

論文審査の結果の要旨

申請者名 吉 松 宏 基

粘液腫様変性による僧帽弁閉鎖不全症 (MI) は、犬における最も一般的な慢性心疾患である。近年、慢性心疾患である MI に対して、一般的な心疾患治療薬以外にさまざまなサプリメントが使用されるようになってきている。そして、それらの中には脂肪酸を主成分とする製品があり MI 症例にも使用されているが、病態と血中脂肪酸組成に関する検討はわずかである。脂肪酸は、正常な心筋の主要なエネルギー源であり、心筋における ATP 産生の 60~90% を占める。しかし、心筋が負荷にさらされると、エネルギーは脂肪酸利用からブドウ糖利用へと傾くことが知られている。心不全における脂肪酸代謝の変化は、心筋中への脂肪蓄積を引き起こし、心筋細胞膜の構築の変化と心筋細胞内の Ca イオン調節の破綻を引き起こすため、心不全をさらに悪化させるといわれている。

犬の血清中脂肪酸の測定には、ガスクロマトグラフ(GC)法や高速液体クロマトグラフ法が用いられている。GC 法は、分離能が高く少量の試料で測定できるが、血清中からの脂肪酸の抽出とメチル化が必要であり、その処理には特殊な器具や高温加熱などの過程でその扱いに注意が必要であるため一般的な検査項目となっていない。このため、犬の血清中脂肪酸組成に関しては、不明な点多く病態との関連は明らかとなっていない。

そこで申請者は、1) 脂肪酸メチル化およびメチル化脂肪酸精製キットを利用した犬の血清中脂肪酸の測定方法について検討した。2) 脂肪酸測定用の血清を得る適切な採血時点について検討した。3) 健常犬の血清中脂肪酸組成の基準値について検討した。そして、4) MI 犬を病期で分類し血清中脂肪酸組成を比較し、さらに脂肪酸と心エコーパラメーターとの関連を確認した。

1. 犬の血清中脂肪酸の測定方法の検討 (第2章)

脂肪酸のメチル化とメチル化脂肪酸の精製のためのキットを用いた GC 法の実用性を確認するために、今回の測定法と従来法による測定値の比較、同時再現性と日差再現性による検者内誤差および検者間誤差を検討した。その結果、飽和脂肪酸(SFA)2 種類、一価不飽和脂肪酸(MUFA)2 種類そして多価不飽和脂肪酸(PUFA)9 種類の合計 13 種類の脂肪酸定量が可能であった。そして、従来法との比較では全ての脂肪酸の種類で高い相関(相関係数: 0.875~1.000)を認めた。同時再現性における変動係数 (CV) の範囲は、2.0~7.4%であった。さらに、日差再現性における CV は、0.4~2.8% の範囲であった。また、全ての脂肪酸の種類において、検者間の測定値に有意差は認めなかった。したがって、今回の測定方法は、従来法と比較して安全かつ簡便に行うことが可能で、その精度が高いことが示された。

2. 犬の血清中脂肪酸濃度を測定するための採血時点の検討 (第3章)

血清中脂肪酸を測定するための最適な採血時点を決定するために、健常犬を用いて血清中脂肪酸の日内変動を調べた。供試犬は、米国飼料検査官協会 (AAFCO) の基準を満たした、同一のフードを2ヵ月以上継続して給与中の健常雄ビーグル6頭を用いた。給餌は毎日7時と19時の2回行い、採血は午前7時の給餌前をPreとし、その後3時間毎に24時間行った。その結果、Preから3時間後の総MUFA、総n-9脂肪酸そしてオレイン酸の濃度は、Preよりも有意($P < 0.05$)に上昇したが、それ以後はPreとの間に有意差を認めなかった。n-3脂肪酸においては、3時間後の α -リノレン酸(ALA)濃度が、Preよりも有意($P < 0.05$)に増加したが、6時間後からは有意差を認めなかった。重量比のうち、エイコサペンタエン酸(EPA)はPreと比べて3時間後と6時間後、そしてドコサペンタエン酸(DPA)は3時間後が有意($P < 0.05$)に減少した。しかし、両者ともに9時間後からは有意な変化を認めなかった。これらのことから、1日に2食を給餌している犬の採血時点は、午前の給餌前あるいはその9時間以後が適当であると判断した。

3. 健常犬における血清中脂肪酸組成の基準値の検討 (第4章)

臨床的に健常な105頭の犬を用いて、血清中脂肪酸の濃度、重量比そして脂肪酸比率の基準値を検討した。供試犬は、幼年齢群、中年齢群そして高年齢群に分類し、さらにそれらの群内を雄群、去勢群、雌群そして避妊群に細分した。測定値が正規分布した脂肪酸濃度の95%区間は、平均 ± 1.96 標準偏差から求めた。正規分布しない場合は、対数変換により正規化した後に95%区間を求め、その最小値と最大値を逆対数変換した。その結果、脂肪酸の変動因子である技術的因子(測定精度、検者内誤差、検者間誤差)、個体内因子(採血時点、性周期、運動習慣、季節の違い)そして個体間因子(食習慣、年齢、性)のうち、測定精度、検者内および検者間の誤差、採血時点、性周期、食習慣などの因子を除外することにより、年齢と性に関わらず脂肪酸の濃度、重量比そして脂肪酸比率に有意差を認めなかった。このことから、脂肪酸濃度の基準値は、年齢や性に関わらず設定可能であると考えられた。しかし、今回の結果は、多くの変動因子に制限を設けた結果であるため、各個体の血清中脂肪酸を基準値と比較する場合には、種々の変動因子の影響を確認する必要があると考えられた。今回は供試犬の頭数が少なく、食べ物や品種の違いについてはさらにデータを蓄積し検討する必要があると考えられた。そのため、今回得られた95%区間は、本研究では参照値として用いることにした。

4. MI 犬の血清中脂肪酸組成の検討 (第5章)

MI 犬における血清脂肪酸組成の変化について検討する目的で、MI 犬 30 頭を International Small Animal Cardiac Health Council の心機能分類にしたがってステージ I、II そして III の3つの群に分類し、それらの血清中脂肪酸の濃度、重量比および脂肪酸比率を健常群と比較した。そして、申請者は血清中脂肪酸と心エコーパラメーターとの相関関係についても調べた。さらに、MI と健常犬との間で EPA および EPA とアラキドン酸の比(EPA/AA)の ROC 解析を行い、それらのカットオフ値を求めた。その結果、すべての MI 犬の脂肪酸濃度は参照値の範囲内であったが、I 群と II 群の AA 濃度は、健常群に比べ有意(それぞれ $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)に低値であった。II 群と III 群の EPA 濃度と重量比は、健常群に比べ有意に低値であった(それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。また、

II 群と III 群の EPA/AA は、健常群よりも有意(それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$)に低値であった。これらのことから、AA のみが低下していた I 群では軽度の容量負荷においても心筋では AA 代謝の活性化が起こっていると考えられ、II 群における EPA と AA の低下は、AA の代謝活性化に追隨して EPA の代謝が活性化したと推察した。そして、これらの変化は慢性心不全で上昇する腫瘍壊死因子- α やインターロイキン-1 などのサイトカインが関与していると考えられた。さらに、III 群ではこれらサイトカインの関与が影響し、EPA のさらなる代謝の活性化により AA の活性が抑制されたことが推察された。

心エコーパラメーターとの検討では、AA とドコサテトラエン酸の濃度は左室拡張末期径指数との間に有意な正の相関を認めた。そして、DPA 濃度は、左室内径短縮率(FS)との間に有意な負の相関を認めた。DPA の重量比は、左房径/大動脈径比(LA/Ao)および FS との間に有意な負の相関を認めた。さらに、EPA/AA は、LA/Ao との間に有意な負の相関を認めた。以上のことから、血清中脂肪酸では、左室の拡張に伴い炎症促進性エイコサノイドの基質である n-6 系脂肪酸が増加し、僧帽弁逆流の増加を示唆する FS や LA/Ao の上昇に伴い炎症抑制性エイコサノイドの基質である n-3 系脂肪酸および EPA/AA が低下することが明らかとなった。このことから、血清中脂肪酸は心不全の病態の進行に伴う心筋エネルギー代謝の変化を反映することが示唆された。

次に、MI 犬に対する治療補助として使用されている脂肪酸サプリメントの投与時期を判断するために求めた EPA 濃度のカットオフ値は $47.5 \mu\text{g/mL}$ であり、感度と特異度はともに 83.33%であった。一方、EPA/AA のカットオフ値は 0.029 であり、感度は 83.33%そして特異度は 66.67%であった。これらの値は本研究で提示した健常犬の参照値の下限であり、MI を中心とした慢性心不全犬で EPA を含有する脂肪酸サプリメントの投与時期を決定する指標として有効であると考えられた。今後さらに、これらの指標をもとにした EPA の投与による臨床的効果と血清中脂肪酸組成の関連を明らかにする必要があると考えられる。

以上のように、本論文は僧帽弁閉鎖不全症犬における血清中脂肪酸組成の変動を検討するために、これまで測定系が煩雑であった血清中脂肪酸測定の方法で安定した方法を確立し、それをもとの確かな採血のタイミングを示した。さらに、健常犬における血清中脂肪酸組成の参照値を示しており、今後犬の各種疾患における血清中脂肪酸組成を検討する上で有用なデータであると考えられる。そして、僧帽弁閉鎖不全症犬で病態初期には炎症促進性エイコサノイド基質が減少し、それに引き続き炎症抑制性エイコサノイド基質が減少すること明らかにしており、治療の補助として脂肪酸が有用である可能性を示しており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。