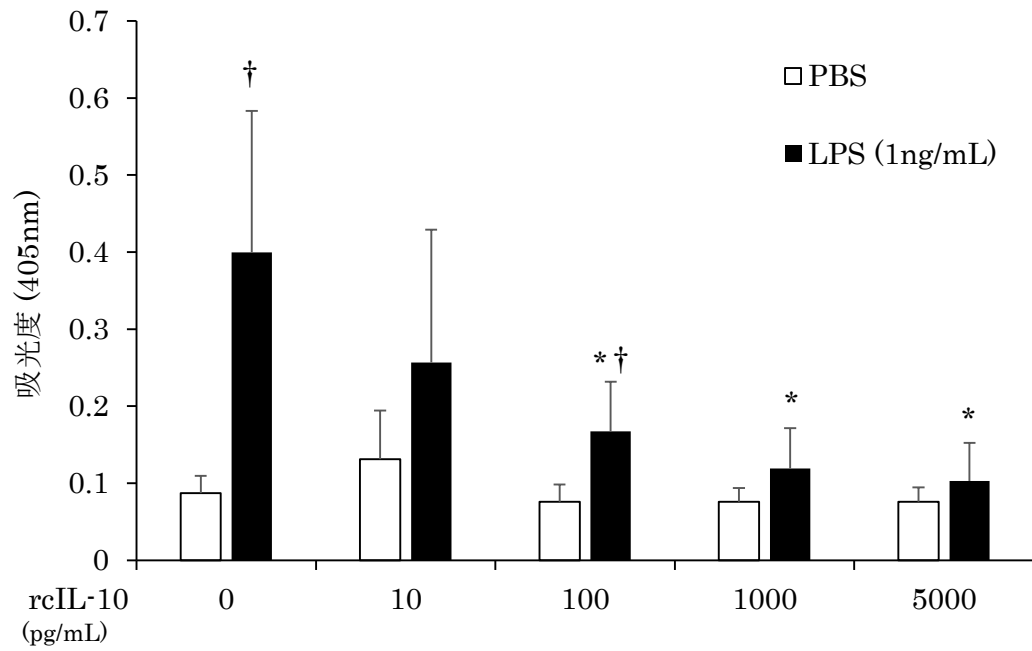


図 15 : rcIL-10 によるイヌ PBMCs の低用量 LPS 誘導性 TFPCA の発現抑制

* $p < 0.05$: vs rcIL-10 (無添加)加 LPS 添加群

† $p < 0.05$: vs 同量 rcIL-10 添加・LPS 無添加群

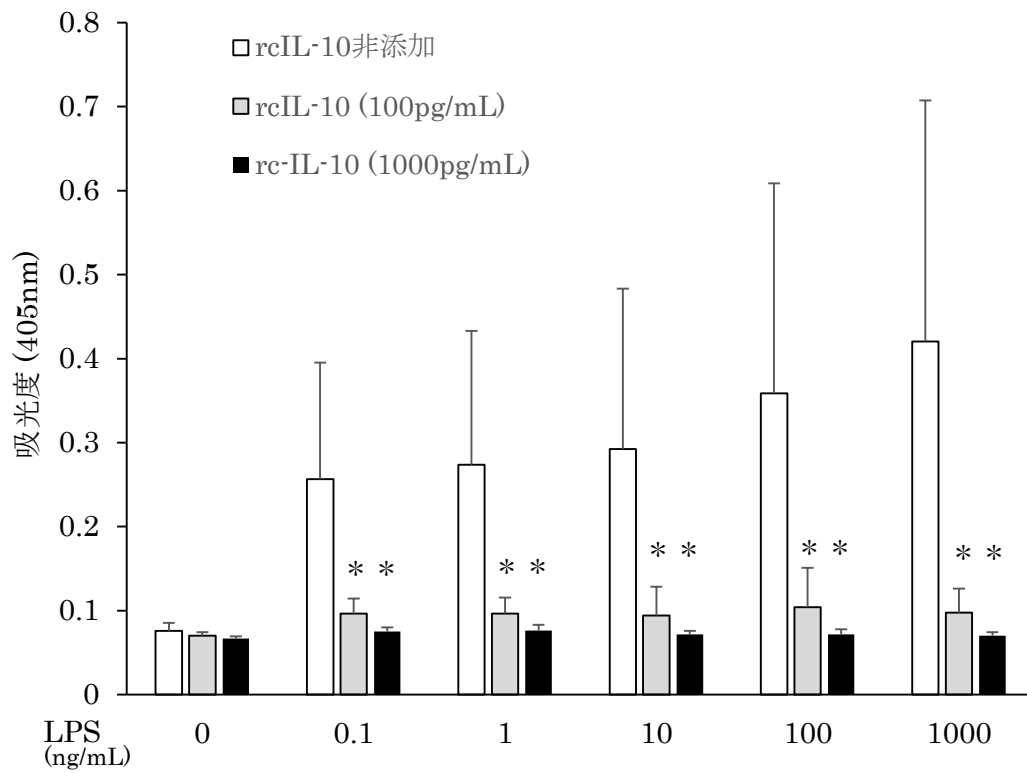


図 16 : rcIL-10 によるイヌ PBMCs の LPS 濃度依存性 TFPCA 発現抑制効果

* $p < 0.05$: vs 同 rcIL-10 投与量・LPS 添加群

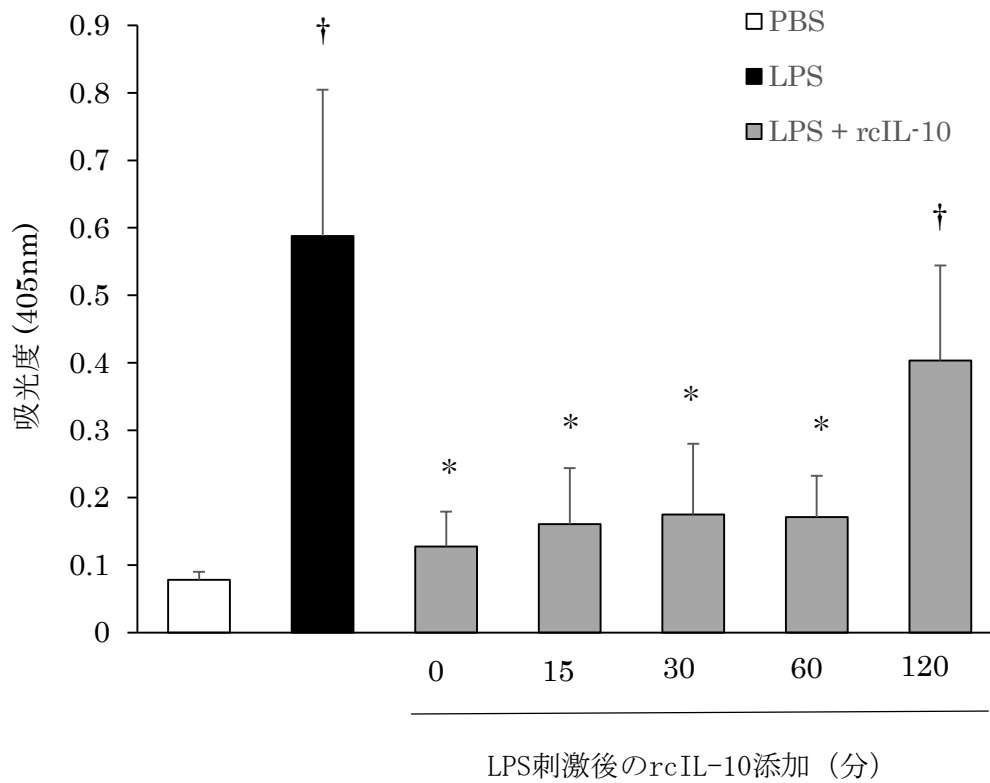


図 17：異なる時間における rcIL-10 (100pg/mL) 添加によるイヌ PBMCs の LPS (100ng/mL) 誘導性 TFPCA 発現抑制効果

* $p < 0.05$ vs LPS 添加・rcIL-10 無添加群

† $p < 0.05$ vs 陰性対照群 (PBS)

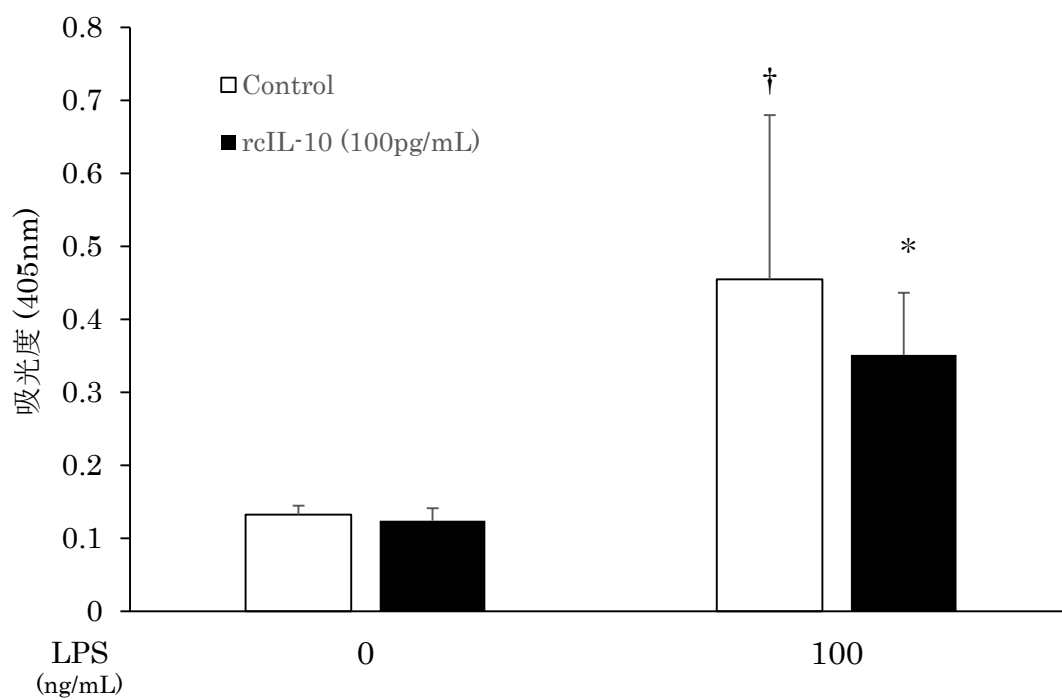


図 18 : rcIL-10 による単独分離したイヌ単球の LPS 誘導性 TFPCA 発現抑制効果

* $p < 0.05$ vs rcIL-10 無添加・LPS 添加群 (100 ng/mL LPS)

† $p < 0.05$ vs rcIL-10 無添加・LPS 無添加群 (0 ng/mL LPS)

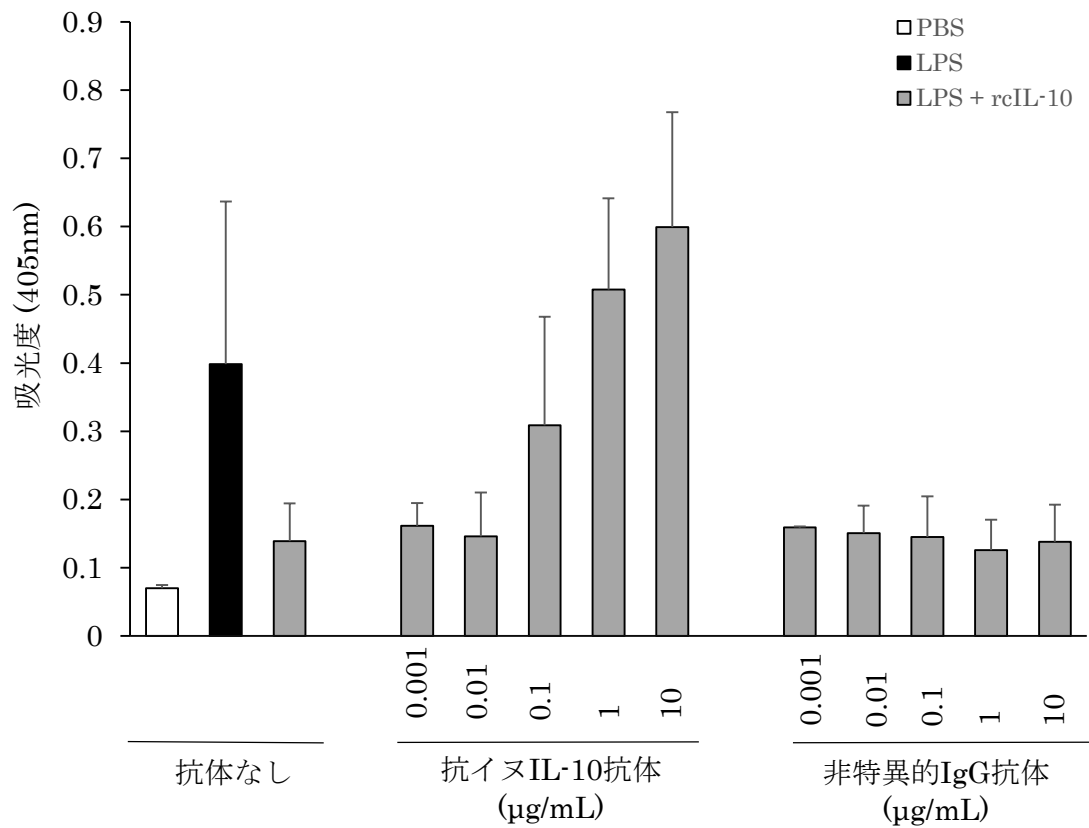


図 19: 抗IL-10抗体と非特異 (アイソタイプ) 抗体使用による rcIL-10 (100pg/mL) のイヌ PBMCs の LPS 誘導性 TFPCA 発現抑制阻止効果