

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14869

研究課題名(和文) 犬毛包虫症における自己免疫反応を軸とした分子病態の解明

研究課題名(英文) Studies on autoimmune responses in molecular pathology of canine demodicosis

研究代表者

前田 貞俊 (MAEDA, Sadatoshi)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50377694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：犬毛包虫症に罹患していた犬より採取した皮膚を3匹のNOD-SCIDマウスに移植することが出来た。3頭の犬(皮膚を採取した犬、毛包虫症に罹患している犬、健常犬)から採取したCD8+リンパ球をマウスに移入した。リンパ球の移入による臨床症状は認められなかった。リンパ球移入42日後に皮膚病理組織学的検査を実施したが、表皮、真皮および毛包において炎症は認められなかった。3匹のマウスの病理組織学的所見に差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The skin sample obtained from a dog that had suffered canine demodicosis were successfully transplanted in three NOD-SCID mice. CD8+ lymphocytes collected from three dogs (a dog which skin had been collected, a dog with canine demodicosis, a healthy dog) were then transferred to the mice. The lymphocyte transfer did not induce any clinical signs. Forty two days after the lymphocyte transfer, a dermatopathological examination was performed and indicated no inflammation in epidermis, dermis and follicles. These were no significant difference on pathological findings among three different mice.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：犬毛包虫症

1. 研究開始当初の背景

毛包虫症は犬、猫および人に発症する外部寄生性皮膚疾患である。猫および人においては極めてまれな疾患であるが、犬においてはいかなる年齢においても発症し、重度な痒みを伴う一般的な皮膚疾患である。毛包虫は共生生物であり、健康な生物においても検出されるが、寄生数が少数であれば皮膚炎は発症しない。寄生数が多い場合、重度な痒痒を伴う皮膚炎を発症するため、殺虫剤による治療を必要とする。しかしながら、殺虫剤による治療に反応しない症例も存在し、このような場合は安楽死の処置がとられることもある。したがって、殺虫剤に依存しない、毛包虫症の病態に基づいた治療法の開発が求められているが、病態解明は一向に進んでいない。

これまで、本疾患の病態には免疫不全が関与していると考えられてきた。しかしながら、これまでの研究を検証してみると、免疫不全を示す客観的な根拠は示されておらず、多くの論文が 1970 年代に実施された結果をもとに、盲目的に免疫不全説を支持しているに過ぎない。申請者は、本疾患の免疫病態を解明するために、汎発性毛包虫症と診断した犬の末梢血および皮膚病変部におけるアポトーシス関連遺伝子の転写量を評価した。その結果、病変部のみならず、末梢血においても Perforin や Granzyme B などの転写量が健常犬のものに比べて有意に高いことが示された。さらに、殺虫剤 (イベルメクチン) を用いた治療前後でリンパ球サブセットの評価が可能であった 2 頭においては、皮膚病変の消失後も、CD8⁺リンパ球の割合が高値を示した。以上の結果より、毛包虫症症例において認められる毛包上皮細胞のアポトーシスならびに CD8⁺リンパ球の浸潤は、毛包虫症の過剰増殖によって引き起こされた結果ではなく、むしろ病因なのではないか? という斬新な仮説を提案するに至った。

2. 研究の目的

毛包虫症の犬においては、毛包上皮細胞に遊走する細胞傷害性 T 細胞が存在することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 供試動物

本研究では、汎発性毛包虫症と診断された症例 2 頭 (イヌ A および B) および健常犬 1 頭 (イヌ C) を用いた。イヌ A は、ボストンテリア、未去勢雄、1 歳 1 ヶ月齢であった。下顎部、腋窩部および下腹部に痒痒を認め、汎発性毛包虫症と診断された。その後、5 ヶ月間にわたるイベルメクチンの投薬によって、寛解状態を維持していた (図 1)。イベルメクチンの投薬を中止して 1 ヶ月後に皮膚サ

ンプルおよび血液サンプルを採材した。



(a) 発症時におけるイヌ A の外貌



(b) 発症時の皮膚



(c) 寛解時の皮膚

図 1 皮膚移植に用いた汎発性毛包虫症症例 (イヌ A)

イヌ B は、ラブラドル・レトリバー、避妊雌、12 歳 3 ヶ月齢であった。免疫介在性多発性関節炎に対してプレドニゾロンおよびミコフェノール酸モフェチルによる治療を行っていたところ、汎発性毛包虫症を発症したが、イベルメクチンを用いた治療を開始したが、寛解は得られなかった。治療開始 21 日後に血液サンプルを採材した。

イヌ C は皮膚病変を認めない実験用ビーグル、未避妊雌、4 歳 1 ヶ月齢であった。

(2) 皮膚サンプル採材および NOD-SCID マウスへの移植

皮膚サンプルは、イヌ A の右腹側部の 4 カ所より採材した。剃毛後、70%エタノールおよび消毒用ヨード液を用いて採材部位を消毒した。2%リドカインを皮下投与したのち、

6 mm トレパンを用いて皮膚サンプルを採材した。4 つの皮膚サンプルのうち 3 つは、皮膚移植に向けてペニシリン 100 units/ml およびストレプトマイシン 100 μ g/ml を含有する PBS に浸漬し、一時的に 4 $^{\circ}$ C で冷蔵保存した。残りの 1 つは 10%ホルマリンにより固定し、パラフィン切片を作製した。HE 染色による病理組織学的検査を実施したところ、1 隻の毛包虫を認めたが、真皮や毛包および付属器周囲において炎症細胞の浸潤は認められなかった。以上の所見から、採材部位の病変は寛解しているものと判断した。採材した 3 つの皮膚サンプルを、3 匹の NOD-SCID マウス (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J、雌、7 週齢) にそれぞれ移植した。ペントバルビタールの腹腔内投与およびイソフルランの吸入による麻酔下において、マウスの背部を剃毛し、70%エタノールおよび消毒用ヨード液を用いて術野を消毒した。背部肩甲骨間の皮膚を 1 cm 切開し、イヌ A より採材した皮膚を移植した。移植部位の乾燥防止を目的として滅菌ワセリンを塗布した。ガーゼで移植部位を覆った後、粘着性布伸縮包帯で保護した。2 匹は移植後 16 日目に、残りの 1 匹は 30 日目に粘着性布伸縮包帯を除去した。

(3) リンパ球の培養

イヌ A、B および C より全血 5 ml を採取し、Lymphoprep を用いて PBMC を分離した。PBMC を 25cm² フラスコ内で RPMI-1640 培地に浮遊させ、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ インキュベーターにて 1 時間静置することにより、単球を除去し、リンパ球のみを回収した。イヌ抗 CD3 抗体を固相化させた 25cm² フラスコと、2.5%FBS を添加したヒト IL-2 (700 RU/ml) を含むリンパ球培養液 (LAM-1) を用いて、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で 1 週間培養した。その後、培養リンパ球を固相化フラスコから非固相化の 75cm² フラスコに移し、ヒト IL-2 (175 RU/ml) を含むリンパ球培養液 (LAM-2) を用いて培養した。非固相化フラスコでの培養がコンフルエントに達した時点で、培養リンパ球を回収し、-80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。培養目標細胞数に達するまで、これらの固相化および非固相化フラスコを用いた培養を繰り返した。

(4) CD8⁺リンパ球の分離

凍結保存していた培養リンパ球を解凍した後、LAM-2 で一晩培養した。培養後、FITC Rat Anti Dog CD4 抗体 (YKIX302.9) を加えて、遮光下、4 $^{\circ}$ C、30 分間反応させた。その後、anti-FITC 抗体を結合させたマイクロビーズを加えて、4 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた。反応後、磁気細胞分離法 (MACS Cell Separator、Miltenyl Biotec) によって、培養リンパ球から CD4⁺リンパ球のみをカラム吸着させた。トリプブル法によって CD4⁺リンパ球を除いた培養リンパ球の生存率を算出した。さらに、FITC Rat Anti Dog CD4 抗体 (YKIX302.9) および Alexa 647 Rat Anti Dog CD8 抗体

(YCATE55.9) を加えて、遮光下、4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、フローサイトメーター (FACS Canto II、BD Biosciences) を用いて CD8⁺リンパ球の割合を算出した。

(5) マウスへの移入

培養リンパ球を 500 μ l の PBS 中に懸濁させ、2.5 ml シリンジを用いて皮膚を移植した 3 匹の NOD-SCID マウスに腹腔内投与した。

4. 研究成果

(1) リンパ球の培養と CD8⁺リンパ球の分離

培養によって 2-3 $\times 10^7$ の CD8⁺リンパ球を得ることができた。生存率は 80%以上であり、CD8⁺リンパ球の割合はそれぞれ 97.7%、96.7%

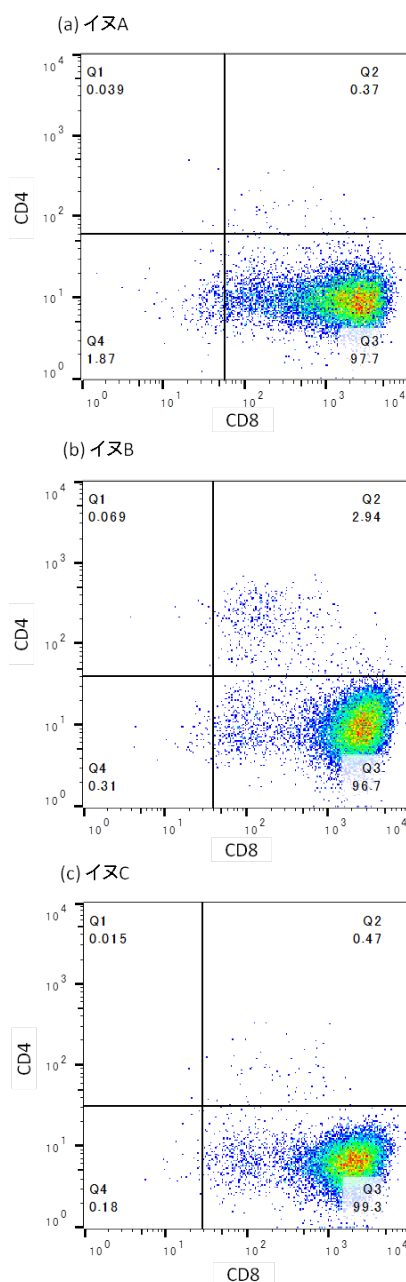


図 2 移入したリンパ球における CD4 および CD8 の発現。

および 99.3%であった (図 2)。

(2) 皮膚移植

皮膚移植 43 日後に、3 匹の NOD-SCID マウスのすべてにおいて、移植皮膚片からの発毛を認めた (図 3)。また、65 日後において、すべての移植皮膚片で被毛数の増加と伸長を認めたことから、移植皮膚片はマウスに定着したと判断した (図 4 および 5)。

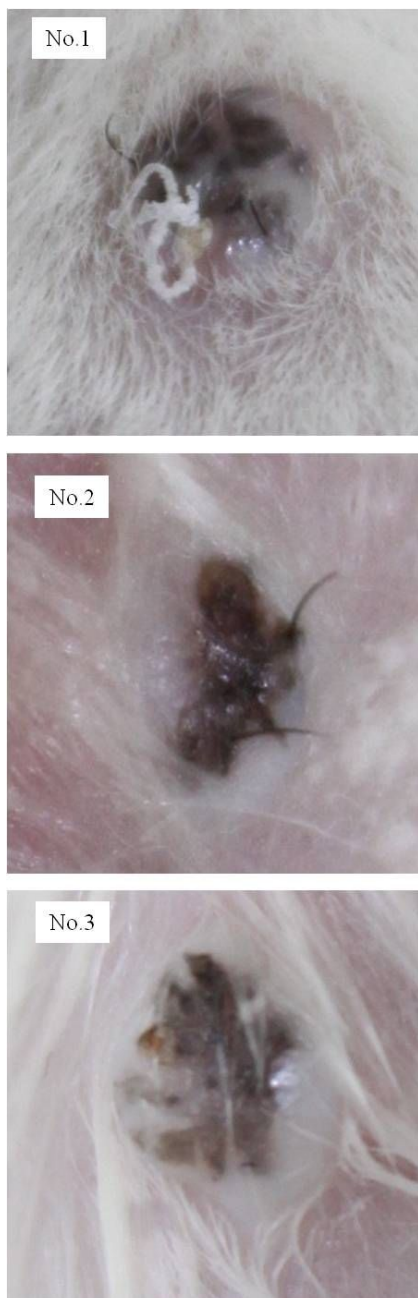


図 3 移植 43 日後における NOD-SCID マウスの移植皮膚片の外観 (マウス No.1: イヌ A リンパ球を移入; No.2: イヌ B リンパ球を移入; No.3: イヌ C リンパ球を移入)。



図 4 皮膚移植 65 日後におけるマウス NO.1 の外観。



図 5 移植 65 日後における NOD-SCID マウスの移植皮膚片の外観 (マウス No.1: イヌ A リンパ球を移入; No.2: イヌ B リンパ球を移入; No.3: イヌ C リンパ球を移入)。

(3)皮膚病理組織学的検査

リンパ球移入 42 日後に採材した移植皮膚片について、パラフィン切片を作製し、HE 染色による組織学的評価を実施した。いずれの NOD-SCID マウスの移植皮膚片においても、毛包上皮のアポトーシスや毛包構造の破壊像などの組織学的異常所見は認められなかった。また、各 NOD-SCID マウスで組織を比較したが、毛包構造に違いは認められなかった (図 6)。

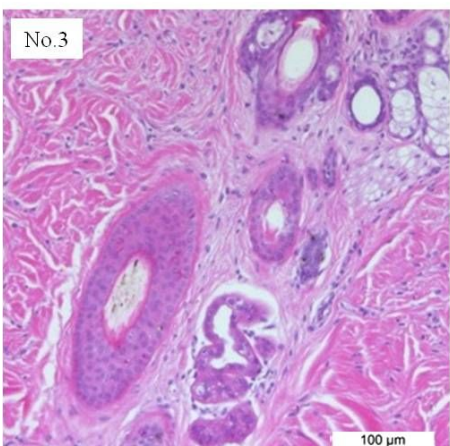
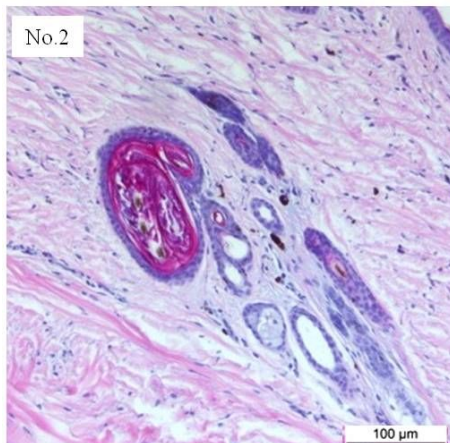
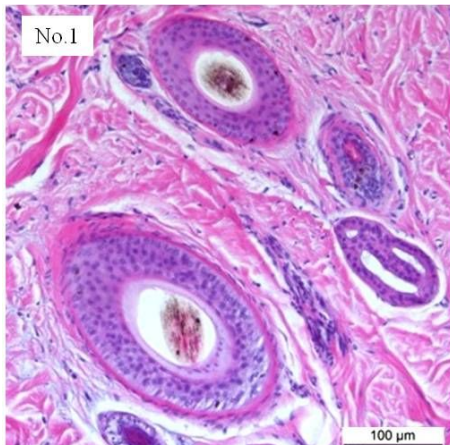


図 6 NOD-SCID マウスに移植した移植皮膚片における毛包構造の比較 (マウス No.1: イヌ A リンパ球を移入; No.2: イヌ B リンパ球を移入; No.3: イヌ C リンパ球を移入)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 貞俊 (MAEDA Sadatoshi)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 50377694

(2) 研究分担者

谷 健二 (TANI Kenji)
山口大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号: 00365420
西藤 公司 (NISHIFUJI Koji)
東京農工大学・農学研究院・准教授
研究者番号: 20365422

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし