

犬の腫瘍性疾患における血清フェリチンに関する研究  
— 臨床的有用性と慢性炎症に伴う変化について —

近澤 征史朗

(平成 25 年度)

Studies on the serum ferritin concentration in dogs with  
neoplastic diseases: Clinical usefulness and changes in  
chronic inflammatory condition

Seishiro CHIKAZAWA

(2013)

学位論文題目

犬の腫瘍性疾患における血清フェリチンに関する研究 ー臨床的有用性と慢性炎症に伴う変化についてー

---

氏名 近澤 征史朗

審査委員

< 主査 >

岡野 昇三  
(獣医外科学・教授)

< 副査 >

渡辺 大作  
(大動物臨床学・教授)

< 副査 >

渡辺 清隆  
(獣医生化学・教授)

< 副査 >

樋口 誠一  
(獣医内科学・教授)

平成26年2月20日

---

北里大学大学院獣医学系研究科

## 緒 言

近年の少子高齢化社会は家庭で飼育される伴侶動物（ペット）を取り巻く環境を大きく変遷させている。インターネットで公開されている一般社団法人ペットフード協会による犬猫飼育頭数の全国調査、および総務省の調査では、2003年度以降の犬猫の家庭内飼育頭数は15歳未満の子供の総数を上回ったとされ、2010年の国勢調査 <http://www.stat.go.jp/data/kokusei/2010/index.htm> では15歳未満人口は16,803,444人に対し家庭飼育犬猫頭数 <http://www.petfood.or.jp/data/chart2010/index.html> は推定で犬11,861,000頭、猫9,612,000頭であった。このような社会環境の変化に伴い、ペットはより家族の一員として大切に飼育されるようになった。社会におけるペットの役割がより愛玩目的に変化したことを受け、獣医療に対する社会的ニーズは多様化し、獣医学の目覚ましい発展（ワクチンの普及、良質なペットフードの開発、疾病の診断・治療・予防法の開発など）に寄与した。それに伴って過去にペットの主な死亡原因であった感染症や交通事故は減少し、現在はペットの平均寿命の延長によって腫瘍性疾患や心疾患が増加している[1]。中でも腫瘍性疾患は現代のペットの代表的な死因であるとされ[2]、今や放射線治療や核医学検査など高度獣医療の導入に代表されるように、ペットの腫瘍性疾患の治癒率改善に向けられた獣医療に対する社会の期待は今後さらに高まると予想される。

伴侶動物の腫瘍性疾患において獣医療が抱える主な問題点は、治療効果の向上に重要な疾患の早期発見が困難であることが挙

げられる。その根底には自覚症状を発しない、多くの悪性新生物の進行速度が人よりはるかに速いなど、動物特有の要因があると考えられる。また、特に体腔内腫瘍の探索は画像診断（レントゲン検査、超音波検査、Computed Tomography: CT 検査、Magnetic Resonance Imaging: MRI 検査）に頼るところが大きく、それらは必ずしも日常的に行われる簡便な検査法とは言えない。上記の問題点を解消するためには、従来の診断法に加えてより簡便に疾患をスクリーニングする方法が必要であると言える。

人医療では腫瘍性疾患の補助診断として種々の血清学的マーカー、所謂「腫瘍マーカー」が存在し、血液検査による疾患のスクリーニングや治療効果判定、予後予知などに利用されている。現在までに多くの臨床的に有用な腫瘍マーカーが発見され、それらは人々の健康維持増進に多大な貢献を果たすことで今日の日常診療になくてはならない検査法として広く認知されている[3]。一方、獣医療では診療に常用される腫瘍マーカーは存在せず、その発見が切望されている。

そこで、本研究では臨床獣医学分野における腫瘍マーカーを見出すために、犬の血清フェリチンに着目してその臨床応用の可能性を検証することを主な目的とした。尚、腫瘍マーカーという用語の定義には諸説あり、日本分子腫瘍マーカー学会では「がんの早期発見を可能にする、体液中にあるがん細胞が産生する物質」と定義しているが[3]、血清フェリチンの由来については不明な点が多いため、本研究では広義の解釈として「体液中に存在する腫瘍性疾患の探索に有用な物質」とする。

フェリチンは哺乳類細胞に普遍的に存在する分子質量約 450

kDa の細胞内鉄貯蔵蛋白質である。フェリチンは H (Heavy あるいは Heart、分子質量約 21 kDa) と L (Light あるいは Liver、分子質量約 19 kDa) の 2 種類のサブユニットが種々の構成割合で結合した 24 量体の中空構造を成す球体蛋白質であり、その内腔に鉄原子 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) を 3,000~4,500 個含有することができる [4, 5]。遊離鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) はフェントン反応 ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ ) を介して活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) を産生し、細胞の酸化障害を引き起こすことから、フェリチンは鉄が誘導する酸化ストレスから生体を防御する重要な生理的役割を持つ [4]。フェリチンは肝臓、脾臓、骨髄に多く存在するが、血清中にも微量に存在し、そのレベルは生体内貯蔵鉄量との間に正の相関関係が認められることから、人医療では主に生体の鉄栄養状態を把握する指標として広く利用されている [5, 6]。血清フェリチンは鉄過剰状態で高値を示す一方で、人および犬において様々な疾患で高値を示すことが知られている。過去に人では膵臓癌、肺癌、肝細胞腫、神経芽細胞腫、急性白血病、乳癌、リンパ腫で高フェリチン血症が報告され、多くの悪性腫瘍で血清レベルの上昇が起こることが知られている [5]。悪性腫瘍のみならず、血清フェリチン濃度は血球貪食症候群 [7]、成人 Still 病 [8]、全身性エリテマトーデス [9] における上昇も報告されており、種々の炎症に付随して上昇することから炎症マーカーの一つとも考えられている [10]。犬ではリンパ腫、組織球肉腫および免疫介在性溶血性貧血における高フェリチン血症が報告されているが、血清フェリチンの臨床的有用性について十分な検討が行われているとは言えず、その発生機序についても不明な点が多いとされている [11-14]。

以上のことから、本研究は犬の血清フェリチンの臨床応用の可能性を調べることを主な目的とした。本論文は全三章で構成され、第一章では、犬の血清フェリチン濃度測定法を、第二章では臨床例を用いた血清フェリチン濃度の腫瘍マーカーとしての臨床応用の可能性を、第三章では、未だ不明な点が多いとされる高フェリチン血症の発生機序について検証した。

## 第一章

### サンドイッチ ELISA 法を用いた犬の血清フェリチン濃度測定法

#### 序 論

犬の血清フェリチンの定量法に関する報告は過去に 2 報のサンドイッチ ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法が報告されている [15, 16]。両測定系は共に良好な測定精度を示すが、健康犬の血清には抗フェリチン自己抗体が存在すること、フェリチンを構成する H と L の 2 種類のサブユニット構成比が臓器由来のフェリチンと異なることなど、測定値に影響すると考えられる種々の因子が存在する [17]。実際に過去の 2 報で示されている健康犬の血清フェリチン濃度の平均値は 252 ng/ml [15] と 479 ng/ml [16] であり、両者には 2 倍近くの差がある。その理由として渡辺らはフェリチンを構成する H と L の両サブユニット間に免疫学的相違が大きいことを指摘している。つまり、犬の血清フェリチンは人と異なり H サブユニットが優勢であるため標準蛋白質として使用するフェリチンのサブユニット構成比も同様に H 優勢であることが望ましいが、Andrews らは標準蛋白質として L サブユニットが優勢である精製犬肝臓フェリチンを使用した。そのことが両者に大きな差が生じた原因であると考えられ、渡辺らは標準蛋白質として H 優勢である精製犬心臓フェリチンを使用することを提唱している [16]。現在までに犬の血清フェリチン濃度を測定するための ELISA 系において上述の要因を考慮し、且つ同種蛋白質に対する抗体を使用した測定系は存在しないことから、本章ではよ



り信頼性の高い測定系を得るために犬フェリチンに対する抗体を使用した Homologous assay を樹立した。

## 材料および方法

### 1. 試薬、精製蛋白質、抗体

本研究で使用した試薬類は主に和光純薬工業（大阪）あるいは関東化学（東京）より購入し、特級あるいは高純度のものを実験に供した。精製犬心臓および肝臓フェリチン、精製ウサギ抗犬心臓フェリチンポリクローナル抗体および精製ウサギ抗ラット肝臓フェリチンポリクローナル抗体は北里大学獣医学部獣医生化学研究室の厚意により分与されたものを使用した。尚、それらは既報の方法を用いて精製された[16, 17]。また、それぞれの蛋白質濃度は Lowry らの方法に従い、牛血清アルブミンをスタンダードとして決定された[18]。

### 2. 免疫沈降とウェスタンブロッティング

健常ビーグル犬より採取した血清 2 ml に対し、5  $\mu$ g の精製ウサギ抗ラット肝臓フェリチンポリクローナル抗体を加え、過去の報告に従って免疫沈降を行った[17]。次いで、得られたペレット、それぞれ 2  $\mu$ g の精製犬心臓および肝臓フェリチンについて、精製抗犬心臓フェリチンポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った[17]。

### 3. サンドイッチ ELISA 法

精製ウサギ抗イヌ心臓フェリチンポリクローナル抗体を濃度が 400 ng/ml になるようリン酸緩衝液 (PBS) (5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 15 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 150 mM  $\text{NaCl}$ , 0.02 %  $\text{NaN}_3$ , pH 7.2) で希

積し、ELISA 用マイクロタイタープレート (Immuno Plate Maxisorp F96; Nunc, Roskilde, Denmark) に 100  $\mu$ l/well 分注した。続いてプレートをシーリングし、4°Cで一晩放置して抗体をプレートに吸着させた。プレートを PBST (0.05 % Tween20 加 PBS) で 3 回洗浄し、ELISA 緩衝液 (0.1 %ゼラチン, 0.1 % Tween20, 0.02 %NaN<sub>3</sub> 加 PBS, pH 7.2) を 300  $\mu$ l/well で分注し、室温で 60 min 静置してマスキング処理を行った。次いで 80  $\mu$ g/ml 精製犬心臓フェリチンを ELISA 緩衝液で希釈し、フェリチン濃度を 100 ng/ml にしたものを 2 倍階段希釈して、検量線用のフェリチン標準液 (3.125~100 ng/ml) を作成した。プレートを PBST で 1 回洗浄し、ELISA 緩衝液で 100 ng/ml から 3.125 ng/ml までの 6 点で 2 倍階段希釈した精製犬心臓フェリチン標準液および、血清サンプルを ELISA 緩衝液に 0.5 M の硫酸アンモニウムを加えて調整した希釈用緩衝液で適切に希釈したものを 100  $\mu$ l/well ずつ分注し、シールして 37°C、2 hr インキュベートした。尚、希釈用緩衝液は犬の血清に含まれる抗フェリチン自己抗体の結合を減弱させる目的で硫酸アンモニウムを含む溶液を使用した。その後プレートを PBST で 3 回洗浄し、100  $\mu$ g/ml アルカリホスファターゼ (Alkaline Phosphatase: ALP) 標識精製ウサギ抗犬心臓フェリチンポリクローナル抗体を濃度が 200 ng/ml になるように ELISA 緩衝液で希釈し、100  $\mu$ l/well ずつ分注した。プレートをシールして 37°C で 2 hr インキュベートし、標識抗体をフェリチンに反応させた。PBST で 3 回洗浄後、ALP 基質溶液 (3 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 100 mM グリシン, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, pH 10.0) を 200  $\mu$ l/well ずつ分注し、42 min 反応させた。200 mM EDTA (pH 7.5) を 50  $\mu$ l/well ずつ添加し、

発色を停止させた。反応して生成した *p*-ニトロフェノールの波長 405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (iMark; Bio Rad, 東京) にて測定した。尚、標準曲線は 4-パラメーターロジスティックモデルで作成し、得られた測定値を標準曲線に外挿してフェリチン濃度を算出した。上記方法は概ね渡辺らの方法を参考にして行った [16]。

#### 4. 同時再現性試験・添加回収試験・希釈試験

希釈試験は 2 つの異なる血清サンプルを使用し、希釈用緩衝液で 50 から 400 倍希釈したものを測定し、得られた値から回帰直線および決定係数 ( $R^2$ ) を求めることで希釈処理の影響を確かめた。同時再現性試験は 12 の異なる個体から得た血清サンプルを使用し、同日に 3 回 (Intra-assay)、あるいは 4 つの異なるサンプルを別々の測定日で 3 回 (Inter-assay) 測定した。また、添加回収試験は既知の濃度の精製犬心臓フェリチンを血清に添加し、その回収率を算出した。

#### 5. 健常犬

とみざわ動物病院 (仙台市開業) に 2010 年から 2011 年の間に犬糸状虫感染予防目的で来院した犬の中から、獣医師による問診および身体検査で異常を認めなかった犬の中から健常犬を選抜した。また、それらは過去に疾患の既往歴を認めない、採材後、6 ヶ月間に臨床症状を伴う受診歴がないことも選抜条件とした。採血は橈骨皮静脈あるいは外則伏在静脈より 2 ml 行い、得られた血液は室温で 30 min 放置させて凝固させた後に  $1,640 \times g$  で 5 min

遠心分離して得られた血清を分取した。血清は実験に使用するまで-20℃に保存された。

本研究は北里大学獣医学部実験動物倫理委員会の承認を経て行われた。

## 6. 統計学的解析

得られたデータは平均値±標準偏差で示し、群間の比較は Student's - *t* test を用いた。危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) の時に有意差ありとした。

## 結 果

### 1. フェリチンに対する抗体の反応性

使用した抗体と犬の血清フェリチンとの反応性を確かめるため、免疫沈降法で回収した健常犬の血清フェリチンに対してウェスタンブロッティングを行った。抗体はフェリチンの H と L の 2 種類のサブユニットを共に認識し、その構成は心臓フェリチンでは H サブユニットが、肝臓フェリチンでは L サブユニットが優勢であった。また、血清フェリチンについては H サブユニットが優勢であった (図 1)。

### 2. 測定精度の検討

樹立した測定系における標準曲線を図 2 に示した。2 つの異なる血清で検討した希釈試験は共に良好な直線性を示した ( $R^2 > 0.99$ 、図 3)。同時再現性試験は 12 サンプルで検討した日内 (Intra-assay) の変動係数は 0.6~2.2%、4 サンプルで検討した日間 (Inter-assay) の変動係数は 3.2~10.9% であった。また、添加回収試験では血清に添加した精製犬心臓フェリチンの回収率は 96~102% であった (表 1)。

### 3. 健常犬の血清フェリチン濃度と基準値の設定

健常犬 163 頭が選抜され、それらは平均 4 歳齢 (1~16 歳齢)、雄 82 頭、雌 81 頭であった。抽出された頻度が高かった犬種はミニチュア・ダックスフンド (32 頭、19.6%)、雑種 (27 頭、16.6%)、柴犬 (20 頭、12.3%) であった。健常犬の血清フェリチン濃度を

測定した結果、平均値±標準偏差は  $789 \pm 284$  ng/ml（範囲：261～1,889 ng/ml）であり、年齢、性別、体重による差は認められなかった（表 2）。また、得られた値を基に犬の血清フェリチン濃度の基準値を設定し、平均値±2×標準偏差から算出された 221～1,357 ng/ml とした（図 4）。

## 考 察

本研究で樹立した ELISA 測定系は犬の血清フェリチン濃度測定において、希釈試験、同時再現性試験、添加回収試験の全てで高い測定精度を示したことから、十分信頼できる測定系であると考えた。ELISA 法を用いた犬の血清フェリチン濃度測定系は過去に 1992 年に Andrews らと 2000 年に渡辺らによって報告されている。既報にて使用された抗体と標準蛋白質はそれぞれ、Andrews らはマウス抗犬フェリチンモノクローナル抗体と精製犬肝臓フェリチン、渡辺らは精製ウサギ抗ラット肝臓ポリクローナル抗体と精製犬心臓フェリチンを使用している [15, 16]。健常犬の血清フェリチン濃度の平均値は前者が 252 ng/ml ( $n=61$ , 80~800 ng/ml)、後者が 479 ng/ml ( $n=51$ , 298~959 ng/ml) であった。フェリチンの H と L 両サブユニット間には免疫学的相違が大きく、そのため測定値は標準蛋白質として用いるフェリチンのサブユニット構成比の影響を受けると考えられている [16, 19]。また、血清フェリチンの H/L サブユニット構成比については人と犬で大きな相違があり、健常人では L サブユニットが優勢 (H/L 比 = 約 0.1) であるが、健常犬では H サブユニットが優勢 (H/L 比 = 3.46) であると報告されている [16, 20]。従って、標準蛋白質としては H サブユニットが優勢である心臓フェリチンを用いる方がより望ましいと考えられる [16]。そのことを踏まえ、本研究ではより測定精度の高い方法を樹立するために使用する抗体を同種由来のフェリチンに対する抗体を使用し、標準蛋白質を犬心臓フェリチンとした Homologous な測定系を樹立した。



本研究で示された健常犬 163 頭の血清フェリチン濃度の平均値は 789 ng/ml であり、過去の報告よりも高値であった。このことについても前述の通り、使用した抗体の両サブユニットに対する反応性の差によるものであると考えられた。つまり、測定する血清に含まれるフェリチンの H/L サブユニット構成比によって測定値に差が生じることが予想される。その詳細については検討していないが、使用した抗体は H と L 両サブユニットを共に認識したことから、血清フェリチンのサブユニット構成比の変化が極端なものでなければ、その誤差は軽微であると思われた。尚、一部の疾病における血清フェリチンのサブユニット構成比の変動については第 3 章で触れる。

本研究で樹立した測定系を用いて臨床的に健康な犬 163 頭の血清フェリチン濃度を測定したところ、性差、雌雄差、体重差は共に認められず、それらの平均値と標準偏差から基準範囲を 221～1,357 ng/ml と定め、以後の研究に用いた。

## 要 約

本章では犬の血清フェリチン濃度を定量する Homologous な ELISA 測定系を樹立した。使用した精製ウサギ抗犬心臓フェリチンポリクローナル抗体はフェリチンの H と L の両サブユニットを良好に認識し、添加回収試験、希釈試験、同時再現性試験はいずれも好成績を示したことから、犬の血清フェリチン濃度の定量法として信頼できると考えた。樹立された系を用いて臨床的に健康な犬 163 頭の血清フェリチン濃度を測定した結果、それらの平均値 $\pm$ 標準偏差は  $789 \pm 284$  ng/ml (範囲: 261~1,889 ng/ml) であり、性、年齢、体重による明らかな差は認められなかった。従って、健常犬の血清フェリチン濃度の基準範囲を平均値  $\pm 2 \times$  標準偏差で算出した 221~1,357 ng/ml とし、以後の研究に使用した。

## 第二章

### 担癌犬における血清フェリチン濃度とその臨床的有用性

#### 序 論

血清フェリチン濃度は生体内貯蔵鉄量と正の相関を示すことから[21]、人医療では主に鉄欠乏性貧血や鉄過剰症の診断に用いられる。しかし、生体内貯蔵鉄量の増加を伴わない血清フェリチン濃度の上昇が肝炎、心筋梗塞、膵臓癌、肺癌、肝細胞癌、急性白血病、リンパ腫、神経芽細胞腫、種々の炎症性疾患、免疫介在性疾患（全身性エリテマトーデス、関節リウマチ）、血球貪食症候群、成人 Still 病など多くの疾患で報告されており、過去に診断マーカーとしての有用性が検討された[7, 8, 9, 10, 22]。しかし、人では高フェリチン血症を認める疾患は多彩で非特異的であり、一部の著しい高フェリチン血症を認める疾患（血球貪食症候群や成人 Still 病）を除いて疾患特異性は低いと考えられている[10, 23]。

一方、犬の血清フェリチンについて Friedrichs らは、健常犬データから定めた基準上限値を 800 ng/ml とした時、肝疾患 (n=24)、組織球肉腫 (n=18)、免疫介在性溶血性貧血 (IMHA, n=15)、リンパ腫 (n=23) 罹患例においてそれぞれ、79%、89%、94%、65% の症例が基準上限値を超え、中でも組織球肉腫と IMHA は著しい高値を示すと報告している[11]。従って IMHA を除外した場合の高フェリチン血症の存在は、その上昇の程度によっては組織球肉腫の診断マーカーとして有用であると結論づけられている。しかし、犬の高フェリチン血症に関する臨床的な情報は上記 4 疾患に

ついでのみであり、臨床応用の可能性について十分な検討が行われているとは言えない。

そこで、本章では前章で樹立したサンドイッチ ELISA 法を用いて各種疾患罹患犬の血清フェリチン濃度を測定し、その臨床的有用性を検証した。

## 材料および方法

### 1. 臨床例の選抜とサンプルの処理

臨床例は2009年6月から2013年11月までの期間に北里大学獣医学部附属小動物臨床センターに来院し、病理学的あるいは臨床病理学的検査によって確定診断を得た症例から選抜した。リンパ腫の免疫表現型の決定はD-ラボ（北海道）に依頼して遺伝子再構成のクローナリティ検査によって行った。腫瘍組織は診断に供された外科的切除組織、あるいは死後の剖検例から得られた組織を用いた。血清は主に診断時あるいは治療開始前のものを用い、治療経過に伴う変化は同一の症例から経時的に得た血清を使用した。採血は橈骨皮静脈あるいは外則伏在静脈より約3 ml行い、得られた血液は目的に応じて以下の通り処理し、サンプルとした。

#### ・全血球計算（Complete Blood Count: CBC）

エチレンジアミン四酢酸（EDTA）で抗凝固処理し、直ちに自動全血球計算装置（Celltac α MEK-6358；日本光電工業、東京）にてCBCを評価し、Packed Cell Volume: PCV 値（%）を測定した。

#### ・血液生化学検査

ヘパリンで抗凝固処理し、 $1,640\times g$ で5 min遠心分離して血漿を分離した。血漿は自動分析装置（AU400；Beckman Coulter, U.S.A.）にて生化学的分析を行った。

#### ・血清フェリチン濃度

血液は室温で30 min放置して完全に凝固させ、その後 $1,640\times g$ で5 min遠心分離した。得られた血清は前章で示したサ

ンドイッチ ELISA 法にて血清フェリチン濃度を測定した [24]。血清は実験に使用するまで -20℃ に保存された。

尚、採血に際し、事前に飼い主に対する説明を口頭および文書の配布によって行った。本研究は北里大学獣医学部実験動物倫理委員会の承認を経て行われた。

## 2. 腫瘍性疾患に対する治療、および治療効果判定

多中心型リンパ腫に対する治療はビンクリスチン、サイクロホスファミド、ドキソルビシン、プレドニゾンを用いた多剤併用化学療法を初期導入法とし [25]、再発が認められた場合は他の薬剤によるレスキュー療法を行った [26, 27]。治療効果判定は概ね過去の文献を参考にして 1~3 週間毎に行い、病変部の大きさの変化により以下の通り評価し、進行が認められた、あるいは新たな部位に腫瘍病変が確認された時点で再発・再燃と診断した [28]。

### ・完全寛解 (Complete Remission: CR)

計測可能な病変の完全な消失

### ・部分寛解 (Partial Remission: PR)

計測した全病変の長径の計 30% 以上の退縮、且つ新しい病変を認めない

### ・維持 (Stable Disease: SD)

PR と PD の中間

### ・進行 (Progressive Disease: PD)

計測した全病変の長径の計 20% 以上の増大、あるいは新しい病変の出現

また、過去の報告に従って、組織球肉腫に対する治療は、

1-(2-chloroethyl)-3- cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) (Moostine; Naprod Life Sciences, Mumbai, India) を用いた [29]。再発の診断は上述したリンパ腫における判断基準を参考にした。

### 3. 統計学的解析

多中心型リンパ腫罹患例の治療後の生存期間は診断時を 0 日とした時の日数で示し、血清フェリチン濃度を 4,000 ng/ml で分類した時の両者の生存期間はカプラン・メイヤー法およびログランク検定を用いて比較された。また、各群間の比較はウィルコクソンの順位和検定を用いた。それぞれ危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) の時に有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 臨床例

282例の犬が選抜され、それらを診断によって癌腫（61例）、肉腫（51例）、造血器系腫瘍（67例）、その他悪性腫瘍（34例）、良性腫瘍（11例）、炎症性疾患（30例）、免疫介在性疾患（28例）の7種類に分類した。各分類における主な疾患は症例数が多い順に、癌腫では乳腺癌（14例）、扁平上皮癌（10例）、肝細胞癌（7例）、肉腫では軟部組織肉腫（22例）、血管肉腫（20例）、骨肉腫（4例）、造血器系腫瘍ではリンパ腫（56例）、組織球肉腫（8例）、形質細胞腫（2例）、その他悪性腫瘍では肥満細胞腫（27例）と悪性黒色腫（7例）、良性腫瘍では乳腺腫（5例）、線維腫性エプーリス（2例）、炎症性疾患では子宮蓄膿症（7例）、睪炎（5例）、肝炎（4例）、免疫介在性疾患では溶血性貧血（18例）、多発性関節炎（5例）、血小板減少症（5例）がそれぞれ含まれた（表3）。

### 2. 各種疾患罹患犬における血清フェリチン濃度

各疾患群における診断時の血清フェリチン濃度を図5に示した。前章において健常犬から算出した基準上限値 1,357 ng/ml を上回った症例の割合は、癌腫で 60.7%（37例/62例）、肉腫で 68.6%（35例/51例）、造血器系腫瘍で 86.6%（58例/67例）、その他悪性腫瘍で 58.8%（20例/34例）、良性腫瘍では 9.0%（1例/11例）、炎症性疾患で 53.3%（16例/30例）、免疫介在性疾患で 92.6%（25例/27例）であった。



### 3. 疾患別の血清フェリチン濃度

各疾患の血清フェリチン濃度を評価し、高率に高フェリチン血症を認めた疾患を抽出した。基準上限値を超えた疾患の割合が特に高かった疾患は、組織球肉腫（8例/8例）、免疫介在性溶血性貧血（17例/18例）、リンパ腫（48例/56例）、血管肉腫（19例/20例）、免疫介在性多発性関節炎（5例/5例）であり、それぞれ100%、94.4%、85.7%、95.0%、100%であった。

### 4. 脾臓腫瘍を有する犬における血清フェリチン濃度

来院時のレントゲン検査あるいは超音波検査にて脾臓に腫瘍性病変を有し、その後の脾臓摘出手術に伴う病理組織学的検査によって確定診断を得た犬22例について血清フェリチン濃度を評価した（図6）。症例の個別データは表4に示す通りであり、血管肉腫11例、血管腫1例、血腫6例、リンパ腫4例が用いられた。血管肉腫については過去の報告に従って以下の通り臨床ステージを分類した。ステージ1は腫瘍が脾臓に限局しているもの、ステージ2は腫瘍の破裂を伴う、あるいは所属リンパ節への転移が認められるもの、ステージ3は遠隔転移を伴う複数の病変が確認できるものとした[30]。血清フェリチン濃度は血管肉腫全例、血管腫1例、リンパ腫3例が前章で定めた基準上限値を上回った。

### 5. 組織球肉腫および多中心型リンパ腫における治療に伴う血清フェリチン濃度の変化

組織球肉腫および多中心型リンパ腫に罹患した症例における治療経過に伴う血清フェリチン濃度を測定した。症例は治療前か

らの臨床経過を追うことができた例を対象とし、組織球肉腫 4 例、多中心型リンパ腫 7 例が選抜された。

多中心型リンパ腫における治療前の個別データを表 5 に示す。血清フェリチン濃度測定がリンパ腫の病態モニタリングに応用可能かどうかを調べるために、治療開始後の血清フェリチン濃度の推移を経時的に観察した。血清フェリチン濃度は多くの症例で CR あるいは PR 時に減少し、明らかな再燃を認めた後に再び上昇する傾向を示した (図 7)。しかし、CR あるいは PR 時に有意な減少を示した一方で、その後臨床的に再燃を診断した時点で寛解時よりも高値を示さなかった例は 6 例中 4 例存在した (図 8)。

組織球肉腫における治療前の個別データを表 6 に示す。組織球肉腫では 4 症例全てにおいて治療開始前に著しい高フェリチン血症を呈しており、その値は CCNU 投与後に速やかに減少し、併せて臨床症状の明らかな改善が認められた。その後再燃を認めた時点での血清フェリチン濃度は全例で大きく増加し、中には再燃を診断する前から上昇を示した例も存在した (図 9)。

## 6. 犬の多中心型リンパ腫における予後と血清フェリチン濃度の関係

多剤併用化学療法および再発時のレスキュー療法を行った多中心型リンパ腫罹患犬 18 症例において、治療前の血清フェリチン濃度とその後の生存期間の関係を評価した。使用した個体別の情報を表 7 に示した。血清フェリチン濃度を 4,000 ng/ml で分けた時の生存期間をカプラン・メイヤー法で比較したところ、治療前の血清フェリチン濃度が高い群 (n=7) の方が低い群 (n=11)

よりも有意に生存期間が短かった ( $P=0.0016$ 、図 10)。また、それらの生存期間中央値は前者が 34 日、後者が 360 日であった。

## 考 察

本研究において各種疾患罹患犬の血清フェリチン濃度は悪性腫瘍、炎症性疾患、免疫介在性疾患の全疾患群において高率 (>50%) に前章で定めた基準上限値 (1,357ng/ml) を上回った。従って、犬の血清フェリチン濃度は人における報告と同様に疾患特異性が低いため、腫瘍マーカーに期待される特定の疾患の検出法への応用は困難であると考えられた。しかし、緒言でも述べたように獣医療では画像診断による腫瘍性疾患の探索が人医療ほど容易ではないことから、早期診断における血清学的検査法の重要性は高いと言える。加えて現在の臨床獣医学分野では一般に広く利用される腫瘍マーカーは存在しない。本研究で明らかになった血清フェリチンにおける多様な疾患での高い上昇率は、腫瘍性疾患の非特異的マーカーとしての有用性を示唆させるものであった。データは示していないが、臨床症状を伴わない例では早期診断が困難であると考えられる体腔内腫瘍 (肝細胞癌、胆管癌、肺腺癌、血管肉腫、平滑筋肉腫、未分化肉腫) における血清フェリチン濃度を評価したところ、32 例中 27 例 (84.4%) が基準上限値を超えていた。従って、筆者は早期発見が難しい腫瘍に対するスクリーニング検査として血清フェリチンが臨床応用できる可能性があると考えた。

そこで着目したのは犬の脾臓に発生する腫瘍の 51 から 66% 以上を占めるとされる血管肉腫であった [31]。犬の脾臓血管肉腫は悪性度の高い腫瘍性疾患であることが知られ、外科的脾臓摘出と化学療法を併用したとしても、その 1 年生存率は 10% 以下とされ

る[31]。加えてほとんどの例が病態初期に顕著な臨床症状を伴わず、進行例における腫瘍の破裂に起因する症状（虚脱や突然死など）を呈することで発見される[31]。過去の報告では腫瘍の破裂が生じる前に外科的切除が行われた例は破裂後よりも予後が良いとされており、本症の治癒率を改善させるためには疾患の早期発見が重要であると考えられている[30]。現在、本症の探索はレントゲン検査や超音波検査による画像診断に頼っており、それらは臨床症状を伴わない例に対して日常的に行われる簡便な検査であるとは言えない。脾臓腫瘍を有する犬における血清フェリチン濃度を評価したところ、血管肉腫では高率に高フェリチン血症が発現することが分かった。しかし、リンパ腫や一部の良性病変など血管肉腫以外の脾臓腫瘍病変においても高フェリチン血症を呈する例が存在したことから、疾患特異性は低いと思われた。また、腹腔内出血の所見が認められないステージ1の症例においても高フェリチン血症が生じていたことから、血清フェリチン濃度は病態の初期段階から上昇することが示唆された。本研究は少数例による検討であるため、今後症例数を増やした大規模な研究が必要であると考えられた。しかし、本研究で用いたステージ1の血管肉腫罹患犬は別の目的で来院した際に偶発的に腫瘍病変が発見された症例であり、臨床症状を伴わない場合に飼い主が異変に気付くことは極めて困難であると思われる。そのため、初期病変を有する症例の確保は難しく、臨床症状を伴わない例に対する網羅的な測定を行うなど積極的なアプローチが必要になると考えられた。

腫瘍の探索以外に、腫瘍マーカーの役割として期待されるもの

に、病態モニタリングあるいは予後指標が挙げられる。腫瘍の再発や進行の程度を把握するための病態モニタリングについて、獣医療では腫瘍サイズの増減を触診や画像診断（超音波検査、レントゲン検査）で評価する方法が一般的に行われている[32]。人ではさらに断層撮影（CT、MRIなど）を用いた全身的且つより客観的な評価が広く行われているが、伴侶動物ではそれら検査に麻酔処置が必要であり、経済的負担も大きく、検査可能な施設も限られることから容易に実施できる方法とは言えない。加えて人医療では腫瘍マーカーの変化を併せて腫瘍の生物学的な活性度を評価し、腫瘍の再発や進行の程度を総合的に評価することでより精度の高いモニタリングが行われている[3, 33]。腫瘍組織は腫瘍細胞以外の種々の成分を含むことから、腫瘍サイズのみでの評価で病態の進行度を把握することは困難であると考えられる。そこで筆者は腫瘍性疾患の治療に伴う病態モニタリングの指標として血清フェリチンが利用可能かどうかを検討した。対象疾患は高フェリチン血症が高率に生じ、且つ化学療法が治療の第一選択である多中心型リンパ腫と組織球肉腫とした。リンパ腫は犬の造血系腫瘍の約80%を占める発生頻度の高い悪性腫瘍である[34]。リンパ腫は化学療法に対する治療反応性が高く、複数の薬剤を用いた多剤併用化学療法によって65~92%の寛解率を示す[34]。しかし多くの場合で初期治療のおよそ4~9ヶ月後に再燃が生じ、治療抵抗性を示すようになることから、治療効果の改善には再燃時（腫瘍サイズがより小さい時点）の速やかな治療方針の変更が重要であるとされる[35]。そこで、本研究では治療経過に伴う血清フェリチン濃度を継続的に評価できた多中心型リンパ腫7例を用いて

検討を行った。その結果、血清フェリチン濃度は化学療法の治療効果に伴って増減することが示唆され、寛解時に減少し、病態末期に著増する例が多いと考えられた。しかし、臨床的に疾患の再燃を診断した時点では多くの例で血清フェリチン濃度の上昇は認められなかったため、病態モニタリングの指標としての有用性は低いと思われた。一方、組織球肉腫4例の検討では、治療前に著しく高い血清フェリチン濃度はCCNUの投与によって速やかに減少し、病態の進行に伴って再び上昇した。その再上昇は臨床的に再燃を診断した時点、あるいはその前段階で認められたことから、組織球肉腫における血清フェリチン濃度は病態を鋭敏に反映すると考えられ、本症の病態モニタリングの指標として臨床的有用性を有すると思われた。組織球肉腫は極めて予後の悪い疾患として知られ、CCNUを用いた治療の生存期間中央値はおよそ100日と短い[29]。現在は本症に対する治療法が限られるため、病態モニタリングを行うことが直接疾患の予後を改善することにはならない。しかし、将来的に組織球肉腫に対する新規化学療法が開発され、新たな選択肢が増えることで本症における血清フェリチンの臨床的有用性が認知されると思われた。

犬の多中心型リンパ腫における高フェリチン血症の発生については過去にいくつか報告がある[12, 14]。興味深いことに、本研究で化学療法によって治療された多中心型リンパ腫において、治療前の血清フェリチン濃度の高値が短い生命予後と関わる可能性が示され、高フェリチン血症が予後不良因子であることが示唆された。本研究で抽出された症例では治療前の血清フェリチン濃度のバラつきが非常に大きかったことから、血清フェリチン濃度に

影響を及ぼす因子が直接的、あるいは間接的に腫瘍の悪性度に影響する可能性が推察された。その因子について本研究では調べていないが、血清フェリチン濃度が高い群は低い群に比べて PCV 値が低く、貧血を有する例が多いことが分かった（表 7）。過去の報告において貧血（PCV <35%）の存在はリンパ腫における予後不良因子であるとされており [36]、貧血と高フェリチン血症に予後因子としての何らかの共通点があるのかもしれない。次章で詳しく述べるが、腫瘍随伴性の貧血で最も発生頻度が高いとされる慢性疾患に伴う貧血（Anemia of chronic disease: ACD）は、炎症が誘発する生体反応である。フェリチンは炎症に伴って血中レベルが増加する急性相蛋白質の一つであることから [5]、炎症の存在が貧血と高フェリチン血症の発生に関与している可能性が考えられた。それらは今後の重要な検討課題になると思われた。

本章では血清フェリチン濃度測定の臨床応用の可能性について検討した。その結果、脾臓血管肉腫における高フェリチン血症の存在および早期診断の可能性、組織球肉腫における病態との関連性、多中心型リンパ腫における予後因子としての有用性がそれぞれ示された。



## 要 約

病理学的あるいは臨床病理学的に診断した担癌犬 224 例（癌腫：61 例、肉腫：51 例、造血器系腫瘍：67 例、その他悪性腫瘍：34 例、良性腫瘍：11 例）および非腫瘍性疾患罹患犬 58 例（炎症性疾患：30 例、免疫介在性疾患：28 例）における診断時の血清フェリチン濃度を評価し、その臨床応用の可能性を検討した。その結果、多くの疾患で基準上限値を上回ったことから血清フェリチンは特定の腫瘍性疾患に対する診断マーカーとしての有用性は乏しいと考えられた。腫瘍別の検討では脾臓血管肉腫 11 例の全例が前章で示した基準上限値を上回り、本症における高フェリチン血症の存在が明らかとなった。加えて脾臓血管肉腫では少数例ながら腹腔内出血を認めない初期の臨床ステージでも高値を示したことから、早期発見が困難であるとされる本症のスクリーニング検査への応用が期待できると思われた。また、組織球肉腫 4 例について、化学療法による治療経過に伴う血清フェリチン濃度の変化を調べたところ、治療効果に伴って血清レベルの増減が認められ、疾患の再燃を認めた時点あるいはその直前に再び上昇した。従って、犬の組織球肉腫において血清フェリチン濃度は病態の進行を鋭敏に反映すると考えられ、病態モニタリングへの応用が可能であると思われた。また、多中心型リンパ腫 18 例において多剤併用化学療法による治療前の血清フェリチン濃度を 4,000 ng/ml で分けた時、両者にはその後の生存期間に強い有意差 ( $P=0.0016$ ) が認められた。従って治療前の血清フェリチン濃度が予後因子として利用できる可能性が示された。

### 第三章

#### 高フェリチン血症の発生機序に関する考察

##### 序 論

Worwoodらは高フェリチン血症が生じる主な要因として、貯蔵鉄量の増加、フェリチンを高濃度に含有する組織（主に肝臓）の傷害、炎症、腫瘍からの直接的な放出、の4つを挙げている[5]。しかし、過去に多くの関連する研究が行われたにも関わらず、疾患に付随する高フェリチン血症の詳細な発生メカニズムには不明な点が多いとされている。前章で犬の血清フェリチン濃度は様々な疾患で基準値を上回ることが明らかになったが、その発生要因として腫瘍が直接関与するのか、あるいは他の因子によるものなのかを判断する根拠は乏しい。

本章では犬の腫瘍性疾患における血清フェリチン濃度の上昇機序を調べるために前述した4つの要因について考察し、特に炎症が引き起こす鉄代謝の変化に主眼を置いて犬の炎症モデルを用いた検証を行った。フェリチンは炎症によって血清レベルが増加する正の急性相蛋白質の一つであると考えられている[37]。炎症と腫瘍は密接に関係し、腫瘍組織は多くの場合でその周囲に炎症を伴うことから[38]、筆者は前章で高フェリチン血症が多くの疾患群で認められた共通の原因として炎症の関与を疑った。

人医療では以前から感染症や腫瘍性疾患、免疫介在性疾患が血清鉄濃度を減少させ、赤血球新生を抑制して貧血を誘導することが知られていた[39]。その貧血は Anemia of Chronic Disease (ACD)

と呼ばれ、血清鉄濃度の低下や鉄剤による治療に反応しない非再生性貧血として認識されていたが、ACDを誘発する原因物質は長く不明であった。2000年初頭、Kraus、Parkらは肝臓において抗菌活性を持つ25のアミノ酸から成る新規ペプチドを発見しヘプシジン（Hepcidin）と名付けた[40, 41]。その後、Pigeonらはマウスへ鉄を経口投与するとヘプシジン mRNA 量発現量が増加すること、そして同様の変化がリポポリサッカライド（Lipopolysaccharide: LPS）の投与によっても起こることを報告し、ヘプシジンが鉄代謝および炎症と密接に関係することが明らかとなった[42]。生体における鉄代謝は半閉鎖式循環を行っており、老化した赤血球を主に網内系細胞が貪食・分解し、ヘモグロビン由来の鉄を遊離させる。遊離した鉄は細胞膜に存在する細胞唯一の鉄のエクスポーターであるフェロポーチンを介して細胞外に放出され、血清中に存在する鉄輸送蛋白質であるトランスフェリンに結合して再び生体に利用される[43]。ヘプシジンはフェロポーチンの細胞内移行と分解を促進することでACDの発生に重要な役割を果たすことから[44]、筆者はACDの持続が貯蔵鉄量と血清フェリチン濃度の経時的増加を引き起こすと考えた。

筆者の知る限り、過去に炎症モデルを用いた研究において急性炎症による血清フェリチン濃度の変化を調べた報告は存在するものの、炎症の長期化に伴う慢性炎症における変化を評価した報告は存在しない。そこで本章では、健常ビーグル犬を用いてテレピン油（Turpentine oil）誘発炎症を長期化させることでACDモデルを作出し、血清フェリチン濃度の変化を調べた。

## 材料および方法

### 1. 実験犬への慢性炎症誘発処置と採材

臨床的に健康なビーグル犬 5 頭（雄 2 頭、雌 3 頭、1~4 歳齢、平均体重 9.0 kg）は日本クレア（東京）から購入し、実験に供した。犬の背部肩甲骨間皮下に炎症惹起物質としてテレピン油（和光純薬工業）を 0.5 ml/頭、3 日毎に 42 日間（計 15 回）投与した。身体検査は毎日実施し、体温は直腸粘膜温で測定した。麻酔処置は硫酸アトロピン（三菱田辺製薬、大阪）0.025 mg/kg を前投与後、ブトルファノール（Bristol-Myers、東京）0.2 mg/kg とアセプロマジン（Boehringer Ingelheim、東京）0.1 mg/kg で鎮静し、プロポフォール（マイラン製薬、東京）5 mg/kg で麻酔導入後、イソフルラン（大日本住友製薬、大阪）と酸素の吸入によって麻酔を維持した。

テレピン油の投与に併せて実験犬の血液、肝臓組織、骨髄組織を表 8 に示すようなスケジュールで採材した。テレピン油投与前を Day 0、投与後の経過日数を Day 1~Day 56 と表記する。血液は 5 ml を頸静脈から採血後、0.5 ml を EDTA にて抗凝固処理し、残りは 30 min 室温に放置した後に 1,560 ×g で 5 min 遠心し、血清を分離した。肝臓組織は 16 ゲージの Tru-cut 生検針（Super Core; Medical Device Technologies, Florida, U.S.A.）を用いて麻酔下の犬を仰臥位に保定し、超音波ガイド下で血管を避けて肝臓の右葉領域から数回採材した。得られた肝臓は 2 つに分け、一方は湿重量約 0.2 g の組織をおよそ 10 倍量の RNAlater（Life technologies, California, U.S.A.）に浸漬して後述するリアルタイム PCR

(Real-time Polymerase Chain Reaction) に用いるまで $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。もう一方の肝臓組織は湿重量約 0.3 g を渡辺らの方法を用いて 10%ホモジネート液に調製し、使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した [16, 45]。また、骨髄組織は 8 ゲージの Jamsidi 針 (T・Lok; Medical Device Technologies) を麻酔下の犬の上腕骨大結節より骨髄内へ刺入し、採材した。採取した骨髄は 10%ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋切片を作成し、ヘモジデリンを検出するためベルリンブルー染色を行った。

## 2. 臨床例からの採材

高フェリチン血症を呈する症例の血清サンプルは、前章で示した臨床例の中から後述する免疫沈降法に供する血清量が確保できたものを使用した。腫瘍組織は外科的に切除された組織あるいは死後の病理解剖時に得られた組織より、肉眼的に腫瘍と考えられる部位を選択して 0.5 g の組織を切り出した。得られた組織の表面をスライドガラスにスタンプして鏡検し、腫瘍細胞の存在を確認してから前述の方法で 10%ホモジネート液を調製した。

## 3. SDS-PAGE によるフェリチン H/L サブユニット構成比の算出

血清は 2010 から 2013 年に北里大学獣医学部附属動物病院小動物診療センターに来院した飼い主が所有する犬から選抜した。血清フェリチン濃度はサンドイッチ ELISA 法にて測定され、6,000 ng/ml 以上の高フェリチン血症を呈する症例の中から、外科的手術後の病理組織学的検査あるいは臨床病理学的検査によって確定診断されたものを選抜した。採血前に飼い主には研究の目的と

処置、データの取り扱いに関して書面による十分な説明を行い、承諾の意思をサインで確認した。臨床例の血液は約 3 ml、健常犬の血液は約 5 ml を頸静脈から採取後、室温に 30 min 放置した後、 $1,640 \times g$ 、5 min 遠心後、血清を分離し、使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存された。血清フェリチン濃度は第一章で樹立した ELISA 法を用いて測定された。血清フェリチンのサブユニット構成比は概ね渡辺らの方法を参考にし、以下の手順で分離した。フェリチンを 4  $\mu\text{g}$  含むサンプルに対してウサギ抗ラット肝臓フェリチン抗体 6  $\mu\text{g}$  を添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させた [16]。次いで  $10,000 \times g$  で 10 min 遠心し、上清を除去してペレットを PBS 1 ml にて 3 回同条件で遠心洗浄した。その後上清を除去し、ペレットをドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE) にて泳動し、バンドをクマシーブルーで染色した後脱色し、フェリチン H サブユニット (分子質量: 21.1 kDa) と L サブユニット (分子質量: 18.7 kDa) のバンドをそれぞれ画像解析ソフト Image J (National Institute of Health) を用いて数値化することで H/L サブユニット構成比を算出した。

尚、本研究は北里大学獣医学部実験動物倫理委員会の承認を経て行われた。

#### 4. 全血球計算と網状赤血球数の測定

EDTA で抗凝固処理した血液は自動全血球計算装置 Celltac  $\alpha$  MEK-6358 (日本光電) にて CBC を測定し、赤血球数、PCV 値、血中ヘモグロビン濃度、mean corpuscular volume (MCV), mean

corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)を測定した。また、抹消血のニューメチレンブルー染色後に血液塗抹標本を作製し、網状赤血球反応を観察した。Absolute reticulocyte count は赤血球 1,000 個中の凝集型の網状赤血球数を測定し、血液 1  $\mu$ l 中の網状赤血球数を算出した [46]。加えて網状赤血球反応の指標として補正值を以下の式より算出した [47]。

Corrected reticulocyte percent (%)

$$= \text{Observed reticulocyte (\%)} \times \text{PCV (\%)} / 45$$

#### 5. 血清 C 反応性蛋白質 (CRP)、鉄、フェリチン、総鉄結合能 (Total Iron Binding Capacity: TIBC)、生化学検査

血清 CRP 濃度は犬 CRP 測定キット (アローズ、大阪) を用い、免疫比ろう法にて測定した [48]。血清鉄および肝臓非へム鉄含有量は 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonicacid)-1,2,4-triazine (フェロジン; Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.) を用いた比色法を用い、得られた反応液について鉄-フェロジン複合体の波長 562nm におけるモル吸光係数  $\epsilon = 27900$  を用いて算出した [49, 50]。血清フェリチン濃度は第 1 章で樹立したサンドイッチ ELISA 法を用いて測定した。また、TIBC は SRL (東京) に依頼し、2-nitroso-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino) phenol (nitroso-PSAP) 法を用いて測定された。血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (Alanine Aminotransferase: ALT) 活性およびアルブミン濃度は自動生化学分析装置 (AU400) を用いて測定した。

#### 6. 総リボ核酸 (Total RNA) 抽出と相補的デオキシリボ核酸

### (complementary DNA : cDNA) 合成

肝臓組織は 5 mm 角に切りだされ、氷冷下にて Trizol Reagent (Life technologies) を 1 ml 加えられた。その後組織はホモジナイズされ、手順書に従って Total RNA が抽出された。抽出された RNA は吸光度法によって純度が確認され、Primescript II cDNA 合成キット (TAKARA、滋賀) を用いて手順書に従って逆転写され、一本鎖 cDNA が合成された。

### 7. リアルタイム PCR 法

犬のヘプシジン mRNA の定量解析には内在性コントロールとしてグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) を使用し、プライマーは過去の報告を参考にした [51]。ヘプシジンの解析に使用したプライマーは Fry らが報告した犬のヘプシジン cDNA 配列を参考にしてプライマー設計ソフト Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) を用いてデザインされ、GAPDH は過去の報告に従った [52]。使用したプライマーのシーケンスは下記の通りである。

[ヘプシジン] product size: 147 base pair

Forward プライマー : 5' CCAGACAGGACAGCTCACAG3'

Reverse プライマー : 5' GGTGTTTTACAGCAGCCACA3'

[GAPDH] product size: 100 base pair

Forward プライマー : 5' TGTCCCCACCCCAATGTATC3'

Reverse プライマー : 5' CTCCGATGCCTGCTTCACTACCTT3'

手順書に従って 96 穴プレートに 200 nM ずつの Forward and



Reverse プライマー、Power SYBR Green Master mix (Life technologies)、希釈した cDNA 溶液を加えた。サンプルの処理は Step One Plus (Life technologies) を使用し、95°C 10 min の後、95°C 15 秒と 60°C 1 min を 40 回繰り返した。全てのサンプルは 3 回独立した手技で行われ、反応後は解離曲線によってシングルピークが形成されることを確認した。検量線はサンプル cDNA を 5 倍階段希釈することで作成し、得られたヘプシジン mRNA 発現量は GAPDH で標準化され、Day 0 を基準とした時の変化を評価した。

#### 8. 統計学的解析

慢性炎症に関する実験では、値は平均値±標準偏差で示し、レピン油投与前 (Day 0) との差を繰り返しのある多重検定 (ANOVA) および Dunnett 検定で比較した。ALT 活性と血清フェリチン濃度の相関関係は Pearson's correlation test を用いて検定した。危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) の時に有意差ありと判定した。

## 結 果

### 1. 高フェリチン血症と血清 ALT 活性の関係

高率に高フェリチン血症を呈する疾患と考えられる脾臓血管肉腫、リンパ腫、組織球肉腫罹患犬における診断時の血清フェリチン濃度と同一サンプルの血清 ALT 活性を比較検討した。脾臓血管肉腫 11 例、リンパ腫 53 例、組織球肉腫 8 例における血清フェリチン濃度と血清 ALT 活性の間に有意な相関関係は全ての疾患で認められなかった (図 11)。

### 2. 健常犬および高フェリチン血症を呈する犬における血清フェリチン H/L サブユニット構成比

5 頭の健常犬から得た血清フェリチン H/L サブユニット構成比の平均値±標準偏差は  $2.17 \pm 0.16$  であった (図 12)。高フェリチン血症を呈した担癌犬のうち、血清フェリチン H/L サブユニット構成比を評価できたのは組織球肉腫 8 例、リンパ腫 11 例、脾臓血管肉腫 4 例であった。それぞれのフェリチン H/L サブユニット構成比は  $1.38 \pm 0.27$ 、 $1.69 \pm 0.40$ 、 $2.70 \pm 1.32$  であった (表 9)。

### 3. 腫瘍組織における組織フェリチン H/L サブユニット構成比

外科的切除あるいは死後の剖検例から採材した腫瘍組織におけるフェリチン H/L サブユニット構成比を評価した。症例はリンパ腫 3 例、血管肉腫 2 例、組織球肉腫 1 例であり、詳細を表 10 に示した。

#### 4. 血清 CRP、アルブミン、CBC の変化

局所投与したテレピン油が炎症を持続的に誘発したかどうかを調べるために血清 CRP 濃度を測定した。血中 CRP 濃度は Day 1 から上昇し、基準上限値とされる 1.0 mg/dl を投与期間中常時上回った (図 13)。また、血清アルブミン濃度はテレピン油投与後から減少し、Day 7~Day 42 までの期間で投与前と比較して有意に減少した (図 14)。CBC の変化は表 11 に示す通り、テレピン油投与期間中は PCV 値の有意な減少と MCV と MCHC の低下を認め、網状赤血球数およびその補正值には大きな変化は見られなかった。また、テレピン油投与終了 14 日後に当たる Day 56 では PCV の上昇と網状赤血球数の増加が認められた。

#### 5. 血清鉄濃度、TIBC、血清フェリチン濃度の変化

持続する炎症に伴う血清学的な鉄関連パラメーターの変化を調べるために血清鉄濃度、TIBC、血清フェリチン濃度を測定した。血清鉄はテレピン油初回投与後、一過性に急激な減少を示した後上昇し、その後経時的な減少傾向を認め、Day 14~Day 42 まで Day 0 ( $1.31 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ ) と比較して有意に低値を示した (図 15)。TIBC は Day 0 ( $392 \pm 37.5 \mu\text{g/dl}$ ) と比較して Day 2 以降全期間を通して有意に低値であった (図 16)。血清フェリチン濃度は Day 0 ( $569 \pm 102 \text{ ng/ml}$ ) と比較して Day 7~Day 21 で有意な高値を示し、その後低下傾向を示した (図 17)。

#### 6. 生体内貯蔵鉄量の変化

生体内貯蔵鉄量を評価するため、肝臓非ヘム鉄含有量の測定お

よび骨髄の鉄染色を行った。それらは共に生体内貯蔵鉄量を反映する有用な指標として報告されている[46, 53]。肝臓鉄濃度は Day 0 ( $246 \pm 30.2 \mu\text{g/g}$ ) と比較して Day 14~Day 28 において有意な上昇を示した後に徐々に低下し、Day 56 には投与前のレベルに戻った (図 18)。また、採取された骨髄組織についてベルリンブルー染色を行い、組織中に存在する血鉄素 (ヘモジデリン) を選択的に青染したところ、Day 42 の骨髄組織は Day 0 と比較して青染する細胞の明らかな増加が認められた (図 19)。

#### 7. 肝臓ヘプシジン mRNA 発現量

リアルタイム PCR 法で評価した肝臓におけるヘプシジン mRNA 発現量は GAPDH で標準化され、Day 0 との差を比較した。ヘプシジン mRNA 発現量は Day 1 で約 15 倍増加した後、実験後期になると徐々に投与前のレベルに低下した (図 20)。

## 考 察

腫瘍性疾患における高フェリチン血症の発生に関する詳細なメカニズムはよく分かっておらず、Worwoodらはその要因として肝傷害、鉄過剰症、炎症、腫瘍組織からの直接的な放出の4つを挙げている[5]。本研究では肝傷害の影響を調べるため、最初に臨床例を用いて前章で示された高フェリチン血症を高率に生じると考えられる疾患（リンパ腫、血管肉腫、組織球肉腫）における血清フェリチン濃度と肝細胞傷害の指標として広く利用されている血清ALT活性の関係を評価した[54]。その結果、上記3つの疾患全てで血清フェリチン濃度と血清ALT活性の間に相関関係は認められなかった。生体内でフェリチンは肝臓、脾臓、骨髄に多く存在することが知られており[5]、それら臓器の障害は細胞内フェリチンの放出を引き起こし、血清レベルの増加に関わると推察される。また、本研究では病理組織学的検査によって肝炎と診断され、血清ALT活性の増加(>300 U/l)を認めた犬4例について血清フェリチン濃度を測定したところ、それぞれ、12,524、3,036、1,372、1,326 ng/mlであり、基準上限値を大きく超えた例は半数の2例であった。少数例の検討であるため詳細は不明であるが、血清ALT活性の高値を認め、且つ病理学的に肝炎と診断された例においても、必ずしも著しい高フェリチン血症が生じるわけではないことが示唆された。Friedrichらは様々な肝細胞傷害を伴う例における血清フェリチン濃度を評価し、79% (19例/24例)が高フェリチン血症を呈したことを報告しているが、それらは腫瘍性疾患による肝障害も含まれる[11]。従って、肝細胞傷害と高フェ

リチン血症の直接的な関係については不明な点はあるが、少なくとも犬の腫瘍性疾患における高フェリチン血症の主な発現要因は肝細胞傷害ではないと考えられた。

次に、腫瘍からのフェリチンの直接的な放出について調べるため、フェリチンの H と L の 2 つのサブユニットの構成比に着目した。フェリチンは H と L の両サブユニットが 24 量体を形成し、その構成比は臓器の鉄要求量によって異なることが知られている [4]。腫瘍の崩壊によって組織内フェリチンが血中に放出され、それが引き金となって高フェリチン血症が生じるならば、血清フェリチンのサブユニット構成比は腫瘍組織内フェリチンの比に近づくと考えられた。そこで、免疫沈降法と SDS-PAGE、画像解析ソフトを用いて血清および腫瘍組織内フェリチンの H/L サブユニット構成比を評価した。腫瘍組織ではリンパ腫 (n=3) が 0.23 ~ 1.36、血管肉腫 (n=2) が 0.24 と 0.43、組織球肉腫が 3.48 (リンパ節病変) および 1.37 (肺病変) であり、表 9 に示したそれら疾患における血清フェリチンサブユニット比と異なるものが多かった。サンプル数が少ないこと、同一個体での評価ができていないこと、腫瘍細胞を均一に採材することが困難であることなどの要因から十分な検討は行えていないが、リンパ腫と血管肉腫においては多くの腫瘍組織由来の H/L サブユニット比が低値 (L 優勢) であったことから、腫瘍組織のフェリチンの放出が高フェリチン血症の主因ではないことが示唆された。一方、組織球肉腫において腫瘍の部位によって組織内フェリチンのサブユニット構成比が異なったことは興味深く、この症例は肺を原発とする組織球肉腫と診断された例であった。つまり、肺病変は原発巣であり

最も腫瘍組織の体積が大きく、リンパ節は転移巣であったと思われた。組織球肉腫の血清フェリチンサブユニット構成比が原発巣由来の組織に類似したことから、血清フェリチンが主病巣の細胞内フェリチンを反映して増加する可能性が考えられた。この点については今後症例数を増やした詳細な検討が必要であると思われた。

生体内貯蔵鉄量の推定は血清フェリチン濃度の測定の他に、肝臓鉄濃度の測定が最も信頼性の高い方法であると考えられているが[53]、生体に侵襲を伴う処置を必要とするため、臨床例での実施は困難であった。従って本研究では高フェリチン血症を呈した症例における生体内貯蔵鉄量は評価できていない。生体における鉄過剰や鉄の分布異常（例えば腫瘍組織への鉄の沈着）などの存在は高フェリチン血症の発生に関与する可能性があると考えられ、今後の検討課題であると思われた。

前章で示したように、犬の血清フェリチンは腫瘍性疾患に限らず多くの疾患で増加すると考えられた。その機序については前述した種々の要因が挙げられたが、肝細胞傷害および腫瘍からの放出は主な要因ではないと考えられた。筆者は血清フェリチンが炎症に伴って血中濃度が増加する正の急性相蛋白質であること[5]、および炎症は鉄代謝抑制蛋白質であるヘプシジンの発現を亢進させて慢性炎症に伴う貧血（ACD）および生体内貯蔵鉄量の増加を誘発することから[55]、腫瘍性疾患に伴う炎症の存在が高フェリチン血症の発生に関与しているのではないかと考えた。現在、多くの実験的 ACD モデルが作出され、炎症に伴う鉄代謝の変化について盛んに研究が行われている[56]。しかし、多くの研究は急

性期の炎症を対象としたものであり、慢性炎症に伴う血清フェリチン濃度の変化を調べた報告は筆者の知る限り存在しない。そこで筆者は催炎症物質としてテレピン油を使用して炎症の長期化が ACD に伴う貯蔵鉄量の持続的増加を引き起こし、高フェリチン血症を誘発すると考え、犬に実験的局所炎症を慢性化させた時の生体内鉄量および血清フェリチン濃度の変化を調べた。

テレピン油によって生じる局所炎症は注射部位における組織傷害に起因し、炎症時に正の急性相蛋白質、例えば CRP、フィブリノゲン、ハプトグロビン、セルロプラスミンの血中濃度を増加させ、逆に負の急性相蛋白質であるアルブミンやトランスフェリンの血中濃度を低下させる [57]。また、その催炎症作用は投与後 24～48 hr でピークに達し、数日間持続する [56, 57]。

本研究において犬にテレピン油を定期的に皮下投与したところ、持続的な血清 CRP 濃度の上昇および血清アルブミン、TIBC（血中のトランスフェリン濃度を反映する）の減少が認められたことから、それらの変化は炎症の持続を示すと考えられた。CBC および網状赤血球の評価より、テレピン油投与中は骨髓の再生所見に乏しい正～低球性および正～低色素性貧血が認められ、それらの変化は ACD の所見と一致した [58]。加えてテレピン油投与によって血清鉄濃度の減少と肝臓非ヘム鉄含有量の一過性の増加が認められ、それら変化は犬に催炎症物質である Freund's complete adjuvant を投与した時の変化と類似する [59]。また、再生所見に乏しい貧血の主な原因について、骨髓疾患や腎不全、鉄欠乏、ACD などが挙げられるが、本研究では骨髓疾患および腎不全を示す異常所見は認められず、加えて TIBC の減少および血清



フェリチンの増加から鉄欠乏性貧血は除外されると考えた[58]。他の原因としてビタミン B<sub>12</sub> あるいは葉酸欠乏症が挙げられるが、典型的な所見である大球性貧血が認められなかったことから両欠乏症は考えにくい[58]。従って、本研究で認められた貧血はテレピン油によって惹起された炎症に起因する ACD であると考えた。

初回のテレピン油投与直後に血清鉄濃度は著減し、肝臓ヘプシジン遺伝子発現量は増加した。これら迅速な変化は、マウスにおいてテレピン油投与 16 hr 後に血清鉄濃度が減少した、あるいは人においてリポポリサッカライド (LPS) 投与 22 hr 後にヘプシジン遺伝子発現量が増加したという過去の報告と類似する[60, 61]。また、ヘプシジンの発現はテレピン油投与 6 hr 後に起こることも示されており[62]、犬においても炎症に伴って起こる迅速な生体反応が備わっていると考えられた。ヘプシジンは炎症や鉄過剰に反応して肝臓から分泌されるペプチドホルモンである。ヘプシジンは腸管上皮細胞、マクロファージ、肝細胞に多く発現し、細胞表面に存在する唯一の鉄エクスポーターであるフェロポーチンの細胞内移行を促進し、血清鉄濃度を減少させると報告されている[42, 63]。生体内鉄代謝は主に生体内における老化した赤血球が網内系細胞に貪食・分解されることでヘモグロビンから鉄が遊離し、遊離した鉄がフェロポーチンを介して血中に放出され、再度赤血球合成に利用される半閉鎖的なリサイクル機構で成立している[64]。従って、ヘプシジンによるフェロポーチン機能の抑制は容易に血清鉄濃度の減少および骨髄で造血に利用される鉄の供給を阻害し、貧血を引き起こす[65]。

興味深いことに、本研究の初期には過去の報告と類似する鉄代謝の変化が観察されたが、後半は血清 CRP の高値や TIBC、血清アルブミンの低値といった炎症の持続を示す変化が認められたにも関わらず、ヘプシジン mRNA 発現量および肝臓鉄量、血清フェリチン濃度は投与前のレベルに近づいた。この変化はマウスの慢性炎症モデルにおいて肝臓ヘプシジン mRNA 発現量が初期に増加し、その後低下した、あるいはヌードマウスへヒト悪性黒色腫細胞株を異種移植した ACD モデルにおいて初期のみヘプシジン mRNA 発現量が増加したという過去の報告と一致する [66, 67]。従って炎症が長期に及ぶ場合、生体は貧血を重度にしないためのヘプシジン発現の調整機構を持っていると考えられた。そのことは犬の ACD における貧血の PCV が 20%以下であるとされていることから推察できる [58]。ヘプシジン発現は LPS やインターロイキン-6 (IL-6) によって促進され、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ ) によって減少する [61]。また、単球において抗炎症性サイトカインである IL-10 は IL-6 の発現を調整すると報告されている [68]。従って、本研究で観察されたヘプシジン遺伝子発現量の変化は慢性炎症に伴う種々のサイトカインレベルの変化に起因するのかもしれないが、その点については検討していない。他の要因として赤血球産生を促進する蛋白質であるエリスロポエチンの関与が考えられた。正常マウスにエリスロポエチンを投与すると、肝臓ヘプシジン mRNA 発現量が低下することが知られている [66]。本研究でエリスロポエチンについては検討していないが、エリスロポエチンが造血に及ぼす影響は赤血球新生の機能が正常時に限られ [69]、また、人の ACD では血清エリスロポエ

チン濃度は上昇しないことが報告されていることから[70]、本研究においてエリスロポエチンは病態形成に大きく関与しなかったと考えた。

鉄欠乏は犬において著しく肝臓へプシジン mRNA 発現量を低下させることが知られており[71]、本研究において実験後期に肝臓非ヘム鉄含有量および肝臓へプシジン遺伝子発現量が低下した要因として考えられた。しかし、Day 42 に骨髄鉄染色像は明らかに鉄染色陽性細胞が増加していたことから、明らかな鉄欠乏があったとは考えにくい。骨髄鉄量は肝臓鉄量と並んで生体内貯蔵鉄量を示す有用な指標の一つであり、犬の ACD において増加することが示されている[59]。興味深いことに、実験後期における肝臓の鉄量およびへプシジン遺伝子発現量と、骨髄鉄染色像の変化は一致しなかった。そのことから骨髄における鉄沈着にはへプシジン以外の要因も関与する可能性が考えられた。慢性炎症では骨髄におけるマクロファージの鉄取り込みの一部を細胞表面に発現する二価金属トランスポーター (Divalent Metal Transporter 1: DMT-1) が仲介するとされている[72]。また、インターフェロン- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  は DMT-1 発現を亢進し、活性化マクロファージにおける鉄の取り込みを促進することが報告され、それら炎症性サイトカインはフェロポーチン発現を抑制することでマクロファージへの鉄沈着を起こすと考えられる[68]。従って、本研究で鉄の分布に差が生じた要因は、炎症性サイトカインおよびへプシジンの相互作用であるかもしれない。

血清フェリチン濃度は実験初期に増加し、後期に正常レベルに低下した。その変化は肝臓における非ヘム鉄含有量とへプシジン

遺伝子発現量と類似しており、生体内貯蔵鉄量を反映していると考えられた。従って、テレピン油による局所的慢性炎症は持続的な ACD を誘発したが、生体内貯蔵鉄量の増加及び高フェリチン血症は認められなかった。結論として臨床例で認められた高フェリチン血症の要因として慢性炎症は強く関与しないことが示唆された。しかし、本研究はテレピン油による実験的催炎処置であるため、臨床例における病態を再現しているとは言えない。ACD は炎症性サイトカインやヘプシジンによる複雑なメカニズムで生じる病態であると考えられるため、このことについては他の ACD モデルを用いた多角的な解析が必要であると考えられた。

犬の腫瘍性疾患における高フェリチン血症は単一の要因で発生するものではなく、種々の要因が複合的に作用して生じる病態であると考えられる。また、他にも網内系細胞へ鉄が大量に流入する病態として IMHA や血球貪食症候群に代表される赤血球貪食の亢進状態において、著しい高フェリチン血症が認められる [11, 73]。犬で血球貪食の亢進が疾患に付随して発生することが示唆されており [74]、このことは高フェリチン血症の発生要因の一つとして挙げられる。更に、フェリチンは人の肺癌細胞株における細胞増殖を鉄非依存的に促進することが報告されており、高フェリチン血症が腫瘍の病態形成に関与する可能性が指摘されている [75]。今後犬の血清フェリチン濃度測定の臨床的有用性を確立するためにはその上昇機序の解明が重要であり、病態への関与を含めて更なる研究が必要であると思われた。

## 要 約

本章では犬の高フェリチン血症の発生機序について検討した。前章で高フェリチン血症を高率に認めたリンパ腫 (n=53)、脾臓血管肉腫 (n=11)、組織球肉腫 (n=8) それぞれの血清フェリチン濃度と血清 ALT 活性の関連性を調べたところ、すべての疾患で相関関係は認められなかった。従って肝細胞傷害は高フェリチン血症の主な要因ではないと考えられた。また、少数例ながら血清と組織のフェリチン H/L サブユニット比を比較したところ、両者に明らかな共通性は認められなかったことから、腫瘍細胞由来のフェリチンの放出が高フェリチン血症の主因ではないことが示唆された。他の要因として本章では、慢性炎症に伴う長期的な鉄代謝異常が高フェリチン血症に関与するかどうか、実験的検証を行った。健常ビーグル犬 5 頭を用い、局所的催炎症物質であるテレピン油を 3 日毎に 0.5cc ずつ計 15 回背部皮下投与することで持続的な局所炎症を誘発し、血フェリチン濃度の変化を経時的に調べた。その結果、血清フェリチン濃度はテレピン油投与初期に一過性に上昇した後に投与前のレベルまで減少し、その変化は生体内貯蔵鉄量の変化と一致した。従って、局所的な慢性炎症は持続的な高フェリチン血症を誘発しないと考えられた。以上の事から、犬の腫瘍性疾患における高フェリチン血症は種々の要因が複雑に関連して生じることが示唆された。

## 総 括

本論文は犬の血清フェリチンの腫瘍マーカーとしての臨床応用の可能性を調べることを主たる目的として行われた。その成果を以下に列挙する。

- ① 犬の血清フェリチン濃度を高精度に定量するサンドイッチ ELISA 法を樹立した。
- ② 脾臓血管肉腫における高フェリチン血症の存在が明らかになった。
- ③ 組織球肉腫における病態モニタリングの指標として、血清フェリチンが利用できる可能性が示された。
- ④ 治療前の著しい高フェリチン血症の存在が多中心型リンパ腫における予後不良因子である可能性が示された。
- ⑤ テレピン油による局所的慢性炎症は高フェリチン血症を誘発しないことが明らかになった。

本研究によって獣医学臨床分野に対して新しい腫瘍マーカーの可能性を提唱することができたと考える。血清フェリチンは疾患特異性が極めて低いため、本来の腫瘍マーカーの第一義的な意義である特定の疾患に対する診断マーカーとしての有用性は乏しいと考えられた。しかし、本研究で示されたデータより、いくつかの疾患に対する早期診断目的のスクリーニング検査、病態モニタリング、予後因子としての臨床的有用性を持つと思われた。また、不明な点が多いとされている腫瘍性疾患に付随する高フェリチン血症の主な発生要因として過去に報告されているいくつかの要因について検討した。血清フェリチンの臨床的有用性を確

立するためには高フェリチン血症の発生機序の解明が重要であると考えられるが、本研究では明確な証拠を示すには至らなかった。しかし、実験的に誘発した犬の局所的慢性炎症において高フェリチン血症が認められなかったことから、腫瘍性疾患に付随する炎症が血清フェリチン濃度の異常高値を引き起こす主因ではないと考えられた。本研究の成果は高フェリチン血症発生機序の解明に有益な情報を提供すると考える。

## 謝 辞

本論文は筆者が北里大学獣医学部助教としての任期中に、その研究成果をまとめたものであり、関係する多くの方々のご支援をいただきました。

本学小動物第1内科学研究室樋口誠一教授には終始寛大な御指導を賜り、ここに深謝いたします。本学獣医生化学研究室内の渡辺清隆教授、折野宏一准教授、吉川泰永講師には精製抗体や蛋白質の分与、リアルタイムPCRの手技など、多大な援助を頂きました。本学獣医寄生虫学研究室の筏井宏実准教授、公衆衛生学研究室の柏本孝茂准教授、人獣共通感染症学研究室の岡村雅史准教授、獣医病理学研究室の畑井仁助教には本研究に対する貴重な助言を頂きました。本学小動物内科学研究室内の諸先生方ならびに学生諸君には日頃より寛大なご支援を頂きました。また、血清サンプルの採材には日々の多忙な業務にも関わらず、日本動物医療センター（東京都）の渡辺慶一郎獣医師、富田夏子獣医師、ごとう動物病院（青森県）の後藤晃伸獣医師に協力をいただきました。本研究に関わった全ての方々に対し、心より御礼申し上げます。また、筆者の日常を支え、研究に対する意欲と活力を与えてくれた妻子に感謝します。

最後に、本研究の構想段階から尽力された故小林秀樹先生に敬意を表し、これを捧げます。



## 参考文献

1. 須田沖夫 2011. 家庭動物（犬猫）の高齢化対策－飼育者にその死をどう受け入れさせるか－ 日獣会誌 64: 22-26.
2. Withrow, S. J. 2007. Why worry about cancer in pets? pp. XV-XVII. *In: Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed. (Withrow, S. J. and Vail, D. M. eds.) Saunders, Philadelphia.
3. 石井勝 腫瘍マーカーハンドブック改訂版 2009 医薬ジャーナル社
4. Harrison, P. M. and Arosio, P. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochem. Biophys. Acta.* **1275**: 161-203.
5. Worwood, M. 1990. Ferritin. *Blood Rev.* **4**: 259-269.
6. Orino, K. and Watanabe, K. 2007. Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin. *Vet. J.* **178**: 191-201.
7. Esumi, N., Ikushima, S., Hibi, S., Todo, S. and Imashuku S. 1988. High serum ferritin level as a marker of malignant histiocytosis and virus-associated hemophagocytic syndrome. *Cancer* **61**: 2071-2076.
8. Ota, T., Higashi, S., Masuda, M., Tanaka, Y., Saito, K., Eto, S. and Suzuki, H. 1990. Serum ferritin as a useful test for diagnosis of adult Still's disease. *Jp. J. Rheumatol.* **2**: 119-125.
9. Lim, M. K., Lee, C. K., Ju, Y. S., Cho, Y. S., Lee, M. S., Yoo, B.

- and Moon, H. B. 2001. Serum ferritin as a serological marker of activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* **20**: 89-93.
10. 大田俊行 2000. 高フェリチン血症と疾患. 産業医科大学雑誌 **22**: 189-200.
11. Friedrichs, K. R., Thomas, C., Piler, M., Andrews, G. A., Chavey, P. S. and Young, K. M. 2010. Evaluation of serum ferritin as a marker for canine histiocytic sarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **24**: 904-911.
12. Kazmierski, K. J., Ogilvie, G. K., Fettman, M. J., Lana, S. E., Walton, J. A., Hansen, R. A. Richardson, K. L., Harmar, D. W., Bedwell, C. L., Andrews, G. and Chavey, S. 2001. Serum zinc, chromium, and iron concentrations in dogs with lymphoma and osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **15**: 585-588.
13. Newlands, C. E., Houston, D. M. and Vasconcelos D. Y. 1994. Hyperferritinemia associated with malignant histiocytosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **205**: 894-851.
14. 近澤征史朗, 小林秀樹, 堀泰智, 星史雄, 金井一享, 伊藤直之, 佐藤淳, 山本祥大, 立花麻子, 春原留美, 打出毅, 折野宏一, 渡辺清隆, 樋口誠一 2010. 犬の多中心型リンパ腫における血清フェリチン濃度の変動. 動物臨床医学. **19**: 71-77.
15. Andrews, G. A., Smith, J. E., Gray, M. and Chavey, P. S. 1992. An improved ferritin assay for canine sera. *Vet. Clin. Pathol.* **21**: 57-60.

16. Watanabe, K., Muranishi, N., Murata, Y., Orino, K., Okano, S. and Yamamoto, S. 2000. Biochemical properties of canine serum ferritin: iron content and nonbinding to concanavalin A. *BioMetals* **13**: 319-324.
17. Watanabe, K., Hayashi, K., Miyamoto, T., Tanaka, M., Okano, S. and Yamamoto, S. 2000. Characterization of ferritin and ferritin-binding proteins in canine serum. *BioMetals* **13**: 57-63.
18. Lowry, O. H. Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
19. Luzzago, A., Arosio, P., Lacobello, C., Ruggeri, G., Cappucci, L., Brocchi, E., De Shimone, F., Gamba, D., Gabri, E. and Levi, S. 1986. Immunochemical characterization of human liver and heart ferritins with monoclonal antibodies. *Biochem. Biophys. Acta* **872**: 61-71.
20. 高橋健二 1994. 諸疾患における血清フェリチン H, L サブユニット測定の臨床的意義 - ELISA 法による検討 - 北海道医誌. **69**: 1010-1023.
21. Jacobs, A. and Worwood, M. 1975. Ferritin in serum: Clinical and biochemical implications. *N. Engl. J. Med.* **292**: 951-956.
22. Wan, W., Knovich, M. A., Coffman, L. G., Torti, F. M. and Torti, S. V. 2010. Serum ferritin: past, present and future. *Biochem. Biophys. Acta.* **1800**: 760-769.
23. Lee, M. H. and Means, Jr. R. T. 1995. Extremely elevated

- serum ferritin levels in a university hospital: associated diseases and clinical significance. *Am. J. Med.* **98**: 566-571.
24. Chikazawa, S., Hori, Y., Hoshi, F., Kanai, K., Ito, N., Sato J., Orino, K., Watanabe, K. and Higuchi, S. 2013. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect and measure serum levels of canine ferritin. *J. Vet. Med. Sci.* **75**: 515-517.
25. Garrett, L.D., Thamm, D.H., Chun, R., Dudley, R. and Vail, D.M. 2002. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* **16**: 704-709.
26. Alvarez, F. J., Kissberth, W. C., Gallant, S. L. and Couto, C. G. 2006. Dexamethasone, melphalan, actinomycin D, cytosine arabinoside (DMAC) protocol for dogs with relapsed lymphoma. **20**: 1178-1183.
27. Saba, C. F., Hafeman, S. D., Vail, D. M. and Thamm, D. H. 2009. Combination chemotherapy with continuous L-asparaginase, lomustine, and predonisone for relapse canine lymphoma. **23**: 1058-1063.
28. Chun. R., Garrett, L. D. and Vail, D. M. 2007. Cancer Chemotherapy. pp. 163-192. *In*: Small Animal Clinical Oncology, 4th ed. (Withrow, S. J. and Vail, D. M. eds.) Saunders, Philadelphia.
29. Skorupski, K. A., Clifford, C. A., Paoloni, M. C., Lara-Garcia, A., Barber, L., Kent, M. S., LeBlanc, A. K., Sabhlok, A.,

- Mauldin, E. A., Shofer, F. S., Couto, C. G. and Sørenmo, K. U. 2007. CCNU for the treatment of dogs with histiocytic sarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **21**: 121-126.
30. Sorenmo, K., Duda, L., Barber, L., Cronin, K., Sammarco, C., Usborne A., Goldschmidt, M., Schofer, F. 2000. Canine hemangiosarcoma treated with standard chemotherapy and minocycline. *J Vet Intern Med* **14**: 395-398.
31. Thamm, D. H. 2007. Hemangiosarcoma. pp. 785-795. *In*: Small Animal Clinical Oncology, 4th ed. (Withrow, S. J. and Vail, D. M. eds.) Saunders, Philadelphia.
32. Forrest, L. J. 2007. Diagnostic Imaging in Oncology. pp. 97-111. *In*: Small Animal Clinical Oncology, 4th ed. (Withrow, S. J. and Vail, D. M. eds.) Saunders, Philadelphia.
33. Perkins, G. L., Slater, E. D., Sanders, G. K. and Prichard, J. G. 2003. Serum tumor markers. *Am. Fam. Phisician.* **68**: 1075-1082.
34. Vail, D. M. and Young, K. M. 2007. Hematopoietic tumors. Section A: Canine lymphoma and lymphoid leukemia. pp. 699-733. *In*: Small Animal Clinical Oncology, 4th ed. (Withrow, S. J. and Vail, D. M. eds.) Saunders, Philadelphia.
35. Hill, R. P. and Stanley, J. A. 1977. Pulmonary metastases of the Lewis lung tumor-cell kinetics and response to cyclophosphamide at different sizes. *Cancer Treat. Rep.* **61**: 29-36.
36. Miller, A. G., Morley, P. S., Rao, S. Avery, A. C., Lana, S. E.

- and Olver, C. S. 2009. Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* **23**: 116-122.
37. Konjin, A. M., Carmel, N., Levy, R. and Hershko, C. 1981. Ferritin synthesis in inflammation. II. Mechanism of increased ferritin synthesis. *Br. J. Haematol.* **49**: 361-370.
38. Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. and Allavena, P. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **86**: 1065-1073.
39. Weiss, G. 1999. Iron and anemia of chronic disease. *Kidney. Int. Suppl.* **69**: S12-17.
40. Krause, A., Neitz, S., Mägert, H. J., Schultz, A., Forssmann, W. G., Knappe, P. S., Adermann, K. 2000. LEAP-1 a novel highly disulfide-bounded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS. Lett.* **480**: 147-150.
41. Park, C. H., Volore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T. 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* **276**: 7806-7810.
42. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., Loreal, O. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* **276**: 7811-7819.
43. 小船雅義、加藤淳二 2006. 慢性炎症と貧血. 日内会誌 **95**: 2016-2020.

44. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K., Ganz, T. 2004. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* **113**: 1271-1276.
45. Kakuta, K., Orino, K., Yamamoto, S., Watanabe, K. 1997. High levels of ferritin and its iron in fetal bovine serum. *Comp. Biochem. Physiol.* **118**: 165-169.
46. Lassen, E. D. and Weiser, G. 2004. Laboratory technology for veterinary medicine. pp. 18-20. *In: Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.* (Thrall, M. A., Baker, D. C., Campbell, T. W., DeNicola, D., Fettman, M. J., Lassen, E. D., Rebar, A. and Weiser, G. eds) Lippincott Williams and Wilkins.
47. Cowgill, E. S., Neel, J. A. and Grindem, C. B. 2003. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* **33**: 1223-1244.
48. Onishi, T., Inokuma, H., Ohno, H., Soeda, K., Noguchi, S. and Sasaki, K. 2000. C-reactive protein concentrations in normal and diseased dogs - measured by laser nephelometric immunoassay. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* **53**: 595-601.
49. Rebouche, C. J., Wilcox, C. L. and Widness, J. A. 2004. Microanalysis of non-heme iron in animal tissues. *J. Biochem. Biophys. Methods* **58**: 239-251.
50. Stookey, L. L. 1970. Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* **42**: 779-781.

51. Piek, C. J., Brinkhof, B., Rothuizen, J., Dekker, A. and Penning, L. C. 2011. Leukocyte count affects expression of reference genes in canine whole blood samples. *BMC. Res. Notes* **4**: 36.
52. Fry, M. M., Liggett, J. L. and Beak, S. J. 2004. Molecular cloning and expression of canine hepcidin. *Vet. Clin. Pathol.* **33**: 223-227.
53. Angelucci, E., Brittenham, G. M., McLaren, D. E., Ripalta, M., Baronciani, D., Giardino, C., Galimberti, M., Polichi, P. and Lucarelli, G. 2000. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N. Engl. J. Med.* **343**: 327-331.
54. Miyazaki, M., Rosenblum, J. S., Kasahara, Y., Nakagawa, I. and Patricelli, M. P. 2009. Determination of enzymatic source of alanine aminotransferase activity in serum from dogs with liver injury. *J. Pharmacol. Toxicol.* **60**: 307-315.
55. 堀田知光, 押味和夫 2007. ヘプシジン, Iron overload と鉄キレート療法, 大屋敷一馬, 小沢敬也, 高後裕, 中尾眞二編, 37-46, 株式会社メディカルレビュー社, 東京.
56. Rivera, S. and Ganz, T. 2009. Animal models of anemia of inflammation. *Semin. Hematol.* **46**: 351-357.
57. Cerón, J. J., Eckersall, P. D. and Subiela, S. M. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* **34**: 85-99.
58. Barger, A. M. 2003. The complete blood cell count: a powerful



- diagnostic tool. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* **33**: 1207-1222.
59. Feldman, B. F., Kaneko, J. J. and Farver, T. B. 1981. Anemia of inflammatory disease in the dog: clinical characterization. *Am. J. Vet. Res.* **42**: 1109-1113.
60. Kemna, E., Pickkers, P., Nemeth, E., Hoeven, H. and Swinkels, D. 2005. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in human injected with LPS. *Blood* **106**: 1864-1866.
61. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K. and Ganz, T. 2004. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* **113**: 1271-1276.
62. Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J. L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A. and Vaulont, S. 2002. The gene expression the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* **110**: 1037-1044.
63. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Gueux, E., Ruivard, M., Coudray, C. and Rayssiguier, Y. 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**: 2090-2093.
64. Delaby, C., Pilard, N., Hetet, G., Driss, F., Grandchamp, B., Beaumont, C. and Canonne-Hergaux, C. 2005. A physiological

- model to study iron recycling in macrophages. *Exp. Cell Res.* **310**: 43-53.
65. Ganz, T. 2011. Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood* **117**: 4425-4433.
66. Sun, X. F. 2006. An iron regulator hepcidin is affected by EPO. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **14**: 778-782.
67. Vokurka, M. 2011. Heparin expression in the liver of mice with implanted tumour reacts to iron deficiency, inflammation and erythropoietin administration. *Folia Biologica* **57**: 248-254.
68. Ludwiczek, S., Aigner, E., Theurl, I. and Weiss, G. 2003. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* **101**: 4148-4154.
69. Vokurka, M. 2011. Heparin expression in the liver of mice with implanted tumour reacts to iron deficiency, inflammation and erythropoietin administration. *Folia Biologica* **57**: 248-254.
70. Theurl, I., Mattle, V., Seifert, M., Mariani, M., Marth, C. and Weiss, G. 2006. Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. *Blood* **107**: 4142-4148.
71. Fry, M. M., Kirk, C. A., Liggett, J. L., Daniel, G. B., Baek, S. J., Gouffon, J. S., Chimakurthy, P. M. and Rekapalli, B. 2009. Change in hepatic gene expression in dogs with experimentally induced nutritional iron deficiency. *Vet. Clin.*

*Pathol.* **38**; 13-19.

72. Andrews, N. C. 1999. The iron transporter DMT1. *Int. J. Biochem.* **31**; 991-994.
73. 堀田知光, 押味和夫 2007. ヘプシジン, Iron overload と鉄キレート療法, 大屋敷一馬, 小沢敬也, 高後裕, 中尾眞二編, 57-69, 株式会社メディカルレビュー社, 東京.
74. Weiss, D. J. 2007. Hemophagocytic syndrome in dogs: 24 cases (1996-2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **230**: 697-701.
75. Alkhateeb, A. A., Han, B. and Connor, J. R. 2013. Ferritin stimulates breast cancer cells through an iron-independent mechanism and is localized within tumor-associated macrophages. *Breast Cancer Res. Treat.* **137**: 733-744.

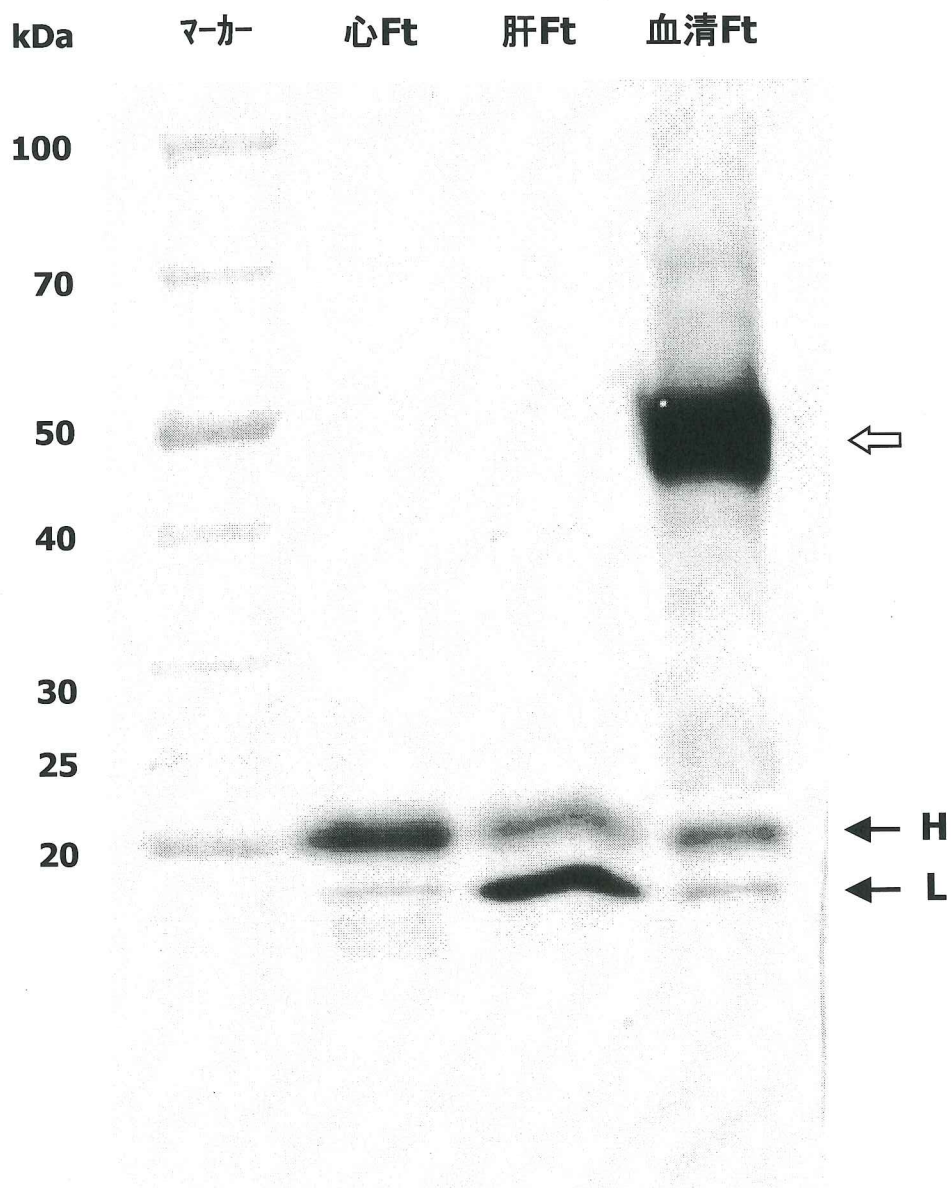


図1 フェリチン (Ferritin: Ft) に対する精製ウサギ抗犬心臓Ft抗体の反応性

レーンは左から分子量マーカー、精製犬心臓Ft、精製犬肝臓Ft、免疫沈降法で回収した健常ビーグル犬の血清Ftを示す。精製蛋白質はそれぞれ2  $\mu$ g、血清は2 mlに対しウサギ抗ラット肝臓Ftポリクローナル抗体5  $\mu$ gを加えて免疫沈降し回収されたものを使用した。黒矢印はH (21.1 kDa) とL (18.7 kDa) サブユニットを、白抜き矢印は免疫沈降法で使用したウサギ抗犬心臓Ft抗体の重鎖と考えられる。

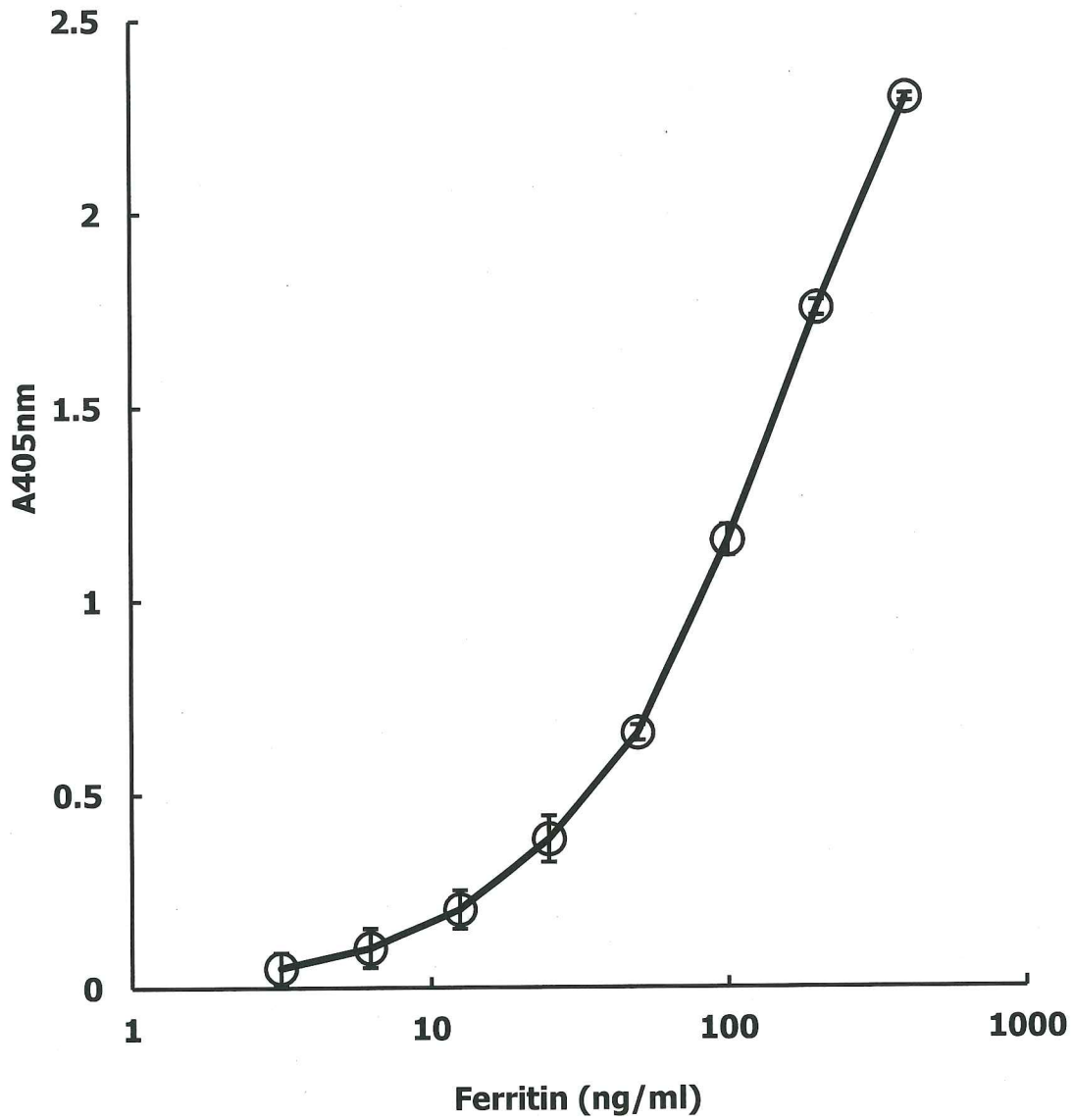


図2 標準曲線

精製犬心臓フェリチンを400~3.125 ng/mlの範囲で2倍階段希釈し、それぞれのフェリチン濃度を本研究で樹立したサンドイッチELISA法で定量した時の標準曲線を示す。データは3回の独立した実験で得られた値の平均値±標準偏差を示している。

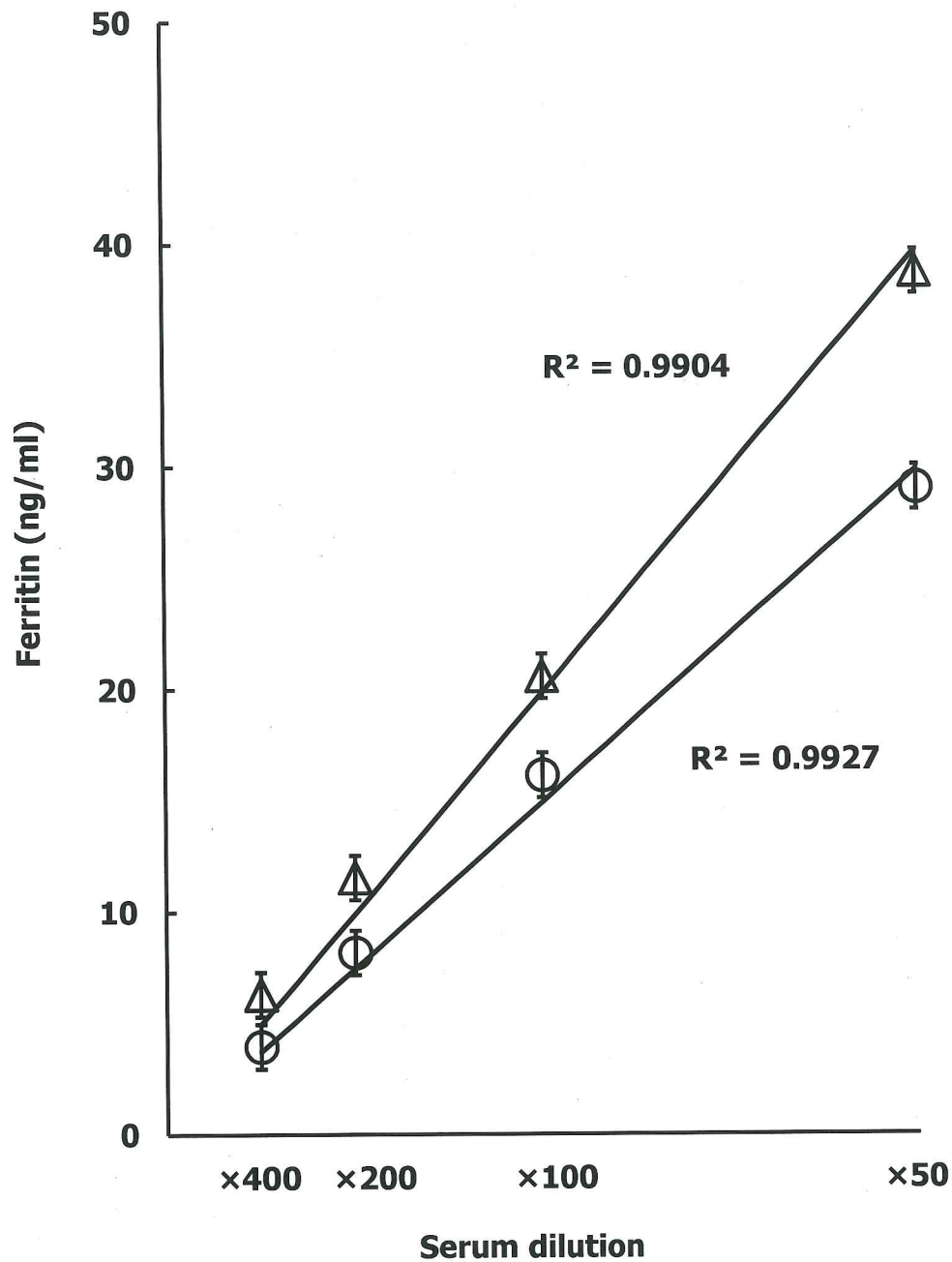


図3 希釈試験

2つの異なる血清サンプルを硫酸アンモニウム含有ELISA緩衝液でそれぞれ50～400倍に希釈し、フェリチン濃度を測定した。それぞれの値における原点を通る回帰直線式から決定係数 ( $R^2$ ) を求めた。データは3回の独立した実験で得られた値の平均値±標準偏差を示す。

Serum No.	Added ferritin (ng/ml)	Found ferritin (ng/ml)	Recovery (%)
1	0	25.4	
	5	30.4	100
	10	35.1	97
2	0	37.0	
	5	41.8	96
	10	47.2	102
3	0	20.6	
	5	25.6	100
	10	30.7	101

表1 添加回収試験

既知の濃度の精製犬心臓フェリチンを3つの異なる血清に0～10 ng/ml添加した時の回収率を示す。

	No. of dogs	Serum ferritin (ng/ml) (Mean±SD)
<b>Age</b>		
< 4 years	71	703 ± 240
4-8 years	54	864 ± 270
> 8 years	29	841 ± 264
<b>Sex</b>		
Male	82	787 ± 298
Female	81	790 ± 266
<b>Body weight</b>		
< 10 kg	98	762 ± 232
> 10 kg	65	878 ± 332
<b>Total</b>	<b>163</b>	<b>789 ± 284 (261 ~ 1889)</b>

表2 健康犬163頭の血清フェリチン濃度

年齢、性、体重の各分類における個体数とそれぞれの血清フェリチン濃度の平均値±標準偏差を示す。各分類における最上段の群との比較による統計上の有意差は認められない。



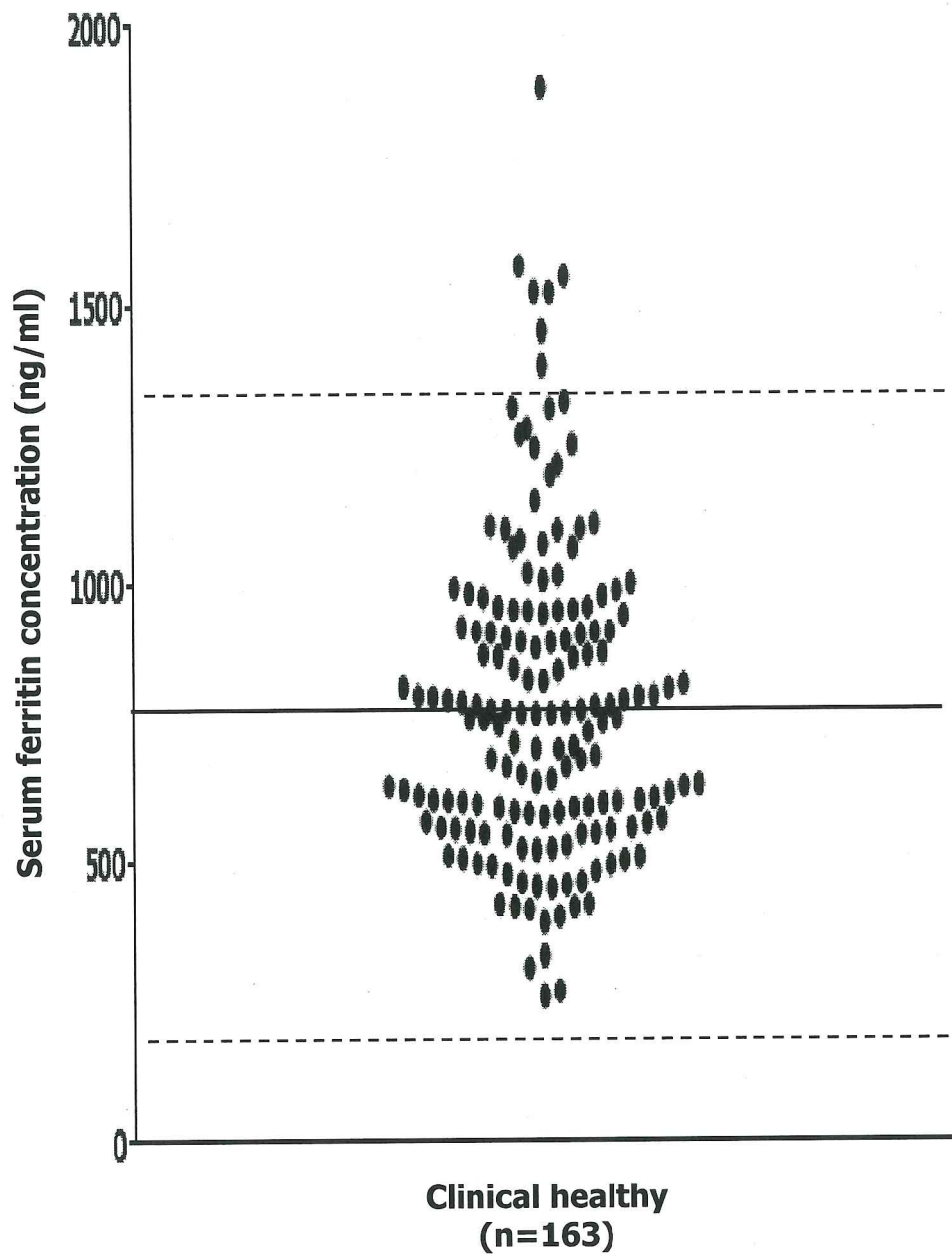


図4 健康犬163頭の血清フェリチン濃度

個別の血清フェリチン濃度をプロットした。実線は全頭の平均値、2つの破線は平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差から算出した基準値をそれぞれ示す。

<b>Classification (n)</b>	<b>Diagnosis</b>	<b>Serum ferritin (ng/ml; Mean±SD)</b>
Carcinoma (61)	Mammary gland adenocarcinoma (14), Squamous cell carcinoma (10), Hepatocellular carcinoma (7), Others (30)	2498 ± 3580
Sarcoma (51)	Soft tissue sarcoma (22), Osteosarcoma (4), Hemangiosarcoma (20), Others (5)	3694 ± 4414
Hemopoietic tumor (67)	Lymphoma (56), Histiocytic sarcoma (8), Plasmacytoma (2), Leukemia (1)	7638 ± 10160
Other malignant tumor (34)	Mast cell tumor (27), Malignant melanoma (7)	1795 ± 1474
Benign tumor (11)	Mammary gland adenoma (5), Fibromatous epulis (2), Others (4)	1100 ± 948
Inflammatory disease (30)	Pyometra (7), Pancreatitis (5), Hepatitis (4), Others (14)	2947 ± 3478
Immune-mediated disease (28)	Hemolytic anemia (18), Polyarthritits (5), Thrombocytopenia (5)	10972 ± 21614

表3 疾患の分類とその内訳

282の臨床例を7分類し、それぞれの疾患群における主要な疾病とそれらの血清フェリチン濃度の平均値±標準偏差を示す。

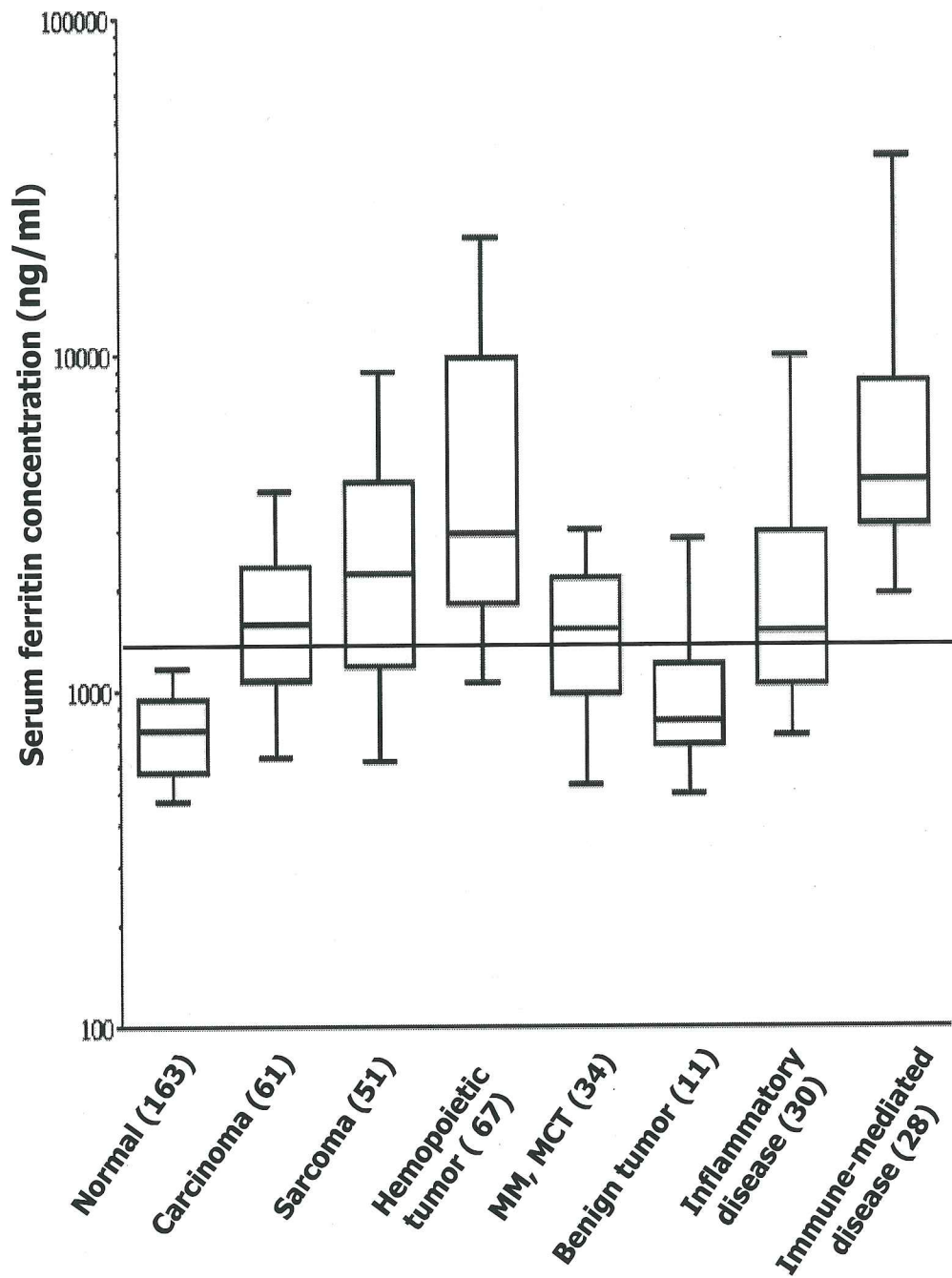


図5 各疾患群の血清フェリチン濃度のボックスプロット

グラフは上から、90、75、50、25、10パーセンタイルをそれぞれ示す。実線は基準上限値とした1,357 ng/mlを示す。

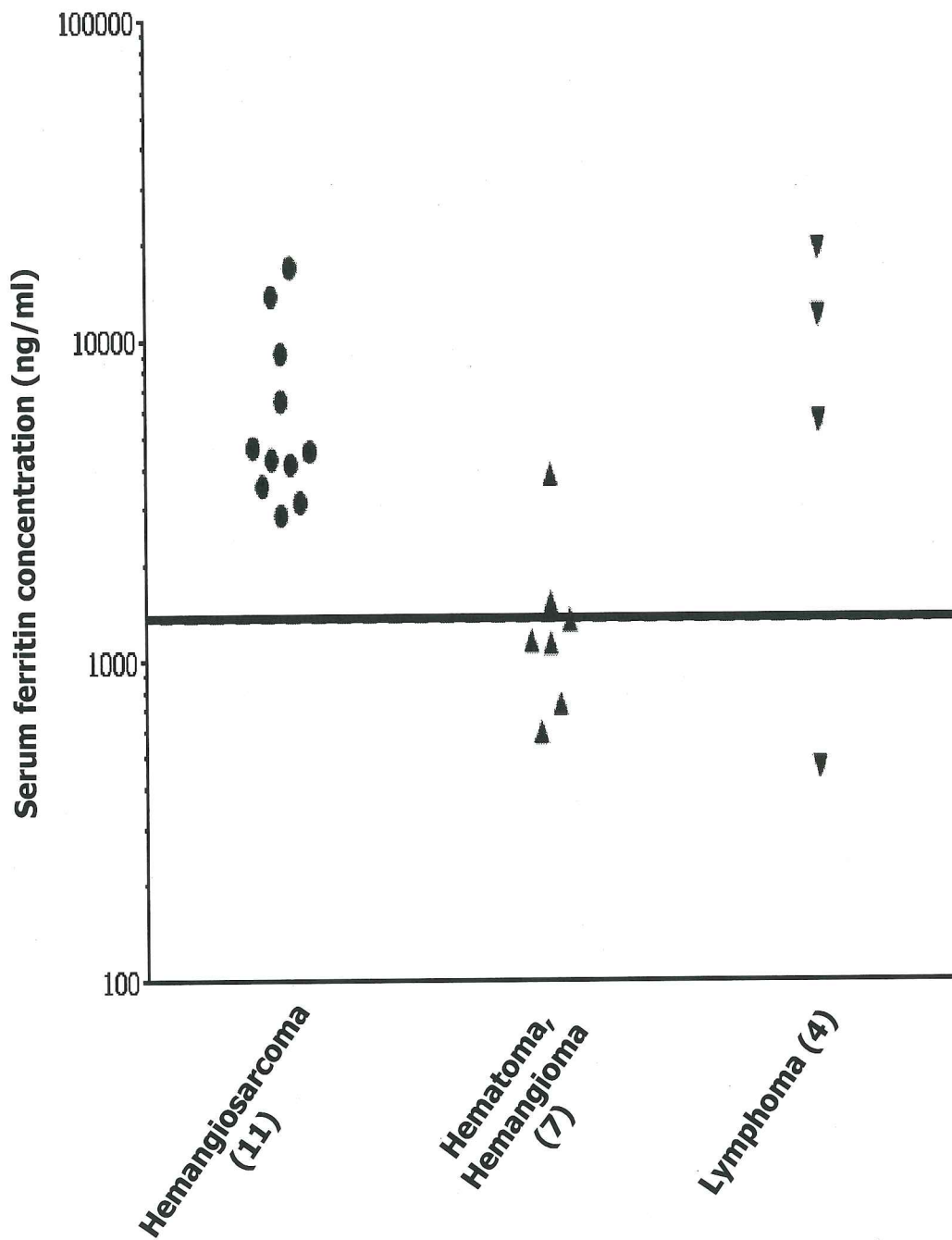


図6 脾臓腫瘍を有する犬における血清フェリチン濃度

脾臓原発疾患を有する犬22例における治療前の血清フェリチン濃度をプロットした。実線は基準上限値とした1,357 ng/mlを示す。

No.	Breed	Age (Y)	Sex	Clinical Stage	Diagnosis	PCV (%)	Serum ferritin (ng/ml)
1	Mongrel	11	Female	2	Hemangiosarcoma	27.6	4549
2	Labrador Retriever	13	Female	1	Hemangiosarcoma	26.6	3149
3	Yorkshire Terrier	12	Female	2	Hemangiosarcoma	25.9	6514
4	Golden Retriever	9	Male	2	Hemangiosarcoma	22.7	9146
5	Golden Retriever	9	Male	2	Hemangiosarcoma	20.0	7840
6	Labrador Retriever	8	Female	3	Hemangiosarcoma	22.4	4285
7	Golden Retriever	9	Female	1	Hemangiosarcoma	45.3	4667
8	Shetland Sheepdog	11	Female	3	Hemangiosarcoma	17.7	17082
9	Miniature Schnauzer	10	Male	2	Hemangiosarcoma	22.6	4413
10	Papillon	15	Female	2	Hemangiosarcoma	18.9	2870
11	Labrador Retriever	8	Male	2	Hemangiosarcoma	35.1	3929
12	Mongrel	8	Male		Hematoma	23.5	1138
13	Labrador Retriever	14	Female		Hematoma	36.1	600
14	Maltese	12	Male		Hematoma	30.5	735
15	German Shepherd	13	Male		Hematoma	39.9	1158
16	Golden Retriever	9	Female		Hematoma	30.0	1527
17	Mongrel	12	Male		Hematoma	21.6	1342
18	Welsh Corgi	11	Male		Hemangioma	32.9	5132
19	Chihuahua	16	Male		Lymphoma	23.0	11950
20	Shih tzu	14	Male		Lymphoma	26.1	5599
21	German Shepherd	12	Female		Lymphoma	46.0	19429
22	M. Dachshund	10	Male		Lymphoma	27	482

表4 脾臓腫瘍を有する犬22例の個別データ

No.	Breed	Age (y)	Serum ferritin (ng/ml)	Immuno-phenotype	Response	Survival time (days)
1	Mongrel	7	1119	B	CR	360
2	F.C. Retriever	9	5391	T	PR	61
3	Bernese M.D.	5	1603	B	SD	28
4	Toy Poodle	3	2234	B	CR	511
5	F. Bulldog	5	2830	B	CR	670
6	Chihuahua	11	1835	T	PR	215
7	Golden Retriever	10	3550	T	PR	105

表5 多中心型リンパ腫罹患犬の個別データ

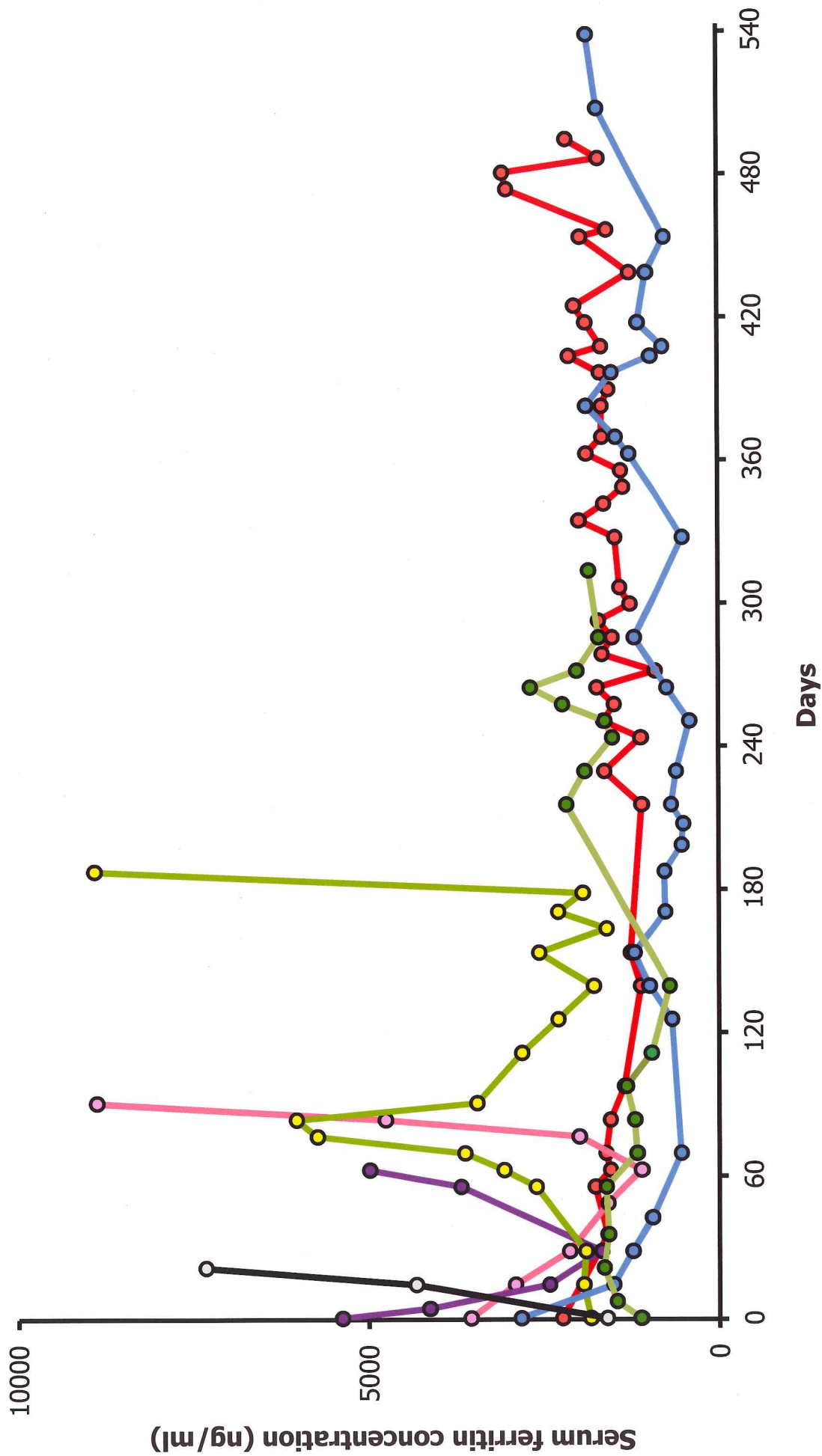


図7 犬の多中心型リンパ腫の治療経過に伴う血清フェリチン濃度の変化  
治療開始時を0日とし、多剤併用化学療法で治療された7症例の血清フェリチン濃度の推移を示す。

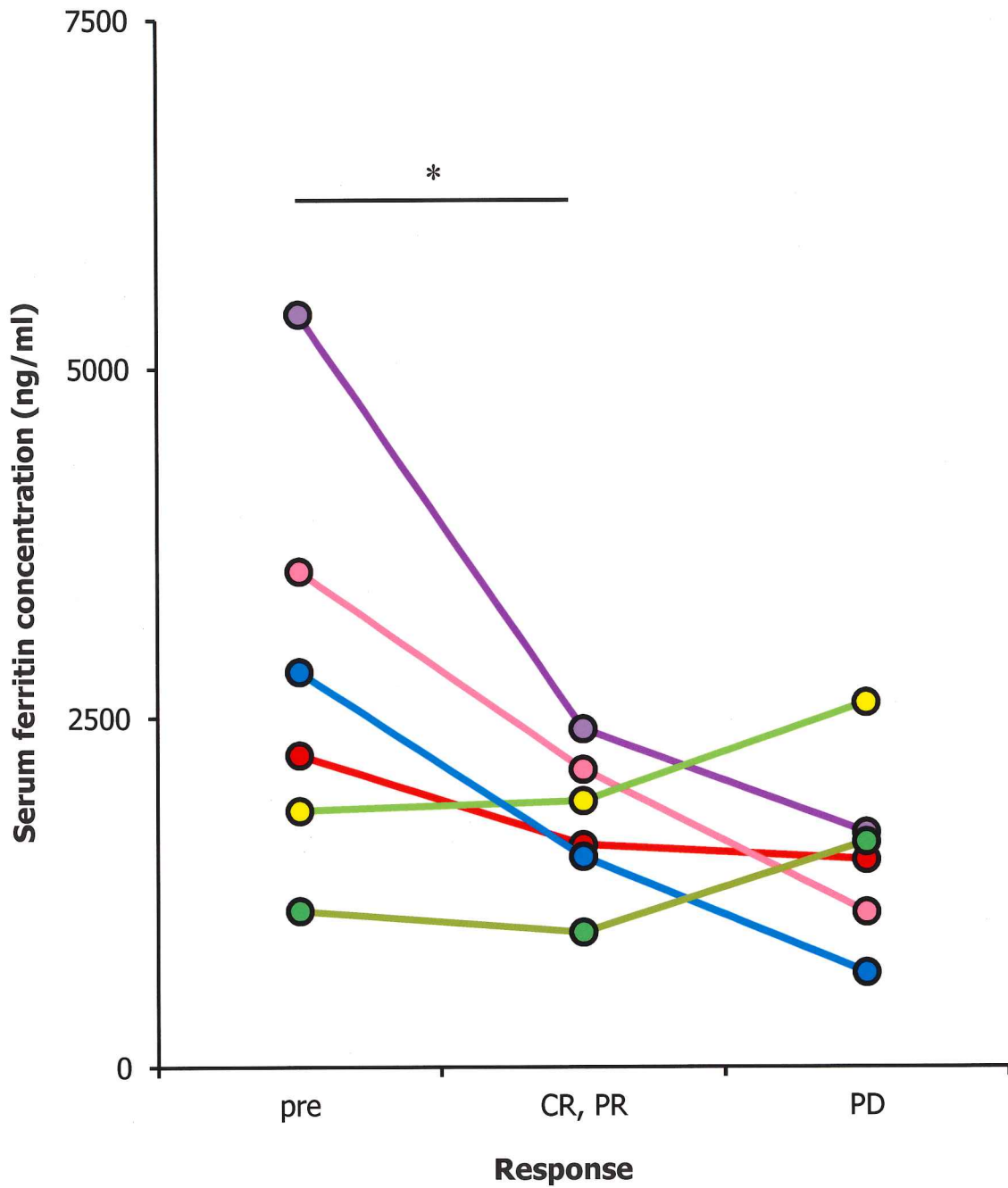


図8 多中心型リンパ腫の治療反応に伴う血清フェリチン濃度の変化

CRあるいはPRの反応を示した多中心型リンパ腫罹患犬6例の治療前 (Pre)、寛解時 (CR, PR)、再燃時 (PD) それぞれの血清フェリチン濃度を示す。値は臨床的に寛解あるいは再燃を診断した日に採取した血清のものとした。

\*:  $P < 0.05$



No.	Breed	Age (y)	Serum ferritin (ng/ml)	Primary site	Treatment	Survival time (Days)
1	F. C. Retriever	10	10431	Left thigh	CCNU	132
2	Welsh Corgi	9	29831	Lung	CCNU	102
3	Welsh Corgi	8	10858	Spleen	Splenectomy CCNU	52
4	Mongrel	10	7035	Left shoulder	CCNU	70

表6 組織球肉腫罹患犬の個別データ

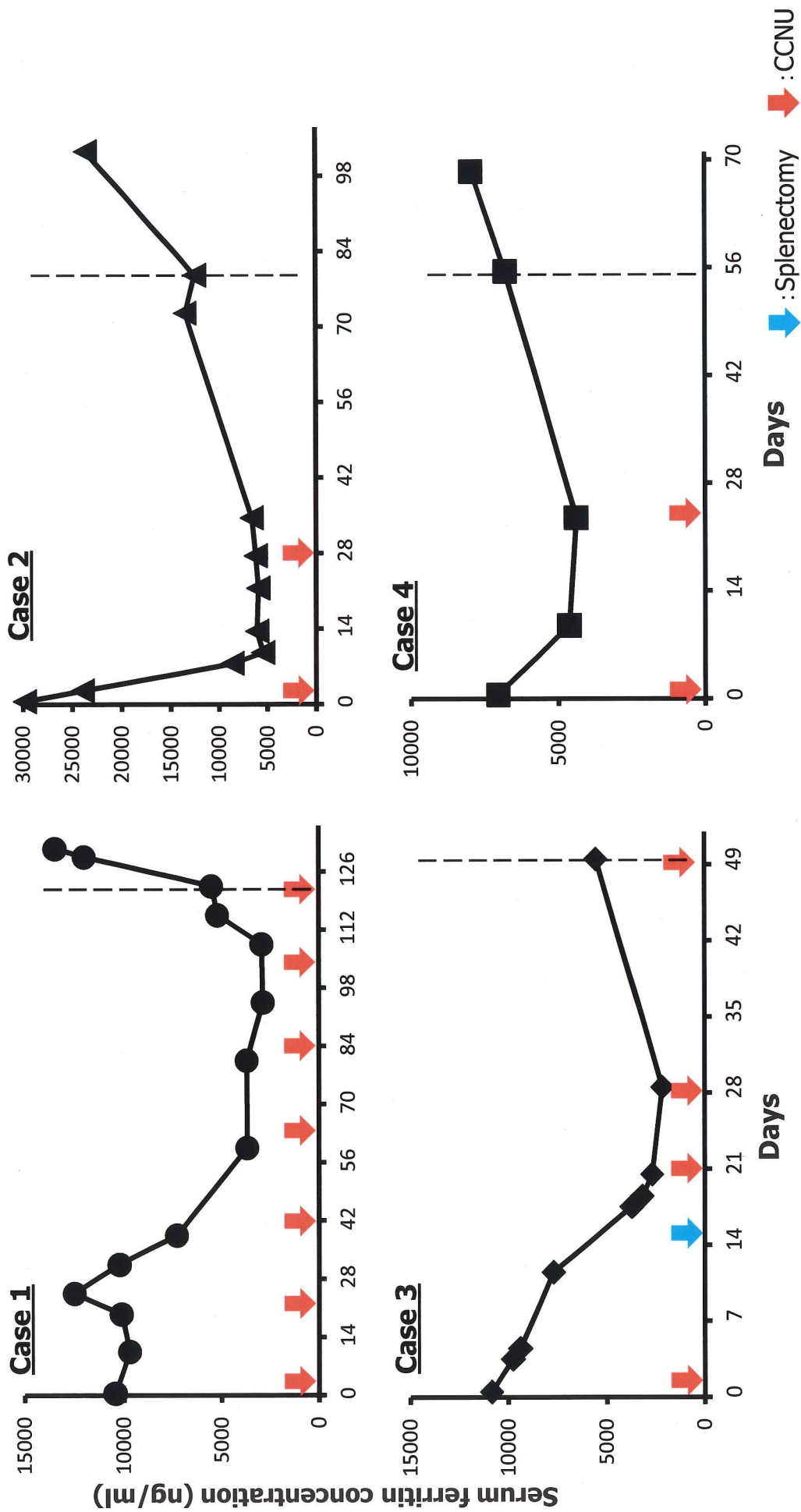


図9 犬の組織球肉腫の治療経過に伴う血清フェリチン濃度の変化

治療開始時を0日とし、CCNU (赤矢印) あるいは外科的脾臓摘出 (青矢印) によって治療された4症例の血清フェリチン濃度の推移を示す。破線は臨牀的に病態の進行 (再燃) が認められた日を示す。

No.	Breed	Age (y)	Serum ferritin (ng/ml)	PCV (%)	ALT (U/l)	Immuno phenotype	Survival Time (days)
1	Papillon	7	18554	41.7	211	B	1
2	M. Schnauzer	13	29407	34.3	36	B	9
3	G. Retriever	4	34006	31.5	29	ND	11
4	Bulldog	4	16124	34.8	221	T	34
5	F.C. Retriever	9	5391	31.9	21	T	61
6	Papillon	4	22351	21.3	109	B	67
7	Beagle	4	4882	34	30	B	80
8	Welsh Corgi	13	1895	43.8	60	B	17
9	Bernese M.D.	5	1603	40.9	235	B	28
10	G. Retriever	10	3550	41	114	T	105
11	Mongrel	7	1846	42.3	35	T	112
12	Chihuahua	11	1835	40.2	61	T	215
13	Mongrel	8	1119	45.9	24	B	360
14	M. Dachshund	10	1890	56.7	12	B	415
15	Toy Poodle	3	2234	41.6	38	B	511
16	F. Bulldog	5	2830	46.2	174	B	670
17	G. Retriever	7	2644	54.8	133	T	540 (Alive)
18	M. Schnauzer	12	1324	46.5	57	B	730 (Alive)

ND: Not detected

表7 多剤併用化学療法を行った多中心型リンパ腫罹患犬の個別データ

18例の多中心型リンパ腫罹患犬の治療前のデータ、および多剤併用化学療法およびレスキュー療法によって治療した時の生存期間を示す。

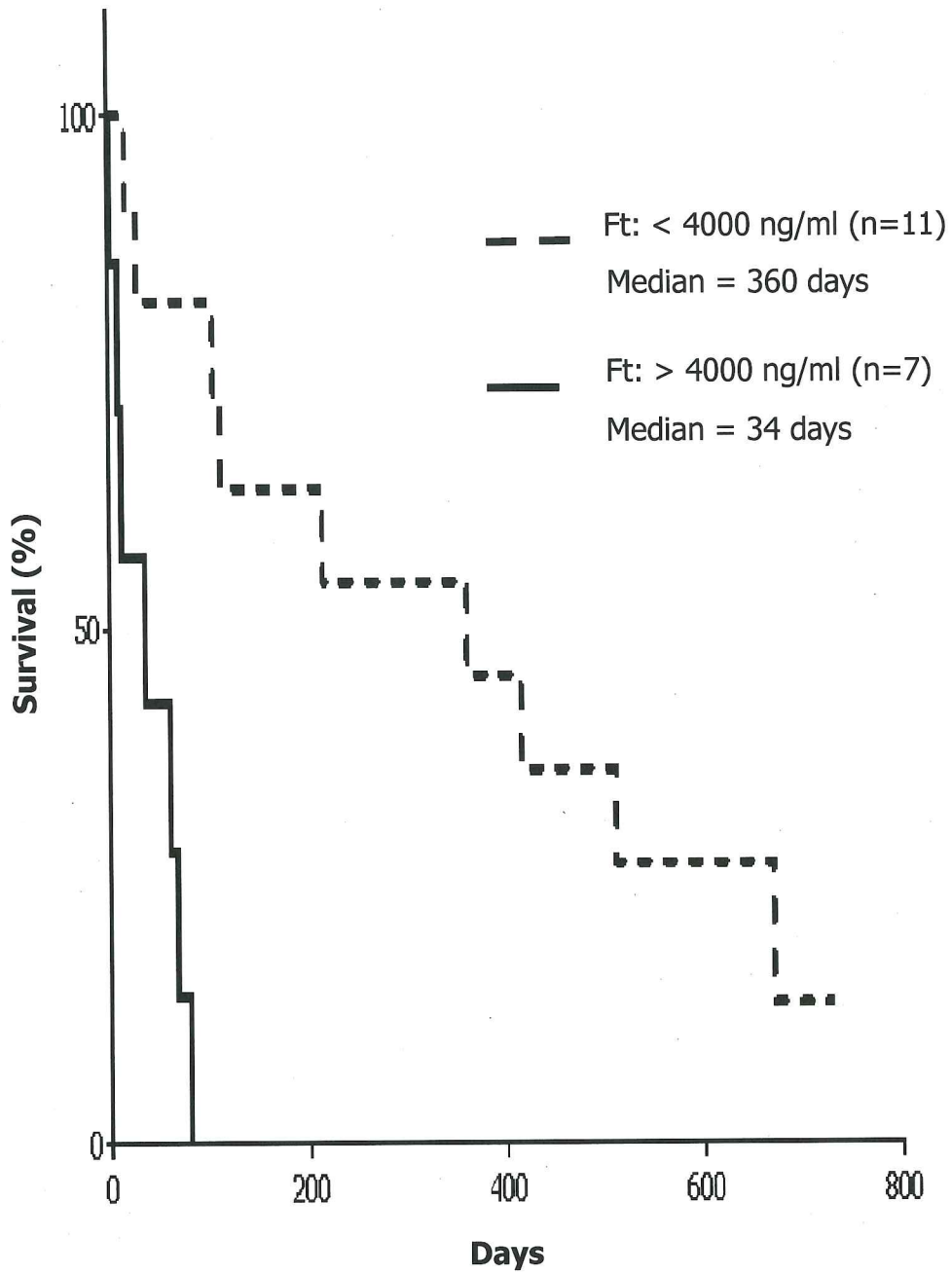


図10 多剤併用化学療法を行った多中心型リンパ腫罹患犬の生存期間と血清フェリチン濃度の関係

治療前の血清フェリチン濃度を4,000 ng/mlで分けた時のカプラン・メイヤー生存曲線を示す。血清フェリチン濃度が高い群（実線; n=7）は低い群（破線; n=11）よりも有意に（ $P=0.0016$ ）短い生存期間であった。

	0	1	2	3	4	7	14	21	28	35	42	56
Days after Turpentine injection												
Turpentine injection (every 3days)												
CBC	○					○			○		○	○
Reticulocyte count	○								○		○	○
Albumin	○	○				○	○		○		○	○
TIBC	○	○	○	○	○	○	○		○		○	○
Ferritin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Iron	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CRP	○	○				○	○		○		○	○
Liver biopsy	○	○				○	○		○		○	○
Bone marrow biopsy	○										○	

表8 実験のタイムテーブル

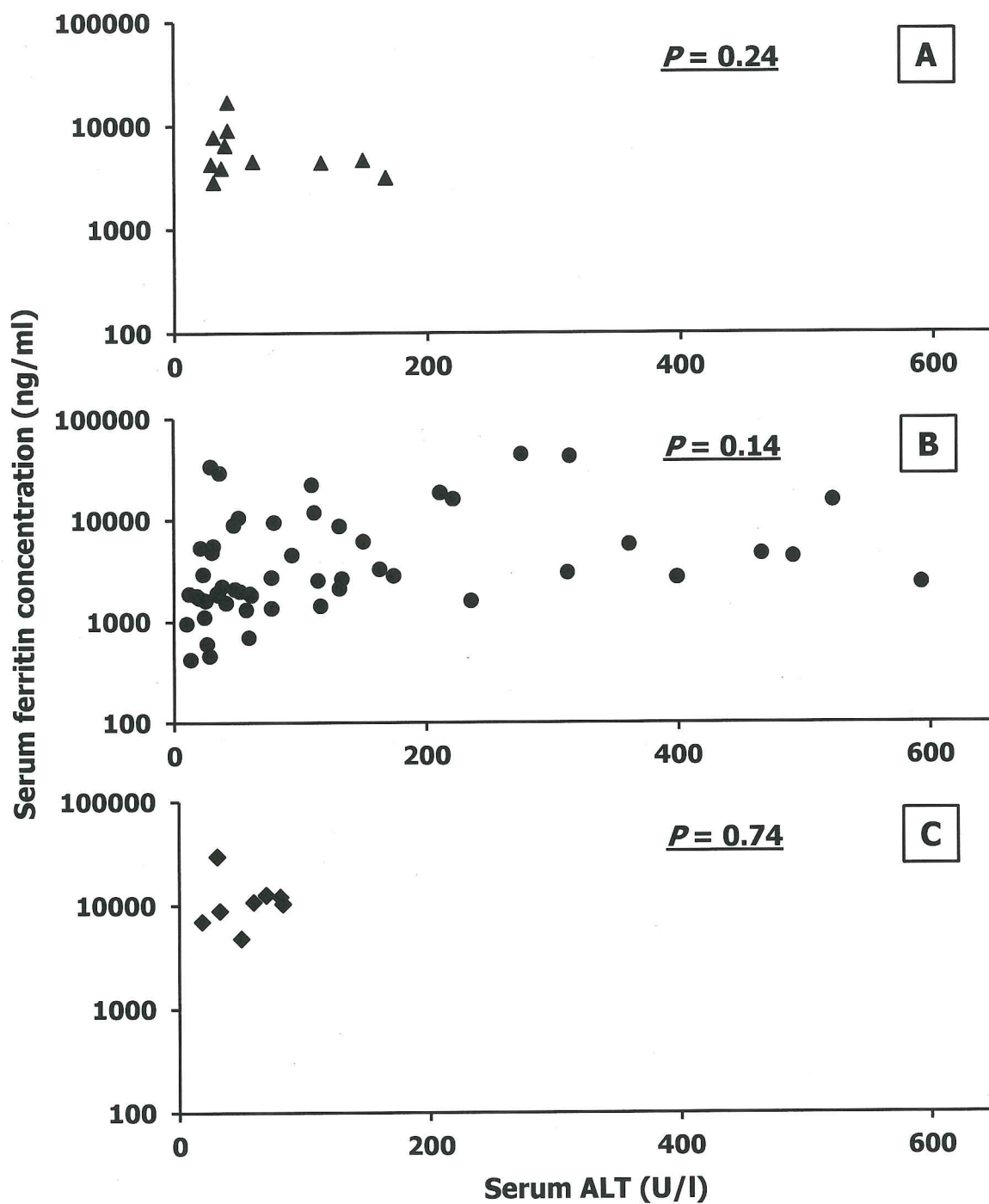


図11 脾臓血管肉腫、リンパ腫、組織球肉腫における治療前の血清フェリチン濃度とALT活性の相関関係

各疾患罹患犬における診断時の血清フェリチン濃度と同一サンプルの血清ALT活性をプロットした。それぞれの疾患における危険率を図内に示す。A:脾臓血管肉腫11例、B:リンパ腫53例、C:組織球肉腫8例

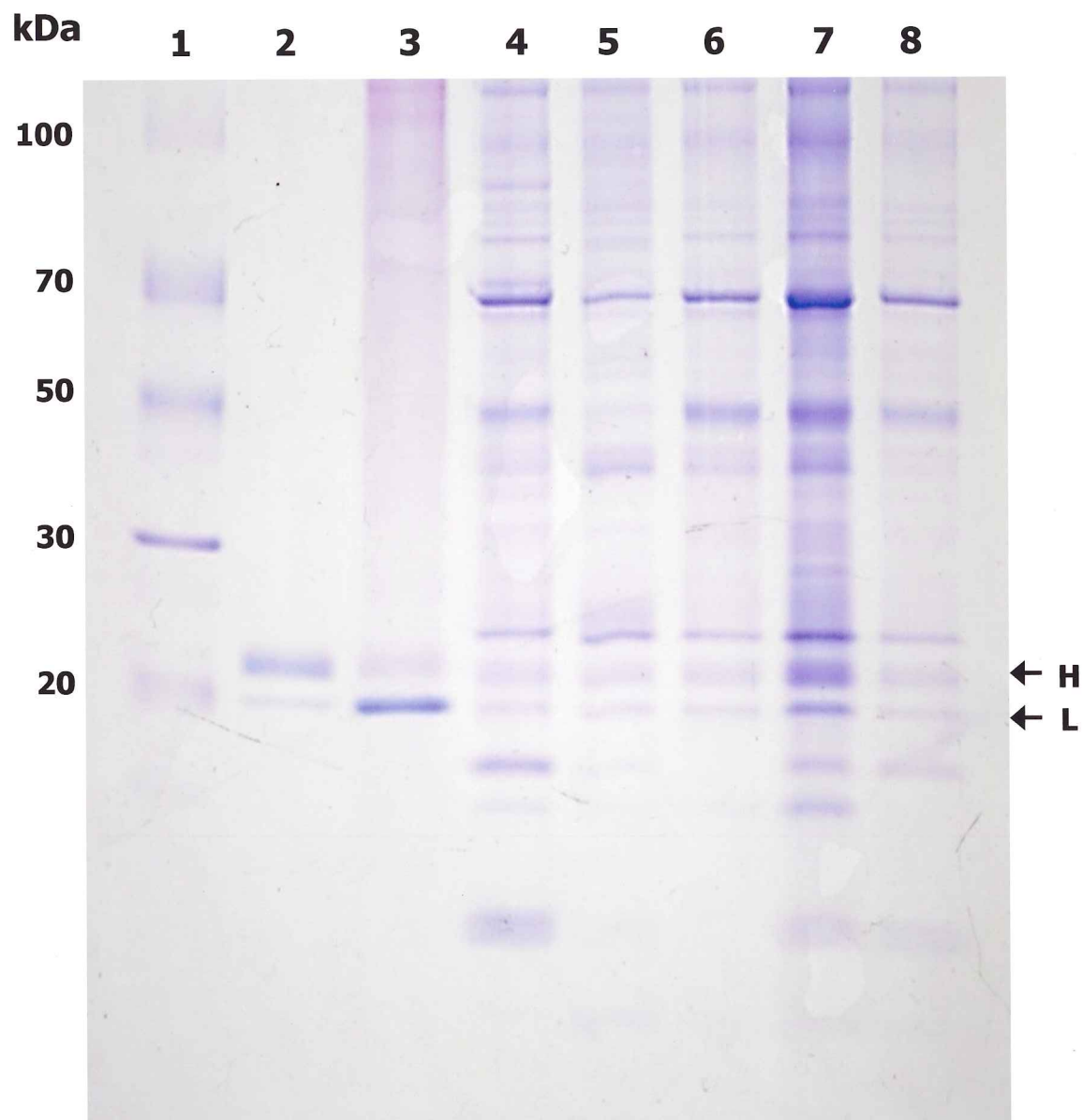


図12 SDS-PAGEによる血清フェリチンH/Lサブユニットの同定

SDS-PAGEを用いて犬のフェリチンの2つのサブユニット（矢印）を分離し、バンドをクマシーブリリアントブルーで染色した。各レーンはそれぞれ、1: 分子量マーカー、2: 精製犬心臓フェリチン、3: 精製犬肝臓フェリチン、3~8: 免疫沈降法で回収した健常犬の血清フェリチンを示している。画像解析ソフトで評価したそれぞれのフェリチンH/Lサブユニット構成比は、2: 5.79、3: 0.18、4: 2.02、5: 2.00、6: 2.28、7: 2.36、8: 2.19であった。

No.	Breed	Age (y)	Serum ferritin (ng/ml)	ALT (U/l)	Diagnosis	Serum ferritin H/L ratio	Mean $\pm$ SD
1	Golden Retriever	9	4821	49	Histiocytic sarcoma	1.35	
2	Labrador Retriever	11	12692	69	Histiocytic sarcoma	0.95	
3	Golden Retriever	10	12178	80	Histiocytic sarcoma	1.13	
4	Welsh Corgi	9	29831	30	Histiocytic sarcoma	1.59	1.38 $\pm$ 0.29
5	Welsh Corgi	8	10858	59	Histiocytic sarcoma	1.21	
6	Mong	10	7035	18	Histiocytic sarcoma	1.45	
7	F.C. Retriever	10	10431	82	Histiocytic sarcoma	1.62	
8	Welsh Corgi	10	8930	32	Histiocytic sarcoma	1.73	
9	Bulldog	4	15190	221	Lymphoma	1.17	
10	Beagle	4	3271	30	Lymphoma	2.24	
11	F.C. Retriever	9	4650	21	Lymphoma	1.8	
12	Golden Retriever	10	4040	114	Lymphoma	1.2	
13	Welsh Corgi	7	7715	79	Lymphoma	1.84	
14	Golden Retriever	10	5048	55	Lymphoma	1.78	1.69 $\pm$ 0.40
15	Miniature Schnauzer	13	15405	36	Lymphoma	1.86	
16	Chihuahua	11	5579	61	Lymphoma	1.14	
17	Welsh Corgi	13	19065	60	Lymphoma	1.9	
18	Boxer	8	5752	361	Lymphoma	1.4	
19	Papillon	4	16030	109	Lymphoma	2.24	
20	Miniature Schnauzer	10	3544	116	Hemangiosarcoma	1.93	
21	Papillon	15	2870	31	Hemangiosarcoma	3.01	2.70 $\pm$ 1.32
22	Labrador Retriever	8	4142	37	Hemangiosarcoma	4.42	
23	Beagle	11	4549	62	Hemangiosarcoma	1.45	
24	Beagle	3	886	ND	Healthy	2.18	
25	Beagle	6	669	ND	Healthy	2.39	
26	Beagle	2	1014	ND	Healthy	1.86	2.12 $\pm$ 0.2
27	Beagle	3	541	ND	Healthy	1.98	
28	Beagle	4	852	ND	Healthy	2.17	

表9 免疫沈降法とSDS-PAGEを用いて評価した各疾患罹患犬の血清フェリチンH/Lサブユニット構成比



No.	Breed	Age (y)	Diagnosis	Lesion	Tissue ferritin (µg/ml)	Tissue ferritin H/L ratio
1	Golden Retriever	10	Lymphoma	Lymph node	24.9	0.23
2	Golden Retriever	8	Lymphoma	Lymph node	16.3	1.36
3	Tosa	2	Lymphoma	Lymph node	12.5	0.86
4	Welsh Corgi	9	Histiocytic sarcoma	Lymph node	80.1	3.48
				Lung legion	85.2	1.37
5	Beagle	11	Hemangiosarcoma	Splenic mass	70.4	0.24
6	Shetland Sheep dog	10	Hemangiosarcoma	Subcutaneous mass	33.7	0.43

表10 免疫沈降法とSDS-PAGEを用いて評価した腫瘍組織フェリチンのH/Lサブユニット構成比

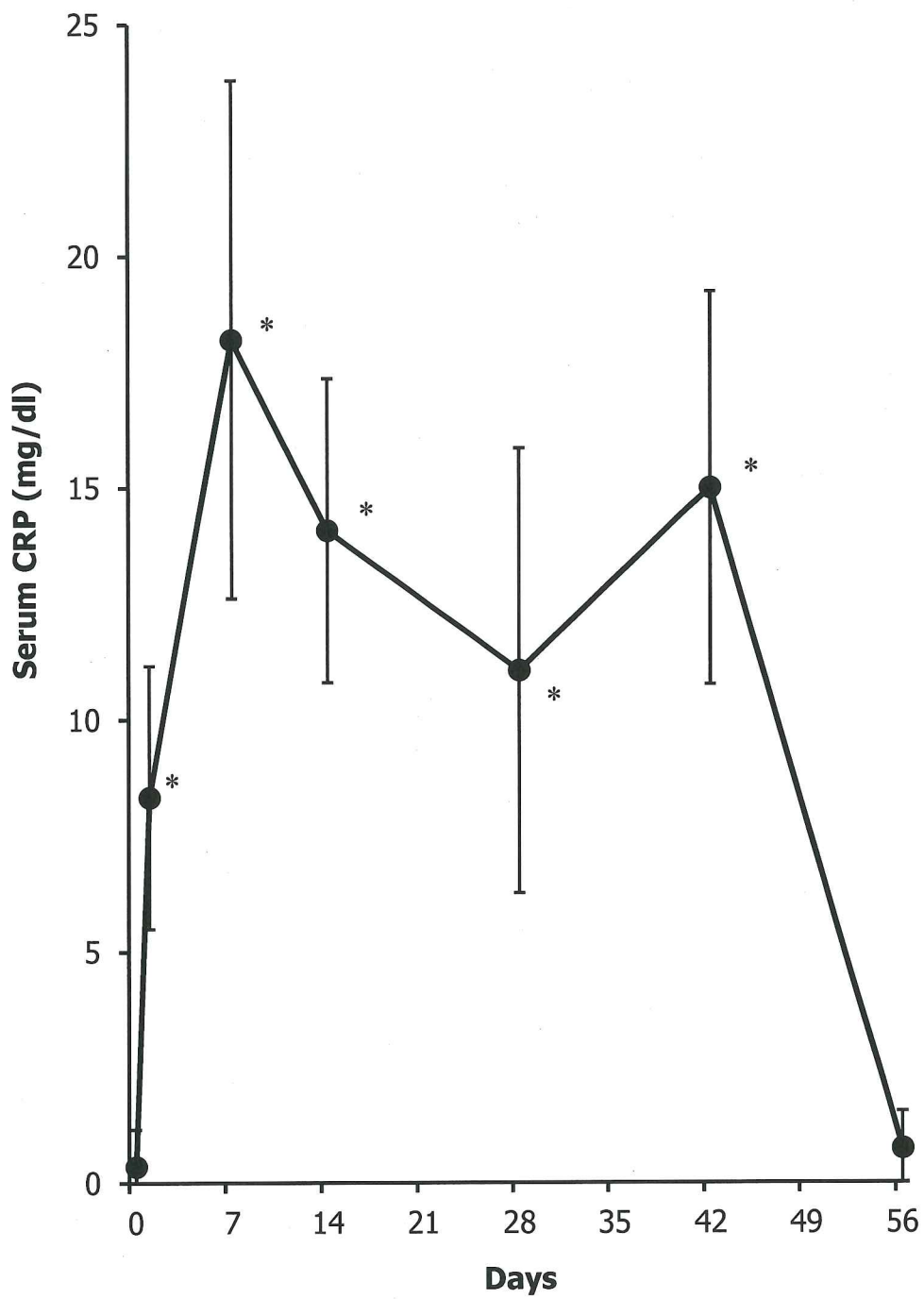


図13 血清CRP濃度の変化

\*: Day 0と比較して有意差あり ( $P < 0.05$ )

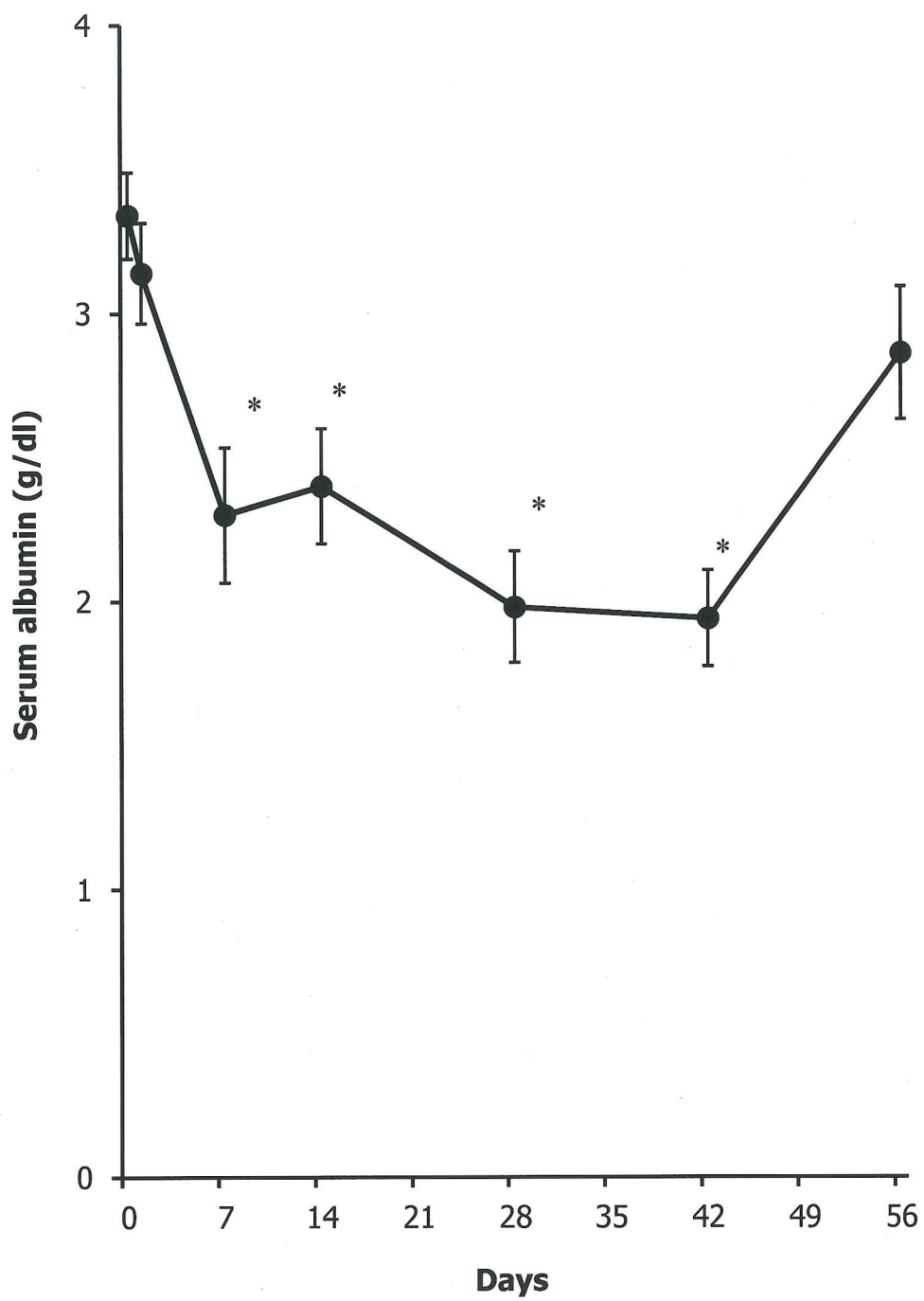


図14 血清アルブミン濃度の変化

\*: Day 0と比較して有意差あり ( $P < 0.05$ )

	Day 0	Day 14	Day 28	Day 42	Day 56
RBC ( $\times 10^4$ cells/ $\mu$ l)	662 $\pm$ 37	585 $\pm$ 23*	465 $\pm$ 30*	468 $\pm$ 22*	552 $\pm$ 30*
PCV (%)	46.1 $\pm$ 3.1	38.7 $\pm$ 2.4*	30.8 $\pm$ 1.5*	31.4 $\pm$ 1.4*	38.0 $\pm$ 1.5*
Hemoglobin (g/dl)	15.8 $\pm$ 1.0	13.1 $\pm$ 0.6*	10.5 $\pm$ 0.8*	10.1 $\pm$ 1.0*	12.4 $\pm$ 0.9*
MCV (fg)	69.6 $\pm$ 1.0	66.0 $\pm$ 1.0*	66.2 $\pm$ 1.7*	67.1 $\pm$ 0.6*	68.8 $\pm$ 1.2
MCHC (%)	34.3 $\pm$ 0.9	33.9 $\pm$ 0.5	34.1 $\pm$ 0.4	32.2 $\pm$ 1.2*	32.6 $\pm$ 1.1*
Absolute reticulocyte count ( $\times 10^4$ cells/ $\mu$ l)	2.3 $\pm$ 1.1	ND <sup>a)</sup>	4.8 $\pm$ 2.1	2.1 $\pm$ 3.5	17.0 $\pm$ 5.0*
Corrected reticulocyte percent (%)	0.36 $\pm$ 0.13	ND	0.71 $\pm$ 0.34	0.31 $\pm$ 0.16	2.6 $\pm$ 1.1*

\*:  $P < 0.05$  versus Day 0

<sup>a)</sup> ND: Not detected

表11 CBCと網状赤血球数の変化

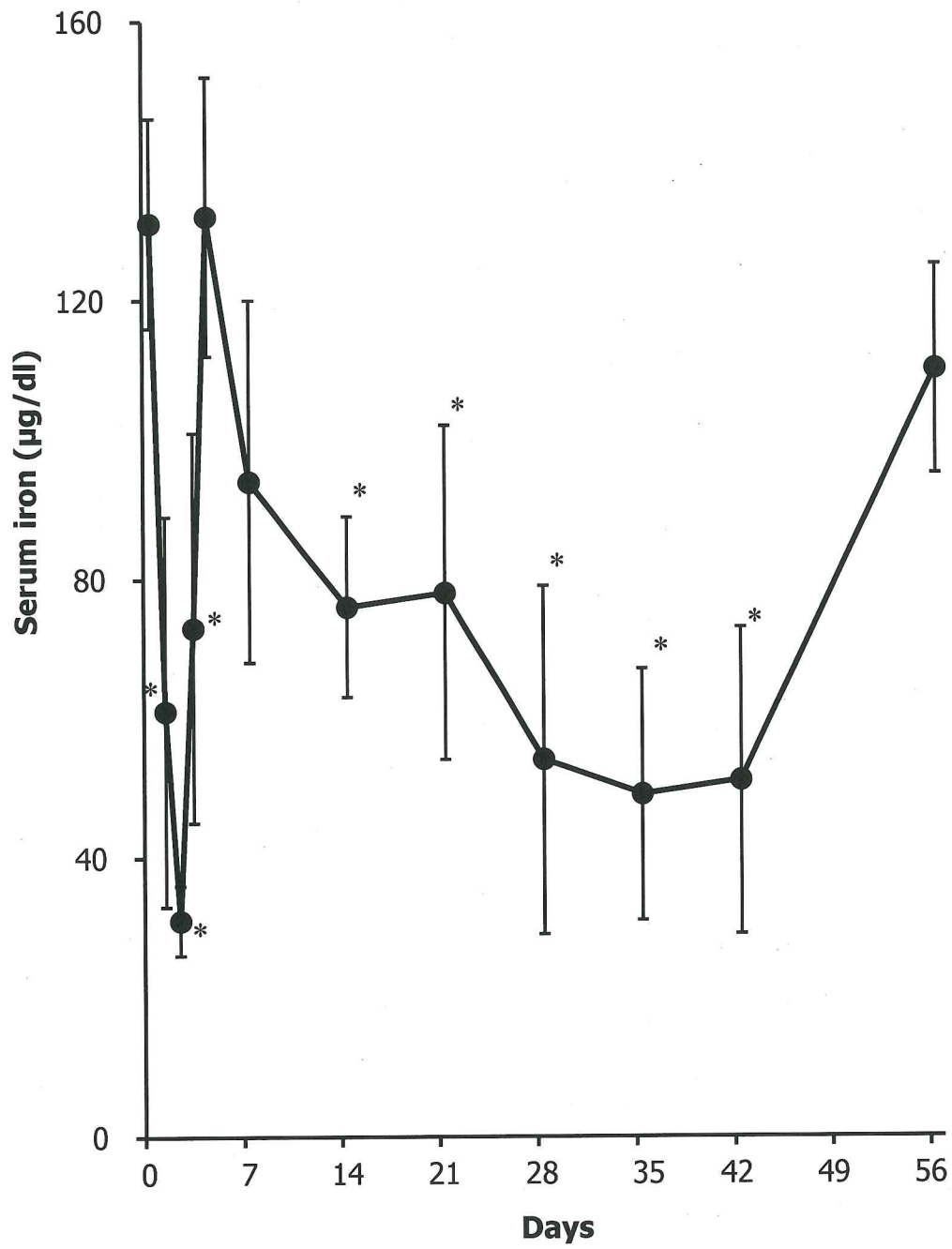


図15 血清鉄濃度の変化

\*: Day 0と比較して有意差あり ( $P < 0.05$ )

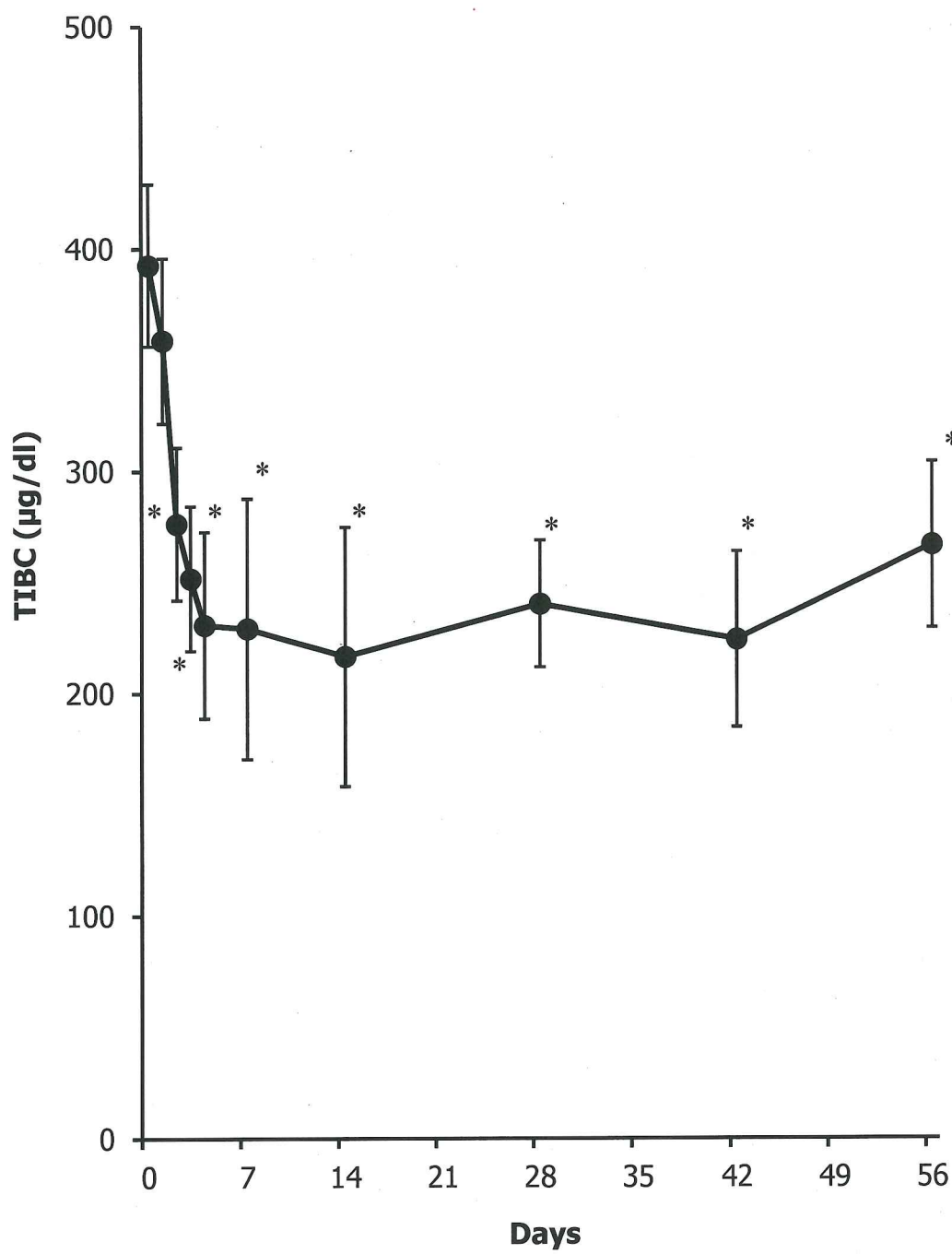


図16 総鉄結合能 (TIBC) の変化

\*: Day 0と比較して有意差あり ( $P < 0.05$ )

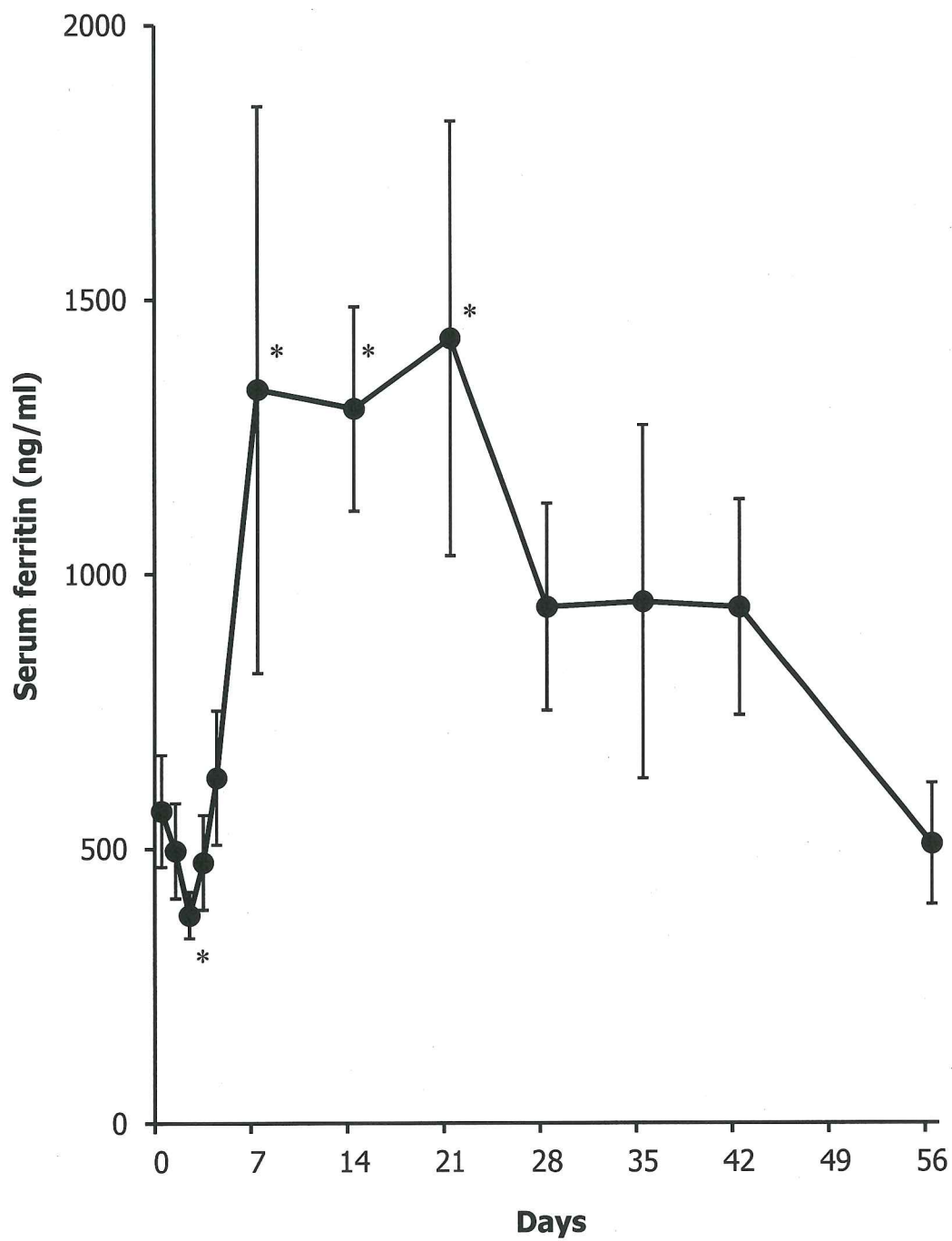


図17 血清フェリチン濃度の変化

\*: Day 0と比較して有意差あり ( $P < 0.05$ )

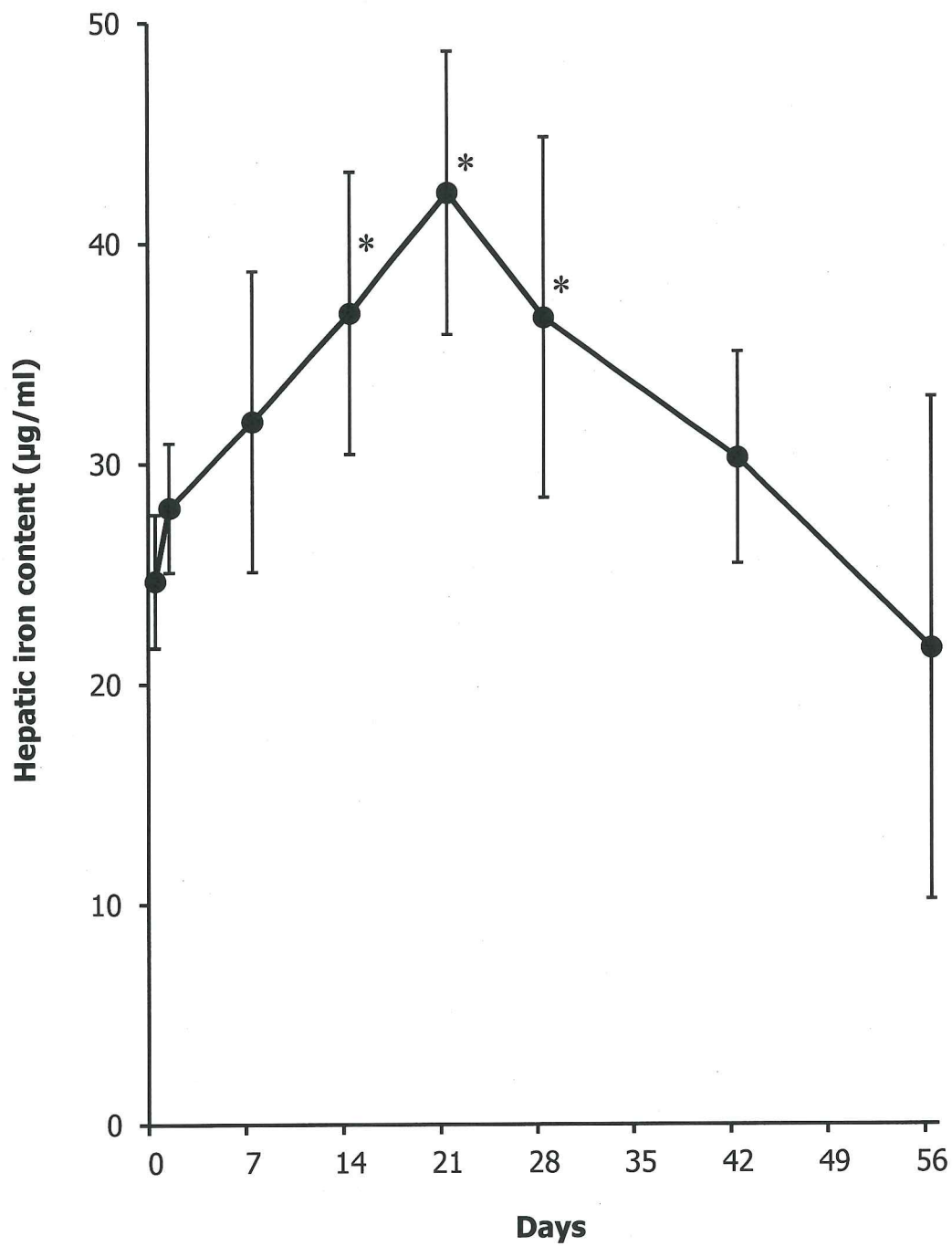


図18 肝臓非ヘム鉄含有量の変化

値は肝臓10%ホモジネート溶液中の非ヘム鉄量で示す。

\*: Day 0と比較して有意差あり ( $P < 0.05$ )



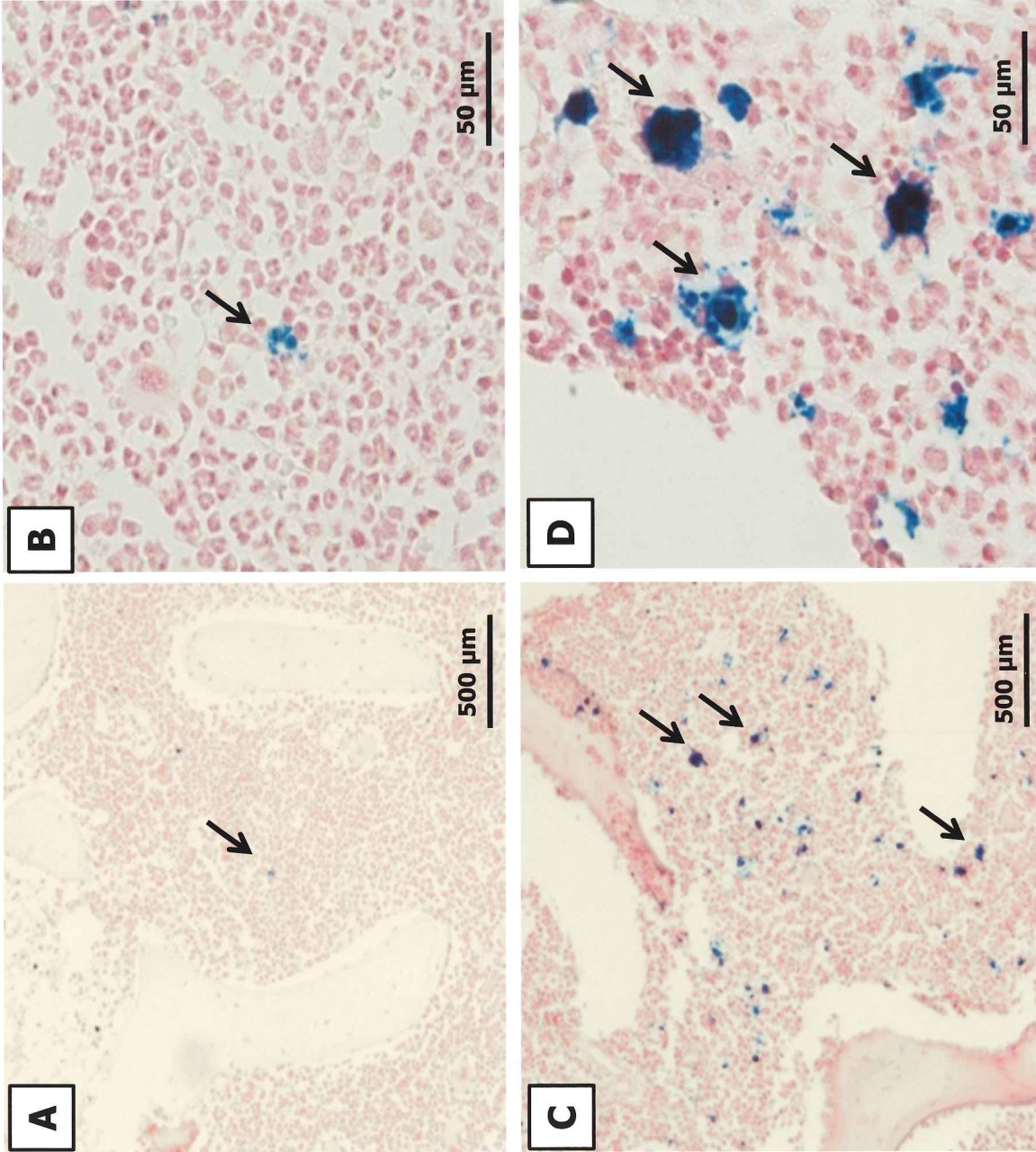


図19 光学顕微鏡を用いた骨髓組織のベルリンブルー染色像

矢印は青染されたヘモジデリン（不溶化したフェリチン蛋白質）を示す。A, B : Day 0の低倍（A）および高倍率像（B）、C, D : Day 42の低倍（C）および高倍率像（D）。

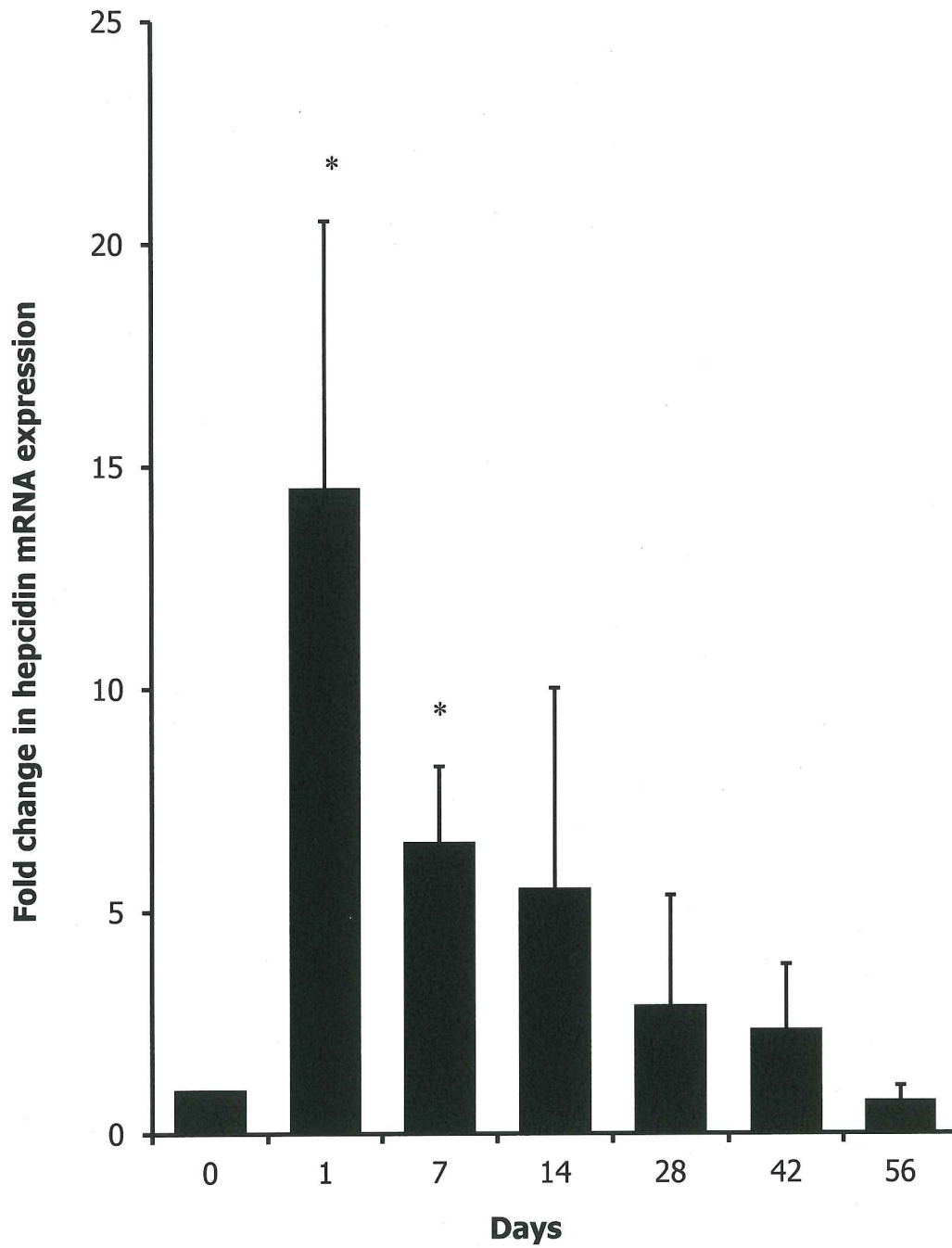


図20 リアルタイムPCR法によるヘプシジン遺伝子発現量の評価

値はGAPDHのmRNA発現量で標準化し、Day 0を基準にして示す。

\*: Day 0と比較して有意差あり ( $P < 0.05$ )