

(14)

氏名(本国籍)	高島 諭(富山県)
主指導教員名	岐阜大学 教授 北川 均
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第417
学位授与年月日	平成26年3月13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	岐阜大学
学位論文題目	ネコの抗インスリン自然自己抗体(IgG)に関する研究
審査委員	主査 岐阜大学 教授 志水泰武 副査 帯広畜産大学 教授 猪熊 壽 副査 岩手大学 教授 佐藤 れえ子 副査 東京農工大学 教授 渡辺 元 副査 岐阜大学 教授 北川 均

学位論文の内容の要旨

ネコでは、投与された異種動物に由来するインスリン製剤に反応して抗体が産生され、インスリン製剤の効果を減ずる場合があるが、膵臓の β 細胞抗原や自己分泌インスリンに対する自己抗体は存在しないとされてきた。しかし最近になって、少数の健康なネコの血清から自己分泌インスリンに親和性を示す免疫グロブリンG(抗インスリンIgG)が発見された。健康なネコはインスリン投与歴がなく、これらのネコから検出された抗インスリンIgGは、外来性インスリンに反応して産生された抗体ではなく、自己分泌インスリンと結合する自然自己抗体であると推察される。自然自己抗体は、正常な免疫系の一部であるとみなされ、老化・変性した自己抗原の排除、免疫機能の調節等により正常な生命活動を維持する役割を担うと考えられている。健康なネコの血清から発見された抗インスリンIgGは、自己インスリンに結合する自然自己抗体として、ネコの生命活動に有用である可能性がある。本研究は、ネコの抗インスリン自然自己抗体の生理的役割を解明することを目的として以下の内容を実施した。

第1章では、ネコの抗インスリンIgGの血漿濃度を測定するための酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を作製し、その測定精度を確認した。作製したELISAは、直線性の高い標準曲線と低い変動係数を示し、希釈試験や添加回収試験においても良好な成績を示した。また、このELISAを用いてインスリン投与歴のない健康なネコ84頭の血漿濃度を測定した。その結果、測定したすべてのネコが抗インスリンIgGを保有していること、その濃度が80 $\mu\text{g/ml}$ から1578 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、中央値が221 $\mu\text{g/ml}$ であること、さらに血漿抗インスリンIgG濃度はネコの性別、年齢、肥満度および血漿インスリン濃度とは関係がなく、

さらに、糖尿病などの疾病ネコにおいても高濃度あるいは低濃度を示さないことを示した。この結果は、健康なネコが自己インスリンを抗原として認識する IgG を自然に保有することの証明となる。

第2章では、ネコの抗インスリン IgG がインスリンの作用に与える効果をネコ成熟脂肪細胞へのグルコースの取込量とそれに関係するリン酸化チロシンタンパク質の検出量の変化から評価した。健康なネコの血清から抗インスリン IgG を精製し、インスリンに対する親和性に基づいたアフィニティクロマトグラフィーによって最初に溶出する第1分画と次に溶出する第2分画に分けた。この第1分画をインスリンと同時に脂肪細胞に添加すると、インスリンを単独で添加した場合よりも、細胞のグルコース取り込み量とリン酸化チロシンタンパク質の検出量が増加した。いっぽう、第2分画とインスリンを同時に添加すると、細胞のグルコース取り込み量とリン酸化チロシンタンパク質の検出量は、インスリン単独で添加した場合と同等であった。健康なネコが血清中に保有する抗インスリン自然自己抗体には、インスリンの作用を増強する効果のある分画と、増強する効果のない分画があることが明らかとなった。

第3章では、抗インスリン IgG がインスリン作用を増強する機序について検討した。ネコの抗インスリン IgG は多クローン性および多反応性であることが明らかとなっている。抗インスリン IgG とインスリンが混在すると、インスリン分子上に複数存在する抗原部位に抗インスリン IgG が同時に結合することにより多分子複合体を形成する可能性がある。抗インスリン IgG 第1分画によるインスリン作用増強効果に IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関係するかどうかを検討した。IgG は、パイン処理により Fab フラグメント化し、複数の抗原と結合できなくなり、抗原が架橋した多分子複合体を形成することができなくなる。パイン処理後の抗インスリン IgG 第1分画は、インスリンの増強作用を消失した。このことは、抗インスリン IgG 第1分画によるインスリンの作用増強効果に、IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関係すると考えられた。

本研究では、ネコが保有する抗インスリン自然自己抗体の血漿濃度およびインスリンの作用に与える効果について検討し、測定したすべてのネコが抗インスリン IgG を保有すること、抗インスリン IgG の一部がインスリンの作用を増強すること、その作用には多分子複合体形成が関係する可能性を示した。ネコが抗インスリン自然自己抗体を持つ生理的意義については、さらに検討する必要があるが、この研究の成果は、ネコの保有する抗インスリン自然自己抗体の持つ機能について有用な情報を提供すると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

ネコでは異種由来インスリンに対する抗体は存在するが、自己の β 細胞抗原やインスリンに対する抗体は存在しないとされてきた。しかし最近になって、健康ネコの血清から自己分泌インスリンに親和性を示す IgG (自然自己抗体) が発見された。本学位論文では、ネコの保有する抗インスリン自然自己抗体の生理的役割を解明することを目的として以下の事項を検討した。

まず、ネコにおける抗インスリン IgG の血漿濃度測定用の酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を作製し、その測定精度を確認するとともに、健康ネコの血漿濃度を測定した。作製した ELISA は良好な測定精度を示し、測定した 84 頭すべてのネコで抗インスリン IgG が検出された。また、血漿抗インスリン IgG 濃度は、ネコの性別、年齢、肥満度および血漿インスリン濃度とは関係がなく、糖尿病等の疾病において特異な濃度を示さなかった。

次に、ネコの抗インスリン IgG をアフィニティクロマトグラフィーによって最初に溶出

する第1分画と次に溶出する第2分画に分け、インスリン作用に与える効果を、ネコ成熟脂肪細胞の糖取込量とそれに関わるリン酸化チロシンタンパク質検出量の変化から評価した。インスリンと第1分画の同時添加では、インスリン単独よりも脂肪細胞の糖取込量が増加し、リン酸化チロシンタンパク質検出量も増加した。いっぽう第2分画では、糖取込量とリン酸化チロシンタンパク質検出量は増加しなかった。ネコの抗インスリン IgG には、インスリン作用を増強する分画と増強しない分画があることが明らかとなった。

さらに、抗インスリン IgG 第1分画によるインスリンの作用増強効果に、IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関係するかどうかを検討した。パパイン処理により Fab フラグメント化し、多分子複合体を形成できなくした抗インスリン IgG 第1分画は、インスリン増強作用を消失した。抗インスリン IgG のインスリン作用増強効果には、IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関係すると考えられた。

本論文では、ネコが保有する抗インスリン IgG の血漿濃度とインスリン作用に与える影響について検討し、すべてのネコが抗インスリン IgG を保有すること、その一部がインスリン作用を増強すること、その作用には多分子複合体形成が関係する可能性を示した。これらはすべて新知見である。

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

- 1) 題 目 : Natural anti-insulin autoantibodies in cats: Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of plasma anti-insulin IgG and its concentrations in domestic cats
著 者 名 : Takashima, S., Nishii, N., Hachisu, T., Kojima, M., Kigure-Hoshino, M., Ogawa, S., Suzuki, T., Iwasawa, A., Ohba, Y. and Kitagawa, H.
学術雑誌名 : Research in Veterinary Science
巻・号・頁・発行年 : 95 (3) : 886-890, 2013

既発表学術論文

- 1) 題 目 : 酵素抗体法による猫の血漿インスリン濃度測定キットの臨床的評価
著 者 名 : 保田恭志, 西飯直仁, 大場恵典, 高島 諭, 高木 充, 東畑有希, 柴田治樹, 北川 均
学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌
巻・号・頁・発行年 : 63 (6) : 449-452, 2010
- 2) 題 目 : アンジオテンシン変換酵素阻害薬とスピロノラクトンを併用した僧帽弁閉鎖不全犬の血漿カリウム濃度の推移
著 者 名 : 佐々木慎哉, 保田恭志, 柴田真治, 高島 諭, 西飯直仁, 高須正規, 大場恵典, 北川 均
学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌
巻・号・頁・発行年 : 63 (8) : 625-629, 2010
- 3) 題 目 : Insulin responses to administrations of amino acids and fatty acids in healthy cats
著 者 名 : Yasuda, K., Takashima, S., Takagi, M., Nishii, N., Ohba, Y. and Kitagawa, H.

学術雑誌名：Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年：73 (10)：1281-1286, 2011

- 4) 題 目：消化管近傍リンパ節に T 細胞性リンパ腫を発症した若齢犬の 1 例
著 者 名：高島 諭, 大場恵典, 渡邊一弘, 児玉篤史, 酒井洋樹, 高木 充,
北川 均

学術雑誌名：日本獣医師会雑誌

巻・号・頁・発行年：64 (5)：390-393, 2011