

犬の慢性腸症における NF-kappa B 活性と
発現遺伝子に関する研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

岡西 広樹

2013

目次

第1章 序論	1
第2章 犬のCEの疫学調査ならびに柴犬のIBDにおける臨床的特徴と 予後不良因子の検討	8
2.1 はじめに	9
2.2 材料および方法	11
2.2.1 症例 (CE)	11
2.2.2 症例 (柴犬)	11
2.2.3 検査所見	12
1) シグナルメントと臨床症状の評価	12
2) 血液検査	13
3) 病理組織学的検査	13
4) 治療反応	14
5) 予後	14
2.2.4 統計処理	14
2.3 結果	16
2.3.1 CEの犬種、性別、年齢	16
2.3.2 CEを呈した柴犬の性別、年齢、体重	16
2.3.3 CEを呈した柴犬の臨床症状と重症度	17

2.3.4	血液検査所見	18
2.3.5	病理組織学的検査所見	19
2.3.6	治療反応	19
2.3.7	予後	21
2.3.8	シグナルメント、臨床症状、検査所見、治療反応、予後との関係	22
2.3.9	予後不良の危険因子	22
2.4	考察	31
2.5	小括	39
第3章	LPCの犬の結腸におけるNF-kappa Bの活性とNOD2 mRNAの発現の検討	42
3.1	はじめに	43
3.2	材料および方法	45
3.2.1	LPC犬	45
3.2.2	健常犬	45
3.2.3	組織の採材と処理	46
3.2.4	RT-PCRによるNOD2 mRNA発現量の定量	46
3.2.5	ゲルシフトアッセイ	47
3.2.6	統計処理	48
3.3	結果	50

3.3.1	症例	50
3.3.2	結腸における NOD2 mRNA 発現量	50
3.3.3	結腸における NF-kappa B 結合活性	51
3.3.4	相関関係	51
3.4	考察	57
3.5	小括	62
第 4 章 LPE の犬におけるセレクトインファミリーと P-Selectin		63
Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) の発現の検討		
4.1	はじめに	64
4.2	材料および方法	66
4.2.1	健常犬	66
4.2.2	LPE 犬	66
4.2.3	組織の採材、処理、病理組織学的検査	67
4.2.4	リアルタイム RT-PCR による mRNA 発現量の定量	68
4.2.5	統計処理	70
4.3	結果	71
4.3.1	症例	71
4.3.2	十二指腸におけるセレクトインと PSGL-1 の mRNA 発現量	71
4.3.3	CIBDAI、病理スコア、セレクトイン、セレクトインリガンドとの関	72
	係	

4.4	考察	76
4.5	小括	81
第5章	LPEの犬の十二指腸におけるNF-kappa Bの活性と 免疫グロブリンスーパーファミリーの検討	83
5.1	はじめに	84
5.2	材料および方法	87
5.2.1	健常犬	87
5.2.2	LPE犬	87
5.2.3	組織の採材、処理、病理組織学的検査	88
5.2.4	ゲルシフトアッセイ	89
5.2.5	リアルタイムRT-PCRによるmRNA発現量の定量	90
5.2.6	統計処理	91
5.3	結果	92
5.3.1	LPE犬	92
5.3.2	病理組織	92
5.3.3	十二指腸におけるNF-kappa B結合活性	93
5.3.4	各種サイトカイン、NOD2、およびCAMのmRNA発現量	93
5.3.5	相関関係	94
5.4	考察	99
5.5	小括	104

第6章 総括	106
謝辞	116
引用文献	117

第 1 章

序論

犬の消化器症状は、嘔吐、吐出、下痢、血便などの症状を呈し、その原因となる疾患は、消化管における感染症（Berg ら、1979）、食餌（Leistra ら、2001）、異物、腫瘍（Gieger、2011）、運動機能不全などのほかに、門脈体循環シャント（Matushek ら、1990）や胆嚢粘液嚢腫などの肝胆道系疾患（Worley ら、2004）、膵炎や膵外分泌不全などの膵疾患（Xenoulis ら、2008）、腎不全などの腎疾患（Bartges ら、2012）、脳腫瘍や重症筋無力症など神経筋疾患（Palmer、1980）、副腎皮質機能低下症（Romatowski、1990）や甲状腺機能低下症（Chastain、1990）などの内分泌疾患、中毒性疾患（植物、化学物質）など極めて多岐にわたる。しかしながら、これらの疾患に属さず慢性の消化器症状を呈し、消化管に炎症、びらん、浮腫を引き起こす原因不明の消化管疾患は、一般に慢性腸症 Chronic Enteropathy（CE）または特発性慢性腸症 Chronic Idiopathic Enteropathy（CIE）と呼ぶ（Jergens、1992；Allenspach、2008）。CE は、その治療反応性によって分類され、食餌療法に反応するものを食餌反応性腸症 Food-Responsive Enteropathy（FRE）、抗菌療法に反応するものを抗生物質反応性腸症 Antibiotic-Responsive Enteropathy（ARE）、そしてこれらの治療に反応せずプレドニゾロンなどのステロイド療法に反応するものをステロイド反応性腸症 Steroid-Responsive Enteropathy（SRE）または炎症性腸疾患 Inflammatory

Bowel Disease (IBD) と呼ばれる (Hall, 2011 ; Simpson ら, 2011)。犬の原因不明の慢性腸炎は、かつて人と同様に、IBD と総称されていたが、現在では、CE と総称されるようになった。CE および IBD の病理像は、主にリンパ球・形質細胞性腸炎 lymphocytic-plasmacytic enteritis (LPE) (Jacobs ら, 1990)、好酸球性腸炎 (Bartsch ら, 1972)、肉芽腫性腸炎 (Dibartola ら, 1982) に分類されるが、そのほとんどが LPE である。CE や IBD の好発犬種として、ジャーマンシェパード、バセンジー、ヨークシャーテリア、シャーペイなどが挙げられているが (Simpson ら, 2011)、本邦では CE に関する好発犬種などの大規模な疫学調査の報告はされていない。

人と犬の IBD には、臨床上類似点は認められるが、病理組織像やその炎症部位に大きな相違点がみられる。人の IBD は、クローン病と潰瘍性大腸炎に大別され、クローン病では、主に小腸から肛門部にわたり限局性または分節性の慢性肉芽腫性炎症を生じ、マクロファージやリンパ球などの浸潤を伴う非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を形成する (Barkin, 1992)。一方、潰瘍性大腸炎は、主に大腸粘膜に潰瘍やびらんを生じ、粘膜上皮に限局した好中球、リンパ球、形質細胞などの炎症細胞の浸潤と杯細胞の減少を特徴とする。犬では、胃から直腸までの粘膜または粘膜固有層における LPE

が主体であるが、人と異なり十二指腸に病変が生じやすい。人のクローン病や潰瘍性大腸炎では、回腸と結腸に病変が生じやすい傾向にある。

人の IBD の病因においては、さまざまな研究が行われており、遺伝的要因を背景に食事や細菌などの要因と不適切な免疫反応の相互作用により起こっていると考えられている (Sartor, 1995)。また、現在までにさまざまな IBD 感受性遺伝子が特定されており、*CARD15 (NOD2)*、*ATG16L1*、*IRGM* などの細胞内異物排除にかかわる遺伝子や *IL23R* とそのシグナル経路の遺伝子など、30 カ所以上が明らかにされている (Barrett ら、2008)。

しかしながら、これらの遺伝子変異は、人種、民族間で異なるためさらなる検討が必要である。環境要因としては、腸内細菌叢のバランスの乱れが免疫寛容の破綻を招き、IBD を惹起すると考えられている。腸内細菌の IBD 発症の関与に関しては、IBD モデルマウスを通常的环境下で飼育すると腸炎が自然発症するが、これらのマウスを細菌が全く存在しない環境下に置くと腸炎を発症しないことから、各種細菌が IBD の発症に重要な役割を果たしていると考えられている (Sellon ら、1998)。宿主の消化管粘膜の免疫異常としては、クローン病では活動期の粘膜内マクロファージにより産生される $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、IFN- γ などの炎症性サイトカイ

ンが過剰に産生され、Th1 優位のサイトカイン産生により病態が形成されることが考えられている。一方、潰瘍性大腸炎においては IgG 分泌細胞の B 細胞系の増加が認められることや抗大腸抗体、抗ムチン抗体、抗トロポミオシン抗体など種々の自己抗体が認められている。また、従来 Th2 優位と考えられていたが、病変の局所では Th1 優位の報告もあり、Th1/Th2 バランスについては必ずしも一定の見解は得られていない (Shih ら、2008)。一方、近年新たなヘルパー T 細胞サブセットとして Th17 が提唱され、Th17/IL23 型の免疫反応が病態の形成に関与する可能性も示唆されている (Yen ら、2006)。さらに最近では、自然免疫異常の関与も指摘されており、細菌やウイルスの菌体成分を認識する Toll-like receptor (TLR) や Nucleotide oligomerization domain two (NOD2)などが消化管粘膜で過剰に発現し、核内因子 kappa B (NF-kappa B) を活性化することにより炎症性サイトカインなどの発現を誘導し、炎症を惹起しているとの報告がある (Stronati ら、2008)。

犬の IBD の病因は、人と同様に遺伝的要因を背景に食餌や細菌などの環境要因と不適切な免疫反応の相互作用により起こっていると考えられているが、人のように多くの研究はなされていない。犬の IBD では、消化管粘膜において CD3、CD4、CD8 陽性 T 細胞が増加しており (Jergens ら、1999 ; German ら、2001)、サイトカイン

に関しては、Th1 と Th2 の両方のサイトカインの発現が亢進していたとの報告がある (German ら、2000 ; Peter ら、2005 ; Jergens ら、2009)。また自然免疫異常に関しては、NOD2 遺伝子の変異が IBD のジャーマンシェパードで認められている (Kathrani ら、2010)。また、TLR2、4、9 がジャーマンシェパードの消化管粘膜で高度に発現しているとの報告がある (Burgner ら、2009)。さらに最近、TLR5 の遺伝子変異により、細菌の鞭毛成分のフラジェリンに対し過剰反応が起き NF-kappa B を活性化させ、炎症を惹起している可能性が考えられている (Kathrani ら、2012)。また、Luckschander らの研究では、CE の十二指腸粘膜で NF-kappa B が活性化していたとの報告がある (2010)。しかしながら、CE における自然免疫異常に関して、いまだ不明な点が多く残されている。さらに、人の IBD の研究では炎症局所への炎症細胞浸潤に関与する細胞接着分子などが病態へ関与することが示唆されている (Nakamura ら、1993 ; Briskin ら、1997)。過去、我々の研究室では、健常犬における接着分子の検討 (Miura ら、2005) は行ったが、犬の IBD、LPE における報告はない。そこで本研究では、犬の CE における病態解明を目的とし、以下の検討を行った。

第2章では犬の CE の疫学調査の一環として、本邦の好発犬種である柴犬に関して、

臨床的特徴と予後不良因子の検討を行った。第 3 章では、CE を呈した症例のうち、内視鏡検査と病理組織学的検査においてリンパ球・形質細胞性結腸炎 lymphocytic-plasmacytic colitis (LPC) と診断した犬において NF-kappa B 活性と NOD2 の発現の検討を行った。第 4 章では、十二指腸の組織学的検査において LPE と診断した犬を対象に、初期の炎症細胞の接着に関わるセレクトインファミリーとセレクトインリガンドである P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) の発現の検討を行った。さらに、第 5 章では、LPE 発症犬の十二指腸においてセレクトインと同様に、細胞接着に関わる免疫グロブリンスーパーファミリーの発現、NF-kappa B 活性とそれに関わる炎症性サイトカイン、NOD2 の発現の検討を行った。

第 2 章

犬の CE の疫学調査ならびに柴犬の IBD における臨床的特徴と
予後不良因子の検討

2.1 はじめに

慢性腸症（CE）は、一般に犬において慢性的な嘔吐、下痢を引き起こす消化管疾患の総称で、その治療反応によって、炎症性腸疾患（IBD）、抗生物質反応性腸症（ARE）、食餌反応性腸症（FRE）に分類される（Hall ら、2005）。CE の疫学調査に関しては、これまでにいくつかの報告（Jergens ら、1992 ; Craven ら、2004 ; Allenspach ら、2007）があり、IBD、ARE、FRE のそれぞれの好発犬種や年齢、性別などについて明らかにされている。また、病理像に関する検討もされており、リンパ球・形質細胞性腸炎（LPE）が最も一般的であることが示されている。しかしながら、我が国における CE の大規模な調査は行われておらず、詳細な情報はない。

CE を呈する症例は、さまざまな犬種で報告されているが、特に欧米ではジャーマンシェパードドッグ（Batt ら、1983 ; Allenspach ら、2010 ; Kathrani ら、2010）やバセンジー（Breitschwerdt ら、1984）、ボクサー（Simpson ら、2006 ; Craven、2010）の報告が多い。柴犬も CE の好発犬種であり（Ohno ら、2006 ; Ohmi ら、2011）、他の犬種に比べ予後が非常に悪く、6 か月生存率が 50%程度であると報告されている。柴犬は、もともとアトピー性皮膚炎などの免疫疾患に罹患しやすいことが知られてお

り (Masuda ら、2000)、消化管においても各種の食餌や細菌抗原に対して異常な免疫応答が引き起こされている可能性が示唆されている。しかしながら CE を呈した柴犬の中にも、短期間で死亡する例が存在する一方、長期間生存する例も存在する。

そこで、本研究では、まず CE を呈した犬の犬種、年齢、性別について詳細な疫学調査を行い、さらに CE の柴犬での短期生存群、長期生存群の臨床的、血液検査的、病理組織学的特徴、治療反応、予後に関する特徴を明らかにした。またこれらのデータに基づき、CE を呈した柴犬における予後不良の危険因子について検討した。

2.2 材料および方法

2.2.1 症例 (CE)

2007 年から 2009 年に日本大学生物資源科学部附属動物病院 (ANIMAL MEDICAL CENTER; ANMEC) に来院した犬 2330 頭のうち、CE を呈した 86 頭を対象とし、犬種、年齢、性別の調査を行った。これらの症例は、血液検査、糞便検査、レントゲン検査ならびに、腹部超音波検査により他の疾患を除外し、さらに内視鏡検査で組織の採材を行い、病理組織学的に LPE と診断したものである。

2.2.2 症例 (柴犬)

2005 年から 2011 年に ANMEC に来院した CE を呈した柴犬 24 頭を対象とした。これらの症例は、嘔吐、下痢、体重減少などの慢性の消化器症状を 3 週間以上呈しており、内視鏡検査にて組織の採材を行った後、病理組織学的に LPE と診断したものである。さらにこれらの症例は、血液検査、糞便検査、レントゲン検査および、腹部超音波検査により他の疾患を除外した。また、生存期間を 6 か月で区切り、6 か月以内に死亡した症例群を短期生存群 (Short survivors; Ss)、6 か月以上生存した症例を

長期生存群 (Long survivors; Ls) とした。全ての症例において、2 週間以上の抗生剤治療 (メトロニダゾール、10 mg/kg、BID) および、食餌療法 (低アレルギー食) が行ったが、治療に反応しなかった。その後、プレドニゾン療法により 1 mg/kg/day (Ss : 6 頭 : Ls : 8 頭) または 2 mg/kg/day (Ss : 10 頭、Ls : 1 頭) の用量にて治療を開始した。治療反応によって、プレドニゾンの増量を行い反応が悪い症例では、シクロスポリン (5-10 mg/kg/day) やアザチオプリン (2 mg/kg/day) の免疫抑制剤も投与した。

2.2.3 検査所見

1) シグナルメントと臨床症状の評価

それぞれの群において、性別 (Sex)、年齢 (Age)、体重 (Body weight) について調査した。また、臨床症状の重症度判定には、Jergens ら (2003) によって提唱された Canine inflammatory bowel disease activity index (CIBDAI) を用いた。活動性、食欲、嘔吐の頻度、糞便の性状、排便の頻度、体重減少の 6 項目に分け、それぞれに 0 から 3 のスコアを付けた。それぞれの項目毎のスコアを合計し、スコア 9 以上を重度 IBD、6 から 8 を中程度 IBD、4 から 5 を軽度 IBD、3 以下を臨床上治療不要な IBD

とした。

2) 血液検査

血液検査では、血球容積 (PCV)、血小板数 (PLT)、白血球数 (WBC)、好中球数、リンパ球数、単球数、好酸球数を測定した。また、血液凝固系検査として、アンチトロンビンⅢ (ATⅢ)、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノーゲン (Fib) を測定した。さらに、血液化学検査において、血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、アルカリホスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、カルシウム (Ca)、リン (IP)、グルコース (Glu)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、アルブミン (ALB)、グロブリン (Glob)、総タンパク (TP)、血清蛋白分画、総コレステロール (T. Chol)、C 反応性蛋白 (CRP) を測定した。

3) 病理組織学的検査

消化管内視鏡検査において採材された組織を、構造的変化と炎症細胞の浸潤程度を基に重症度判定を行い、スコア 0 (正常)、スコア 1 (軽度)、スコア 2 (中程度)、ス

コア 3 (重度) に分類した。

4) 治療反応

治療反応のスコアに関しては、治療に全く反応しないものをスコア 0 (poor)、治療に反応はしたが、完全には症状の消失をみとめなかったものをスコア 1 (partial)、治療に反応し、症状の完全な消失を認めたものをスコア 2 (good) とした。さらにそれぞれの群において、初期治療に反応していた日数を比較した。

5) 予後

予後に関しては、治療反応が悪くなってから死亡するまでの日数、生存日数、死亡率を調査した。さらに長期生存群の経過に関する情報は、一次診療の紹介病院から得た。予後不良の危険因子は、CIBDAI、血液検査、病理スコア、治療反応において調査した。

2.2.4 統計処理

CE 症例の年齢に関しては、平均±標準偏差 (mean±S.D.) で表記した。その他の

測定値に関しては、中央値（範囲）で表記した。カテゴリーデータは、パーセンテージ（%）または、比率で表記した。Fisher's exact test は、カテゴリーデータの比較に使用した。Mann-Whitney U test は、Ss と Ls の数値データの比較に使用した。Kaplan-Meier 生存曲線と log-rank test は、生存期間のデータの解析に使用した。相関関係は、Spearman's rank correlation test によって解析した。オッズ比（OR）は、単一予測変数のロジスティック回帰モデルから算出し分析した。また、CE の好発犬種の解析にオッズ比を用いた。多変量ロジスティック回帰分析には、サンプルサイズが小さすぎたため、予後不良の危険因子の解析には、単変量ロジスティック回帰分析を使用した。また、Receiver Operatorating Characteristic（ROC）曲線は、年齢とCIBDAI のカットオフ値の決定に用いた。なお、統計学的な有意水準は $P < 0.05$ とした。統計分析には、GraphPad Prism 5 for Mac OS（GraphPad Software Inc., San Diego, CA, US）、SigmaPlot 12（SYSTAT Software Inc., San Jose, CA, US）を使用した。

2.3 結果

2.3.1 CE の犬種、性別、年齢

調査期間中に来院した犬 2,330 頭中、86 頭を内視鏡検査で採材した組織所見により LPE と診断した。そのうち柴犬 (OR 5.5, $P < 0.01$)、ウェストハイランドホワイトテリア (OR 5.8, $P < 0.05$)、ジャーマンシェパード (OR 3.8, $P < 0.05$)、ミニチュアピンシャー (OR 3.2, $P < 0.01$) が他の犬種と比較して有意に発症頻度が高かった (表 2-1)。性別では、オス 51 頭 (59.3 %) のうち去勢オスが 23 頭、未去勢オスが 28 頭であった。また、メス 35 頭 (40.7 %) のうち、避妊メスが 23 頭、未避妊メスが 12 頭であった。平均年齢は、 6 ± 3.5 歳齢であった。

2.3.2 CE を呈した柴犬の性別、年齢、体重

本研究で CE を呈していた全ての柴犬 25 頭が、病理組織学的検査において、LPE を伴う IBD と診断された。そのうち、Ss 群は 16 頭、Ls 群は 9 頭であった。性別に関しては、Ss 群ではオスが 9 頭 (去勢オスが 4 頭、未去勢オスが 5 頭) で、メスは、7 頭 (避妊メスが 4 頭、未避妊メスが 3 頭) であった。一方、Ls 群では、オスが 6

頭（オスが2頭、未去勢オスが4頭）であり、メスは、3頭（全て避妊メス）であった。性分布は、Ss群とLs群では統計的に有意差は認められなかった（表2-2）。

全症例における年齢の中央値は、7歳齢（平均8.5歳齢）であった。Ss群の中央値は、7.5歳齢（平均7.6歳齢、範囲3～13歳齢）で、Ls群の中央値、5歳齢（平均5.2歳齢、範囲1～10歳齢）に比べ有意に高値を示した（ $P < 0.05$ ）（表2-2）。

Ss群における体重の中央値は、10.5 kg（範囲4～17 kg）、Ls群の中央値は、10 kg（範囲4.8～14 kg）であった。Ss群とLs群の中央値に、統計学的な有意差はなかった（表2-2）。

2.3.3 CEを呈した柴犬の臨床症状と重症度

全ての症例が、小腸性の消化器症状を示していた。CIBDAIの中央値は、Ss群で12ポイント（範囲4～17ポイント）、Ls群では、7ポイント（範囲4～13ポイント）と、Ss群で有意に高値を示した（ $P < 0.05$ ）。特に、Ss群の活動性（ $P < 0.05$ ）、食欲（ $P = 0.01$ ）、体重減少（ $P < 0.05$ ）の項目の重症度はLs群に比べ、Ss群で有意に高かった（表2-2）。

2.3.4 血液検査所見

血液検査は、全ての症例で実施したが、どの項目においても Ss 群と Ls 群で統計学的有意差は認められなかった。また、血液凝固系検査においても統計学的有意差は認められなかった。

血液化学検査に関しては、TP、CRE、CRP 値において、それぞれの群の間に統計学的有意差が認められた（表 2-3）。Ss 群における TP 濃度の中央値は、5.4 g/dl（範囲 3.6 ~ 7.3 g/dl）と、Ls 群は 6.2 g/dl（範囲 4.8 ~ 7.6 g/dl）に比べ有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）。また、低蛋白血症の症例は、Ss 群で 6 頭（37.5 %）であったのに対し、Ls 群では 1 頭（11.1 %）のみであった。

Ss 群における CRE の中央値は、0.8 mg/dl（範囲 0.4 ~ 1.1 mg/dl）で、Ls 群は 1 mg/dl（範囲 0.4 ~ 1.7 mg/dl）であり、Ss 群が統計学的に有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）。また、CRE の値が正常値範囲（0.5 ~ 1.8 mg/dl）を下回っていた症例は、Ss 群で 2 例（12.5 %）、Ls 群では 1 例（11.1 %）であった。

Ss 群における CRP の中央値は、1.7 mg/dl（範囲 0.05 ~ 12 mg/dl）と、Ls 群の 0.15 mg/dl（範囲 0 ~ 2.5 mg/dl）に比べ有意に高値を示した（ $P < 0.05$ ）。また、CRP が高値を示した症例は、Ss 群で 10 頭（62.5 %）であったのに対し、Ls 群では 2 例

(22.2%)のみであった。

2.3.5 病理組織学的検査所見

全症例において、上部消化管内視鏡検査により採材し胃、十二指腸の組織評価を行った。Ss群における病理スコアの中央値は、3（平均2.8 範囲2～3）で、Ls群の中央値も3（平均2.3 範囲1～3）であった。統計学的には、Ss群がLs群よりも有意に高値を示した（ $P < 0.05$ ）（表2-4）。また、Ss群ではスコア3（重度）を示したのは、14頭（87.5%）で、Ls群では、6頭（66.6%）であった。

胃においては、両群で病理スコアに統計学的有意差はなかった。また、多くの症例（Ss群12頭、75%；Ls群6頭、66.6%）が組織学的に、正常（スコア0）と評価された。重度（スコア3）と評価されたのは、両群でそれぞれ1頭であった。

2.3.6 治療反応

プレドニゾロンの投与量が、2 mg/kg/day以上の症例は、Ss群が16頭中11頭で、Ls群の9頭中1頭に比べ、有意にSs群のほうが多かった（ $P < 0.05$ ）。さらに、プレドニゾロンの投与量を減らすことができた症例は、Ss群の3頭に比べ、Ls群では

7頭と、Ls群のほうが有意に多かった ($P < 0.01$)。Ls群の2頭は完全にプレドニゾロンの投与を休薬することができたのに対し、その他の7頭は0.5 mg/kg/day (5頭) または、1 mg/kg/day (2頭) で維持することが可能であった。

初期治療において、25頭中21頭 (84 %) が反応した。そのうち、Ss群でスコア2 (good) であったのが7頭 (43.8 %)、スコア1 (partial) であったのが5頭 (31.2 %)、スコア0 (poor) であったのが4頭 (25 %) であった。Ls群では、9頭全ての症例 (100 %) がスコア2 (good) であった。その治療反応スコアの中央値は、Ss群がスコア1 (範囲0 ~ 2) で、Ls群がスコア2 (範囲2) であり、Ss群の治療反応はLs群に比べ、有意に低かった ($P < 0.01$) (表2-4)。

初期治療に対する反応期間の分析には、治療に反応し続けた症例 (Ls群の4頭) と最初から全く反応しなかった症例 (Ss群の4頭) は除外した。治療反応日数の中央値は、Ss群は42.5日 (範囲20 ~ 91日) と、Ls群の285日 (範囲196 ~ 1026日) に対し、有意に短かった ($P < 0.01$) (表2-4)。

プレドニゾロン療法に反応しない症例は、シクロスポリンまたはアザチオプリンを投与した。シクロスポリンを投与された症例は、Ss群で10頭 (62.5 %)、Ls群で2頭 (22.2 %) であった。アザチオプリンは、Ss群の1頭のみ投与された。しかし

ながら、これらの免疫抑制剤に反応した症例はなかった。

2.3.7 予後

治療に対する反応が消失してから死亡するまでの日数の分析には、治療に反応し続けた症例（Ls 群の 4 頭）と最初から全く反応しなかった症例（Ss 群の 4 頭）は除外した。死亡までの日数の中央値は、Ss 群は 19.5 日（範囲 0 ~ 90 日）と、Ls 群の 151 日（範囲 35 ~ 218 日）に対し、有意に短かった（ $P < 0.05$ ）（表 4）。

生存日数は、Ls 群の中央値が 800 日（範囲 231 ~ 2204 日）であったのに対し、Ss 群では 73 日（範囲 26 ~ 171 日）と有意に短かった（ $P < 0.0001$ ）。柴犬の全症例（25 頭）における生存日数の中央値は 101 日で、6 か月生存率、1 年生存率、3 年生存率、5 年生存率は、それぞれ、36 % (9/25)、32 % (8/25)、16 % (4/25)、8 % (2/25) であった。

柴犬の全症例の死亡率は、84 % (21/25) であった。Ss 群の死亡率は、16 頭 (100 %) と、Ls 群の 5 頭 (55.5 %) に比べ有意に高かった（ $P = 0.01$ ）（図 2-1）。死亡した症例全てが、CE に関連した疾患で死亡した。死亡の原因は、吸収不良による衰弱死（18/21、85.7 %）と消化管出血（3/21、14.3 %）であった。

2.3.8 シグナルメント、臨床症状、検査所見、治療反応、予後との関係

全症例において、年齢、CIBDAI、TP、CRP、初期治療反応日数、治療反応悪化から死亡するまでの日数、生存日数についての関係を分析した。その結果、生存日数と年齢 ($r_s = -0.53$, $P < 0.01$)、CRP ($r_s = -0.56$, $P < 0.01$)、TP ($r_s = 0.45$, $P < 0.05$)、治療反応悪化から死亡するまでの日数 ($r_s = 0.64$, $P < 0.01$) に相関関係がみられた。さらに、CIBDAI と CRP ($r_s = 0.52$, $P < 0.01$)、初期治療反応日数と治療反応悪化から死亡するまでの日数 ($r_s = 0.53$, $P < 0.05$) においても相関性が認められた (表 2-5)。

2.3.9 予後不良の危険因子

年齢、CIBDAI、CRP、初期治療反応スコア、初期治療反応日数において予後不良の危険因子を分析した。単変量ロジスティック回帰分析では、年齢 ($P < 0.05$, OR 7.7, CI 95% 1.1 ~ 51.2) と CIBDAI ($P < 0.05$, OR 1.5, CI 95% 1.1 ~ 1.9) が危険因子となることが明らかとなった。年齢のカットオフ値は、7 歳齢で、感度 0.7、特異度 0.78、曲線下面積 0.81 であった (図 2-2)。また、CIBDAI のカットオフ値は、9 ポ

イントで、感度 0.88、特異度 0.68、曲線下面積 0.75 であった (図 2-3)。そのほか

の因子は、予後不良の危険因子にはならなかった。

表 2-1 CE の症例の犬種と来院頭数

Breed	CE頭数	(%)	来院頭数	OR	P value
Shiba	13	6.74	193	5.52	<0.01
Miniature Dachshund	10	2.08	480	0.49	<0.05
Welsh Corgi	6	3.85	156	1.04	
Shih Tzu	6	3.92	153	1.06	
Yorkshire Terrier	5	3.7	135	1.003	
Chihuahua	4	2.26	177	0.58	
West Highland White Terrier	3	17.6	17	5.75	<0.01
Toy Poodle	3	1.97	152	0.5	
German Shepherd Dog	3	12.5	24	3.82	<0.05
Papillon	3	4.55	66	1.25	
French Bulldog	3	5.36	56	1.49	
Miniature Pinscher	3	10.7	28	3.2	<0.05
Siberian Husky	2	25	8	8.88	<0.01
Labrador Retriever	2	2.35	85	0.61	
Bernese Mountain Dog	2	9.52	21	2.78	
American Cocker Spaniel	2	5.88	34	1.64	
Miniature Schnauzer	1	2	50	0.52	
Whippet	1	20	5	6.58	
Golden Retriever	1	0.72	138	0.18	
Japanese Terrier	1	100	1	-	
Boston Terrier	1	16.7	6	5.26	
Boxer	1	25	4	8.78	
Cavalier King Charles Spaniel	1	1.69	59	0.44	
Jack Russell Terrier	1	7.14	14	2.01	
Standard Poodle	1	33.3	3	13.1	<0.01
Maltese	1	1.32	76	0.34	
Border Collie	1	4.55	22	1.25	
Mixed Breeds	5	2.4	208	0.62	

OR: オッズ比

表 2-2 短期生存群と長期生存群のシグナルメントと臨床症状のスコアの比較

Item examined	Ss	Range	n	Ls	Range	n	<i>P</i>
Sex (Male : Female)	9 : 7	—	16	6 : 3	—	9	0.6913
Age (years)	7.5	3-13	16	5	1-10	9	0.0462
Body weight (kg)	10.5	4-17	16	10	4.8-14	9	0.9321
CIBDAI (score)	12	4-17	16	7	4-13	9	0.0131
Attitude/Activity	2	0-3	16	0	0-2	9	0.0364
Appetite	2	0-3	16	0	0-3	9	0.01
Vomiting	0	0-3	16	2	0-3	9	0.229
Stool consistency	3	2-3	16	3	0-3	9	0.156
Stool frequency	1	0-3	16	0	0-2	9	0.1047
Weight loss	3	1-3	16	2	0-3	9	0.0337

Ss: 短期生存群、Ls: 長期生存群

表 2-3 短期生存群と長期生存群の血液検査所見の比較

Item examined	Ss	Range	n	Ls	Range	n	<i>P</i>
WBC (/ μ l)	17750	11300-50700	16	16000	7200-21900	9	0.3648
Seg (/ μ l)	10355	2585-47405	16	10868	1460-20148	9	0.2949
Lymp (/ μ l)	1002	57-3364	16	1881	555-2431	9	0.3802
Mon (/ μ l)	734	232-5134	16	930	10-5600	9	0.8429
Eos (/ μ l)	56	0-3102	16	185	0-920	9	0.3802
PLT (/ μ l)	420000	60300-611000	16	332	153-531	9	0.1486
PCV (%)	37	27.5-49.0	16	38	31.0-46.0	9	0.3071
AT (%)	87	68-134	14	99	67-109	7	0.5504
PT (sec)	8.3	6.7-10.0	14	7.8	6.2-10	6	0.7725
APTT (sec)	15	12.0-24.0	14	15	13-18	6	0.6758
Fib (mg/dl)	303	175-598	14	236	93-393	6	0.2834
ALB (g/dl)	1.65	0.7-3.1	16	2.3	1.6-3.5	9	0.1124
TP (g/dl)	5.4	3.2-7.3	16	6.2	4.8-7.6	9	0.0173
Glob (g/dl)	3.2	2.6-4.5	16	3.6	3-4.8	9	0.0887
α-1 (%)	4.6	3.3-9.4	11	4.0	2.8-5.1	5	0.1405
α-2 (%)	15.2	7.9-20.3	11	9.4	7.2-19.9	5	0.3644
β (%)	13.7	4.5-20.3	11	11.6	5.2-14.5	5	0.5711
γ (%)	25.3	12-49.9	11	34.3	11.3-48.8	5	0.5711
BUN (mg/dl)	12	4-35	16	17	7-21	9	0.7331
CRE (mg/dl)	0.8	0.3-1.1	16	1.0	0.4-1.7	9	0.0194
Tcho (mg/dl)	109.5	54-229	16	98	69-238	9	0.8207
Ca (mg/dl)	8.9	7-9.9	15	9.4	8.5-10	7	0.1116
P (mg/dl)	3.2	1.5-5.4	13	3.5	1.6-5.3	4	0.8207
Na (mEq/l)	146	133-156	16	147	143-149	9	0.513
K (mEq/l)	3.9	3.0-4.8	16	3.9	3.6-4.3	9	0.7548
Cl (mEq/l)	112	91-123	16	116	105-118	9	0.5139
Glu (mg/dl)	104	85-181	16	108	78-124	9	0.4612
ALP (U/l)	189	45-956	16	74	29-273	9	0.2574
GPT (U/l)	68.5	10-1016	16	31	10-208	9	0.5705
CRP (mg/dl)	1.7	0.05-12	16	0.15	0-2.5	9	0.0135

表 2-4 短期生存群と長期生存群の病理スコア、治療反応、予後の比較

	Ss	Range	n	Ls	Range	n	<i>P</i>
病理スコア							
胃	0	0-3	12	0	0-3	9	0.9405
十二指腸	3	2-3	16	3	1-3	9	0.0231
治療							
治療スコア	1	0-2	16	2	2	9	0.0079
初期治療反応日数	42.5	20-91	12	285	196-1026	5	0.0019
治療反応悪化から死亡するまでの日数	19.5	0-90	12	151	35-218	5	0.0131
予後							
生存日数	73	26-171	16	800	231-2204	9	<0.0001
死亡率 (%)	100	—	16	55.5	—	9	0.01

Ss: 短期生存群、Ls: 長期生存群

表 2-5 シグナルメント、CIBDAI、血液検査、病理スコア、治療反応、予後の相関性

	r	n	P
生存日数 vs 年齢	-0.524	25	0.0072
生存日数 vs CIBDAI	-0.3439	25	0.0999
生存日数 vs CRP	-0.56	25	0.0036
生存日数 vs TP	0.446	25	0.0254
生存日数 vs 初期 治療反応日数	0.6246	17	0.0054
CIBDAI vs CRP	0.5161	25	0.0083
CIBDAI vs 初期治療反応日数	-0.4528	17	0.068
CRP vs 初期治療反応日数	-0.2641	17	0.305
初期治療反応日数 vs 治療反応悪化から死亡までの日数	0.5298	17	0.0287

r: 相関係数

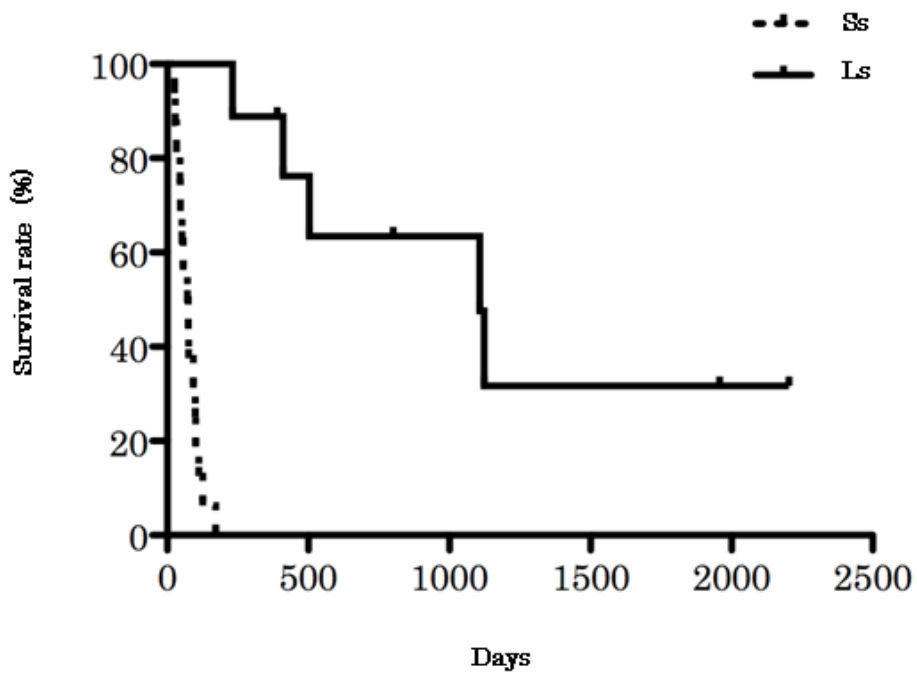
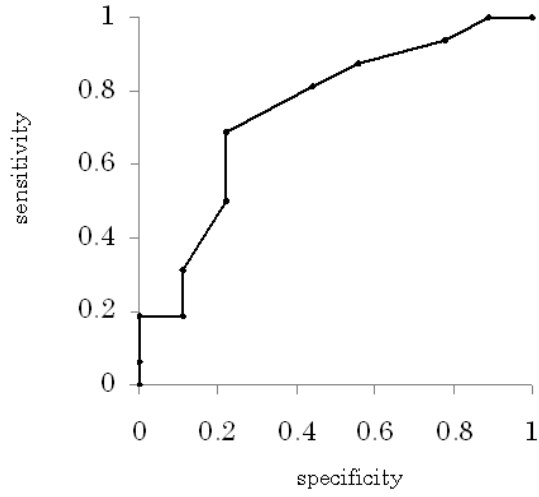


図 2-1 短期生存群と長期生存群の生存曲線

Ss: 短期生存群、Ls: 長期生存群

A



B

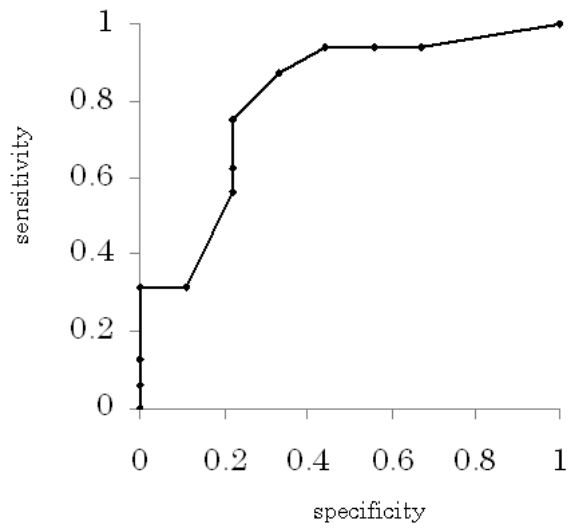


図 2-2 年齢 (A) と CIBDAI (B) の ROC 曲線

2.4 考察

本研究では、柴犬、ウェストハイランドホワイトテリア、ジャーマンシェパードが、他の犬種と比較して有意に CE の発症頻度が高いことが明らかとなった。以前の疫学調査の報告 (Jacobs ら、1990 ; Jergens ら、1992 ; Allenspach ら、2007) では、ジャーマンシェパード、ウェストハイランドホワイトテリア、ヨークシャーテリアなどが好発犬種として報告されているが、柴犬が多いとの報告はない。もともと、柴犬は、日本での飼育頭数は多いが、海外では少ないことが理由の一つかもしれない。性別では、オスが若干多い傾向があったこと、年齢が中年齢 (5 歳前後) で多いという結果は、以前の報告と一致していた。

柴犬の CE における最近の研究では、発症年齢の中央値は、4.9 歳齢と報告されており (Ohmi ら、2011)、過去の CE や IBD の報告 (Jacobs ら、1990 ; Jergens ら、1992 ; Allenspach ら、2007) とほぼ一致している。本研究においても、長期生存群における年齢の中央値は 5 歳齢 (平均 5.2 歳齢) と過去の報告とほぼ一致していた。しかしながら、短期生存群における年齢の中央値は、7.5 歳齢 (平均 7.6 歳齢) であり、全症例でみると 7 歳齢であった。これは、以前に報告されたステロイド療法を必要とする CE の症例の調査の年齢 (平均 6.5 歳齢) とほぼ一致する (Allenspach ら、

2007)。また、年齢と生存期間の間に負の相関関係が認められた。したがって、高齢の CE の柴犬は、生存期間が短く治療反応が悪い可能性があり、特に、8 歳以上の年齢の柴犬では予後に注意が必要である。

これまで CE の柴犬の CIBDAI について検討した報告はないが、過去に柴犬の生存群と非生存群を比較した論文では、元気消失と食欲不振が、非生存群で多く認められている (Ohmi ら、2011)。他の LPE の犬 (柴犬を多く含む) を対象とした調査では、非生存群で食欲不振と体重減少が多く症例で認められていることから、食欲不振は予後不良の危険因子であると報告されている (Ohno ら、2006)。本研究においても、活動性の減少と体重減少のスコアが長期生存群に比べ、短期生存群で有意に高かったが、食欲不振のスコアは、両群で違いはなかった。この違いとして、食欲不振のスコアは、主観的な判断によるものが強いことが原因である可能性が考えられる。

本研究では、短期生存群の CIBDAI は、長期生存群に比べ有意に高値を示し、CIBDAI スコア >9 が予後不良の危険因子となった。Allenspach ら (2007) の CE の研究では、CIBDAI スコア (>8) が予後不良の危険因子になるが、Canine chronic enteropathy clinical activity index (CCECAI) のほうが、CIBDAI より強い予後不良の危険因子になると報告している。今回、CCECAI に関しては検討しなかったこ

とから今後、CCECAI についても検討する必要があると思われる。

過去の柴犬の CE では、TP の値は、生存群に比べ、非生存群で有意に低値を示すことが報告されている (Ohmi ら、2011)。さらに、LPE の犬 16 頭中 15 頭 (93.8%) で低蛋白血症が認められ、予後不良因子になることも報告されている (Ohno ら、2006)。本研究では、低蛋白血症を示した犬は、短期生存群でわずか 37.5% で、短期生存群の TP の値は、長期生存群に比べ有意に低い値を示した。さらに、TP 値と生存期間の間には相関関係があり、TP 値の低い症例は、生存期間が短いことも明らかとなった。これらの結果から、TP 値は、予後不良の危険予測因子として用いることは難しいが、TP 値の低い症例は、予後に注意する必要があることが判明した。

以前の CE の研究では、CRP 値と予後、または CRP 値と CIBDAI には、関連性はないと報告されている (Craven ら、2007; McCann ら、2007; Allenspach ら、2007; Ohmi ら、2011)。本研究では、CRP 値は、短期生存群で有意に高く、CRP 値と生存期間の間には負の相関関係が認められた。また CRP 値と CIBDAI の間には、正の相関関係が認められた。これらの結果から、腸管の強い炎症は重篤な臨床症状を引き起こし、予後が悪化する可能性がある。しかしながら、単変量ロジスティック回帰分析では、CRP の高い症例では予後に注意する必要があるものの、CRP 値は予後不良の

危険予測因子として使用するには難しいことが判明した。さらに症例を集め、CRPとCEの予後について検討する必要があると思われた。

海外におけるCEの研究では、十二指腸の病理組織のグレードと、臨床症状の重症度や予後とは関係はないと報告されている（Cravenら、2007；McCannら、2007；Allenspachら、2007；Ohmiら、2011）が、わが国の柴犬のCEの症例の75%が、十二指腸の病理組織において重度と評価された（Ohmiら、2011）。本研究では、柴犬の十二指腸の病理組織において重度と評価されたのは、短期生存群で87.5%、長期生存群で66.6%と両群で有意な違いはみられなかったことから、十二指腸の病理組織のグレードは、予後判定には使用できないことが示された。しかしながら、そのスコアの値は、短期生存群で有意に高値を示した。また、興味深いことに、胃の病理スコアは、短期生存群、長期生存群ともにほとんどの症例が正常を示した。柴犬のCEでは、十二指腸は重度の炎症を引き起こし、胃では重篤な病変が存在しないことが特徴の一つであるのかもしれない。

短期生存群の多くの症例（10/16頭）に、最初にプレドニゾロン2 mg/kg/dayの用量を投与したのに対し、Ls群の1例だけが2 mg/kg/dayの用量を最初に投与した。この理由は、短期生存群は臨床症状や検査所見が長期生存群より重篤であったため

あった。また 2 mg/kg/day 以上の用量を最終的に投与された症例は、長期生存群で 9 頭中 1 頭に対し、短期生存群では 16 頭中 11 頭と、有意に多かった。これは、短期生存群のほうが、治療により高用量のプレドニゾロンが必要であったことを示している。一方、長期生存群の全症例がプレドニゾロンの投与を休薬することができたか、または 0.5 mg/kg/day、1 mg/kg/day の抗炎症量で状態を維持することが可能であった。したがって、長期生存群では、低用量のプレドニゾロンで状態を維持できることを示している。

初期治療で部分的に、または十分な反応が認められた症例は、短期生存群では 75 %、そして長期生存群では全症例（100 %）であった。しかしながら、短期生存群の初期治療反応スコアは長期生存群よりも低値であった。治療反応においては、LPE 犬に関する研究があり（Ohno ら、2006）、治療に反応したのは、短期生存群で 12.5 %、長期生存群で 87.5 %であり、治療反応の良否は予後不良の危険予測因子となる可能性があることが報告されている。この報告と本研究との違いは、本研究では、柴犬のみで治療反応を評価したことや、治療プロトコルが異なったことが原因である可能性がある。本研究の成績から、柴犬の CE は初期治療に、反応する症例は多いが、予後は不良になる可能性があることが判明した。また、初期治療の反応性は、予後不良の危

陰予測因子にはならない可能性が示唆された。

初期治療の反応期間は、短期生存群では、42.5 日（範囲 20 ~ 90 日）で、長期生存群の 285 日（範囲 196 ~ 1026 日）に比べ有意に短く、治療反応が悪化してから死亡するまでの期間も短期生存群で有意に短かった。また、初期治療反応期間と生存日数においても正の相関が認められた。これらの結果から、短期間（約 3 か月）で初期治療に対する反応が悪い症例は、その後の治療反応も悪く、早期に死亡する可能性が高いと思われる。両群において、初期治療に対する反応が異なった理由は不明であるが、人のステロイド抵抗性 IBD の患者では、核内因子 kappa B (NF-kappa B) が消化管粘膜で活性化し、グルココルチコイドレセプターの減少を引き起こし、その結果、抗炎症効果を減少させていたとの報告 (Bantel, 2002) もあることから犬においても NF-kappa B の活性化がステロイド抵抗性に関与している可能性がある。一方、低コバラミン血症を呈している CE 犬の症例は、治療反応が悪いとの報告 (Craven, 2004) や消化管粘膜などに存在し、薬剤を細胞外へ排出する働きをする P 糖蛋白の発現が犬のプレドニゾン抵抗性 IBD の消化管粘膜で増加しているとの報告がある (Allenspach ら、2006)。本研究ではこれらの測定は行っていないため、短期生存群と長期生存群の病態の違いについて更なる検討が必要と思われる。

シクロスポリンは、ステロイド抵抗性 IBD の犬に有効な免疫抑制剤であることが報告されている (Allenspach ら、2006)。しかしながら、本研究では、シクロスポリンに反応を示した症例はいなかった。この理由として、消化管粘膜の重度の障害により薬剤の吸収不良が引き起こされた可能性が考えられることから、消化管の粘膜障害が重度になる前の初期段階にシクロスポリンの投与を検討する必要がある。また、今回はシクロスポリンの吸収不良を裏付ける血中濃度の測定を行わなかったことから、今後シクロスポリンの血中濃度と CE に対する治療の影響についても検討が必要であると思われる。

CE 発症犬の生存期間に関しては、短期生存群の中央値 73 日であったのに対して長期生存群は 800 日であった。また、6 か月生存率、1 年生存率、3 年生存率、5 年生存率は、それぞれ、36 %、32 %、16 %、8 %であった。過去の CE の柴犬の研究 (Ohmi ら、2011) では、生存日数の中央値が 74 日で、6 か月生存率、1 年生存率が、46 %、31 %、IBD や LPE の犬では、6 か月生存率が、96%、74 %であった (Jacobs ら、1990 ; Ohno ら、2006)。これらの研究と比較すると、今回検討した CE の柴犬は、非常に予後が悪いことが示された。ただし、6 か月生存率と 1 年生存率がほぼ差がなかったことから、6 か月生存した個体は、1 年以上生存できる可能性があるが、

最終的には約半数（55.5 %）が、CE を再発して死亡しているので、CE の柴犬は、長期間の注意深い経過観察を行う必要があると思われる。

2.5 小括

本研究では CE の症例の現状と実態の把握を目的として、2007 年 10 月から 2009 年 2 月まで日本大学動物病院に来院した犬 2330 頭に対する CE の症例の割合と犬種、年齢、性別について調査した。来院した犬 2330 頭中、86 頭が CE と診断し、そのうち柴犬、ウェストハイランドホワイトテリア、ジャーマンシェパード、ミニチュアピンシャーが他の犬種と比較して有意に発症頻度が高いことが明らかとなった。性別は、オス 51 頭、メス 35 頭とオスが若干多い傾向にあり、発症年齢は平均で約 6 歳であった。また、本研究では、CE の好発犬種である柴犬において、短期生存群と長期生存群について臨床的、血液検査的な特徴、病理、治療反応、予後に関して比較検討を行い、予後不良の予測因子の解析を行った。その結果、短期生存 (Ss) 群 (生存期間 6 か月以下) は 16 頭、長期生存 (Ls) 群 (生存期間 6 か月以上) は 9 頭であった。全ての症例がリンパ球形質細胞性十二指腸炎を伴う IBD と診断された。年齢の中央値は Ss 群で 7.5 歳、Ls 群で 5 歳と Ss 群が有意に高かった。年齢において最も良いカットオフ値は 7 歳で、感度 0.7、特異度 0.78、臨床症状の重症度スコア (CIBDAI) の中央値は Ls 群の 7 に対し Ss 群で 12 と有意に高かった。CIBDAI において最も良いカットオフ値は 9 で、感度 0.88、特異度 0.68 であった。したがって 7 歳以上の高

齢の症例や、CIBDAI が 9 以上の症例では、短期間で死亡するリスクが高く、予後に注意が必要であることが示唆された。血液生化学検査の TP、CRE、CRP 値において、Ss 群と Ls 群の間に統計学的な有意差が認められた。しかしながら、単変量ロジスティック回帰分析の結果、TP、CRE、CRP 値は予後不良の危険予測因子として使用するには難しいことが判明した。ただし、TP 値の低い症例、CRP 値の高い症例は、予後に注意する必要があると思われる。病理学的重症度スコアでは重度の腸炎は、Ss 群で 14/16 (87.5%)、Ls 群で 6/9 (66.6%) であり、予後不良因子として十二指腸の病理学的重症度は、使用できなかった。CE の柴犬の 25 頭中 21 頭で初期治療に反応した。しかしながら初期治療に反応をした症例のうち、治療に反応していた日数の中央値は、Ss 群が 42.5 日 (20-91 日) と Ls 群の 285 日 (196-1026 日) に比べ有意に短かった。したがって、初期治療の反応日数が約 3 か月と短い症例は、早期に死亡する可能性があることが示唆された。初期治療の反応が悪くなってから死亡するまでの日数の中央値は、Ss 群が 19.5 日と Ls 群の 151 日に比べ優位に短かった。また、生存日数の中央値も、Ss 群で有意に短かった (Ss:73 日 Ls:800 日)。死亡率は、全症例では 84% (21/25) で、Ss 群で 100%、Ls 群の 55.5%であった。したがって、6 か月と 1 年生存率にあまり差がないことを考慮すると 6 か月生存する症例は、1 年以

上生存する可能性があることが示唆された。しかしながら長期生存群の約半数が、最終的に腸炎により死亡していることを考慮すると、長期間の経過観察が重要であると思われた。

第 3 章

リンパ球形質細胞性結腸炎（LPC）の犬の結腸における
NF-kappa B の活性と NOD2 mRNA の発現の検討

3.1 はじめに

リンパ球形質細胞性結腸炎（LPC）は、犬の大腸に起こる IBD の一般的な病理像の一つであり、LPE と同様に原因不明の慢性消化器疾患であるが、食餌や細菌に対する消化管粘膜の免疫反応の制御に何らかの異常があると考えられている（Jergens ら、1999 ; Ridyard ら、2002 ; Burgner ら、2008）。人の IBD においては、以前から獲得免疫の異常が関与していることが指摘されてきたが、近年、病原体関連分子パターンを認識する機構である自然免疫の異常に注目が集められている（Abreu ら、2004 ; Reuter ら、2004）。パターン認識受容体は、病原体関連分子パターンに反応するマクロファージなどの免疫細胞や、消化管の粘膜上皮細胞のような非免疫細胞に広く発現する受容体蛋白である（Hugot ら、2006 ; Mercier ら、2012）。パターン認識受容体の中で、最も重要な受容体としては、細胞表面やエンドソーム内で細菌やウイルス抗原を認識する Toll-like receptor（TLR）や細胞質内で細菌抗原を認識する Nucleotide oligomerization domain（NOD）がある（Becker ら、2007 ; Franchi ら、2008）。NOD 蛋白は、細菌の構成成分であるリポ多糖（LPS）やペプチドグリカン（PGC）を認識する重要な受容体蛋白である。また NOD は、自然免疫システムの中で宿主から感染抗原の排除に重要な細胞内伝達因子である NF- κ B を活性化する

(Inohara ら、2001 ; Silverman ら、2001)。多くの研究において、この NOD ファミリーの NOD2 をコードする遺伝子領域にフレームシフト突然変異が起き、消化管での NOD2 の機能欠損を引き起こし、クローン病発症に関わっていることが報告されている (Ogura ら、2001 ; Hugot ら、2001 ; Cuthbert ら、2002 ; Naser ら、2012)。また、近年、NOD2 mRNA と蛋白レベルにおいて、人の IBD の消化管粘膜で発現が亢進し、NF-kappa B を活性化しているとの報告もある (Berrebi ら、2003 ; Stronati ら、2008 ; Wild ら、2007)。

犬でも、NOD2 に関する報告は、健常犬の結腸 (Swerdlow ら、2006) や肛門周囲瘻 (House ら、2008、2009) でなされているが、犬の LPC に関する報告はない。また、CE の犬の小腸で NF-kappa B の活性化が認められたとの報告 (Luckschander ら、2010) はあるものの、大腸における研究はされていない。

そこで、本研究では、LPC の犬の結腸組織において、NOD2 mRNA の発現と NF-kappa B の活性化について検討した。

3.2 材料および方法

3.2.1 LPC 犬

消化管粘膜組織検体は、2011年6月から2012年5月においてANMECに来院した3週間以上大腸性の慢性消化器症状（下痢、血便、しぶりなど）を呈した犬19頭から採取した。症例は、血液検査（CBC、血液化学検査）、糞便検査、レントゲン検査、超音波検査、内視鏡検査、病理組織検査を行い、他の消化器症状を呈する疾患を除外した。全症例の臨床症状の重症度の評価はCIBDAIを用いて行った。活動性、食欲、嘔吐の頻度、糞便の性状、排便の頻度、体重減少の6つの評価項目について、それぞれを0から3にスコアをつけた。

3.2.2 健常犬

健常対照犬として、5頭の健常ビーグル犬（メス）を用いた。年齢の中央値は、5歳齢（範囲3～9歳齢）で、消化器症状などは認められなかった。また、血液検査（CBC、血液化学検査）、糞便検査、レントゲン検査、超音波検査においても、異常所見は認められなかった。さらに内視鏡検査により、消化管の生検を行い、病理組織検査を実

施したが異常所見は認められなかった。

なお、本研究における健常犬の使用は、本学生物資源科学部実験動物委員会の承認に基づき行った（承認番号 AP11B059）。

3.2.3 組織の採材と処理

全身麻酔下において、下部消化管内視鏡（VES3 Helen, VQ-8143B flexible video endoscope, Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan）により下行結腸から生検鉗子（VH-143-B25, Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan）を用いて粘膜組織を採材した。RNA と核蛋白の分析に用いる組織は、採材後すぐに液体窒素に浸し、使用するまで -80°C で凍結保存した。病理組織検査に用いる組織は、10 %ホルマリンにて固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色を実施した。

3.2.4 RT-PCR による NOD2 mRNA 発現量の定量

組織は、Micro Smash ms-100R（Tomy Corp., Tokyo, Japan）によりホモジナイズし、TRIzol Reagent（Life Technologies Corp., Tokyo, Japan）により全 RNA 抽出を行った。抽出した全 RNA は、オリゴ dT プライマーと Avian Myeloblastosis Virus

(AMV) reverse transcriptase (Promega Inc., Madison, WI, US) を用いて RT 反応させ、cDNA 合成を行った。cDNA は使用するまで -20°C で保存した。PCR 反応液は、合成した cDNA 溶液 $2\mu\text{l}$ を鋳型として、Taq DNA ポリメラーゼ を $0.1\mu\text{l}$ 、 $10\times$ Ex taq バッファーを $2\mu\text{l}$ 、 2mM dNTP を $1.6\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{M}$ の Forward および Reverse プライマーを $1\mu\text{l}$ ずつ加え、RNase-free 滅菌精製水で全量が $20\mu\text{l}$ になるように調整した。PCR 反応は、熱変性を 95°C 、30 秒、アニーリングを 58.6°C の温度で 1 分間、伸長反応を 72°C 、1 分間の工程を 1 サイクルとして 25 サイクル行った。PCR 用のプライマーとプローブの塩基配列は、表 3-1 に示した。GAPDH は内在性コントロール遺伝子 (キャリブレーター) として用いた。PCR 増幅産物は 2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を 30 分行い、紫外線照射下で観察した。バンドは Software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US) により解析した。

3.2.5 ゲルシフトアッセイ

ホモジナイズした組織は、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Pierce, Rockford, IL, US) により核蛋白と細胞質の分離を行い、核蛋白抽出を行っ

た。蛋白濃度の調整は、BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible (Pierce, Rockford, IL, US) を用いて行った。DNA プローブは、95 °Cで、5 分間加熱後、室温まで冷却しアニーリングした。DNA プローブに使用された二本鎖オリゴ DNA は、NF-kappa B に対する共通塩基配列 (3' - T C A A C T C C C C T G A A G G G T C C G - 5') を保有しており、さらに蛍光色素である Cy 5 によって標識した。核蛋白 (10 µg) と DNA プローブ (17.5 fmol) は、バインディングバッファー 20 µl (5 M NaCl, 1 M Tris HCl, 0.5 M EDTA pH 8, 1 M dithiothreitol, 37.8 % glycerol, 1.5 % NP-40, 5 mg/ml bovine serum albumin, 1 µg poly dI-dC) の中で、25 °C、30 分間、結合反応を行った。サンプルは、4 % ポリアクリルアミドにおいて、100V、1 時間、電気泳動を行った。ゲルの画像は、Typhoon 9410 high performance imager (GE Healthcare, Tokyo, Japan) と Software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US)により解析した。

3.2.6 統計処理

統計処理は、GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, US) を用いて行った。Mann-Whitney U-test は、NOD2 mRNA 発現量と NF-kappa B の

活性化において LPC 犬と健常犬の比較に用いた。CIBDAI、NOD2 mRNA、NF-kappa B における相関関係は、Spearman's rank correlation test によって解析した。なお、統計学的な有意水準は $p < 0.05$ とした。

3.3 結果

3.3.1 症例

全症例において、結腸の粘膜固有層に、軽度から顕著なリンパ球と形質細胞の浸潤を確認し、LPC と診断した。症例の年齢の中央値は、8 歳齢（範囲 2 ~ 14 歳齢）で、オスが 8 頭（去勢オス 3 頭、未去勢オス 5 頭）であり、メスは、11 頭（避妊メス 6 頭、未避妊メス 5 頭）であった。犬種は、柴犬（3 頭）、ミニチュアダックスフント（3 頭）、ボストンテリア（1 頭）、ミニチュアシュナウザー（1 頭）、チワワ（1 頭）、ミニチュアピンシャー（1 頭）、パピヨン（1 頭）、ロットワイラー（1 頭）、バーニーズマウンテンドッグ（1 頭）、ヨークシャーテリア（1 頭）ウェルシュコーギー（1 頭）、ジャックラッセルテリア（1 頭）、アイリッシュセッター（1 頭）、ワイアーヘアード・フォックス・テリア（1 頭）、雑種（1 頭）であった。CIBDAI の中央値は、5（範囲 2 ~ 14）であった。

3.3.2 結腸における NOD2 mRNA 発現量

NOD2 の結腸組織の mRNA 発現量は、健常犬に比べ、LPE 犬で有意に上昇していた（1.6 倍、 $p < 0.05$ ）（図 3-1、3-2）。

3.3.3 結腸における NF-kappa B 結合活性

結腸組織における NF-kappa B 結合活性は、健常犬に比べ LPC 犬で有意に高かった (1.45 倍、 $p < 0.05$) (図 3-3)。

3.3.4 相関関係

CIBDAI、NOD2、NF-kappa B 活性の間に相関関係は認められなかった。

表 3-1 半定量的 RT-PCR におけるプライマーの配列

Target gene		Primer sequence(5'-3')	Product size (bp)	Source
NOD2	Forward	CCTGAACTCATCAAAGCCATCG	559	Mathew <i>et al.</i>
	Reverse	TGCTCACCATCCTACCTATT		
GAPDH	Forward	CTCATGACCACAGTCCATGC	412	Gen Bank NM_008084
	Reverse	TGAGCTTGACAAAGTGGTCA		



図 3-1 結腸組織における PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動

M ; 分子量マーカー (100 bp DNA ladder)

Lane1~5 ; 健常犬

Lane 6~24 ; LPC 犬

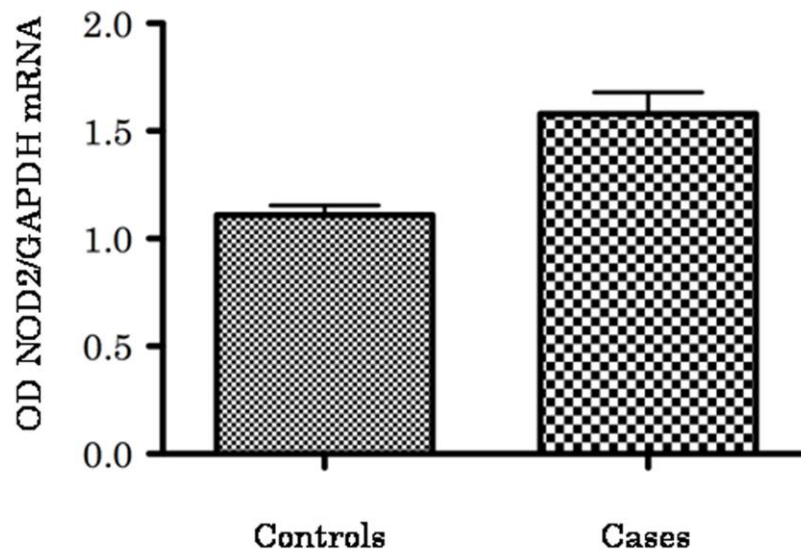


図 3-2 健常犬と LPC 犬における結腸組織の NOD2 mRNA 発現量

Controls ; 健常犬 (5 頭)

Cases ; LPC 犬 (19 頭)

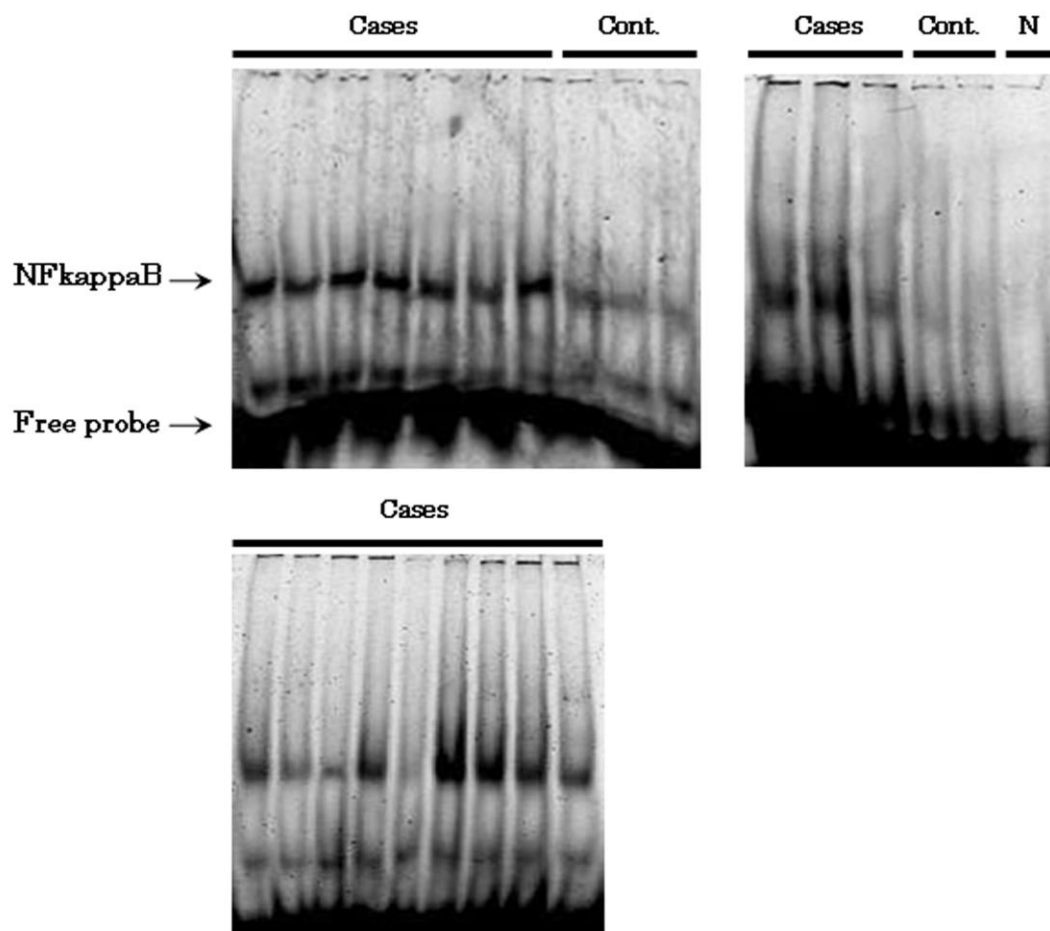


図 3-3 ゲルシフトアッセイによる NF-kappa B 結合活性

Cont. ; 健常犬

Cases ; LPC 犬

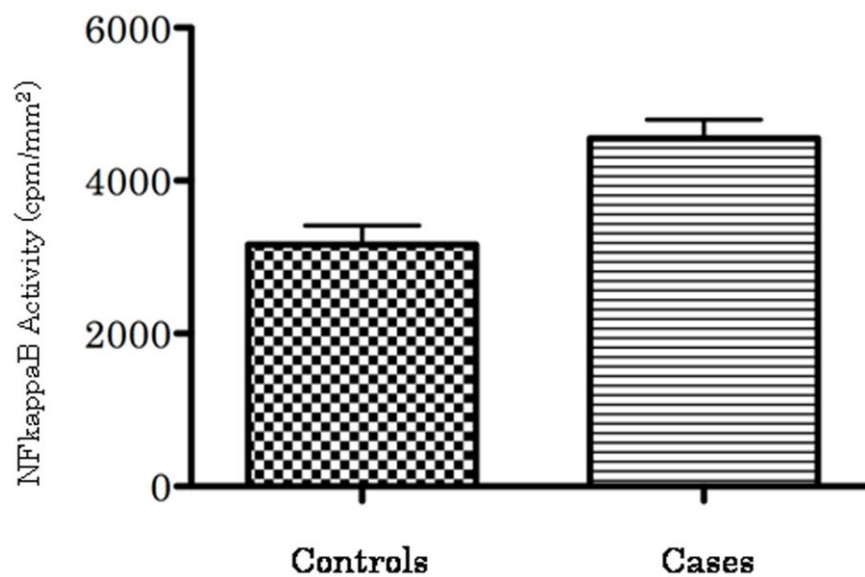


図 3-2 健常犬と LPC 犬における結腸組織の NF-kappa B 結合活性の比較

Controls ; 健常犬 (5 頭)

Cases ; LPC 犬 (19 頭)

3.4 考察

過去における人やラットの研究では、結腸炎の粘膜組織で NOD2 mRNA の発現が亢進していたことが報告されている (Gutierrez ら、2002 ; Rosenstiel ら、2003 ; Fujisawa ら、2006 ; Stronati ら、2008)。本研究においても、健常犬に比べ LPC 犬の結腸粘膜で NOD2 mRNA の発現が亢進していた。Swerdlow らは、健常犬の結腸粘膜上皮の初代培養細胞では NOD2 mRNA の発現は低いが、ペプチドグリカンによる刺激を行うと NOD2 mRNA の発現が亢進すると報告している (2006)。また、Gutierrez らも健常人の結腸粘膜から分離培養した細胞では、通常 NOD2 mRNA の発現は低いが、TNF- α やペプチドグリカンで刺激すると発現増強されることを報告している (2002)。本研究では、健常犬の結腸粘膜において TNF- α やペプチドグリカンなどの刺激前後の状態は不明だが、LPC 犬に比べて低発現であった。これは、粘膜上皮やマクロファージの NOD2 が、通常、共生細菌に対し低い反応性を示すことで消化管粘膜の恒常性の維持に貢献していると考えられる。全身性の免疫疾患である人のブラウ症候群では、NOD2 mRNA を制御する遺伝子部位の突然変異により NOD2 発現亢進と NF-kappa B の活性化が引き起こされる (Tanabe ら、2004)。同様の炎症が、LPC 犬での腸粘膜でも起こっている可能性がある。また、NOD2 ノック

クアウトマウスの研究では、腸内細菌が存在するにも関わらず、腸炎が全く引き起こされず、腸炎の惹起に NOD2 が重要な役割を果たしており、粘膜において細菌に対する免疫反応を調節している可能性が示されている (Pauleau ら、2003)。本研究では、NOD2 と腸内細菌の関係性については検討していないが、以下の病態メカニズムが想定される。1) NOD2 遺伝子の異常などにより NOD2 の発現亢進が起き、腸内細菌の菌体構成成分に対する感受性が増加し、炎症を惹起する。2) 消化管粘膜障害のために、腸内細菌の侵入を防ぐことができなくなる。3) 腸管粘膜細胞へ細菌が侵入することにより、NOD2 mRNA の発現増強が起こる。しかしながら、本研究では、NOD2 蛋白やその遺伝子変異に関する検討は行っていないため、更なる検討が必要である。

Luckschander (2010) らは、CE の十二指腸粘膜で NF-kappa B が活性化していたと報告している。本研究においても、結腸粘膜において同様に NF-kappa B の活性化が認められた。一般に、NF-kappa B は、NOD2 を含むさまざまなカスケードを通して活性化される (Jobin ら、2008)。また、最近のクローン病の報告では、NOD2 のプロモーターサイトの中に NF-kappaB サイトと高い相同性を示す部分があり、NF-kappaB が NOD2 の発現を制御していることが示されている (Rosenstiel ら、

2003 ; Hu ら、2010)。IBD 犬の十二指腸と結腸では、NF-kappa B を活性化する働きを持つ TLR2、4、9 mRNA の発現が、健常犬よりも亢進していたことが報告されている (Burgner ら、2008)。また最近、TLR4 および 5 の遺伝子が、ジャーマンシェパードの IBD の疾患関連遺伝子であることが示された (Kathrani ら、2010)。さらに、TLR5 遺伝子の異常が、IBD の犬で菌体構成成分のフラジェリン蛋白に過剰反応し、NF-kappa B を活性化し炎症を惹起することも報告されている (Kathrani ら、2010)。本研究では、犬の LPC が、NOD2 の高発現と NF-kappa B の活性化により引き起こされているのか、または NOD2 を発現した炎症細胞の集積が起きているのかは不明であるが、腸内細菌や食餌抗原により NOD2、TLR、TNF- α などの受容体を介して NF-kappa B が活性化され、NOD2 が発現し、さらに NF-kappa B の活性化が引き起こされるというポジティブフィードバックが惹起されている可能性がある。その結果として、炎症性サイトカインやケモカイン、あるいは細胞接着分子などの発現が誘導されて慢性炎症が引き起こされているのかもしれない。今後、LPC の犬でも NF-kappa B の活性を誘導するもしくは誘導される炎症性サイトカインやケモカインの因子の解析を行う必要があると考えられる。

本研究では、臨床症状のスコア (CIBDAI) と NOD2、NF-kappa B との間に、相

関関係は認められなかった。Luckschander ら (2010) の報告でも、CIBDAI と NF-kappa B との相関はみられていない。TLR mRNA 発現量と CIBDAI との関係を検討した論文では、TLR2 と CIBDAI は相関がある (McMahon ら、2010) あるいは相関がない (Burgner ら、2008) というように、一致した見解は得られていない。症状の重篤さと NOD2 の発現の強さには、関連性はないのかもしれない。

本研究では、治療後の NF-kappa B と NOD2 の解析は行っていないが、Luckschander ら (2010) は、CE 犬の治療前後には腸管の NF-kappaB の活性が低下していたと報告している。人の IBD 患者の研究では、NOD2 の発現と NF-kappa B 活性が、治療後有意に低下しており症状も改善している (Thiele ら、1999 ; Stronati ら、2008)。実際に人では、この NF-kappa B をターゲットとした新しい治療が検討されている (Atreya ら、2008) ことから、今後、犬の IBD の治療に関しても NF-kappa B、NOD2、TLR の因子活性の制御が重要になるとと思われる。

ジャーマンシェパードのような犬種は、CE に罹患しやすいため、NOD2 や NF-kappa B が高い活性を示す可能性があることから、今後、CE を発症した犬種の違いによるこれらの因子の活性についても検討する必要があるだろう。また、それぞれの症例では、生活環境や飼育環境も異なることから、食餌や飼育環境あるいは、腸

内細菌叢等の違いと NOD2、NF-kappa B の発現の関係性について、より大規模で詳

細な研究が必要になると思われる。

3.5 小括

本研究では、犬の LPC において NOD2 mRNA の発現と NF-kappa B の活性の程度を検討した。2011 年 6 月から 2012 年 5 月において ANMEC に来院した 3 週間以上の大腸性の慢性消化器症状（下痢、血便など）を呈した犬 19 頭と健常犬 5 頭から消化管粘膜組織検体を採取した。

組織の NOD2 mRNA は、半定量的 RT-PCR により解析し、NF-kappa B 活性は、ゲルシフトアッセイにより解析した。NOD2 mRNA は、LPC 群において健常犬群に比べ 1.63 倍と有意に上昇していた。NF-kappa B の活性は、LPC 群において健常犬群に比べ 1.45 倍と有意に上昇していた。以上の結果から、LPC の犬の消化管では、食餌抗原や腸内細菌に対し、NOD2 を介した過剰反応が生じた結果、NF-kappa B の活性化が起こり炎症性サイトカインやケモカインの発現を誘導している可能性があることが示唆された。また、NF-kappa B がさらに NOD2 の発現を誘導するという正のフィードバックが起こり、消化管における慢性炎症の病態構築に寄与している可能性が示唆された。

第4章

LPE の犬におけるセレクトインファミリーと

P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) の発現の検討

4.1 はじめに

LPE は、犬の IBD の最も典型的な病理像で、消化管の粘膜固有層におけるリンパ球と形質細胞の浸潤を特徴とする (Guildford ら、1996 ; German ら、2003)。IBD は、人や犬では、食餌抗原や腸内細菌に対する腸管免疫の異常として考えられている。人の IBD は、クローン病と潰瘍性大腸炎に分類されるが、犬の IBD は、慢性腸疾患の一つの型であると考えられている (Jergens ら、1992 ; Xavier ら、2007)。

白血球の組織内への遊走は、炎症や免疫反応の主要な動態であり、循環血液中の白血球が消化管の血管内皮細胞に接着し、組織内に移行・浸潤した結果として、炎症免疫反応が起こる (Ley、2003)。循環白血球の血管内皮細胞への接着のカスケードは、①循環白血球の血管壁への辺縁趨向、②ローリング、③血管内皮細胞への繫留、④血管内皮細胞への強固な接着、⑤遊出、で構成される (Shimizu ら、1992)。これらのステップは、それぞれ特異的な接着分子によって担われており、セレクトインファミリーとそのリガンドは、これらの最初のステップを惹起する (Dustin ら、1991 ; Hogg ら、1992)。E セレクトインは、通常血管内皮細胞では発現していないが、TNF や IL1 などの炎症性サイトカインによって急速に発現する。L セレクトインは、巨核球や単球、リンパ球に、P セレクトインは、活性化した血小板や血管内皮細胞に発現している。

PSGL-1 は、血管内皮、白血球、血小板に発現し全てのセレクチンのリガンドになるが、特に P セレクチンに対する主要なリガンドとなることが明らかとなっている (Ley、2003)。人の IBD 患者では、血管内皮、白血球、血小板でのセレクチンの高発現が、報告されている (Ohtani ら、1992 ; Koizumi ら、1992 ; Schürmann、1995)。さらに、腸炎マウスやラットモデルにおいても、セレクチン mRNA の高発現が確認されている (Sun ら、2001 ; Everts ら、2003)。同様に、LPE の犬においてもセレクチンとそのリガンドの高発現が、循環白血球の血管内皮への接着に寄与し、消化管の炎症をもたらしていると考えられる。

しかしながら、LPE 犬においてセレクチンやセレクチンリガンドに関しては、全く検討されていない。そこで本研究では、犬における LPE とセレクチンとそのリガンドの関係を明らかにすることを目的に、両因子の mRNA を相対定量し、その発現量を健常犬と比較検討するとともに、これらの因子間の関連性や臨床症状の重症度や病理組織のグレードとの関係を検討した。

4.2 材料および方法

4.2.1 健常犬

健常対照群として、健常ビーグル犬 10 頭（オス 5 頭、メス 5 頭）を用いた。年齢の中央値は、6 歳齢（範囲 1 ~ 10 歳齢）で、消化器症状などの臨床症状は認められなかった。全ての犬は、血液検査（CBC、血液化学検査）、糞便検査、レントゲン検査、超音波検査において、異常所見は認められなかった。さらに内視鏡検査により、消化管の生検を行い、病理組織検査を実施したが異常所見は認められなかった。

なお、本研究における健常犬の使用は、本学生物資源科学部実験動物委員会において承認に基づき行った（承認番号 AP11B059）。

4.2.2 LPE 犬

第 3 章と同様に、消化管粘膜組織検体は、2011 年 3 月から 2012 年 10 月において ANMEC に来院した 3 週間以上の小腸性の慢性消化器症状（嘔吐、下痢など）を呈した犬 21 頭から採取した。症例は、血液検査（CBC、血液化学検査）、糞便検査、レントゲン検査、超音波検査、内視鏡検査、病理組織検査を行い、LPE 以外の消化器

症状を呈する他の疾患を除外した。症例犬の年齢の中央値は、9歳齢（範囲2～14歳齢）で、オスが9頭（去勢オス6頭、未去勢オス3頭）であり、メスは、12頭（避妊メス5頭、未避妊メス7頭）であった。全ての症例は、第2、3章と同様に CIBDAI による臨床症状の重症度スコアを算定した。総スコアにおいて0～8であった症例群を Non-severe CIBDAI 群、9以上の症例群を severe CIBDAI 群とした。犬種は、柴犬（4頭）、ミニチュアダックスフント（3頭）、雑種犬（3頭）、トイプードル（2頭）、チワワ（1頭）、バーニーズマウンテンドッグ（1頭）、ヨークシャーテリア（1頭）、ウェルシュコーギーペンブローク（1頭）、ジャックラッセルテリア（1頭）、ジャーマンシェパード（1頭）ビーグル（1頭）、ポメラニアン（1頭）、ニュージージーランドハンタウエイ（1頭）であった。CIBDAI の中央値は、9（範囲2～17）であった。

4.2.3 組織の採材、処理、病理組織学的検査

全身麻酔下において、上部消化管内視鏡（VES3 Helen, VQ-8143B flexible video endoscope, Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan）により十二指腸下行部から生検鉗子（VH-143-B25, Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan）を用いて粘膜組織を採材した。RNA と核蛋白の分析に用いる組織に関しては、採材後す

ぐに液体窒素に浸し、使用するまで -80°C で凍結保存した。病理組織検査に用いる組織は、10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、ヘマトキシリン・エオジンにて染色した。

病理組織は、World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) ガイドラインを基に、病理学専門医により評価した。十二指腸の病理組織は、形態学的特徴（絨毛、上皮障害、陰窩拡張、リンパ管拡張、粘膜線維化）と浸潤している炎症細胞の特徴（上皮内リンパ球、粘膜固有層のリンパ球と形質細胞、好酸球、好中球）から、0（正常）、1（軽度）、2（中程度）3（重度）にスコア化した。総合スコアにおいて0~8であった症例群を Non-severe 病理グレード 群、9以上の症例群を severe 病理グレード群とした。

4.2.4 リアルタイム RT-PCR による mRNA 発現量の定量

組織は Micro Smash ms-100R (Tomy Corp., Tokyo, Japan) によりホモジナイズし、TRIzol Reagent (Life Technologies Corp., Tokyo, Japan) により全 RNA 抽出を行った。抽出した全 RNA に、オリゴ dT プライマー $1.0\ \mu\text{l}$ 、RNase inhibitor $0.5\ \mu\text{l}$ 、RNase free-water を加え $10\ \mu\text{l}$ になるように調整した。調整したサンプルは 70°C 、10 分間、 4°C の条件で変性、アニーリングを行った。次に変性、アニーリング済み反応液 $10\ \mu\text{l}$ に Avian Myeloblastosis Virus (AMV) reverse transcriptase (Promega

Inc., Madison, WI, US) 1.5 μ l、Mg 4 μ l、 $\times 10$ Buffer、dNTP 2 μ l、RNaseDNase Free-water 0.5 μ l を加えた。調整したサンプルは、42 $^{\circ}$ C、15 分間、95 $^{\circ}$ C、5 分間、4 $^{\circ}$ C、5 分間の条件で RT 反応を行い、cDNA 合成を行った。cDNA は使用するまで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

リアルタイム PCR 用のプライマーとプローブの塩基配列は、表 4-1 に示した。

GAPDH は内在性コントロール遺伝子（キャリブレーター）として用いた。内在性コントロール遺伝子にはいくつかの種類があり、組織によって最適な遺伝子が異なることがあるが、GAPDH は個体間での差が小さく、遺伝子の発現変化の検出に適している（Peters ら、2006）。他の内在性コントロール遺伝子として β アクチン、succinate dehydrogenase complex subunit A（SDHA）を用いたが変動が大きかったため、リアルタイム PCR には変動のより小さい GAPDH を用いた。

リアルタイム PCR は Light Cycler System（Roche Diagnostics Inc., Basel, Switzerland）を用いた。反応液は、SYBR Primix Ex Taq（Takara Bio Inc., CA, USA）を 10 μ l、10 μ M に予め調整した Forward および Reverse プライマー 0.4 μ l を加え、さらに 2 μ l のサンプル cDNA を添加し、RNase-free 滅菌蒸留水で全量が 20 μ l になるように調整した。増幅条件は、95 $^{\circ}$ C、30 秒間を 1 サイクル反応させた後、

95°C、5 秒間と 60°C、20 秒間の工程を 1 サイクルとして 40 サイクル行い、その後 95°C、1 秒間と 65°C、15 秒さらに 95°C、1 秒間を 1 サイクル行った。

リアルタイム PCR を行う前に、抽出した全 RNA サンプルにおいて GAPDH のプライマーを用いて PCR と電気泳動を行い、ゲノムのコンタミネーションが存在しないことを確認した。定量解析には、 Δ CT 法による相対定量法を実施した。

4.2.5 統計処理

統計処理は、GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, US) を用いて行われた。Mann–Whitney U-test は、mRNA 発現量における LPE 犬と健常犬、Non-severe CIBDAI 群と severe CIBDAI 群、Non-severe 病理グレード群と severe 病理グレード群の比較に用いた。CIBDAI、病理スコア、mRNA 発現量における相関関係は、Spearman's rank correlation test によって解析した。なお、統計学的な有意水準は $p < 0.05$ とした。

4.3 結果

4.3.1 症例

全症例において、十二指腸の粘膜固有層に、軽度から顕著なリンパ球と形質細胞の浸潤を確認し、LPE と診断した。severe CIBDAI グループは 11 頭、non severe CIBDAI グループは 10 頭であった。また、病理スコアの中央値は、9 (5-16) であった。severe 病理グレード群は、11 頭、non severe 病理グレード群は、10 頭であった。

4.3.2 十二指腸におけるセレクトインと PSGL-1 の mRNA 発現量

十二指腸組織の E セレクトインにおける mRNA 発現量は、健常犬に比べ、LPE 犬で 2.2 倍と有意に上昇していた ($p < 0.01$)。P セレクトインの mRNA 発現量も、健常犬に比べ、LPE 犬で 2.1 倍と有意に上昇していた ($p < 0.001$)。さらに、LPE 犬の十二指腸組織における PSGL-1 の mRNA 発現量は、健常犬に比べて、1.6 倍に上昇していた ($p < 0.05$)。しかしながら L セレクトインの mRNA 発現量は、健常犬と LPE 犬では有意な差は認められなかった (図 4-1)。

4.3.3 CIBDAI, 病理スコア、セレクトイン、セレクトインリガンドとの関係

E セレクトインと L セレクトインの間に正の相関が認められた ($p < 0.01$, $r = 0.66$)。

また、P セレクトインと L セレクトインの間にも正の相関が認められた ($p < 0.05$, $r = 0.45$) (図 4-2)。しかしながら、E セレクトインと P セレクトインの間に相関は認められなかった ($p = 0.11$, $r = 0.36$)。また、その他の項目における相関は認められなかった。

severe CIBDAI 群と non severe CIBDAI 群の比較においても、セレクトイン、PSGL-1、病理スコアに違いは認められなかった。severe 病理グレード群と non severe 病理グレード群の比較においても、セレクトイン、PSGL-1、病理スコアに有意な差は認められなかった。

表 4-1 定量的リアルタイム RT-PCR におけるプライマーの配列

Primer		Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	GenBank accession number
GAPDH	Forward	TGCCCCACCCCAATGTATC	100	NM_001003142
	Reverse	CTCCGATGCCTGCTCACTACCTT		
β -actin	Forward	CATGTACCCTGGCATTGCTGAC	123	AF_021873.2
	Reverse	ATGGAGCCTCCGATCCACAC		
SDHA	Forward	TGGTCTGGAACACCGACCTG	143	XM_535807.3
	Reverse	CTCGTCAATCCGCACCTTGTA		
E-selectin	Forward	GAAATTCTGGCCCGTCCATC	135	NM_001003310.1
	Reverse	ATGCAGCCAGCACTTAATCTGAAAC		
L-selectin	Forward	GATTCAACAGGACCAGCAGCA	120	XM_537201.3
	Reverse	CCGCAGGGTCCACAAGTAAGA		
P-selectin	Forward	TACAACACCAGCTGTCGCTTCC	94	XM_537202.3
	Reverse	GTGCTGTCCACTGTCCCAAGTC		
PSGL-1	Forward	TTCTGGCTGAGATGGCGATG	70	NM_001242719.1
	Reverse	AGAGTGGCTGGCTCTGGAGTTC		

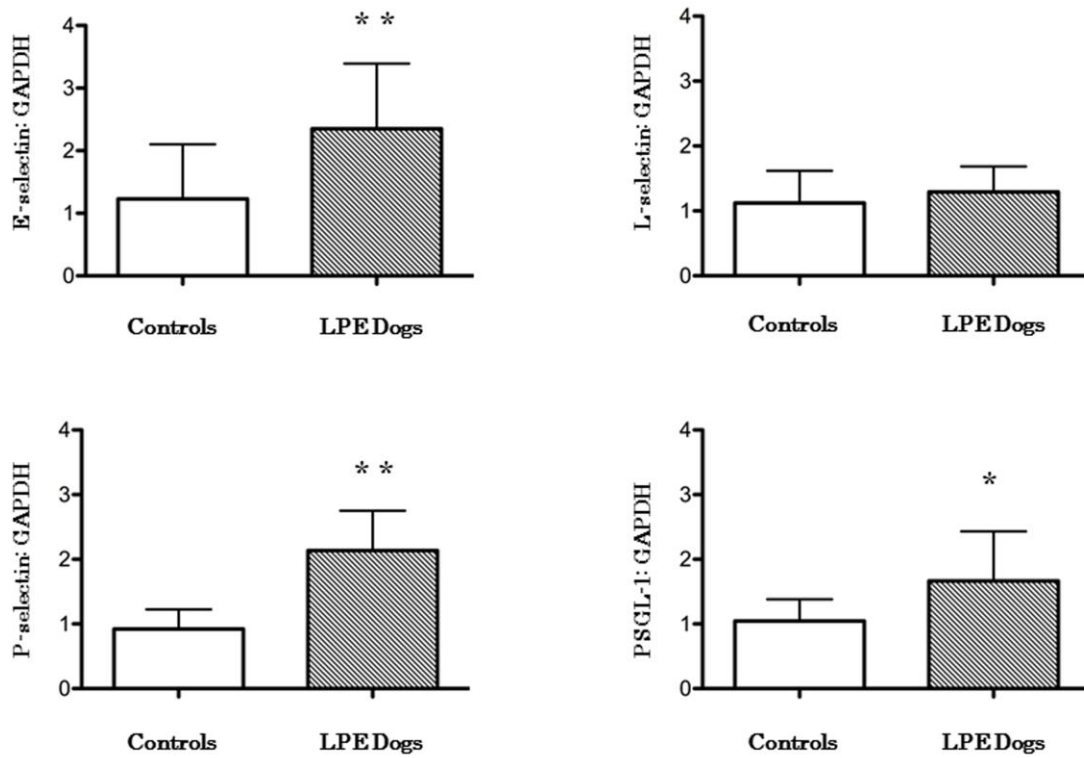


図 4-1 セレクチンと PSGL-1 の mRNA 発現量

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

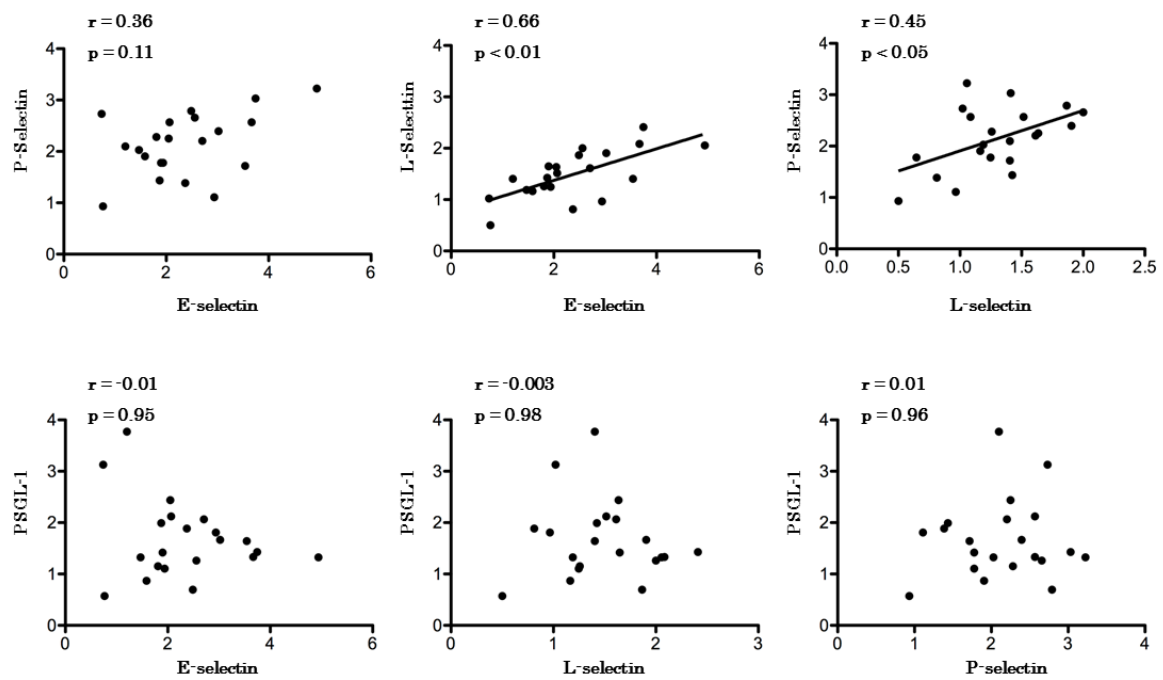


図 4-2 セレクチンと PSGL-1 の mRNA 発現量との関係

r : 相関係数

p < 0.05 : 有意水準

4.4 考察

これまで犬の腸炎におけるセレクチンの研究の報告はないが、リポ多糖 (LPS) を投与した敗血症モデル犬では、E セレクチン mRNA の発現量が肺や肝臓で増加しており、小腸では上昇していない (Sakaue ら、2005)。人 IBD 患者では、腸組織の E セレクチンの発現が増加していることが多数報告されている (Nakamura ら、1993 ; Pooley ら、1995 ; Bhatti ら、1998)。同様に、本研究でも LPE の犬において E セレクチン mRNA が上昇していることが明らかとなった。E セレクチンは、TNF- α や IL-1 β の活性化によって血管内皮細胞に発現する。P セレクチンは、血管の表面を転がるようになるローリングの初期に重要だが、E セレクチンは、スローローリングに関わっている (Ley、2003)。この結果は、E セレクチンの発現が、LPE の犬のリンパ球と形質細胞のスローローリングによって、炎症を惹起している可能性を示している。また、E セレクチン mRNA の発現と蛋白の発現が相関しているとの報告もある (Whelan、1991 ; Van Kampen、2001)。今後、LPE の犬においても E セレクチンの蛋白レベルの発現を検討する必要があると思われる。

人のクローン病、潰瘍性大腸炎患者では、L セレクチンの発現に健常人と有意な差はなく、血清 L セレクチンの測定はこれらの疾患の診断ツールとしては、適切ではな

いと報告がある (Seidelin, 1998)。一般に、Lセレクトインは、E、Pセレクトインと違い、次の細胞接着のプロセスに向う前に、活性化刺激とともに細胞表面からダウンレギュレートされることが知られている (Ballら、2011)。したがって、本研究においてLセレクトイン mRNA の発現が健常犬に比べ高くなかったことは、このダウンレギュレートが原因であることも考えられる。今後、さらに症例を集積することにより、LPE と Lセレクトインの関係を検討する必要があると思われる。

Pセレクトインは、トロンビン、ヒスタミン、C5aにより活性化し血小板や血管内皮細胞に発現する (Rivera-Nieves, 2008)。また、ローリングにおけるPセレクトインの役割は、Eセレクトインと同様であるが、特に初期のローリングに関与する。皮膚炎と肥満細胞腫の犬では、健常犬に比べPセレクトインの発現が上昇する (Chénierら、1998 ; de Moraら、2007) と報告されている。人IBDで、Pセレクトインの発現が、血小板で上昇することも報告されている (Fägerstamらの報告、2000)。さらに、クローン病や潰瘍性大腸炎の患者の血管内皮細胞においても、Pセレクトインが上昇していた (Schürmannら、1995) ことから、LPE犬においても、初期のローリングにおいてPセレクトインが作用している可能性がある。今後、血小板、血管内皮細胞のどちらにまたは両方において発現しているかについては検討が必要であると思われる。

マウスにおいては、デキストラン硫酸で結腸炎を誘発すると、血管内皮細胞の PSGL-1 の発現が亢進する (Vowinkel ら、2007)。犬では、最近 PSGL-1 の cDNA クローニングが行われ、モノクローナル抗体作製に関する報告がされた (Umeki ら、2011) もの、P セレクチンとそのリガンドの PSGL-1 の関係性を検討した研究はない。本研究では、LPE 犬で P セレクチンと共に PSGL-1 mRNA の発現が亢進していることが明らかとなった。このことは、LPE 犬で P セレクチン-PSGL-1 の相互作用が、白血球の遊走を惹起することで腸炎を引き起こしている可能性を示唆するものと思われる。

LPE 発症犬では E セレクチンと L セレクチンの発現および P セレクチンと L セレクチンの発現間に正の相関関係が認められた。この結果は、それぞれのセレクチンが共調して発現し、炎症細胞が集積に関与している可能性を示している。しかしながら、CIBDAI、病理スコア、セレクチンとの間には相関は認められなかった。CIBDAI、WSAVA の病理グレードスコアは、確かに臨床症状の重症度や病理組織のグレード分類に、非常に有用なツールである。しかし、これらの判定は主観的であり、臨床家や病理専門医によって評価がさまざまである。一方で、臨床症状と WSAVA グレードには関係性がないという報告も多数ある (Allenspach ら、2010 ; Willard ら、2010)

ことから、今後、さらに大規模な症例検討が必要であろう。

第3章では、LPCの犬でNF-kappa Bの活性化が確認された。NF-kappa Bは、パターン認識受容体 (TLR、NOD-like receptor)、TNF レセプター、B cell レセプターを介し活性化し、ケモカイン、炎症性サイトカイン、細胞接着分子、セレクチン、セレクチンリガンドなどの遺伝子を発現する (Nishikori、2005 ; Pfosser、2010)。

したがってLPE犬では、細菌や食餌抗原によりNF-kappa Bが活性化しセレクチン、セレクチンリガンドなどの発現が増強し、PSGL-1を介し、白血球の血管内皮細胞へのローリングと結合が起きている可能性が考えられる。そして、その結果、細胞間隙に多くの白血球の遊走が起これ、消化管の炎症が惹起されている可能性が考えられる。

今後、PSGL-1以外のほかのリガンド (例、Glycam-1, シアリルルイス X など)、インテグリン (例、 $\alpha 4$, B7 など)やそのインテグリンを活性化するケモカイン (例、TECK, MEC, IL-8, RANTES など) 等の分析も行い、犬のLPEにおける白血球のホーミングや、遊走のメカニズムを解明する必要があると思われた。

人のクローン病や潰瘍性大腸炎患者では、血清中のE、Pセレクチンの濃度が上昇しており、病状進行のバイオマーカーとして使用されている (Göke、1997 ; Magro、2004)。Bhatti ら (1998) は、放射性同位元素 (ラジオアイソトープ) で標識された

薬剤を体内に投与後、放出される放射線を画像化する免疫シンチグラフィ検査において、抗 E セレクチン抗体で標識したラジオアイソトープを用いたところ、クローン病や潰瘍性大腸炎患者の消化管画像が増強されたと報告している。さらに、マイクロバブルを造影剤として使用した造影超音波検査において、IBD マウスの消化管の血管内皮細胞では P セレクチンが増強され、治療後減少したことが示されている

(Deshpande、2012)。したがって、今後、犬の LPE においてもこれらのセレクチンの測定は、診断や治療効果の判定に有用なツールとなる可能性が示唆された。また、IBD モデルマウスの治療においては、抗 P セレクチン抗体、抗 PSGL-1 抗体を使用したところ、腸炎が改善したと報告されている (Rijcken ら、2004 ; Inoue ら、2005)。

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発性大腸炎マウスの実験でも、抗 E、抗 P セレクチン抗体により白血球のローリングが減少することが示されている (Panés、2003)。したがって、抗 E、抗 P セレクチン抗体は、将来、犬の IBD の治療の有用なツールになる可能性があると思われる。一方、これらのセレクチンやリガンドの発現が異なる犬種が存在する可能性もあることから、今後犬種ごとの検討も必要であると思われる。さらに、胃や空回腸や結腸における各セレクチンの発現量に違いがあることも考えられるので、今後、消化管の部位別に詳細な検討を行う必要があると思わ

れる。

4.5 小括

セレクトチンは、腸管の炎症動態において中心的な役割を担っており、白血球の循環血液から血管内皮へのローリングに関わっている。セレクトチンファミリー(E-, L-, P-セレクトチン) mRNA とセレクトチンリガンド PSGL-1 の mRNA の発現を測定することにより、セレクトチンファミリーとこれらのリガンドである PSGL-1 が、犬の LPE の病態に関与している可能性について検討した。

対象は、LPE の犬 21 頭、対照群として健常犬 10 頭から上部消化管内視鏡検査により採材した十二指腸組織を用い、リアルタイム RT-PCR により mRNA の発現量を定量した。また CIBDAI、病理スコア、セレクトチン、PSGL-1 の相関は、スピアマンの順位相関係数にて解析した。

LPE 犬の E セレクトチン、P セレクトチン、PSGL-1 mRNA は健常犬に比べ、有意に増加していた。しかしながら L セレクトチンにおいては、健常犬と有意な差はなかった。E セレクトチンと L セレクトチン発現、また P セレクトチンと L セレクトチン発現の間に正の相関が認められた。しかしながら、CIBDAI、病理スコア、セレクトチン発現の間には相関が認められなかった。これらの結果から、セレクトチンや PSGL-1 は、犬の LPE

の炎症細胞の集積に関与している可能性が示唆された。本研究は、犬 IBD の炎症カスケードに新しい所見を与えるものであり、セレクチンは治療法や診断ツールとして有用になる可能性が示唆された。

第 5 章

LPE の犬の十二指腸における NF-kappa B の活性と 免疫グロブリンスーパーファミリーの検討

5.1 はじめに

LPE は、犬の IBD の中で最も一般的に認められる病理組織所見 (Guildford, 1996 ; German ら、2003) であり、人と同様に、その明確な原因は不明であるが、遺伝的な異常によって食事抗原や腸内細菌に対する消化管粘膜免疫機構が破綻することで、腸炎を惹起していると考えられている (Burgner ら、2008 ; McMahon ら、2010)。人の IBD は、主にクローン病と潰瘍性大腸炎に大別される。以前から宿主側の獲得免疫の異常がその病態に関わっていると考えられていたが、最近では自然免疫の異常も IBD に関与していると考えられるようになってきた (Abreu ら、2004)。

NF-kappa B は、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) やインターロイキン 1 β (IL-1 β) などの炎症性サイトカインの発現をコントロールしている最も重要な転写制御因子の 1 つであり、自然免疫において中心的な役割を果たしている (Madsen, 2001 ; Silverman, 2001)。NF-kappa B は、Ikappa B という阻害因子により通常細胞質内に保持されているが、細胞の酸化、サイトカイン、微生物などの炎症反応メディエーターの暴露によるストレスを受けると Ikappa B は、Ikappa B キナーゼによりリン酸化反応が起こされ、その後プロテアーゼによって分解される。結合を解かれた NF-kappa B は、核内に移行し、DNA と結合し活性化される (Beg ら、1993 ; Barnes, 1997)。一方、

NOD2 も自然免疫において重要な働きを果たしている。NOD2 は、病原体関連分子パターンを認識する TLR と同様のパターン認識受容体の一つで、単核球、マクロファージ、樹状細胞、上皮細胞、パネート細胞上に発現する (Hugot、2006)。また、NOD2 は、NF-kappa B が活性化により炎症性サイトカインの発現を誘導することで、細菌に対する防御反応を惹起するという重要な働きを担っている。人の IBD では、この NOD2 と NF-kappa B が TNF α 、IL1 β とともに結腸において活性化しているといわれている (Neurath ら、1998 ; Atreya ら、2008 ; Stronati ら、2008)。しかしながら、犬の LPE では NF-kappa B の活性化とそのカスケードの研究はなされていない。

細胞接着分子 (CAMs) の発現も、また NOD2 と同様に、NF-kappa B によって制御されている。CAMs は、損傷した組織に対して、白血球のホーミングと遊走性に中心的な役割を果たし、炎症反応を惹起する免疫グロブリンスーパーファミリーと呼ばれる分子である。Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) は、血管内皮細胞を含む一部の細胞に弱いながらも恒常的に発現している (Jones ら、1995)。一方、Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) は、樹状細胞、クッパー細胞、滑膜細胞などに発現する (Seron ら、1991)。そして、Mucosal addressin cell adhesion

molecule 1 (MAdCAM-1) は、消化管やパイエル板、腸間膜リンパ節などの消化管関連リンパ組織 (GALT) の細静脈の血管内皮細胞に特異的に発現する (Hokari ら、2001)。人の IBD の消化管粘膜では、この CAMs が健常の人に比べ高い発現を認めることが報告されている (Jones ら、1995 ; Briskin ら、1997 ; Raddatz ら、2004)。健常犬では、胃、十二指腸、結腸、腸管関連リンパ組織 Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT) における MAdCAM-1 mRNA の発現は、低発現であるのが確認されている (Miura ら、2005)。しかしながら、これまで犬の IBD や LPE での CAMs の発現に関する検討はなされていない。

そこで本研究では、犬の LPE において NF-kappa B の活性の程度とそれに関わる炎症性サイトカイン、NOD2 mRNA の発現を検討し、また腸粘膜における CAMs mRNA の発現についても検討を行った。さらに、NF-kappa B、炎症性サイトカイン、NOD2、CAMs、CIBDAI、病理グレードとの関連性についても検討を行った。

5.2 材料および方法

5.2.1 健常犬

健常対照として、健常ビーグル犬 8 頭（オス 4 頭、メス 4 頭）を用いた。年齢の中央値は、2.5 歳齢（範囲 1 ~ 6 歳齢）で、消化器症状などの臨床症状は認められなかった。血液検査（CBC、血液化学検査）、糞便検査、レントゲン検査、超音波検査において、異常所見は認められなかった。さらに内視鏡検査により、消化管の生検を行い、病理組織検査を実施したが異常所見は認められなかった。

本研究における健常犬の使用は、本学生物資源科学部実験動物委員会の承認に基づき行った（承認番号 AP11B059）。

5.2.2 LPE 犬

2011 年 3 月から 2012 年 10 月において ANMEC に来院した 3 週間以上の小腸性の慢性消化器症状（嘔吐、下痢など）を呈した犬 21 頭から消化管粘膜組織を採取した。症例は、血液検査（CBC、血液化学検査）、糞便検査、レントゲン検査、超音波検査、内視鏡検査、病理組織検査を行い LPE 以外の消化器症状を呈する他の疾患

を除外した。症例の年齢の中央値は、9 歳齢（範囲 2～14 歳齢）で、オスが 9 頭（去勢オス 6 頭、未去勢オス 3 頭）であり、メスは、12 頭（避妊メス 5 頭、未避妊メス 7 頭）であった。全ての症例は、これまでと同様に CIBDAI による臨床症状の重症度スコアを算定した。

5.2.3 組織の採材、処理、病理組織学的検査

全身麻酔下において、上部消化管内視鏡（VES3 Helen, VQ-8143B flexible video endoscope, Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan）により十二指腸下行部から生検鉗子（VH-143-B25, Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan）を用いて粘膜組織を採取した。RNA と核蛋白の分析に用いる組織は、採材後すぐに液体窒素に浸し、使用するまで -80°C で凍結保存した。病理組織検査に用いる組織は、10 %中性緩衝ホルマリンにて固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。病理組織は、World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) ガイドラインに基づいて、病理学専門医が評価した。十二指腸の病理組織は、形態学的特徴（絨毛、上皮障害、陰窩拡張、リンパ管拡張、粘膜線維化）と浸潤している炎症細胞の特徴（上皮内リンパ球、粘膜固有層のリンパ球と形質細胞、好酸球、好中球）から評価し、0

(正常)、1 (軽度)、2 (中程度)、3 (重度) にスコア化した。

5.2.4 ゲルシフトアッセイ

組織は、Micro Smash ms-100R (Tomy Corp., Tokyo, Japan) によりホモジナイズし、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Pierce, Rockford, IL, US) により核蛋白と細胞質の分離を行い、核蛋白抽出を行った。蛋白濃度の調整は、BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible (Pierce, Rockford, IL, US) を用いて行った。DNA プローブは、95 °Cで、5 分間加熱後、室温にて冷却しアニーリングした。DNA プローブに使用された二本鎖オリゴ DNA は、NF-kappa B に対する共通塩基配列 (3'-T C A A C T C C C C T G A A G G G T C C G-5') をもち、さらに蛍光色素である Cy 5 によって標識された。核蛋白 (10 µg) と DNA プローブ (17.5 fmol) は、バインディングバッファー 20 µl (5 M NaCl, 1 M Tris HCl, 0.5 M EDTA pH 8, 1 M dithiothreitol, 37.8 % glycerol, 1.5 % NP-40, 5 mg/ml bovine serum albumin, 1 µg poly dI-dC) の中で、25 °C、30 分間、結合反応を行った。サンプルは、4 % ポリアクリルアミドにおいて、100V、1 時間、電気泳動を行った。ゲルの画像は、Typhoon 9410 high performance imager (GE Healthcare, Tokyo, Japan) と

Software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US)により解析した。

5.2.5 リアルタイム RT-PCR による mRNA 発現量の定量

ホモジナイズされた組織は、前章までと同様に TRIzol Reagent (Life Technologies Corp., Tokyo, Japan) により全 RNA 抽出を行った。抽出した全 RNA に、オリゴ dT プライマー 1.0 μ l、RNase inhibitor 0.5 μ l、RNase free-water を加え 10 μ l になるように調整した。調整したサンプルは 70°C、10 分間、4°C の条件で変性、アニーリングを行った。次に変性、アニーリング済み反応液 10 μ l に Avian Myeloblastosis Virus (AMV) reverse transcriptase (Promega Inc., Madison, WI, US) 1.5 μ l、Mg 4 μ l、 \times 10 Buffer、dNTP 2 μ l、RNaseDNase Free-water 0.5 μ l を加えた。調整したサンプルは、42°C、15 分間、95°C、5 分間、4°C、5 分間の条件で RT 反応を行い、cDNA の合成を行った。cDNA は使用するまで -20°C で保存した。

リアルタイム PCR 用のプライマーとプローブの塩基配列は、表 5-1 に示した。GAPDH は内在性コントロール遺伝子 (キャリブレーター) として用いた。リアルタイム PCR は Light Cycler System (Roche Diagnostics Inc., Basel, Switzerland) を用いた。反応液は、SYBR Primix Ex Taq (Takara Bio Inc., CA, USA)

を 10 μ l、10 μ M に予め調整した Forward および Reverse プライマー 0.4 μ l を加え、さらに 2 μ l のサンプル cDNA を添加し、RNase-free 滅菌蒸留水で全量が 20 μ l になるように調整した。増幅条件は、95°C、30 秒間を 1 サイクル反応させた後、95°C、5 秒間と 60°C、20 秒間の工程を 1 サイクルとして 40 サイクル行い、その後 95°C、1 秒間と 65°C、15 秒間さらに 95°C、1 秒間を 1 サイクル行った。

リアルタイム PCR を行う前に、抽出した全 RNA サンプルにおいて GAPDH のプライマーを用いて PCR と電気泳動を行い、ゲノムのコンタミネーションが存在しないことを確認した。定量解析には、 Δ CT 法による相対定量法を実施した。

5.2.6 統計処理

統計処理は、GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, US) を用いて行った。Mann–Whitney U-test は、NF-kappa B の活性化および mRNA 発現量における LPE 犬と健常犬の比較に用いた。年齢、CIBDAI、病理スコア、NF-kappa B 活性、mRNA 発現量における相関関係は、Spearman's rank correlation test によって解析した。なお、統計学的な有意水準は $p < 0.05$ とした。

5.3 結果

5.3.1 LPE 犬

LPE を発症していた犬種は、柴犬（4 頭）、ミニチュアダックスフント（3 頭）、雑種犬（3 頭）、トイプードル（2 頭）、チワワ（1 頭）、バーニーズマウンテンドッグ（1 頭）、ヨークシャーテリア（1 頭）、ウェルシュコーギーペンブローク（1 頭）、ジャックラッセルテリア（1 頭）、ジャーマンシェパード（1 頭）ビーグル（1 頭）、ポメラニアン（1 頭）、ニュージーランドハンタウェイ（1 頭）であった。CIBDAI の中央値は、9（範囲 2～17）であった。

5.3.2 病理組織

全ての症例は、十二指腸に炎症があり、リンパ球と形質細胞の浸潤を伴う LPE と診断された。絨毛損傷の程度としては、正常から中程度まで認められた。上皮損傷は、ほとんどの症例で認められなかったが、2 症例で軽度の損傷が認められた。陰窩とリンパ管の拡張は、正常から重度まで認められた。しかしながら、粘膜の線維化は、いずれの症例でも認められなかった。上皮内リンパ球の増加は、正常から中程度まで、固有層のリンパ球と形質細胞の浸潤程度は、軽度から重度まで認められた。好酸球と

好中球の浸潤は認められなかった。病理グレードの中央値は、9（範囲 5～16）であった。

5.3.3 十二指腸における NF-kappa B 結合活性

十二指腸の組織における NF-kappa B 結合活性を、LPE 犬 21 頭、健常犬 5 頭で分析した。NF-kappa B 結合活性は、健常犬に比べ LPE 犬で 1.65 倍と有意に高かった ($p < 0.05$) (図 5-1)。

5.3.4 各種サイトカイン、NOD2、および CAMs の mRNA 発現量

各種サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β)、NOD2、CAMs (ICAM-1、VCAM-1、MAdCAM-1) mRNA 発現量の解析は、LPE 犬 21 頭、健常犬 8 頭において行った。その結果、TNF- α 、IL-1 β においては発現量に有意差はなかった。さらに、NOD2 の発現量においても健常犬と LPE 犬で有意差はなかった (図 5-2)。ICAM-1 mRNA の発現量は、健常犬に比べ LPE 犬において、2.17 倍と有意に高値を示した ($p < 0.01$)。また、MAdCAM-1 mRNA に関しても、LPE 犬では 1.43 倍と健常犬に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$)。しかしながら、VCAM-1 mRNA に関しては、健常犬のほう

が LPE 犬に比べ 2.5 倍も発現量が高かった。 ($p < 0.05$) (図 5-3)。

5.3.5 相関関係

年齢、CIBDAI、病理グレード、NF-kappa B 活性、各種サイトカイン、NOD2、CAMs の mRNA 発現量の間には、相関は認められなかった。

表 5-1 定量的リアルタイム RT-PCR におけるプライマーの配列

Target gene		Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	GenBank accession number
TNF- α	Forward	TCCCAAATGGCCTCCAACATA	187	NM_001003244.4
	Reverse	ATCAGCTGGTTGTCTGTCTCAGCTC		
IL-1 β	Forward	AGCTGATGGCCCTGGAAAATG	124	NM_001037971.1
	Reverse	CACGAAATGCCTCAGACTCTTGTTA		
NOD2	Forward	CGTGCCTCAGTGTCTGCAAG	147	XM_544412.3
	Reverse	GTGCACAGCCATCGGTCAA		
ICAM-1	Forward	GAAGTGGCCTGCACACACAGA	81	NM_001003291.1
	Reverse	GTCAGTGGACAGCAGGGCATAG		
MAdCAM-1	Forward	CCTGAAGGCTGGTTCCAGTG	72	NM_001024639.1
	Reverse	GACTTCCGCGACCAGGTACA		
VCAM-1	Forward	TTTGAACCCAAACAAAGGCAGAGTA	79	NM_001003298.1
	Reverse	GGCTGACCACGACGGTTGTA		
GAPDH	Forward	TGTCCCCACCCCAATGTATC	100	NM_001003142
	Reverse	CTCCGATGCCTGCTTCACTACCTT		

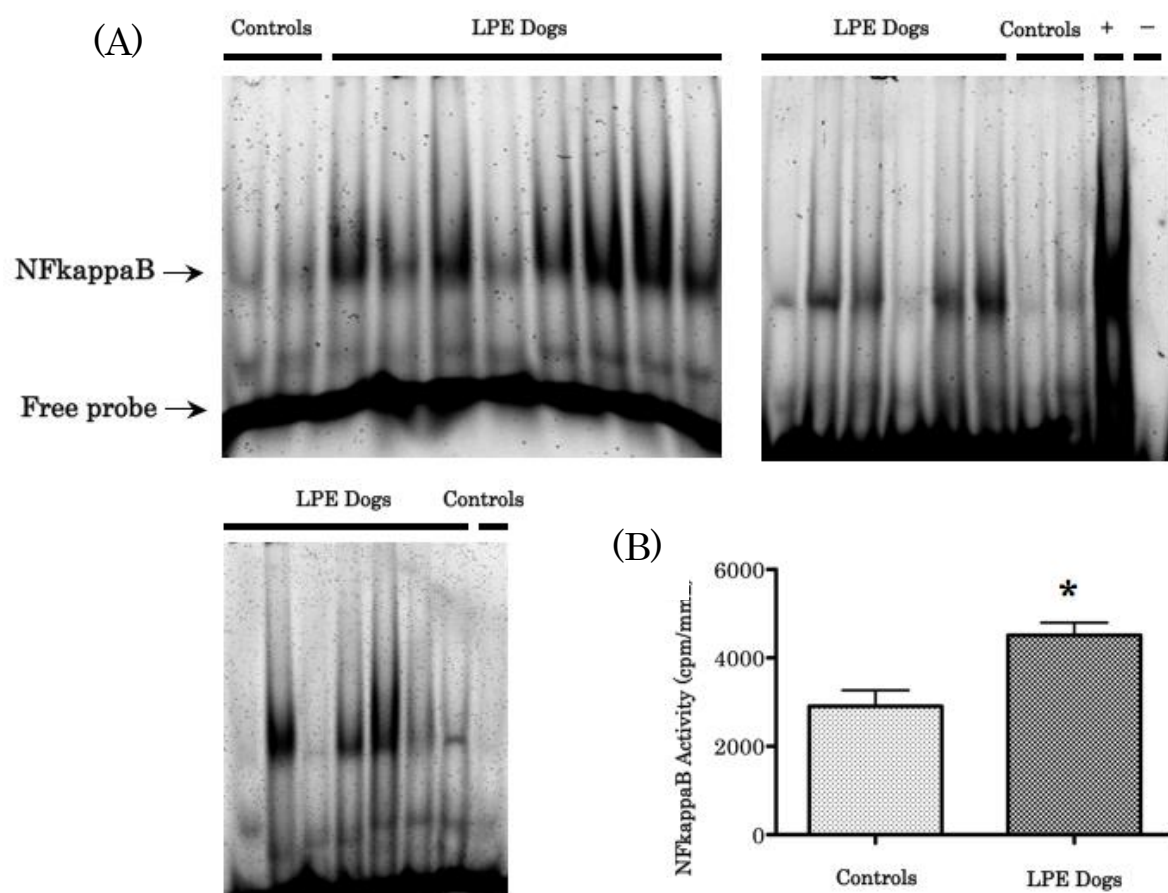


図 5-1 ゲルシフトアッセイによる NF-kappa B 結合活性 (A) とその活性度の比較

(B)

+ : ポジティブコントロール (HeLa 細胞) , - : ネガティブコントロール (核蛋白なし)

* $p < 0.05$

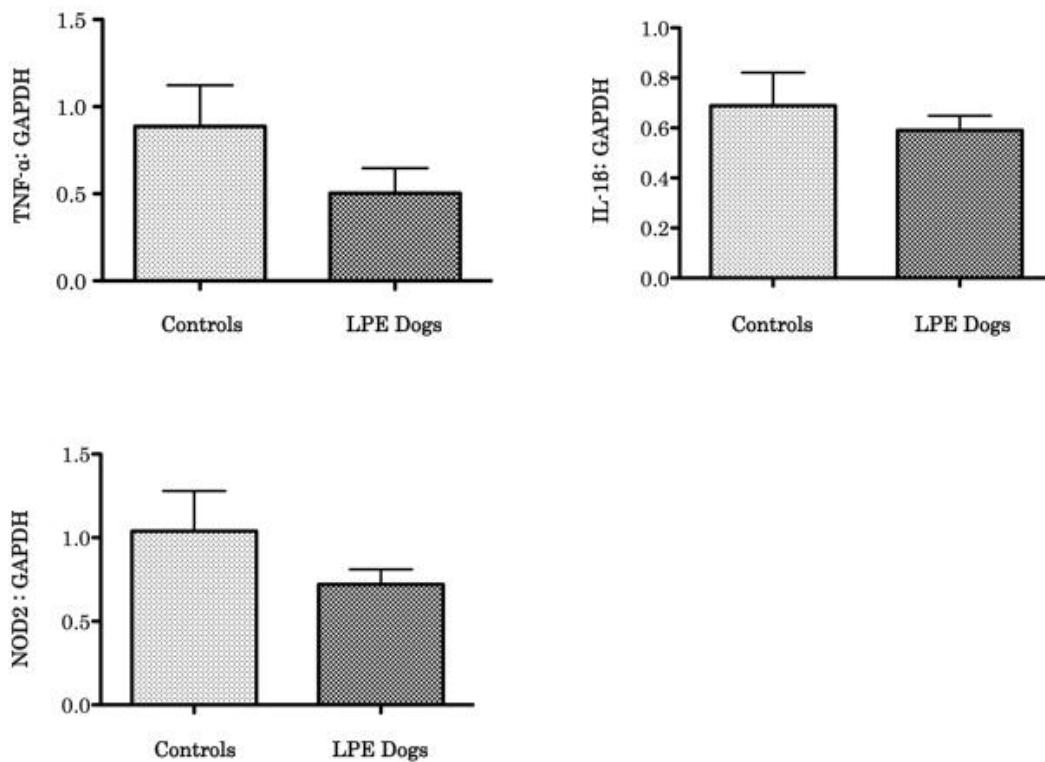


図 5-2 サイトカイン (TNF- α 、IL-18)、NOD2 の mRNA 発現量

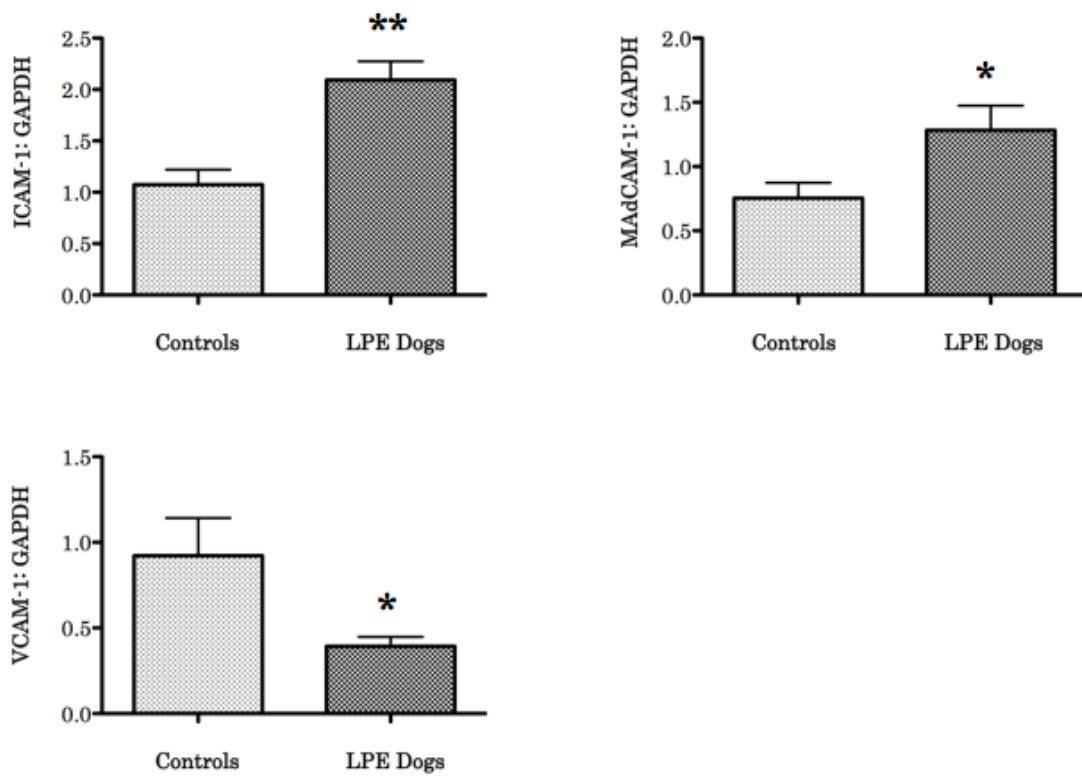


図 5-3 CAMs (ICAM-1、MAdCAM-1、VCAM-1) の mRNA 発現量

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

5.4 考察

過去の CE の犬の研究では、健常犬に比べ、十二指腸では、NF-kappa B が活性化していたと報告されている (Luckschander ら、2010)。本研究でも LPE 犬では同様に、健常犬に比べ、十二指腸の NF-kappa B が活性化していることが判明したが、Luckschander らは、どのタイプの十二指腸炎かは明らかにしていない。さらに、彼らは NF-kappa B の活性は、免疫組織染色によって間接的に調べられているのに対し、本研究では、NF-kappa B の DNA との接着を直接確認できたことから、NF-kappa B の活性化は、LPE の病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

NF-kappa B の活性化は、LPS のような細菌の細胞壁成分や TNF- α や IL-1 β のような炎症性サイトカインやウイルスそして、DNA に損傷を与える薬剤などさまざまな因子によって引き起こされる (Karin ら、2005)。人の IBD 患者の消化管粘膜では、NF-kappa B の活性上昇が、TNF- α と IL-1 β の発現増加とともに認められている (Neurath ら、1998 ; Atreya ら、2008 ; Stronati ら、2008)。しかしながら、本研究では、TNF- α と IL-1 β において LPE 犬と健常犬に有意差はなかった。その理由として、人の IBD は、回腸や結腸の組織による検討であるのに対し、本研究では十二指腸組織と、生検部位が異なることが考えられる。また、人の IBD の病理像は、肉

芽腫様または潰瘍性の炎症像であり、犬の LPE とは異なるため、炎症性サイトカインの発現も異なっている可能性がある。CE のジャーマンシェパードでの研究では、TNF- α と IL-1 β mRNA の発現が上昇していたとの報告 (German ら、2000) があるが、CE の他の犬種では、これらのサイトカインの上昇は確認できていない (Peters ら、2005 ; Jergens、2009)。今後、炎症性サイトカインのタンパクレベルでの発現と LPE 犬における炎症像の関係性についても検討が必要であろう。

近年、パターン認識受容体であり NF- κ B を活性化する働きをもつ TLR 2, 4, 9 mRNA が、IBD 犬の十二指腸と結腸の粘膜で発現が亢進していたことが示されている (Burgner ら、2008 ; McMahon ら、2010)。本研究では、TLR と同じパターン認識受容体である NOD2 mRNA の発現は、健常犬と LPE 犬の間で差はなかった。しかしながら、第 2 章の LPC の検討では、NOD2 mRNA の発現は健常犬に比べ有意に高値を示すことが明らかとなっている。したがって、これらの結果から、LPE (十二指腸) と LPC (結腸) では、NF- κ B の伝達経路に違いがあるのかもしれない。人の IBD では、回腸粘膜で NOD2 が発現していることが多数報告されている (Gutierrez ら、2002 ; Stronati ら、2008) ことから、今後、IBD の犬の回腸でも NOD2 発現検討をする必要があると思われる。

人では、ICAM-1 mRNA が IBD 患者で上昇することが示されており (Raddatz ら、2004)、LPE 犬でも同様であった。このことは、十二指腸における白血球の遊走とホーミングに対して ICAM-1 が一部分の役割を担い、LPE 犬の十二指腸における炎症を惹起している可能性がある。今後、ICAM-1 のリガンドである白血球に発現する lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) や CD11a についても更なる検討が必要であると思われた。また、人の IBD の治療に ICAM-1 の発現を mRNA レベルで阻害する ISIS2302 という薬剤が将来的に治療薬として有望視されている (Yacyshyn ら、1998) ことから、犬の IBD においても ICAM-1 は重要な治療標的の一つになるものと思われる。

本研究では、LPE 犬の VCAM-1 mRNA の発現は健常犬に比べ有意に低いことが判明した。人のクローン病でも同様に VCAM-1 は、上昇していないことから (Nakamura ら、1993)。犬の LPE においても VCAM-1 はその病態発現に強く関与していないと思われた。

ICAM-1 と同様に、クローン病と潰瘍性大腸炎の患者の消化管粘膜においても MAdCAM-1 の発現亢進が報告されている (Briskin、1997)。MAdCAM-1 は、消化管の上皮細胞や GALT において特に多く発現しており、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン陽性 T

細胞に選択的に接着する (Arihiro ら、2002)。また、ケモカインは $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン陽性 T 細胞を活性化することが知られているが、その $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを活性化する CCL20 と CCL25 が犬の IBD の十二指腸粘膜で発現亢進していることも示されている (Maeda ら、2011)。今回、LPE 犬の MAdCAM-1 mRNA の発現が、健康犬に比べ有意に高い発現を示していたことは、MAdCAM-1 が犬の LPE の病態に深く関わっている可能性を示唆するものと思われる。また、MAdCAM-1 と $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン陽性 T 細胞の相互作用に対する阻害が、IBD の患者の治療標的になると考えられていることから、これらも LPE 犬の治療にも有効であると思われる。本研究では、粘膜下組織の $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン陽性リンパ球の浸潤に関する検討は行っていないので、今後、これらの細胞と LPE の関与についてさらなる検討が必要である。

本研究では、年齢、CIBDAI、病理グレード、NF-kappa B 活性、サイトカイン、NOD2、CAM の mRNA 発現量の間には、相関関係は認められなかった。これまでの犬の CE の研究でも、病理組織グレードと臨床症状の重症度または NF-kappa B の活性に関連性は認められていない (Cravren ら、2004; Allenspach ら、2007; Schreiner、2008 ; Luckschander ら、2010)。CIBDAI スコアリングシステムは、臨床症状の評価において非常に有用な指標であるが主観的な部分もある。さらに WSAVA ガイドラ

インによる病理組織の評価は、病理医による組織評価において一定の客観性はあるものの、それでもなお主観的な要素は排除できない (Washabau ら、2010 ; Allenspach ら、2010 ; Willard ら、2010)。これらのことが、CIBDAI と病理グレードの間に相関が認められなかった理由かもしれない。今後、サンプル数を増やすとともに、サイトカイン、NOD2、CAMs のタンパクレベルでの発現とそれらの関連性についても検討する必要があると思われる。

NF-kappa B は、TNF- α や IL-1 β だけでなく他の様々な因子 (TLR など) によっても活性化され、細胞接着分子のプロモーター遺伝子に結合し、さまざまな遺伝子発現を誘導することが知られている (Ogawa ら、2005 ; González-Ramos ら、2007)。

したがって、LPE の犬でも、十二指腸において食餌抗原や細菌に対し過剰反応し TLR やサイトカイン、ケモカインなどの刺激により NF-kappa B が活性化されて、CAMs の発現を誘導し、さらに NF-kappa B を活性化するというポジティブフィードバックループの形成が慢性炎症に関与している可能性も考慮する必要があると思われる。さらに、犬種間での NF-kappaB の発現や活性の違い、また感染症 (サルモネラやクロストリジウムなど) や低グレードリンパ腫を除外するなど、多角的な視点からの検討も必要であると考えられる。

5.5 小括

本研究では、犬の LPE の病態解明を目的に、NF-kappa B の活性の程度とそれに関わる炎症性サイトカイン、NOD2 mRNA の発現ならびに腸粘膜における CAMs mRNA の発現の検討を行った。さらに、NF-kappa B、炎症性サイトカイン、NOD2、CAMs、CIBDAI、病理グレードの関連性の検討を行った。

2011 年 3 月から 2012 年 10 月において ANMEC に来院した 3 週間以上の小腸性の慢性消化器症状（嘔吐、下痢など）を呈した犬 21 頭と健常犬 8 頭から消化管粘膜組織を採取した。十二指腸の組織における NF-kappa B 結合活性は、LPE21 頭、健常犬 5 頭において分析した。その結果、LPE 犬の NF-kappa B 結合活性は、健常犬に比べ有意に高いことが明らかとなった。TNF- α 、IL-1 β の発現量、NOD2 の発現量においても健常犬と LPE 犬で有意差はなかった。LPE 犬の ICAM-1 mRNA と MAdCAM-1 mRNA の発現量は、健常犬に比べ、有意に高値であることが明らかとなった。しかしながら、VCAM-1 mRNA の発現量に関しては、健常犬のほうが LPE 犬に比べ発現量が高値を示した。年齢、CIBDAI、病理グレード、NF-kappa B 活性、サイトカイン、NOD2、CAMs の mRNA 発現量の間には、相関は認められなかった。十二指腸の LPE の犬では、食餌抗原や細菌に対して、過剰に反応した TLR やサイト

カイン、ケモカインなどを介して NF-kappa B が活性化されることで、CAMs の発現を誘導し、さらに、NF-kappa B を活性化するというポジティブフィードバックループが形成されることが慢性炎症に関与している可能性が示唆された。

第 6 章

総括

犬の慢性腸症（CE）は、慢性の消化器症状と消化管の炎症細胞の浸潤を特徴とする原因不明の疾患である。炎症性腸疾患（IBD）もその一つで、病理学的に、リンパ球・形質細胞性腸炎（LPE）やリンパ球・形質細胞性結腸炎（LPC）と診断されることが多く、症例によっては、難治性の慢性の消化器症状を呈し、衰弱死する例も少ない。IBDの病因は特定されていないが、遺伝的素因と関連した免疫の異常が、腸内細菌や食餌抗原に過剰に反応して発症に至ると考えられている。

NF-kappa Bは、炎症性サイトカイン、ケモカイン、また炎症部位への接着に関わる細胞接着分子やセレクチンなどの最も重要な核内転写因子の一つであり、自然免疫機構の中心的な役割を担っている。人のIBDであるクローン病や潰瘍性大腸炎では、以前から獲得免疫の異常が原因として考えられていたが、近年、NF-kappa Bを中心とした自然免疫の異常が原因の一つである可能性が示唆されるようになった。しかしながら、犬のCEの病態に関しては、自然免疫の異常の面からの検討は、ほとんどされていない。

本研究では、犬のCEの病態と疫学調査を目的に、難治性のIBDを呈する柴犬の臨床的特徴と予後不良因子の検討を行った。さらに、慢性炎症を伴う消化管におけるNF-kappa Bの活性ならびにその関連分子について、分子生物学的手法を用いて検討

した。

1. 犬の CE の疫学調査ならびに柴犬の IBD における臨床的特徴と予後不良の危険因

子の検討

犬で CE を呈する症例は数多いものの、わが国では今まで大規模な事例の検討はほとんど行われていない。そこで、本研究では CE の症例の実態の把握を目的として疫学調査を行った。対象は、2007 年 10 月から 2009 年 2 月まで日本大学動物病院に来院した犬 2,330 頭に対する CE の症例の割合と犬種、年齢、性別について調査した。来院した犬 2,330 頭中、86 頭が CE と診断され、そのうち柴犬、ウェストハイランドホワイトテリア、ジャーマンシェパード、ミニチュアピンシャーが他の犬種と比較して有意に発症頻度が高いことが判明した。性別は、オス 51 頭、メス 35 頭とオスで若干多い傾向があった。年齢は平均で約 6 歳だった。

柴犬は、一般にアトピー性皮膚炎のような自己免疫性疾患になりやすいため、IBD の柴犬も食餌や細菌に対するアレルギー反応が起きていることが予想される。さらに柴犬は、他の犬種に比べて治療に対する反応性が悪く、また 6 か月生存率が約 50% と他の犬種に比べ著しく低い。しかしながら、IBD の柴犬の中にも比較的長期生存す

るものも存在することから、柴犬を短期生存群と長期生存群に大別し、臨床的、血液学的な特徴、病理、治療反応、予後を比較検討するとともに、予後不良の予測因子を解析した。

3 週間以上の慢性消化器症状を呈した柴犬 25 頭を対象に調査したところ、全ての症例がリンパ球・形質細胞性十二指腸炎を伴う IBD と診断された。これら 25 頭は、短期生存 (Ss) 群 (生存期間 6 か月以下) は 16 頭、長期生存 (Ls) 群 (生存期間 6 か月以上) は 9 頭に大別された。年齢の中央値は、Ss 群が 7.5 歳と Ls 群の 5 歳に比べ有意に高かった。年齢において最も良いカットオフ値は 7 歳で、感度 0.7、特異度 0.78 であった。臨床症状の重症度スコア (CIBDAI) の中央値は、Ss 群では 12 と、Ls 群の 7 に比べ有意に高かった。CIBDAI において最も良いカットオフ値は 9 で、感度 0.88、特異度 0.68 であった。以上から、柴犬では、7 歳以上の高齢の症例、CIBDAI スコアが 9 以上の症例では、短期間で死亡するリスクが高く、予後には注意が必要であることが示唆された。十二指腸の病理学的重症度スコアでは、Ss 群で重度の腸炎を示した症例は、14/16 (87.5%)、Ls 群では 6/9 (66.6%) で、予後不良因子として、使用するには難しいことが示された。また初期治療に反応した 25 頭中 21 頭の症例のうち、治療に反応していた日数の中央値は、Ss 群が有意に短かった (Ss:42.5 日

(20-91 日) ; Ls:285 日 (196-1026 日))。したがって、初期治療の反応日数が約 3 か月と短い症例は、早期に死亡する可能性があることが示唆された。また、初期治療の反応が悪くなってから死亡するまでの日数の中央値は、Ss 群で 19.5 日と Ls 群の 151 日に比べ、有意に短かった。生存日数の中央値は、Ss 群で 73 日と、Ls 群の 800 日比べ有意に短かった。死亡率は、全症例では 84% (21/25) で、Ss 群では 100%、Ls 群では 55.5%であった。したがって 6 か月と 1 年生存率に差がないことを考慮すると 6 か月間生存する症例は、1 年以上生存する可能性があることが示唆された。しかしながら長期生存群の約半数が、最終的に腸炎により死亡していることを考慮すると、長期間継続した経過観察が重要であると思われる。

2. LPC の犬における NF-kappa B 活性と NOD2 の発現の検討

NOD2 は、細胞内の病原体関連分子のパターン認識受容体であり、NF-kappaB を活性化し、炎症性サイトカインを産生させることで細菌に対する宿主免疫反応として重要な働きをする。最近、この NOD2 が人のクローン病患者の結腸粘膜で、発現が亢進しており、また、その腸粘膜では同時に NF-kappaB の活性化も認められることが報告されている。しかしながら、犬においては、慢性腸症の細胞内伝達分子について

ての研究はほとんど行われていない。そこで、本研究では、LPC 犬で、慢性炎症の病態解明を目的に NOD2 mRNA と NF-kappaB が LPC の犬の粘膜で健常犬より発現亢進している可能性を検討した。

LPC の犬 19 頭と対照群として健常犬 5 頭から下部消化管内視鏡検査により結腸組織を採取した。

NF-kappa B の活性は、LPC 群においてコントロール群に比べ 1.45 倍、NOD2 mRNA 発現量は、1.63 倍と有意に上昇していた。

以上の結果から、LPE の犬では、消化管において食餌抗原や腸内細菌に対し NOD2 を介して過剰に反応した結果、NF-kappa B の活性化が起こり炎症性サイトカインやケモカインの発現を誘導している可能性が考えられた。また、NF-kappa B がさらに NOD2 の発現を誘導する正のフィードバックが確立され、慢性炎症の病態構築に寄与している可能性も示唆された。

3. LPE の犬におけるセレクトインファミリーと P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1)の発現の検討

セレクトインは、腸の炎症動態において、白血球の循環血液から血管内皮へのローリ

ングに関与している。セレクトインファミリーとこれらのリガンドである PSGL-1 が、犬の LPE の病態に関与している可能性を考え、セレクトインファミリー (E-, L-, P-セレクトイン) mRNA とセレクトインリガンド PSGL-1 の mRNA の発現を検討した。

LPE の犬 21 頭、対照群として健常犬 10 頭から上部消化管内視鏡検査により採材した十二指腸組織を用い、リアルタイム RT-PCR により mRNA の発現量を定量した。また CIBDAI、病理スコア (WSAVA histological grade)、セレクトイン、PSGL-1 の相関は、スピアマンの順位相関係数にて解析した。

LPE 犬の E セレクトイン、P セレクトイン、PSGL-1 mRNA 発現は健常犬に比べ、有意に増加していたが、L セレクトインの発現は、健常犬と有意な差はなかった。また、E セレクトインと L セレクトイン、また P セレクトインと L セレクトインの間で正の相関が認められた。しかしながら、CIBDAI、病理スコア、セレクトインの間には相関が認められなかった。以上の結果から、E、P セレクトインやそのリガンドの PSGL-1 は、犬の LPE の炎症細胞の集積に関与している可能性が示唆された。

4. LPE の犬における NF-kappa B 活性と免疫グロブリンスーパーファミリーの検討

NF-kappa Bは、最も重要な炎症性サイトカインなどの核内制御因子の一つであり、自然免疫機構の中心的な役割を担う。一方、NOD2は、病原体関連分子パターンを認識するTLRと同様にパターン認識受容体の一つであり、単核球、マクロファージ、樹状細胞、上皮細胞、パネート細胞に発現している。また、NOD2を介してNF-kappa Bを活性化することで細菌防御の役割を担っていることから自然免疫において重要な因子である。人のIBDでは、このNOD2とNF-kappa BがTNF α 、IL1 β とともに結腸において活性化しているとの報告がある。炎症細胞の血管内皮へのローリングに関わる免疫グロブリンスーパーファミリーである細胞接着分子（CAMs）の発現もまたNOD2と同様に、NF-kappa Bによって制御されていることが報告されている。CAMsは、白血球のホーミングと遊走性に重要な役割を果たし、炎症反応を惹起する。したがって本研究では、慢性小腸炎の病態を明らかにするため、犬のLPEの腸粘膜においてNF-kappa Bの活性の程度とそれに関わる炎症性サイトカイン(TNF α 、IL-1 β)、NOD2ならびにCAMsのmRNAの発現を検討した。

LPEの犬21頭、コントロール群として健常犬8頭から上部消化管内視鏡検査により十二指腸組織を採材した。組織のNF-kappa B活性は、ゲルシフトにより、NOD2、TNF α 、IL-1 β 、CAMs（ICAM-1、VCAM-1、MAdCAM-1）mRNAは、リアルタイム

ム RT-PCR により解析した。

LPE 群の NF-kappa B の活性は、コントロール群に比べ 1.65 倍と有意に上昇していた。LPE 群の TNF α 、IL1 β 、NOD2 mRNA 発現量と control 群の間に有意な差はみられなかった。LPE 群の ICAM-1 mRNA 発現量および MAdCAM-1 mRNA 発現量は、コントロール群に比べそれぞれ 2.17 倍、1.43 倍と有意に上昇していた。一方、LPE 群の VCAM-1 mRNA の発現量は、コントロール群に比べ 2.5 倍、有意に低下していた。これらの結果から、NF-kappaB と ICAM-1 および MAdCAM-1 等の接着分子が LPE の病態に重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究では、柴犬は CE の好発犬種の一つであることが明らかとなった。CE 柴犬において、短期生存群と長期生存群のそれぞれの臨床的、検査的な特徴、病理、治療反応、予後について違いを示すとともに、その予後不良の危険因子を明らかにすることができた。また、LPC の犬において、NOD2 の発現亢進とそのシグナル伝達経路の下流にある NF-kappa B が活性化していることも明らかにすることができた。さらに、犬の LPE においては、E、P セレクチン、セレクチンリガンド PSGL-1 の発現が十二指腸で亢進しているとともに、NFkappa B の活性と細胞接着分子である

ICAM-1、MAdCAM-1 の発現も亢進していることを明らかにした。

本研究により、犬の CE において NF-kappa B を中心とした自然免疫機構の関与による病態機構を明らかにしたことは、今後、犬における CE の診断や治療に向けた研究の発展に貢献することが期待される。

謝辞

本研究を終えるにあたり、終始変わらぬご指導とご鞭撻を賜りました日本大学大学院獣医学研究科の亘 敏広 教授に深謝いたします。また、本論文の作成に当たり、多くのご指導とご助言を賜りました同研究科の佐藤 常男 教授ならびに丸山 総一 教授に心より感謝致します。また、本研究を実施する上で、ご協力およびご助言を賜りました同研究科の諸先生方ならびに総合臨床獣医学研究室の諸氏に心より感謝致します。さらに、日本大学動物病院（ANMEC）のスタッフに心より感謝致します。

引用文献

Abreu, M.T., Arditi, M. 2004. Innate immunity and Toll-like receptors: Clinical implications of basic science research. *J. Pediatr.* 144: 421-429.

Abreu, M.T., Fukata, M., Arditi, M. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J. Immunol.* 174: 4453-4460.

Allenspach, K., Bergman, P.J., Sauter, S., Gröne, A., Doherr, M.G., Gaschen, F. 2006. P-glycoprotein expression in lamina propria lymphocytes of duodenal biopsy samples in dogs with chronic idiopathic enteropathies. *J. Comp. Pathol.* 134: 1-7.

Allenspach, K., House, A., Smith, K., McNeill, F.M., Hendricks, A., Elson-Riggins, J., Riddle, A., Steiner, J.M., Werling, D., Garden, O.A., Catchpole, B., Suchodolski, J.S. 2010. Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies. *Vet. Microbiol.* 146: 326-335.

Allenspach, K., Rüfenacht, S., Sauter, S., Gröne, A., Steffan, J., Strehlau, G., Gaschen, F. 2006. Pharmacokinetics and clinical efficacy of cyclosporine treatment of dogs with steroid-refractory inflammatory bowel disease. *J. Vet. Intern. Med.* 20: 239-224.

Allenspach, K., Wieland, B., Gröne, A., Gaschen, F. 2007. Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *J. Vet. Intern. Med.* 21: 700-708.

Arihiro, S., Ohtani, H., Suzuki, M., Murata, M., Ejima, C., Oki, M., Kinouchi, Y., Fukushima, K., Sasaki, I., Nakamura, S., Matsumoto, T., Torii, A., Toda, G., Nagura, H. 2002. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Pathol. Int.* 52: 367-374.

Atreya, I., Atreya, R., Neurath, M.F. 2008. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 263: 591-596.

Ball, C.J., King, M.R. 2011. Role of c-Abl in L-selectin shedding from the neutrophil surface. *Blood. Cells. Mol. Dis.* 15: 246-251.

Bantel, H., Schmitz, M.L., Raible, A., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. 2002. Critical role of NF-kappaB and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness. *FASEB J.* 16: 1832-1834.

Barkin, R., Lewis, J.H. 1992. Overview of inflammatory bowel disease in humans. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 7: 117-27.

Barnes, P.J. 1997. Nuclear factor-kappa B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 867-870.

Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant,

S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., Bitton, A., Dassopoulos, T.,
Bartges, J.W. 2012. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet. Clin. North. Am.*
Small. Anim. Pract. 42: 669-692

Bartsch RC, Irvine-Smith B. 1972. Eosinophilic gastroenteritis: report of a case in
a dog. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 43: 263-265.

Batt, R.M., Needham, J.R., Carter, M.W. Bacterial overgrowth associated with a
naturally occurring enteropathy in the German shepherd dog. 1983. *Res. Vet. Sci.*
35: 42-46.

Becker, C.E., O'Neill, L.A. 2007. Inflammasomes in inflammatory disorders: The
role of TLRs and their interactions with NLRs. *Semin. Immunopathol.* 29:
239-248.

Beg, A.A., Finco, T.S., Nantermet, P.V., Baldwin Jr., A.B. 1993. Tumor necrosis

factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3301-3310.

Berg, J.N., Fales, W.H., Scanlan, C.M. 1979. Occurrence of anaerobic bacteria in diseases of the dog and cat. *Am. J. Vet. Res.* 40: 876-881.

Berrebi, D., Maudinas, R., Hugot, J.P., Chamailard, M., Chareyre, F., De Lagausie, P., Yang, C., Desreumaux, P., Giovannini, M., Cézard, J.P., Zouali, H., Emilie, D., Peuchmaur, M. 2003. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut.* 52: 840-846.

Bhatti, M., Chapman, P., Peters, M., Haskard, D., Hodgson, H.J. 1998. Visualising E-selectin in the detection and evaluation of inflammatory bowel disease. *Gut.* 43: 40-47.

Breitschwerdt, E.B., Ochoa, R., Barta, M., Barta, O., McClure, J., Waltman, C.

1984. Clinical and laboratory characterization of Basenjis with immunoproliferative small intestinal disease. *Am. J. Vet. Res.* 45: 267-273.

Briskin, M., Winsor-Hines, D., Shyjan, A., Cochran, N., Bloom, S., Wilson, J., McEvoy, L.M., Butcher, E.C., Kassam, N., Mackay, C.R., Newman, W., Ringler, D.J. 1997. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am. J. Pathol.* 151: 97-110.

Burgener, I.A., König, A., Allenspach, K., Sauter, S.N., Boisclair, J., Doherr, M.G., Jungi, T.W. 2008. Upregulation of toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 22: 553-560.

Chastain, C.B. 1990. Canine pseudohypothyroidism and covert hypothyroidism. *Probl. Vet. Med.* 2:693-716.

Chénier, S., Doré, M. 1998. P-selectin expression in canine cutaneous inflammatory diseases and mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 35: 85-93.

Craven, M., Dogan, B., Schukken, A., Volkman, M., Chandler, A., McDonough, P.L., Simpson, K.W. 2010. Antimicrobial resistance impacts clinical outcome of granulomatous colitis in boxer dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 24: 819-824.

Craven, M., Simpson, J.W., Ridyard, A.E., Chandler, M.L. 2004. Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002). *J. Small. Anim. Pract.* 45: 336-342.

Cuthbert, A.P., Fisher, S.A., Mirza, M.M., King, K., Hampe, J., Croucher, P.J., Mascheretti, S., Sanderson, J., Forbes, A., Mansfield, J., Schreiber, S., Lewis, C.M., Mathew, C.G. 2002. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 867-874.

Datta, L.W., Green, T., Griffiths, A.M., Kistner, E.O., Murtha, M.T., Regueiro, M.D., Rotter, J.I., Schumm, L.P., Steinhart, A.H., Targan, S.R., Xavier, R.J.; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle, C., Sandor, C., Lathrop, M., Belaiche, J., Dewit, O., Gut, I., Heath, S., Laukens, D., Mni, M., Rutgeerts, P., Van Gossum, A., Zelenika, D., Franchimont, D., Hugot, J.P., de Vos, M., Vermeire, S., Louis, E.; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon, L.R., Anderson, C.A., Drummond, H., Nimmo, E., Ahmad, T., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Fisher, S.A., Marchini, J., Ghori, J., Bumpstead, S., Gwilliam, R., Tremelling, M., Deloukas, P., Mansfield, J., Jewell, D., Satsangi, J., Mathew, C.G., Parkes, M., Georges, M., Daly, M.J. 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40: 955-962.

de Mora, F., de la Fuente, C., Jasmin, P., Gatto, H., Marco, A., Ferrer, L., Fondati, A., Fondevila, D., Torres, R. 2007. Evaluation of the expression of P-selectin, ICAM-1, and TNF-alpha in bacteria-free lesional skin of atopic dogs with

low-to-mild inflammation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115: 223-229.

Deshpande, N., Lutz, A.M., Ren, Y., Foygel, K., Tian, L., Schneider, M., Pai, R., Pasricha, P.J., Willmann, J.K. 2012. Quantification and monitoring of inflammation in murine inflammatory bowel disease with targeted contrast-enhanced US. *Radiology.* 262: 172-180.

DiBartola, S.P., Rogers, W.A., Boyce, J.T., Grimm, J.P. 1982. Regional enteritis in two dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1982 181: 904-908.

Dustin, M.L., Springer, T.A. 1991. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 27-66.

Everts, M., Asgeirsdóttir, S.A., Kok, R.J., Twisk, J., de Vries, B., Lubberts, E., Bos, E.J., Werner, N., Mejer, D.K., Molema, G. 2003. Comparison of E-selectin expression at mRNA and protein levels in murine models of inflammation. *Inflamm. Res.* 52: 512-518.

Franchi, L., Park, J.H., Shaw, M.H., Marina-Garcia, N., Chen, G., Kim, Y.G., Núñez, G. 2008. Intracellular NODlike receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell. Microbiol.* 10: 1-8.

Fujisawa M, Kiyosue M, Hori M, Ozaki H. 2006. Identification of Card15/Nod2 mRNA in intestinal tissue of experimentally induced colitis in rats. *J .Vet. Med. Sci.* 68: 701-708.

Fägerstam, J.P., Whiss, P.A., Ström, M., Andersson, R.G. 2000. Expression of platelet P-selectin and detection of soluble P-selectin, NPY and RANTES in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Res.* 49: 466-472.

German, A.J., Hall, E.J., Day, M.J. 2001. Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *J. Vet. Intern. Med.* 15: 14-25.

German, A.J., Hall, E.J., Day, M.J. 2003. Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17: 820.

German, A.J., Helps, C.R., Hall, E.J., Day, M.J. 2000. Cytokine mRNA expression in mucosal biopsies from German shepherd dogs with small intestinal enteropathies. *Dig. Dis. Sci.* 45: 7-17.

Gieger T. 2011. Alimentary lymphoma in cats and dogs. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 41: 419-432.

González-Ramos, R., Donnez, J., Defrère, S., Leclercq, I., Squifflet, J., Lousse, J.C.,

Van Langendonck, A. 2007. Nuclear factor-kappa B is constitutively activated in peritoneal endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 13: 503-509.

Guildford, W.G. 1996. Idiopathic inflammatory bowel diseases. In: Guildford, W.G., Center, S.A., Strombeck, D.R., Williams, D.A., Meyer, D.J. (Eds.), *Strombeck's*

Small Animal Gastroenterology. Saunders, Philadelphia, PA, pp. 451-486.

Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., Fernandez-Luna, J.L. 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* 277: 41701-41705.

Göke, M., Hoffmann, J.C., Evers, J., Krüger, H., Manns, M.P. 1997. Elevated serum concentrations of soluble selectin and immunoglobulin type adhesion molecules in patients with inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 32: 480-486.

Hall, E., German, A.J. 2005. Diseases of the small intestine. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine* 6th edition Edited by Ettinger, S.J., Feldman, E.C. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 1332-1378.

Hall, E.J. 2011. Antibiotic-responsive diarrhea in small animals. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 41: 273-286.

Hogg, N. 1992. Roll, roll, roll your leucocyte gently down the vein.... *Immunol. Today.* 13: 113-115.

Hokari, R., Kato, S., Matsuzaki, K., Iwai, A., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miyahara, T., Itoh, K., Sekizuka, E., Nagata, H., Ishii, H., Iizuka, T., Miyasaka, M., Miura, S. 2001. Involvement of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in the pathogenesis of granulomatous colitis in rats. *Clin. Exp. Immunol.* 126: 259-265.

House, A.K., Binns, M.M., Gregory, S.P., Catchpole, B. Analysis of NOD1, NOD2, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 and TLR9 genes in anal furunculosis of German Shepherd Dogs. 2009. *Tissue. Antigens.* 73: 250-254.

House, A.K., Gregory, S.P., Catchpole, B. 2008. Pattern-recognition receptor mRNA expression and function in canine monocyte/ macrophages and relevance to canine anal furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124: 230-240.

Hu, C., Sun, L., Hu, Y., Lu, D., Wang, H., Tang, S. 2010. Functional characterization of the NF-kappaB binding site in the human NOD2 promoter. *Cell. Mol. Immunol.* 7: 288-295.

Hugot, J.P. 2006. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072: 9-18.

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 411: 599-603.

Inohara, N., Ogura, Y., Chen, F.F., Muto, A., Nuñez, G. 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 26: 2551-2554.

Jacobs, G., Collins-Kelly, L., Lappin, M., Tyler, D. 1990. Lymphocytic-plasmacytic enteritis in 24 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 4: 45-53.

Jergens AE, Gamet Y, Moore FM, Niyo Y, Tsao C, Smith B. 1999. Colonic lymphocyte and plasma cell populations in dogs with lymphocytic-plasmacytic colitis. *Am. J. Vet. Res.* 60: 515-520.

Jergens, A.E. 1999. Inflammatory bowel disease. Current perspectives. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 29: 501-521, vii.

Jergens, A.E., Moore, F.M., Haynes, J.S., Miles, K.G. 1992. Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats: 84 cases (1987-1990). *J. Am. Vet.*

Med. Assoc. 201: 1603-1608.

Jergens, A.E., Schreiner, C.A., Frank, D.E., Niyo, Y., Ahrens, F.E., Eckersall, P.D., Benson, T.J., Evans, R. 2003. A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J. Vet. Intern. Med.* 17: 291-297.

Jergens, A.E., Sonea, I.M., O'Connor, A.M., Kauffman, L.K., Grozdanic, S.D., Ackermann, M.R., Evans, R.B. Intestinal cytokine mRNA expression in canine inflammatory bowel disease: a meta-analysis with critical appraisal. *Comp. Med.* 59: 153-162.

Jobin, C. 2008. NF-kappa B signaling cascade and IBD: Turn it down? *Inflamm Bowel Dis* 2: S108–S109.

Jones, S.C., Banks, R.E., Haidar, A., Gearing, A.J., Hemingway, I.K., Ibbotson, S.H., Dixon, M.F., Axon, A.T. 1995. Adhesion molecules in inflammatory bowel

disease. *Gut*. 36: 724-730.

Karin, M., Greten, F.R., 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 749-759.

Kathrani, A. Overdominant single nucleotide polymorphisms in the nucleotide oligomerisation domain two (NOD2) gene are significantly associated with canine inflammatory bowel disease. Proceedings of the ACVIM symposium. Anaheim(CA): ACVIM; 2010. P. 176.

Kathrani, A., House, A., Catchpole, B., Murphy, A., German, A., Werling, D., Allenspach, K. 2010. Polymorphisms in the TLR4 and TLR5 gene are significantly associated with inflammatory bowel disease in German Shepherd Dogs. *PLoS ONE*. 5: 15740.

Kathrani, A., Schmitz, S., Priestnall, S.L., Smith, K.C., Werling, D., Garden, O.A.,

Allenspach, K., 2011. CD11c+ cells are significantly decreased in the duodenum, ileum and colon of dogs with inflammatory bowel disease. *J. Comp. Pathol.* 145: 359-366.

Koizumi M, King N, Lobb R, Benjamin C, Podolsky DK. 1992. Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 103: 840-847.

Leistra, M.H., Markwell, P.J., Willemse, T. 2001. Evaluation of selected-protein-source diets for management of dogs with adverse reactions to foods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219: 1411-1414.

Ley, K. 2003. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends. Mol. Med.* 9: 263-268.

Luckschander, N., Hall, J.A., Gaschen, F., Forster, U., Wenzlow, N., Hermann, P.,

Allenspach, K., Dobbelaere, D., Burgener, I.A., Welle, M. 2010. Activation of nuclear factor-kappaB in dogs with chronic enteropathies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133: 228-236.

Madsen, K.L., Doyle, J.S., Tavernini, M.M., Jewell, L.D., Rennie, R.P., Fedorak, R.N. 2000. Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology.* 118: 1094-1105.

Maeda, S., Ohno, K., Nakamura, K., Uchida, K., Nakashima, K., Fukushima, K., Tsukamoto, A., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y., Tsujimoto, H. 2011. Quantification of chemokine and chemokine receptor gene expression in duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144: 290-298.

Magro, F., Araujo, F., Pereira, P., Meireles, E., Diniz-Ribeiro, M., Velosom, F.T. 2004. Soluble selectins, sICAM, sVCAM, and angiogenic proteins in different activity groups of patients with inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 49:

1265-1274.

Masuda, K., Sakaguchi, M., Fujiwara, S., Kurata, K., Yamashita, K., Odagiri, T., Nakao, Y., Matsuki, N., Ono, K., Watari, T., Hasegawa, A., Tsujimoto, H. Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. 2000. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73: 193–204.

Matushek, K.J., Bjorling, D., Mathews, K. 1990. Generalized motor seizures after portosystemic shunt ligation in dogs: five cases (1981-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196: 2014-2017.

McCann, T.M., Ridyard, A.E., Else, R.W., Simpson, J.W. 2007. Evaluation of disease activity markers in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *J. small. Animal. Practice.* 48: 620-625.

McMahon, L.A., House, A.K., Catchpole, B., Elson-Riggins, J., Riddle, A., Smith,

K., Werling, D., Burgener, I.A., Allenspach, K. 2010. Expression of Toll-like receptor 2 in duodenal biopsies from dogs with inflammatory bowel disease is associated with severity of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135: 158-163.

Mercier, E., Peters, I.R., Day, M.J., Clercx, C., Peeters, D. 2012. Toll- and NOD-like receptor mRNA expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145: 618-624.

Miura, T., Watari, T., Maruyama, H., Sakai, M., Takahashi, T., Kano, R., Koie, H., Yamaya, Y., Tokuriki, M., Hasegawa, A. 2005. Molecular cloning of canine mucosal addressin cell adhesion molecule-1 cDNA and its expression in normal tissues. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 1257-1260.

Nakamura, S., Ohtani, H., Watanabe, Y., Fukushima, K., Matsumoto, T., Kitano, A., Kobayashi, K., Nagura, H. 1993. In situ expression of the cell adhesion

molecules in inflammatory bowel disease. Evidence of immunologic activation of vascular endothelial cells. *Lab. Invest.* 69: 77-85.

Naser, S.A., Arce, M., Khaja, A, et al. Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2012;18:412–424.

Neurath, M.F., Fuss, I., Schürmann, G., Pettersson, S., Arnold, K., Müller-Lobeck, H., Strober, W., Herfarth, C., Büschenfelde, K.H., 1998. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 17: 149-159.

Nishikori, M. 2005. Classical and alternative NF-kB activation pathways and their roles in lymphoid malignancies. *J. Clin. Exp. Hematopathol.* 45: 1.

Ogawa, H., Binion, D.G., Heidemann, J., Theriot, M., Fisher, P.J., Johnson, N.A., Otterson, M.F., Rafiee, P. 2005. Mechanisms of MAdCAM-1 gene expression in

human intestinal microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 288: C272-C281.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 411: 603-606.

Ohmi, A., Ohno, K., Uchida, K., Nakayama, H., Koshino-Goto, Y., Fukushima, K., Takahashi, M., Nakashima, K., Fujino, Y., Tsujimoto, H. 2011. A retrospective study in 21 Shiba dogs with chronic enteropathy. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 1-5.

Ohno, K., Konishi, S., Kobayashi, S., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y., Nakayama, H., Tsujimoto, H. 2006. Prognostic factors associated with survival in dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 929-933.

Ohtani, H., Nakamura, S., Watanabe, Y., Fukushima, K., Mizoi, T., Kimura, M., Hiwatashi, N., Nagura, H. 1992. Light and electron microscopic immunolocalization of endothelial leucocyte adhesion molecule-1 in inflammatory bowel disease. Morphological evidence of active synthesis and secretion into vascular lumen. *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 420: 403-409.

Okanishi, H., Hayashi, K., Sakamoto, Y., Sano, T., Maruyama, H., Kagawa, Y., Watari, T. 2013. NOD2 mRNA Expression and NFkappaB Activation in Dogs with Lymphocytic Plasmacytic Colitis. *J. Vet. Intern. Med.* 27: 439-444.

Okanishi, H., Kabeya, H., Maruyama, S., Kagawa, Y., Watari, T. 2013. Activation of nuclear factor-kappa B and cell adhesion molecule mRNA expression in duodenal mucosa of dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 154: 145-52.

Okanishi, H., Sano, T., Yamaya, Y., Kagawa, Y. and Watari, T. 2013. The characteristics of short- and long-term surviving Shiba dogs with chronic enteropathies and the risk factors for poor outcome. *Acta. Vet. Scand.*, 55:32.

Palmer, A.C. 1980. Myasthenia gravis. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 10: 213-221.

Pauleau, A.L., Murray, P.J. 2003. Role of nod2 in the response of macrophages to Toll-like receptor agonists. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7531-7539.

Peters, I.R., Helps, C.R., Calvert, E.L., Hall, E.J., Day, M.J. 2005. Cytokine mRNA quantification in duodenal mucosa from dogs with chronic enteropathies by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Vet. Intern. Med.* 19: 644-653.

Pfossier, A., El-Aouni, C., Pfisterer, I., Dietz, M., Globisch, F., Stachel, G.,

Trenkwalder, T., Pinkenburg, O., Horstkotte, J., Hinkel, R., Sperandio, M., Hatzopoulos, A.K., Boekstegers, P., Bals, R., Kupatt, C. 2010. NF kappaB activation in embryonic endothelial progenitor cells enhances neovascularization via PSGL-1 mediated recruitment: novel role for LL37. *Stem. Cells.* 28: 376-385.

Pooley, N., Ghosh, L., Sharon, P. 1995. Up-regulation of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 differs between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig. Di.s Sci.* 40: 219-225.

Raddatz, D., Middel, P., Bockemühl, M., Benöhr, P., Wissmann, C., Schwörer, H., Ramadori, G., 2004. Glucocorticoid receptor expression in inflammatory bowel disease: evidence for a mucosal down-regulation in steroid-unresponsive ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19: 47-61.

Reuter, B.K., Pizarro, T.T. 2004. Commentary: The role of the IL-18 system and other members of the IL-1R/TLR superfamily in innate mucosal immunity and

the pathogenesis of inflammatory bowel disease: Friend or foe? *Eur. J. Immunol.* 34: 2347-2355.

Ridyard, A.E., Nuttall, T.J., Else, R.W. Simpson JW, Miller HR. 2002. Evaluation of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine mRNA expression within the colonic mucosa of dogs with idiopathic lymphocyticplasmacytic colitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86: 205-214.

Rivera-Nieves, J., Gorfú, G., Ley, K. 2008. Leukocyte adhesion molecules in animal models of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 14: 1715-1735.

Romatowski, J. 1990. Iatrogenic adrenocortical insufficiency in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196: 1144-1146.

Rosenstiel, P., Fantini, M., Bräutigam, K., Kühbacher, T., Waetzig, G.H., Seegert,

D., Schreiber, S. 2003. TNF α and IFN γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 124: 1001-1009.

Sakaue, Y., Nezu, Y., Yanagisawa, S., Komori, S., Hara, Y., Takahashi, K., Tagawa, M., Ogawa, R. 2005. Effects of continuous low-dose infusion of lipopolysaccharide on expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA and neutrophil accumulation in specific organs in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 66: 1259-1266.

Sartor, R.B. 1995. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 24: 475-507.

Schreiner, N.M., Gaschen, F., Grone, A., Sauter, S.N., Allenspach, K. 2008. Clinical signs, histology, and CD3-positive cells before and after treatment of dogs with chronic enteropathies. *J. Vet. Intern. Med.* 22: 1079-1083.

Schürmann, G.M., Bishop, A.E., Facer, P., Vecchio, M., Lee, J.C., Rampton, D.S., Polak, J.M. 1995. Increased expression of cell adhesion molecule P-selectin in active inflammatory bowel disease. *Gut*. 36: 411-418.

Seidelin, J.B., Vainer, B., Horn, T., Nielsen, O.H. 1998. Circulating L-selectin levels and endothelial CD34 expression in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 93: 1854-1859.

Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., Sartor, R.B. 1998. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* 66: 5224-5231.

Semin. Vet. Med. Surg (Small Anim). 7: 117-127.

Seron, D., Cameron, J.S., Haskard, D.O. 1991. Expression of VCAM-1 in the

normal and diseased kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* 6: 917-922.

Shih, D.Q., Targan, S.R. 2008. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World. J. Gastroenterol.* 14: 390-400.

Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y., Shaw, S. 1992. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol. Today.* 13: 106-112.

Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* 2001;15:2321–2342.

Simpson, K.W., Dogan, B., Rishniw, M., Goldstein, R.E., Klaessig, S., McDonough, P.L., German, A.J., Yates, R.M., Russell, D.G., Johnson, S.E., Berg, D.E., Harel, J., Bruant, G., McDonough, S.P., Schukken, Y.H. 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. *Infect. Immun.* 74: 4778-4792.

Simpson, K.W., Jergens, A.E. 2011. Pitfalls and progress in the diagnosis and management of canine inflammatory bowel disease. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 41: 381-398.

Stronati, L., Negroni, A., Merola, P., Pannone, V., Borrelli, O., Cirulli, M., Annese, V., Cucchiara, S. 2008. Mucosal NOD2 expression and NF-kappaB activation in pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 14: 295-302.

Sun, B., Fan, H., Honda, T., Fujimaki, R., Lafond-Walker, A., Masui, Y., Lowenstein, C.J., Becker, L.C. 2001. Activation of NF kappa B and expression of ICAM-1 in ischemic-reperfused canine myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 109-119.

Sun, F.F., Lai, P.S., Yue, G., Yin, K., Nagele, R.G., Tong, D.M., Krzesicki, R.F., Chin, J.E., Wong, P.Y. 2001. Pattern of cytokine and adhesion molecule mRNA in

hapten-induced relapsing colon inflammation in the rat. *Inflammation*. 25: 33-45.

Swerdlow, M.P., Kennedy, D.R., Kennedy, J.S., Washabau, R.J., Henthorn, P.S., Moore, P.F., Carding, S.R., Felsburg, P.J. 2006. Expression and function of TLR2, TLR4, and Nod2 in primary canine colonic epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114: 313-319.

Tanabe, T., Chamailard, M., Ogura, Y., Zhu, L., Qiu, S., Masumoto, J., Ghosh, P., Moran, A., Predergast, M.M., Tromp, G., Williams, C.J., Inohara, N., Núñez, G. 2004. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO. J.* 23: 1587-1597.

Thiele, K., Bierhaus, A., Autschbach, F., Hofmann, M., Stremmel, W., Thiele, H., Ziegler, R., Nawroth, P.P. 1999. Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut*. 45: 693-704.

Turvey, S.E., Broide, D.H. 2010. Innate immunity. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 125: S24-S32.

Umeki S, Suzuki R, Shimojima M, Ema Y, Yanase T, Iwata H, Okuda M, Mizuno T. 2011. Characterization of monoclonal antibodies against canine P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 142: 119-125.

Van Kampen, C., Mallard, B.A. 2001. Regulation of bovine E-selectin expression by recombinant tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79: 151-165.

Vowinkel, T., Wood, K.C., Stokes, K.Y., Russell, J., Taylor, A., Anthoni, C., Senninger, N., Krieglstein, C.F., Granger, D.N. 2007. Mechanisms of platelet and leukocyte recruitment in experimental colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 293: G1054-1060.

Washabau, R.J., Day, M.J., Willard, M.D., Hall, E.J., Jergens, A.E., Mansell, J., Minami, T., Bilzer, T.W., WSAVA International Gastrointestinal Standardization Group, 2010. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *J. Vet. Intern. Med.* 24: 10-26.

Whelan, J., Ghersa, P., Hooft van Huijsduijnen. R., Gray, J., Chandra, G., Talabot, F., DeLamarter, J.F. 1991. An NF kappa B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Nucleic. Acids. Res.* 19: 2645-2653.

Wild, G.E., Drozdowski, L., Tartaglia, C., Clandinin, M.T., Thomson, A.B. Nutritional modulation of the inflammatory response in inflammatory bowel disease—from the molecular to the integrative to the clinical. *World. J. Gastroenterol.* 13: 1-7.

Willard, M.D., Moore, G.E., Denton, B.D., Day, M.J., Mansell, J., Bilzer, T., Wilcock, B., Gualtieri, M., Olivero, D., Lecoindre, P., Twedt, D.C., Collett, M.G., Hall, E.J., Jergens, A.E., Simpson, J.W., Else, R.W., Washabau, R.J. 2010. Effect of tissue processing on assessment of endoscopic intestinal biopsies in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 24: 84-89.

Worley, D.R., Hottinger, H.A., Lawrence, H.J. 2004. Surgical management of gallbladder mucoceles in dogs: 22 cases (1999-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225: 1418-1422.

Xavier, R.J., Podolsky, D.K. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 448: 427-434.

Xenoulis, P.G., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M. 2008. Chronic pancreatitis in dogs and cats. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 30: 166-180.

Yacyshyn, B.R., Bowen-Yacyshyn, M.B., Jewell, L., Tami, J.A., Bennett, C.F., Kisner, D.L., Shanahan Jr., W.R. 1998. A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 114: 1133-1142.

Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., Murphy, E., Sathe, M., Cua, D.J., Kastelein, R.A., Rennick, D. 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest.* 116: 1310-1316.