

氏名（本籍）	鬼頭克也（愛知県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博乙第45号
学位授与年月日	平成13年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	犬糸状虫の虫体抽出液投与によるショックに関する研究
審査委員	主査 岐阜大学 教授 佐々木 榮 英 副査 帯広畜産大学 教授 藤 崎 幸 藏 副査 岩手大学 教授 内 藤 善 久 副査 東京農工大学 教授 岩 崎 利 郎 副査 岐阜大学 教授 小 森 成 一

### 論文の内容の要旨

犬糸状虫による犬糸状虫症ならびに回旋糸状虫、バンクロフト糸状虫あるいはマレー糸状虫による人糸状虫症の治療や予防の際に、ショックが発症することはよく知られている。重症例では死に至るため、治療や予防の推進に重大な障害になっている。これらのショックは、成虫や子虫の死亡または損傷により漏出した虫体成分が、宿主に何らかの影響を与えることによって発生すると考えられている。しかし、ショックの発症機序や原因物質は未だ明らかではない。本研究は、犬糸状虫成虫の虫体抽出液（抽出液）を用いてショックを誘発し、犬糸状虫によるショック（HWショック）の病態および発症機序を解明するとともに、その原因物質を明らかにすることを目的とした。

HWショックの病態：抽出液を犬に静脈内投与してショックを誘発し、臨床所見ならびに病理所見について検討した。その結果、HWショックは、犬糸状虫の寄生の有無に関わらず50例中39例（78％）に発症した。臨床所見では、抽出液投与5から30分後に血圧が著しく低下し、虚脱、可視粘膜蒼白、心音微弱などの症状が観察された。発症時には、末梢血液中の白血球および血小板が減少し、alanine transaminase, alkaline phosphataseなどの血清酵素活性が上昇した。また、病理所見と循環動態から、HWショックは、腹部内臓血管床に血液が貯留して静脈還流量が減少し、その結果血圧が低下した血液分配異常性ショックであることが明らかになった。HWショックのこれらの特徴は、犬のアナフィラキ

シーショックやエンドトキシンショックの所見と多くの類似点が認められた。したがって、HWショックの発症機序の解明には、これらのショックの発症機序との比較が有用であると考えられた。

HWショックの発症機序：はじめに、HWショックの発症とアナフィラキシー反応との関連について検討した。その結果、HWショックは、specific pathogen-free (SPF) 犬でも発症した。また、SPF犬と犬糸状虫非寄生犬の抽出液投与前の血清は、すべてウサギ受動皮膚アナフィラキシー反応が陰性であった。したがって、HWショックの発症には抗犬糸状虫抗体は関与していないことが確認できた。しかし、HWショックの発症時には血漿ヒスタミン濃度が上昇し、また、抽出液はラット摘出腹膜の肥満細胞や犬粘膜型肥満細胞を直接脱顆粒した。したがって、抽出液は非抗体依存性に肥満細胞を脱顆粒する物質を含むことが明らかにされ、これがHWショックの発症の一因となっていることが考えられた。

つぎに、エンドトキシンショックの病態発生に中心的な役割を果たす腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) が、HWショックの発症に関与しているか否かを検討した。その結果、HWショックでは血清TNF- $\alpha$ 濃度はほとんど上昇しなかった。また、血漿中にエンドトキシンは検出されず、体温も上昇しなかった。これに対して、リポ多糖の投与によりエンドトキシンショックを発症した犬では、血清TNF- $\alpha$ 濃度は投与30から180分後まで著しく上昇し、40℃以上の発熱が見られた。したがって、HWショックはエンドトキシンショックと発症機序が異なることが明らかになった。

HWショックの発症例には血漿ヒスタミン濃度がほとんど上昇しない例も認められたので、犬の腹部大動脈摘出標本を用いて抽出液による張力変化について検討した。その結果、抽出液は血管内皮細胞依存性に一酸化窒素を介して弛緩する物質および血管平滑筋に直接作用して収縮する物質を含むことが証明された。また、これらはいずれも分子量10kDa以上の異なる物質であることが明らかになった。

以上の所見から、HWショックの発症機序として、1)抽出液に含まれる肥満細胞脱顆粒誘発物質が肥満細胞を直接脱顆粒し、その結果遊離したヒスタミンがショックを誘発する、2)抽出液に含まれる血管弛緩物質あるいは血管収縮物質が腹部動脈または静脈を弛緩あるいは肝静脈を収縮し、腹部内臓血管床に血液を貯留してショックを誘発する、という2つの機序が考えられた。

ショック原因物質の分離：疎水性相互作用、陰イオン交換およびゲル濾過の3種類のクロマトグラフィーを用いて、抽出液からショック原因物質を分離精製したところ、ショック原因物質は分子量66kDaの蛋白質であることが明らかにな

った。

まとめ：HWショックは、腹部内臓血管床に血液が貯留して発症する血液分配異常性ショックであることが明らかになった。また、抽出液は非抗体依存性に肥満細胞を脱顆粒する作用や血管を弛緩あるいは収縮する作用を有することが明らかになり、これらがHWショックの発症機序に強く関与していることが示唆された。さらに、分子量66kDaの蛋白質をショック原因物質として分離した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

犬における犬糸状虫症ならびに人の回旋糸状虫症、バンクロフト糸状虫症あるいはマレー糸状虫症などの治療や予防の際に、ショックが発症することが知られている。これらのショックの原因は、成虫や子虫の死亡または損傷により漏出した虫体成分と考えられている。しかし、ショックの発症機序や原因物質は未だ明らかにされていない。本研究は、犬糸状虫成虫の虫体抽出液（抽出液）を用いてショックを誘発し、犬糸状虫によるショック（HWショック）の病態および発症機序を解明するとともに、その原因物質を明らかにすることを目的とした。

HWショックの病態：抽出液を犬に静脈内投与すると、50例中39例（78％）に、抽出液投与5から30分後に血圧の著しい低下、虚脱、可視粘膜蒼白、心音微弱などのショック症状が観察され、末梢血液中の白血球および血小板の減少、ALT、ALPなどの血清酵素活性の上昇を認めた。なお、このショックの発生は犬糸状虫の寄生の有無とは関係なかった。病理所見と循環動態から、腹部内臓血管床に血液が貯留して静脈還流量が減少する血液分配異常性ショックであることが明らかになった。

HWショックの発症機序：HWショックを発症した specific pathogen-free (SPF) 犬と犬糸状虫非寄生犬の抽出液投与前の血清を用いて犬糸状虫抗原に対するウサギ受動皮膚アナフィラキシー反応を行った結果、全例陰性であった。したがって、HWショックの発症には抗犬糸状虫抗体は関与していないことが確認できた。しかし、ショック発症時には血漿ヒスタミン濃度が上昇していた。また、抽出液はラット摘出腹膜の肥満細胞や犬粘膜型肥満細胞を直接脱顆粒した。したがって、抽出液には非抗体依存性に肥満細胞を脱顆粒する物質を含むことが明らかにされ、これがショックの発症の一因となっていることが考えられた。HWショックでは血清腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）濃度はほとんど上昇しなかった。また、血漿中にエンドトキシンは検出されず、体温も上昇しなかった。これに対して、リポ多糖の投与によりエンドトキシンショックを発症した犬では、血清 TNF- $\alpha$  濃度は投与後に著しく上昇し、40℃以上の発熱が見られた。したがって、HWショックはエンドトキシンショックと発症機序が異なることが明らかになった。HWショックの発症例には血漿ヒスタミン濃度がほとんど上昇しない例も認められたので、犬の腹部大動脈摘出標本を用いて抽出液による張力変化について検討した。その結果、抽出液は血管内皮細胞依存性に一酸化窒素を介して弛緩する物質および血管平滑筋に直接作用して収縮する物質を含むことが証明された。また、これらはいずれも分子量 10kDa 以上の異なる物質であること

が明らかになった。

これらの所見から、HW ショックの発症機序として、1)抽出液に含まれる肥満細胞脱顆粒誘発物質が肥満細胞を直接脱顆粒し、その結果遊離したヒスタミンがショックを誘発する、2)抽出液に含まれる血管弛緩物質あるいは血管収縮物質が腹部動脈または静脈を弛緩あるいは肝静脈を収縮し、腹部内臓血管床に血液を貯留してショックを誘発する、という2つの機序が考えられた。

ショック原因物質の分離：疎水性相互作用、陰イオン交換およびゲル濾過の3種類のクロマトグラフィーを用いて、抽出液からショック原因物質を分離精製したところ、ショック原因物質は分子量 66kDa の蛋白質であることが明らかになった。

本研究により、犬糸状虫の虫体抽出液によるショックは、血液が腹部内臓血管床に貯留することによる血液分配異常性ショックであること、抽出液中には非抗体依存性に肥満細胞を脱顆粒する作用や血管を弛緩あるいは収縮させる物質が含まれていることが明らかにされ、これらがHW ショックの発症に強く関与していることが示唆された。また、ショック原因物質として分子量 66kDa の蛋白質が分離された。

以上について、審査委員会全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

1. KITO, K., WATO, K., CHAYA, K., KITAGAWA, H. and SASAKI, Y. (1994). Clinical, hematologic, and biochemical findings in dogs after induction of shock by injection of heartworm extract. *Am. J. Vet. Res.* 55: 1535-1541.
2. KITO, K., WATO, K., KITAGAWA, H. and SASAKI, Y. (1994). Blood coagulopathy in dogs with shock induced by injection of heartworm extract. *Am. J. Vet. Res.* 55: 1542-1547.
3. KITO, K., KITAGAWA, H. and SASAKI, Y. (1998). Pathologic findings in dogs with shock induced by intravenous administration of heartworm extract. *Am. J. Vet. Res.* 59: 1417-1422.
4. KITO, K., MIKAMI, C., KITAGAWA, H. and SASAKI, Y. (2001). Hemodynamic alterations in dogs with shock induced by intravenous injection of heartworm extract. *J. Vet. Med. Sci.* (in press).
5. KITO, K., KATO, H., KITAGAWA, H., NAGASE, M., SASAKI, N. and SASAKI, Y. (2001). The role of histamine in heartworm extract-induced shock in dogs. *Am. J. Vet. Res.* (in press).
6. KITO, K., KATO, H., KITAGAWA, H. and SASAKI, Y. (2001). Serum tumor necrosis factor concentration in dogs with shock induced by intravenous injection of heartworm extract. *Am. J. Vet. Res.* (in press).
7. KITO, K., OKA, A., KITAGAWA, H., UNNO, T., KOMORI, S. and SASAKI, Y. (2001). Relaxing and contracting activities of heartworm extract on isolated canine abdominal aorta. *J. Parasitol.* (in press).

既発表学術論文

1. 林 隆敏, 鬼頭克也, 迫 悟, 山根乙彦 (1984). Simplate を応用した犬の出血時間測定法の検討. 日獣会誌 37: 366-369.
2. 北川 均, 佐々木榮英, 鬼頭克也, 竹橋史雄, 牧 秀雄, 松井昭秀, 草野健一, 古田哲也 (1992). ミルベマイシンオキシムのコリーに対する安全性. 日獣会誌 45: 953-955.
3. KITAGAWA, H., SASAKI, Y., KUMASAKA, J., MIKAMI, C., KITOH, K. and KUSANO, K. (1993). Clinical and laboratory changes after administration of milbemycin oxime in heartworm-free and heartworm-infected dogs. *Am. J. Vet. Res.* 54: 520-526.
4. 西村由香里, 鬼頭克也, 和藤賢治, 木原ゆかり, 北川 均, 佐々木榮英, 草野健一 (1994). 低ミネラル特別療法食の猫尿中ストラバイト結晶溶解および予防効果. 日獣会誌 47: 197-201.
5. 木原ゆかり, 鬼頭克也, 和藤賢治, 北川 均, 佐々木榮英 (1994). ラテックス凝集反応による犬糸状虫成虫抗原の検出. 日獣会誌 47: 583-586.
6. KITAGAWA, H., YASUDA, K., KITOH, K. and SASAKI, Y. (1994). Blood gas analysis in dogs with heartworm caval syndrome. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 861-867.
7. KITAGAWA, H., KITOH, K., YASUDA, K. and SASAKI, Y. (1995). Systemic oxygen delivery and consumption in dogs with heartworm disease. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 33-37.
8. 鬼頭克也, 水村芳弘, 北川 均, 佐々木榮英 (1995). 酵素抗体法改良型キットによる犬糸状虫成虫抗原の検出. 日獣会誌 48: 109-112.
9. SASAKI, Y., KITAGAWA, H., FUJIOKA, T., KITOH, K., IWASAKI, T., SAKAGUCHI, M. and INOUE, S. (1995). Hypersensitivity to japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 683-685.
10. 石川幸子, 鬼頭克也, 山添由香里, 出村尚子, 長村 徹, 岩崎利郎, 北川 均, 佐々木榮英, 草野健一 (1995). 犬の毛包虫症および疥癬に対するミルベマイシンオキシムの効果. 日獣会誌 48: 581-584.
11. 長村 徹, 鬼頭克也, 石川幸子, 藤岡 透, 岩崎利郎, 北川 均, 佐々木榮英, 草野健一 (1995). 子犬におけるミルベマイシンオキシムの犬回虫駆除効果. 日獣会誌 48: 875-878.
12. KITAGAWA, H., WAKAMIYA, H., KITOH, K., KUWAHARA, Y., OHBA, Y., ISAJI, M., IWASAKI, T., NAKANO, M. and SASAKI, Y. (1997). Efficacy of monotherapy with benazepril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, in dogs with naturally acquired chronic mitral insufficiency. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 513-520.
13. KITAGAWA, H., KITOH, K., IWASAKI, T. and SASAKI, Y. (1997). Comparison of laboratory data in dogs with heartworm caval syndrome surviving and nonsurviving after surgical treatment. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 609-611.
14. KITAGAWA, H., KITOH, K., OHBA, Y., KUWAHARA, Y., IWASAKI, T. and SASAKI, Y. (1998). Comparison of laboratory test results before and after surgical removal of heartworms in dogs with vena caval syndrome. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 21: 1134-1136.
15. KUWAHARA, Y., KOBAYASHI, R., IWATA, J., KITOH, K., KITAGAWA, H. and SASAKI, Y. (1999). Method of lymphocytotoxic crossmatch test for feline renal transplantation. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 481-485.

16. KITAGAWA, H., EGUCHI, T., KITOH, K., OHBA, Y., KONDO, M., NAKANO, M. and SASAKI, Y. (2000). Plasma concentrations of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, benazepril, and its active metabolite, benazeprilat, after repeated administrations of benazepril in dogs with experimental kidney impairment. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 179-185.
17. 鬼頭克也, 北川 均, 佐々木榮英 (2000). 犬の血管肉腫に合併した播種性血管内凝固症候群の1例. *日獣会誌* 53: 80-82.
18. KITAGAWA, H., KITOH, K., INOUE, H., OHBA, Y., SUZUKI, F. and SASAKI, Y. (2000). Plasma renin activities, angiotensin II concentrations, atrial natriuretic peptide concentrations and cardiopulmonary function values in dogs with severe heartworm disease. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 453-455.
19. OHBA, Y., KITAGAWA, H., KITOH, K., ASAHINA, S., NISHIMORI, K., YONEDA, K., KUNIEDA, T. and SASAKI, Y. (2000). Homozygosity mapping of the locus responsible for renal tubular dysplasia of cattle on bovine chromosome 1. *Mamm. Genome* 11: 316-319.
20. 北川 均, 溝口仁美, 鬼頭克也, 桑原康人, 大場恵典, 志水泰武, 大塚喜彦, 佐々木榮英 (2000). 肥満犬における血漿レプチン濃度. *日獣会誌* 53: 311-314.
21. OHBA, Y., KITAGAWA, H., KITOH, K., SASAKI, Y., TAKAMI, M., SHINKAI, Y. and KUNIEDA, T. (2000). A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomics* 68:229-236.
22. 北川 均, 鬼頭克也, 伊藤哲郎, 大場恵典, 金沢金吾, 長谷川弘美, 川合良郎, 古橋武, 佐々木榮英 (2000). 発育不良の黒毛和種牛における甲状腺機能. *日獣会誌* 53: 735-739.