

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780277

研究課題名（和文）新たな犬好中球機能不全症の謎を解き明かすー治療法の確立を目指してー

研究課題名（英文）Clarification of unaccountable mechanisms in novel canine neutrophil dysfunction to find new treatment

研究代表者

小林 沙織（KOBAYASHI SAORI）

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：60566214

研究成果の概要（和文）：

新たな好中球機能不全症を有する雑種犬を発見した。本症は、遺伝子変異を伴わない好中球 $\beta 2$ インテグリン発現の減少が原因であり、著しい殺菌能の低下をもたらすことが明らかとなった。ウシラクトフェリンの長期経口投与は、 $\beta 2$ インテグリン発現を増加させ、一連の好中球機能を回復させるとともに、臨床症状を改善させることが明らかとなった。好中球機能不全症に対する新たな根治療法を提案できる研究成果となったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We found a mixed-breed male dog with novel familial neutrophil dysfunction. The disorder was caused by a decrease of $\beta 2$ -integrin expression encoding CD18 without mutation, followed by a profound decrease of superoxide production. Our results indicate that oral treatment with bovine lactoferrin increases neutrophil $\beta 2$ -integrin transcript level, leading to the upregulation of neutrophil functions and improvement of clinical symptoms in the dog with familial neutrophil dysfunction.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：家族性好中球機能不全症、 $\beta 2$ -インテグリン、犬、ウシラクトフェリン、CD11b/CD18

1. 研究開始当初の背景

好中球機能不全症は、ヒトおよび動物において若齢時からの易感染性および重度の細菌・真菌感染の再発を特徴とし、生命に関わる疾患のひとつである。そのため、人医学領域では、好中球機能不全症に対する研究が展開され、病態解明および治療法の検討の結果、好中球の貪食・活性酸素産生に関与する様々な因子の欠

損ないし不全による機能異常症の存在が証明されている。しかしその一方で、小動物獣医学領域では、アイリッシュセッターのイヌ白血球粘着不全症、ワイマラナーやドーベルマンピンシャーの好中球機能不全症などの純血種における少数の報告がされている以外、これら以外の好中球機能不全症については国内外ではほとんど研究が展開されていない。このため、報告のある

純血種以外の犬種において、小動物臨床現場では、好中球機能不全症の存在は見逃されていることが多く、診断に至ったとしても治療法に関する情報がないのが現状である。

先天性の好中球機能不全症は、「若齢時から易感染性および細菌・真菌感染を繰り返し、抗生物質等の治療で回復しない」という所見が認められた場合にその存在が強く疑われる。このような状況の中、申請者は、生後数ヶ月から細菌感染を繰り返し、治療に反応せず重症化した雑種同腹犬2頭を見出した。患者の病歴から、家族性の好中球機能不全症が強く疑われたが、好中球機能を精査した結果、好中球殺菌能の著しい低下を特徴とした好中球機能不全症を雑種犬に見出した。これまで報告のある殺菌能の著しい低下を特徴としたイヌの好中球機能不全症には、遺伝子変異が原因で発症するアイリッシュセッターの犬白血球粘着不全症が挙げられる。しかし、雑種犬の本症例では該当の遺伝子変異は発見されず、犬白血球粘着不全症とは異なる原因で発症していることが考えられたが、ヒトを含め他の動物でも同様の病態は見当たらない。そのため、本症例は新たな好中球機能不全症に分類されるべき疾患である可能性が高く、病態解明によって獣医療への有用な知見・情報が提供可能となり、またひとつ、病気の解明の進展につながることを期待された。

2. 研究の目的

家族性の好中球機能不全症を疑う症例犬における発症原因の究明および治療法の開発を目指し、次の項目を検討することを目的とした。

- (1) 本症例の遺伝的背景の精査
- (2) 本症例における好中球機能不全症の発症の病態解明
- (3) 本症例の好中球機能不全症へのウシラクトフェリン療法の検討

3. 研究の方法

(1) 遺伝学的背景の精査：家系調査、同腹犬の娘犬と父犬との戻し交配、臨床症状の観察および好中球機能検査の実施。

(2) 好中球機能不全症の発症の病態解明：検鏡による好中球の形態評価、好中球機能検査（ファイバーカラム法による接着能、フローサイトメトリー法による貪食能、オプソニン化能、ルミノール化学発光法による殺菌能の評価）、好中球接着分子 CD11b/CD18 発現の評価（フローサイトメトリー法による膜発現およびリアルタイム PCR 法による遺伝子発現の測定）、ウェスタンブロッティング法による NADPH オキシダーゼコンポーネントの発現の測定、クローニングによる好中球 $\beta 2$ インテグリン遺伝子配列の変異の有無についての検索。

(3) ウシラクトフェリン経口投与試験の実施：長期にわたるウシラクトフェリン経口投与を好中球機能不全症例に対して実施し、臨床症状および好中球機能へ及ぼす治療効果を検討した。ウシラクトフェリンは、乳汁より分離精製した天然型のもので用量は1日あたり 40mg/kg を少量の水に溶解させ、経口投与させた。

4. 研究成果

(1) 遺伝的背景の精査

家系の調査によると、母犬は9歳齢で死亡したが生涯無症状であったとのことであった。父犬は生存していたが、無症状であるとのことであった。症例2例には、雌1頭・雄2頭の同腹犬がいるとのことだった。そのうちの雌の同腹犬と父犬との戻し交配を実施した結果、4頭の子犬（雄1頭、雌3頭）が産まれた。臨床症状の継続的な観察と共に、好中球機能検査（吸着能、殺菌能、貪食能、インテグリン発現量の評価）を実施した。好中球機能不全症を有した症例犬2例では生後3カ月より、上部気道の細菌感染と思われる症状が発現したとのことであったが、戻し交配で得られた4頭の子犬には細菌感染による臨床症状は継続して認められなかった。また、好中球機能検査では、同年齢の子犬との比較を行ったが、特徴的な好中球殺菌能の低下やインテグリンの減少は検出されなかった。したがって、症例に見られた好中球機能不全症は母犬由来の可能性が示唆された。

(2) 本症例における好中球機能不全症の発症の病態解明

本症例の末梢血好中球数は、雌および雄犬で正常範囲内であり、核および顆粒の異常は認められなかった。正常犬と同様に、症例犬の好中球細胞質において一次顆粒ミエロペルオキシダーゼが認められた。好中球殺菌能は、雌・雄犬において著減していた（図1）。その後、雌犬が不慮の交通事故で死亡したため、雄犬でのみ以降の解析を実施した。非特異的貪食能は正常犬の約70%に低下していたが、オプソニン化能は正常であった。接着能は正常犬の約60%まで低下していた。症例犬では、CD11bおよびCD18蛋白発現が正常犬の42-45%程度まで減少しており、同時に遺伝子レベルも減少していることが明らかとなった（図2）。一方、好中球の二次顆粒・ラクトフェリン遺伝子の発現量は正常範囲内であった。したがって、好中球の形体異常および一次・二次顆粒欠損症は否定され、本症例はCD11b/CD18インテグリン関連の好中球機能不全症であることが明らかとなった。さらに、本症例では、NADPH オキシダーゼコンポーネントであるp47phox・p67phox・gp91phoxが過剰発現し、 $\beta 2$ インテグリン遺伝子の塩基配

列には、ミスセンス変異は存在しなかった。したがって、本症例犬における慢性肉芽腫症および犬白血球粘着不全症は否定された。

以上より、本症例犬における好中球機能不全症は、好中球を形態・機能・遺伝子・分子生物学的な面から解析した結果、これまで報告されている病態とは一致せず、新たな好中球機能不全症に分類されうる可能性が高いことが明らかとなった。新たな機序による好中球不全症として、国際研究雑誌でのレビューにも取り上げられる結果となった。

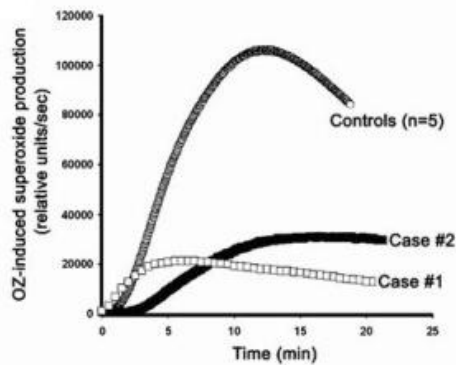


図1 好中球機能不全症の犬における殺菌能の著しい減弱

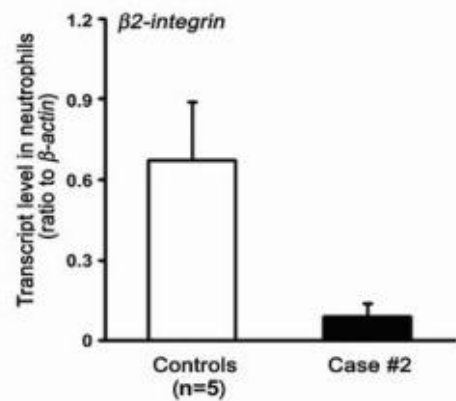


図2 好中球機能不全症の犬におけるβ2 インテグリン遺伝子発現の低下

(3) 本症例の好中球機能不全症へのウシラクトフェリン療法の検討

二症例において、初めの2週間は抗生物質の投与・輸液・吸入療法等の対処療法を実施したがいずれも重症化した上部・下部気道細菌感染および減弱した好中球機能には効果が認められなかった。それに対し、ウシラクトフェリンの併用投与により、2症例における粘液膿性の眼脂・鼻漏や呼吸器感染の症状が改

善した。同時に、好中球のβ2インテグリン発現量の増加がおり、好中球殺菌能が著しく改善した(図3、4)。これは投与期間の長さ按比例して改善し、最終的には正常犬レベルまで殺菌能が回復する結果となった。一時期、オーナーの都合によりラクトフェリンを休薬したが、再び好中球機能が減衰していった。

したがって、ウシラクトフェリンの経口投与は、家族性好中球機能低下症の好中球のインテグリン遺伝子発現量を可逆的に増加させることによって一連の好中球機能の回復をもたらし、結果として臨床症状を緩和させたと考えられた。また、ラクトフェリンの好中球機能改善効果は可逆的であったことから終生飲み続けることが必要であると思われた。この研究により、これまで骨髓幹細胞移植以外では対症療法しかなかった好中球機能不全症の治療法に、新たな根治療法を提案できる研究成果となったと考えられる。

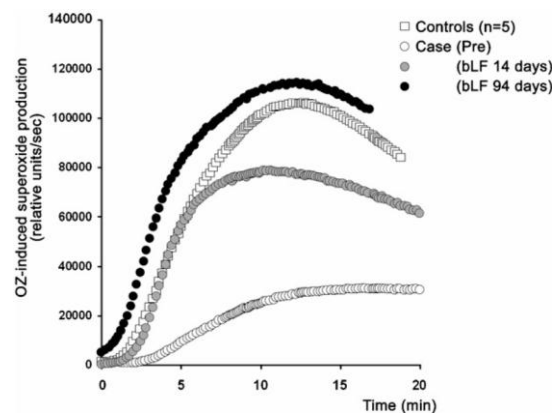


図3 ウシラクトフェリン経口投与による殺菌能の変化

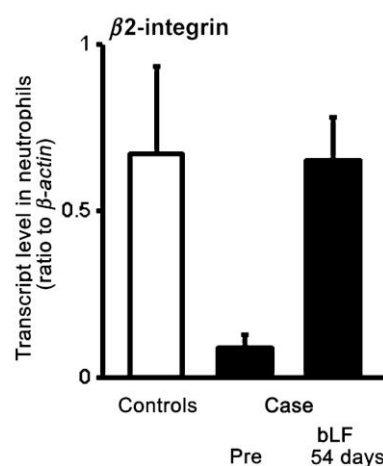


図4 ウシラクトフェリン経口投与によるβ2 インテグリン発現の変化

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2件)

- ① Sato R, Kobayashi S, Abe Y, Kamishina H, Oda S, Yasuda J, Sasaki J., Clinical effects of bovine lactoferrin on two canine cases with familial neutrophil dysfunction, The Journal of Veterinary Medical Science, 査読有, 74, 2012 (Printing)
- ② Kobayashi S, Abe Y, Inanami O, Oda S, Yamauchi K, Hankanga C, Yasuda J, Sato R., Oral administration of bovine lactoferrin upregulates neutrophil functions in a dog with familial β 2-integrin-related neutrophil dysfunction, Veterinary Immunology and Immunopathology, 査読有, 143 (1-2), 2011, 155-161

[その他]

ホームページ等

http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~naika/works/naika2_study.html#koutyuukyuu

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 沙織 (KOBAYASHI SAORI)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：60566214