

博士論文

イヌの特発性多発性関節炎の
病態生理に関する研究

村上 康平

目次

緒論	1
第1章	8
イヌの特発性多発性関節炎における血漿・滑液中の C3-IgG 複合体の検出	
第2章	31
滑液中 CXCL8 と CCL2 のイヌの特発性多発性関節炎の病態への関与	
第3章	60
イヌの特発性多発性関節炎におけるグルココルチコイド療法に伴う 滑液総蛋白質濃度の変化	
総括	74
謝辞	78
引用文献	79

緒 論

ヒトの多発性関節炎には様々な種類がある。特に関節リウマチは、紀元前から知られる代表的な多発性関節炎であり、日本人の0.5–1.0%が罹患している (日本リウマチ学会, 2010)。関節リウマチ以外にも、乾癬性関節炎、若年性特発性関節炎、シェーグレン症候群、全身性紅斑性狼瘡、強皮症、血管炎症候群など、数多くの疾患で多発性関節炎が発生する (日本リウマチ学会, 2010)。これらの疾患は、いずれも免疫異常が病態に関わっているとされ、一般的に免疫抑制療法が行われる (日本リウマチ学会, 2010)。毎年のように新たな薬剤が開発され、治療選択肢は増えているが (Isaacs *et al.*, 2015)、現状ではいずれの多発性関節炎に対しても根治療法は存在しない (日本リウマチ学会, 2010)。

イヌでも多発性関節炎は珍しい疾患ではなく、動物病院に来院したイヌの0.35–1.09%で多発性関節炎を認めたと報告がある (Ohno *et al.*, 2006; Stull *et al.*, 2008)。初めてイヌの多発性関節炎が報告されたのは1967年に遡る (Lewis and Hathaway, 1967)。その後、イヌの非感染性多発性関節炎の中には、骨びらんを伴うものと伴わないものが存在することが明らかとなり (Pedersen *et al.*, 1976a, b)、1987年 David Bennett によって両者の診断基準が明文化された (Bennett, 1987a–e; Bennett and Kelly, 1987)。骨びらんを伴う多発性関節炎はイヌの関節リウマチ (canine rheumatoid arthritis: cRA) に、骨びらんを伴わない多発性関節炎は全身性紅斑性狼瘡、多発性筋炎/多発性関節炎症候群、そして特発性多発性関節炎 (idiopathic polyarthritis: IPA) の三疾患に分類された。これにより、イヌの多発性関節炎に含まれる各疾患は独立して扱われるようになった。

IPA は既知の疾患に分類できない多発性関節炎と定義されており、イヌに発生する多発性関節炎の中で最もよく見られる (Rondeau *et al.*, 2005; Stull *et al.*, 2008)。若齢から中

年齢で好発すると報告されているが (Johnson and Mackin, 2012a)、実際の発症年齢は 0.3–13 歳と幅広い (Bennett, 1987e; Clements *et al.*, 2004; Kohn *et al.*, 2005; Ohno *et al.*, 2006; Stull *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2014)。性差に関しては、認められない (Kohn *et al.*, 2005; Stull *et al.*, 2008)、メスが多い (Ohno *et al.*, 2006)、オスが多い (Bennett, 1987e) との報告があり、一致した見解は得られていない。発症する犬種も様々で (Bennett, 1987e; Clements *et al.*, 2004; Kohn *et al.*, 2005; Ohno *et al.*, 2006; Stull *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2014)、特別な好発犬種は報告されていない。国内での大規模な疫学調査は行われていないが、筆者が 2010 年から 2015 年まで東京大学附属動物医療センターに来院し IPA と診断されたイヌ 109 頭を調査したところ、発症年齢は 0.5–14.2 歳 (中央値 6.8 歳)、雄 53 頭 (去勢済 24 頭)、雌 56 頭 (避妊済 31 頭) で雌雄差はなかった。本施設では、ミニチュア・ダックスフンド (オッズ比 3.2, $P < 0.001$) とウェルッシュ・コーギー・ペンブローク (オッズ比 2.6, $P < 0.01$) の二犬種で有意に IPA が好発していた。

IPA の臨床徴候としては跛行が最もよく認められ、次いで発熱が多い (Clements *et al.*, 2004)。移動性跛行は IPA に特徴的であるが、必ずしも認められない (Pedersen *et al.*, 1976b)。また IPA のイヌの多くは、活動性の低下や食欲の減退など非特異的な全身性の徴候を伴う (Bennett, 1987e)。しかしこれらはときに曖昧であり、跛行が認められず、多発性関節炎を疑いにくいときには IPA の診断は難しい (Taylor, 2009)。

IPA は多発性関節炎が認められたイヌで、各種の検査によりその他の関節炎を除外することで診断される。しかし、0–8 %の IPA のイヌで抗核抗体が、また 12–21%の IPA のイヌでリウマチ因子が陽性になることが報告されており (Bennett, 1987e; Clements *et*

al., 2004; Stull *et al.*, 2008)、IPA と他の関節炎をはっきりと鑑別することが難しい場合もある。また基礎疾患が存在することも多く、感染性疾患、胃腸疾患、腫瘍性疾患などから IPA が続発することも知られている (Bennett, 1987e; Kohn *et al.*, 2005; Rondeau *et al.*, 2005)。IPA の治療にはグルココルチコイドや免疫抑制剤が選択され、初期の治療反応率は 81% と比較的高い (Clements *et al.*, 2004)。しかし、その中の 31% では再発が認められ、治療反応性が乏しい症例や再発を繰り返す症例も少なくない (Clements *et al.*, 2004)。したがって IPA の発症予防法や新たな治療法を早急に確立することが望まれており、そのためには病因や病態に関与する因子を特定することが重要となる。

IPA は他の関節炎を除外することで診断されるので、細菌など関節炎を来す病原微生物の存在は、滑液の細胞診や培養により否定される (Pedersen *et al.*, 1976b; Bennett, 1987e)。過去には、ジステンパー抗原および抗ジステンパー抗原抗体が免疫介在性多発性関節炎のイヌで高率に検出され (Bell *et al.*, 1991; May *et al.*, 1994)、イヌジステンパーウイルスの IPA 発症への関与が示唆されたことがある。しかし、これを裏付ける証拠は未だに無く、多発性関節炎はイヌジステンパーウイルス感染症の一般的な臨床症状ではないことから、この説は懐疑的である。また、多発性関節炎は ST 合剤などの薬剤 (Giger *et al.*, 1985; Bennett, 1987e, Trepanier *et al.*, 2003) やワクチン投与 (Dobbs *et al.*, 2001; Kohn *et al.*, 2003) に伴って発症することもあるため、何らかの外因性の刺激が IPA の発症を誘導している可能性も考えられる。しかし、IPA のイヌで共通する因子は今のところない。そこで、遺伝的素因あるいは自己免疫機序を考慮した IPA の病態解析が進められてきた。

遺伝的素因に関して、ヒトの関節リウマチの疾患感受性遺伝子とされるヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: *HLA*) -*DRB1* 遺伝子のホモログであるイヌ白血球抗原 (dog leukocyte antigen: *DLA*) -*DRB1* が、多発性関節炎の疾患感受性遺伝子になっていると報告されている (Ollier *et al.*, 2001)。またノヴァ・スコシア・ダック・トーリング・レトリバーでは、多発性関節炎に疾患感受性を持つイヌ白血球抗原クラス 2 (*DLA-DRB2*) のハプロタイプが報告された (Wilbe *et al.*, 2009)。これらの遺伝子は、多発性関節炎の病因となる抗原提示に関与する可能性があり、IPA の一部は遺伝的背景をもつ可能性が考えられる。しかし、高リスクの *DLA-DRB1* ハプロタイプをもつイヌでの多発性関節炎の発症率が 36.5–39.2%である一方、多発性関節炎ではないイヌでも同様のハプロタイプが 11.5–21.9%で認められる。したがって、遺伝的素因のみで IPA の発症を説明することは難しい。

IPA のイヌでは免疫が賦活しており、これが IPA の主要な病態と考えられている (Bennett, 2010; Johnson and Mackin, 2012a, b)。IPA のイヌの滑膜組織中では炎症細胞の浸潤が認められると同時に、補体 C3 と IgG または補体 C3 と IgM で構成される免疫複合体が沈着していることが示されている (Bennett, 1987e)。また、IPA と cRA を含む多発性関節炎のイヌの血清中では、健康なイヌよりも有意に多くの血中免疫複合体が検出された (Carter *et al.*, 1989)。これらの知見は、IPA が 3 型過敏反応であることを示唆する。一方で、多発性関節炎のイヌの血漿中で、2 型コラーゲン (Bari *et al.*, 1989) や熱ショック蛋白 65 (Bell *et al.*, 1995)、あるいは cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (Khatlani *et al.*, 2003) に対する自己抗体が高率に検出されることが知られており、2 型過敏反応の

関与も考えられる。

以上のような研究にも関わらず、IPA の病因は未だ十分に解明されていない。この原因と考えられるのは、IPA と cRA の混同である。多くの研究では、IPA 症例と cRA 症例を同一群として扱っている (Bari *et al.*, 1989; Carter *et al.*, 1989; Bell *et al.*, 1991; May *et al.*, 1994; Khatlani *et al.*, 2003; Hegemann *et al.*, 2003; Hegemann *et al.*, 2005)。しかしながら、IPA と cRA では X 線検査所見はもちろん、発生頻度、治療反応性、予後が大きく異なり (Bennett, 2010; Johnson and Mackin, 2012 a, b)、それぞれの病因や病態も異なると考えられる。また、IPA の多様性も研究を難しくしている。さらに、IPA は治療反応性が比較的高いため、滑膜生検の機会が少ない。このため、1987 年の報告以降 (Bennett, 1987e)、IPA の滑膜組織を利用した研究はなく、IPA の病原因子の証明は困難である。

本論文における一連の研究では、IPA の病態生理の解明を試みた。これまでの研究から、IPA のイヌでの滑膜の病理組織学的な特徴は、(1) 免疫複合体の存在、(2) 高度な好中球の浸潤、(3) lining layer の消失や間質の壊死を伴う重度な障害、が挙げられる。そこで、上記 3 つの特徴に着目し、それぞれに関連した臨床病理学的変化を検討した。IPA 症例の一部で免疫複合体が関与することは、滑膜組織の免疫組織化学で明らかにされている (Bennett, 1987e)。しかし、免疫複合体の由来や治療に伴う変化はまだわかっていない。第 1 章では、IPA のイヌにおける血漿および滑液中の免疫複合体を検討した。また IPA のイヌでは、滑膜だけでなく滑液中の白血球数も増加しており、このほとんどが好中球である (Bennett, 1987e; Clements *et al.*, 2004; Colopy *et al.*, 2010)。しかし好中球が関節に集簇するメカニズムはまだわかっていない。そこで第 2 章では、ヒトにおける好

中球走化因子である Chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (CXCL8) と単球走化因子である Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) の滑液中の濃度および好中球集簇への関与について *in vitro* で評価した。第3章では、滑膜の障害に伴う滑膜機能の低下を検討した。健康な動物の滑膜は、高分子の血漿蛋白質が滑液に流入することを制限する。そのため、滑液中に高分子量の蛋白質はほとんど含まれておらず、滑液総蛋白質濃度も血漿と比較して低く保たれている。しかし滑膜が障害を受けると、その機能は失われて血漿蛋白質が滑液中に流入し、滑液総蛋白質濃度は上昇すると考えられる。IPA のイヌでも滑液総蛋白質濃度は上昇すると考えられるが、IPA に限った報告はまだなく、治療前後での変化も調べられていない。そこで IPA のイヌの滑液総蛋白質濃度および治療後の変化について検討した。

第 1 章

イヌの特発性多発性関節炎における
血漿・滑液中の C3-IgG 複合体の検出

【緒言】

イヌの IPA では臨床像や臨床病理学的所見に関する報告はあるものの、現在まで病態の解明には至っていない。IPA は免疫抑制療法に反応することから、免疫介在性疾患の側面を有すると考えられている。また、IPA のイヌの滑膜における免疫組織化学で補体 C3 と IgG または補体 C3 と IgM が共局在していたことから、IPA に 3 型過敏反応が関与すると提唱された (Bennet, 1987e)。

補体 C3 は古典経路、レクチン経路、代替経路の合流点に位置する補体系の中心的蛋白質である (Lambris, 2001)。補体 C3 は C3 転換酵素によって切断され、低分子フラグメントの C3a (9 kDa) と高分子フラグメントの C3b (176 kDa) に分かれる。C3b はさらに iC3b (176 kDa)、C3c (132 kDa)、C3dg (40 kDa) と分解と活性化が進む (Lambris, 2001)。これら C3 分解産物は様々な生物活性を持ち、その中の一つに免疫グロブリンのクリアランス作用がある。免疫グロブリンは Fc 領域や Fd 領域に補体結合部位を持ち (Kulics *et al.*, 1983; Vivanco *et al.*, 1999; Fields *et al.*, 2013)、補体 C3 およびその分解産物と結合する。補体 C3 が結合した免疫グロブリンは、補体受容体をもつ赤血球などによって排除される。ヒトでは関節リウマチや全身性紅斑性狼瘡、シェーグレン症候群など関節炎を伴う自己免疫疾患の患者で血清中の補体 C3 と免疫グロブリンの複合体が増加することが報告されている (Panush *et al.*, 1985; Aguado *et al.*, 1985; Soares *et al.*, 2001)。イヌでは、リーシュマニア症で血清中の補体 C3 を含む免疫複合体が増加することが報告されているが (Lopez *et al.*, 1996)、IPA における血中免疫複合体は検討されていない。本章では、IPA のイヌの血漿と滑液中の補体 C3 と IgG を含む免疫複合体を探索した。

【材料と方法】

症例と対照

2012年から2015年に東京大学附属動物医療センターに来院したイヌのうち、IPAと診断されたイヌ32頭を組み入れた。これらのイヌは0.9–13.9歳齢(中央値8.2歳齢)、オス8頭(うち4頭去勢済み)、メス24頭(うち10頭避妊済み)であった。犬種は、ミニチュア・ダックスフンドが13頭、トイ・プードルが5頭、シーザーが3頭、イタリアン・グレイハウンド、ウェルッシュ・コーギー・ペンブローク、ポメラニアン、ミニチュア・シュナウザーが各2頭、フレンチ・ブルドッグ、マルチーズ、雑種犬が各1頭であった。IPAの診断基準は、以下の4項目を満たすこととした。

- 1) 2つ以上の関節から採取した滑液において、
 - ① 塗抹標本上の高倍率視野($\times 400$)で2個以上の白血球が観察される
 - ② 自動血球計算機により3000個/ μl 以上の白血球がカウントされるのいずれか。
- 2) 四肢のレントゲン検査によりびらん性関節炎が除外される。
- 3) 滑液の鏡検または微生物学的検査により細菌性関節炎が除外される。
- 4) 全身性紅斑性狼瘡および多発性筋炎/多発性関節炎症候群を示唆する所見がない。

疾患対照として、cRAのイヌ4頭(2.8–12.7歳齢(中央値3.7歳齢)、去勢オス1頭、メス3頭(うち避妊済み2頭)、チワワ、ミニチュア・ダックスフンド、シーザー、トイ・プードル(各1頭))と関節炎を伴わない全身性疾患のイヌ17頭(1.7–13.9歳齢(中央値7.0歳齢)、オス5頭(うち去勢済み4頭)、メス12頭(うち避妊済み10頭)、ミニ

チュア・ダックスフンド (4頭)、トイ・プードル (3頭)、アメリカン・エスキモー、ビション・フリーゼ、ボーダー・コリー、ジャック・ラッセル・テリア、ミニチュア・シュナウザー、パピヨン、シーズー、シェットランド・シープドッグ、柴犬、ウェルッシュ・コーギー・ペンブローク (各1頭)) を組み入れた。cRA の診断は、滑液検査で非感染性の多発性関節炎を認めたイヌでレントゲン検査を行い、軟骨や骨のびらんを確認することで診断した。非関節炎の疾患対照としては、跛行や発熱、血漿中 C 反応性蛋白 (C-reactive protein: CRP) の増加などから IPA が疑われ、その除外を目的として関節穿刺を行い、滑液中に白血球を認めなかったイヌを組み入れた。非関節炎の疾患対照のイヌは、最終的に脾炎、免疫介在性溶血性貧血 (各 2 頭)、骨髄異形性症候群、再生不良性貧血、胆管肝炎、大腸炎、消化器型リンパ腫、根尖膿瘍、子宮蓄膿症、腎盂腎炎、蛋白漏出性腎症、全身性紅斑性狼瘡、多発性筋炎、無菌性結節性脂肪織炎、不明熱 (各 1 頭) と診断された。健康対照として、臨床的に健康なイヌ 27 頭 (0.8–8.0 歳齢 (中央値 6.0 歳齢)、オス 14 頭 (うち去勢済み 6 頭)、メス 13 頭 (うち避妊済み 6 頭)、ビーグル 24 頭、ラブラドル・レトリバー 3 頭) を組み入れた。

滑液と血漿、血清

滑液はすべて診断時に採取し、遠心分離後 (4°C, 5000 × g, 10 分) に上清を採取し、使用直前まで -30°C で保管した。同時に採血を行い、ヘパリン処理された遠心管と血液分離剤入りの遠心管に分取した。ヘパリン化した遠心管の血液は 1890 × g で 3 分間遠心分離し、血漿を採取した。血液分離剤入りの遠心管は、室温で 30 分間静置後、遠心分

離を行い (700 × g, 5 分)、血清を採取した。血漿と血清は、使用まで-30°C で保存した。

また IPA 群のうち 5 頭はグルココルチコイドで治療され (いずれもプレドニゾン 1.0-1.5 mg/kg/day; 10 日間から 10 週間、中央値 3 週間)、再検査では滑液中に白血球が認められなくなった。この時点の血漿を同様に採取し、-30°C で保存した。また症例の滑液と血漿、血清を二次使用することについては、十分な説明の上ですべての飼い主から書面による許諾を得た。

イムノブロットによる C3-IgG 複合体の検出

血漿および滑液 10 nl 分の蛋白質を、還元剤を含まない Laemmli サンプルバッファーと混合し、6% のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した。ゲル内の蛋白質は、セミドライ式の転写装置 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.) を用いてニトロセルロース膜 (Amersham Hybond ECL; GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.) に転写した。転写後のニトロセルロース膜は 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を含むトリス緩衝液 (TBS-T) に 5% (w/v) のスキムミルク (Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.) を加え、室温で 60 分間ブロッキングした。続いて市販のキット (Peroxidase Labeling Kit -SH; Dojindo, Kumamoto, Japan) で horseradish peroxidase (HRP) を直接標識したヤギ抗イヌ補体 C3 抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, U.S.A.) を TBS-T で希釈し (1:50000)、室温で 60 分間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄し、ECL Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて化学発光させ、High Performance Chemiluminescence Film (Amersham Hyperfilm

ECL; GE Healthcare) 上で検出した。ニトロセルロース膜は、リン酸緩衝液 (PBS; 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) で3回洗浄し、4°Cで一晩以上静置した。室温に戻した後、市販の抗体除去緩衝液 (Restore Western Blot Stripping Buffer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) と室温、12分間反応させた。TBS-Tで3回洗浄後、5%のスキムミルクを含むTBS-Tでブロッキングを行った。つづいてTBS-Tで希釈したHRP標識ヤギ抗イヌIgG抗体 (1:50000, Bethyl Laboratories) を室温、60分間反応させた。TBS-Tで3回洗浄し、ECL Detection Reagentを用いて化学発光させ、High Performance Chemiluminescence Film 上で検出した。

二次元電気泳動

補体 C3 と IgG に対するイムノブロットで、共通するバンドが見られた IPA のイヌの血漿を用いて、二次元電気泳動を行った。一次元目は固定化 pH 勾配ゲル (Ready Strip, pH 4-7, 17 cm; Bio-Rad Laboratories) を用いて等電点電気泳動を行った。血漿 7 µl 中の蛋白質は、膨潤緩衝液 (8 M 尿素, 2% CHAPS, 2% IPG Buffer, Bromophenol blue) で室温、12 時間膨潤した。その後、等電点電気泳動装置 (PROTEAN IEF Cell; Bio-Rad Laboratories) を用いて 500 V/lane で 1 時間、1000 V/lane で 1 時間、8000 V/lane で 4 時間電圧を加えた。ゲル中の蛋白質は、平衡化緩衝液 (50 mM Tris-Cl, 6 M 尿素, 30% Glycerol, 2% SDS, Bromophenol blue, pH 8.8) と室温、15 分間反応させ、6%の SDS-PAGE で分離した。ここまでの過程で 2 つのポリアクリルアミドゲルを用意し、1 つは Coomassie brilliant blue-R250 (CBB) で染色し、1 つはタンク式の転写装置 (Bio-Rad Laboratories) で

ニトロセルロース膜に転写した。得られたニトロセルロース膜は、先述と同様に補体 C3 および IgG に対するイムノブロットを行った。共通するスポットを確認し、先程 CBB で染色したゲル上で該当するスポットを切り抜き、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS) に供した。

LC-MS/MS による蛋白質の同定

二次元電気泳動で得られたポリアクリルアミドゲル片をトリプシンで処理した (Promega, Madison, WI, U.S.A.)。得られたペプチドはイオントラップ質量分析計と直結した高速液体クロマトグラフィー装置 (Thermo Finnigan, San Jose, CA, U.S.A.) で分離し、分析した。質量分析計で検出されたスペクトルは、ソフトウェアで解析し (TurboSEQUENT; Thermo Quest, San Jose, CA, U.S.A.)、各々のピークから MASCOT プログラム (<http://www.matrixscience.com>) を用いて NCBI のデータベース検索を行った。MASCOT 確率分析により有意とされた蛋白質のみを結果とした。

C1q 結合アッセイ

C1q 結合アッセイは過去の報告 (Stanilova and Slavov, 2001) を改変し、行った。精製ヒト補体 C1q (AssayPro, St. Charles, MO, U.S.A.) を炭酸-重炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 10 $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、平底の 96 ウェルプレート (Multi Well Plate; Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) に 100 μl ずつ加え、4°C で一晩静置して固相化した。凍結保存していた血清を氷上で解凍し、サンプル緩衝液 (1% ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) と 0.2% Tween

20 を含む PBS) で 50 倍に希釈した。また、精製イヌ IgG (Rockland Immunochemicals, Limerick, PA, U.S.A.) を生理食塩水で 5 mg/ml に希釈し、63°C で 20 分間反応させ、氷冷した。その後 4°C、1500 × g で 15 分間遠心分離し、上清を分取して蛋白質濃度を測定した (Protein Assay; Bio-Rad Laboratories)。得られたイヌ凝集グロブリン (aggregated canine globulin: ACG) をサンプル緩衝液で階段希釈し、標準蛋白質とした。精製ヒト C1q を固相化した 96 ウェルプレートは自動マイクロプレート洗浄機 (Immunowash 1575; Bio-Rad Laboratories) を用いて PBS で 3 回洗浄し、血清と標準蛋白質を 95 μl/well ずつ加え、37°C で 1 時間静置した。TBS-T で 3 回洗浄した後、TBS-T で希釈した HRP 標識ヤギ抗イヌ IgG 抗体 (1:10000, Bethyl Laboratories) を 100 μl/well 加え、室温で 60 分間反応させた。TBS-T で洗浄後、100 μl/well の発色液 (1 mg/ml, 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid; Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) と反応させ、Model 680 プレートリーダー (Bio-Rad Laboratories) を用いて 405 nm の吸光度を測定した。すべての測定は 1 バッチの 2 重測定で行った。標準蛋白質でプレートごとに作成した標準曲線を用いて、各検体の吸光度の平均から凝集イヌグロブリン相当濃度 (μg E ACG/ml) を算出し、評価した。

【統計】

イムノブロットによる C3-IgG 複合体の検出は、Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, U.S.A.) を用いて Kruskal-Wallis 検定を行い、Dunn's post test で多重比較検定を行った。C1q 結合アッセイの結果は一元配置分散分析法を実施し、Tukey-Kramer 法で多重

比較検定を行った。得られた検定結果は $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

血漿中の C3 および IgG に対するイムノブロット

抗イヌ C3 抗体を用いて、非還元状態の血漿蛋白質に対するイムノブロットを行った代表的な結果を図 1A に示した。全検体で、最も強い反応を示すバンドが見かけ上 250 kDa の位置に認められ、補体 C3 の全長蛋白質と考えられた。それよりも低分子量の位置に複数のバンドが認められ、これらは断片化した補体 C3 と考えられた。さらに、健康なイヌの 14 頭中 4 頭 (29%)、IPA のイヌの 33 頭 29 頭 (88%)、cRA のイヌの 4 頭中 3 頭 (75%)、非関節炎の疾患対照のイヌの 17 頭中 10 頭 (59%) では 250 kDa よりも高分子量の位置に複数のバンドが認められた。同一のニトロセルロース膜から抗 C3 抗体を除去し、抗イヌ IgG 抗体を反応させたところ、IPA のイヌの 32 頭中 22 頭 (69%) および非関節炎の疾患対照のイヌの 17 頭中 4 頭 (24%; 子宮蓄膿症, 無菌性結節性脂肪織炎, 骨髓異形性症候群, 再生不良性貧血) では、250 kDa よりも高分子量側に抗 C3 抗体と抗 IgG 抗体の両方が反応するバンドが確認された (図 1B 矢印)。同様のバンドは健康なイヌと cRA のイヌでは認められず、IPA のイヌでは健康なイヌ ($P < 0.01$)、非関節炎の疾患対照のイヌ ($P < 0.05$)、cRA のイヌ ($P < 0.05$) よりも有意に検出率が高かった。IPA のイヌのうちグルココルチコイドで治療された 5 頭では、関節炎の改善に伴って、3 頭で高分子量のバンドが消失し、2 頭では反応が減弱した (図 2)。

滑液中の C3 および IgG に対するイムノブロット

血漿蛋白質と同様に、滑液蛋白質中でも 250 kDa より高分子量側に、抗 C3 抗体と抗

IgG 抗体の両方が反応するバンドが健康なイヌの 6 頭中 0 頭、IPA のイヌの 24 頭中 22 頭 (92%) で確認された (図 3)。血漿中に抗 C3 抗体と抗 IgG 抗体の両方が反応するバンドを認めた IPA のイヌは、すべて滑液中で同様のバンドが検出された (表 1)。

二次元電気泳動と質量分析

血漿中に抗 C3 抗体と抗 IgG 抗体の両方が反応するバンドが検出された IPA のイヌの血漿を二次元電気泳動し、補体 C3 および IgG に対するイムノプロットを行った (図 4)。その結果、最も強い反応が認められる位置よりも高分子量のところで、抗 C3 抗体と抗 IgG 抗体に共通して反応するスポットを認めた。該当するスポットの LC-MS/MS を実施し、イヌ免疫グロブリンの γ 鎖と λ 鎖、そしてイヌ補体 C3 の予想配列が確認された。しかし上記以外のイヌの蛋白質は検出・同定されなかった (表 2)。

C1q-ELISA

C1q 結合アッセイによる血清中の免疫複合体測定値を図 5 に示した。健康なイヌ ($13.7 \pm 7.0 \mu\text{g E ACG/ml}$: 平均値 \pm 標準偏差, $n=27$)、非関節炎の疾患対照のイヌ ($11.6 \pm 5.5 \mu\text{g E ACG/ml}$, $n=15$)、IPA のイヌ ($12.8 \pm 8.0 \mu\text{g E ACG/ml}$, $n=16$) の間で有意差はなかった。cRA のイヌ ($n=4$) では、他の 3 群よりも有意に血清中の血中免疫複合体の測定値が高かった ($29.7 \pm 18.9 \mu\text{g E ACG/ml}$)。C1q 結合アッセイと C3-IgG 複合体との間に、明らかな関連性は認められなかった (表 1)。

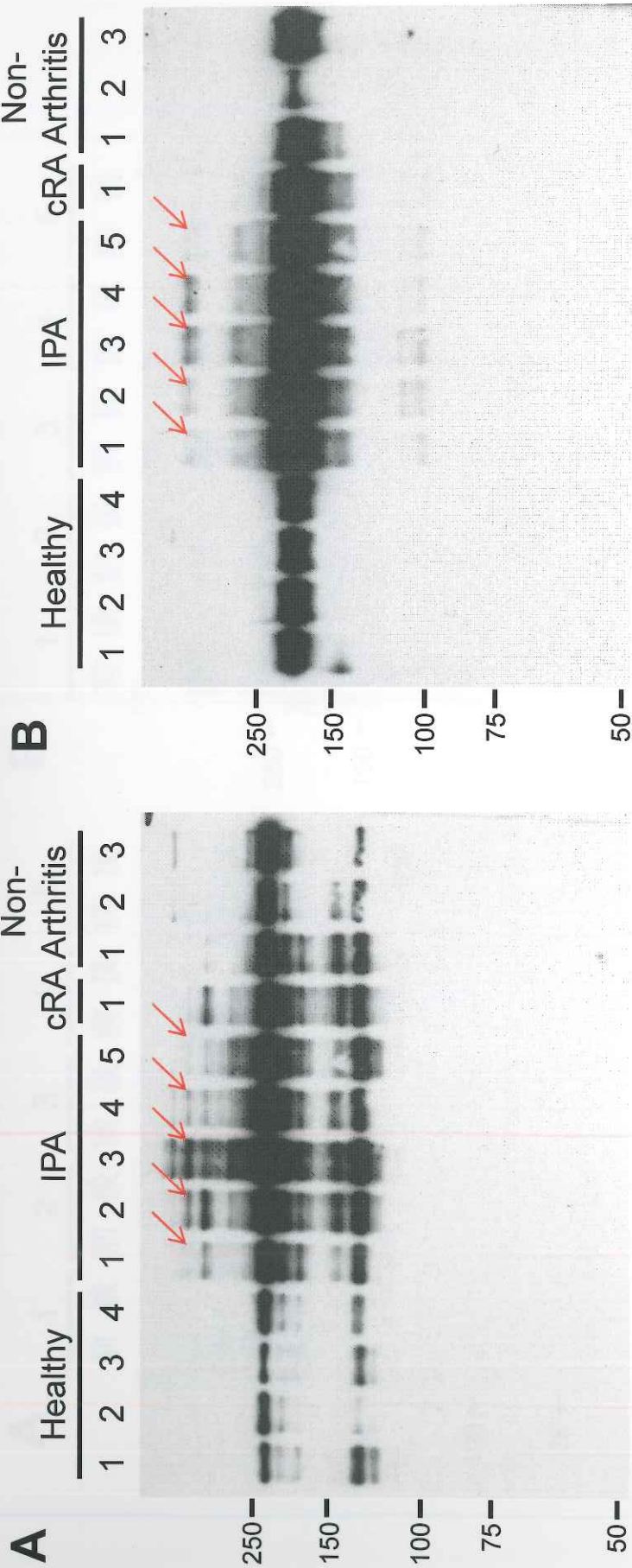


図1 抗C3抗体 (A) と抗IgG抗体 (B) を用いたイヌ血漿蛋白質に対するイムノブロットの代表的な結果
 Healthy: 健康対照、IPA: 特発性多発性関節炎、cRA: イヌの関節リウマチ、Non-Arthritis: 非関節炎の疾患対照、
 数字はそれぞれの症例を示す。矢印は、抗C3抗体と抗IgG抗体でともに反応したバンドを示す。一番左の数字は
 分子量を表す (分子量 $\times 10^{-3}$)。

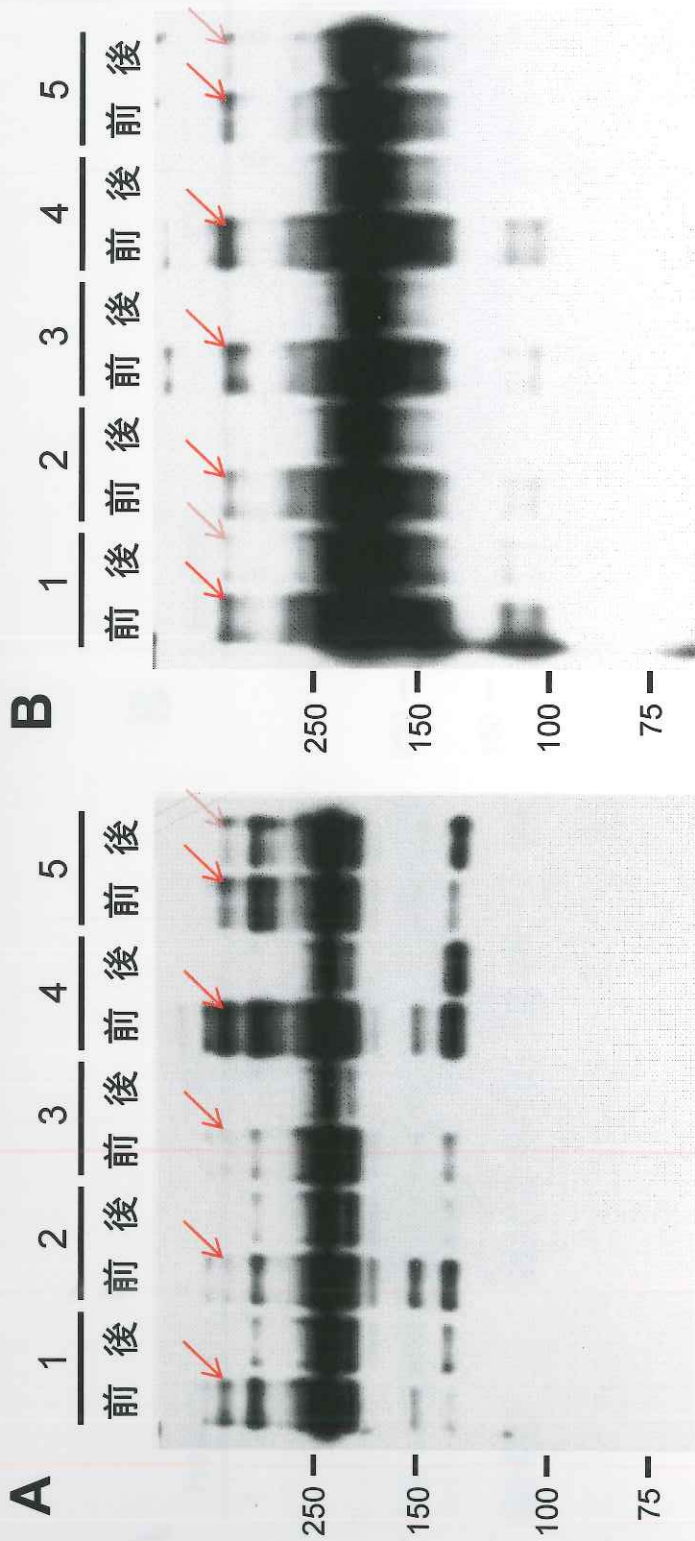


図2 抗C3抗体 (A) と抗IgG抗体 (B) を用いた治療前後のIPAのイヌの血漿蛋白質に対するイムノブロット上部の数字はIPAの症例を、一番左の数字は分子量を表す (分子量 $\times 10^{-3}$)。矢印は、抗C3抗体と抗IgG抗体とともに反応したバンドを示す。

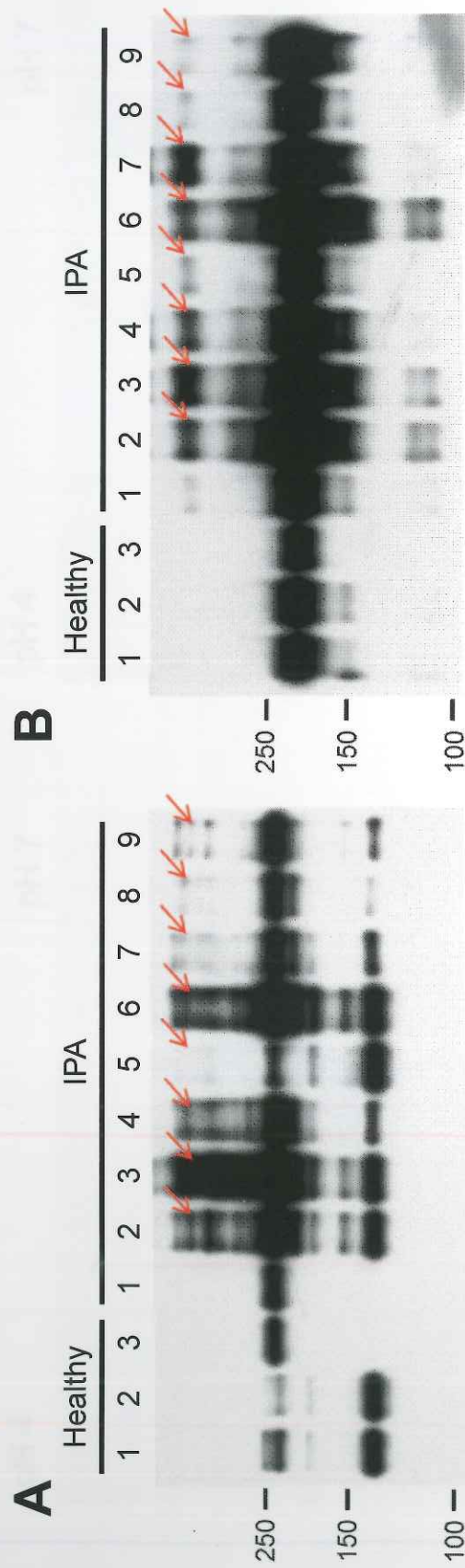


図3 抗C3抗体(A)と抗IgG抗体(B)を用いたイヌ滑液蛋白質に対するイムノブロットの代表的な結果
 Healthy: 健康対照、IPA: 特発性多発性関節炎、上部の数字はそれぞれの症例を、左の数字は分子量を表す
 (分子量 $\times 10^{-3}$)。矢印は、抗C3抗体と抗IgG抗体でもとに反応したバンドを示す。

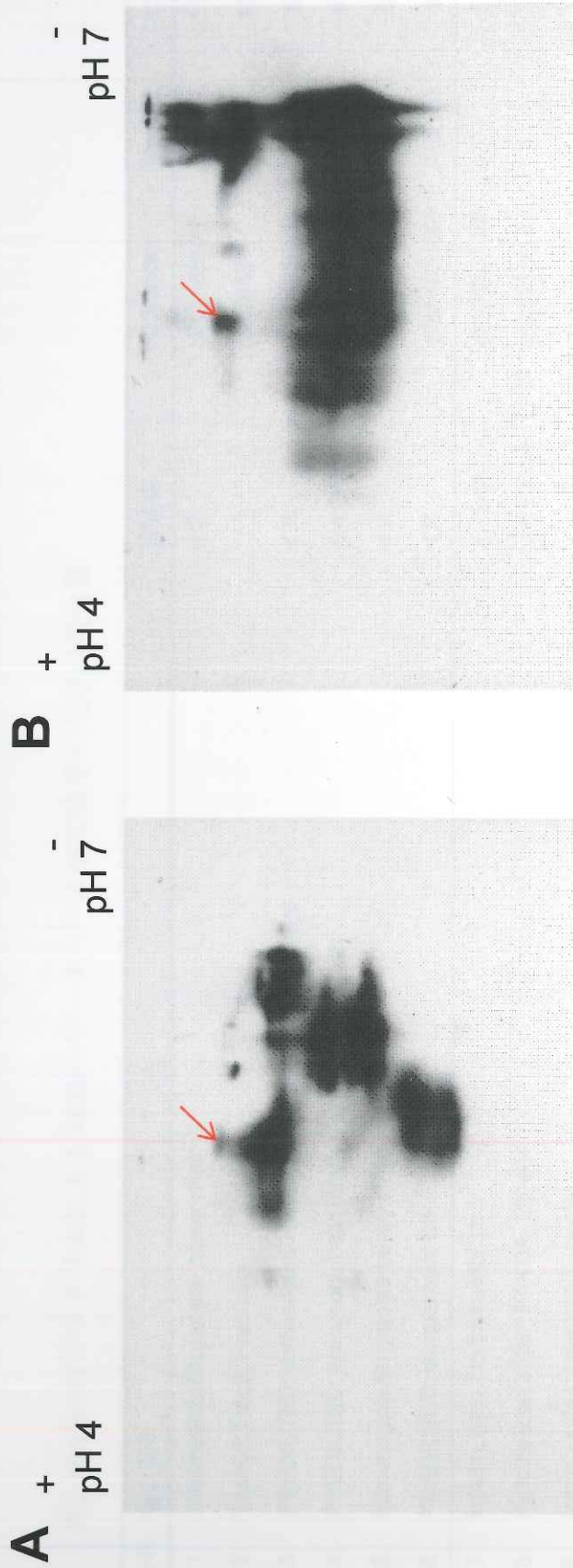


図4 抗C3抗体(A)と抗IgG抗体(B)を用いた二次元電気泳動後のIPAのイヌの血漿蛋白質に対する
 イムノブロット
 1次元目は等電点電気泳動、2次元目はSDS-PAGEを行った。矢印は、抗C3抗体と抗IgG抗体が共通して
 反応したスポットを表す。

表2 MASCOTプログラムによるNCBIのデータベース検索結果の上位12蛋白質

番号	蛋白質名	動物種	Gi Number	Mass値	スコア
1	immunoglobulin gamma heavy chain C	イヌ	gi 17066528	51809	111
2	Trypsin; Flags: Precursor		gi 136429	24394	103
3	PREDICTED: immunoglobulin lambda-like polypeptide 5-like	イヌ	gi 73995681	13206	82
4	PREDICTED: immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	セイウチ	gi 472362034	24378	81
5	immunoglobulin gamma heavy chain B	イヌ	gi 17066526	51926	80
6	PREDICTED: complement C3	イヌ	gi 545535669	180183	66
7	keratin, type II cytoskeletal 1b	イノシシ	gi 194037336		60
8	hypothetical protein PANDA_007564	ジャイアントパンダ	gi 281338025		52
9	laminin subunit gamma-2, partial	イノシシ	gi 350589114		39
10	PREDICTED: putative cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4-like protein	ホシバナモグラ	gi 507979128		36
11	PREDICTED: interleukin-1 receptor-associated kinase 4	アムールトラ	gi 591291227		36
12	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: FRAS1-related extracellular matrix protein 2	ウマ	gi 338715226		36

番号1-6の蛋白質は有意 ($P < 0.05$) とされた。

表1 IPA症例のシグナルメントとC1q結合アッセイおよびC3-IgG複合体の検出結果

症例番号	年齢	性別	犬種	C3-IgG複合体		血清
				血漿	滑液	C1q結合アッセイ ($\mu\text{g E ACG/ml}$)
1	5 y 3 m	SF	トイ・プードル	-	-	NE
2	4 y 3 m	SF	ウェルッシュ・コーギー・ペンブローク	-	-	NE
3	2 y 11 m	F	シーズー	-	NE	NE
4	9 y 10 m	M	フレンチ・ブルドッグ	-	+	6.6
5	1 y 4 m	CM	イタリアン・グレイハウンド	-	+	12.3
6	13 y 11 m	F	マルチーズ	-	+	17.3
7	11 y 10 m	CM	ミニチュア・ダックスフンド	-	+	NE
8	9 y 11 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	-	+	10.9
9	11 m	F	ポメラニアン	-	+	16.4
10	3 y 8 m	M	トイ・プードル	-	+	25.9
11	5 y 6 m	SF	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	33.6
12	12 y 10 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	NE
13	10 y 9 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	16.0
14	7 y 3 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	13.2
15	11 y 11 m	SF	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	10.9
16	6 y 3 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	3.0
17	9 y 9 m	SF	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	NE
18	6 y 0 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	NE
19	8 y 2 m	F	ミニチュア・シュナウザー	+	+	NE
20	11 y 5 m	SF	ミニチュア・シュナウザー	+	+	NE
21	6 m	F	シーズー	+	+	NE
22	5 y 7 m	F	トイ・プードル	+	+	NE
23	12 y 2 m	M	トイ・プードル	+	+	12.3
24	8 y 7 m	SF	ウェルッシュ・コーギー・ペンブローク	+	+	4.1
25	11 y 7 m	SF	雑種犬	+	+	NE
26	1 y 6 m	CM	イタリアン・グレイハウンド	+	NE	7.3
27	5 y 0 m	M	ミニチュア・ダックスフンド	+	NE	NE
28	11 y 7 m	SF	ミニチュア・ダックスフンド	+	NE	NE
29	12 y 9 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	+	NE	6.5
30	3 y 8 m	F	ポメラニアン	+	NE	NE
31	11 y 9 m	SF	シーズー	+	NE	NE
32	3 y 0 m	CM	トイ・プードル	+	NE	9.4

M: オス、CM: 去勢オス、F: メス、SF: 避妊メス、+: 陽性、-: 陰性、NE: 検査せず。

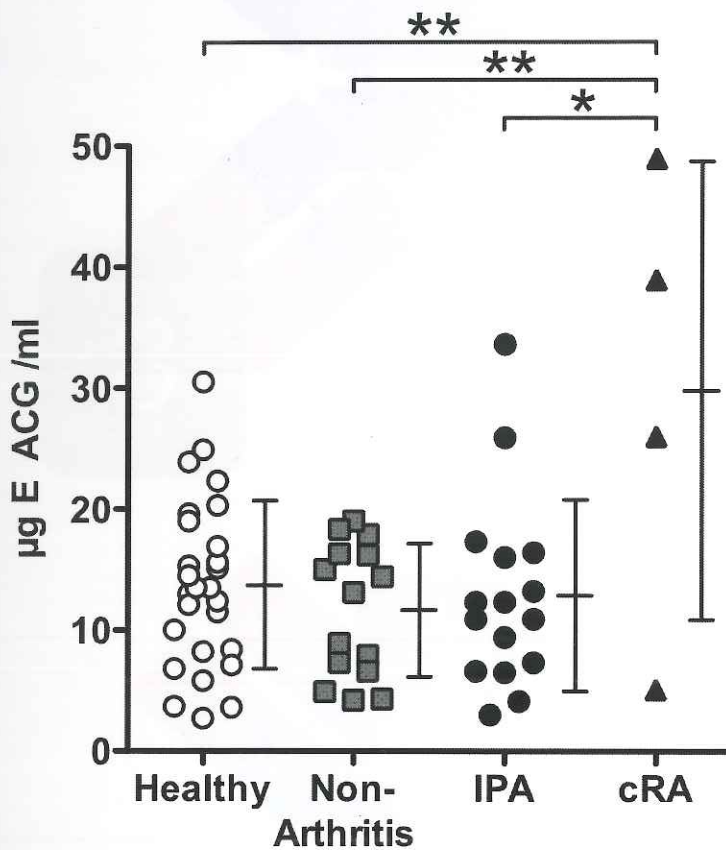


図5 C1q結合アッセイによるイヌの血清中免疫複合体の測定値
 Healthy: 健康対照、Non-Arthritis: 非関節炎の疾患対照、IPA: 特発性多発性関節炎、
 cRA: イヌの関節リウマチ。縦軸は凝集イヌグロブリン相当濃度を、バーは平均値
 ±標準偏差を表す。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, Tukey-Kramer多重比較検定。

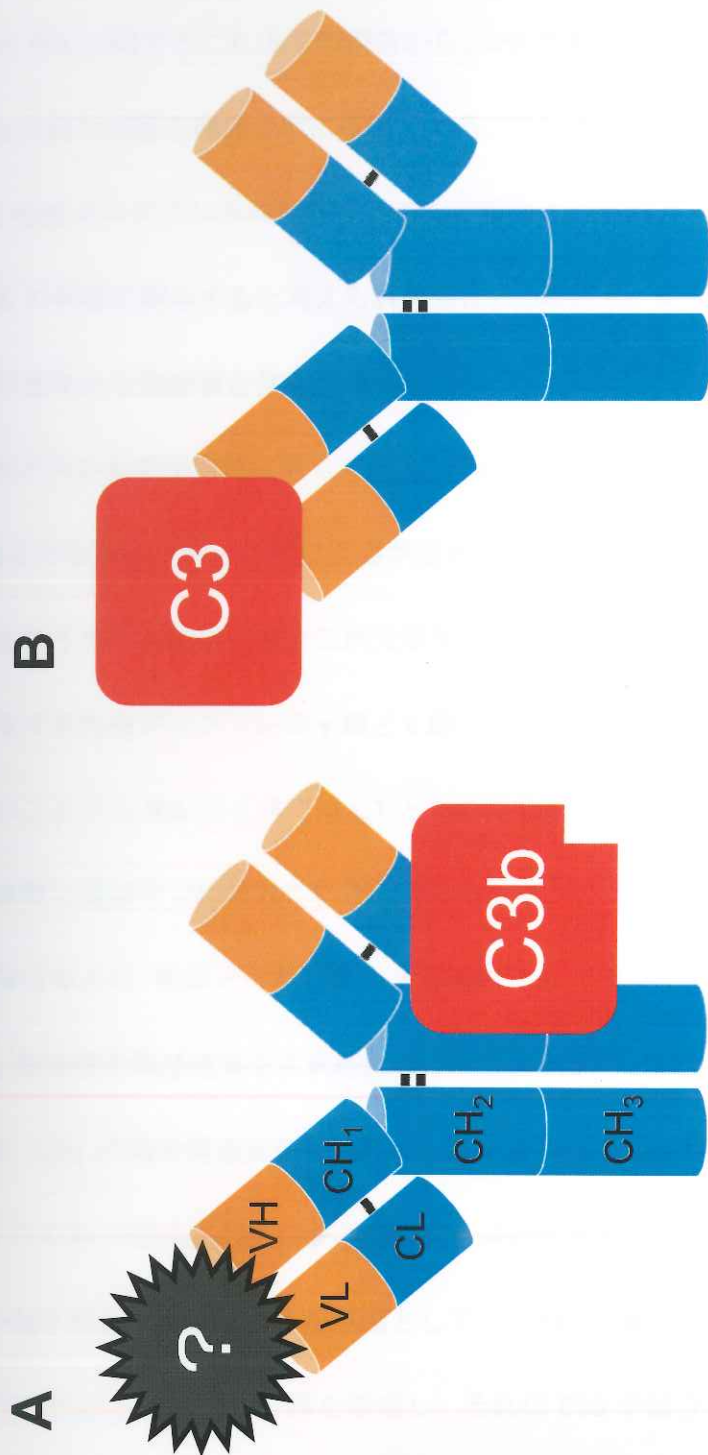


図6 IPAのイヌの血漿・滑液中C3-IgG複合体の予想模式図

A: 未知の抗原 (?) とIgGで構成される抗原抗体複合体にC3bが結合する。

B: C3またはその分解産物を抗原としてIgGが結合する。

C3bは、Fc領域 (VH+CH₁) またはFc領域 (CH₂+CH₃) に結合する。C1qは、CH₂領域に結合する。

【考察】

イヌの IPA に関するこれまでの報告から、IPA の臨床像が徐々に明らかになってきたが、その詳細な病態生理は未だに不明である。これまでに IPA のイヌの滑膜組織では補体 C3 と免疫グロブリンが共局在することが報告されており (Bennett, 1987e)、免疫複合体が IPA の病態に関与すると考えられてきた。このため、本章では IPA 症例の血漿および滑液に含まれる免疫複合体を探索した。

IPA のイヌの血漿蛋白質に対して抗 C3 抗体でイムノブロットを行ったところ、補体 C3 全長よりも高分子量の位置に反応が認められ、これは抗 IgG 抗体とも反応した。さらに IPA のイヌの血漿蛋白質を二次元電気泳動し、質量分析を実施したところ、IgG を構成するイヌ免疫グロブリンの γ 鎖と λ 鎖、そしてイヌ補体 C3 の予想配列が確認された。このことから IPA のイヌでは C3 と IgG が複合体を形成しており、この C3-IgG 複合体が血漿と滑液中で増加していると考えられた。

免疫複合体とは、抗原とそれに反応する免疫グロブリンで構成される高分子量蛋白質である。免疫複合体は補体系古典経路のイニシエーターとなり、補体 C1q が結合する。結合した C1q は高次構造変化を起こし、次々と補体系が活性化される。その結果、補体 C3 から C3b が産生され、C3b は免疫複合体のクリアランスに働く。本研究で確認された C3-IgG 複合体が生成される原因として、二つの可能性が考えられる。一つは、体内で未知の抗原と IgG が複合体を形成し、それに C3b が結合している可能性 (図 6A)、もう一つは、補体 C3 に対する自己抗体として IgG が存在する、という可能性が考えられる (図 6B)。本研究では、二次元電気泳動と質量分析により同定された蛋白質が、補

体 C3 と IgG 由来のものに限られた。このことは、後者の仮説を支持する。ヒトの全身性紅斑性狼瘡やループス腎炎の患者で抗 C3b 自己抗体の存在が報告されており、マクロファージによる死細胞の認識を阻害することが示唆されている (Kenyon *et al.*, 2011; Vasilev *et al.*, 2015)。IPA のイヌでも血漿や滑液中に抗 C3 自己抗体が存在する可能性が考えられ、イヌ補体 C3 の精製および C3 に対する IPA のイヌの血漿や滑液の反応性を調べる必要があると考えられた。

ヒトの関節リウマチ患者では、滑液中に多量の免疫複合体が含まれ (Hannestad, 1967; Winchester and Kunkel, 1968)、それらは血清中よりも多いことから、免疫複合体は関節局所で産生され、血中に流出すると考えられている (Winchester *et al.*, 1970)。本研究でも、IPA のイヌの C3-IgG 複合体は、血漿よりも滑液中でより高率に認められた。さらに、血漿中に抗 C3 抗体と抗 IgG 抗体の両方が反応するバンドを認めた IPA のイヌは、すべて滑液中でも同様のバンドが検出された。よって、IPA のイヌでは C3-IgG 複合体が関節局所で生成されて、血漿中に流出していることが示唆された。

C1q 結合アッセイは、補体成分 C1q の免疫複合体への結合能を利用して行われる血中免疫複合体の定量法である (Ahlstedt *et al.*, 1976)。本研究では、IPA のイヌで血中の C3-IgG 複合体が高率に検出されたにも関わらず、C1q 結合アッセイの測定値は健康なイヌと有意差はなかった。C1q は免疫グロブリンの CH₂ 領域に結合する (北村, 2010; 図 6)。したがって、IPA のイヌで C3 は IgG の CH₂ 領域を覆うように複合体を形成している可能性がある。過去の報告では、イヌの血漿を用いた C1q 結合アッセイにおいて、IPA や cRA を含む免疫介在性多発性関節炎のイヌの測定値は健康なイヌよりも有意に高か

った (Carter *et al.*, 1989)。本研究の C1q 結合アッセイでは、cRA のイヌの測定値は IPA のイヌよりも有意に高かった。したがって、IPA と cRA では病態が異なると考えられた。興味深いことに、cRA のイヌの血漿中では C3-IgG 複合体は検出されなかった。このことから、cRA のイヌでは、血中に豊富に存在する抗原抗体複合体に対して、補体 C3 が反応していない可能性が考えられた。

IPA のバイオマーカーは、いくつか知られている。特に血漿 CRP 濃度は、滑液中の白血球数と相関し (Foster *et al.*, 2014)、治療に伴う CRP 濃度の低下は予後とも関連する (Ohno *et al.*, 2006)。イヌの IPA の診断感度は 100%とされており (Ohno *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2014)、現在知られる最も優れた IPA のバイオマーカーである。ただし、血漿 CRP 濃度は関節炎以外の様々な疾患でも上昇するため (Nakamura *et al.*, 2008)、基礎疾患が存在する IPA では、関節炎のモニタリングに適さないこともある。本研究で検出される C3-IgG 複合体は、IPA の疾患活動性と相関しており、新たなバイオマーカーになりうると考えられた。

【小括】

本章では、イムノブロット法により血漿や滑液中の C3 と IgG を含む免疫複合体を検出する方法を開発した。この方法を用いることで、IPA のイヌの血漿と滑液中では補体 C3 もしくはその分解産物と IgG で構成される免疫複合体が増加していることが示された。増加した免疫複合体は Fc γ 受容体を介して免疫細胞に認識され、様々なサイトカインやケモカインの放出を惹起し、炎症を誘発すると考えられる。そこで、次章では滑液中のケモカインの濃度、および病態への寄与について検討した。

第2章

滑液中 CXCL8 と CCL2 の イヌの特発性多発性関節炎の病態への関与

【諸言】

IPA に罹患したイヌでは、滑膜組織への高度な白血球の浸潤が認められる (Bennett, 1987e)。また滑液中でも白血球数は増加しており、多くの場合、増加した白血球の主体は好中球である (Bennett, 1987e; Clements *et al.*, 2004)。これはイヌの IPA の最も特徴的な所見の一つだが、好中球集簇の機序や主要な走化因子はまだわかっていない。

Chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (CXCL8) は neutrophil chemotactic factor と呼ばれ、最もよく知られた好中球走化因子の一つである (Rampart *et al.*, 1989)。CXCL8 は、関節リウマチのヒトの滑液や滑膜組織、血清で増加している (Endo *et al.*, 1991; Koch *et al.*, 1992a; Hogan *et al.*, 1994)。さらに滑液中の CXCL8 濃度が、その患者の滑液の好中球数と有意に相関することから (Endo *et al.*, 1991)、CXCL8 はヒトの関節リウマチの病態に強く関わっていると考えられている。

Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) は monocyte chemoattractant protein-1 と呼ばれ、単球の活性化や遊走の促進に作用する (Gu *et al.*, 1999)。CCL2 も関節リウマチのヒトの滑液や血清中で増加しており (Akahoshi *et al.*, 1993; Stankovic *et al.*, 2008; Klimiuk *et al.*, 2005)、関節リウマチの疾患活動性と有意に相関する (Klimiuk *et al.*, 2005; Liou *et al.*, 2013)。ところで、CCL2 の受容体である (C-C motif) receptor 2 (CCR2) は、健常なヒトの単球とリンパ球に発現しており、生理的な状態の好中球には発現していない (Carr *et al.*, 1994; Charo *et al.*, 1994; Maus *et al.*, 2003; Dewald *et al.*, 2005)。しかし最近、マウスの抗原誘発関節炎モデルやヒトの初期の関節リウマチ患者の好中球は CCR2 を発現し、CCL2 に対して遊走することが報告された (Talbot *et al.*, 2015)。このことから、

イヌの IPA でも CCL2 が好中球の走化因子として作用している可能性を検討することは有意義だと考えられた。

イヌの IPA の病態と CXCL8 や CCL2 との関連性は、十分に明らかにされていない。過去に報告されている知見は、IPA と cRA のイヌの滑液中に浸潤した細胞が CXCL8 の mRNA を発現していることと (Hegemann *et al.*, 2005)、IPA のイヌの血清中 CXCL8 濃度は健康なイヌと差がないことである (Foster *et al.*, 2014)。イヌの IPA と CCL2 に関する報告はまだない。本研究の目的は、IPA のイヌで認める関節への好中球浸潤における CXCL8 や CCL2 の役割を評価し、好中球集簇の機序を明らかにすることである。

【材料と方法】

症例と対照

2012年から2015年に東京大学附属動物医療センターに来院したイヌのうち、IPAと診断された25頭のイヌを組み入れた。これらのイヌのシグナルメントと実施した試験・研究は表3に示す。診断前1週間以内にグルココルチコイド投与を受けているイヌは除外した。これらのIPAのイヌから得られた滑液では、すべて白血球の増加が認められ、24頭では好中球が、1頭(症例6)では単球が主体であった。対照群としてcRAのイヌ3頭(3.3-12.7歳齢(中央値4.3歳齢)、去勢オス1頭、メス2頭(うち避妊済み1頭)、シーズー、チワワ、ミニチュア・ダックスフンド(各1頭))と骨関節症(osteoarthritis: OA)のイヌ6頭(前十字靭帯断裂5頭、膝蓋骨内方脱臼1頭、1.2-13.5歳齢(中央値7.9歳齢)、去勢オス1頭、メス5頭(うち避妊済み4頭)、トイ・プードル(2頭)、ゴールデン・レトリバー、柴犬、シベリアン・ハスキー、ラブラドル・レトリバー(各1頭))および臨床的に健康なビーグル8頭を組み入れた。IPAの診断は第1章と同様に行った。OAの確定診断は、手術時に行った。

滑液

IPAのイヌでは診断時に、OAのイヌでは手術時に滑液を採取した。採取した滑液から塗抹標本を作成し、ライトギムザ染色で評価した。残りの滑液は、遠心分離後(4°C, 5000 × g, 10分)、上清を回収し、-30°Cで保存したものをを用いた。上清の総蛋白質濃度はウシ血清アルブミンを標準としたBradford法により決定した(Protein Assay; Bio-Rad

Laboratories)。また IPA のイヌの滑液上清 (症例 7, 14, 17, 18, 19, 25) を等量ずつ混合し、IPA のプール滑液を作成した。症例の滑液を二次使用することについては、十分な説明の上ですべての飼い主から書面による許諾を得た。

健康犬の多形核白血球の分離

臨床的に健康な 1 歳齢のメスまたは 7 歳齢のオスのビーグル犬の頸静脈より 21G 針で採血し、ヘパリン処理した採血管に加えた。その後、等量の Histopaque (specific gravity 1.077; Sigma-Aldrich) と共に、比重遠心分離した ($400 \times g$, 室温, 45 分)。次に上層に含まれる末梢単核細胞を廃棄し、その下層の多形核白血球を分離した。さらに ACK (Ammonium Chloride-Potassium) 溶血緩衝液で赤血球を除き、PBS で洗浄した。細胞数を改良 Neubauer 血球計算盤で計数し、 2.0×10^6 個/ml になるように抗生物質 (ペニシリン 10,000 U/ml, ストレプトマイシン 10 $\mu\text{g/ml}$) を添加した RPMI 1640 (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) で希釈して多形核白血球浮遊液を作製した。トリパンブルー染色により生細胞率が 98%以上であることを、またライトギムザ染色により多形核白血球が 96%以上含まれることを確認した。

健康、OA、IPA のイヌの滑液に対する走化性試験

市販の改良 Boyden チャンバーを用いた (CytoSelect; Cell Biolabs, San Diego, CA, U.S.A.)。走化因子としては凍結保存滑液を、遊走させる細胞には健康犬より分離した多形核白血球を用いた。手順は説明書に従った。まず健康 ($n=3$)、OA ($n=4$)、IPA ($n=3$; 症

例 1, 2, 3) それぞれのイヌの滑液を総蛋白質濃度が 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように RPMI 1640 で希釈し、ウェルの下層に 150 μl ずつ加えた。孔径 3 μm のマイクロチャンバーの上層に多形核白血球浮遊液を加え、その後にインキュベートした (37°C, 5% CO_2 , 2 時間)。チャンバー内の遊走していない細胞は吸引除去し、PBS で洗浄した。チャンバーの底面に接着した細胞はキットに付属した緩衝液で剥がし、細胞溶解液と DNA 染色蛍光試薬 (CyQuant GR fluorescent dye solution) を加えた。30 分間プレートシェーカーで振盪し (800 回/分)、励起波長 480 nm、蛍光波長 520 nm で定量した (SpectraMax Paradigm; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)。試験は 1 バッチの 2 重測定で行った。遊走した多形核白血球の細胞数は、各検体の平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity: MFI) で評価した。

CXCL8 と CCL2 の sandwich ELISA

市販のイヌ CXCL8 用ならびにイヌ CCL2 用 sandwich ELISA キットを用いた (Quantikine canine CXCL8/IL-8, Quantikine canine CCL2/MCP-1; R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.)。滑液は PBS で 4 倍希釈して測定した。これらのキットに適切な測定検体は血漿と血清が示されているが、滑液でも添加回収試験で高い回収率が得られることを予め確かめた (CXCL8 平均 88.7%, 範囲 79.7–98.1%; CCL2 平均 100.8%, 範囲 100.7–100.9%)。滑液中 CXCL8 濃度におけるアッセイ内変動係数は 5.2–7.1%、アッセイ間変動係数は 6.4%、測定下限値は 15.6 pg/ml であった。滑液中 CCL2 濃度におけるアッセイ内変動係数は 4.2% であった。すべての測定は 1 バッチの 2 重測定で行った。測定値が

上限値 (4000 pg/ml) を上回る滑液は PBS で 12 倍希釈して再測定した。

組換え CXCL8 および CCL2、IPA のイヌのプール滑液に対する走化性試験と遊走抑制

試験

市販の改良 Boyden チャンバーを用いた (Chemotaxicell; Kurabo, Osaka, Japan)。走化因子として組換えイヌ CXCL8、組換えイヌ CCL2 (ともに R&D Systems)、または IPA のイヌのプール滑液を使用した。遊走させる細胞は前述の通り調整した健康犬の多形核白血球を用いた。CXCL8 の受容体である CXCR1/2 を非競合的に阻害する repertaxin は MedChemexpress (Princeton, NJ, U.S.A.) より、CCR2 のアンタゴニストである MK-0812 は AdooQ BioScience (Irvine, CA, U.S.A.) より購入した。これらの阻害薬または溶媒 (1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO)) で多形核白血球を前処置し (37°C, 15 分)、孔径 3 μm のマイクロチャンバーの上層に加えた。下層には組換えイヌ CXCL8、組換えイヌ CCL2、もしくは RPMI 1640 で希釈した IPA のイヌのプール滑液 (1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を加え、インキュベートした (37°C, 5% CO_2 , 2 時間)。チャンバー内の遊走していない細胞を吸引除去し、PBS で洗浄した。チャンバーの底面に接着した細胞をメタノールで 5 分間固定し、ライトギムザ染色した。400 倍の倍率で鏡検し、1 ウェルにつき任意の 5 視野における細胞数を計測し、1 視野当たりの平均値をもって評価した。すべての測定は 1 バッチの 3 重測定で行った。

滑液中・血液中の白血球の CCR2 に対する免疫細胞化学

健康なイヌ ($n=3$) の血液ならびに IPA のイヌ ($n=4$) の血液と滑液を使用した。これらは遠心分離後に ($5000 \times g$, 10 分)、上清を吸引除去し、沈渣を PBS で希釈した。次に、集細胞遠心装置 (Cytospin 4; Thermo Scientific) で遠心し ($800 \times g$, 10 分)、APS コートしたスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に貼り付けた。スライドガラスは風乾し、メタノールで固定した後 (室温, 10 分)、 -80°C で保存した。

スライドガラスは室温に戻し、5% 正常ヤギ血清 (Wako Pure Chemical) と 0.1% Triton X-100 を添加した PBS で室温、45 分間ブロッキングした。続いてウサギ抗ヒト CCR2 抗体 (AVIVA Systems Biology, San Diego, CA, U.S.A.) を 1% ウシ血清アルブミン、1% 正常ヤギ血清、0.1% Triton X-100 を含む PBS (希釈緩衝液) で $3 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、 4°C で一晩反応させた。陰性対照として、抗 CCR2 抗体の代わりに正常ウサギ血清 (Wako Pure Chemical) を希釈緩衝液で $3 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、反応させた。0.1% ウシ血清アルブミンを加えた PBS で洗浄後、FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) を希釈緩衝液で希釈し (1:100)、室温で 45 分間反応させた。PBS で洗浄し、風乾させた後、DAPI 入り Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) で封入した。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察し、ZEN 2012 (Carl Zeiss) で記録した。

イヌの滑液中の総白血球と末梢血由来総白血球

IPA のイヌ ($n=3$) から採取した滑液を遠心分離後に上清を除去し、沈渣の総白血球を

得た。また IPA のイヌ ($n=4$) と健康なイヌ ($n=6$) から 1 ml 採血し、EDTA 処理した遠心管に分取した。これらを ACK 溶血緩衝液で処理し、末梢血由来の総白血球を得た。

健康なイヌの多形核白血球と単球の分離

臨床的に健康なビーグル犬 6 頭の頸静脈から 22G 針を用いて採血し、ヘパリン化処理した遠心管に分取した。得られた血液は等量の Histopaque (specific gravity 1.077; Sigma-Aldrich) と共に比重遠心分離した ($400 \times g$, 室温, 45 分)。次に上層の末梢血単核細胞と下層の多形核白血球を別の遠心管に回収し、それぞれを PBS で洗浄した。末梢血単核細胞は培養液 (20% ウシ胎児血清 (JRH Biosciences, Lenexa, KS, U.S.A.) を含む RPMI 1640) で希釈し、細胞培養用シャーレ (MS-10350; Sumitomo Bakelite) で 37°C 、2 時間培養した。浮遊している細胞を除去後、シャーレを PBS で 3 回洗浄し、接着している細胞を単球として回収した (Bennett and Breit, 1994)。

Quantitative Real-Time PCR (qPCR) による mRNA 発現量の比較

前述の通り調整した IPA のイヌの滑液中の総白血球と末梢血由来総白血球、健康犬の末梢血由来白血球ならびに単球と多形核白血球から RNeasyMini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて総 RNA を抽出した。抽出した総 RNA の逆転写反応を ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて行い、cDNA を作製した。作製した cDNA をテンプレートとして、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて、qPCR を行った。すなわち、調整したマスターミックスに cDNA および表 4 のプライマーを最終濃度 700 nM

になるように加え、StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、PCR 条件を 50°C 2 分、95°C 10 分、(95°C 15 秒、60°C 1 分) ×40 サイクルに設定して qPCR を行った。PCR 産物が単一であることは融解曲線と 2% アガロースゲル電気泳動により確認した。すべての測定は 1 バッチの 2 重測定で行った。相対的定量解析は各遺伝子の発現量を *GAPDH* の発現量で除して標準化したものを測定値とし、実験結果は 1 頭の健康なイヌの多形核白血球での mRNA 発現量を 1 として表した。

【統計】

統計解析には Prism 5 (GraphPad Software) と Statcel 3 (OMS publishing, Saitama, Japan) を用いた。滑液に対する走化性試験、総白血球での *CCR2* および *CXCR2* の mRNA 発現は一元配置分散分析法を用い、その後 Turkey-Kramer 法により多重比較検定を行った。滑液中の *CXCL8* および *CCL2* 濃度の結果は Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Dunn's post test により多重比較検定を行った。滑液中の *CXCL8* 濃度と *CCL2* 濃度の相関は、Spearman の相関係数で表した。イヌの単球と多形核白血球での *CCR2* および *CXCR2* の mRNA 発現は Student's *t*-test で比較した。組換え *CXCL8* と組換え *CCL2* に対する走化性試験、repertaxin と MK-0812 を用いた IPA のイヌのプール滑液に対する遊走抑制試験では、Dunnett 法により多重比較検定を行った。Repertaxin と MK-0812 を用いた組換え *CXCL8* と組換え *CCL2* に対する遊走抑制試験では、Williams 法により多重比較検定を行った。得られた検定結果は $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

滑液に対する走化性試験

イヌの滑液に対する健康なイヌの末梢血由来の多形核白血球を用いた走化性試験の結果を図7に示した。OAのイヌの滑液へ遊走する多形核白血球数は、健康なイヌの滑液へのそれと比較して多い傾向を示した。IPAのイヌの滑液では、健康なイヌやOAのイヌよりも有意に多形核白血球の遊走を促進した (それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

滑液中の CXCL8 濃度と CCL2 濃度

各疾患群と対照群の滑液中 CXCL8 濃度を図 8A に示した。健康なイヌの滑液中の CXCL8 はすべて測定限界未満 (< 15.6 pg/ml) であった。OAのイヌの滑液中 CXCL8 濃度は健康犬のそれと比較して上昇傾向にあった (339 ± 404 pg/ml; 平均 \pm 標準偏差)。IPAのイヌの滑液中 CXCL8 濃度 (3668 ± 3879 pg/ml) は健康なイヌよりも有意に高値であり、OAのイヌよりも高い傾向が見られた。IPAのイヌのうち1頭では(症例6)滑液中の白血球の主体が単球であり、このイヌの滑液中 CXCL8 濃度は測定限界未満であった。cRAのイヌの滑液中 CXCL8 濃度は 697 ± 1035 pg/ml であり、他群との間に有意差はなかった。

滑液中 CCL2 濃度は図 8B に示した。滑液中 CCL2 濃度は健康なイヌで 235 ± 45 pg/ml、OAのイヌで 923 ± 477 pg/ml であった。IPAのイヌの滑液中 CCL2 濃度 (3316 ± 2452 pg/ml) は健康なイヌよりも有意に高値であり、OAのイヌよりも高い傾向にあった。IPAの症例6の滑液中 CCL2 濃度は 840 pg/ml であった。また cRAのイヌの滑液中 CCL2 濃

度 (4284 ± 3675 pg/ml) は健康なイヌより有意に高かった。さらに本研究に組み入れたイヌの滑液中 CXCL8 濃度と CCL2 濃度には有意な正の相関が認められた ($rs=0.866$, $P < 0.001$, 図 8C)。

イヌの白血球における CCR2 の発現

IPA のイヌの滑液と血液、健康なイヌの血液に対して、抗 CCR2 抗体を用いた免疫細胞化学を行った (図 9)。抗 CCR2 抗体は IPA のイヌの滑液中の白血球に反応し、特に多形核白血球で強い反応が認められた。一方、単核球では抗 CCR2 抗体の反応は微弱であった (矢頭)。IPA のイヌの血液では、多形核白血球が抗 CCR2 抗体に強く反応したが、単核球では反応は無かった。健康なイヌの血液でも、多形核白血球が抗 CCR2 抗体に強く反応したが、単核球は反応しなかった。CCR2 の mRNA 発現を qPCR で測定したところ、IPA のイヌの滑液中の総白血球および末梢血由来の総白血球では、健康なイヌの末梢血由来総白血球よりも有意に CCR2 の発現が低下していた (ともに $P < 0.05$; 図 10)。

健康なイヌの多形核白血球と単球におけるケモカイン受容体の mRNA 発現

CXCL8 の受容体である CXCR2 の mRNA の発現量は、多形核白血球と単球との間で有意差がなかった (図 11A)。一方、CCL2 の受容体である CCR2 の mRNA の発現量は、多形核白血球で単球よりも有意に高かった (図 11B)。

CXCL8 と CCL2 に対する走化性試験と遊走抑制試験

健康なイヌから分離した多形核白血球を上層に、組換えイヌ CXCL8 または組換えイヌ CCL2 を下層に加えてインキュベートし、多形核白血球の遊走を調べた (図 12)。健康なイヌの多形核白血球は、10 nM の組換え CXCL8 ならびに 0.1 nM の組換え CCL2 に対して最も顕著に遊走することがわかった。次に CXCL8 の受容体の CXCR1/2 の非競合阻害薬である repertaxin または CCR2 のアンタゴニストである MK-0812 で多形核白血球を前処置し、それぞれ組換え CXCL8 または組換え CCL2 に対する走化性を調べた。その結果、repertaxin は組換え CXCL8 に対する遊走を、そして MK-0812 は組換え CCL2 に対する遊走をそれぞれ濃度依存的に抑制した (図 13)。

IPA のイヌの滑液に対する遊走の repertaxin と MK-0812 による抑制試験

IPA イヌのプール滑液に対する遊走を repertaxin (1 μ M) や MK-0812 (100 μ M) で抑制できるかを調べた (図 14)。IPA のイヌの滑液に対する遊走は、repertaxin 単独と MK-0812 単独では有意な抑制は認められなかった。しかし、repertaxin と MK-0812 を併用すると、IPA のイヌの滑液に対する遊走は有意に抑制された ($P < 0.05$)。

表3 組み入れたIPA症例のシグナルメントと実施した試験・研究

症例番号	シグナルメント			実施した試験・研究				
	年齢	性別	犬種	滑液 ケモタキシス アッセイ	滑液 CXCL8濃度 (ELISA)	滑液 CCL2濃度 (ELISA)	血液・滑液 CCL2発現 (ICC)	血液・滑液 CCL2・CXCR2発現 (qPCR)
1	5 y 7 m	SF	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	+	-	-
2	14 y 7 m	F	マルチーズ	+	+	+	-	-
3	13 y 11 m	CM	ミニチュア・ダックスフンド	+	+	+	-	-
4	10 y 11 m	M	ミニチュア・シュナウザー	-	+	+	-	-
5	11 y 7 m	SF	ミニチュア・ダックスフンド	-	+	+	-	-
6	3 y 0 m	CM	イタリアン・グレイハウンド	-	+	+	-	-
7	11 y 10 m	SF	雑種犬	+	+	+	-	-
8	10 y 0 m	SF	ミニチュア・ダックスフンド	-	+	+	-	-
9	9 y 2 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	-	+	+	-	-
10	1 y 5 m	CM	イタリアン・グレイハウンド	-	+	+	-	-
11	12 y 10 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	-	+	+	-	-
12	12 y 2 m	M	トイ・プードル	-	+	-	-	-
13	3 y 9 m	M	トイ・プードル	-	+	-	-	-
14	0 y 6 m	F	シーズー	+	-	+	+	-
15	6 y 0 m	F	ミニチュア・ダックスフンド	-	-	+	+	-
16	11 y 7 m	SF	ミニチュア・シュナウザー	-	-	+	+	-
17	11 y 5 m	M	トイ・プードル	+	-	+	+	-
18	13 y 0 m	CM	ミニチュア・ダックスフンド	+	-	+	-	-
19	8 y 2 m	F	ミニチュア・シュナウザー	+	-	+	-	-
20	9 y 10 m	M	フレンチ・ブルドッグ	-	-	+	-	-
21	9 y 7 m	CM	ミニチュア・ダックスフンド	-	-	+	-	-
22	9 y 2 m	CM	雑種犬	-	-	-	-	+
23	11 y 3 m	CM	ミニチュア・ダックスフンド	-	-	-	-	+
24	12 y 6 m	CM	トイ・プードル	-	-	-	-	+
25	13 y 11 m	M	ミニチュア・ダックスフンド	+	-	-	-	+

M: オス、CM: 去勢オス、F: メス、SF: 避妊メスを表す。

表4 qPCRに使用したプライマー

Name	Accession No.	Direction	Nucleotide Sequence (5'-3')	Product Size	Reference
GAPDH	NM_001003142	Forward	GCTGCCAAATATGACGACATCA	75 bp	Reich <i>et al.</i> , 2012
		Reverse	GTAGCCCAGGATGCCCTTTGAG		
CCR2	XM_005632631	Forward	ACATGCTGTCCACATCGCA	101 bp	Park <i>et al.</i> , 2013
		Reverse	GGCGCGCTGTAATCATAGTC		
CXCR2	XM_005640417.1	Forward	TCATCTTTGCTGTCGTGCTC	165 bp	Chiang <i>et al.</i> , 2012
		Reverse	TGTGGAAGAAGCCCCAGAATC		

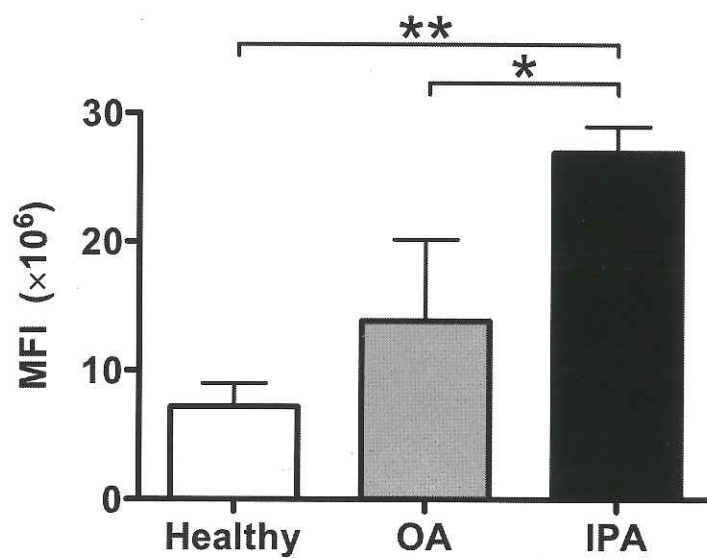


図7 イヌの滑液に対する健康なイヌの末梢血由来多形核白血球の走化性試験
 Healthy: 健康対照 ($n=3$)、OA: 骨関節症 ($n=4$)、IPA: 特発性多発性関節炎 ($n=3$)。
 縦軸は、遊走した細胞数を2重測定の平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity: MFI)
 で表す。カラムとバーは平均値と標準偏差を表す。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, Tukey-
 Kramer多重比較検定。

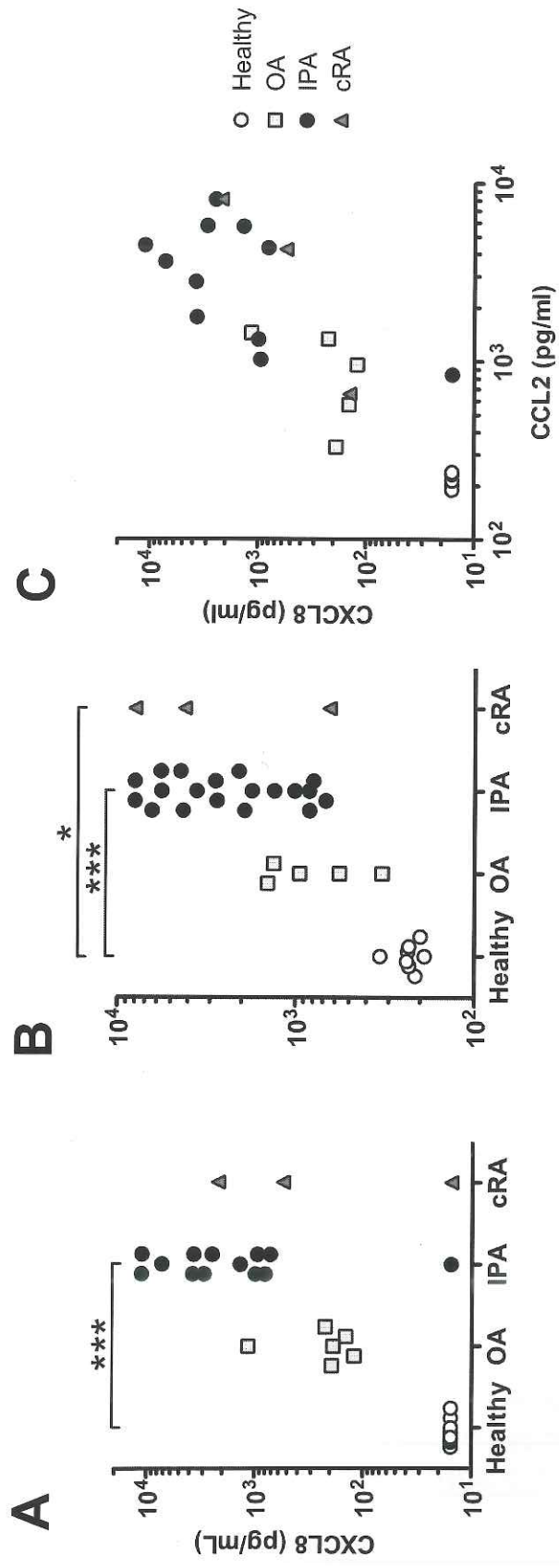


図8 滑液中のCXCL8濃度 (A) とCCL2濃度 (B) およびそれらの相関 (C)

Healthy: 健康対照、OA: 骨関節症、IPA: 特発性多発性関節炎、cRA: イヌの関節リウマチ。

*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, Dunn's post test。

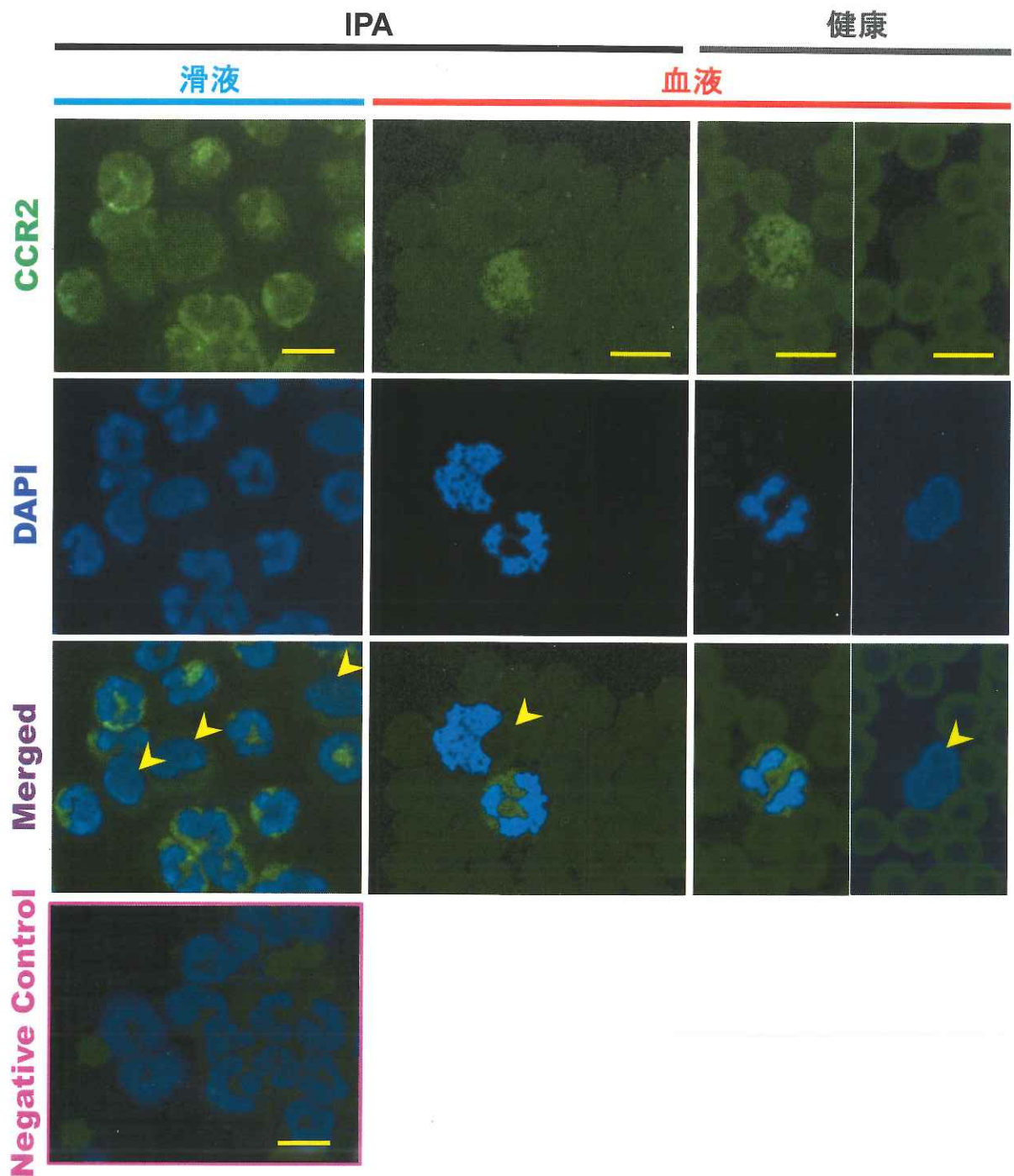


図9 イヌの白血球に対する抗CCR2抗体を用いた免疫細胞化学
 IPAのイヌの滑液と血液、健康なイヌの血液に対して、一次抗体としてウサギ抗ヒト
 CCR2ポリクローナル抗体、二次抗体としてFITC標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を用いた。
 核染色にはDAPIを用い、陰性対照では、一次抗体の代わりに正常ウサギ血清を用いた。
 矢頭は単核球を表す。スケールバーは10 μm 。

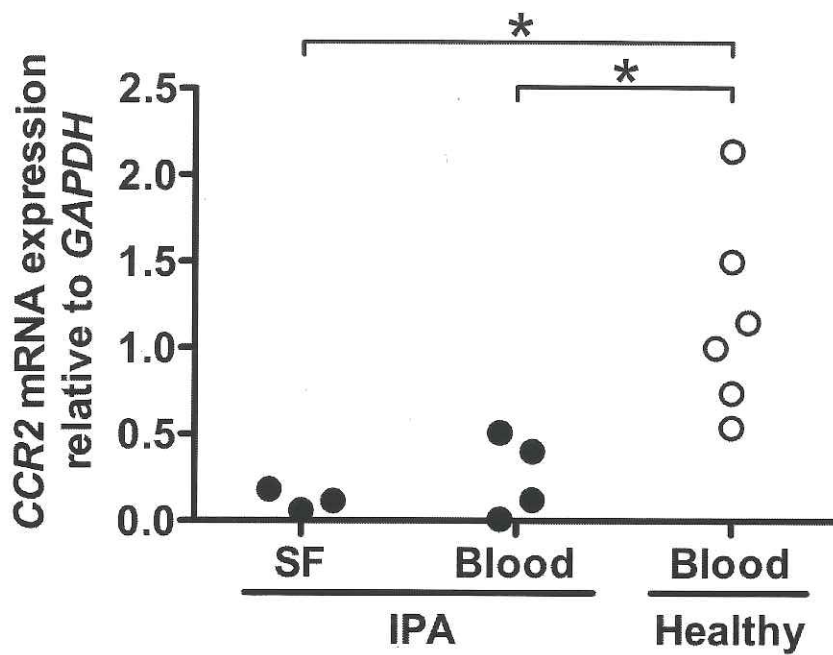


図10 IPAのイヌの滑液中の総白血球 (SF) と末梢血由来の総白血球 (Blood) および健康なイヌの末梢血由来の総白血球における *CCR2* の mRNA 発現
 qPCRは表3のプライマーを用い、*CCR2* 遺伝子の発現量を *GAPDH* の発現量をもとに標準化し、1頭の健康なイヌの末梢血由来白血球の mRNA 発現量を1として表した。
 *: $P < 0.05$, Tukey-Kramer 多重比較検定。

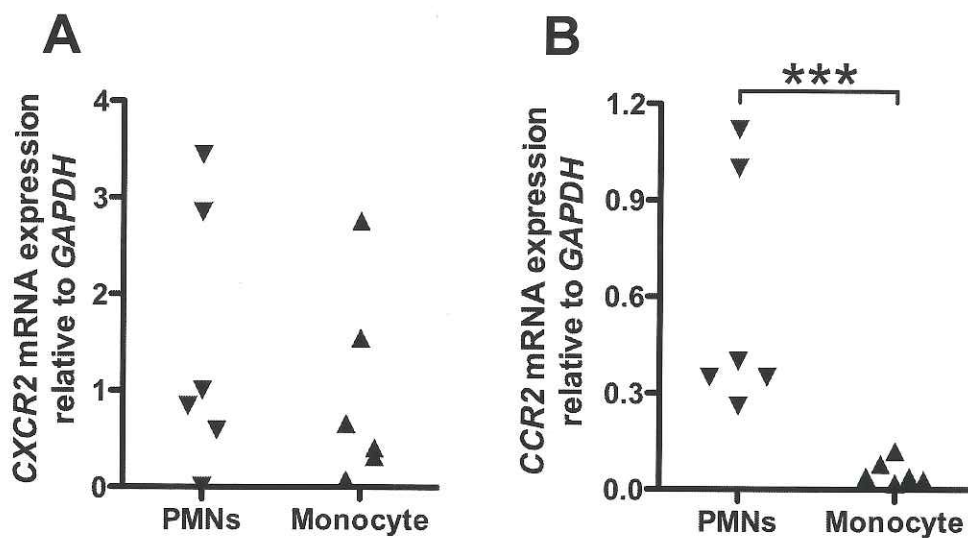
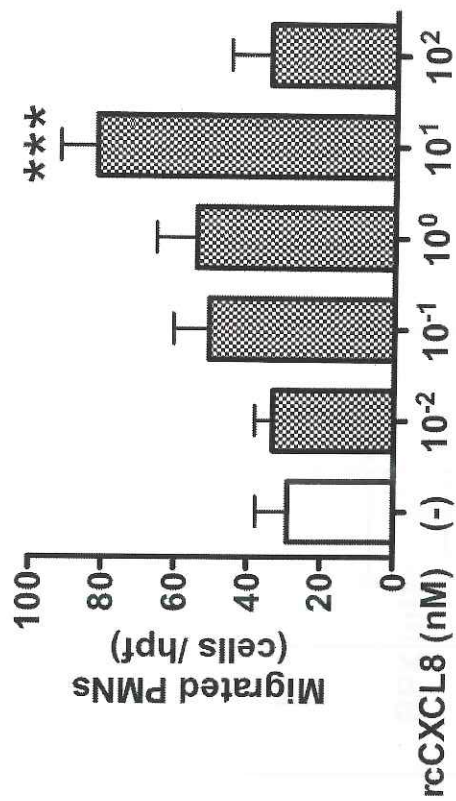


図11 健康なイヌの多形核白血球と単球のCXCR2 (A) およびCCR2 (B) のmRNA発現qPCRは、表3のプライマーを組み合わせを行い、各遺伝子の発現量はGAPDHの発現量をもとに標準化し、1頭の多形核白血球におけるmRNA発現量を1として表した。PMNs: 多形核白血球、Monocyte: 単球。***: $P < 0.001$, Student's *t*-test.

A



B

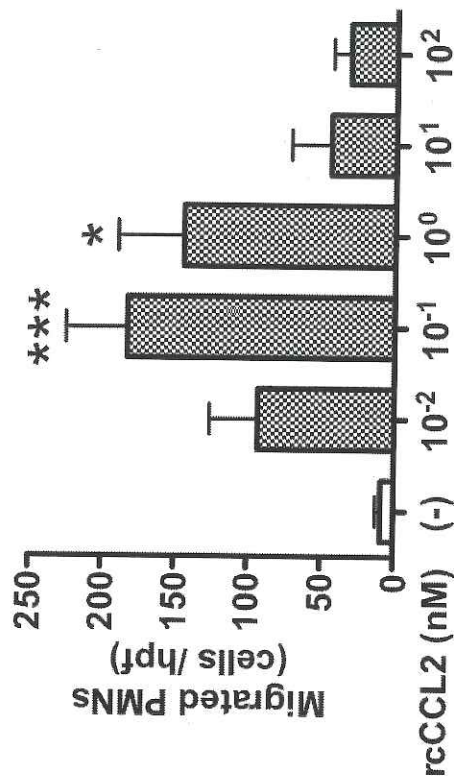
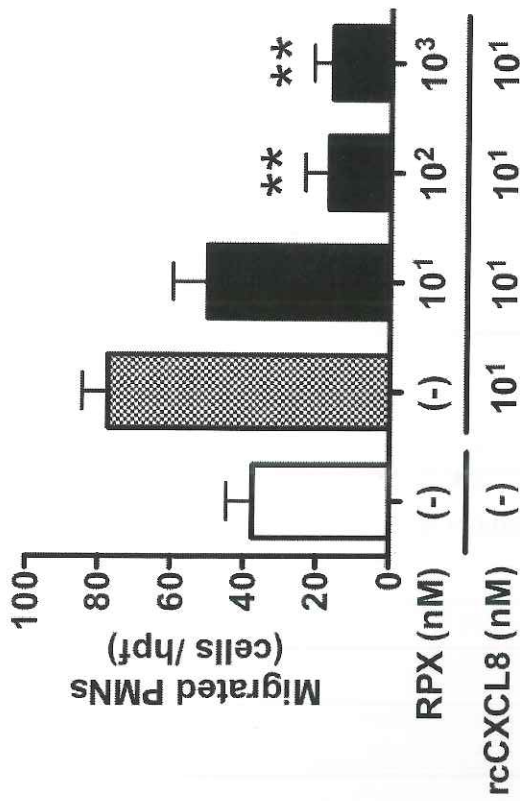


図12 組換えイヌCXCL8 (rcCXCL8; A) と組換えイヌCCL2 (rcCCL2; B) に対する多形核白血球の走化性試験
健康なイヌ由来の多形核白血球をマイクロチャンバーの上層に、それぞれの組換え蛋白質を下層に加えて
インキュベートした。遊走した細胞は400倍の倍率で鏡検し、1視野当たりの細胞数を計測した。カラムと
バーは平均値と標準誤差を表す。*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, Dunnett法による多重比較検定 (vs 溶媒のみ (白
抜きカラム))。

A



B

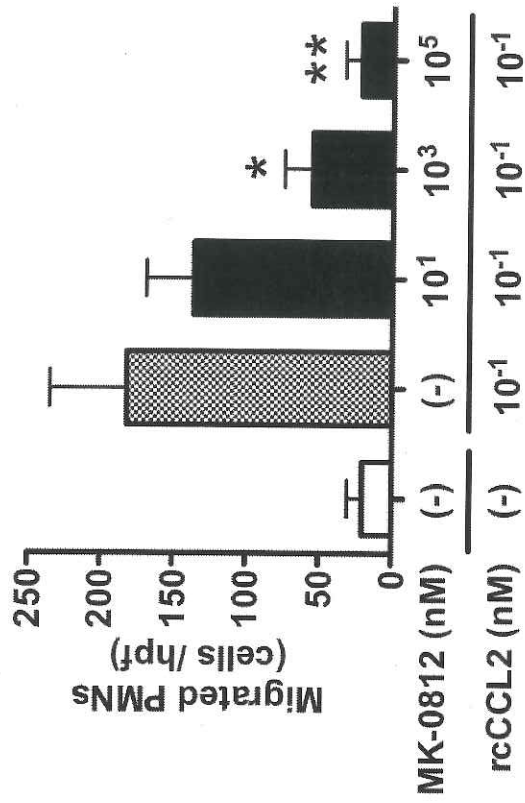


図13 Repertaxin (RPX; A) と MK-0812 (B) による遊走抑制試験
 健康なイヌ由来の多形核白血球をRPX、MK-0812、溶媒 (DMSO; (-)) で各々前処置した後、
 マイクロチャンバーの上層に、それぞれの組換え蛋白を下層に加えてインキュベートした。
 カラムとバーは平均値と標準誤差を表す。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, Williams法による多重比較
 検定 (vs 阻害薬なし (網掛けカラム))。

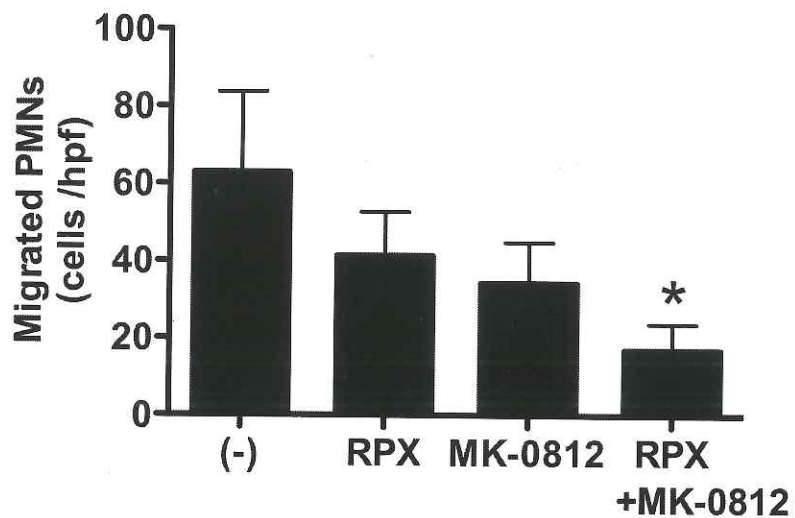


図14 Repertaxin (RPX) とMK-0812による滑液への遊走抑制試験
 健康なイヌ由来の多形核白血球をRPX (1 μ M) やMK-0812 (100 μ M) で前処置した後、
 マイクロチャンバーの上層に、IPAのイヌのプール滑液を下層に加えてインキュベート
 した。カラムとバーは平均値と標準誤差を表す。*: $P < 0.05$, Dunnett法による多重比較
 検定 (vs 阻害薬なし)。

【考察】

ヒトの関節疾患では様々な走化因子が滑液中で増加し、好中球の関節への集簇に寄与する。例えば、関節リウマチではCXCL8 (Perotti *et al.*, 1999)、補体C3a (Moxley *et al.*, 1985)、補体C5a (Okamoto *et al.*, 1986)、ロイコトリエンB4 (Klickstein *et al.*, 1980) などの好中球走化因子が滑液中で増加し、好中球を関節に集簇させる。本章では、IPAの特徴的な所見の一つである滑液中の好中球数の増加について、ケモカインおよびその受容体を検討した。

ヒトの関節リウマチでは、滑液が多形核白血球 (Okamoto *et al.*, 1986; Bignold, 1992) や単核球 (Ellingsen *et al.*, 2000)、肥満細胞 (Olsson *et al.*, 2001) といった様々な細胞の遊走を促す。本研究では、IPAのイヌの滑液は健康なイヌやOAのイヌよりも強く多形核白血球の遊走を促進することが確かめられた。このことから、IPAのイヌの滑液中では多形核白血球に対する何らかの走化因子が増加していることが示唆された。

CXCL8はその受容体であるCXCR1/2に結合し、好中球を遊走させることや (Rampart *et al.*, 1989)、血管新生を促すことで (Koch *et al.*, 1992b) ヒトの関節リウマチの病態と深く関わっている。イヌの関節疾患ではライム病 (Straubinger *et al.*, 1997) や骨関節症 (de Bruin *et al.*, 2005) で滑液中の細胞や滑膜組織を用いたCXCL8のmRNA発現が調べられている。またIPAとcRAを含む免疫介在性多発性関節炎のイヌの滑液中の細胞でもCXCL8のmRNA発現が確認されている (Hegemann *et al.*, 2005)。本研究ではIPAのイヌで滑液中のCXCL8濃度が上昇していることを確かめた。血中のCXCL8濃度は、IPAのイヌと健康なイヌで差はないことが報告されている (Foster *et al.*, 2014)。このことから、

CXCL8 は関節局所で機能し、イヌの IPA の関節での病態、つまり好中球集簇などの炎症反応に関与すると考えられた。

ヒトやげっ歯類において、CCL2 は単球やマクロファージに対する走化因子である (Loetscher *et al.*, 1994)。ヒトの関節リウマチ (Akahoshi *et al.*, 1993; Stankovic *et al.*, 2008) や若年性特発性関節炎 (de Jager *et al.*, 2006) では、滑液中の CCL2 は増加し、単球やマクロファージの関節への集簇に関与すると考えられている。本研究では、IPA のイヌの滑液中で CCL2 が増加していることを確かめた。本研究に組み入れたほとんどの IPA のイヌの滑液中では、単球ではなく、好中球が主体となり白血球数が増加していた。このことから、CCL2 は単球走化因子というよりも、好中球走化因子として作用している可能性が考えられた。

CCL2 の受容体である CCR2 は、生理的な状態のヒトやマウスでは単球とリンパ球に発現しており、好中球には発現していない (Carr *et al.*, 1994; Charo *et al.*, 1994; Maus *et al.*, 2003; Dewald *et al.*, 2005)。しかし、重度敗血症のマウスでは好中球が機能的な *de novo* CCR2 を発現し、多臓器不全への進行に関わる (Speyer *et al.*, 2004; Rios-Santos *et al.*, 2007; Souto *et al.*, 2011)。マウスの抗原誘発関節炎モデルやヒトの関節リウマチでも、病態に応じて好中球は CCR2 を発現し、CCL2 に対して走化性を示す (Talbot *et al.*, 2015)。このように、ヒトやマウスでは炎症反応が起きたときに好中球が機能的な CCR2 を発現するのに対し、本研究では健康なイヌの多形核白血球が、単球よりも強く CCR2 を発現していることを確かめた。そして健康なイヌの多形核白血球は、組換え CCL2 に対する走化性を示した。したがって、イヌの CCL2 は単球走化因子というよりも、多形核白血

球走化因子として機能していることが示唆された。文献的には、生理的な状態で好中球に CCR2 を発現する動物種は報告されておらず、これはイヌに特異的な性質だと考えられた。

滑液中の好中球は宿主防衛に重要な機能を担うが、直接的または間接的に関節炎での組織障害にはたらくことがある (Snyderman, 1983; Tiku *et al.*, 1986; Dubravec *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1993)。そのため、滑液中に増加する好中球は有力な治療標的だと考えられる。Repertaxin は CXCR1/2 を不活性な状態で固定することで、細胞シグナル伝達を阻害することができる (Bertini *et al.*, 2004)。そして *in vivo* でもマウスのあらゆる CXCL8 関連疾患、例えば関節炎や急性肺障害、頭蓋内出血を改善する (Coelho *et al.*, 2008; Zarbock *et al.*, 2008; Matsushita *et al.*, 2014)。MK-0812 は CCR2 のアンタゴニストであり (Merck, 2005)、アカゲザルでは CCL2 で誘導される皮膚への単球の集簇を抑制する (Wisniewski *et al.*, 2010)。ヒトでは、関節リウマチで第 II 相の治験が行われ (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00542022)、科学的な論文は発表されていないが、有用性は認められなかったようである (Xia and Sui, 2009; Proudfoot *et al.*, 2010)。本研究では、これらの阻害薬を用いて、IPA のイヌの滑液に対する多形核白血球の遊走を阻害できるか *in vitro* で確かめた。まず repertaxin は組換え CXCL8 に対する、MK-0812 は組換え CCL2 に対する遊走を阻害した。従って、これらの阻害薬はイヌの多形核白血球においても有効と考えられた。そして、repertaxin と MK-0812 の併用は、多形核白血球が IPA のイヌの滑液に対して遊走することを有意に抑制した。このことから、IPA のイヌで認められる好中球の関節への集簇に、CXCL8 と CCL2 がともに寄与していると考えられた。そして、これ

らの阻害薬は IPA のイヌでの新規治療薬の候補となることが示された。

IPA のイヌの滑液中で増加する白血球のほとんどは好中球だが (Bennett, 1987e; Clements *et al.*, 2004)、単核球が増加することもある (Clements *et al.*, 2004)。本研究でも、単球が滑液中で増加しており、滑液中にほとんど好中球を認めなかった 1 頭の IPA のイヌが含まれた (症例 6)。このイヌの滑液中の CXCL8 と CCL2 の濃度を測定したところ、CXCL8 は測定限界未満であり、CCL2 も IPA のイヌの中で最も低かった。このことは、イヌでは CXCL8 と CCL2 が、主に好中球の走化因子として機能していることを傍証すると考えられた。

滑膜細胞からの CXCL8 の産生は、多くの炎症性サイトカイン (tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin-1 β , -17 など) によって誘発される (Georganas *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2010)。同様に、滑膜細胞からの CCL2 の産生も、炎症性サイトカイン (TNF- α , interleukin-1 β , -18 など) によって促進される (Szekanecz *et al.*, 2010)。本研究では、滑液中 CXCL8 濃度と CCL2 濃度の間で正の相関が認められた。このことから、イヌの滑液中の CXCL8 と CCL2 は、炎症性サイトカインなどの共通した因子により制御されていると考えられた。

正常なヒトの末梢血の好中球は CXCR2 を発現しているが、CCR2 は発現していない (Patel *et al.*, 2001)。しかし関節リウマチのヒトの滑液中の好中球は、末梢血のそれと比較して、CXCR2 の蛋白および mRNA 発現が低下している (Brühl *et al.*, 2001; Auer *et al.*, 2007)。また単球上の CCR2 発現は、様々な前炎症性サイトカイン (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor,

CCL2 など) によって下方制御される (Tangirala *et al.*, 1997)。本研究では、免疫細胞化学において抗 CCR2 抗体が IPA のイヌの滑液や末梢血の多形核白血球に強く反応した。しかし、IPA のイヌの滑液や末梢血由来の総白血球の CCR2 の mRNA 発現は低下していた。この結果から、IPA のイヌの滑液中の白血球では、CCR2 が CCL2 など前炎症性サイトカインに反応して下方制御された可能性が考えられる。確かめるためには、フローサイトメトリー法を用いて、IPA のイヌでの細胞膜上の CCR2 発現を定量的に評価する必要があると考えられた。

【小括】

IPA のイヌの滑液は、健康なイヌ由来の多形核白血球の遊走を有意に促進することが確かめられた。そこで、ヒトの好中球走化因子である CXCL8 と単球走化因子である CCL2 について検討したところ、IPA のイヌの滑液中では CXCL8 だけでなく、CCL2 も増加していた。イヌでは、CCL2 の受容体である CCR2 は、主に多形核白血球に発現し、単球では発現していなかった。さらに健康なイヌの多形核白血球は組換え CCL2 に反応して、遊走した。これらのことから、ヒトの単球走化因子である CCL2 は、イヌの多形核白血球の走化因子として機能していることが示された。CXCL8 と CCL2 の IPA の病態における役割を検討するために、CXCR1/2 の阻害薬である repertaxin と CCR2 の阻害薬である MK-0812 を用いて遊走抑制試験を行った。その結果、repertaxin と MK-0812 の併用により多形核白血球の IPA のイヌの滑液に対する遊走は抑制された。以上より、IPA のイヌの滑液では、CXCL8 と CCL2 が共に好中球の関節への集簇に寄与していると考えられた。そして、repertaxin と MK-0812 は、IPA のイヌの新規治療薬となり得ることが示された。

第3章

イヌの特発性多発性関節炎における
グルココルチコイド療法に伴う滑液総蛋白質濃度の変化

【緒言】

治療前の IPA のイヌでは滑液中の白血球数の増加が認められ、これは IPA の診断基準の一つにもなっている。そして IPA のイヌをグルココルチコイドで治療すると、多くの場合、速やかに症状が改善し、滑液中の白血球数は減少する (Foster *et al.*, 2014)。そのため、試験的治療やその他の理由でグルココルチコイドを投与されているイヌでは、IPA の診断が難しいことがある。

血漿成分は滑膜間質の有窓性の血管内皮を通り、様々な細胞外基質をすり抜け、滑液中に流入する (Ropes and Bauer, 1953; Meriel *et al.*, 1956; Schur and Sandson, 1963)。それゆえ、滑液中の蛋白質のほとんどが血漿に由来する。健康なヒトやイヌでは、滑膜の機能により滑液中の蛋白質濃度は一定に保たれている (Kushner and Somerville, 1971; Simkin and Pizzorno, 1979; Strøm *et al.*, 1989)。しかし、関節リウマチや変性性関節症などの関節疾患では、滑膜の損傷に伴って血漿蛋白質が多く流入し、滑液中の蛋白質は増加する (Levick, 1981; Strøm *et al.*, 2008)。従って、イヌの IPA でも滑液中の蛋白質は増加すると予想されるが、イヌの多発性関節炎での滑液蛋白質濃度に関する報告は 2 報しか無く (Rondeau *et al.*, 2005; Colopy *et al.*, 2010)、IPA に限定した報告はまだない。また滑液蛋白質とグルココルチコイド治療との関連もわかっていない。そこで本章では、IPA のイヌにおけるグルココルチコイド治療前後の滑液総蛋白質濃度の変化を検討した。さらに、血漿中および滑液中の蛋白質を SDS-PAGE で分離し、IPA のイヌの滑液中で増加する蛋白質の傾向を評価した。

【材料と方法】

イヌの滑液と血漿

2012年から2014年に東京大学附属動物医療センターに来院したイヌのうち、IPAと診断された24頭の滑液を用いた。これらのイヌは0.8–13.9歳齢(中央値9.4歳齢)、オス8頭(うち4頭去勢済み)、メス16頭(うち8頭避妊済み)、体重は2.2–13.7 kg(中央値4.9 kg)であった。IPAの診断は第1章と同様に行った。

24頭のIPAのイヌのうち、20頭では検査前1週間以内にグルココルチコイド投与を受けていなかった。これら20頭から得られた滑液を、pre-GC-IPA群とした。しかし、1頭では滑液に血液の混入が認められたため除外し、残り19検体を実験に供した。すべてのIPAのイヌのうち、追跡可能であったのは12頭であった。これらのイヌでは、グルココルチコイド療法(プレドニゾン単独0.8–2.0 mg/kg/day(中央値1.4 mg/kg/day)、1–10週間(中央値2.5週間))によりいずれも臨床症状が改善し、滑液中の白血球数は正常化した。これら12頭のイヌから得られた滑液をpost-GC-IPA群とした。疾患対照として、非関節炎疾患のイヌ34頭(1.2–14.6歳齢(中央値8.4歳齢)、オス12頭(うち去勢済み10頭)、メス22頭(うち避妊済み17頭)、体重2.5–33.5 kg(中央値5.1 kg)、血漿CRP濃度0.3–17.7 mg/dl(中央値2.9 mg/dl))を組み入れた。これらのイヌは跛行や発熱、血漿CRP濃度の増加などからIPAが疑われ、その除外を目的として滑液が採取された。この滑液を非関節炎群として実験に供した。非関節炎群のイヌは、それぞれ非再生性貧血、不明熱(各4頭)、骨髓異形性症候群、膝炎、全身性紅斑性狼瘡、診断不明(各2頭)、胆管肝炎、慢性腸症、食物アレルギー、蛋白漏出性腎症、腎盂腎炎、細菌性膀胱炎、前

立腺膿瘍、膿皮症、脊椎炎、リンパ腫、移行上皮癌、骨肉腫、免疫介在性好中球減少症、免疫介在性溶血性貧血、非再生性免疫介在性貧血、多発性筋炎、慢性疾患に伴う貧血、椎間板疾患 (各 1 頭) と診断された。さらに臨床的に健康なビーグル 10 頭 (0.8–8.0 歳齢 (中央値 4.0 歳齢)、オス 4 頭、メス 6 頭) から得られた滑液を健康群として組み入れた。

すべての滑液で塗抹標本を作成し、ライトギムザ染色を行った。残った滑液は遠心分離後 (4°C, 5000 × g, 10 分)、上清を採取し、使用直前まで -30°C で保管したものを用いた。また滑液を採取した日に採血も行い、ヘパリン処理された遠心管に分取した。分取した血液は遠心分離後 (1890 × g, 3 分)、血漿を回収し、使用直前まで -30°C で保管したものを用いた。また症例の滑液と血漿を二次使用することについては、十分な説明の上ですべての飼い主から書面による許諾を得た。

滑液総蛋白質濃度

保管した滑液上清は氷上で解凍後、超純水で 80 倍希釈し、蛋白質濃度を Bradford 法により決定した (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories)。蛋白質濃度の標準曲線は、凍結乾燥したウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) を用いて作製した。

SDS-PAGE による血漿と滑液蛋白質の比較

Pre-GC-IPA 群 11 頭、post-GC-IPA 群 9 頭、非関節炎群 12 頭、健康群 9 頭の血漿および滑液上清 32 nl に含まれる蛋白質を 6% と 13.5% の SDS-PAGE で分離した。ゲルを室温

で 90 分間、蛍光蛋白質染色し (Oriole; Bio-Rad Laboratories)、画像検出装置 (Gel Doc EZ Imager; Bio-Rad Laboratories) で取り込んだ。デンシトメトリー解析には、付属のソフトウェア (Image Labs; Bio-Rad Laboratories) を使用し、各症例の血漿と滑液に含まれる蛋白質のバンド強度を比較した。

【統計】

統計解析には Prism 5 (GraphPad Software) と Statcel 3 (OMS publishing) を用いた。滑液総蛋白質濃度は Scheffe's F test により多重比較検定を行った。IPA の診断精度は非関節炎群と post-GC-IPA 群を組み入れ、receiver operating characteristic (ROC) 曲線の曲線下面積を用いて比較した。各々の解析では $P < 0.05$ を有意とみなした。

【結果】

滑液総蛋白質濃度

健康群、非関節炎群、pre-GC-IPA 群、post-GC-IPA 群の滑液の総蛋白質濃度の測定結果を図 15 に示した。健康群 (1.46 ± 0.22 g/dl: 平均値±標準偏差) や非関節炎群 (1.91 ± 0.50 g/dl) と比較して、pre-GC-IPA 群の蛋白質濃度 (3.19 ± 0.94 g/dl) は有意に高かった。Post-GC-IPA 群の滑液総蛋白質濃度 (2.76 ± 0.42 g/dl) も非関節炎群および健康群よりも有意に高かった。さらに post-GC-IPA 群のうち 4 頭は、グルココルチコイドでの治療開始から 7-10 週間が経過していたが、滑液総蛋白質濃度 (2.43 ± 0.10 g/dl) は依然として健康群よりも有意に高かった ($P < 0.01$)。一方、pre-GC-IPA 群と post-GC-IPA 群の間で滑液総蛋白質濃度に有意差は認められなかった。

IPA の診断バイオマーカーとしての有用性

グルココルチコイドで治療されている IPA のイヌにおいて、滑液総蛋白質濃度が診断バイオマーカーとして有用であるかを調べるために ROC 曲線を描いた (図 16)。そして IPA の診断バイオマーカーとして確立されている血漿 CRP 濃度と比較した。滑液総蛋白質濃度の診断精度 (曲線下面積 0.94) は、血漿 CRP 濃度 (曲線下面積 0.67) よりも高かった。また滑液総蛋白質濃度のカットオフ値を 2.10 g/dl とすると、IPA に対する感度は 100%、特異度は 67%であった。

SDS-PAGE による分子量ごとの血漿/滑液蛋白質比

健康群では、滑液中で検出されるバンドのすべてが血漿中にも検出されるバンドと同じ分子量であった (図 17)。そして、滑液中のバンドは高分子量ほど減少し、特に 100 kDa 以上ではほとんど検出されなかった。これは、非関節炎の疾患対照群でも同様であった。一方、pre-GC-IPA 群では分子量にかかわらず血漿と同じ分子量のバンドが滑液中に認められ、滑液に含まれる蛋白質のバンド強度は、健康群よりも強い傾向にあった。これは post-GC-IPA 群でも同様であった。次に、すべてのイヌの血漿中で確認できた 15 バンドについてデンストメトリー法で定量し、滑液/血漿比を比較した (図 18)。Pre-GC-IPA 群と post-GC-IPA 群では、特定の蛋白質が増加しているわけではなく、様々な分子量の蛋白質が総じて滑液中で増加していた。

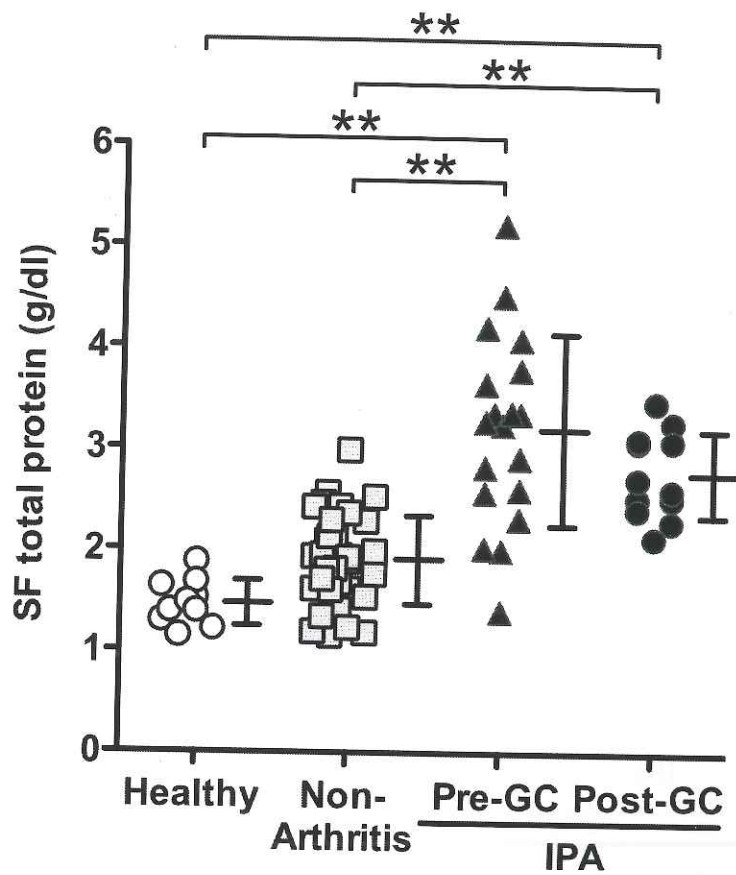


図15 イヌの滑液総蛋白質濃度

健康群 (Healthy; 10頭)、非関節炎群 (Non-Arthritis; 34頭)、グルココルチコイドを1週間以内に投与されていないIPAのイヌ (Pre-GC-IPA群; 19頭) とグルココルチコイドで治療されたIPAのイヌ (Post-GC-IPA群; 12頭) の滑液総蛋白質濃度。バーはそれぞれ平均値±標準偏差を表す。**: $P < 0.01$, Scheffe's F test.

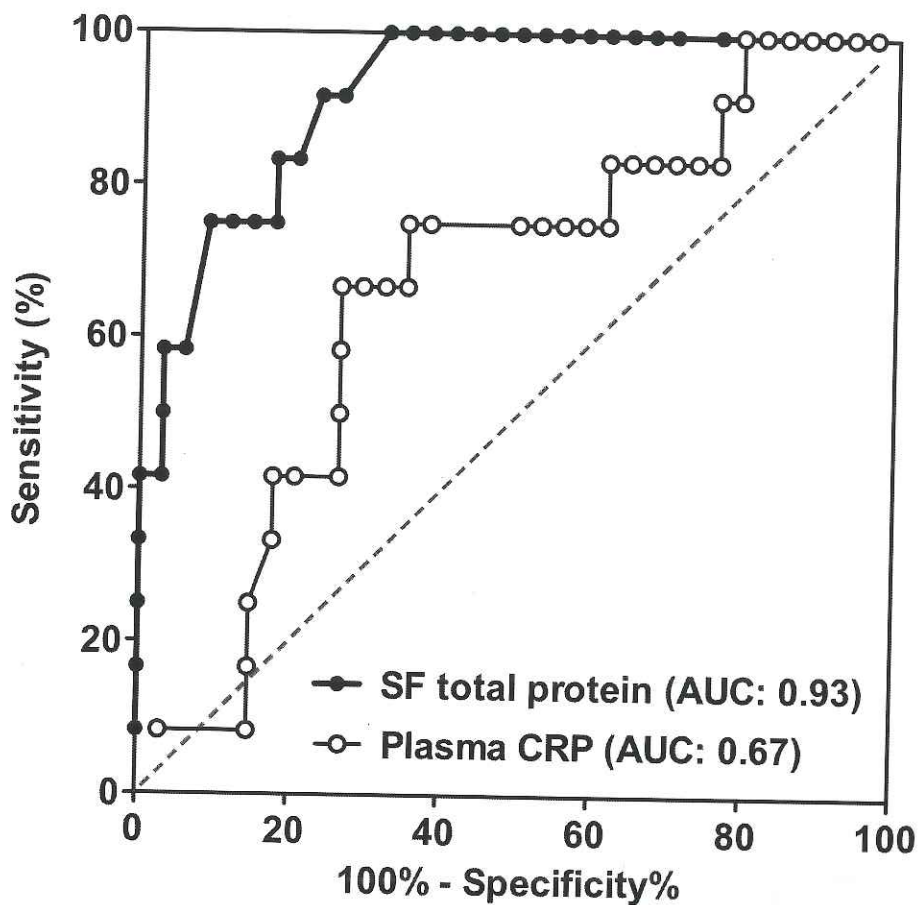


図16 IPAの診断に対するROC曲線
 非関節炎群とpost-GC-IPA群を組み入れ、滑液総蛋白質濃度と血漿CRP濃度のIPA診断における有用性を曲線下面積 (area under the curve: AUC) で評価した。

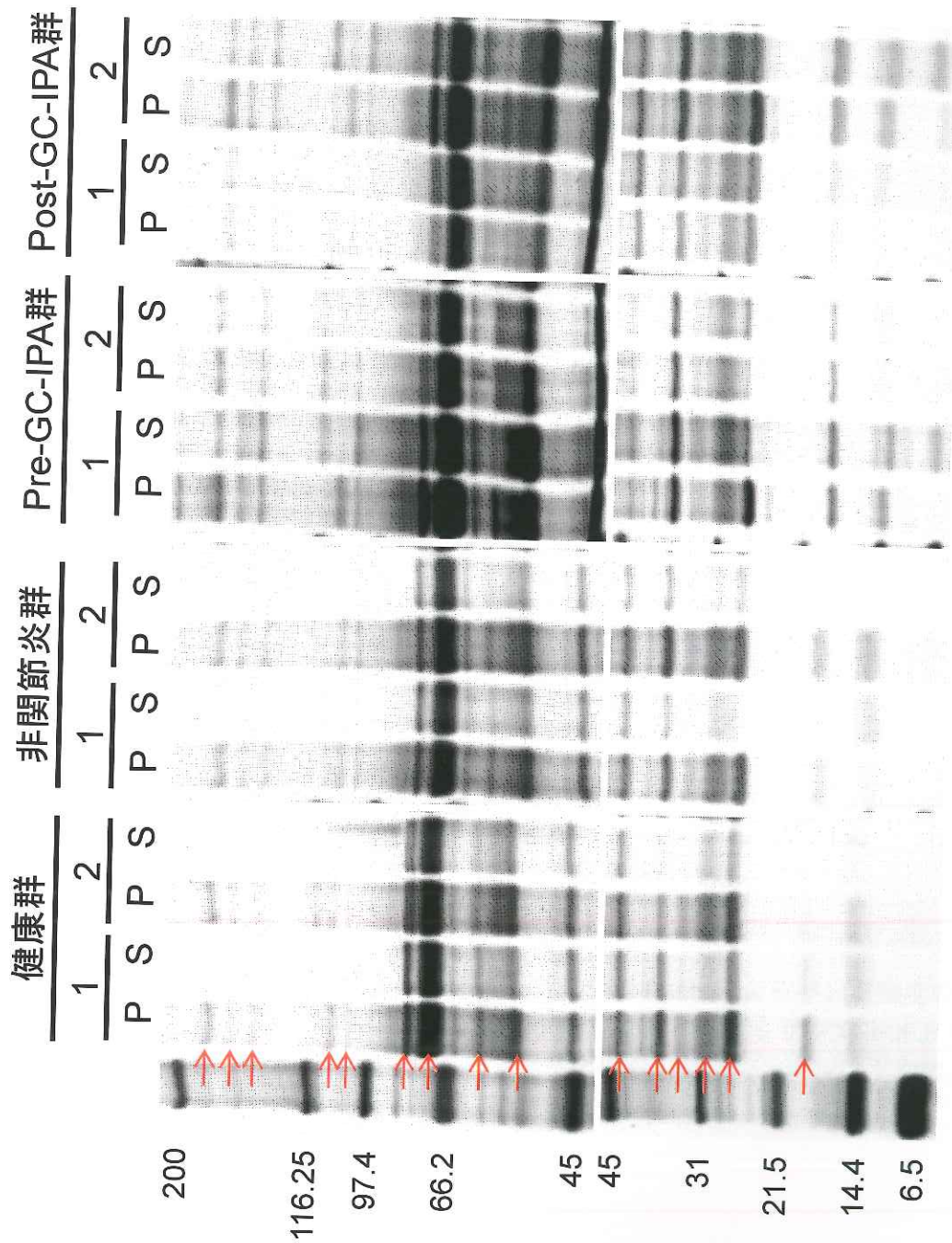


図17 イヌの血漿 (P) と滑液 (S) の SDS-PAGE
 上段は6%、下段は13.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて、血漿と滑液 (32 nl) に含まれる
 蛋白質を分離し、分子量ごとに比較した。すべてのイヌの血漿中で認められるバンド (矢印)
 について、血漿中のバンド強度と滑液中のバンド強度をデンシトメトリー法で比較した (次頁)。
 染色には、Orioleを用いた。一番左のレーンは分子量マーカー (分子量 $\times 10^{-3}$) を示す。

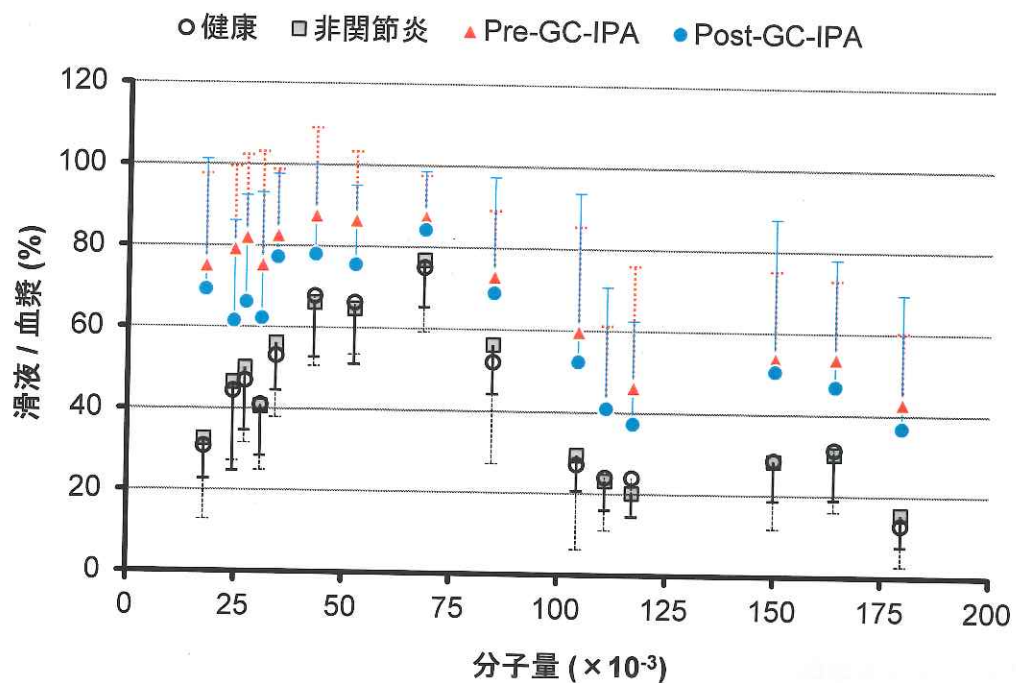


図18 滑液蛋白質と血漿蛋白質のSDS-PAGEによるバンド強度の比
 図17のSDS-PAGEで認められたバンドについて、デンストメトリー法により滑液と血漿でバンド強度を比較した。シンボルは平均値、バーは標準偏差を表す。

【考察】

IPAに罹患したイヌは、関節痛や跛行といった整形外科的な症状を必ずしも示さず、活動性の低下や食欲不振、発熱といった不明瞭な症状を示すことが多い (Bennett, 1987e)。このため、IPAの診断は遅れることあり、IPAはイヌの不明熱の主要な原因疾患の一つである (Dunn and Dunn, 1998; Battersby *et al.*, 2006)。本章では滑液総蛋白質濃度の測定が、IPAの診断に有用であることを確かめた。

IPAにおける高感度なバイオマーカーとして、血漿CRP濃度が知られている (Ohno *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2014)。しかしながら、様々な炎症性疾患でも血漿中のCRPは増加する (Nakamura *et al.*, 2008)。さらにグルココルチコイドによる治療が奏効し、滑液中の白血球数が減少すると、血漿CRP濃度も平行して減少することがわかっている (Foster *et al.*, 2014)。このため、すでにグルココルチコイドを投与されているイヌでは血漿CRP濃度を参考にしづらく、IPAの診断に苦慮することがある。本章ではまず、治療前のIPAのイヌの滑液総蛋白質濃度を調べたところ、関節炎を持たないイヌよりも有意に高かった。IPAのイヌにグルココルチコイドで治療を行うと、滑液中の白血球数は減少した。しかしながら、post-GC-IPA群の滑液中の総蛋白質濃度は依然として有意に高かった。そして滑液総蛋白質濃度の診断精度は、血漿CRP濃度よりも高かった。本章の結果は、グルココルチコイドを投与されているイヌにおいて、滑液総蛋白質濃度の高値が優れた診断マーカーとなり得ることを明らかにした。また滑液総蛋白質濃度は、主に滑膜組織の完全性に依拠していると考えられている (Levick *et al.*, 1996)。従って、post-GC-IPA群で滑液総蛋白質濃度が高値であることは、グルココルチコイドによる治

療で炎症が収束しているにも関わらず、滑膜組織の損傷が残っていることを示唆している。

各症例の血漿蛋白質と滑液蛋白質を分子量ごとに比較したところ、健康群の滑液中では 100 kDa 以上の高分子量の蛋白質は、100 kDa 未満の蛋白質よりも少ないことがわかった。これは非関節炎の疾患対照のイヌでも同様であった。このことから、健康なイヌの滑膜には高分子量の血漿蛋白質の滑液へ流入を制限する機能があり、この機能は非関節炎の疾患対照のイヌでも保存されていると考えられた。そして pre-GC-IPA 群のイヌでは 100 kDa 以上の蛋白質も含めて、総じて滑液中の蛋白質のバンド強度が増しており、それらのバンドのほとんどが血漿中の蛋白質と同一と考えられた。同様の傾向が post-GC-IPA 群でも確認された。したがって、IPA のイヌでは分子量バリア機能が破綻した結果、様々な分子量の血漿蛋白質が滑液中で増加していると考えられた。

滑液総蛋白質濃度を用いてイヌの IPA を診断するには 2 つの注意点がある。まず IPA は必ずしもすべての関節で発症するわけではない、ということである。そのため、複数関節から得られた滑液の蛋白質濃度をそれぞれ測定し、誤って判断することを避ける必要がある。次に、他の関節疾患でも滑液総蛋白質濃度は増加するということである。よって、注意深い整形外科的検査やレントゲン検査などにより、他の関節疾患を除外することが必要と考えられる。

【小括】

健康なイヌと治療前の IPA のイヌの滑液総蛋白質濃度を測定したところ、治療前の IPA のイヌでは有意に滑液総蛋白質濃度が上昇していた。そして、グルココルチコイド治療により良化した IPA のイヌでも、滑液総蛋白質濃度は依然として健康なイヌよりも有意に高かった。そこで、非関節炎の疾患対照のイヌとグルココルチコイドで良化した IPA のイヌを組み入れ、ROC 曲線を描いたところ、滑液総蛋白質濃度が診断に有用であることが示された。以上より、滑液総蛋白質濃度を測定することで、グルココルチコイドを投与されているイヌで IPA を診断あるいは除外することが容易になると考えられた。

総括

本論文では、IPA のイヌで認められる特徴的な病理組織学的変化である滑膜組織での免疫複合体の存在と好中球数の増加、そして滑膜の組織構造の破壊について、関連する臨床病理学的変化を検討し、イヌの IPA の病態生理の解明を試みた。

第一章では、イムノブロット法で補体 C3 と IgG で構成される免疫複合体を検出する方法を開発した。この方法により IPA のイヌでは血漿中の C3-IgG 複合体が増加していることがわかった。この複合体は、IPA のイヌの臨床症状が改善するとともに減少した。さらに、IPA のイヌの滑液中では、血漿中よりも高率に C3-IgG 複合体が検出された。従って、IPA のイヌの関節で C3-IgG 複合体が産生され、病態へ関与している可能性が示された。

第二章では、IPA のイヌにおける滑液中の好中球走化因子について検討した。IPA のイヌの滑液は、健康なイヌ由来の多形核白血球の遊走を有意に促進した。そして、IPA のイヌの滑液中では、ヒトの好中球走化因子である CXCL8 と単球走化因子である CCL2 が増加していた。興味深いことに、CCL2 の受容体である CCR2 は主に多形核白血球に発現し、単球では発現していなかった。そして、健康なイヌの多形核白血球は CCL2 に反応して遊走した。これらのことから、monocyte chemoattractant protein-1 ともよばれる CCL2 は、イヌでは多形核白血球の走化因子として機能していることが示された。CXCL8 と CCL2 の IPA の病態における役割を検討するために、CXCR1/2 の非競合阻害薬である repertaxin と CCR2 のアンタゴニストである MK-0812 を用いて遊走抑制試験を行ったところ、repertaxin と MK-0812 を併用することで、IPA のイヌの滑液に対する多形核白血球の遊走は抑制された。以上より、IPA のイヌでは、滑液中の CXCL8 と CCL2

がともに関節への好中球の浸潤に寄与していると考えられた。

第三章では、IPA のイヌの滑液総蛋白質濃度について調べた。まず治療前の IPA のイヌの滑液総蛋白質濃度は、健康なイヌや非関節炎のイヌよりも有意に高かった。興味深いことに、グルココルチコイドで治療され、滑液中に白血球が認められなくなったイヌでも、滑液総蛋白質濃度は高いままであった。ROC 曲線を描いたところ、滑液総蛋白質濃度はグルココルチコイドを投与されているイヌで IPA を診断するのに有用であることが示された。

本論文における一連の研究により、イヌの IPA における病態生理の一端が明らかとなった。まず IPA のイヌでは、滑液中で C3-IgG 複合体が産生されていることが示唆された。この関節局所で増加した免疫複合体は、Fc γ 受容体を介して様々な滑膜組織の細胞を活性化すると推察される。活性化した細胞は、CXCL8 や CCL2 といったイヌにおける好中球走化因子の滑液中への放出を促進し、好中球が関節に集簇すると考えられた。そして集簇した好中球は関節、特に滑膜に損傷を与えることで、血漿蛋白質が関節腔内に流入し、滑液総蛋白質濃度が上昇すると考えられた。

これらの研究結果は IPA の病態生理の理解につながると同時に、IPA の診断や治療に対して臨床的有用性をもつと考えられた。すなわち、C3-IgG 複合体は IPA のイヌの血漿中で高率に認められ、治療に反応して減少する。従って、イヌの IPA の診断マーカー、治療反応性マーカーとして有用となる可能性がある。また *in vitro* での研究ではあるが、CXCL8 と CCL2 の受容体を阻害することで、好中球の浸潤を抑制することができた。従って、ケモカイン受容体を標的とした薬剤は、イヌの IPA に対する効果的な治療法と

なる可能性がある。さらに、滑液総蛋白質濃度を測定することは、グルココルチコイドが投与されているイヌで IPA を診断あるいは除外することを容易にし、IPA の診断マーカーとして有用と考えられる。

本論文における一連の研究は、イヌの IPA の病態を解明するための重要な知見を提供するものであり、新規診断法ならびに新規治療法の確立につながるものと考えられる。

【謝辞】

本研究を行うにあたりご指導賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室 松木直章教授に深謝申し上げます。また、実験の遂行にあたり貴重なご助言を頂戴しました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室 米澤智洋准教授、前田真吾特任助教、相模大野プリモ動物病院 玉原智史院長に感謝申し上げます。

貴重な研究試料をご提供下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医内科学研究室 辻本元教授、大野耕一准教授、高度医療科学研究室 望月学教授、東京大学大学院農学生命科学研究科附属動物医療センター 本阿彌宗紀特任助教、また高額な実験装置の使用を快諾して下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫学研究室 後藤康之准教授、獣医公衆衛生学研究室 平山和宏准教授に感謝の意を表します。

最後に、本研究に大いにご協力下さいました東京大学動物医療センターの皆様、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医内科学研究室、そして獣医臨床病理学研究室の各位に心から御礼申し上げます。

引用文献

- Aguado, M.T., Lambris, J.D., Tsokos, G.C., Burger, R., Bitter-Suermann, D., Tamerius, J.D., Dixon, F.J., Theofilopoulos, A.N., 1985. Monoclonal antibodies against complement 3 neoantigens for detection of immune complexes and complement activation. Relationship between immune complex levels, state of C3, and numbers of receptors for C3b. *J. Clin. Invest.* **76**, 1418–1426.
- Ahlstedt, S., Hanson, L.Å., Wadsworth, C., 1976. A Clq immunosorbent assay compared with thin-layer gel filtration for measuring IgG aggregates. *Scand. J. Immunol.* **5**, 293–298.
- Akahoshi, T., Wada, C., Endo, H., Hirota, K., Hosaka, S., Takagishi, K., Kondo, H., Kashiwazaki, S., Matsushima, K., 1993. Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. Regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum.* **36**, 762–771.
- Auer, J., Bläss, M., Schulze-Koops, H., Russwurm, S., Nagel, T., Kalden, J.R., Röllinghoff, M., Beuscher, H.U., 2007. Expression and regulation of CCL18 in synovial fluid neutrophils of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **9**, R94.
- Bari, A.S.M., Carter, S.D., Bell, S.C., Morgan, K., Bennett, D., 1989. Anti-type II collagen antibody in naturally occurring canine joint diseases. *Br. J. Rheumatol.* **28**, 480–486.
- Bell, S.C., Carter, S.D., Bennett, D., 1991. Canine distemper viral antigens and antibodies in dogs with rheumatoid arthritis. *Res. Vet. Sci.* **50**, 64–68.
- Bell, S.C., Carter, S.D., May, C., Bennett, D., 1995. Antibodies to heat shock proteins in dogs with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Br. Vet. J.* **151**, 271–279.

- Bennett, D., 1987a. Immune-based erosive inflammatory joint disease of the dog: canine rheumatoid arthritis. 1. Clinical, radiological and laboratory investigations. *J. Small Anim. Pract.* **28**, 779–797.
- Bennett, D., 1987b. Immune-based erosive inflammatory joint disease of the dog: canine rheumatoid arthritis. 2. Pathological investigations. *J. Small Anim. Pract.* **28**, 799–819.
- Bennett, D., 1987c. Immune-based non-erosive inflammatory joint disease of the dog. 1. Canine systemic lupus erythematosus. *J. Small Anim. Pract.* **28**, 871–889.
- Bennett, D., 1987d. Immune-based non-erosive inflammatory joint disease of the dog. 2. Polyarthritits/polymyositis syndrome. *J. Small Anim. Pract.* **28**, 891–908.
- Bennett, D., 1987e. Immune-based non-erosive inflammatory joint disease of the dog. 3. Canine idiopathic polyarthritits. *J. Small Anim. Pract.* **28**, 909–928.
- Bennett, D., Kelly, D.F., 1987. Immune-based non-erosive inflammatory joint disease of the dog. 2. Polyarthritits/polymyositis syndrome *J. Small Anim. Pract.* **28**, 891–908.
- Bennett, D., 2010. Immune-mediated and infective arthritis. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7th ed., Saunders, Philadelphia. pp. 743–749.
- Bennett, S., Breit, S.N., 1994. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 236–240.
- Bertini, R., Allegretti, M., Bizzarri, C., Moriconi, A., Locati, M., Zampella, G., Cervellera, M.N., Di Cioccio, V., Cesta, M.C., Galliera, E., Martinez, F.O., Di Bitondo, R., Troiani, G.,

- Sabbatini, V., D'Anniballe, G., Anacardio, R., Cutrin, J.C., Cavalieri, B., Mainiero, F., Strippoli, R., Villa, P., Di Girolamo, M., Martin, F., Gentile, M., Santoni, A., Corda, D., Poli, G., Mantovani, A., Ghezzi, P., Colotta, F., 2004. Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11791–11796.
- Bignold, L.P., 1992. Measuring chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes with the Sparse-Pore polycarbonate membrane in the boyden chamber: chemotactic activity of rheumatoid synovial fluid. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **40**, 33–37.
- Brühl, H., Wagner, K., Kellner, H., Schattenkirchner, M., Schlöndorff, D., Mack, M., 2001. Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **126**, 551–559.
- Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E.D., Rose, S.S., Springer, T.A., 1994. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3652–3656.
- Carter, S.D., Bell, S.C., Bari, A.S., Bennett, D., 1989. Immune complexes and rheumatoid factors in canine arthritides. *Ann. Rheum. Dis.* **48**, 986–991.
- Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J., Coughlin, S.R., 1994. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2752–2756.

- Chiang, H.C., Wang, Y.S., Chou, C.H., Liao, A.T., Chu, R.M., Lin, C.S., 2012. Overexpression of chemokine ligand 7 is associated with the progression of canine transmissible venereal tumor. *BMC Vet. Res.* **8**, 216.
- Choi, K.H., Park, J.W., Kim, H.Y., Kim, Y.H., Kim, S.M., Son, Y.H., Park, Y.C., Eo, S.K., Kim, K., 2010. Cellular factors involved in CXCL8 expression induced by glycated serum albumin in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. **209**, 58–65.
- Clements, D.N., Gear, R.N., Tattersall, J., Carmichael, S., Bennett, D., 2004. Type I immune-mediated polyarthritis in dogs: 39 cases (1997-2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **224**, 1323–1327.
- Coelho, F.M., Pinho, V., Amaral, F.A., Sachs, D., Costa, V.V., Rodrigues, D.H., Vieira, A.T., Silva, T.A., Souza, D.G., Bertini, R., Teixeira, A.L., Teixeira, M.M., 2008. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum.* **58**, 2329–2337.
- Colopy, S.A., Baker, T.A., Muir, P., 2010. Efficacy of leflunomide for treatment of immune-mediated polyarthritis in dogs: 14 cases (2006-2008). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **236**, 312–318.
- De Bruin, T., De Rooster, H., van Bree, H., Cox, E., 2005. Interleukin-8 mRNA expression in synovial fluid of canine stifle joints with osteoarthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **108**, 387–397.

- De Jager, W., Hoppenreijns, E.P., Wulffraat, N.M., Wedderburn, L.R., Kuis, W., Prakken, B.J., 2006. Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis; a cross-sectional study. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 589–598.
- Dewald, O., Zymek, P., Winkelmann, K., Koerting, A., Ren, G., Abou-Khamis, T., Michael, L.H., Rollins, B.J., Entman, M.L., Frangogiannis, N.G., 2005. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* **96**, 881–889.
- Dodds, W.J., 2001. Vaccination protocols for dogs predisposed to vaccine reactions. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **37**, 211–214.
- Dubravec, D.B., Spriggs, D.R., Mannick, J.A., Rodrick, M.L., 1990. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6758–6761.
- Dunn, K.J., Dunn, J.K., 1998. Diagnostic investigations in 101 dogs with pyrexia of unknown origin. *J. Small Anim. Pract.* **39**, 574–580.
- Ellingsen, T., Buus, A., Møller, B.K., Stengaard-Pedersen, K., 2000. In vitro migration of mononuclear cells towards synovial fluid and plasma from rheumatoid arthritis patients correlates to RANTES synovial fluid levels and to clinical pain parameters. *Scand. J. Rheumatol.* **29**, 216–221.
- Endo, H., Akahoshi, T., Takagishi, K., Kashiwazaki, S., Matsushima, K., 1991. Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the

- induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints. *Lymphokine Cytokine Res.* **10**, 245–252.
- Fields, C., O'Connell, D., Xiao, S., Lee, G.U., Billiald, P., Muzard, J., 2013. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. *Nat. Protoc.* **8**, 1125–1148.
- Foster, J.D., Sample, S., Kohler, R., Watson, K., Muir, P., Trepanier, L.A., 2014. Serum biomarkers of clinical and cytologic response in dogs with idiopathic immune-mediated polyarthropathy. *J. Vet. Intern. Med.* **28**, 905–911.
- Georganas, C., Liu, H., Perlman, H., Hoffmann, A., Thimmapaya, B., Pope, R.M., 2000. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF- κ B but not C/EBP β or c-Jun. *J. Immunol.* **165**, 7199–7206.
- Giger, U., Werner, L.L., Millichamp, N.J., Gorman, N.T., 1985. Sulfadiazine-induced allergy in six Doberman pinschers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **186**, 479–484.
- Gu, L., Tseng, S.C., Rollins, B.J., 1999. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem. Immunol.* **72**, 7–29.
- Hannestad, K., 1967. Presence of aggregated γ G-globulin in certain rheumatoid synovial effusions. *Clin. Exp. Immunol.* **2**, 511–529.
- Hegemann, N., Wondimu, A., Ullrich, K., Schmidt, M.F., 2003. Synovial MMP-3 and TIMP-1 levels and their correlation with cytokine expression in canine rheumatoid arthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **91**, 199–204.

- Hegemann, N., Wondimu, A., Kohn, B., Brunnberg, L., Schmidt, M.F.G., 2005. Cytokine profile in canine immune-mediated polyarthritis and osteoarthritis. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* **18**, 67–72.
- Hogan, M., Sherry, B., Ritchlin, C., Fabre, M., Winchester, R., Cerami, A., Bucala, R., 1994. Differential expression of the small inducible cytokines GRO α and GRO β by synovial fibroblasts in chronic arthritis: Possible role in growth regulation. *Cytokine.* **6**, 61–69.
- Isaacs, J.D., Cutolo, M., Keystone, E.C., Park, W., Braun, J., 2015. Biosimilars in immune-mediated inflammatory diseases: initial lessons from the first approved biosimilar anti-tumour necrosis factor monoclonal antibody. *J. Intern. Med.* In Press.
- Johnson, K.C., Mackin, A., 2012a. Canine immune-mediated polyarthritis: part 1: pathophysiology. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **48**, 12–17.
- Johnson, K.C., Mackin, A., 2012b. Canine immune-mediated polyarthritis: part 2: diagnosis and treatment. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **48**, 71–82.
- Katz, Y., Nadiv, O., Beer, Y., 2001. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor α -induced synthesis of interleukins 1, 6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: A possible role as a “fine-tuning cytokine” in inflammation processes. *Arthritis Rheum.* **44**, 2176–2184.
- Kenyon, K.D., Cole, C., Crawford, F., Kappler, J.W., Thurman, J.M., Bratton, D.L., Boackle, S.A., Henson, P.M., 2011. IgG autoantibodies against deposited C3 inhibit macrophage-mediated apoptotic cell engulfment in systemic autoimmunity. *J. Immunol.* **187**, 2101–2111.

- Khatlani, T.S., Ma, Z., Okuda, M., Inokuma, H., Onishi, T., 2003. Autoantibodies against T-Cell costimulatory molecules are produced in canine autoimmune diseases. *J. Immunother.* **26**, 12–20.
- Klickstein, L.B., Shapleigh, C., Goetzl, E.J. 1980. Lipoygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *J. Clin. Invest.* **66**, 1166–1170.
- Klimiuk, P.A., Sierakowski, S., Latosiewicz, R., Skowronski, J., Cylwik, J.P., Cylwik, B., Chwiecko, J., 2005. Histological patterns of synovitis and serum chemokines in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **32**, 1666–1672.
- Koch, A.E., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., Johnson, B., Evanoff, H.L., Haines, G.K., Burdick, M.D., Pope, R.M., Strieter, R.M., 1992a. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **90**, 772–729.
- Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., Strieter, R.M., 1992b. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* **258**, 1798–1801.
- Kohn, B., Garner, M., Lübke, S., Schmidt, M.F.G., Bennett, D., Brunnberg, L., 2003. Polyarthrititis following vaccination in four dogs. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* **16**, 6–10.
- Kohn, B., Lübke, S., Schmidt, M.F.G., Brunnberg, L., 2005. Idiopathic immune-mediated polyarthrititis type I in dog: occurrence, clinical findings, laboratory results, therapy and outcome of 16 cases (1996-2000). *Kleintierpraxis.* **50**, 415–428.

- Kulics, J., Rajnavölgyi, E., Füst, G., Gergely, J., 1983. Interaction of C3 and C3b with immunoglobulin G. *Mol. Immunol.* **20**, 805–810.
- Kushner, I., Somerville, J.A., 1971. Permeability of human synovial membrane to plasma proteins. Relationship to molecular size and inflammation. *Arthritis. Rheum.* **14**, 560–570.
- Lambris, J.D., 2001. Arvind Sahu Structure and biology of. *Immunol. Rev.* **180**, 35–48.
- Levick, J.R., 1981. Permeability of rheumatoid and normal human synovium to specific plasma proteins. *Arthritis Rheum.* **24**, 1550–1560.
- Levick, J.R., Price, F.M., Mason, R.M., 1996. Synovial matrix-synovial fluid system of joints. In: Comper, W.D. (Eds.), *Extracellular Matrix*, volume 1., CRC Press, London. pp. 328–377.
- Lewis, R.M., Hathaway, J.E., 1967. Canine systemic lupus erythematosus; presenting with symmetrical polyarthritis. *J. Small Anim. Pract.* **8**, 273–284.
- Liou, L.B., Tsai, W.P., Chang, C.J., Chao, W.J., Chen, M.H., 2013. Blood monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and adapted disease activity Score28-MCP-1: favorable indicators for rheumatoid arthritis activity. *PLoS One.* **8**, e55346.
- Lopez, R., Lucena, R., Novales, M., Ginel, P.J., Martin, E., Molleda, J.M., 1996. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* **43**, 469–474.
- Maus, U.A., Waelsch, K., Kuziel, W.A., Delbeck, T., Mack, M., Blackwell, T.S., Christman,

- J.W., Schlöndorff, D., Seeger, W., Lohmeyer, J., 2003. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J. Immunol.* **170**, 3273–3278.
- May, C., Carter, S.D., Bell, S C., Bennett, D., 1994. Immune responses to canine distemper virus in joint diseases of dogs. *Br. J. Rheumatol.* **33**, 27–31.
- Merck., 2005. Process for the preparation of CCR-2 antagonist. WO2005044795 A1
- Meriel, P., Reffie, R., Fournie, A., Sardou, R., Sardou, M., 1956. Combined electrophoresis of synovial fluid and serum. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.* **23**, 734–745.
- Moore, A.R., Iwamura, H., Larbre, J.P., Scott, D.L., Willoughby, D.A., 1993. Cartilage degradation by polymorphonuclear leucocytes: in vitro assessment of the pathogenic mechanisms. *Ann. Rheum. Dis.* **52**, 27–31.
- Moxley, G., Ruddy, S., 1985. Elevated C3 anaphylatoxin levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **28**, 1089–1095.
- Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y., Tsujimoto, H., 2008. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J. Vet. Med. Sci.* **70**, 127–131.
- Ohno, K., Yokoyama, Y., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y., Tsujimoto, H. 2006. C-reactive protein concentration in canine idiopathic polyarthritis. *J. Vet. Med. Sci.* **68**, 1275–1279.
- Okamoto, T., Ueda, K., Kambara, T., Kutsuna, T., 1986. Chemotactic activity for

- polymorphonuclear and mononuclear leukocytes in rheumatoid synovial fluids. *Acta Pathol. Jpn.* **36**, 1109–1122.
- Ollier, W.E., Kennedy, L.J., Thomson, W., Barnes, A.N., Bell, S.C., Bennett, D., Angles, J.M., Innes, J.F., Carter, S. D., 2001. Dog MHC alleles containing the human RA shared epitope confer susceptibility to canine rheumatoid arthritis. *Immunogenetics.* **53**, 669–673.
- Olsson, N., Ulfgren, A.K., Nilsson, G., 2001. Demonstration of mast cell chemotactic activity in synovial fluid from rheumatoid patients. *Ann. Rheum. Dis.* **60**, 187–193.
- Panush, R.S., Katz, P., Longley, S., Yonker, R.A., 1985. Detection and quantitation of circulating immune complexes in arterial blood of patients with rheumatic disease. *Ann. Rheum. Dis.* **36**, 217–226.
- Park, E.S., Uchida, K., Nakayama, H., 2013. Th1-, Th2-, and Th17-related cytokine and chemokine receptor mRNA and protein expression in the brain tissues, T cells, and macrophages of dogs with necrotizing and granulomatous meningoencephalitis. *Vet. Pathol.* **50**, 1127–1134.
- Pedersen, N.C., Castles, J.J., Weisner, K., 1976a. Noninfectious canine arthritis: rheumatoid arthritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **169**, 295–303.
- Pedersen, N.C., Weisner, K., Castles, J.J., Ling, G.V., Weiser, G., 1976b. Noninfectious canine arthritis: the inflammatory, nonerosive arthritides. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **169**, 304–310.
- Perotti, L. A., Peretti, L., Lovino, C., Masera, R.G., Sartori, M.L., Angeli, A., 1999.

- Concentration of cortisol in the synovial fluid of patients with untreated rheumatoid arthritis: relation to in vitro IL-8 production by synovial mononuclear cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **876**, 255–258.
- Proudfoot, A.E., Power, C.A., Schwarz, M.K., 2010. Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert Opin. Investig. Drugs.* **19**, 345–355.
- Rampart, M., Van Damme, J., Zonnekeyn, L., Herman, A.G., 1989. Granulocyte chemotactic protein/interleukin-8 induces plasma leakage and neutrophil accumulation in rabbit skin. *Am. J. Pathol.* **135**, 21–25.
- Reich, C.M., Raabe, O., Wenisch, S., Bridger, P.S., Kramer, M., Arnhold, S., 2012. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue-and bone marrow-derived mesenchymal stem cells—a comparative study. *Vet. Res. Commun.* **36**, 139–148.
- Rios-Santos, F., Alves-Filho, J.C., Souto, F.O., Spiller, F., Freitas, A., Lotufo, C.M.C., Soares, M.B., Dos Santos, R.R., Teixeira, M.M., Cunha, F.Q., 2007. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 490–497.
- Rondeau, M.P., Walton, R.M., Bissett, S., Drobotz, K.J., Washabau, R.J., 2005. Suppurative, nonseptic polyarthropathy in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **19**, 654–662.
- Ropes, M.W., Bauer, W., 1953. *Synovial fluid changes in joint disease*. Harvard University Press; Camnridge, Massachusetts

- Ruddy, S., Colten, H.R., 1974. Rheumatoid arthritis: biosynthesis of complement proteins by synovial tissues. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1284–1288.
- Schur, P.H., Sandson, J., 1963. Immunologic studies of the proteins of human synovial fluid. *Arthritis Rheum.* **6**, 115–129.
- Simkin, P.A., Pizzorno, J.E., 1979. Synovial permeability in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **22**, 689–696.
- Snyderman, R., 1983. Pharmacologic manipulation of leukocyte chemotaxis: Present knowledge and future trends. *Am. J. Med.* **75**, 10–18.
- Soares, N.M., Santiago, M.B., Pontes deCarvalho, L.C., 2001. An improved anti-C3/IgG ELISA for quantification of soluble immune complexes. *J. Immunol. Methods.* **249**, 199–205.
- Souto, F.O., Alves-Filho, J.C., Turato, W.M., Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., Cunha, F.Q., 2011. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 234–242.
- Speyer, C.L., Gao, H., Rancilio, N.J., Neff, T.A., Huffnagle, G.B., Sarma, J.V., Ward, P.A., 2004. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am. J. Pathol.* **165**, 2187–2196.
- Stanilova, S.A., Slavov, E.S., 2001. Comparative study of circulating immune complexes quantity detection by three assays--CIF-ELISA, C1q-ELISA and anti-C3 ELISA. *J. Immunol. Methods.* **253**, 13–21.
- Stankovic, A., Slavic, V., Stamenkovic, B., Kamenov, B., Bojanovic, M., Mitrovic, D.R., 2008.

- Serum and synovial fluid concentrations of CCL2 (MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoid arthritis and osteoarthritis reflect disease activity. *Bratisl. Lek. Listy*. **110**, 641–646.
- Straubinger, R.K., Summers, B.A., Chang, Y.F., Appel, M.J., 1997. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 111–116.
- Strøm, H., Alexandersen, S., Poulsen, O.M., Hau, J., 1989. Synovial fluid proteins in degenerative joint disease in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **22**, 187–196.
- Stull, J.W., Evason, M., Carr, A.P., Waldner, C., 2008. Canine immune-mediated polyarthritis: clinical and laboratory findings in 83 cases in western Canada (1991-2001). *Can. Vet. J.* **49**, 1195–1203.
- Szekanecz, Z., Vegvari, A., Szabo, Z., Koch, A.E., 2010. Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **2**, 153–167.
- Talbot, J., Bianchini, F.J., Nascimento, D.C., Oliveira, R.D., Souto, F.O., Pinto, L.G., Peres, R.S., Silva, J.R., Almeida, S.C., Louzada-Junior, P., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Alves-Filho, J.C., 2015. CCR2 expression in neutrophils plays a critical role in their migration into joints in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 1751–1759.
- Tangirala, R.K., Murao, K., Quehenberger, O., 1997. Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines. *J. Biol. Chem.* **272**, 8050–8056.

- Taylor S.M., 2009. Disorders of the joints. In: Nelson, R.W., Couto C.G. (Eds.), *Small animal internal medicine*, 4th ed., Mosby Elsevier, Missouri. pp. 1127–1141.
- Tiku, K., Tiku, M.L., Skosey, J.L., 1986. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* **136**, 3677–3685.
- Trepanier, L.A., Danhof, R., Toll, J., Watrous, D., 2003. Clinical findings in 40 dogs with hypersensitivity associated with administration of potentiated sulfonamides. *J. Vet. Intern. Med.* **17**, 647–652.
- Vasilev, V.V., Noe, R., Dragon-Durey, M.A., Chauvet, S., Lazarov, V.J., Deliyska, B.P., Fremeaux-Bacchi, V., Dimitrov, J.D., Roumenina, L.T., 2015. Functional characterization of autoantibodies against complement component C3 in patients with lupus nephritis. *J. Biol. Chem.* **290**, 25343–25355.
- Vivanco, F., Muñoz, E., Vidarte, L., Pastor, C., 1999. The covalent interaction of C3 with IgG immune complexes. *Mol. Immunol.* **36**, 843–852.
- Wilbe, M., Jokinen, P., Hermanrud, C., Kennedy, L.J., Strandberg, E., Hansson-Hamlin, H., Lohi, H., Andersson, G., 2009. MHC class II polymorphism is associated with a canine SLE-related disease complex. *Immunogenetics.* **61**, 557–564.
- Winchester, R.J., Kunkel, H.G., 1968. High molecular weight complexes involving γ -globulin in joint fluids from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* **11**, 849–850.
- Winchester, R.J., Agnello, V., Kunkel, H.G., 1970. Gamma globulin complexes in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. Partial characterization and relationship to

- lowered complement levels. *Clin. Exp. Immunol.* **6**, 689–706.
- Wisniewski, T., Bayne, E., Flanagan, J., Shao, Q., Wnek, R., Matheravidathu, S., Fischer, P., Forrest, M.J., Peterson, L., Song, X., Yang, L., Demartino, J.A., Struthers, M., 2010. Assessment of chemokine receptor function on monocytes in whole blood: In vitro and ex vivo evaluations of a CCR2 antagonist. *J. Immunol. Methods.* **352**, 101–110.
- Xia, M., Zhihua S., 2009. Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opin. Ther. Pat.* **19**, 295–303.
- Zarbock, A., Allegretti, M., Ley, K., 2008. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. *Br. J. Pharmacol.* **155**, 357–364.
- Zhang, L., Yu, M., Deng, J., Lv, X., Liu, J., Xiao, Y., Yang, W., Zhang, Y., Li, C., 2015. Chemokine signaling pathway involved in CCL2 expression in patients with rheumatoid arthritis. *Yonsei Med. J.* **56**, 1134–1142.
- 北村肇, 2010. 補体学入門-基礎から臨床・測定法まで-. 学際企画. 東京. 日本.
- 日本リウマチ学会, 日本リウマチ財団編集, 2010. リウマチ病学テキスト. 診断と治療社. 東京. 日本.