

氏名(本籍)	林 繁 利 (徳島県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第 3 号
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	Synthesis of C-reactive protein (CRP) and α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AG) as indicators of acute inflammation in young and adult dogs (幼齢犬および成犬における急性炎症の指標としてのC-反応性蛋白(CRP)ならびに α_1 -酸性糖蛋白(α_1 -AG)の産生能)
論文審査委員	(主査) 山 本 静 雄 (副査) 福 山 正 文 丸 山 務

論 文 内 容 の 要 旨

はじめに

イヌにおいてもC-反応性蛋白(CRP)および α_1 -酸性糖蛋白(α_1 -AG)が急性期蛋白としての性状を有していることが知られてきた。しかし、炎症の種類・程度あるいはイヌの成長過程と急性期蛋白の産生能については、不明な点が多い。イヌは医薬品の安全性試験に用いられる重要な実験動物であり、それらの知見を得ることは、医薬品の安全性試験の精度向上に貢献できるものと考えられる。

著者は、実験用ビーグル犬に*Bordetella bronchiseptica*接種によって惹起させた肺炎の過程におけるCRP濃度の変動および*B. bronchiseptica*に対する抗体の炎症刺激に対する作用を調べた。さらに、幼齢犬および成犬における炎症刺激に対するCRPと α_1 -AG産生能についても検討した。その実験成績の概要について述べるとおおよそ次のとおりである。

I. *B. bronchiseptica* 接種犬の血清CRP濃度および免疫応答

1. 材料および方法

B. bronchiseptica L-414株(I相菌)は5%牛血清を含むトリプチケースソイ寒天を用いて37℃下で20時間培養後、10%トリプチケースソイブロスを含有する滅菌生理食塩液に 10^9 個/mlに浮遊した。この*B. bronchiseptica*は実験犬への接種および間接蛍光抗体法(IFA)用スライド抗原の調製に用いた。

実験には10頭(雌雄各5頭)の体重9~10kgの健康なビーグル犬を用いた。実験犬は $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ に制御されたアイソレーターで飼育した。これらの実験犬は、対照犬2頭、*B. bronchiseptica*接種犬4頭および*B. bronchiseptica*接種後1日当たり2mg/kgのプレドニゾロンを5日間皮下投与した実験犬4頭の3グループに分けた。X線観察下で全身麻酔を施した実験犬に気管支末端まで

カテーテルを挿入し、それを介して、対照犬には5mlの滅菌生理食塩液を、他の2グループの実験犬には 1×10^9 個の*B.bronchiseptica*の生菌5mlをそれぞれ接種した。グループ1には*B.bronchiseptica*の初回接種42日後に、グループ2には35日後に同様の術式で*B.bronchiseptica*を再接種した。血液は*B.bronchiseptica*接種後2週間はほぼ毎日および*B.bronchiseptica*再接種の翌日に、血液、CRP濃度およびIFA価をモニターするために採取した。加えて、再接種の翌日に分泌液中のIFA価をモニターするために、気管分泌液を採取し、食塩加リン酸緩衝液中に気管分泌液を抽出した。

白血球数は自動分析機で、CRP濃度はサンドイッチELISAによってそれぞれ測定した。成績の統計処理には t 検定を用い、有意差 ($p < 0.05$) を求めた。

2. 結果および考察

*B.bronchiseptica*接種前の実験犬のCRP濃度は、6.8～21.9 $\mu\text{g/ml}$ と低値であった。初回接種1日後のCRP濃度は、グループ1では385.0～720.0 $\mu\text{g/ml}$ (平均478 $\mu\text{g/ml}$) に、グループ2では372.0～649.0 $\mu\text{g/ml}$ (平均551 $\mu\text{g/ml}$) に著しく増加した。滅菌生理食塩液で処理した対照犬ではCRPが全く増加しなかった。CRPは8頭中7頭の実験犬が、*B.bronchiseptica*接種1日後に、他の1頭は2日後に最高値を示し、その後いずれも速やかに減少した。*B.bronchiseptica*再接種の1日後にCRP濃度は増加したが、このときのCRP濃度の増加は全ての実験犬において初回接種後よりも低値であった ($p < 0.05$)。

2頭の対照犬では白血球数は変化を示さなかったが、グループ1および2では*B.bronchiseptica*接種1～3日後にゆるやかに増加を示した。

2頭の対照犬では全くX線所見に異常が認められなかった。肺のX線検査で、*B.bronchiseptica*接種1～2日後に、すべての実験犬の左側中葉と左側前肺葉に肺胞浸潤の証拠が認められた。*B.bronchiseptica*接種3日後にすべての実験犬で肺炎の障害像が著しく減少し、10日後までに肺はX線検査上ほとんど正常となった。

*B.bronchiseptica*に対する血清および気管分泌液のIFA価は、接種前には、すべての実験犬が陰性であった。しかし、*B.bronchiseptica*に対する血清IgMおよびIgG抗体は、すべての実験犬で*B.bronchiseptica*接種5日後から検出されたが、血清IgA抗体は検出されなかった。このIFA価にはグループ1と2の実験犬の間に有意差は認められなかった。分泌液中のS-IgAおよびIgGのIFA価は、*B.bronchiseptica*の再接種に続いて増加した。

人為的に惹起させた気管支肺炎によってすべての実験犬の血清CRP濃度が23～95倍に著しく増加したことは、気管支肺炎の病態を評価する指標としてCRPが有用であることを示唆している。*B.bronchiseptica*再接種後のCRP濃度の増加が初回接種後のそれに比べて有意に低値を示した理由は、気管および気管支分泌液中の*B.bronchiseptica*に対するS-IgAおよびIgG抗体が防御作用を示した結果、炎症刺激が減弱したためと考えられた。

抗炎症剤であるプレドニゾロンは、本実験で白血球数を増加させたが、CRP濃度には影響を及ぼさず、血清中のIgGとIgM、気管分泌液中のIgGとS-IgAのいずれの応答をも抑制しなかった。

本実験で、CRPは白血球数よりもよりの確に炎症の過程を反映することが確認された。

II. 幼齢犬および成犬におけるCRPと α_1 -AG産生能

1. 材料および方法

本実験には17頭の健康な実験用ビーグル犬および臨床例として10頭の家畜での飼育犬を用い、CRPおよび α_1 -AGの産生能を検討した。12頭の1、3および18カ月齢の実験犬（雌雄各6頭）には体重10kg当たり1mlのテレピン油を筋肉内へ、4頭の1カ月齢の実験犬（雌雄各2頭）には 5×10^8 個の*Staphylococcus aureus*を皮下へそれぞれ注射した。残り1頭の実験犬では実験的に経皮的胃ろう造設術を実施した。臨床例では、2頭の1カ月齢および3頭の3カ月齢の雑種犬に卵巣・子宮摘出術を施し、4頭の1カ月齢のビーグル犬に生ウイルスワクチンを接種した。骨折した1頭の3カ月齢の雑種犬は、手術前よりCRPおよび α_1 -AGの変動の検討に用いた。

CRP濃度はサンドイッチELISAを、 α_1 -AG濃度はSRIDキットを用いてそれぞれ定量した。成績の統計処理にはt検定を用い、有意差（ $p < 0.05$ ）を求めた。

2. 結果および考察

テレピン油を注射したすべての実験犬で、CRP濃度が2日後に最大値を示した。それらの濃度は1カ月齢の幼犬では146.6～201.2 μ g/mlで接種前値の12～15倍の増加を示したが、3カ月齢と18カ月齢の実験犬では、それぞれ322.5～341.8 μ g/ml（接種前値の16～26倍）、297.6～371.9 μ g/ml（接種前値の14～26倍）であった。1カ月齢犬と3カ月齢以上の実験犬との間のCRP産生能には有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

α_1 -AGはテレピン油注射の4日後にすべての実験犬が最大値を示した。それらの濃度は、1カ月齢犬では2,120～2,700 μ g/ml（接種前値の4～5倍）、3カ月齢犬では2,170～2,680 μ g/ml（接種前値の5～8倍）、18カ月齢では、2,240～2,910 μ g/ml（接種前値の2～10倍）であった。これらの実験犬においては、 α_1 -AG濃度に有意差（ $p < 0.05$ ）が認められなかった。

*S.aureus*を接種した1カ月齢犬では、CRPおよび α_1 -AGともに接種1日後に最大値を示した。しかし、それらの濃度は、CRPが61.8～98.1 μ g/ml、 α_1 -AGが318～760 μ g/mlと低値であった。これは、*S.aureus*の炎症刺激が弱かったことに起因すると推察された。

生ウイルスワクチン接種犬では、CRPも α_1 -AGも増加を示さなかったが、イヌにおけるウイルス感染と急性期蛋白増加の関係についてはさらに検討が必要である。

卵巣・子宮摘出術例においては、CRP濃度は1カ月齢犬では90 μ g/ml、3カ月齢犬では105.8～199.0 μ g/mlと手術の1日後に最大値を示し、その濃度は月齢を経るに従って高くなった。 α_1 -AG濃度にはほとんど増加が認められなかった。経皮的胃ろう造設術を施した成犬では、1日後にCRP濃度が343.4 μ g/ml（術前値の54倍）、 α_1 -AG濃度が1,600 μ g/ml（術前値の8倍）の最大値を示した。3カ月齢の骨折の症例では、骨折の翌日にCRP濃度が131.3 μ g/ml、 α_1 -AG濃度が219 μ g/mlで、骨折によってCRPが増加することが確認された。本症例では、手術の1日後にCRPが262.6 μ g/ml、 α_1 -AGが922 μ g/mlに増加したのちに、漸次減少した。ピンを除去した翌日に、CRPと α_1 -AGの濃度はそれぞれ4.4倍、1.2倍程度に増加した。

本実験の成績から、CRP 産生能は1カ月齢の幼齢犬では著しく弱く、成長に伴って産生能が高まり、ほぼ3カ月齢では成犬と同程度の産生能を有することが確認された。 α_1 -AG 産生能は、幼齢犬と成犬にほとんど差が認められなかったことから、CRP と α_1 -AG 産生に関わるサイトカインの種類が異なるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

C-反応性蛋白 (CRP) および α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AG) は、イヌにおいても、ヒトと同様に、急性炎症に伴って増加する急性期蛋白としての性状を有していることが知られてきた。しかしながら、急性炎症の種類・程度あるいはイヌの成長過程とこれらの産生能との関係については未だ不明な点が多い。一方、イヌは医薬品の安全性試験において重要な役割を担っているが、その健康状態を把握するための指標ならびに検査項目は少なく、その研究開発が待たれている。

著者は、実験用ビーグル犬に *Bordetella bronchiseptica* を接種して肺炎を惹起させ、肺炎の経過に伴う CRP の消長および *B. bronchiseptica* に対する抗体の炎症反応への関わりならびに *Staphylococcus aureus* 感染モデルにおける CRP 産生について研究を実施した。さらに、イヌの成長過程における CRP および α_1 -AG の産生能についても検討し、炎症刺激の種類・程度および成長段階と急性期蛋白産生能に関して初めての知見を得る研究を行なった。

本研究の概要は次のとおりである。

I. *B. bronchiseptica* 接種犬の肺炎の経過と CRP 濃度

本実験には、CRP 濃度が 6.8~21.9 $\mu\text{g/ml}$ の健康な実験用ビーグル犬 10 頭を用いた。*B. bronchiseptica* L-414 株 (I 相菌) の生菌 (5×10^9 個) を X 線透視下で挿入したカテーテルを介して実験用ビーグル犬の気管支末端へ接種し、肺炎を惹起させた。X 線検査によって肺炎所見を経日的に観察しながら、肺炎の病態と白血球数および CRP 濃度の変動との関連性を調べた。その結果、*B. bronchiseptica* の代わりに滅菌生理食塩液を接種した対照犬では、肺炎像は観察されず、白血球数および CRP 濃度にも変動が認められなかったが、*B. bronchiseptica* 接種によって肺炎を惹起させた実験犬では、接種 1 日後に左側中葉と左側前肺葉に肺泡浸潤が観察され、白血球数は接種 1~3 日後にゆるやかな増加を示し、CRP 濃度は接種 1 日後に 7 頭が、2 日後に 1 頭が 372.0~720.0 $\mu\text{g/ml}$ (接種前値の 23~95 倍) と最大値を示すことを明らかにした。*B. bronchiseptica* 接種 3 日後にはすべての実験犬で肺炎像が著しく減少し、10 日後までに肺は X 線検査上ほとんど正常となった。CRP 濃度は、最大値を示したのちに、肺炎像の縮小に伴って 2 日間急激に減少し、その後は漸次減少して *B. bronchiseptica* 接種後ほぼ 7~10 日で接種前値に復することを明らかにした。

本実験で、著者は細菌性肺炎で CRP が産生され、その産生量は肺炎の程度と関連があることをイヌで初めて確認した。

Ⅱ. 粘膜表面上の抗体の炎症反応への関与

B. bronchiseptica に対する間接蛍光抗体法での血清抗体価 (IFA 価) は、*B. bronchiseptica* 接種5日後から IgM および IgG クラスに認められた。*B. bronchiseptica* の初回接種35～42日後に、初回と同様に *B. bronchiseptica* の最接種を行ったところ、最接種1日後の CRP 濃度はすべての実験犬で初回接種時よりも有意に低値を示すことを明らかにした。このとき気管分泌液中の S-IgA および IgG の *B. bronchiseptica* の排除に関与したために、炎症刺激が減弱された結果 CRP 産生が低かったものと推察された。

本実験では、抗炎症剤であるプレドニゾロンの CRP 産生および血清・気管分泌液中の抗体産生への作用を検討し、プレドニゾロンは *B. bronchiseptica* の大量接種のような強い炎症刺激では CRP および抗体産生のいずれにも影響を及ぼさない成績を得た。また、気管分泌液中に存在する IgG および S-IgA 抗体が、*B. bronchiseptica* 再感染時の炎症刺激を減弱する作用を有していることを示唆する成績も得ている。

Ⅲ. 幼齢犬および成犬の CRP および α_1 -AG 産生能

1、3および18ヵ月齢の実験用ビーグル犬17頭および家庭での飼育犬10頭を用いて、イヌの成長過程における CRP および α_1 -AG 産生能を種々の炎症刺激について検討した。テレピン油を筋肉内注射 (1ml/kg) した12頭のビーグル犬すべてで CRP 濃度の増加が認められ、1ヵ月齢犬では 143.3～201.2 $\mu\text{g/ml}$ (接種前値の12～15倍)、3ヵ月齢犬と18ヵ月齢犬ではそれぞれ 322.5～341.8 $\mu\text{g/ml}$ (接種前値の16～26倍)、297.6～371.9 $\mu\text{g/ml}$ (接種前値の14～26倍) であり、1ヵ月齢犬と3ヵ月齢以上の実験犬との間に CRP 産生能に有意差 ($p<0.05$) があることを明らかにした。一方、これらの実験犬では α_1 -AG が 2,120～2,910 $\mu\text{g/ml}$ (接種前値の2～10倍) に増加したが、月齢間における α_1 -AG 産生能に有意差 ($p<0.05$) は認められなかった。

S.aureus を皮下接種した1ヵ月齢のビーグル犬4頭では、接種1日後に CRP 濃度が5～7倍に、 α_1 -AG 濃度がわずかに増加した。それに対して、卵巣・子宮摘出を施した雑種犬の症例では、 α_1 -AG はほとんど増加を示さなかったが、CRP 濃度は1ヵ月齢犬で 90 $\mu\text{g/ml}$ 、3ヵ月齢犬では 105.8～199.0 $\mu\text{g/ml}$ に増加する成績を得た。加えて、成犬の経皮的胃ろう造設術を施したビーグル犬の症例では、343.4 $\mu\text{g/ml}$ (術前の54倍) の最大値を示し、組織破壊によっても、CRP 産生能は月齢を経るに従って高くなることを明らかにした。また、3ヵ月齢の雑種犬の骨折の症例でも、骨折の翌日に CRP 濃度が 131.3 $\mu\text{g/ml}$ と増加し、骨折の手術1日後にはさらに 262.6 $\mu\text{g/ml}$ に増加した。骨折手術後の骨髓ピン摘出では4.4倍しか CRP 濃度が増加しないことおよび α_1 -AG 濃度は、卵巣・子宮摘出手術時とほぼ同様に、骨折でもほとんど増加しない成績を得ている。

生ウイルスワクチン接種した4頭のビーグル犬では、CRP および α_1 -AG がいずれも増加しない成績を得た。

以上、著者はイヌの CRP が細菌感染によって著しく増加する性状を有していることを初めて実験的

に証明し、それ以降のCRPの研究と応用の両面に多大な貢献をした。さらには、イヌの成長に伴うCRPおよび α_1 -AG産生能についても検討し、月齢ならびに炎症刺激の種類と程度によってこれらの産生能に違いがある知見を得た。

本研究は、医薬品の安全性試験をはじめとしたイヌを用いる研究ならびに急性期蛋白の比較免疫疫学的研究の進展に寄与するところが大きく、博士（学術）の学位授与に値するものと認める。