

氏 名 (本籍)	小林 沙 織 (秋田県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 2 0 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 8 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	ラクトフェリン投与が Feline Immunodeficiency Virus(FIV)感染ネコの免疫能に及ぼす影響
審 査 委 員	主査 岩手大学 教授 内藤 善久 副査 帯広畜産大学 教授 斎藤 篤志 副査 岩手大学 教授 小林 晴男 副査 東京農工大学 教授 岩崎 利郎 副査 岐阜大学 教授 北川 均

論 文 の 内 容 の 要 旨

FIV 感染症では、体液性および細胞性免疫能の機能不全に陥り、HIV 感染症と類似した臨床症状や後天性免疫異常が引き起こされる。本感染症では、病期が進行すると様々な慢性炎症性疾患がみられるようになる。また、FIV 感染ネコではしばしば難治性口内炎が観察される。FIV 感染症の根絶的治療法はいまだ確立されていないため、小動物臨床現場では難治性口内炎に対しては、抗生物質や抗炎症剤であるグルココルチコイドの全身投与が広く行われている。しかし、それらの薬剤の長期投与は、菌交代現象や著しい免疫抑制などの副作用を引き起こすため、使用は短期間に限定される。

ラクトフェリン (LF) は、唾液などの外分泌液および好中球の三次顆粒中に存在する糖タンパクであり、宿主防御や免疫調節に関わっている。最近の研究では、難治性口内炎を呈した FIV 感染ネコに対して、ウシラクトフェリン(bLF)を経口投与すると臨床症状が緩和することが明らかとなった。しかし、bLF の治療効果における作用機序は、いまだ不明の点が多い。そこで本研究では、FIV 感染ネコにおける bLF の抗炎症作用および免疫調節作用の機序を解明することを目的として以下の研究を行った。

第一章では、FIV 感染ネコの難治性口内炎に対する bLF の治療効果を検討した。その結果、bLF の経口投与は様々な病期における FIV 感染ネコの難治性口内炎に対して効果的で、抗炎症作用を示すことが確認された。また、bLF の治療によって、FIV 陰性ネコにおける歯肉炎および口内炎も改善した。

第二章では、bLF の治療効果の機序を解明するために、好中球およびリンパ球機能に

対する bLF の調節作用を検討した。特に炎症に深く関与する補体レセプター発現への bLF 経口投与の調節作用を、無症状キャリア(AC)期 FIV 陽性ネコを用いて検討した。その結果、bLF 投与前では、AC 期 FIV 陽性ネコの補体レセプター CD35 発現が FIV 陰性ネコと比べて増加していた。そのことから、FIV 陽性ネコの生体内では、好中球が活性化していることが明らかとなった。bLF の経口投与は、FIV 陰性および AC 期 FIV 陽性ネコ好中球における補体レセプター CD35 発現を減少させた。この所見から、bLF 経口投与は好中球外部環境あるいは好中球自身に作用することによって好中球への刺激と炎症反応を減弱させていることが示唆された。

次に、FIV 陰性ネコ、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 期および AIDS 関連症候群 (ARC) 期 FIV 陽性ネコの末梢血単核細胞 (PBMC) をコンカナバリン A (ConA) 刺激した際のサイトカイン発現について、bLF 添加培養がどのような影響を及ぼすのかを検討した。半定量的 RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR により検討した結果、ConA は interferon- γ (IFN- γ) mRNA の発現のみを誘導し、他の interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) や IL-12p40 mRNA の発現は誘導しなかった。この ConA により増加した IFN- γ mRNA の発現は、ConA 刺激 30 分前だけでなく 10、20、40 分後の bLF 添加によっても著しく阻害されることが明らかとなった。したがって、bLF はすでに誘導された炎症性サイトカインの発現を抑制する効果を持つ可能性が示唆された。

続いて、PBMC 細胞内シグナル伝達経路の活性化と ConA によって誘導されるサイトカイン発現との関係を検討した。ウェスタンブロッティングにより、FIV 陰性ネコ PBMC におけるチロシンキナーゼ (PTK) および細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) は、ConA 刺激後 10 分以内に活性化し、両キナーゼとも ConA 刺激 40 分までにはその活性がなくなった。さらに、ConA 誘導 IFN- γ mRNA の発現は、PTK 阻害剤である genistein および ERK 阻害剤である PD-98059 によってある程度抑制された。これらの結果から、bLF は、ConA が ConA のレセプターと結合した後に活性化された PTK/ERK 非依存性細胞内伝達経路あるいは ERK の下流を干渉することによって、ConA 誘導 IFN- γ mRNA の発現を抑制していることが示唆された。

さらに、bLF の経口投与による FIV 陰性ネコおよび ARC 期以降の FIV 陽性ネコ PBMC における IFN- γ mRNA の発現量の変化を検討した。FIV 感染症では、病期が進行した状態でも HIV 感染症とは異なり、PBMC の IFN- γ の発現や ConA に対する反応性は比較的保たれていることが明らかとなった。bLF の経口投与は、FIV 陰性ネコおよび FIV 陽性ネコの PBMC における IFN- γ 発現量を抑制しなかった。そのため、bLF の経口投与は末梢血中における IFN- γ 発現量の調節作用は弱いと考えられた。また、ConA に対する反応性を増加させていたため、PBMC 機能を賦活化させている可能性が示唆された。したがって、bLF は全身ではなく局所において誘導された IFN- γ の発現に抑制的に作用することが考えられた。

以上のことから、本研究では、bLF の経口投与が様々な病期における FIV 感染ネコの難治性口内炎に対して治療効果のあることが明らかとなった。bLF の難治性口内炎に対する抗炎症効果は、好中球やリンパ球などの免疫担当細胞やサイトカインネットワーク、補体系を外因性 bLF が調節することによって発揮している可能性が考えられた。

したがって、bLF は免疫低下の状態では慢性炎症を持つ有症期 FIV 陽性ネコに対して長期間投与できる免疫調整物質であり、bLF による治療は生体内でのさまざまな病態における炎症応答を軽減させるには有益であると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

第一章では、FIV 感染ネコの難治性口内炎に対する ウシラクトフェリン (bLF) の治療効果を検討し、bLF の経口投与が様々な病期における FIV 感染ネコの難治性口内炎に対して効果的で、抗炎症作用を示すことを確認した。

第二章では、bLF の治療効果の機序を解明するために、好中球およびリンパ球機能に対する bLF の調節作用を検討した。1) 炎症に関与する好中球補体レセプター発現への bLF 経口投与の調節作用を検討した。bLF の経口投与は、FIV 陰性および無症状キャリア期 FIV 陽性ネコの好中球 CD35 発現を減少させた。2) bLF 添加培養がコンカナバリン A (ConA) 刺激した末梢血単核細胞 (PBMC) のサイトカイン発現に及ぼす影響を検討した。ConA は interferon- γ (IFN- γ) mRNA の発現のみを誘導し、interleukin-1 β 、tumor necrosis factor- α や IL-12p40 mRNA の発現は誘導しなかった。ConA により増加した IFN- γ mRNA の発現は、ConA 刺激 30 分前だけでなく 10~40 分後の bLF 添加によっても著しく阻害されることが明らかとなった。3) PBMC 細胞内シグナル伝達経路の活性化と ConA によって誘導されるサイトカイン発現との関係を検討した。PBMC に対する ConA の刺激は、刺激後 40 分以内にチロシンキナーゼ (PTK) および細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) によってシグナル伝達されることが明らかとなった。ConA 誘導 IFN- γ mRNA の発現は、PTK 阻害剤 (genistein) および ERK 阻害剤 (PD-98059) によってある程度抑制されたことから、bLF は ConA が ConA のレセプターと結合した後に活性化された PTK/ERK 非依存性細胞内伝達経路あるいは ERK の下流を干渉することによって、ConA 誘導 IFN- γ mRNA の発現を抑制していることが示唆された。4) bLF の経口投与による FIV 陰性ネコおよび ARC 期以降の FIV 陽性ネコ PBMC における IFN- γ mRNA の発現量の変化を検討した。bLF の経口投与によって、PBMC の ConA に対する反応性は増加したが、IFN- γ 発現量の変化は認められなかった。

本研究により、bLF の経口投与が様々な病期における FIV 感染ネコの難治性口内炎に対して治療効果を示すことが明らかとなり、好中球やリンパ球やサイトカインネットワーク、補体系を調節することによって抗炎症効果を発揮している可能性が示唆された。したがって、bLF は免疫低下の状態では慢性炎症を持つ有症期 FIV 陽性ネコに対して長期間投与できる免疫調整物質であり、bLF による治療は生体内での様々な病態における炎症応答を軽減させるには有益であると考えられた。

以上について、審査委員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があると認めた。

基礎となる学術論文

- 題 目 : Reduction of concanavalin A-induced expression of interferon- γ by bovine lactoferrin in feline peripheral blood mononuclear cells
- 著 者 名 : Kobayashi, S., Sato, R., Inanami, O., Yamamori, T., Yamato, O., Maede, Y., Sato, J., Kuwabara, M. and Naito, Y.
- 学術雑誌名 : Veterinary Immunology and Immunopathology
- 巻・号・頁・発行年 : 105(1-2) : 75-84, 2005

その他の論文

- 題 目 : ネコ免疫不全症ウイルス (FIV) 感染におけるウシラクトフェリンの抗炎症作用
- 著 者 名 : 佐藤れえ子, 小林沙織, 稲波 修, 佐藤 淳, 山田裕一, 内藤善久, 佐々木重荘
- 学術雑誌名 : ミルクサイエンス
- 巻・号・頁・発行年 : 53(4) : 296-298, 2004