

氏名(本籍)	北垣雅人(静岡県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第415号
学位授与年月日	平成19年11月26日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	実験動物の金属製耳標装着による耳介軟骨炎に関する病理学的研究
論文審査委員	(主査) 二宮博義 (副査) 赤堀文昭 代田欣二

論文内容の要旨

実験動物における耳介軟骨炎は、ラット特有の加齢性病変として報告されているが、その発生機序は未だ不明である。一般に耳介軟骨炎は、肉眼的変化として両側の耳介に紅斑を伴う肥厚がみられ、組織学的には耳介軟骨板の断裂を伴う肉芽腫性炎が主病変とされている。ラットの耳介軟骨炎は古くから知られる病変ではあるが、一方で僅かな症例報告に留まり、その発生原因を特定するための体系的な研究が行われてこなかった。それ故、この原因不明の耳介軟骨炎の発症機序を解明することは、実験動物を用いた毒性学的研究において、被験物質の影響を厳密に見極める上で重要である。

本研究において、筆者は耳介軟骨炎の発生原因を解明する目的で、CrI:CD(SD)ラットにおける耳介軟骨炎の発生状況について疫学的調査を実施した。さらに、初期の耳介軟骨炎の発生機序を解明するために、ラットと同様の耳介軟骨炎が発症することを筆者らが初めて見出したC57BL/6マウスを用い、病理組織学的見地からの検討を実施した。

第1章 CrI:CD(SD)ラットにおける耳介軟骨炎の発生状況および特徴

CrI:CD(SD)ラットにおける耳介軟骨炎の発生時期および組織学的特徴を把握するために、7～9および18～29週齢のCrI:CD(SD)ラットの両側耳介について病理組織学的検査を行った。また、比較病理検査のために、他の軟骨組織(大腿骨頭、気管、喉頭、鼻および気管支)についても病理組織学的検討を実施した。なお、本研究に用いたCrI:CD(SD)ラットは入荷時(4週齢)に個体識別として汎用される金属製耳標を片側の耳介に装着した。

その結果、CrI:CD(SD)ラットの耳介軟骨炎は7～9週齢および18～29週齢のいずれで性差なく発症が認められた。この耳介軟骨炎の発生状況は、いずれの個体においても金属製耳標を装着した耳介側から必ず発生し、その反対側の耳介へと波及することが確認された(発症率:雄5.9%、雌2.9%)。一方、その他の軟骨組織では耳介軟骨炎に関連する異常所見は確認されなかった。耳介部の病理組織学

的变化としては、限局性ないしは多発性の肉芽腫性炎を伴う軟骨板の破壊、新生軟骨結節の形成および異所性の軟骨内骨化によって特徴付けられていた。なお、病変部位において、細菌感染は確認されなかった。

このように、これまで多くの系統の老齢ラットでの報告と病理組織学的に一致する耳介軟骨炎が7～9週齢の若齢Crl:CD(SD)ラットでも発生することが確認され、ラットにみられる耳介軟骨炎はこれまでの多くの報告とは異なり、加齢性に発現する病変でないことを明らかにした。また、単に両側に発現すると考えられていた耳介軟骨炎は、時系列的に金属製耳標を装着した耳介から発生し、その後、反対側の耳介に波及することも確認した。以上、本章の研究結果より、従来ラットで加齢性に自然発生すると考えられていた耳介軟骨炎が、Crl:CD(SD)ラットにおいて金属製耳標の装着を原因とすることが示唆された。

第2章 C57BL/6 マウスにおける耳介軟骨炎の発症メカニズムの解明

第1章において、耳介軟骨炎の発現は金属製耳標の装着により誘発されることが示唆された。また、耳介軟骨炎は単なる加齢や外傷性損傷で発生するのではなく、生体の金属製耳標に対する特異的な反応、すなわち金属製耳標からの遊離金属イオンが耳介軟骨炎の発現に大きく関与していると推察した。そこでCrl:CD(SD)ラットと同様の耳介軟骨炎のみられた雄C57BL/6マウスを用い、この仮説を確認する目的で、耳介組織中における金属製耳標の主要構成成分の金属濃度を測定するとともに、同部位での金属結合蛋白であるメタロチオネイン (MT)-IおよびIIの存在および遺伝子発現レベルを免疫組織化学的検査およびRT-PCR法を用いて確認した。また、耳標装着後の耳介の初期病理組織学的変化を金属製耳標装着耳介および非装着耳介との間で比較検討した。

その結果、金属製耳標を装着した耳介において、肉眼的に耳介の肥厚が確認され、組織学的にはラットと同様の耳介軟骨炎の特徴所見、すなわち耳介軟骨板の破壊、新生軟骨結節および軟骨内骨化生の併発が認められた。さらに、金属製耳標の装着および非装着耳介間での比較では、金属製耳標の主要構成成分である銅および鉄の耳介組織中イオン濃度が装着側に統計学的に有意に高値を示した ($P<0.05$)。これら金属イオン濃度の測定結果に一致して、金属製耳標を装着した耳介ではRT-PCR法によりMT-IおよびIIの発現が、さらに免疫組織化学的にも破壊された耳介軟骨板の部位でMT-IおよびIIの陽性反応が認められた。

MTは銅および鉄などの重金属により誘導され、金属毒性の軽減に重要な役割を示すことが知られている。一方、鉄および銅は生体内で活性酸素種 (ROS) の供給源となり、皮膚における線維化および炎症の誘発に関与するとともに軟骨破壊を惹起することが知られている。このように、C57BL/6マウスを用いた本章の試験成績から、金属製耳標遊離鉄イオンおよび銅イオンが耳介軟骨炎の初期病変である耳介軟骨板の破壊に関与する可能性を示唆した。

第3章 C57BL/6 マウスにおける耳介軟骨炎の免疫組織学的検討

第2章において、耳介軟骨炎の発生開始に耳介部に装着した金属製耳標が関与する可能性が示唆されたが、その一方で耳介軟骨炎が反対側の耳介にも波及する原因については不明である。本章では、金属製耳標の装着により発症した耳介軟骨炎が自己免疫性疾患として知られる再発性多発性軟骨炎 (RP) やリュウマチ性関節炎 (RA) での耳介軟骨炎の初期変化に病理組織学的な類似性を示すか否かを確認する目的として、金属製耳標装着側に発生した雄 C57BL/6 マウスの耳介軟骨炎について免疫組織化学的検査を実施した。さらに耳介組織中のサイトカインの挙動についても検索を行った。

その結果、耳介軟骨炎の初期病変部位に浸潤する炎症細胞は、RP および RA の初期変化と同様に、CD4 陽性 T リンパ球、Mac-1 陽性のマクロファージ、好中球ならびに肥満細胞が優位に認められた。さらに、金属製耳標非装着の耳介に比べ、装着耳介では組織中サイトカイン濃度が RP および RA の初期変化と同様に、IL-2、TNF- α および IFN- γ で有意な高値 ($P < 0.05$) を示した。

ラットを含めマウスでの耳介軟骨炎に関するこれら免疫組織学的知見およびサイトカインの挙動についての報告はないが、ヒトでは自己免疫疾患として知られている RP や RA において、これら RP および RA 疾患モデル動物で併発する耳介軟骨炎でも筆者の成績と同様の所見が報告されている。したがって、本章において確認した C57BL/6 マウスへの金属製耳標の装着は、装着部位に耳介軟骨炎を発症させ、この片側性の耳介軟骨炎が時間の経過とともに反対側の耳介でも発生し、結果的に両側性耳介軟骨炎へと進行していく病態は、RP および RA 疾患モデル動物と同様に自己免疫学的機序が関与する可能性を示唆した。

第4章 総括および結論

本研究では、耳介軟骨炎の発生原因を解明する目的で、Crl:CD (SD) ラットにおける耳介軟骨炎の発生状況について疫学的調査を実施した。またラットと同様の耳介軟骨炎が C57BL/6 マウスでも発生することを初めて見出し、ラットで得られた知見を基に、これらマウスを用い病理組織学的見地からその発生原因の可能性を検討した。その結果、Crl:CD (SD) ラットを用いた発生状況の確認において、単に両側性に発現すると考えられていた耳介軟骨炎は、時系列的に金属製耳標を装着した耳介から発生し、その後、反対側の耳介に波及することを確認し、加齢性に自然発生すると考えられていたラットの耳介軟骨炎が、金属製耳標の装着が原因となって発症することを示した。また、C57BL/6 マウスを用いた検討では、金属製耳標から遊離した鉄イオンおよび銅イオンが耳介軟骨炎の初期病変である耳介軟骨板の破壊に大きく関与する可能性が示唆された。さらに、片側性の耳介軟骨炎が時間の経過とともに反対側の耳介でも発生し、結果的に両側性耳介軟骨炎へと進行していく病態は、RP および RA 疾患モデル動物の病態に類似し自己免疫学的機序が本症の病態ないしは進行に関与する可能性が考えられた。

これまで実験動物における耳介軟骨炎の発生原因を特定するための体系的な調査が行われてこなかったが、本研究で明らかとなったこれらの知見は、実験動物を用いた毒性学的研究において、被験物

質の影響を精査に見極める上で重要と考えられた。また、今回の研究結果から、金属製耳標の使用が生体へ影響を与えることが強く示唆され、他の個体識別法を選択することが種々の実験判断を精査に見極める上で重要と考えられた。また、種を超えラット以外にもマウスで耳介軟骨炎を確認したことは、その他の種にも本疾患が起り得ると推察され、実験動物のみならず他の動物に対してもその使用を回避する必要があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

化学物質の安全性評価ならびに毒性学的研究を行う上で、化学物質の生体への影響を正確に解析するために自然発生病変の原因やその発生機序を明らかにしておくことは極めて重要である。耳介軟骨炎は古くからラット特有の加齢性病変として報告されているが、その発生機序は未だ不明である。一般に耳介軟骨炎は、肉眼的変化として両側の耳介に紅斑を伴う肥厚がみられ、組織学的には耳介軟骨板の断裂を伴う肉芽腫性炎が主病変とされている。これまで耳介軟骨炎に関する論文は僅かな症例報告に留まり、その発生原因を特定するための体系的な研究が行われてこなかった。この原因不明の耳介軟骨炎の発症機序を解明することは、実験動物を用いた毒性学的研究において、被験物質の影響を厳密に見極める上で重要である。

筆者は耳介軟骨炎の発生原因を解明する目的で、CrI:CD(SD)ラットにおける耳介軟骨炎の発生状況について疫学的調査を実施した。さらに、初期の耳介軟骨炎の発生機序を解明するために、ラットと同様の耳介軟骨炎が発症することを筆者らが初めて見出したC57BL/6マウスを用い、病理組織学的見地からの検討を実施した。

本研究の概要は次の通りである。

1. CrI:CD(SD)ラットにおける耳介軟骨炎の発生状況および特徴

CrI:CD(SD)ラットにおける耳介軟骨炎の発生時期および組織学的特徴を把握するために、入荷時(4週齢)に金属製耳標を片側の耳介に装着した7～9および18～29週齢のCrI:CD(SD)ラットの両側耳介について病理組織学的検査を行った。その結果、CrI:CD(SD)ラットの耳介軟骨炎はいずれの週齢で性差なく発症が認められ、その発生状況は金属製耳標を装着した耳介側から必ず発生し、その反対側の耳介へと波及することが確認された。耳介部の病理組織学的変化としては、限局性ないしは多発性の肉芽腫性炎を伴う軟骨板の破壊、新生軟骨結節の形成および異所性の軟骨内骨化によって特徴付けられていた。なお、病変部位の細菌感染は確認されず、その他の軟骨組織でも耳介軟骨炎に関連する異常所見は確認されなかった。

このように、これまで多くの系統の老齢ラットでの報告と病理組織学的に一致する耳介軟骨炎は、若齢CrI:CD(SD)ラットでも発生することが確認されことから、加齢性に発現する病変でないことを明らかにした。また、単に両側性に発現すると考えられていた耳介軟骨炎は、時系列的に金属製耳標を装着した耳介から発生し、その後、反対側の耳介に波及することも確認した。

以上、本章の研究結果より、従来ラットで加齢性に自然発生すると考えられていた耳介軟骨炎が、Crl:CD(SD)ラットにおいて金属製耳標の装着を原因とすることが示唆された。

2. C57BL/6 マウスにおける耳介軟骨炎の発症メカニズムの解明

Crl:CD(SD)ラットを用いた耳介軟骨炎の検討結果から、筆者は耳介軟骨炎の発現は金属製耳標の装着により誘発されることが示唆され、また金属製耳標からの遊離金属イオンが耳介軟骨炎の初期発現に大きく関与していると推察した。そこでCrl:CD(SD)ラットと同様の耳介軟骨炎のみられる雄C57BL/6マウスを用い、耳介組織中における金属製耳標の主要構成成分の金属濃度を測定するとともに、同部位での金属結合蛋白であるメタロチオネイン (MT)-IおよびIIの存在および遺伝子発現レベルを免疫組織化学的検査およびRT-PCR法を用いて確認した。

その結果、金属製耳標を装着した耳介において、肉眼的および組織学的にラットと同様の耳介軟骨炎の特徴所見が認められた。金属製耳標の装着および非装着耳介間での比較において、装着側の耳介組織中のイオン濃度は銅および鉄が統計学的に有意に高値を示した ($P<0.05$)。また装着側の耳介組織ではMT-Iおよび-IIの遺伝子発現および免疫組織化学的にも破壊された耳介軟骨板の部位でMT-Iおよび-IIの陽性反応が認められた。

このように、C57BL/6マウスを用いた本章の試験成績から、金属製耳標遊離鉄イオンおよび銅イオンが耳介軟骨炎の初期病変である耳介軟骨板の破壊に関与する可能性を示唆した。

3. C57BL/6 マウスにおける耳介軟骨炎の免疫組織学的検討

最後に、筆者は耳介軟骨炎が両側性に発生する要因が自己免疫学的機序が関与すると推察し、自己免疫性疾患として知られる再発性多発性軟骨炎 (RP) やリュウマチ性関節炎 (RA) での耳介軟骨炎の初期変化に病理組織学的な類似性を示すか否かを確認する目的として、金属製耳標装着側に発生した雄C57BL/6マウスの耳介軟骨炎について免疫組織化学的検査を実施した。さらに耳介組織中のサイトカインの挙動についても検索を行った。

その結果、耳介軟骨炎の初期病変部位に浸潤する炎症細胞は、RPおよびRAの初期変化と同様に、CD4陽性Tリンパ球、Mac-1陽性のマクロファージ、好中球ならびに肥満細胞が優位に認められた。さらに、金属製耳標非装着の耳介に比べ、装着耳介では組織中サイトカイン濃度がRPおよびRAの初期変化と同様に、IL-2、TNF- α およびIFN- γ で有意な高値 ($P<0.05$) を示した。

ラットを含めマウスでの耳介軟骨炎に関するこれら免疫組織学的知見およびサイトカインの挙動についての報告はないが、ヒトでは自己免疫疾患として知られているRPやRAにおいて、これらRPおよびRA疾患モデル動物で併発する耳介軟骨炎でも筆者の成績と同様の所見が報告されている。したがって、本章において確認したC57BL/6マウスへの金属製耳標の装着は、装着部位に耳介軟骨炎を発症させ、この片側性の耳介軟骨炎が時間の経過とともに反対側の耳介でも発生し、結果的に両側性耳介軟骨炎へと進行していく病態は、RPおよびRA疾患モデル動物と同様に自己免疫学的機序が関与する可

能性を示唆した。

以上の結果から、筆者は、耳介軟骨炎の発生に金属製耳標の装着が関与することを Crl:CD (SD) ラットを用いて確認した。また、ラットと同様にマウスでも耳介軟骨炎が発症することを初めて明らかにした。さらに耳介軟骨炎の初期発生には金属製耳標から遊離する銅および鉄イオンの関与すること、また免疫組織化学的知見およびサイトカインの挙動から耳介軟骨炎が両側性へ進行していく病態は自己免疫学的機序が関与する可能性を示唆した。これまで実験動物における耳介軟骨炎の発生原因を特定するための体系的な調査が行われてこなかったが、本研究で明らかとなったこれらの知見は、実験動物を用いた毒性学的研究において、被験物質の影響を厳密に見極めるための基礎的データとして有効に利用でき、大きな貢献を示すものとして評価される。よって博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいものと認める。