

がんを罹患したイヌにおける血漿遊離アミノ酸濃度の変動
(Changes in plasma free amino acids concentration in dogs with cancer)

小野沢 栄里

がんを罹患したイヌにおける血漿遊離アミノ酸濃度の変動
(Changes in plasma free amino acids concentration in dogs with cancer)

小野沢 栄里

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医保健看護学専攻博士後期課程平成 26 年入学

(指導教員：左向 敏紀)

平成 29 年 3 月

目次

序論・・1

第1章 イヌにおける血漿遊離アミノ酸濃度測定の基礎的研究・・・・・・・・6

緒言・・7

第1節 イヌの血漿遊離アミノ酸濃度測定における LC/MS の
信頼性および再現性の検討

材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10

供試動物

同時再現性の検討

日差再現性の検討

希釈直線性の検討

測定方法および測定項目

統計解析

結果・・13

考察・・15

第2節 イヌの血漿遊離アミノ酸濃度測定における適切な採
血時間の検討

材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

供試動物

採血プロトコールおよび検体処理方法

測定方法および測定項目

統計解析

結果・・20

	考察	22
	小括	25
	図および表	26
第2章	イヌにおけるがんの罹患およびがんの種類による血漿遊離アミノ酸濃度の変動	46
	緒言	47
第1節	がんを罹患したイヌと健常犬の血漿遊離アミノ酸濃度の比較	
	材料および方法	49
	供試動物	
	採血プロトコールおよび検体処理方法	
	測定方法および測定項目	
	統計解析	
	結果	51
	考察	52
第2節	がんの種類別における血漿遊離アミノ酸濃度の変動	
	材料および方法	57
	供試動物	
	統計解析	
	結果	58
	考察	60
	小括	70
	図および表	72

第3章	がんを罹患したイヌにおける治療前後の血漿遊離アミノ酸濃度の変動	89
	緒言	90
	材料および方法	91
	供試動物	
	使用した抗がん剤	
	採血プロトコールおよび検体処理	
	測定方法および測定項目	
	統計解析	
	結果	93
	考察	95
	小括	98
	図および表	99
	総括	106
	謝辞	110
	参考文献	111

序論

腫瘍とは、体表や体内にできる組織の塊のことをいい、異常な細胞が過剰に増えることにより発生する。腫瘍はその成長や良性、悪性などの特性によって分類される。良性腫瘍は転移せず、他の組織への浸潤よりも細胞数の拡大が局所に限定して増大する傾向がある。そのため、予後は良好であるとされている。一方、悪性腫瘍（以降がん）は生体内の細胞が異常かつ無制限に増殖する病気と定義されている。がんの種類にもよるが、がん細胞が無制限に異常増殖し、隣接する正常組織への浸潤や他臓器への遠隔転移を起こすことが特徴である。これらは根治的な治療を施さなければ、予後は不良であり最悪の場合は死亡する。がんは大きく分けると上皮性腫瘍と非上皮性腫瘍およびその他のがんに分類される。上皮性腫瘍は皮膚や消化管、肝臓および腎臓などの上皮に発生する腫瘍であり、腺癌、扁平上皮癌、移行上皮癌および肝細胞癌などがある。非上皮性腫瘍は筋肉や骨、造血組織、脂肪などの上皮以外の場所から発生する腫瘍であり、肉腫、線維肉腫、骨肉腫および血管肉腫などがある。がんを罹患した動物の治療および予後は、その性質や広がりによって決まる。そのため、がんの種類を把握し、がんの組織学的タイプやグレードを分け、診断をすることが非常に重要である。がんの治療法には外科療法、放射線療法および化学療法の大きく分けて 3 つの方法がある。外科治療は、血液のがんを除いて、手術で除去することができる場合はほとんどのがんで対象となる。外科療法は腫瘍の容積を大幅に減らすことが出来る最も有効な手段であり、がん治療の集学的治療において中核を担う最も選択される局所療法である。放射線治療は、腫瘍の成長を遅らせることや、腫瘍を縮小させるために、X 線や γ 線および電子線などの放射線を用いた治療法である。放射線は細胞の DNA に直接作用し、細胞分裂能力の抑制やアポトーシスを誘導させることでがん細胞を殺滅させる。そのため、がん細胞に侵された臓器の

機能や形態の温存ができる局所療法とされている。化学療法は、抗がん剤を用いてがん細胞の増殖を抑制することで再発および転移を防ぎ、広範囲に治療することが可能な全身療法の一つである。化学療法は、抗がん剤単独で治療する場合と、外科療法や放射線療法と組み合わせて実施される場合がある。がんに関する研究の歴史は古く、がんの治療法や予防、疫学的調査など様々な研究が世界中で行われてきた。そのため、がんの基礎的研究は大幅に進み、現在はがんの検査や診断、治療法の進歩により、早期発見や早期治療に加え、多くのがんが治療可能となり、完治や生存期間の延長が認められるようになってきた。しかし、日本においてヒトおよびイヌのがんは、死亡原因が第一位の疾患であり【平成27年度 人口動態統計月報年計（概数）の概要、Inoue M *et al.*, 2015】、アメリカやイギリスなど日本以外の国においても、イヌのがんは最も一般的な死亡原因である【Bronson RT *et al.*, 1982】。世界中でがんに関する研究が盛んに行われているのにも関わらず、がんによる死亡が死亡原因第一位であり続けている。近年では特にがんの早期発見および治療が重要視されている。

近年、網羅的な生体分子についての情報である「オミックス」が注目されている。オミックスとは、生体内にある分子全体を網羅的に調べる学問のことである。生体内で起こる事象を包括的に調べるオミックス解析は、遺伝子（ゲノム）を網羅的に解析するゲノミクス、タンパク質（プロテオーム）を網羅的に解析するプロテオミクス、mRNA（トランスクリプトーム）を網羅的に解析するトランスクリプトミクス、代謝産物（メタボローム）を網羅的に解析するメタボロミクスがある。このオミックス解析に用いられる測定法および解析技術が発展し、対象となる分子の網羅的情報を元に、その分子の違いや共通点から全体を把握することが可能となった。様々なオミックス研究の中でも、メタボロミクス解析は最も新しい分野であり、近年注目を集めている。メタボロミクスは他のオミックス解析と比較して、対象とする物質が少ない、対象とする物質が低分子、生体内での事象を直接的に観察可能およ

び動物種特異性が無いという特徴がある。ヒトにおいて、メタボロミクス解析技術を用いた研究報告が近年増加しており、代謝産物のなかでも特にアミノ酸は生体内において一定にその濃度が保たれているため、生体内で起こる様々な事象の変化を捉えやすく、メタボロミクス研究の対象となることが多い【Zhang Q *et al.*, 2006; Newgard CB *et al.*, 2009; Miyagi Y *et al.*, 2011; Wang TJ *et al.*, 2011; Shah SH *et al.*, 2012】。

アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基から構成されている有機化合物であり、ヒトをはじめとした生物において、身体を構成する要素となるだけでなく、生体内においてエネルギー源となるほか、様々な酵素の主成分として体内での代謝に重要な働きを担っている。天然には何百ものアミノ酸が存在するが、一般的に 20 種類のアミノ酸が生体タンパク質を構成するとされている。植物はタンパク質を構成している 20 種類のアミノ酸を合成できるが、人間を含む多くの動物はその一部が体内で合成できないため食物から摂取する必要がある。そのためイヌではアルギニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジン、ヒスチジンおよびスレオニンの 10 種は必須アミノ酸と呼ばれている。一方、グリシン、アラニン、セリン、システイン、チロシン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンおよびグルタミンの 10 種は非必須アミノ酸と呼ばれ体内で合成することができる。生体内のアミノ酸は筋肉や肝臓など様々な組織に遊離アミノ酸として存在しており、これら遊離アミノ酸はアミノ酸プールと呼ばれている。血漿中のアミノ酸 (Plasma free amino acids: PFAAs) もアミノ酸プールの一部であり、その濃度は健康な場合は正確に制御され、ほぼ一定に保たれている。全身のアミノ酸は、摂取タンパク質の分解、体タンパク質の分解、非必須アミノ酸の合成とタンパク質合成などの動的平衡状態にある。PFAAs を調べることはその動態と平衡状態を知ることであり、臨床的に極めて重要となる。つまり、PFAAs は健常時と疾患罹患時の変化を捉えや

すだけでなく、PFAAs を網羅的に測定することで、その他の代謝産物を含む代謝全体の変化や異常を予測することが可能である。医学領域において、PFAAs の測定は主に液体クロマトグラフィー質量分析計 (Liquid Chromatography Mass Spectrometry: LC/MS) が用いられている。LC/MS による測定技術が発展したことにより、分析および解析時間が大幅に短縮された。近年、この LC/MS を用いてがんや糖尿病、肝疾患、肥満などで PFAAs を測定し、その変化を解析した報告が多くされている【Zhang Q *et al.*, 2006; Newgard CB *et al.*, 2009; Miyagi Y *et al.*, 2011; Wang TJ *et al.*, 2011; Shah SH *et al.*, 2012; Yamakado M *et al.*, 2012】。これらの報告の中で PFAAs の測定は、様々な疾患のリスク評価、早期発見や治療効果の判定および栄養状態の把握に用いられる。また、生体内のアミノ酸代謝の変化を理解することは、疾患の病態生理を解明することに繋がると示唆されている。医学領域では、様々な疾患の中でも特にがんと PFAAs の関係に関する報告が多数されており、PFAAs を網羅的に測定することで、がん細胞のアミノ酸代謝を包括的に理解することが可能となった。その他、がんによって変化するアミノ酸の存在や、がん細胞や宿主の生体内で起こるアミノ酸代謝の変化が明らかとなっている【Miyagi Y *et al.*, 2011; Luo Y *et al.*, 2014】。最近ではがんのスクリーニングとして、アミノ酸を変数として多変量解析を行い、がんであるリスクをスコア化して評価するアミノインデックス検査が臨床的に応用されている【Miyagi Y *et al.*, 2011】。しかし前述した通り、PFAAs の測定技術が発展し、ヒトにおける研究報告が飛躍的に増えているにもかかわらず、獣医学領域においては PFAAs を網羅的に測定した報告はほとんどない【Ikeda K *et al.*, 2002; Azuma K *et al.*, 2012】。また、先行研究のほとんどが高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) を用いた報告であり、LC/MS を用いて PFAAs を網羅的に測定した報告はない【Ikeda K *et al.*, 2002; Azuma K *et al.*, 2012】。先行研究では質量分析計を用いていないため、分析できる PFAAs の種類が限

られており、低分子の PFAAs や分子量の類似した PFAAs の判別ができず、詳細なアミノ酸代謝の解析ができていない。また、がんと PFAAs の関係や治療による PFAAs の変化を示した報告はほとんどない【Azuma K *et al.*, 2012】。そのため、がんを罹患したイヌにおけるアミノ酸代謝機構に関する知見が非常に少ない。そこで本研究では、がんを罹患したイヌにおいて PFAAs の変動を調査し、がんと PFAAs の関係性を示す新たな知見を得ることを目的とした。

本研究目的を達成するために、本論文では以下の構成で研究を実施した。

第 1 章は、イヌにおける PFAAs 測定のための基礎的研究として、第 1 節でイヌの血漿遊離アミノ酸濃度の測定における LC/MS の再現性および信頼性の検討を行った。次いで第 2 節では、PFAAs は食事の影響を受けて変動するため、食事の影響を受けない適切な採血時間を検討した。

第 2 章は、第 1 節でがんを罹患したイヌと健常犬の PFAAs を比較し、変動する PFAAs を調査した。次いで第 2 節ではがんの種類によって変動する PFAAs を調査した。

第 3 章は、代表的な 3 種類のがん治療法の中で、全身療法のひとつである化学療法が推奨されている移行上皮癌を罹患したイヌに着目し、移行上皮癌罹患犬における化学療法前後の PFAAs の変化を調査した。

第 1 章

イヌにおける血漿遊離アミノ酸濃度測定の基礎的研究

緒言

メタボロミクス研究では主に、LC/MS や、ガスクロマトグラフ質量分析計 (Gas Chromatograph Mass Spectrometry: GC/MS) およびキャピラリー電気泳動質量分析計 (Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry: CE-MS) が用いられている。測定対象とする物質の特性からこれらの機器を使い分けているが、ヒトの PFAAs 測定には LC/MS が適しており、がんと PFAAs の関係に関する研究においても LC/MS を用いて測定している報告が多い【Miyagi Y *et al.*, 2011; Zhao Q *et al.*, 2014】。一般的に LC では試料中の各成分の固定相と移動相に対する親和性 (保持力) の差によって成分を分離し、成分の性質によって UV、蛍光などで検出する。一方、MS は試料成分を様々な方法でイオン化させ、得られたイオンを真空中で質量と電荷の比 (m/z) によって分離し、各イオンの強度を測定する高感度な検出法である。これらふたつの要素を兼ね備えた装置が LC/MS である。LC/MS で測定することにより HPLC で分離が不十分な物質も定量分析をすることが可能であるため、より詳細に代謝産物を分析することが出来る。イヌの PFAAs に関する研究では HPLC を用いたものしかなく【Ikeda K *et al.*, 2002; Azuma K *et al.*, 2012】、LC/MS を用いて PFAAs を網羅的に測定かつ詳細に解析した報告はない。

医学領域において、アミノインデックス技術を用いた PFAAs の検査は、空腹時で午前中に採血をするという条件が設定されている。人間ドックで健康と判定された健常者のサンプルがアミノインデックス検査のコントロールとして用いられている。コントロールサンプルは人間ドックを受ける際に同時に採取されたサンプルであり、人間ドックは検査前日の夕食以降は絶食し、検査当日は空腹時で午前中から検査を開始するため、コントロールの条件と合わせる為に前述のような条件が設定されている。また、夜に高タンパク質食を摂取した場合、翌朝になっても PFAAs が空腹時の値に戻らず、

PFAAs は食事の影響を受けるという報告がされている【Nishioka M *et al.*, 2013】。この研究によると、食事の影響を受けた状態で PFAAs を測定すると、がん患者と似た変化が現れ、偽陽性を示す可能性が高いと報告されている。そのため検査の際の前日は高タンパク食やアミノ酸飲料などの摂取は避け、夕食から 12 時間以上経過したのちに採血を行うべきとされている。獣医学領域においては、PFAAs を網羅的に測定した報告が少なく、臨床的に PFAAs 測定が検査の一つとして応用されていないため、ヒトのような測定条件は設定されていない。HPLC を用いてイヌの PFAAs (18 種類) を、食後 9 時間まで経時的に測定した先行研究において、アラニン、アルギニン、アスパラギン、ヒスチジン、リジン、フェニルアラニン、セリン、スレオニンおよびトリプトファンは食後 1-4 時間でピークを迎え、食後 9 時間までに食前の値まで低下した。しかし、食後 9 時間を経過しても食前の値まで回帰しない PFAAs (グルタミン酸、グリシン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、チロシンおよびバリン) も認められたと報告されている【Ikeda K *et al.*, 2002】。さらに、シスチンとメチオニンは食後にピークを迎えることなく 9 時間後まで一貫して変化がなかったことから、この 2 種類の PFAAs は食事の影響を受けないということも明らかとなっている【Ikeda K *et al.*, 2002】。しかし、先行研究で調べられている PFAAs の種類が 18 種類と限られているだけでなく、食後 9 時間までしか調べられておらず、食後 9 時間以降の PFAAs の変化は明らかとなっていない。獣医領域において PFAAs 測定の臨床応用を考えた場合、食事の影響を受けない時間に採血をしなければならない。そのため食事前後における PFAAs の変化を調べ、食後何時間経過した後に採血を実施することが適切か明らかにする必要がある。

そこで第 1 章では、イヌの血漿を用いた PFAAs 測定における基礎的研究として以下の内容で本研究を実施した。

第 1 節として、イヌのプール血漿を用いて①同時再現性 ②日差再現

性 ③希釈直線性の検討を行い、イヌの PFAAs 測定における LC/MS の信頼性および再現性の検討を行った。

第 2 節として、イヌの PFAAs 測定における適切な採血時間を検討した。

第1節 イヌの血漿遊離アミノ酸濃度測定における LC/MS の信頼性および再現性の検討

材料および方法

供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門で飼育管理されている健常犬 5 頭 (犬種: ビーグル、年齢: 4-8 歳、性別: 去勢雄 4 頭、避妊雌 1 頭、体重: 9.9-13.8 kg、Body Condition Score (BCS): 4-5/9) を用いた。これらのイヌはあらかじめ一般身体検査、完全血球計算および血液化学検査にて健常と判断されているものを用いた。また、全個体とも室温、湿度、照明を適切に管理された施設内で 1 個体ずつ単独飼育した。食事は成犬用総合栄養食であるセレクトスキンケア (ROYAL CANIN JAPON Inc, Tokyo, Japan) を、現在の体重が維持できるように、安静時エネルギー要求量 ($RER=B.W^{0.75} \times 70$) $\times 1.2-1.6$ kcal を 1 日 2 回に分けて与え、自由飲水で管理した。各イヌのプロフィールは Table 1 に示す。

採血ポイントおよびサンプル調整方法

ヒトにおける PFAAs 測定の条件を参考にし、12 時間以上絶食させた早朝に、頸静脈より 1 頭あたり 5 mL ずつ採血を行った。得られた血液はエチレンジアミン四酢酸 2 カリウム塩 (EDTA-2K) により抗凝固処理を行った。その後直ちに 4°C、3,000 rpm、10 min 遠心機にかけ血漿を分離した。

遠心後に各検体の血漿をそれぞれ 2.5 mL ずつ 50 mL 遠心管に入れプール血漿を作成した。測定までは -80°C で冷凍保存した。作成したプール血漿を以下の方法に従って同時再現性、日差再現性、希釈直線性を調べた。

① 同時再現性の検討

プール血漿を 0.5 mL ずつ 1.5 mL のマイクロチューブに分注し、計 10 本作製し同時に全検体を測定した。

② 日差再現性

プール血漿を 0.5 mL ずつ 1.5 mL のマイクロチューブに分注し、計 8 本作製した。1 週間ごとに 1 検体ずつ測定を行い、計 8 週間における測定結果の差異を観察した。各測定までは-80℃で冷凍保存した。

③ 希釈直線性

4 本のマイクロチューブに生理食塩水 0.5 mL をあらかじめ入れておき、プール血漿から 0.5 mL とり、それぞれ 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に段階希釈した。これらの希釈した血漿は直ちに測定した。

PFAAs 測定

PFAAs の測定は全て富士フイルムモノリス株式会社に委託し、分析装置は LC/MS を用いた。

測定した PFAAs

測定した PFAAs の種類は、医学領域における様々な研究で測定されており、さらに生体内におけるアミノ酸代謝が明らかとなっている 39 種類の PFAAs を対象とした。

必須アミノ酸: スレオニン (Thr)、バリン (Val)、メチオニン (Met)、イソロイシン (Ileu)、ロイシン (Leu)、フェニルアラニン (Phe)、ヒスチジン (His)、トリプトファン (Trp)、リジン (Lys)、アルギニン (Arg)

非必須アミノ酸: アスパラギン酸 (Asp)、セリン (Ser)、アスパラギン (Asn)、グルタミン酸 (Glu)、グルタミン (Gln)、プロリン(Pro)、グリシン (Gly)、アラニン (Ala)、チロシン (Tyr)

その他のアミノ酸: シスチン (Cystine)、シスタチオニン (Cysthio)、タウリン (Tau)、ヒドロキシプロリン (Hypro)、サルコシン (Sar)、 α -アミノアジピン酸 (α -AAA)、シトルリン (Cit)、 α -アミノ酪酸 (α -ABA)、 γ -アミノ β -ヒドロキシ酪酸 (γ -A β -HBA)、 β -アラニン (β -Ala)、 β -アミノイソ酪酸 (β -AIBA)、 γ -アミノ酪酸 (γ -ABA)、モノエタノールアミン (MEA)、ホモシスチン (Homocys)、3-メチルヒスチジン (3-Me His)、1-メチルヒスチジン (1-Me His)、カルノシン (Carno)、アンセリン (Ans)、ヒドロキシリジン (Hylys)、オルニチン (Orni)の 39 種類を測定した。全ての PFAAs の単位は nmol/mL で表記した。

結果

同時再現性では測定した全ての PFAAs において変動係数 (Coefficient of variation: CV) が 15%以内であった[Table 2]。

日差再現性ではタウリン、アスパラギン、セリン、グルタミン酸、グルタミン、プロリン、グリシン、アラニン、チロシン、スレオニン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、シトルリン、ヒスチジン、トリプトファン、リジン、アルギニン、ヒドロキシプロリン、シスタチオニン、サルコシン、 α -アミノアジピン酸、 α -アミノ酪酸、3-ヒドロキシ 4-アミノ酪酸、 β -アラニン、 β -アミノイソ酪酸、 γ -アミノ酪酸、ホモシステイン、3-メチルヒスチジン、1-メチルヒスチジン、ヒドロキシリジン、オルニチン、モノエタノールアミン、カルノシンおよびアンセリンでは CV は 15%以内であった。シスチンの CV は 66%であった [Table. 3]。

希釈直線性ではタウリン、スレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、メチオニン、チロシン、イソロイシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、リジンおよびアルギニンにおいて原点を通る直線が得られた ($P < 0.05$)。一方、アスパラギン酸、アスパラギン、ヒドロキシプロリン、グルタミン酸、オルニチン、 α -アミノアジピン酸、シスチン、シスタチオニン、モノエタノールアミン、カルノシン、トリプトファン、3-メチルヒスチジン、シトルリン、 α -アミノ酪酸および 1-メチルヒスチジンにおいて、原点を通る直線にはならなかったが、全ての PFAAs における P 値は 0.05 以下であった[Table 4, Fig. 1]。

考察

同時再現性では測定した全ての PFAAs の CV が 15%以内と良好な結果が得られ、同時再現性が得られたと考えられた。

日差再現性では採血日から 1 週間毎に計 8 週間の値を測定したが、8 週間後の CV がシスチンにおいて 66.5%と 15%を大幅に超える結果となった。その他の PFAAs の CV は全て 15%以内であり、良好な結果が得られた。シスチンは 8 週目まで値の増減が大きく、特に採血から 1 週目で大幅に低下し、3 週目で大幅に増加した[Table 4]。冷凍保存していても安定した測定値を得ることができないことが明らかとなった。そこで、シスチンを測定する場合は採血後、直ちに検体を処理し、1 週間以内に測定をする必要があると考えられた。

希釈直線性の検討では、アスパラギン酸、アスパラギン、ヒドロキシプロリン、グルタミン酸、オルニチン、 α -アミノアジピン酸、シスチン、シスタチオニン、モノエタノールアミン、カルノシン、トリプトファン、3-メチルヒスチジン、シトルリン、 α -アミノ酪酸および 1-メチルヒスチジン以外の PFAAs は原点を通る直線性を得ることが出来た。アスパラギン酸、アスパラギン、ヒドロキシプロリン、グルタミン酸、オルニチン、 α -アミノアジピン酸、シスチン、シスタチオニン、モノエタノールアミン、カルノシン、トリプトファン、3-メチルヒスチジン、シトルリン、 α -アミノ酪酸および 1-メチルヒスチジンは原点を通らず、直線性が得られなかった。直線性が得られなかった PFAAs は、元々の血中濃度が微量であり、希釈倍率が高くなるにつれて検出限界値未満となってしまったためと考えられた。

以上より、イヌの PFAAs の測定において LC/MS の信頼性および再現性が得られたと考えられた。

先行研究でイヌの PFAAs を測定する際に用いている機器は HPLC が

ほとんどであり【Ikeda K *et al.*, 2002; Azuma K *et al.*, 2012】、測定できる PFAAs の種類が LC/MS を用いたときより少ない。HPLC による測定のみでは、MS を用いることで測定できる微量な PFAAs を捉えることは難しい。アミノ酸代謝を詳細に調べるためには、多くのアミノ酸に関連する情報が必要である。そのため、イヌにおいてもヒトと同様に、LC/MS を用いて網羅的に PFAAs を測定することが有用であると考えられた。

第 2 節 血漿遊離アミノ酸濃度測定における適切な採血時間の検討

材料および方法

供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門で飼育管理されている健常犬 6 頭 (犬種: ビーグル、年齢: 4-8 歳、性別: 去勢雄 3 頭、避妊雌 3 頭、体重: 9.6-13.6 kg、BCS: 4-5/9) を用いた。健常と診断するための検査項目および、使用したイヌの飼育環境に関しては、第 1 節と同様である。食事は成犬用総合栄養食であるセレクトスキンケア (ROYAL CANIN JAPON Inc, Tokyo, Japan) を安静時エネルギー要求量 ($RER=B.W^{0.75} \times 70$) $\times 1.2-1.6$ kcal を 1 日 2 回に分けて午前 8 時と午後 8 時に給与し、自由飲水で管理した。各イヌのプロフィールは Table 5 に示す。

供試フード

本研究では、一般家庭で与えられている食事を考慮し、総合栄養食であるセレクトスキンケア (ROYAL CANIN JAPON Inc, Tokyo, Japan) を使用した。セレクトスキンケアは主に食物アレルギー皮膚疾患および消化器疾患のイヌのための総合栄養食で、含有されている蛋白質量は乾物重量で 25% であり、ペットフードの栄養基準を設定している全米飼料検査官協会 (Association of American Feed Control Official: AAFCO) の定める蛋白含有量の基準である 18%以上を満たしている。

供試フードの成分表は Table 6 の通りである。

採血プロトコール

本実験では、食事の有無に影響を受ける PFAAs を調べるために、Study1 として午前 8 時から午後 8 時までの食事前後における PFAAs の変化を調査した。次いで臨床現場における適切な採血時間を検討するためには、検査前日に摂取した食事の影響が翌日まで継続するか調べる必要がある。そこで Study2 は午後 8 時から翌日午後 12 時までの食事前後における PFAAs の変化を調査した[Fig. 1]。

試験前日、午前 8 時に 1 日分の食事を給与し、その後 24 時間絶食させることで、試験前の食事の影響を除外した。試験当日の食事は一般的な家庭における 1 日 2 回という食事回数を考慮し、午前 8 時および午後 8 時に給与した (1 回あたりの食事給与量: $RER \times 1.6 \times 1/2$ kcal)。試験当日の Study1 では、午前 8 時の食事給与前を 0 とし、0、食後 2、4、8、12 時間の 5 ポイントで採血を行った。ついで Study2 では、午後 8 時の食事給与後 12、14、16 時間の 3 ポイントで採血を実施した。Study1 および 2 を含め、計 8 ポイントで採血を実施した。それぞれのポイントにおいて、頸静脈より血液を 4 mL ずつ採取した。得られた血液は直ちに EDTA-2K により抗凝固処理を行った。その後 4°C、3,000 rpm、10 min 遠心機にかけ血漿を分離した。遠心後は血漿をマイクロチューブに分注し、測定までは -80°C で保存した。

PFAAs 測定

PFAAs の測定は全て採血から 1 週間以内に富士フイルムモノリス株式会社へ委託し、分析装置は LC/MS を用いた。

統計解析

統計解析ソフトは GraphPad Prism5 を使い、統計解析は One-Way ANOVA Repeated Measures test (Graph Pad Software, San Diego, CA,

USA) を用いた。One-Way ANOVA Repeated Measures test で有意差が認められた場合は、さらに Post-hoc-test (Newman-Keuls: Compare all pairs of columns) を用い、Study1 では午前 8 時の食事給与前 (0) と食後 2、4、8、12 時間 および Study2 では午後 8 時の食事給与前 (12) と食後 12 (グラフの表記は 24)、14 (26)、16 (28) 時間で比較した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなし* ($P < 0.05$)、** ($0.01 < P < 0.05$)、*** ($P < 0.01$)で示した。

結果

第 2 節では健常犬 6 頭を用いて計 8 ポイントにおいて採血を行い、食事前後における PFAAs の変化を調べた。39 種類測定した PFAAs のうち、測定した全時間において検出限界値未満となった 6 種類の PFAAs (γ -アミノ β -ヒドロキシ酪酸、 β -アミノイソ酪酸、 γ -アミノイソ酪酸、ホモシステイン、アンセリンおよび β -アラニン) を除いた 33 種類の PFAAs で検討した。

Study1

全ての PFAAs において One-Way ANOVA Repeated Measures test を用いて統計解析を行ったところ、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、3-メチルヒスチジン、シスタチオニンおよびシスチンを除いた 26 種類の PFAAs で統計学的に有意な変化が認められた [Fig. 3]。

タウリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン酸、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、3-メチルヒスチジン、1-メチルヒスチジン、ヒドロキシリジン、オルニチン、アルギニン、トリプトファンおよびシスタチオニンは午前 8 時の食事給与後 2 時間でピークを迎え、その後 12 時間までに食前の値まで回帰した。

ヒドロキシプロリン、セリン、サルコシン、 α -アミノアジピン酸、プロリン、グリシン、カルノシン、グルタミンおよびメチオニンは午前 8 時の食事給与後 4 時間でピークを向かえ、その後食後 12 時間までに食前の値にまで回帰した。

リジン、シトルリン、 α -アミノ酪酸およびモノエタノールアミンはそれぞれ午前 8 時の食事給与後それぞれ 2、4、8 と 12 時間でピークを向かえ、12 時間経過後も食前の値まで回帰しなかった。

Study2

全ての PFAAs において One-Way ANOVA Repeated Measures test を用いて統計解析を行ったところ、グルタミン、メチオニン、モノエタノールアミンおよびトリプトファンは、食事給与後 14 時間以降は有意な変化はなかった [Fig. 3]。

α -アミノ酪酸に関しては、食事給与後 16 時間以降は有意な変化はなかった [Fig. 3]。

その他の PFAAs に関しては、食事給与後に実施した採血ポイントにおいて、有意な変化は認められなかった [Fig. 3]。

考察

イヌにおいて、PFAAs は食事の影響を受けて変化することが知られている【Ikeda K *et al.*, 2002; Nishioka M *et al.*, 2013】。医学領域では、食事の影響を考慮して、検査前日の食事から 12 時間以上絶食した後、午前中に採血を行うと決められている。しかし、獣医学領域においてこのような条件設定はされていない。HPLC を用いて PFAAs を測定した先行研究では、食事給与から 9 時間後までしか測定されておらず、食後 9 時間以降の PFAAs の変化に関しては明らかとなっていない【Ikeda K *et al.*, 2002】。また、測定された PFAAs も 18 種類のみであり、先行研究で報告されていない PFAAs に関する食事前後の変化は明らかとなっていない。臨床現場において PFAAs 測定を実施する上で、正確に PFAAs を測定するためには、食事の影響を受けない時間帯に採血を実施する必要がある。そこで本研究では、イヌにおける PFAAs を測定する際の、適切な採血時間を検討するために、食事前後における PFAAs の変化を調べた。

本研究より、グルタミン酸、グルタミン、メチオニン、モノエタノールアミン、トリプトファンおよびリジンは Study1 では食事給与後 12 時間以降、Study2 では食事給与後 14 時間以降で有意な変化がなくなった。また、 α -アミノ酪酸は Study1 では食事給与後 12 時間以降、Study2 では食事給与後 16 時間以降で有意な変化がなくなった。このように、日中と夜間で変化が異なった PFAAs に関しては、朝と夜では活動性の違いからタンパク質代謝が異なる可能性が考えられた。日中と夜間で変動が異なる PFAAs に関しては、検査前日の夜食後は絶食にし、翌日の午前中に採血を実施するなど、ヒトと同様に採血時間に関する条件設定を行うことが望ましいと考えられた。

アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニンおよび 3-メチルヒスチジンにおいては、食事前後の変化は認められなかったため食事の

影響を受けないと考えられた。Study2 より検討した 33 種類の PFAAs のうち α -アミノ酪酸を除く 32 種類の PFAAs は、食時給与後 14 時間以降で有意な変化がなくなったことから、最低でも 14 時間は絶食することで食事の影響を受けずに PFAAs を測定する事ができると考えられた。 α -アミノ酪酸は食後 16 時間以上経っても食前の値との間に有意差が認められたことから、このアミノ酸に関してのみ絶食時間をさらに延ばして食事の影響を調べる必要があると考えられた。

以上より、イヌにおいて PFAAs を網羅的に測定する際は、検査前日夜の食事摂取から 14 時間以上経過していることおよび臨床現場における実用面を考慮すると、午前中に採血を実施することが適切であると考えられた。また、本章以降の実験では、PFAAs 測定の採血を実施するに当たり、食事の影響を長期間受ける α -アミノ酪酸は、患者動物の絶食時間（食後 16 時間以上）が長すぎると判断し、解析対象からはずすこととした。

小括

第 1 章では、イヌにおける LC/MS を用いた PFAAs 測定の基礎的研究とし、第 1 節では LC/MS の信頼性および再現性を検討した。同時再現性の検討を行ったところ、全ての PFAAs において CV は 15%以内であり、再現性が得られたと考えられた。日差再現性においては、シスチンで CV が 66% と高い値を示したため、採血後は直ちに検体を処理し、採血から 1 週間以内に測定することが望ましいと考えられた。希釈直線性は元々の血中濃度が低い PFAAs ほど、原点を通らず直線性が得られなかった。しかし、これは元の濃度の影響で希釈倍率が高くなるほど検出限界値未満となり、測定できなかったためと考えられた。以上より、イヌの血漿を用いた LC/MS の信頼性および再現性を得ることが出来た。

次いで、第 2 節では獣医領域において PFAAs の測定を臨床応用するため、食事の影響を受けない適切な採血時間を決定することを目的とした。イヌにおける食事前後の PFAAs の変化を調べたところ、食後 14 時間経過していれば、食事の影響を受けないことが明らかとなった。日中と夜間で食事前後の変化が異なる PFAAs が認められたことから、採血時間を臨床現場での実用面を考慮し、午前中と定め、検査前日に夜食を摂取してからは絶食で翌日採血を行うなど、採血時間の統一をするべきであると考えられた。 α -アミノ酪酸に関しては、長期間の絶食（食後 16 時間以上）を行わないと正確に測定が出来ないため、以降の実験では解析対象から除外した。

以上より、第 1 章で明らかとなった LC/MS における測定条件および採血条件を考慮し、第 2 章以降の実験を行った。

図および表

Table 1 第1節で使用した健常犬のプロフィール

	犬種	性別	年齢 (歳)	体重 (kg)	BCS (9段階)
Dog1	ビーグル	去勢雄	8	10.9	4
Dog2	ビーグル	去勢雄	6	11.8	4
Dog3	ビーグル	去勢雄	6	10.6	4
Dog4	ビーグル	去勢雄	4	13.8	5
Dog5	ビーグル	避妊雌	8	9.9	4

Table 2 健常犬のプール血漿を用いた PFAAs 濃度測定における同時再現性の検討

項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	SD	CV (%)
Thr	158.1	152.0	155.4	148.2	148.1	144.1	147.9	157.9	153.7	155.5	152.1	4.6	3.0
Val	139.3	141.7	137.0	142.9	139.0	139.1	145.9	135.3	145.1	139.2	140.5	3.2	2.3
Met	49.9	52.4	51.2	50.6	48.6	50.9	49.9	51.8	51.3	50.3	50.7	1.0	2.0
Ileu	50.7	52.2	53.1	50.6	53.6	51.2	52.5	52.8	53.3	50.3	52.0	1.2	2.2
Leu	97.8	102.4	100.1	94.5	100.8	101.4	97.4	100.7	96.6	98.0	99.0	2.4	2.4
Phe	45.2	48.4	46.0	47.1	48.2	47.7	49.9	48.8	49.6	47.5	47.8	1.4	2.9
His	69.2	68.1	72.8	69.3	70.0	71.5	70.4	70.0	75.3	74.0	71.1	2.2	3.1
Trp	50.6	53.9	53.3	54.5	53.3	53.2	52.7	51.9	54.2	52.9	53.1	1.1	2.0
Lys	138.3	133.7	128.0	129.5	127.5	134.0	128.1	127.5	132.4	130.3	130.9	3.4	2.6
Arg	120.2	116.2	119.3	116.5	122.0	114.7	125.3	117.5	122.0	132.4	120.6	5.0	4.1
Asp	3.4	3.4	3.4	3.4	3.6	3.6	3.2	3.1	3.3	3.4	3.4	0.1	4.3
Ser	105.0	101.7	104.6	102.1	101.9	105.4	100.7	105.0	103.3	106.8	103.7	1.9	1.8
Asn	38.1	36.7	38.1	37.2	39.5	39.2	38.9	38.6	38.7	37.2	38.2	0.9	2.3
Glu	27.8	28.1	27.4	26.9	26.8	26.1	27.0	26.7	27.5	26.2	27.1	0.6	2.3
Gln	632.9	659.5	654.0	646.0	654.0	654.4	665.4	621.5	665.6	646.9	650.0	13.2	2.0
Pro	113.1	117.3	116.3	118.6	112.7	119.7	118.2	118.4	116.8	115.4	116.7	2.2	1.9
Gly	220.8	214.6	216.3	217.7	214.9	216.7	217.4	219.9	214.3	212.4	216.5	2.5	1.1
Ala	334.1	339.6	326.2	334.5	338.3	336.1	338.8	332.5	330.2	329.4	334.0	4.2	1.3
Tyr	34.2	33.6	34.2	33.4	32.9	33.6	35.1	33.2	34.3	32.1	33.7	0.8	2.4
Cystine	6.4	6.5	5.7	5.4	5.1	5.6	5.7	5.1	7.6	6.1	5.9	0.7	12.2
Cysthio	4.7	5.7	4.7	5.1	5.3	5.0	5.1	5.4	5.7	5.2	5.2	0.3	6.4
Tau	94.3	98.3	94.5	96.3	97.5	96.2	95.0	90.7	95.9	97.7	95.6	2.1	2.2
Hypro	24.8	25.2	28.8	26.4	27.5	29.3	27.2	27.1	26.6	27.0	27.0	1.3	4.9
Sarco	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -AAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cit	70.0	72.7	70.6	73.7	67.5	74.1	67.0	67.7	66.7	64.4	69.4	3.1	4.5
α -ABA	13.8	13.8	13.4	13.4	13.2	12.9	13.6	14.8	14.3	14.4	13.8	0.6	4.1
γ -A β -HBA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -Ala	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -AIBA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
γ -ABA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEA	7.3	6.5	6.7	6.8	7.4	7.4	6.5	6.5	6.5	6.9	6.9	0.4	5.3
Homocys	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Me His	8.8	8.4	8.5	8.0	8.2	7.8	8.4	8.9	8.8	9.0	8.5	0.4	4.5
1-Me His	7.6	7.6	7.3	7.2	7.3	7.9	8.2	7.8	7.8	8.2	7.7	0.3	4.4
Carno	29.1	32.2	30.9	29.8	32.2	30.6	31.4	30.5	30.6	30.7	30.8	0.9	3.0
Ans	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hyls	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Orni	14.3	15.2	16.6	15.1	14.9	14.9	16.5	14.3	15.0	15.3	15.2	0.7	4.9

単位は全て nmol/mL で表記した

Table 3 健常犬のプール血漿を用いた PFAAs 濃度測定における日差再現性の検討

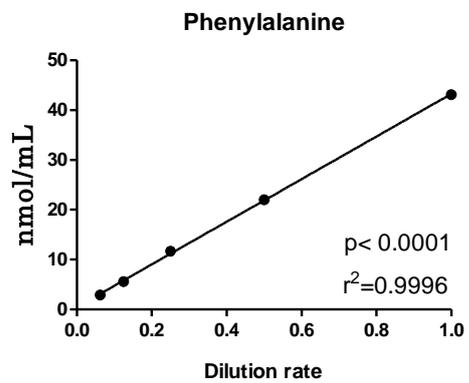
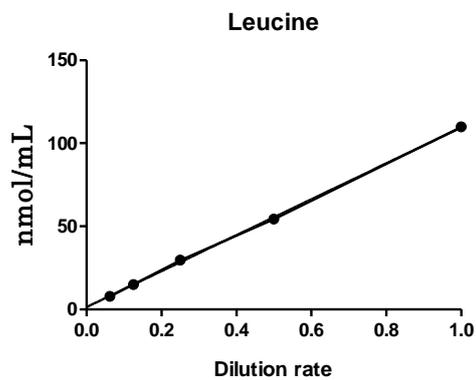
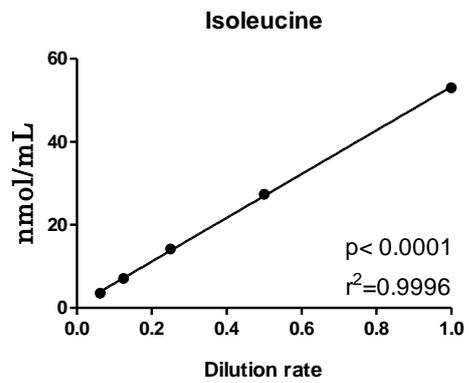
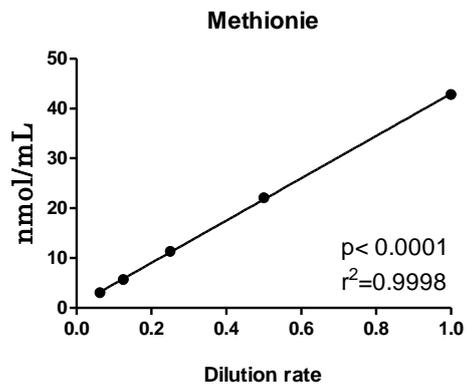
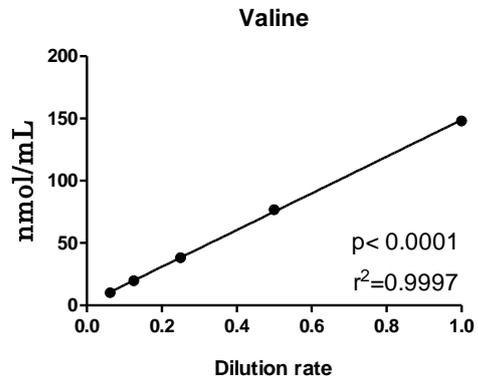
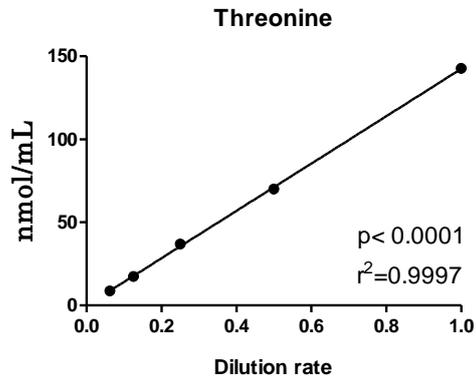
項目	0	1	2	3	4	5	6	7	8	平均	SD	CV (%)
Thr	152.6	140.6	149.4	148.8	152.4	154.8	152.0	155.7	153.6	151.1	4.3	2.8
Val	139.0	135.1	144.3	138.9	141.7	143.6	144.3	143.0	145.8	141.7	3.2	2.3
Met	53.2	48.5	49.7	51.9	49.9	48.2	53.1	49.1	52.4	50.7	1.9	3.7
Ileu	50.5	48.1	50.6	51.9	50.1	48.9	50.9	49.9	52.6	50.4	1.3	2.6
Leu	99.3	93.1	104.2	96.2	97.1	104.6	98.8	98.6	103.8	99.5	3.7	3.8
Phe	47.8	43.9	48.0	46.5	46.8	48.0	45.6	47.2	49.8	47.1	1.6	3.3
His	73.5	68.5	67.9	67.1	67.7	67.7	65.0	64.4	68.7	67.8	2.4	3.6
Trp	52.2	51.8	55.6	53.1	51.7	53.0	54.0	51.8	54.8	53.1	1.3	2.5
Lys	131.0	123.2	130.0	126.7	122.6	137.1	130.0	120.9	133.1	128.3	5.0	3.9
Arg	115.9	108.8	122.2	114.8	118.7	124.2	116.7	116.1	120.3	117.5	4.3	3.6
Asp	3.2	3.6	4.1	3.1	3.5	3.6	3.7	3.3	3.4	3.5	0.3	8.1
Ser	102.0	96.0	110.8	105.9	101.7	103.5	105.4	107.3	104.1	104.1	3.9	3.7
Asn	39.1	35.8	40.0	40.3	37.0	38.0	37.9	37.5	38.0	38.2	1.3	3.5
Glu	27.6	23.2	24.3	25.4	24.5	25.7	23.6	26.9	24.0	25.0	1.4	5.6
Gln	659.2	592.6	652.6	635.9	652.4	621.3	661.0	647.0	650.3	641.4	20.7	3.2
Pro	110.2	115.7	119.8	114.5	118.0	116.6	115.9	119.4	121.0	116.8	3.1	2.6
Gly	225.1	206.0	222.6	216.3	219.8	213.3	218.4	230.8	216.9	218.8	6.7	3.1
Ala	344.3	331.1	351.0	332.6	336.9	346.4	335.0	329.2	340.0	338.5	7.0	2.1
Tyr	31.7	33.6	33.2	33.2	33.8	33.6	32.5	33.9	34.5	33.3	0.8	2.3
Cystine	6.8	2.9	4.9	14.2	2.5	4.5	3.3	3.6	3.6	5.1	3.4	66.5
Cysthio	5.3	5.1	4.6	6.8	4.3	5.2	4.7	4.7	5.5	5.1	0.7	13.5
Tau	94.4	89.9	100.6	94.9	94.6	96.2	98.0	98.3	103.4	96.7	3.7	3.8
Hypro	27.5	25.6	27.9	30.3	25.8	25.2	26.7	29.9	26.9	27.3	1.7	6.3
Sarco	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -AAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cit	72.9	52.1	64.3	63.0	64.1	77.0	78.8	74.4	77.9	69.4	8.5	12.2
α -ABA	13.3	14.3	15.1	13.5	14.5	16.0	13.9	13.6	14.8	14.3	0.8	5.7
γ -A β -HBA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -Ala	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -AIBA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
γ -ABA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEA	7.1	6.4	5.8	6.7	6.9	7.1	6.7	6.5	6.5	6.6	0.4	5.7
Homocys	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Me His	8.1	8.1	8.4	7.4	7.1	9.0	7.8	7.3	7.8	7.9	0.6	7.1
1-Me His	7.7	7.6	7.7	6.9	7.3	6.2	7.7	6.8	7.0	7.2	0.5	6.9
Carno	31.2	29.0	30.8	28.9	31.6	31.7	32.2	32.4	30.9	31.0	1.2	3.8
Ans	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hyls	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Orni	15.1	14.5	17.0	15.3	16.1	15.9	16.5	15.2	15.9	15.7	0.7	4.6

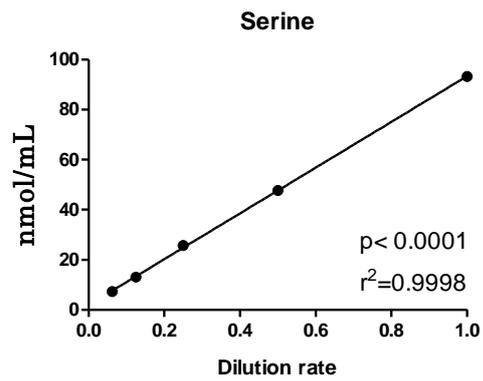
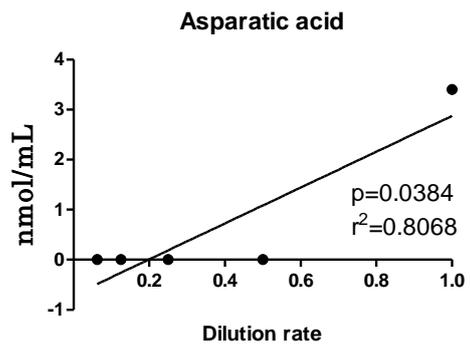
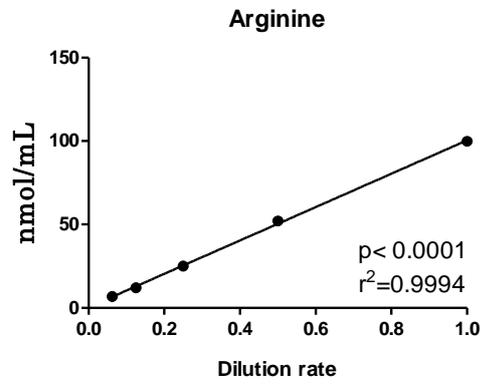
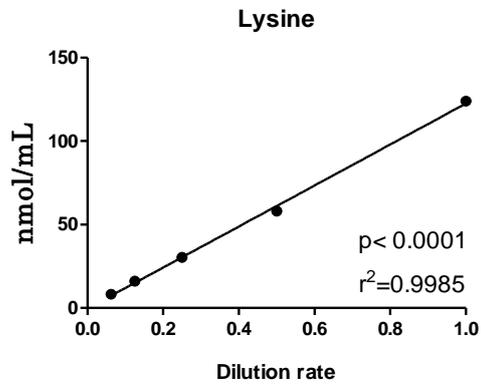
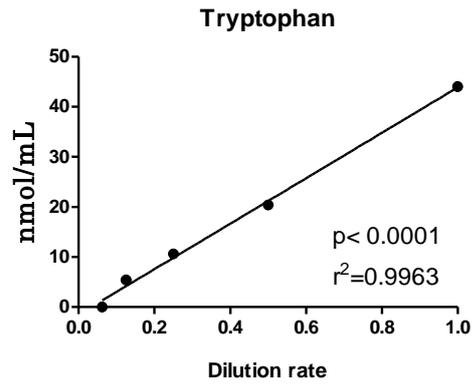
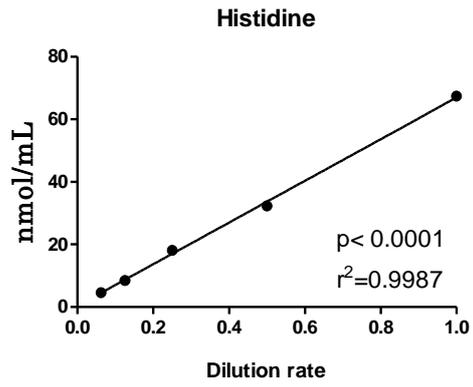
単位は全て nmol/mL で表記した

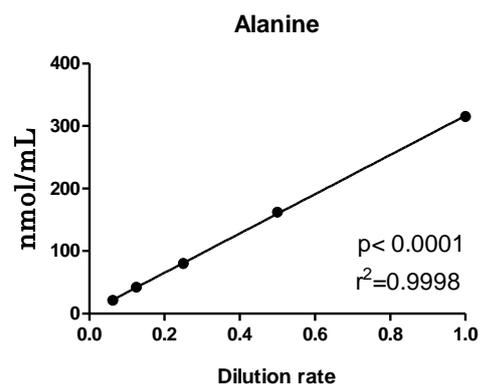
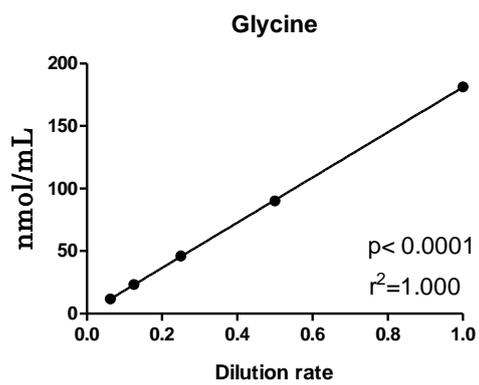
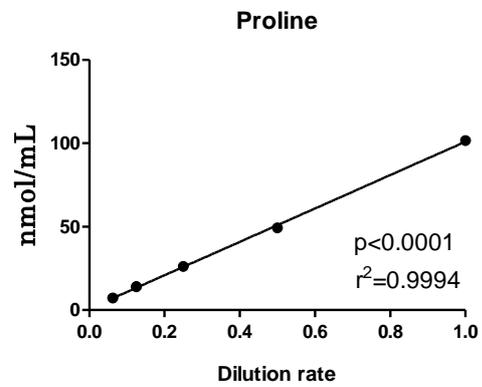
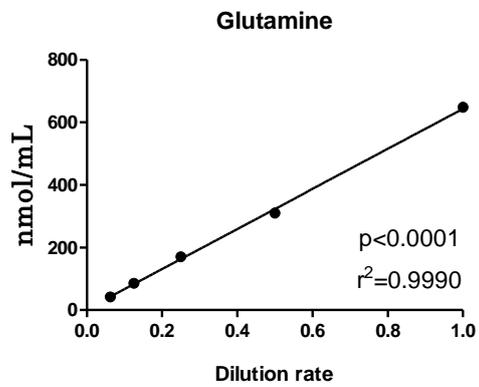
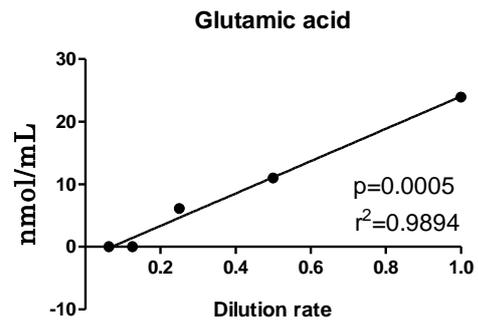
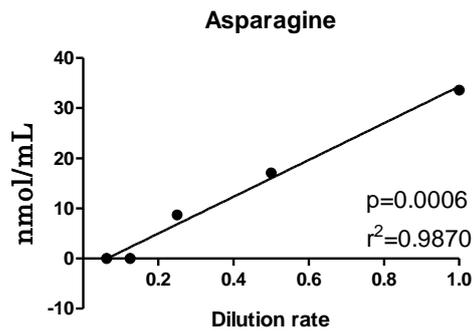
Table 4 希釈直線性の検討における実測値

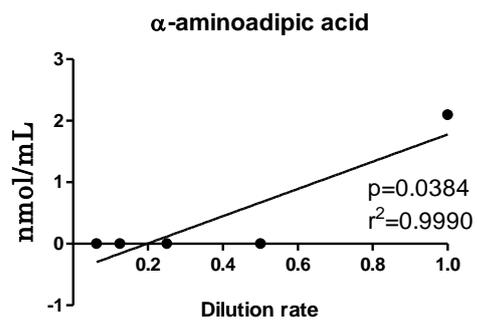
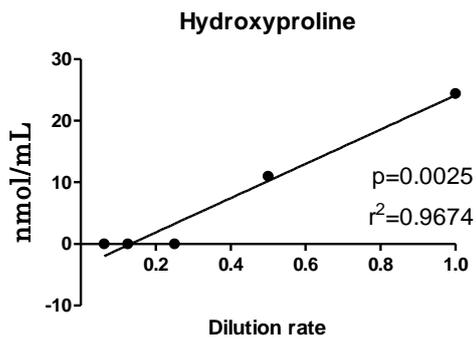
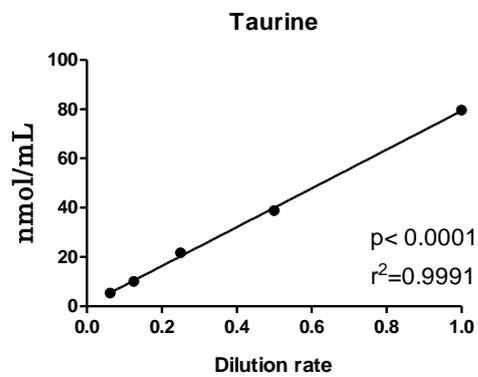
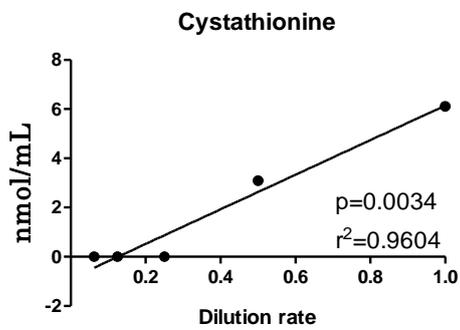
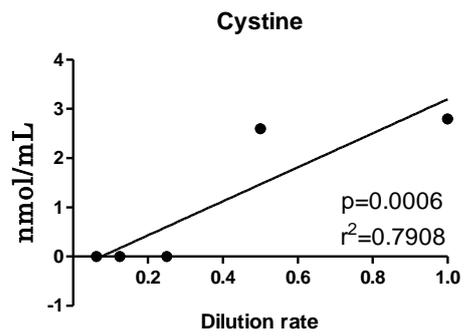
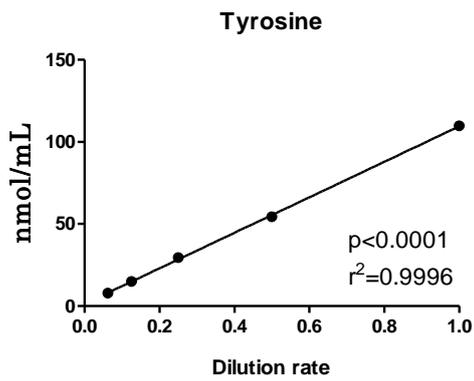
項目	希釈倍率				
	0	2	4	8	16
Thr	142.7	70.0	36.9	17.4	8.7
Val	148.1	76.7	38.3	19.7	10.0
Met	42.8	22.1	11.3	5.7	3.0
Ileu	53.0	27.4	14.2	7.1	3.5
Leu	109.8	54.3	29.5	14.9	7.8
Phe	43.1	22.0	11.7	5.6	2.9
His	67.4	32.3	18.1	8.5	4.6
Trp	44.0	20.4	10.6	5.4	0.0
Lys	123.9	58.0	30.3	16.0	8.2
Arg	99.8	52.0	25.0	12.1	6.8
Asp	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0
Ser	93.2	47.7	25.7	13.0	7.3
Asn	33.6	17.1	8.7	0.0	0.0
Glu	23.9	11.0	6.1	0.0	0.0
Gln	648.0	310.4	170.4	85.5	41.7
Pro	101.6	49.3	26.2	14.1	7.2
Gly	181.3	90.0	46.0	23.2	11.7
Ala	315.3	162.2	80.2	42.3	21.0
Tyr	32.7	15.9	8.2	4.2	2.3
Cystine	2.8	2.6	0.0	0.0	0.0
Cysthio	6.1	3.1	0.0	0.0	0.0
Tau	79.6	38.8	21.6	10.0	5.3
Hypro	24.4	11.0	0.0	0.0	0.0
Sarco	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -AAA	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Cit	52.6	27.6	14.5	7.2	0.0
α -ABA	20.5	11.1	5.8	0.0	0.0
γ -A β -HBA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -Ala	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -AIBA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
γ -ABA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEA	6.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Homocys	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Me His	8.5	4.4	0.0	0.0	0.0
1-Me His	7.6	0.0	0.0	0.0	0.0
Carno	31.1	16.0	7.6	0.0	0.0
Ans	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hylys	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Orni	13.4	7.0	3.8	0.0	0.0

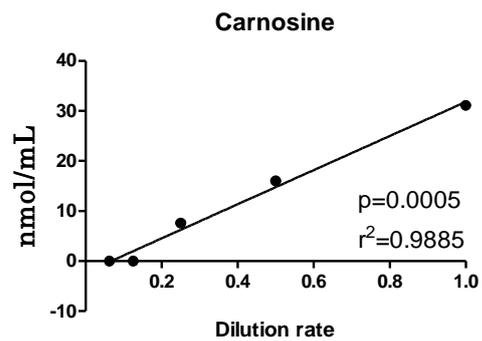
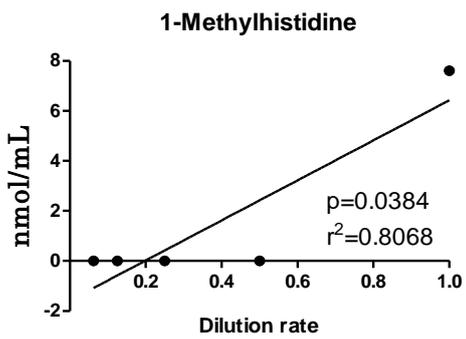
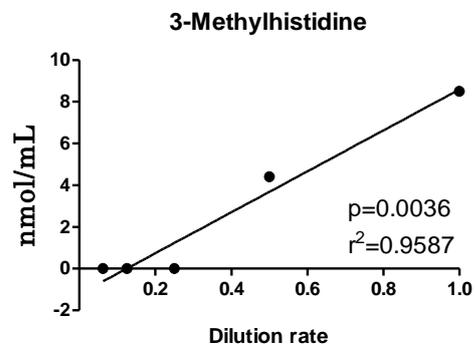
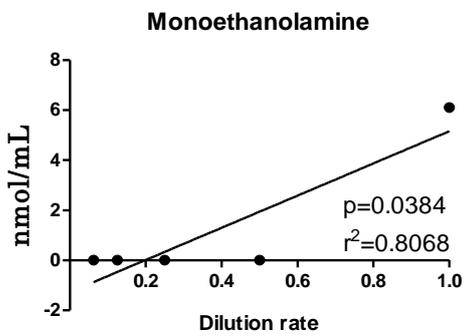
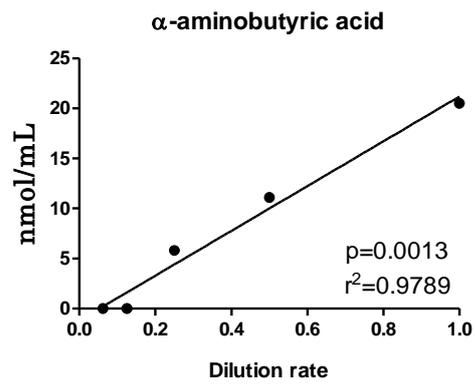
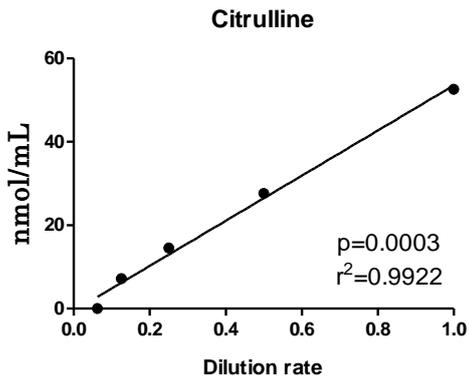
単位は全て nmol/mL で表記した











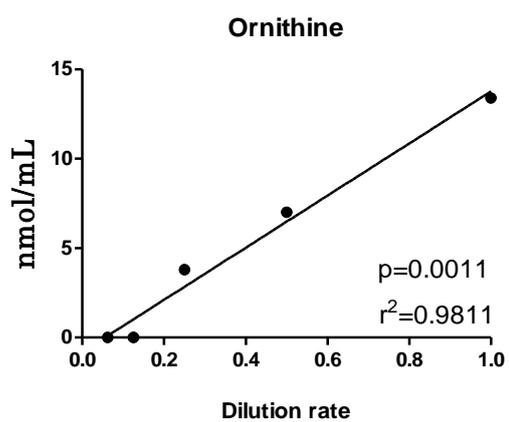


Fig. 1 希釈直線性の検討

作成したプール血漿を 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に段階希釈した。

多くの PFAAs で原点を通る直線が得られた。単位は全て nmol/mL で表記した。

Table 5 第2節で使用した健常犬のプロフィール

	犬種	性別	年齢 (歳)	体重 (kg)	BCS (9段階)
Dog1	ビーグル	去勢雄	8	10.7	4
Dog2	ビーグル	去勢雄	6	11.3	4
Dog3	ビーグル	去勢雄	6	11.2	4
Dog4	ビーグル	去勢雄	4	13.6	5
Dog5	ビーグル	避妊雌	8	9.6	4
Dog6	ビーグル	避妊雌	7	14.7	5

Table 6 セレクトスキンケアの成分含有量 (代謝エネルギー387kcal/100g)

成分含有量	炭水化物	タンパク質	脂質	食物繊維
セレクトスキンケア	12.3	5.7	3.6	0.9

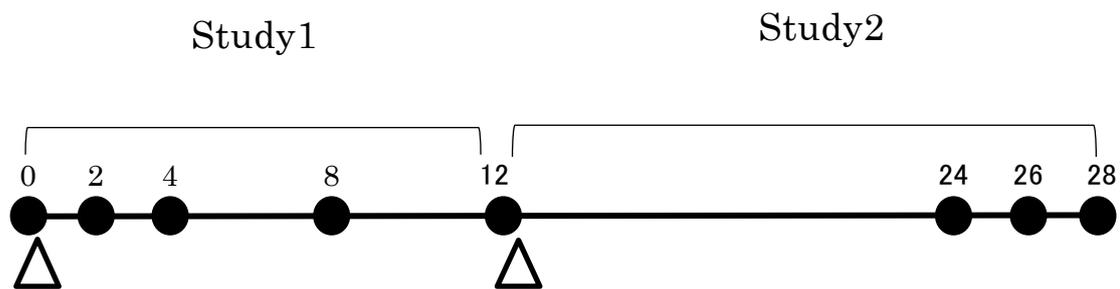
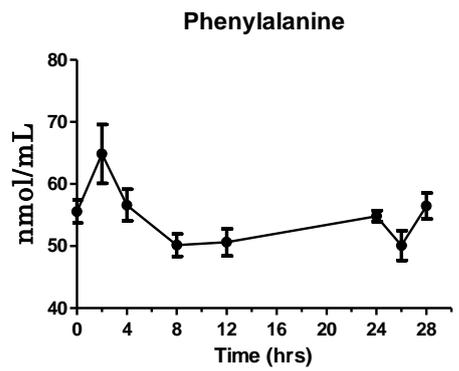
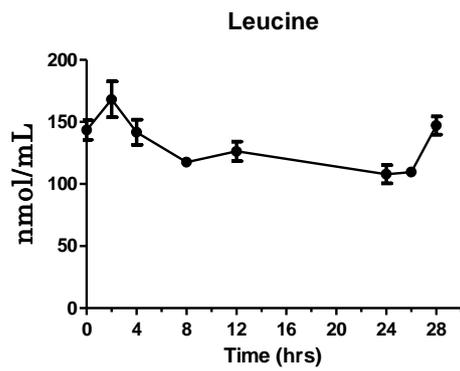
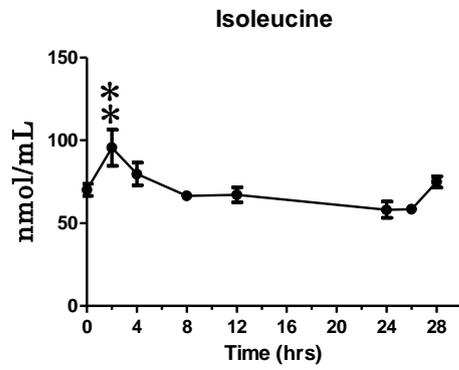
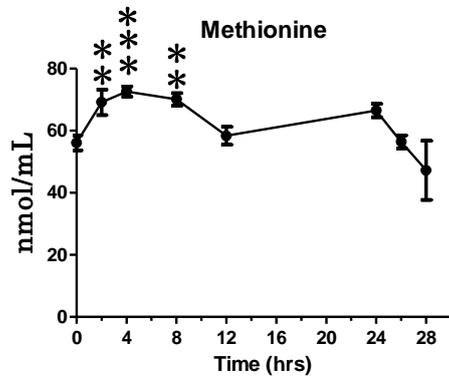
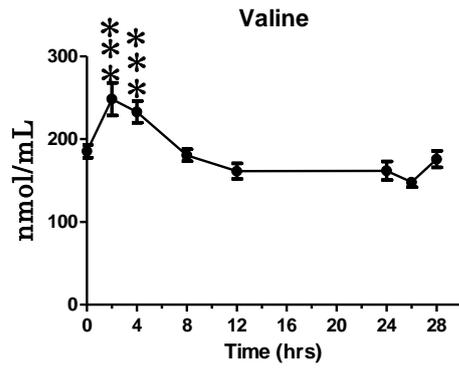
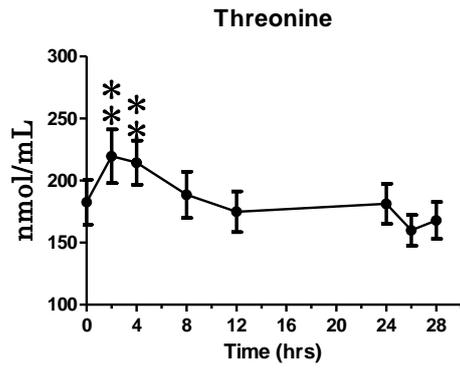
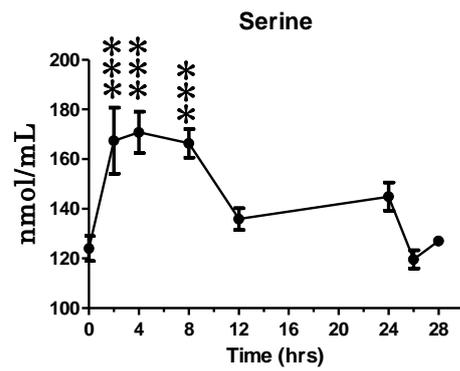
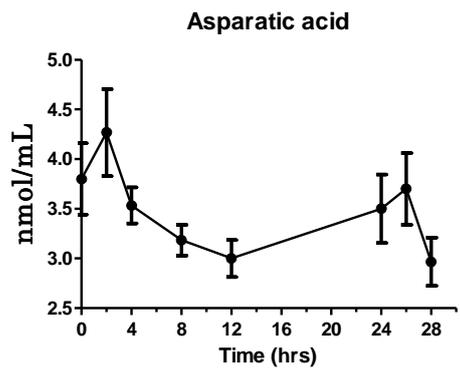
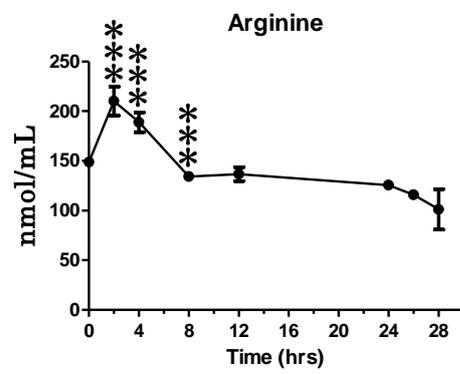
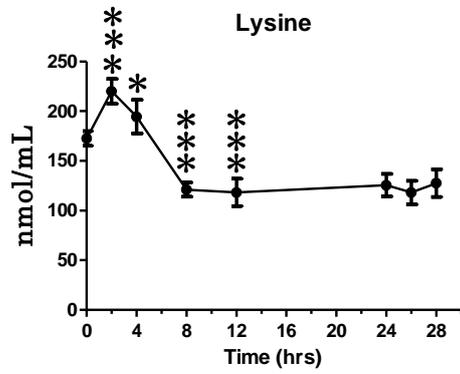
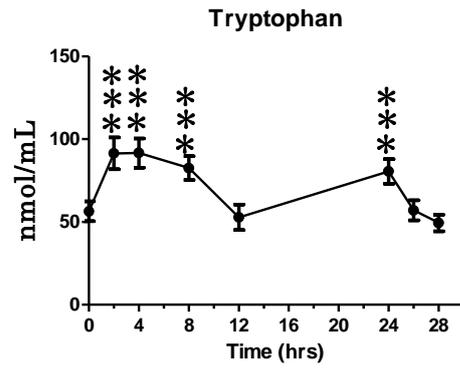
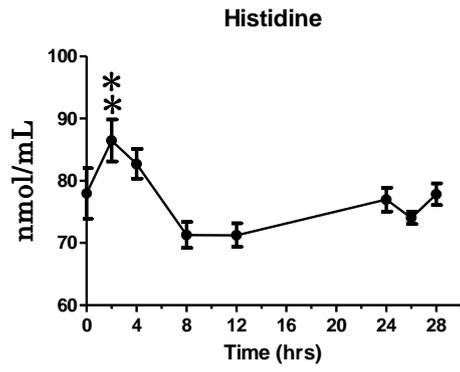
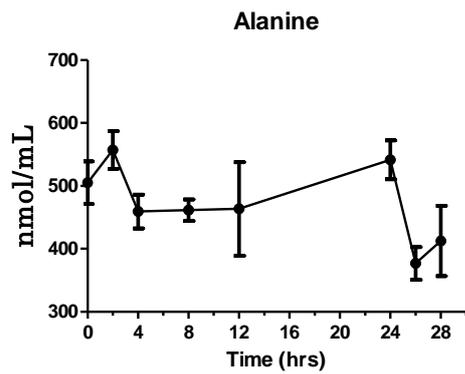
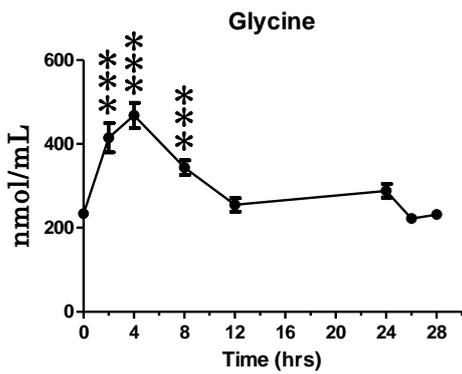
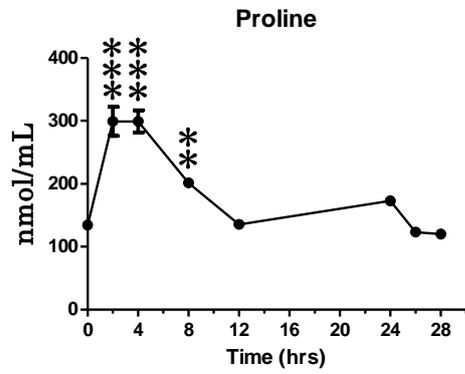
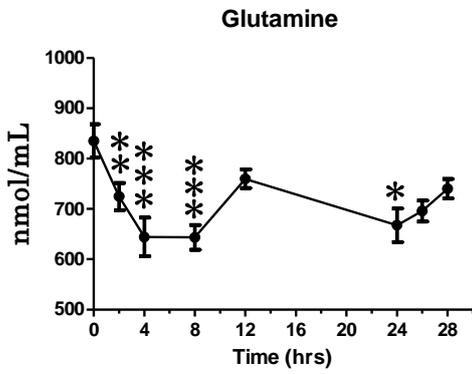
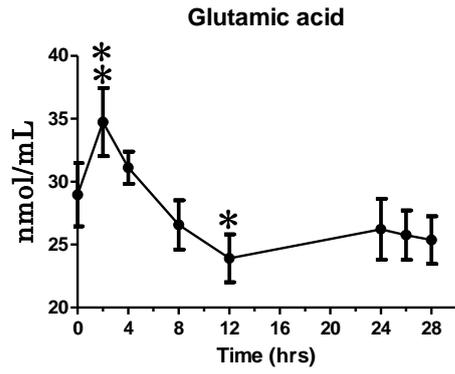
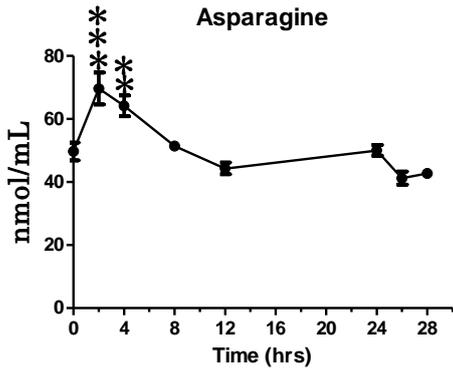


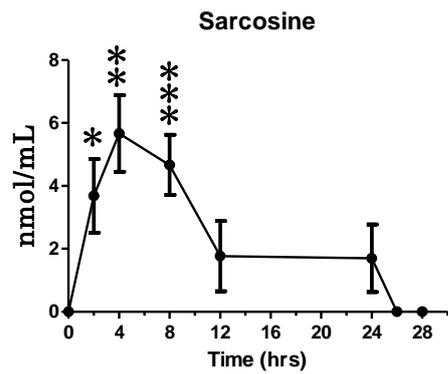
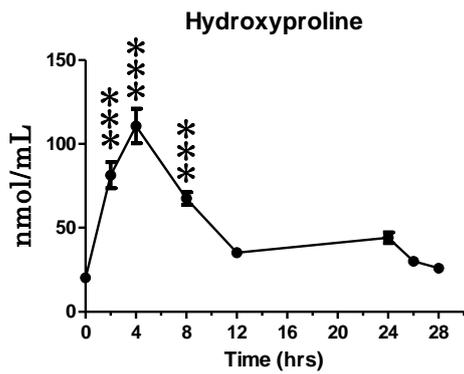
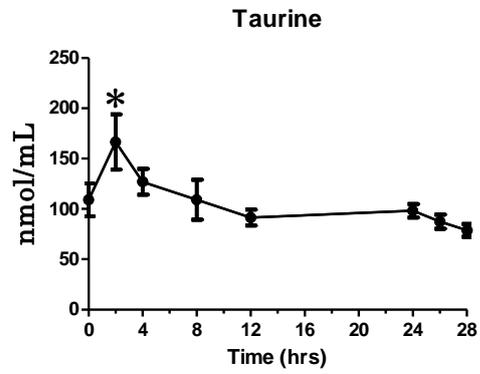
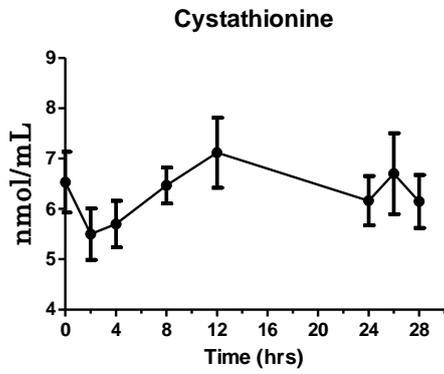
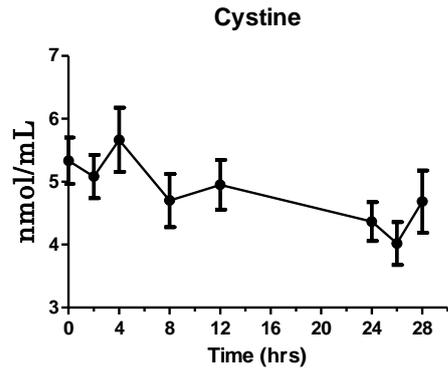
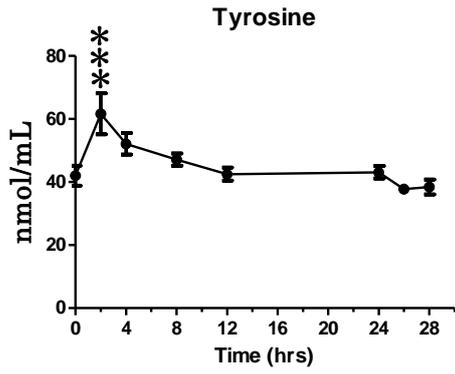
Fig. 2 採血および食事給与ポイント

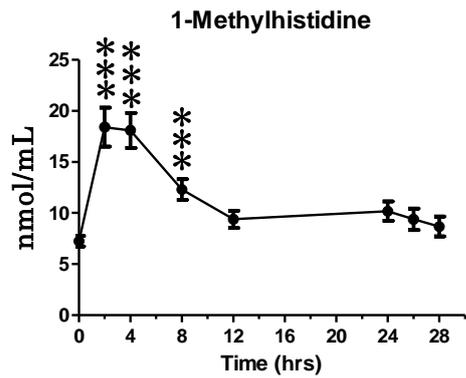
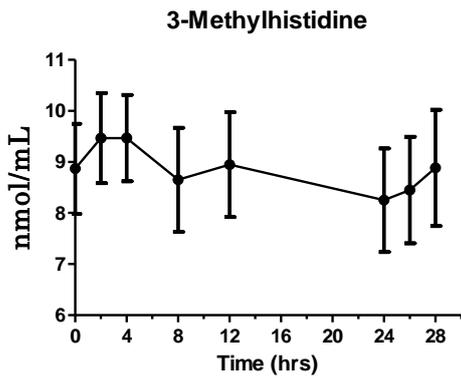
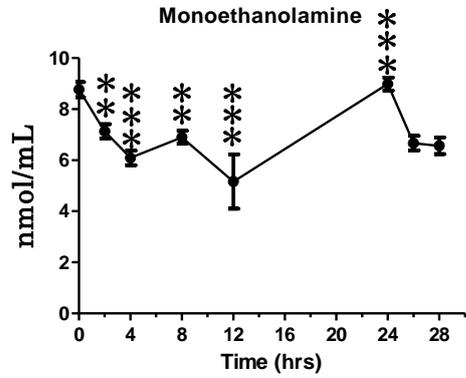
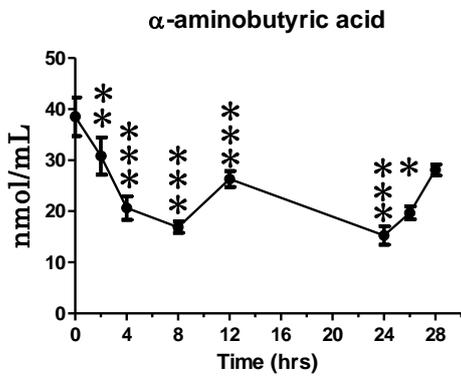
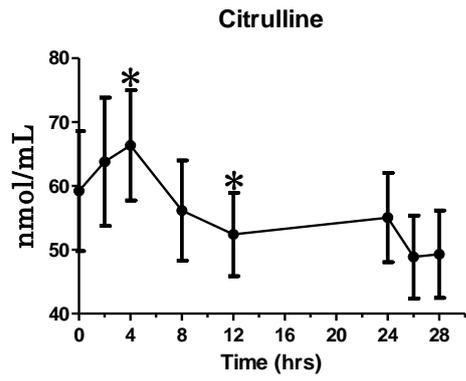
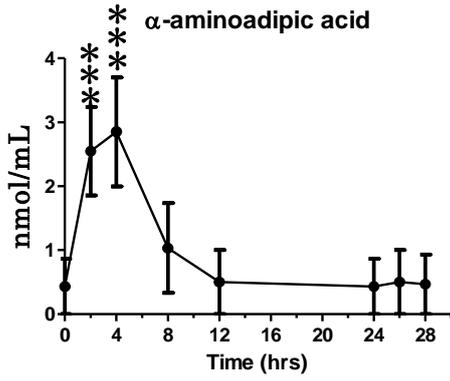
採血ポイント (●)、食事給与ポイント (△)











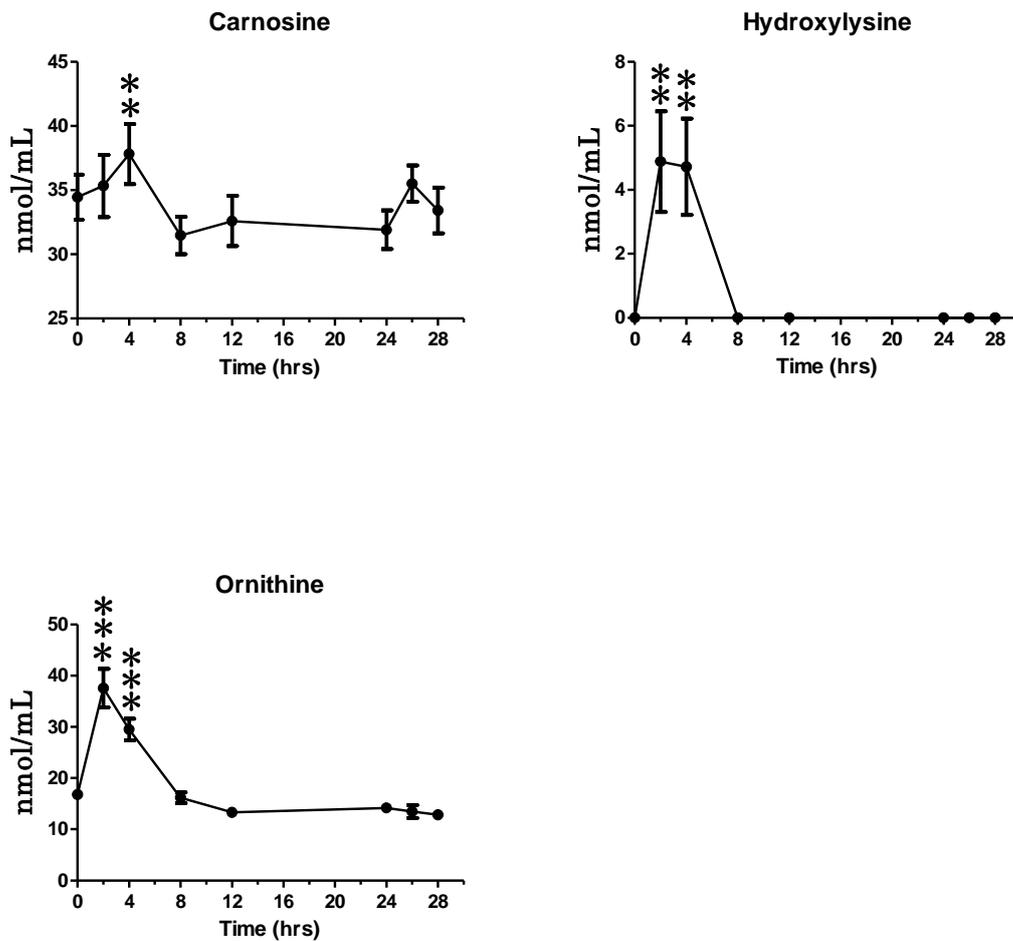


Fig. 3 健康犬における食事前後の PFAAs 濃度の変化

Study1 として午前 8 時から午後 8 時までにおける PFAAs の食事前後の変化を検討した。次いで Study2 は午後 8 時から翌日午後 12 時までにおける PFAAs の食事前後の変化を検討した。

Study1 では午前 8 時の食事給与前 (0) と 食後 2、4、8、12 時間 および Study2 では午後 8 時の食事給与前(12) と 食後 12(グラフの表記は 24)、14(26)、16(28) 時間で比較した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなし*, $P < 0.05$; **, $0.01 < P < 0.05$; ***, $P < 0.01$, One-Way ANOVA Repeated Measures test で表記した。単位は全て nmol/mL で表記した。

第 2 章

イヌにおけるがんの罹患およびがんの種類による
血漿遊離アミノ酸濃度の変動

緒言

医学領域では、がんや糖尿病、肝疾患、腎疾患および肥満などの様々な疾患で PFAAs が変化することが明らかとなっている【Zhang Q *et al.*, 2006; Newgard CB *et al.*, 2009; Miyagi Y *et al.*, 2011; Wang TJ *et al.*, 2011; Shah SH *et al.*, 2012】。代謝産物の中でも PFAAs は、絶食時において生体内で濃度が一定に保たれているため、疾患を罹患した際の変化を反映するとされている。

ヒトにおいてがんを罹患すると PFAAs が変化することが明らかとなっている【Brenner U *et al.*, 1985; Muscaritoli M *et al.*, 1999; Maeda J *et al.*, 2010; Mamtimin B *et al.*, 2011; Miyagi Y *et al.*, 2011; Abbassi-Ghadi N *et al.*, 2013; Hasim A *et al.*, 2013; Barnes T *et al.*, 2014; Mamtimin B *et al.*, 2014; Zhao Q *et al.*, 2014; Fukutake N *et al.*, 2015; Gu Y *et al.*, 2015; Kim HJ *et al.*, 2015; Miller JA *et al.*, 2015; Yamazaki Y *et al.*, 2015; Unni SN *et al.*, 2015】。がんはイヌおよびヒトにおいて死亡原因第一位の疾患【平成 27 年:人口動態統計月報年計（概数）の概況、Inoue M. *et al.*, 2002】であり、がんの予防や早期発見、新たな治療法の開発などの技術向上は、がんによる死亡抑制のためには非常に重要な要素である。現在、数多くのがんスクリーニング法が開発されているが、被験者は疑われるがんの種類によって特異性の高い様々な検査を受けなければならず、経済的、時間的な負担となるだけでなく、精神的や肉体的にも負担が大きい。しかし、PFAAs の検査は、1 回の採血量が 5 mL と少量であり、比較的簡便な検査法なため、侵襲性も低い。そして、1 回の採血で複数疾患についても同時に検査することが出来るという汎用性も有している。近年、PFAAs を変数とし多変量解析を用いてがんであるリスクをスコア化する「アミノインデックス技術」が開発され、2011 年 4 月より臨床応用が開始されている。アミノインデックス技術のような PFAAs を網羅的に測定し、解析する技術の発展により、複数種類のがんのリスクを評価することが可能となった。

また、PFAAs の変化はがんの種類により異なることも明らかとなっている【Miyagi Y *et al.*, 2011】。様々ながんにおいて PFAAs を用いた新規バイオマーカーの探索や、がん罹患によるアミノ酸代謝の変化から新規治療法の開発など多くの研究が盛んに行われている【Meadows GG *et al.*, 1982; Brenner U *et al.*, 1985; Muscaritoli M *et al.*, 1999; Maeda J *et al.*, 2010; Mamtimin B *et al.*, 2011; Miyagi Y *et al.*, 2011; Hasim A *et al.*, 2013; Kim T *et al.*, 2013; Barnes T *et al.*, 2014; Luo Y *et al.*, 2014; Mamtimin B *et al.*, 2014; Zhao Q *et al.*, 2014; Fukutake N *et al.*, 2015; Gu Y *et al.*, 2015; Kim HJ *et al.*, 2015; Li P *et al.*, 2015; Unni SN *et al.*, 2015; Hens JR *et al.*, 2016; He YU *et al.*, 2016】。現在、胃、大腸、肺、膵臓、前立腺（男性）、乳腺（女性）および子宮・卵巣（女性）、について、がんである可能性を一度に評価することででき、その簡便さから検査実施可能な病院が増えている。しかし、獣医学領域においてこのような検査法は確立されておらず、イヌにおいてがんと PFAAs の関係を調べた報告はほとんど無い【Azuma K *et al.*, 2012】。

そこで第 2 章では、がんを罹患したイヌにおける PFAAs の変化を調べることを目的とし、第 1 節で、本学付属動物医療センターに来院したがんを罹患したイヌと健常犬を比較することで変動する PFAAs を調査した。次いで、第 2 節ではがんの種類によって変化する PFAAs を調査した。

第1節 がんを罹患したイヌと健常犬における PFAAs の比較

材料および方法

供試動物

日本獣医生命科学大学附属動物医療センター腫瘍外科に初診で来院したがんを罹患したイヌ 39 頭 (年齢: 7-14 歳, 性別: 雄 9 頭, 去勢雄 10 頭, 雌: 1 頭, 避妊雌: 19 頭, 体重: 2.8-28.2 kg, BCS: 4-5/9) を使用した。がんに対する治療は一切行っていない個体を本実験に供した。獣医師より飼い主に対するインフォームドコンセントを十分に行い、本研究の目的や方法、リスク等を説明した後、飼い主より承諾が得られた症例のみを使用した。オーナー様からの稟告より、食欲低下や下痢や嘔吐といった消化器症状は認められず、被毛の状態に変化もないことを確認した。全症例において体重減少はなく、BCS および Muscle condition score (MCS) は適正であった。また、血漿中の Total Protein (TP) および Albumin (ALB) の値は基準値内であり、総合的に診て栄養状態は良好な個体であった。供試動物のプロフィールは Table 7 の通りである。また、コントロールとして日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門で飼育されている健常犬 20 頭 (犬種: ビーグル, 年齢: 3-11 歳, 性別: 雄 9 頭, 雌 11 頭, 体重 5.9-13.2 kg, BCS: 4-5/9) を使用した [Table 8]。全てのがんを罹患したイヌおよび健常犬の食事は 1 回量を $RER \times 1.0-1.6 \text{ kcal} \times 1/2$ に設定した市販の総合栄養食を 1 日 2 回給与した。

採血プロトコールおよび検体処理

前日の食事から 14 時間以上経過していることおよび採血時間が午前中であり、来院時は空腹状態であることを予めオーナー様に確認した後、採

血を実施した。採血は頸静脈より 2 mL 採血を行い、直ちに EDTA-2K にて抗凝固処理を行った後、4°C、3,000 rpm、10 min 遠心分離を行った。得られた血漿を 1.5 mL マイクロチューブに 0.5 mL 以上分注し、測定までは-80°C で保存した。

PFAAs 測定

第 2 章と同様、PFAAs の測定は全て採血から 1 週間以内に富士フィルムモノリス株式会社に委託し、分析装置は LC/MS を用いた。

測定した PFAAs

第 1 章と同様、39 種類の PFAAs に加え、必須アミノ酸 (EAA)、非必須アミノ酸 (NEAA)、チロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンの 3 種を総称した芳香族アミノ酸 (AAA)、バリン、ロイシンおよびイソロイシンの 3 種を総称した分岐鎖アミノ酸 (BCAA)、フィッシャー比 (BCAA/AAA) および総アミノ酸も算出した。

統計解析

統計解析ソフトは GraphPad Prism5 を使い、がんを罹患したイヌと健常犬の比較を Mann-Whitney U test (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) を用いて評価した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなし*で示した。

結果

39種類測定した PFAAs のうち、健常犬およびがん罹患犬の全頭において検出限界値未満となった 5 種類の PFAAs (γ -アミノ β -ヒドロキシ酪酸、 β -アミノイソ酪酸、 γ -アミノ酪酸、ホモシステインおよびヒドロキシリジン) および食後 16 時間以上経過しないと測定が出来ない α -アミノ酪酸 を除いた 33 種類の PFAAs を Mann–Whitney U test を用いて比較した。

スレオニン、 α -アミノアジピン酸、シスチン、シスタチオニン、メチオニン、チロシン、フェニルアラニン、3-メチルヒスチジン、1-メチルヒスチジン、カルノシン、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸で、健常犬と比較してがんを罹患したイヌにおいて有意に増加し、グリシンおよびヒスチジンはがんを罹患したイヌにおいて有意に低下した ($P < 0.05$)。その他の PFAAs に関しては有意な変化は認められなかった [Table 9, Fig. 4]。

考察

第2章では、がんを罹患したイヌ 39 頭と健常犬 20 頭の PFAAs を測定し比較した。

結果としてグリシンの濃度が、がんを罹患したイヌにおいて健常犬と比較して有意に低下した。これはがん細胞に特異的なエネルギー代謝方式であるワールブルグ効果の影響が示唆される【Jain M *et al.*, 2012】。正常細胞は好気環境下ではクエン酸回路を経て 36 ATP を産生する好気呼吸を行う。腫瘍学におけるワールブルグ効果は、悪性腫瘍の腫瘍細胞内で、嫌気環境のみならず好気環境でも、解糖系に偏ったブドウ糖代謝がみられることである【Fig. 6】。乳酸やピルビン酸を作るためにグリシンが多く使われ、血中のグリシン濃度が低下したと考えられた。ヒトのがんにおいてもグリシンの低下が確認されており【Miyagi Y *et al.*, 2011】、イヌにおいてもヒトと同様の変化が認められると考えられた。

ヒトでは肺がん、膵臓がん、乳がんおよび子宮・卵巣がんなど多くのがんで血中ヒスチジン濃度が低下すると報告されている【Maeda J *et al.*, 2010; Hasim A *et al.*, 2013; Barnes T *et al.*, 2014; Mamtimin Be *et al.*, 2014; Fukutake N *et al.*, 2015; Kim HJ *et al.*, 2015; Unni SN *et al.*, 2015】。本研究においても、ヒトと同様にイヌにおいてもがん罹患によるヒスチジンの低下が認められることが明らかとなった。また、がん細胞はがん細胞に特異的なアミノ酸トランスポーターである L-type amino acid transporter 1 (LAT1) の発現が高いことが知られており【Ochiai H *et al.*, 2012; Fukumoto S *et al.*, 2013; Ogihara K *et al.*, 2015; Barollo S *et al.*, 2016】、LAT1 から取り込まれるアミノ酸にヒスチジンも含まれている。つまり、イヌにおいても LAT1 よりヒスチジンはがん細胞に盛んに取り込まれ、血中濃度が低下した可能性が示唆された。

本研究において、がんを罹患したイヌでスレオニン、シスチンおよび

シスタチオニンの濃度が有意に増加していた。ヒトのがん患者において、血中スレオニン濃度が増加することが報告されている【Gu Y *et al.*, 2015】。イヌにおいてもヒトと同様のアミノ酸代謝が行われている可能性が考えられた。シスチンやシスタチオニンは細胞内に取り込まれると、細胞の活性化や増殖および保護効果のあるグルタチオンの合成に利用されると報告されている【Kobayashi S *et al.*, 2015】。しかし、本研究において、シスチンとシスタチオニンはがんを罹患したイヌにおいて有意に増加していたため、がん細胞で利用されなかった可能性が考えられた。

げっ歯類の悪性黒色腫モデルおよび悪性黒色腫の培養細胞において、フェニルアラニンとチロシンを制限することで、腫瘍細胞の増殖が抑制されると報告されている【Meadows GG *et al.*, 1982】。つまり、ある種のがん細胞にとってフェニルアラニンとチロシンは、がん細胞の増殖および生存には不必要なアミノ酸である。本研究では、がんを罹患したイヌにおいて健常犬と比較してフェニルアラニンは有意に増加しており、チロシンは有意な変化は認められなかったが、がんを罹患したイヌにおいて増加傾向が認められた。つまり、イヌにおいてもフェニルアラニンはがん細胞で利用されない可能性が高く、がん細胞内に積極的に取り込まれないため、血中濃度が増加したと考えられた。また、がんのイヌにおいてフェニルアラニンが有意に高かったという報告もされており【Ogilvie GK *et al.*, 1990】、本研究結果は先行研究と一致していた。

がん細胞にとって最大の敵は免疫系であり、免疫系から逃れることはがん細胞の生存にとって非常に重要である。この免疫系から逃れるためにがん細胞はトリプトファンの代謝物であるキヌレニンを分泌し、がん細胞の生存と増殖に関与していると報告されている【Opitz CA *et al.*, 2011】。そのためヒトのがん患者では、がん細胞内へのトリプトファンの取り込みが盛んに行われ、がんの種類に限らずトリプトファン濃度が低下していると報告されてい

る【Miyagi Y *et al.*, 2011】。また、がんモデル犬において、トリプトファン代謝経路阻害剤を投与した際、がんの増殖および転移抑制効果を示したと報告されている【Timosenko E *et al.*, 2016】。つまり、イヌにおいてもヒトと同様にトリプトファンの代謝ががん細胞の生存に関係している可能性が示唆されている。しかし、本研究ではがんを罹患したイヌにおいてトリプトファン濃度が健常犬と比較して有意に増加しており、がんのヒトやイヌにおけるトリプトファン代謝と矛盾する結果となった。イヌの悪性悪性乳腺腫瘍と健常犬の PFAAs を比較した先行研究では、悪性乳腺腫瘍罹患犬と健常犬の間で、トリプトファン濃度に有意な変化は認められなかったと報告している【Azuma K *et al.*, 2012】。つまり、本研究よりがんを罹患しているイヌで認められたトリプトファンの有意な増加は、がんの種類によってトリプトファン代謝の活性に違いがある可能性が示唆された。

1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンおよびカルノシンは健常犬と比較してがんを罹患したイヌにおいて有意に増加した。これらの PFAAs は主に筋肉に存在している。ヒトにおいてがん患者は炎症性サイトカインの上昇やタンパク質分解誘導因子 (PIF) の作用によって体内のタンパク質異化が亢進することが証明されている【Luo Y *et al.*, 2014】。タンパク質異化の亢進は主に骨格筋で起こるため筋肉内に多く存在している 1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンおよびカルノシンの血中濃度が増加したと考えられた。また、大腸がん発症モデルマウスを用いた実験で、がん細胞から放出される High mobility group box1 (HMGB1) と呼ばれるタンパク質が、宿主の骨格筋に働きかけることで、筋タンパク質がオートファジーにより分解され、PFAAs の不均衡が生じていると報告されている【Luo Y *et al.*, 2014】。リンパ腫のイヌにおいて HMGB1 の分泌が報告されており【Meyer A *et al.*, 2010; Sterenczak KA *et al.*, 2010】、本研究においても HMGB1 の作用により、筋タンパク質の異化が亢進している可能性が示唆された。これらの中でも 3-メチルヒスチジンは

ヒトにおいて重度侵襲患者で増加するということがわかっており、全身のタンパク質代謝や栄養状態の評価の指標となることが報告されている【山下 進他., 2007】。そこで、医学領域ではタンパク質異化の亢進具合を把握することで、がん患者に対する栄養学的介入をすることができると考えられている。現在、イヌにおいて筋タンパク質異化と 3-メチルヒスチジンに関する論文は発表されていない。しかし、がんを罹患したイヌで 3-メチルヒスチジンが高値を示していることから、イヌにおいても 3-メチルヒスチジンは筋タンパク質異化の指標になるのではないかと考えられた。これらの結果より、がんを罹患したイヌにおいて筋タンパク質異化の亢進が起きていると考えられ、健常犬と比較してがんを罹患したイヌにおいて有意に増加していた必須アミノ酸（スレオニン、トリプトファンおよびフェニルアラニン）および芳香族アミノ酸（特にトリプトファンおよびフェニルアラニンの有意な増加）は筋タンパク質異化の亢進により産生されたと示唆された。

α -アミノアジピン酸はリジンがアセト酢酸とアセチル CoA に分解される際に、サッカロピンを経て産生される中間体である。ヒトのがん細胞株を用いた研究で、がん細胞はリジンの分解を利用して細胞の膜に必要なアセチル CoA の合成を盛んに行っているため、その中間体である α -アミノアジピン酸の分泌量が有意に増加したと報告されている【Bellance N *et al.*, 2012】。本研究において、 α -アミノアジピン酸ががんを罹患したイヌで健常犬と比較して有意に増加したことに関して、イヌにおいてもがん細胞でのリジンの消費が盛んに行われ、産生した α -アミノアジピン酸はがん細胞外に排泄されたため、血中濃度が有意に増加したと考えられた。

以上より第 2 章 1 節では、イヌにおいてがんを罹患することで生じた PFAAs の変化より、がん細胞内で起きているアミノ酸代謝異常や宿主の筋タンパク質を分解するなどがん細胞が宿主に与える影響が明らかとなった。

第2節 がんの種類によって変化する PFAAs の違い

材料および方法

解析対象

第1節で実験に供したがん罹患犬のうち、移行上皮癌（年齢：10-13歳，性別：雄1頭，雌1頭，避妊雌6頭，体重：3.5-23.0 kg，BCS：4-5/9，n = 8）、悪性乳腺腫瘍（年齢：9-12歳，性別：雌1頭，避妊雌2頭，体重：4.0-8.9 kg，BCS：4-5/9，n = 3）、肝細胞癌（年齢：9-14歳，性別：雄1頭，去勢雄3頭，避妊雌4頭，体重：2.8-27.0 kg，BCS：4-5/9，n = 8）、悪性黒色腫（年齢：8-13歳，性別：雄2頭，去勢雄2頭，避妊雌2頭，体重：3.4-14.0 kg，BCS：4-5/9，n = 6）、甲状腺癌（年齢：9-11歳，性別：雄1頭，去勢雄1頭，避妊雌2頭，体重：4.2-9.5 kg，BCS：4-5/9，n = 4）を罹患したイヌおよび健常犬20頭（犬種：ビーグル，年齢：3-11歳，性別：去勢雄11頭，避妊雌9頭，体重：5.9-13.2 kg，BSC：4-5/9）のPFAAsを解析に用いた。解析に供したがんを罹患したイヌの詳細はTable 6-7に示した。

解析した PFAAs

39種類の測定したPFAAsのうち、第2章の1節と同様に、健常犬およびがん罹患犬の全頭において検出限界値未満となった5種類のPFAAs (γ -アミノ β -ヒドロキシ酪酸、 β -アミノイソ酪酸、 γ -アミノ酪酸、ホモシステインおよびヒドロキシリジン)および食後16時間以上経過しないと測定が出来ない α -アミノ酪酸を除いた33種類のPFAAsを健常犬およびがんの種類により分類したがんを罹患したイヌで比較した。

統計解析

統計解析ソフトは GraphPad Prism5 を使い、対象とした各がんを罹患したイヌと健常犬の比較を Mann–Whitney U test (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) を用いて評価した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなし*で示した。

結果

移行上皮癌

メチオニン、フェニルアラニン、1-メチルヒスチジン、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸は、移行上皮癌罹患犬において健常犬と比較して有意に増加した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test)。グリシン、アルギニン、タウリン、フィッシャー比は移行上皮癌において健常犬と比較して有意に低下した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test) [Fig. 5]。

悪性乳腺腫瘍

α -アミノアジピン酸、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸は、悪性乳腺腫瘍罹患犬において健常犬と比較して有意に増加した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test)。タウリンは悪性乳腺腫瘍罹患犬において健常犬と比較して有意に低下した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test) [Fig. 5]。

肝細胞癌

α -アミノアジピン酸、シスチン、シスタチオニン、フェニルアラニン、3-メチルヒスチジン、1-メチルヒスチジン、トリプトファン、芳香族アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、カルノシン、アスパラギン酸、イソロイシン、アスパラギン、グルタミン酸、 α -アミノ酪酸、バリン、オルニチンおよび必須アミノ酸は、肝細胞癌罹患犬において健常犬と比較して有意に増加した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test)。グリシンおよびヒドロキシプロリンは、肝細胞癌罹患犬において健常犬と比較して有意に低下した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test) [Fig. 5]。

悪性黒色腫

α -アミノアジピン酸、メチオニン、3-メチルヒスチジン、1-メチルヒスチジンおよびカルノシンは、悪性黒色腫罹患犬において健常犬と比較して有意に増加した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test)。グルタミンは、悪性黒色腫罹患犬において健常犬と比較して有意に低下した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test) [Fig. 5]。

甲状腺癌

スレオニン、トリプトファンおよびプロリンは、甲状腺癌罹患犬において健常犬と比較して有意に増加した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test)。イソロイシンは、甲状腺癌罹患犬において健常犬と比較して有意に低下した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test) [Fig. 5]。

考察

それぞれのがんの種類において考察を行った。さらに複数種類のがんで有意な変化が認められた PFAAs においても考察した。

移行上皮癌

ヒトの膀胱腫瘍患者では、トリプトファン代謝異常が起きていることが明らかとなっており、膀胱腫瘍患者に L-トリプトファンを負荷後、その代謝産物であるキヌレニンなどのトリプトファン代謝産物の尿中排泄量が顕著に増大したと報告されている【Wolf H *et al.*, 1979】。前節でがんを罹患したイヌにおけるトリプトファンの有意な増加は、筋タンパク質異化が亢進した結果、血中濃度が増加したと考えられたと述べたが、移行上皮癌罹患犬では 1-メチルヒスチジンが有意に増加しており、有意差はなかったものの 3-メチルヒスチジンやカルノシンも増加傾向を示していた。つまり、移行上皮癌罹患犬に関しては、筋タンパク質異化を亢進し、トリプトファンの血中濃度が増加したと考えられた。

アルギニンは移行上皮癌罹患犬において、健常犬と比較して有意に低下した。アルギニンと膀胱腫瘍に関して、ヒトおよびイヌにおける報告はされていないが、ヒトの乳がん、大腸がん、肺がん、膵臓がんおよび胃がんにおいても、血中のアルギニン濃度が低下することが明らかとなっている【Miyagi Y *et al.*, 2011】。また、がんの種類に関係なくイヌにおいてもがんを罹患すると血中アルギニン濃度が低下することがわかっている【Ogilvie GK *et al.*, 1990】。これはアルギニンを分解する酵素であるアルギナーゼが、がん細胞周辺で活性が上昇しているためと報告されている【Park KG *et al.*, 1991; Polat MF *et al.*, 2003; Caso G *et al.*, 2004; Perez G *et al.*, 2012】。アルギニンは免疫力を高め、がんの成長を抑制するなどの効果があるといわれているが【Bedoya AM *et al.*, 2014】、

がん細胞周囲のアルギナーゼ活性の上昇によりアルギニンが分解され、がん患者では血中濃度が低下するといわれている【Hu L *et al.*, 2016】。つまり、イヌにおいてもヒトと同様にがん細胞周囲のアルギナーゼ活性の上昇により、血中アルギニン濃度が低下したと考えられた。

ヒトの研究において、血中のタウリン濃度と膀胱腫瘍に関する報告はないが、様々ながんにおいてがん組織内にタウリンが蓄積していると報告されている【De Micheli E *et al.*, 2000】。これはがん組織を取り巻く血管から組織内へのタウリンの移行を示唆しており、がん罹患を予測するバイオマーカーとしての可能性が報告されている【De Micheli E *et al.*, 2000】。本研究では、移行上皮癌罹患犬において、健常犬と比較して血中タウリン濃度が有意に低下し、イヌにおいてもタウリンががん組織内に蓄積し、血中の濃度が低下したと考えられた。つまり、イヌにおいてもヒトと同様に、タウリンは移行上皮癌のリスク評価に利用できる可能性が示唆された。

悪性乳腺腫瘍

獣医学領域において、悪性乳腺腫瘍罹患犬の PFAAs の変化について一報のみ報告されている【Azuma K *et al.*, 2012】。この論文では、メチオニン、セリン、グルタミン、アラニン、タウリン、シトルリン、非必須アミノ酸および総アミノ酸濃度が健常犬と比較して有意に低下すると報告しているが、本研究ではチロシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸の濃度が有意に増加しており、先行研究とは異なる結果となった。これらのほかに、本研究では α -アミノアジピン酸も有意に増加していた。ヒトの乳がん患者では、スレオニン、アラニンおよびオルニチンが健常者と比較して有意に増加し、ヒスチジンおよびトリプトファンは有意に低下すると報告されている【Miyagi Y *et al.*, 2011; Barnes T *et al.*, 2014】。また、別の乳がん患者に関する論文では、健常者と比較して乳がん患者で、本研究で有意な増加が認めら

れた PFAAs を含め、多くの PFAAs の濃度が増加したという報告もある【Poschke I *et al.*, 2013】。有意な変化が認められた α -アミノアジピン酸、フェニルアラニン、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸に関しては、前節で述べたように、 α -アミノアジピン酸はがん細胞によるリジン代謝の亢進による分泌量が増加したこと、そしてフェニルアラニン、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸は、筋タンパク質異化により血中濃度が増加したと考えられる。健常犬と比較して悪性乳腺腫瘍罹患犬においてチロシンが有意に増加したことに関しては、チロシンはフェニルアラニンから合成されるアミノ酸であるため、フェニルアラニン濃度の増加に伴って、チロシン濃度も同時に増加したと考えられた。今回、イヌの先行研究とは異なる結果となったが、ヒトの研究報告と類似する点が多かった。つまり、ヒトとイヌの乳がんにおいて同様のアミノ酸代謝異常が起きている可能性が示唆された。イヌの悪性乳腺腫瘍はヒトの乳がんと同様の点があることから、治療などの研究で乳がんモデルとして利用できる可能性が考えられている【Wang W *et al.*, 2016】。これらのことからイヌにおいても PFAAs が悪性乳腺腫瘍のバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

肝細胞癌

肝細胞癌では研究で使った他のがん（移行上皮癌、悪性乳腺腫瘍、悪性黒色腫および甲状腺癌）と比較して、一番変化した PFAAs が多かった。ほとんどのアミノ酸は肝臓で代謝されるため、肝細胞癌で PFAAs が変化する事は明らかである。肝機能と関係するとされる AAA（特にチロシンとフェニルアラニンにおいて）および BCAA に関して、肝機能が低下すると AAA の血中濃度が増加し、ALB の合成のために用いられる BCAA は、肝機能低下により ALB の合成能が低下すると、ALB の合成に消費されることで血中濃度が低下するため、結果としてフィッシャー比が低下することがわかっている。

本研究において、肝細胞癌罹患犬の AAA および BCAA は有意に増加していた。BCAA の有意な増加に関して、本実験に供した肝細胞癌罹患犬の栄養状態は良好であり、ALB の値も基準値内であった。つまり、筋タンパク質異化により血中濃度が高くなった BCAA は ALB の合成に利用されることなく、血中濃度が増加したと考えられた。

悪性黒色腫

悪性黒色腫罹患犬においてグルタミンが健常犬と比較して有意に低下したが、正常細胞でも分裂の盛んな細胞や、がん細胞ではグルタミンの要求量が高いことが知られている【Munoz-Pinedo C *et al.*, 2012】。また、生体内のグルタミン濃度は非常に高く、多くの細胞が利用しやすいとされている。「グルタミノリシス」と呼ばれる、グルタミンが α -ケトグルタル酸を通過して、乳酸に分解される経路があるが、グルタミンを必要としているがん細胞は、グルタミノリシスを介して、乳酸の産生を盛んに行っている。さらに、グルタミンの炭素骨格はほかの非必須アミノ酸、脂質および核酸の材料としても不可欠であるため、グルタミンはがん細胞の増殖に関与しているとされている【小川原陽子 他., 2014】。また、グルタミンの供給は、ワールブルグ効果によって反応が滞っている TCA 回路の中間体を供給することにより、増殖に必要な化合物と還元力を供給するといわれている【小川原陽子 他., 2014】。つまり、悪性黒色腫におけるグルタミンの有意な低下は、がん細胞へのグルタミン供給に利用されているためと考えられた。

甲状腺癌

本研究において、健常犬と比較して甲状腺癌罹患犬においてスレオニン濃度が有意に増加した。ヒトの甲状腺癌患者でも、スレオニン濃度が有意に増加したと報告されており【Gu Y *et al.*, 2015】、イヌにおいてもヒトと同様の

変化が認められることが明らかとなった。しかし、プロリンにおいてはイヌでは有意に増加し、ヒトでは有意に低下し、ヒトとイヌで異なる結果となった。スレオニン本研究において甲状腺癌罹患犬でのみ有意な変化が認められたアミノ酸であり、ヒトの甲状腺癌で認められるスレオニンの変化と同様の変化を示したことから、イヌにおける甲状腺癌のリスク評価の指標として利用できる可能性が示唆された。

複数種類のがんで有意な変化が認められたアミノ酸

メチオニン

移行上皮癌と悪性黒色腫罹患犬においてメチオニンが有意に増加していたが、医学領域では *in vivo* や *in vitro* の実験で、悪性黒色腫や膀胱腫瘍でメチオニンの要求量が高いことが示されている【Letocha H *et al.*, 1994; Agrawal V *et al.*, 2012】。しかし、本研究では移行上皮癌および悪性黒色腫罹患犬で、メチオニン濃度が有意に高く、その他のがんにおいても健常犬より高い傾向にあった。イヌの移行上皮癌と悪性黒色腫罹患犬におけるメチオニン代謝に関する報告はないため明らかではないが、本研究より、イヌにおいてこれらのがんではメチオニンの要求量が高くない可能性が考えられた。

3-メチルヒスチジン、1-メチルヒスチジンおよびカルノシン

移行上皮癌、肝細胞癌および悪性黒色腫罹患犬において、健常犬と比較し、3-メチルヒスチジン、1-メチルヒスチジンおよびカルノシンの全てもしくは一部が健常犬と比較して有意に増加した。悪性乳腺腫瘍および甲状腺癌に関しては、有意な変化は認められなかったものの、3種類全てもしくは一部で健常犬より増加傾向を示した。前節でも述べたように、これらの PFAAs は主に筋肉に存在しているアミノ酸であり、がん細胞から放出されるタンパク質分解誘導因子が骨格筋に作用することで、タンパク質の異化が亢進し、血

中濃度が増加したと示唆された。がん患者にとって、がん細胞にアミノ酸を奪われるだけでなく、高タンパク質な食事を摂取し、運動するなど、筋肉を落とさないようにすることは、生命維持のためにも非常に重要である。つまり、がんを罹患したイヌにおいてもタンパク質の異化亢進の指標となり得るこれら3つのPFAAsを測定することで、がんを罹患したイヌにおける栄養学的な介入を可能にすると考えられた。

α-アミノアジピン酸

悪性乳腺腫瘍、肝細胞癌および悪性黒色腫罹患犬において、健常犬と比較して有意に増加した。移行上皮癌および甲状腺癌においても健常犬より増加傾向を示した。前節でも述べたように、ヒトのがん細胞株を用いた研究で、がん細胞はリジンの分解を利用して細胞の膜に必要なアセチル CoA の合成を盛んに行っているため、その中間体である α-アミノアジピン酸の分泌量が有意に増加したと報告されている【Bellance N *et al.*, 2012】。本研究結果より、イヌにおいてもがんの種類に関係なく、がん細胞でのリジンの消費が盛んに行われ、産生した α-アミノアジピン酸はがん細胞外に排泄されたため、血中濃度が有意に増加したと考えられた。

グリシン

移行上皮癌および肝細胞癌罹患犬において有意に低下し、悪性乳腺腫瘍、悪性黒色腫および甲状腺癌では有意差は無かったものの、健常犬と比較して低下傾向を示した。前節でも述べたように、ワールブルグ効果の結果、グリシンからピルビン酸が合成され、ついで乳酸産生が活発に行われている。グリシンが有意に低下したがんの種類は、今回調査した5種類中2種類だけであったが、5種類のがんで健常犬と比較してその濃度は低下しているため、イヌにおいて、がんの種類に関係なくがんを罹患していることの指標となり

得ると考えられた。

フェニルアラニン、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸

フェニルアラニンは悪性乳腺腫瘍および肝細胞癌罹患犬において、健常犬と比較して有意に増加した。移行上皮癌、悪性黒色腫および甲状腺癌では有意な変化は認められなかったが、健常犬と比較して増加傾向を示した。

トリプトファンと芳香族アミノ酸は悪性黒色腫以外のがんにおいて有意に増加した。前節において、フェニルアラニンはがん細胞の増殖抑制効果が認められることから、がん細胞にとっては不必要なアミノ酸であると考えられ、トリプトファンもがん細胞で利用されず、血中濃度が有意に増加したと考えられた。

イソロイシン

イソロイシンの濃度が甲状腺癌罹患犬では有意に低下し、肝細胞癌罹患犬で有意に増加したことに関して、イソロイシンはアミノ酸トランスポーターの一つである LAT1 の輸送基質であるが、ヒトの甲状腺癌組織において過剰に発現していることが報告されているほか、イヌの甲状腺癌においても LAT1 の発現が明らかとなっている【Ochiai H *et al.*, 2012; Barollo S *et al.*, 2016】。つまり、イヌにおいてイソロイシンが有意に低下したことは、LAT1 の発現によるイソロイシンの取り込みが亢進しているためと考えられた。また、肝細胞癌罹患犬では、健常犬と比較して有意に増加した。イソロイシンはタンパク質構成アミノ酸で必須アミノ酸であるが、本研究では全供試動物は絶食下で試験を実施しており、食事由来のイソロイシンの供給はない。肝細胞癌罹患犬において 3-メチルヒスチジンなど筋肉中に存在する PFAAs が増加していたことから、がん罹患による筋タンパク異化が亢進し、血中濃度が増加したと考えられた。本研究において唯一、血中イソロイシン濃度が甲状腺癌で

有意に低下および肝細胞癌で有意に増加し、がんの種類によって PFAAs に違いが認められた。悪性乳腺腫瘍および移行上皮癌に関しては、有意差は認められなかったものの低下傾向を示した。つまり、健常犬と比較して、肝細胞癌におけるイソロイシンの有意な増加と甲状腺癌における有意な低下はそれぞれ異なる機序によるものと考えられた。

最後に、大腸がん発症マウスを用いた実験では、大腸がんを発症させる薬剤を投与した後、経時的に PFAAs を測定し、がんが進行度するにつれて PFAAs も健常者と大きく異なることが明らかとなっている【Luo Y *et al.*, 2014】。本研究で用いたがんを罹患したイヌは、単一の発生であり、所属リンパ節や他臓器に転移が起こっていない固体を選別して使用している。つまり本研究にはステージの進んだ個体はいないため、有意差が認められるほど顕著な変化が認められなかった可能性が考えられた。しかし、がんは発生初期段階で見つけることが、早期に治療を開始するためには非常に重要である。本研究で明らかとなった PFAAs の変化は、ステージが進んでいない個体から得られた結果であり、がんのリスクを早期に評価する上で重要な知見となると考えられた。

本研究では、複数種類のがんに共通して変化する PFAAs やがんの種類で変化が異なる PFAAs が明らかとなった。このようにがんの種類の違いによって変化する PFAAs を明らかにすることで、がん特異的な治療戦略や診断法を考慮することが可能となる。本研究のように、イヌにおいて複数種類のがんと PFAAs の変化との関連を調べた報告はないため、獣医学領域において新たな知見として有益であると考えられた。

以上より、第 2 章 2 節では、がんの種類に限らず変化する PFAAs やがんの種類によって変化が異なる PFAAs が明らかとなった。

小括

第2章ではがんを罹患したイヌと健常犬の PFAAs の比較を目的とし、第1節として 39 頭のがんを罹患したイヌと 20 頭の健常犬の平均値を比較し、がんを罹患することによる PFAAs の変化を調べた。第2節として第1節で用いたがんを罹患したイヌのうち移行上皮癌、悪性乳腺腫瘍、肝細胞癌、悪性黒色腫および甲状腺癌を罹患したイヌで群分けをし、がんの種類による PFAAs の違いについて検討した。

がんを罹患したイヌは健常犬と比較してスレオニン、 α -アミノアジピン酸、シスチン、シスタチオニン、フェニルアラニン、3-メチルヒスチジン、1-メチルヒスチジン、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸が有意に増加し、グリシン、ヒスチジンおよびフィッシャー比が有意に低下した。有意に低下した PFAAs は、がん細胞への取り込みが促進している可能性が考えられ、有意に増加した PFAAs は、タンパク質異化により産生したアミノ酸ががん細胞に利用されなかった、あるいはがん細胞内で産生したアミノ酸が細胞外に分泌し血中へと移行したため、血中濃度が増加した可能性があるということを示唆された。これらの PFAAs は、がんを罹患していることの指標になり得るということが示唆された。骨格筋に存在している PFAAs の有意な増加は、宿主の筋タンパク質異化が亢進されていることを反映していると考えられた。特に、ヒトにおいて 3-メチルヒスチジンは筋タンパク質異化亢進の指標とされていることから、イヌにおいても同様に 3-メチルヒスチジンを筋タンパク質異化の指標として利用できる可能性が考えられた。

次いで、移行上皮癌、悪性乳腺腫瘍、肝細胞癌、悪性黒色腫および甲状腺癌でがん罹患犬を分類し、がんの種類によって PFAAs に違いがあるか調べた。結果として、がんの種類により特徴的な PFAAs の違いが認められた。これらはがんの種類による特異的な代謝変化を反映している可能性が高い。

また、複数種類のがんにおいて共通して変動する PFAAs もあった。このようにがんの種類に分けて調べることでがんの特異的な変動が明らかとなった。以上より、イヌにおいてがんを罹患およびがんの種類によって PFAAs が変動することが示された。

医学領域において、がん治療前後に PFAAs が変化することが明らかとなっており【Desai TK *et al.*, 1992; Nefyodov LI *et al.*, 2000; Grigoryan RS *et al.*, 2004; Glazev AA *et al.*, 2008; Chiba, M *et al.*, 2013; Miller JA *et al.*, 2015】、特に化学療法前後で認められた PFAAs の変化は副作用と関連するという報告もされている【Abd-Allah AR *et al.*, 2005; Chiba, M *et al.*, 2013; Barzał JA *et al.*, 2014】。

そこで第3章では全身的な治療法である化学療法が推奨されている移行上皮癌 (Transitional cell carcinoma: TCC) に焦点をあて、イヌにおいてもがん治療前後で PFAAs が変化するか検討した。

図および表

Table 7 供試動物プロフィール (がん罹患犬)

疾患名	犬種	年齢(歳)	性別	体重(kg)	BCS(9段階)
甲状腺癌	ウェルシュ・コーギー	9	避妊雌	8.2	5
甲状腺癌	ウェルシュ・コーギー	10	避妊雌	7.5	5
甲状腺癌	雑種	10	去勢雄	9.5	4
甲状腺癌	ミニチュア・ダックスフント	11	雄	4.2	5
移行上皮癌	ラブラドル・レトリバー	11	雌	23.0	5
移行上皮癌	ポメラニアン	12	避妊雌	6.2	5
移行上皮癌	ミニチュア・シュナウザー	12	避妊雌	7.4	4
移行上皮癌	ミニチュア・ダックスフント	10	避妊雌	5.4	5
移行上皮癌	ミニチュア・ダックスフント	12	避妊雌	4.5	5
移行上皮癌	ミニチュア・ダックスフント	13	避妊雌	3.8	5
移行上皮癌	ミニチュア・ダックスフント	10	雄	4.7	4
移行上皮癌	パピヨン	11	避妊雌	3.5	4
悪性乳腺腫瘍	ミニチュア・ダックスフント	12	避妊雌	4.3	5
悪性乳腺腫瘍	ウェルシュ・コーギー	10	避妊雌	8.9	5

悪性乳腺腫瘍	ヨークシャー・テリア	9	雌	4.0	5
悪性黒色腫	フレンチ・ブルドッグ	8	雄	10.2	5
悪性黒色腫	ミニチュア・ダックスフント	13	避妊雌	3.4	4
悪性黒色腫	ミニチュア・ダックスフント	11	避妊雌	4.0	4
悪性黒色腫	ミニチュア・シュナウザー	13	去勢雄	6.3	4
悪性黒色腫	ウェルシュ・コーギー	12	去勢雄	9.2	5
悪性黒色腫	雑種	11	雄	14.0	5
リンパ腫	シェットランド・シープドッグ	8	去勢雄	12.3	5
リンパ腫	ラブラドル・レトリバー	10	避妊雌	26.3	4
扁平上皮癌	トイ・プードル	7	去勢雄	5.6	4
扁平上皮癌	チワワ	8	去勢雄	3.2	4
肝細胞癌	ミニチュア・ダックスフント	12	去勢雄	4.5	5
肝細胞癌	シベリアン・ハスキー	9	去勢雄	20.3	5
肝細胞癌	ラブラドル・レトリバー	14	雄	27.0	4
肝細胞癌	シー・スー	13	避妊雌	4.8	5
肝細胞癌	チワワ	12	去勢雄	2.8	4
肝細胞癌	ウェルシュ・コーギー	9	避妊雌	8.3	5

肝細胞癌	雑種	10	避妊雌	12.2	5
肝細胞癌	ミチユア・シュウサター	10	避妊雌	5.9	5
前立腺癌	ビーグール	14	雄	11.5	5
血管周皮腫	雑種	10	避妊雌	16.3	5
多発性骨髄腫	ゴールドエン・レトリバー	12	雄	28.2	4
骨肉腫	トイ・プードル	8	避妊雌	4.8	4
腎細胞癌	雑種	10	雄	15.3	4
肺腺癌	シー・ズター	10	去勢雄	6.7	5

Table 8 供試動物プロフィール(健常犬)

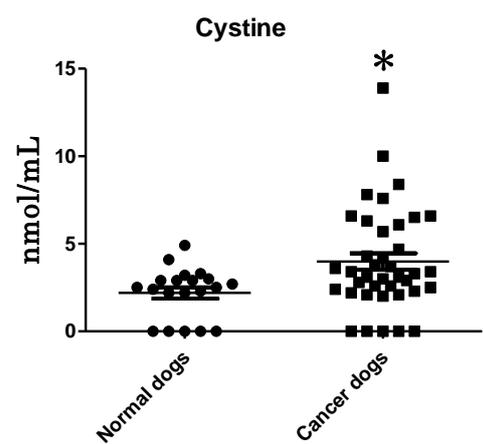
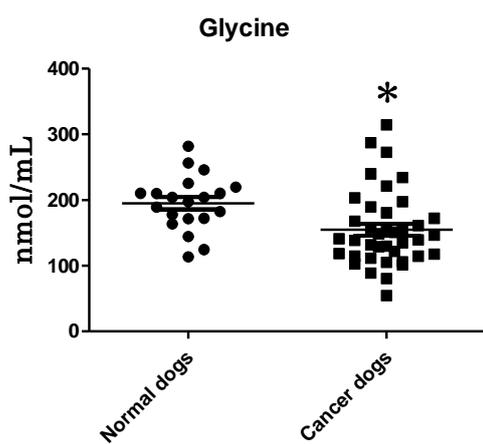
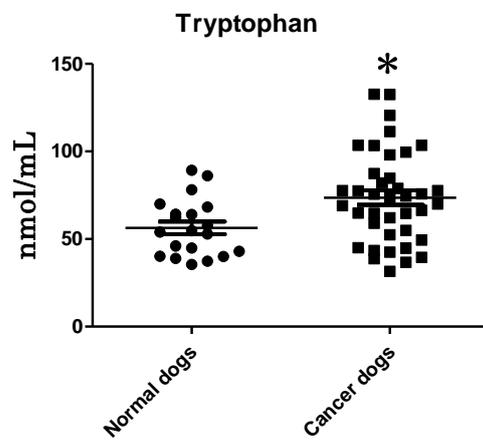
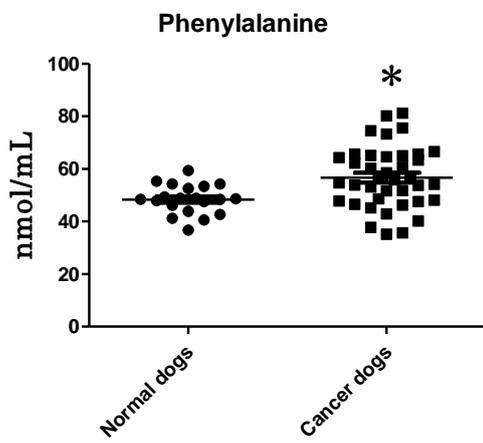
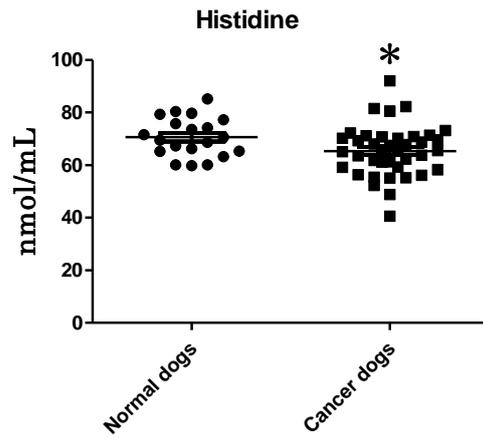
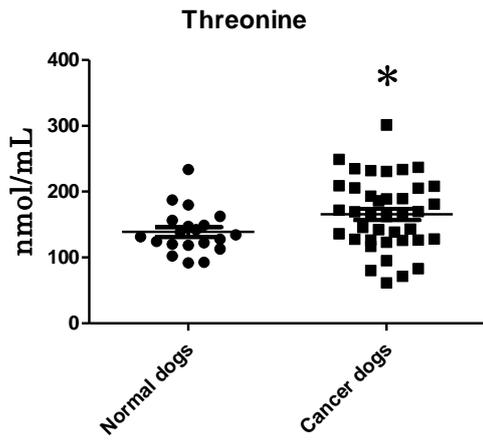
犬種	年齢 (歳)	性別	体重 (kg)	BCS(9段階評価)
ビーグル	11	避妊雌	9.8	4
ビーグル	8	避妊雌	8.1	4
ビーグル	10	避妊雌	7.2	4
ビーグル	8	避妊雌	8.5	4
ビーグル	8	避妊雌	5.9	5
ビーグル	7	避妊雌	10.3	4
ビーグル	7	避妊雌	10.0	4
ビーグル	7	避妊雌	10.2	4
ビーグル	4	避妊雌	13.2	5
ビーグル	5	去勢雄	11.5	4
ビーグル	5	去勢雄	11.1	4
ビーグル	5	去勢雄	11.0	4
ビーグル	5	去勢雄	10.8	5
ビーグル	5	去勢雄	11.7	4
ビーグル	3	去勢雄	12.3	4
ビーグル	3	去勢雄	12.4	4
ビーグル	3	去勢雄	12.2	4
ビーグル	3	去勢雄	12.8	4
ビーグル	8	去勢雄	11.2	5
ビーグル	8	去勢雄	10.2	4

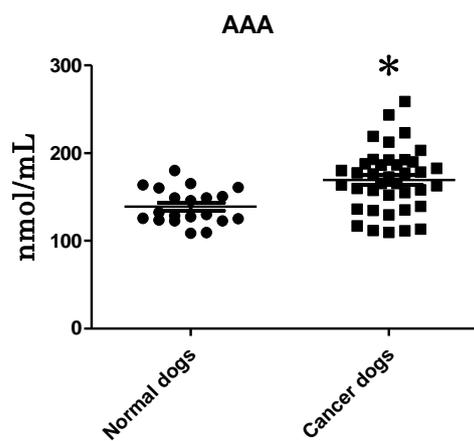
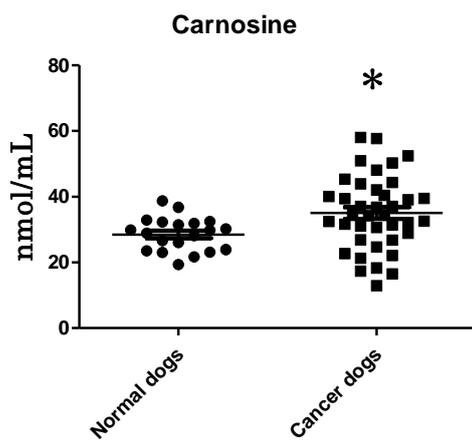
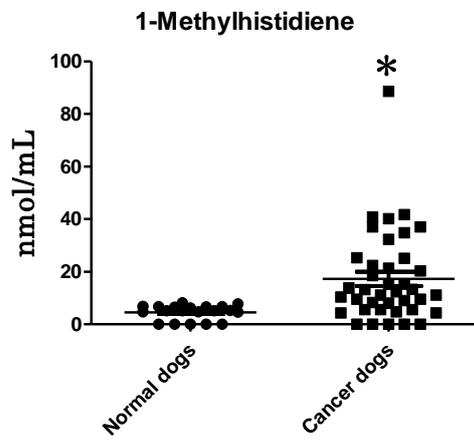
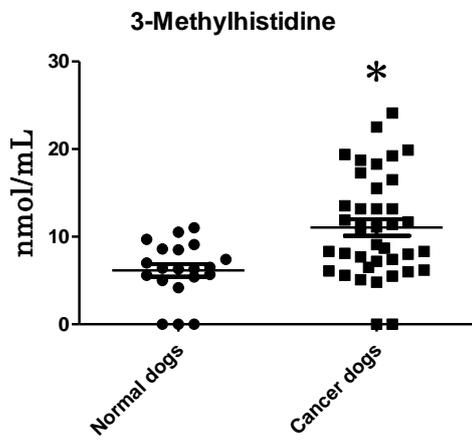
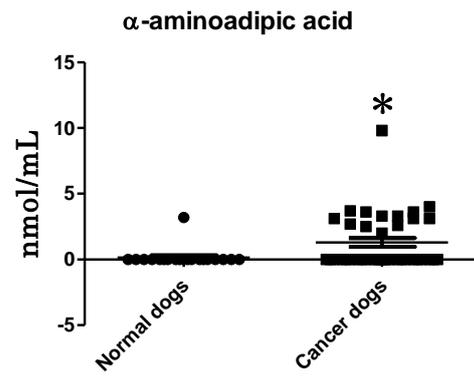
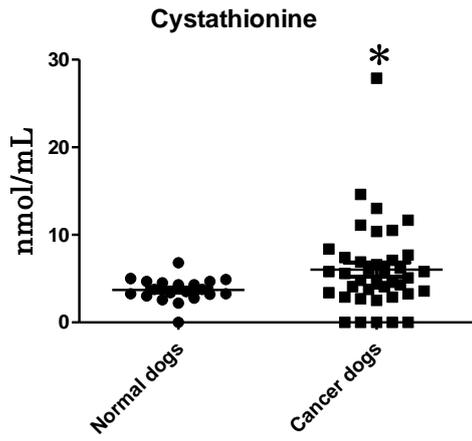
Table 9 がんを罹患したイヌおよび健常犬における PFAAs の比較

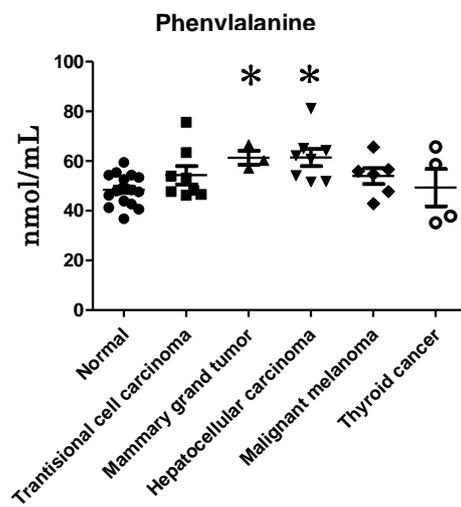
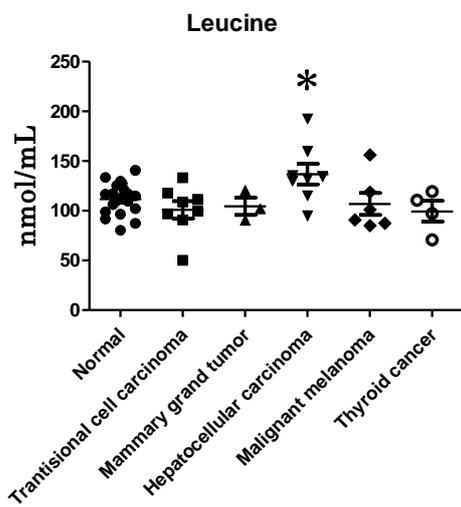
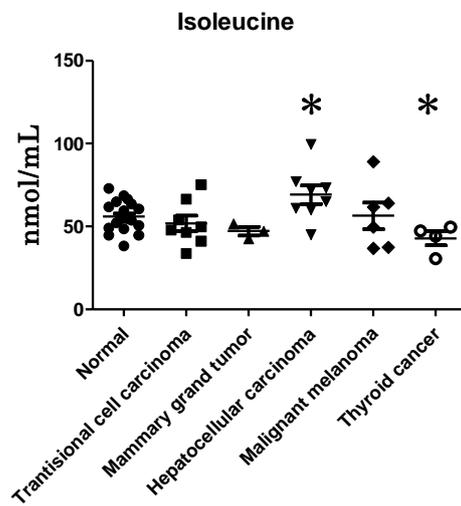
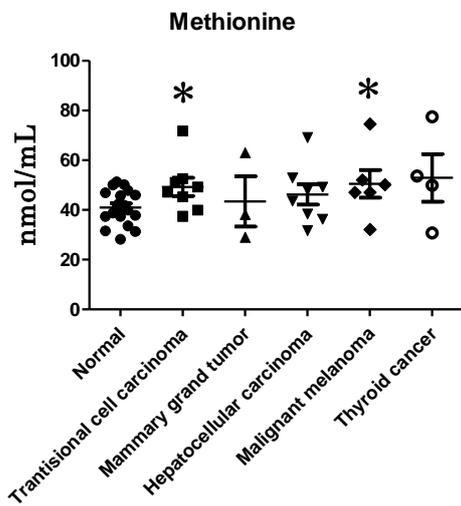
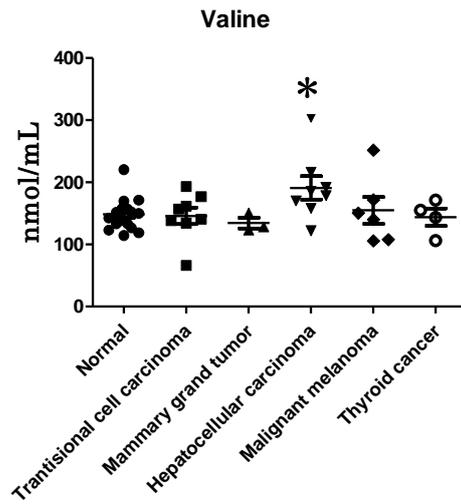
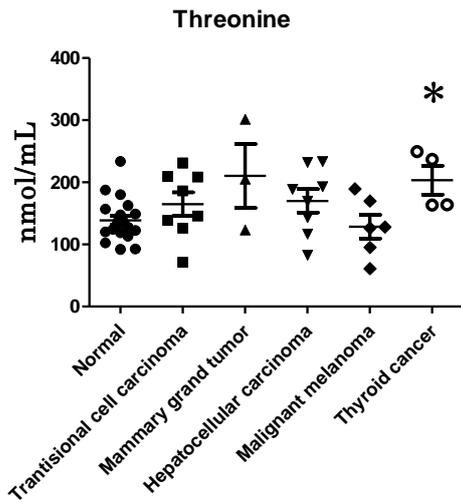
Amino acid	Cancer dogs	Normal dogs
Thr *	165.6±8.7	138.7±7.6
Val	157.8±7.0	148.2±5.2
Met	47.5±2.0	41.6±1.5
Ileu	55.6±2.6	55.9±2.0
Leu	111.4±4.4	111.8±3.5
Phe *	56.7±1.9	48.4±1.2
His *	65.4±1.6	70.7±1.7
Trp *	73.6±4.2	56.3±3.6
Lys	159.8±10.1	136.1±7.1
Arg	85.2±4.3	95.9±5.0
Asp	5.4±0.3	4.7±0.2
Ser	95.9±5.6	103.9±4.8
Asn	40.1±1.6	37.0±1.6
Glu	36.8±2.5	32.1±1.1
Gln	597.7±22.1	663.2±12.4
Pro	115.4±6.8	112.0±4.5
Gly *	154.7±9.1	195.2±9.3
Ala	349.0±17.3	322.8±19.7
Tyr	39.8±1.8	34.2±1.2
Cystine *	4.0±0.5	2.2±0.3
Cysthio *	6.0±0.8	3.7±0.3
Tau	105.9±6.2	105.9±5.1
Hypro	105.9±6.2	15.6±2.4
Sarco	1.4±0.4	0.3±0.3
α-AAA *	1.3±0.3	0.2±0.2
Sarco	1.4±0.4	0.3±0.3
α-AAA	1.3±0.3	0.2±0.2
Cit	47.2±3.6	46.8±4.4
α-ABA	23.5±1.8	20.0±1.0
γ-A β-HBA	0.0	0.0
β-Ala	0.6±0.2	0.0
β-AIBA	0.0	0.0
γ-ABA	0.0	0.0
MEA	6.2±0.5	6.5±0.6
Homocys	0.0	0.0
3-Me His *	11.1±0.9	6.2±0.7
1-Me His *	17.3±2.7	4.5±0.6
Carno *	35.0±1.8	28.5±1.1
Ans	0.7±0.3	0.0
Hyllys	0.0	0.0
Orni	14.0±0.9	12.0±0.5
総アミノ酸	105.9±6.2	2661.0±64.8
非必須アミノ酸	1544.3±43.5	1613.2±41.0
必須アミノ酸	978.6±32.9	903.5±25.9
分岐鎖アミノ酸	324.9±13.6	315.9±10.1
芳香族アミノ酸 *	169.5±5.7	139.0±4.5
フィッシャー比 *	1.4±0.1	1.8±0.1

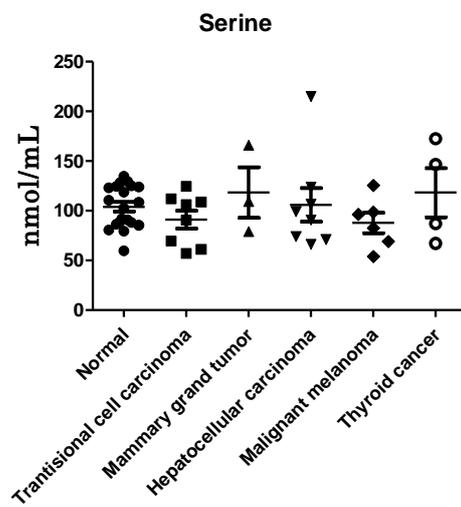
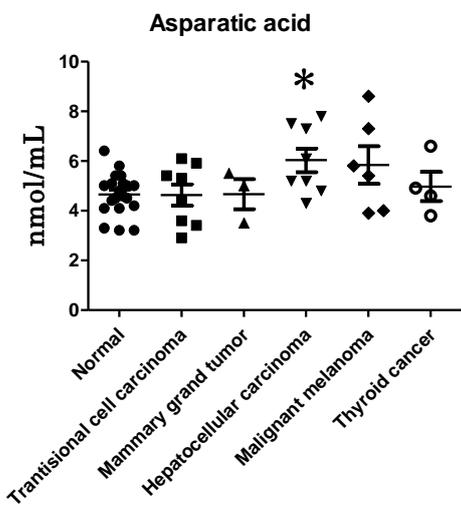
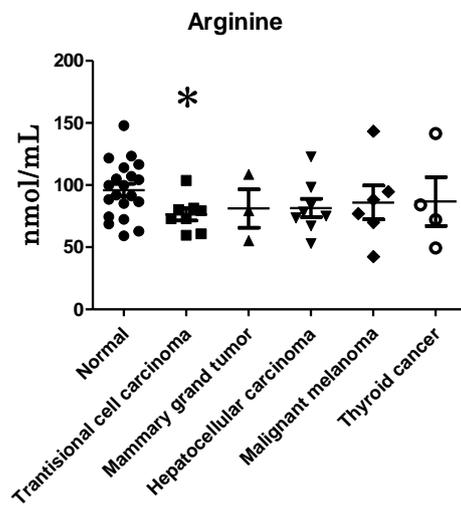
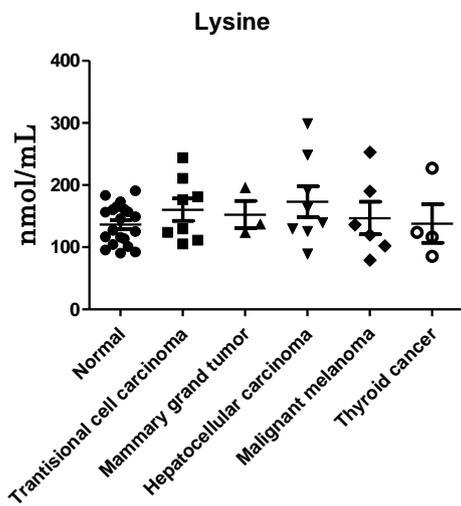
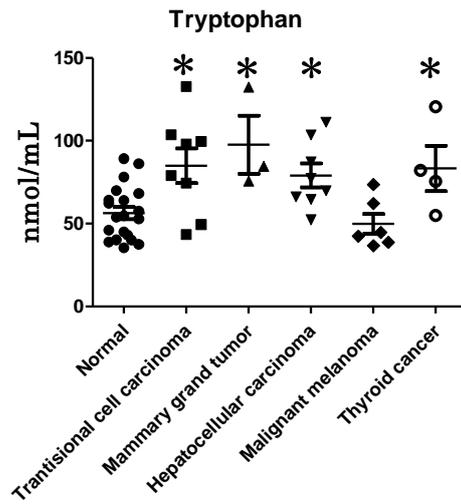
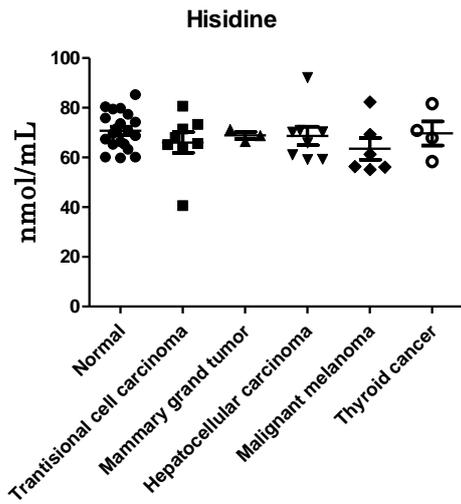
Mann-Whitney U test (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) を用いて評価した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなし*で示した。

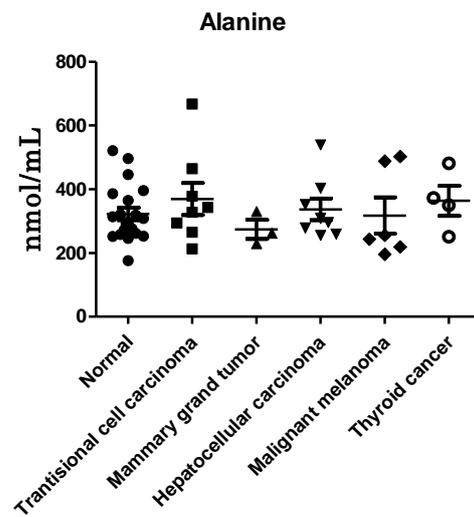
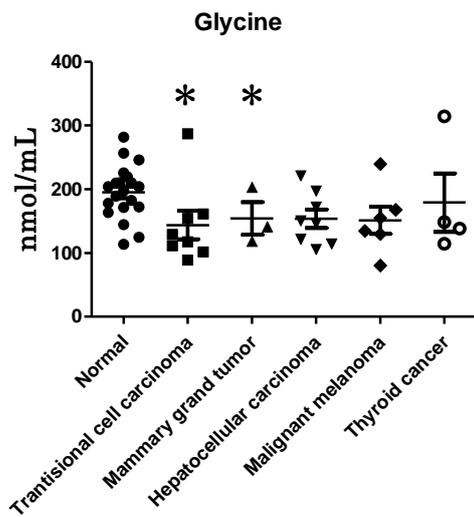
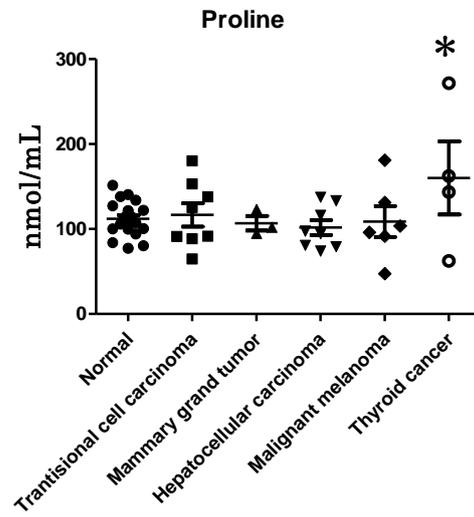
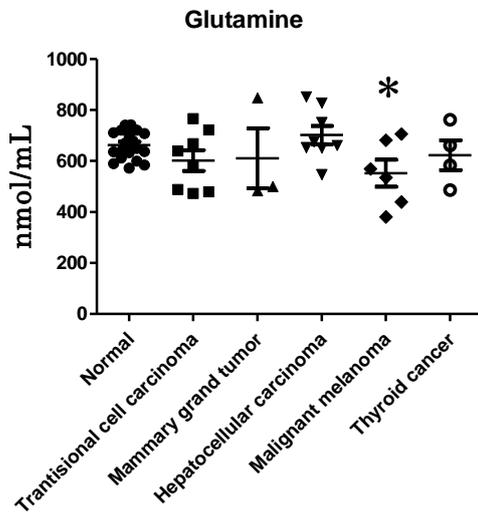
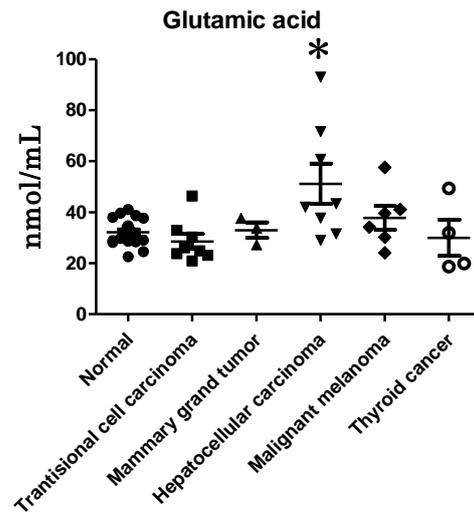
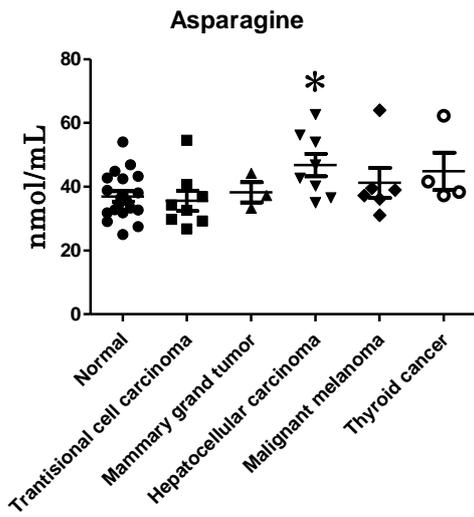
PFAAs は平均 ± SE で示し、単位は全て nmol/mL で表記した。

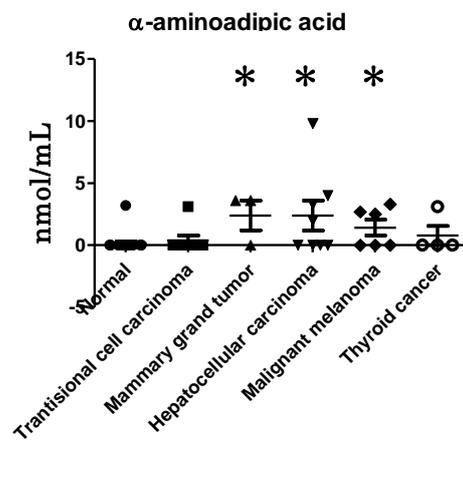
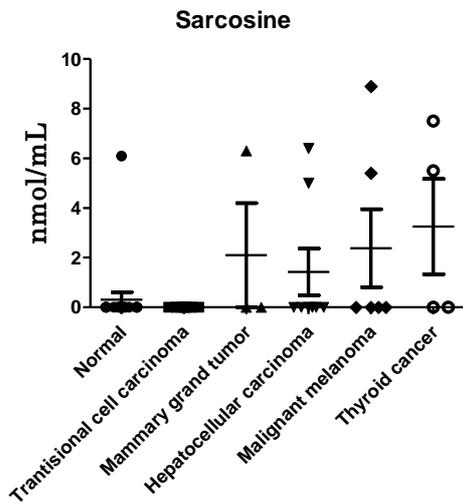
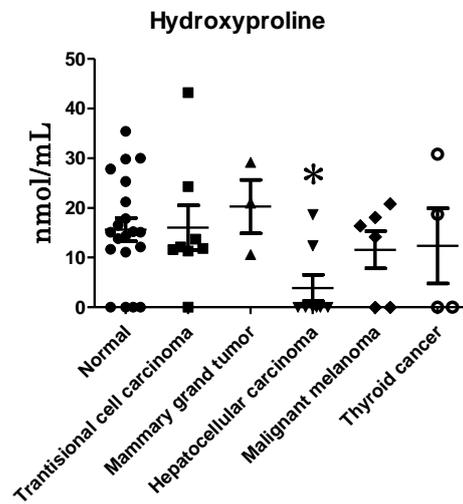
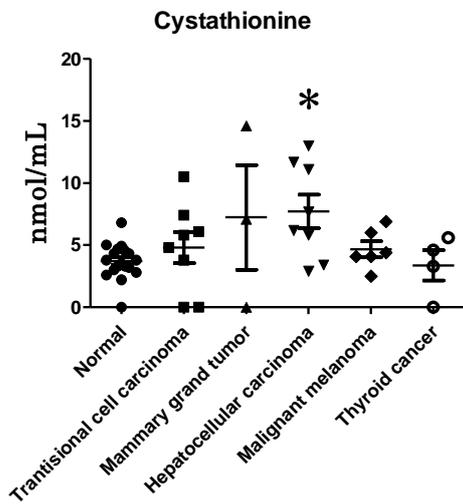
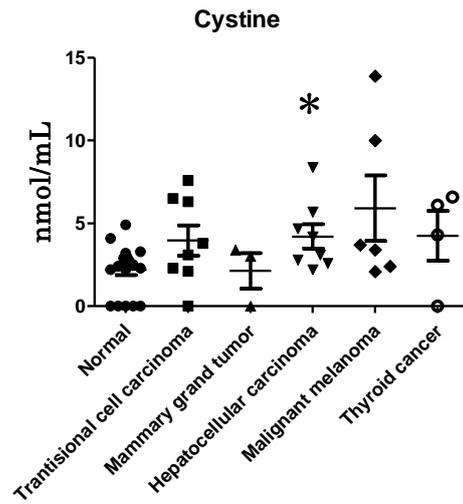
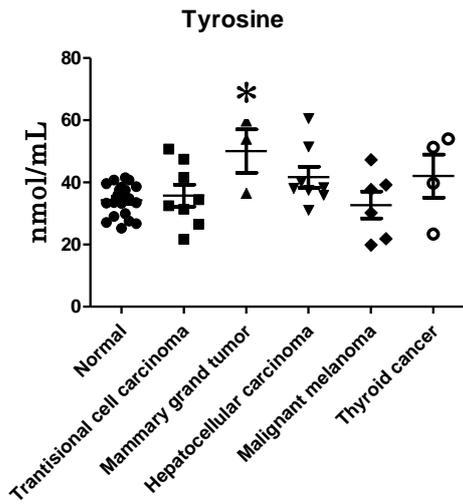


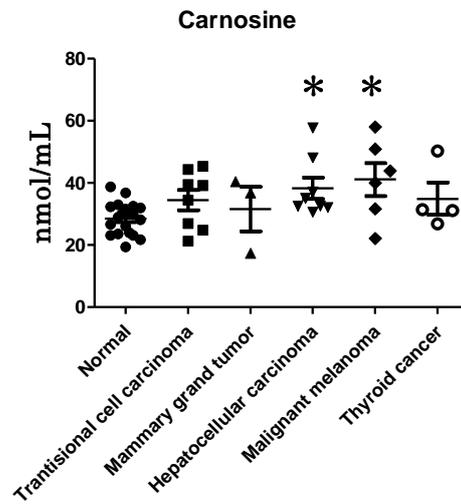
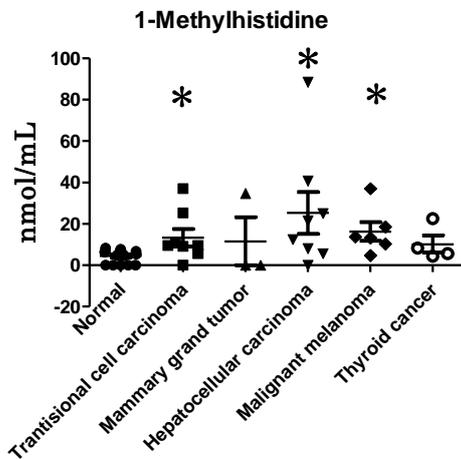
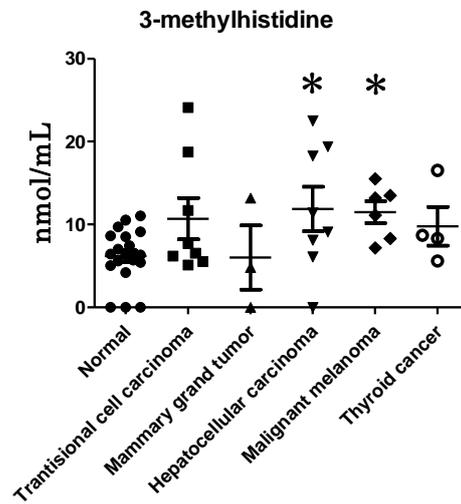
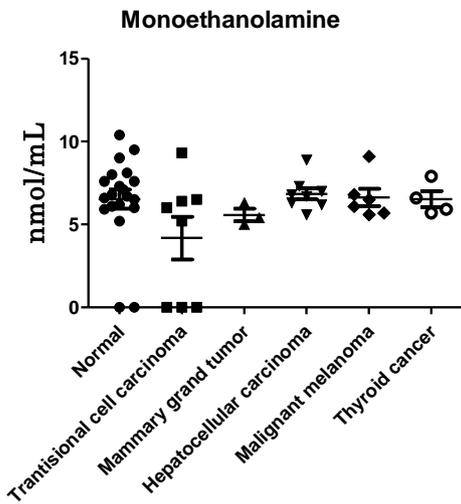
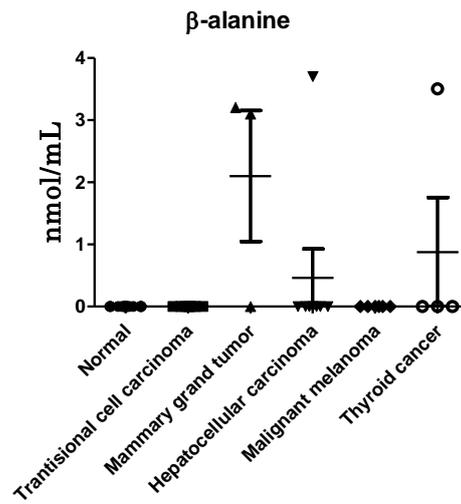
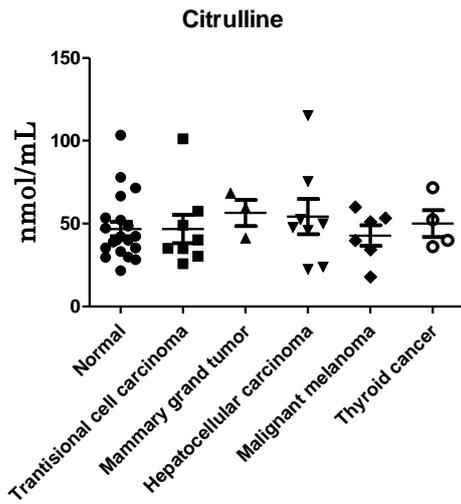


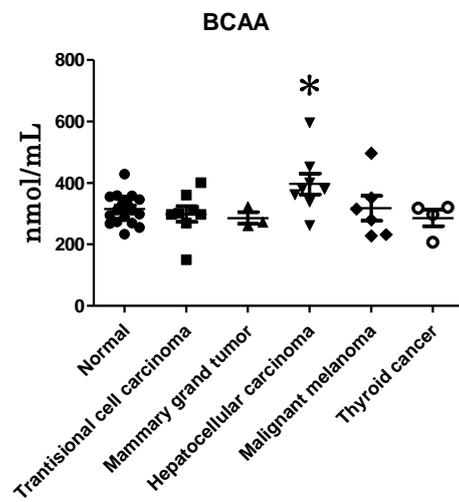
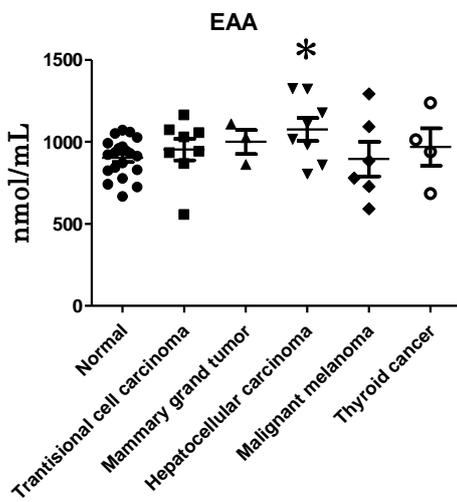
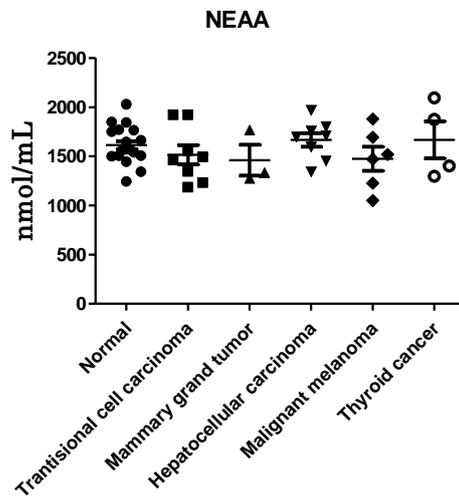
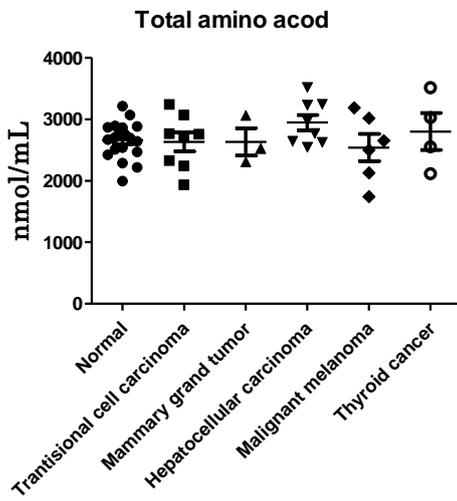
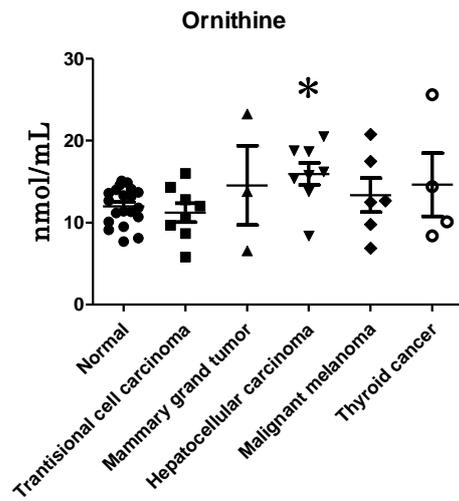
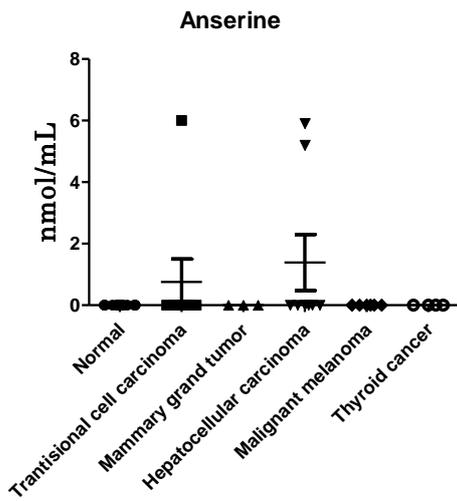












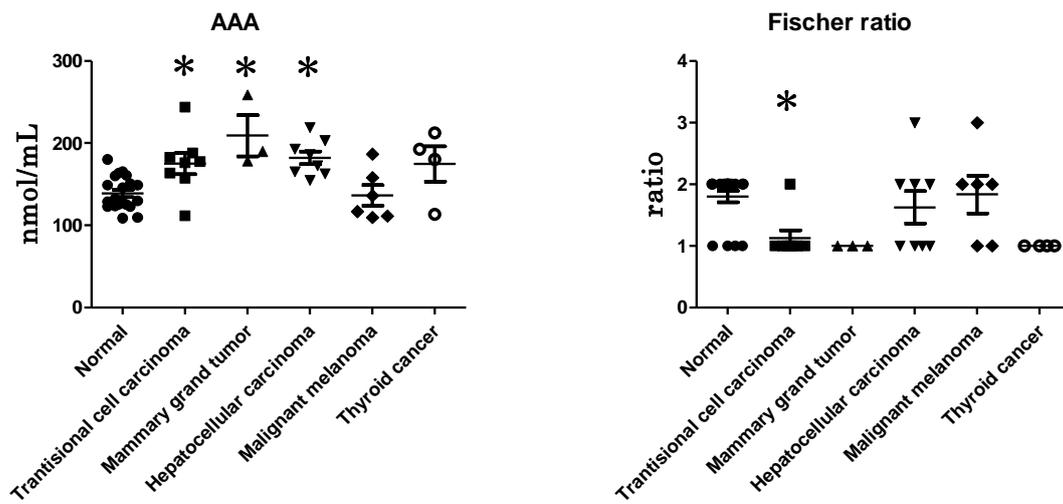


Fig. 5 がんの種類別と健常犬の PFAs の比較

各がんと健常犬を比較し、有意な変化が認められた場合は* ($P < 0.05$, Mann–Whitney U test)で示した。単位は全て nmol/mL で表記した。

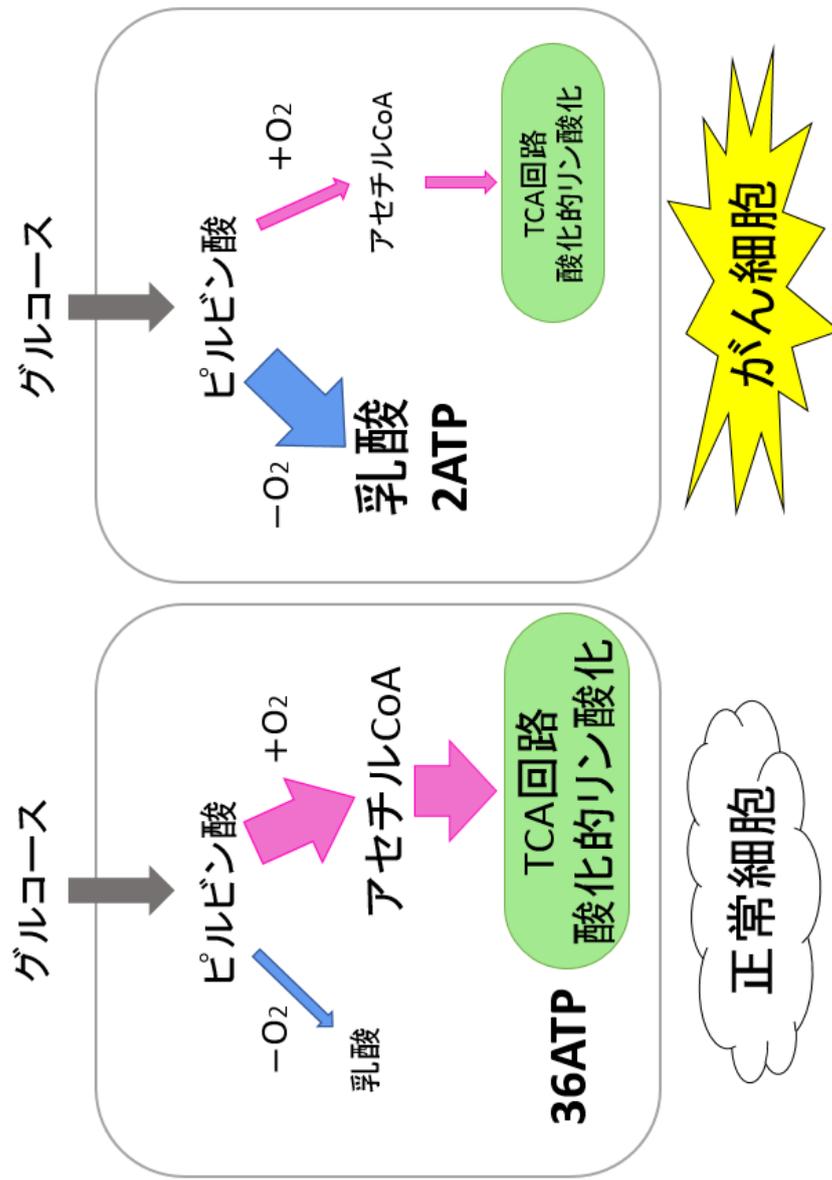


Fig. 6 がん細胞におけるワールブルグ効果

腫瘍学におけるワールブルグ効果とは、がん細胞内で嫌気環境のみならず、好気環境でも解糖系によるグルコース代謝が亢進していることである。がん細胞は酸素がある環境でもミトコンドリアの酸化的リン酸化 (36ATP 産生) よりも、嫌氣的な解糖系でのエネルギー産生 (2ATP) を行っている。グルコースは解糖系でピルビン酸になった後は、ミトコンドリアに入らず、最終産物として乳酸に

第 3 章

がん治療前後における血漿遊離アミノ酸濃度の変化

緒言

イヌの移行上皮癌 (Transitional Cell Carcinoma: TCC)は、イヌの膀胱腫瘍の中で最も一般的な悪性腫瘍である。イヌの全腫瘍の中で 1%、膀胱腫瘍の中で 90%を占める【Norris AM *et al.*, 1992; Valli VE *et al.*, 1995; Mutsaers AJ *et al.*, 2003】。TCC は膀胱粘膜から発生し、主臨床症状として血尿や頻尿、排尿障害が認められる【Mutsaers AJ *et al.*, 2003】。イヌの TCC の病態生理学的な特徴はヒトの浸潤性 TCC と非常に類似している。TCC は腫瘍が発見されたときには既に膀胱壁の筋層や近くの組織に浸潤していることが多い。このように、TCC を早期に発見することは治療戦略上非常に重要である。イヌの TCC の治療法は、腫瘍の大きさが小さい場合や、膀胱三角と呼ばれる部位以外の場所に発生した場合に外科治療がはじめに推奨される。しかしイヌの TCC は膀胱三角に発生することが最も多く、外科治療による切除が難しい。それゆえ、放射線治療や化学療法が治療法として推奨されている。化学療法においては抗がん剤の 1 種であるミトキサントロンとピロキシカムとの併用療法が最も一般的な治療法である。

ヒトの膀胱腫瘍患者において、がんによって PFAAs のバランスが崩れ、さらに抗がん剤の治療前後で PFAAs が変化することが報告されている【Nefyodov LI *et al.*, 2000】。さらに、様々ながんの種類において、抗がん剤の投与は PFAAs に影響を与え、抗がん剤による副作用と関係しているという報告もされている【Desai TK *et al.*, 1992; Nefyodov LI *et al.*, 2000; Grigoryan RS *et al.*, 2004; Abd-Allah AR *et al.*, 2005; Glazev AA *et al.*, 2008; Chiba M *et al.*, 2013; Islambulchilar M *et al.*, 2015; Miller JA *et al.*, 2015】。しかしながら、獣医学領域において、TCC 罹患犬における抗がん剤の投与前後で PFAAs が変化するかどうかを調査した報告はない。そこで本研究では、TCC 罹患犬における化学療法前後の PFAAs の変化を調べることを目的とした。

材料および方法

供試動物

本学附属動物医療センターに来院した膀胱原発の TCC に罹患したイヌ 3 頭（年齢: 10-12, 性別: 避妊雌 3 頭, 体重: 5.4-6.2kg, BCS: 4-5/9）を本研究に用いた[Table. 10]。獣医師より飼い主に対するインフォームドコンセントを十分に行い、本研究の目的や方法、リスク等を説明した後、飼い主より承諾が得られた症例のみを使用した。全ての症例が血尿や頻尿、膀胱炎の症状を呈していた。各症例は膀胱鏡検査やカテーテルによって採取した組織の病理組織学的検査により TCC と診断された。全症例において体重減少はなく、血漿中の TP および ALB の値は基準値内であり、栄養状態は良好な個体である。食事は 1 回量を RER（Resting energy : 安静時要求量） $\times 1.2-1.6 \text{ kcal} \times 1/2$ に設定した総合栄養食を 1 日 2 回給与されていた。また、移行上皮癌罹患犬において PFAAs が治療効果判定の指標として利用可能か調査するため、第 2 章 2 節で TCC 罹患犬に認められた有意に変化した PFAAs に関して、本試験終了時（6 週間目）と健常犬を比較し、健常犬の値に近づくか検討した。比較対象とした健常犬の値は、第 2 章で用いた健常犬のデータを本章でも使用した[Table 7]。

化学療法

TCC 罹患犬は一般状態の確認のため採血を実施し、完全血球計算および血液化学検査で異常が認められないことを確認したのち、 4 mg/m^2 でミトキサントロン（ノバントロン; タケダ薬品株式会社, 東京, 日本）をイヌの橈側皮静脈より投与した。投薬プロトコールは、初診時を（0 週間目）とし、3 週間毎に 6 週間後まで投与した。途中で消化管毒性や骨髄抑制などといった副作用の有無を初回投与から 1 週間後に確認した。3 週および 6 週後に投与し

た際の副作用の確認はホームドクターで実施された。もし副作用が認められた場合は、次回のミトキサントロンの投与量を 3/4 に減量して投与した。さらに、全症例とも 1 日 1 回ピロキシカム (バキソ; 富山製薬株式会社, 東京, 日本) を 0.3 mg/kg で投与した。腫瘍径は採血プロトコール (0、1、3 および 6 週間目) と同日に超音波検査下で最大長径を計測した。

採血プロトコールおよび検体処理方法

血液検体は抗がん剤投与前 (0 週目) および投与後 (1、3、6 週間目) に TCC 罹患犬の頸静脈より 2 mL 採取した。PFAAs は食事の影響により変化するため、前日の最後の食事から 12 時間以上絶食していることを飼い主に確認し、午前中に採血を実施した。採血後は直ちに抗凝固剤として EDTA-2K (テルモ、東京、日本) に分注し、抗凝固処理を行った。次いで、速やかに 4°C, 3,000 rpm, 10 min 遠心分離し、得られた血漿は PFAAs を測定するまで -80°C で保存した。

PFAAs 測定

PFAAs の測定は全て採血から 1 週間以内に富士フィルムモノリス株式会社に委託し、分析装置は LC/MS を用いた。

測定した PFAAs

第 1 章と同様、39 種類の PFAAs に加え、必須アミノ酸 (EAA)、非必須アミノ酸 (NEAA)、チロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファンの 3 種を総称した芳香族アミノ酸 (AAA)、バリン、ロイシンおよびイソロイシンの 3 種を総称した分岐鎖アミノ酸 (BCAA)、フィッシャー比 (BCAA/AAA) および総アミノ酸も算出した。

統計解析

全ての結果は Mean±SE にて表した。抗がん剤投与前後における PFAAs の変化の評価は One-Way Repeated Measured ANOVA を用いた。前章第 2 節において、移行上皮癌罹患犬で変化した PFAAs に関して、試験終了時（6 週間目）と健常犬の値を Mann-Whitney U test を用いて統計解析を行った。全ての結果は Graph pad Prism5 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA)を用いて統計解析を行い、有意標準は $P < 0.05$ とした。

結果

第3章では、TCC罹患犬3頭を用いて抗がん剤投与前を0週間とし、投与後1、3、6週間後の計4ポイントにおいて採血を行い、抗がん剤投与前後のPFAAsの変化を調べた。39種類測定したPFAAsのうち、測定した全ポイントにおいて検出限界値未満となった6種類のPFAAs (γ -アミノ β -ヒドロキシ酪酸、 β -アミノイソ酪酸、 γ -アミノ酪酸、ホモシスチン、アンセリンおよびヒドロキシリジン) および食後16時間以上経過しないと測定が出来ない α -アミノ酪酸を除いた32種類のPFAAsで検討した。

シスタチオニンにおいて抗がん剤投与前後で有意な変化が認められた ($P < 0.05$, One-Way Repeated Measured ANOVA)。シスタチオニンは投与後1週間と3週間で投与前と比較して低下し、6週間後に増加した[Table 11]。

第2章の2節で、移行上皮癌罹患犬において有意な変化が認められたグリシン、メチオニン、1-メチルヒスチジン、トリプトファン、芳香族アミノ酸、アルギニン、タウリンおよびフィッシャー比に関しては、治療前後で有意な変化は認められなかった ($P > 0.05$, One-Way Repeated Measured ANOVA)。また、試験終了時(6週間目)と健常犬を比較したところ、メチオニン、アルギニン、タウリンおよびフィッシャー比で有意な変化はなくなった ($P > 0.05$, Mann-Whitney U test) [Fig. 7]。

腫瘍の大きさは投与前後で顕著な変化は認められなかった[Fig. 8]。血尿や頻尿などの臨床症状は全頭において抗がん剤投与後直ぐに改善された。抗がん剤の副作用の一つである消化器毒性は全頭において認められなかったが、3頭中1頭において投与から1週間後に骨髄抑制が認められた(白血球数: 1300 個/ μ L、好中球数: 205 個/ μ L)。

考察

医学領域において、PFAAs が変化することが報告されている【Gu Y *et al.*, 2015; Miyagi Y *et al.*, 2011】。獣医学領域においては、悪性乳腺腫瘍を罹患したイヌにおいて PFAAs が変化することが報告されている【Azuma K *et al.*, 2012】。本研究では、TCC 罹患犬における抗がん剤投与前後の PFAAs の変化について検討した。

有意な変化はシスタチオニンにおいて認められたが、その他の PFAAs で有意な変化は認められなかった。細胞外のシスタチオニンは細胞内に移行し、システインを合成する【Kobayashi S *et al.*, 2015】。合成されたシステインはグルタチオンの合成に利用される。グルタチオンは細胞保護能力や薬剤を細胞外に排出する能力を有している。血漿シスタチオニンはがん細胞に取り込まれ、グルタチオンの合成が活発に行われている可能性が考えられた。従って、シスタチオニン濃度は 0 週間と比較して、抗がん剤投与から 1 および 3 週間後に低下したのは、抗がん剤を排出するためにグルタチオン産生に利用されたと考えられた。さらに、がん細胞は抗がん剤に曝露されると酸化ストレスを受けると報告されており、酸化ストレスを受けたがん細胞内では、ホモシステインからシスタチオニンに変換する酵素の活性が低下するということが明らかとなっている【Yamamoto T *et al.*, 2014】。また、同時にペントースリン酸回路を介して核酸や NADPH の合成が盛んになると報告されている【Yamamoto T *et al.*, 2014】。それゆえ、細胞内のシスタチオニン濃度は低下し、抗がん剤に曝露されることによってがん細胞内で NADPH の合成が活性化すると考えられた。細胞内における NADPH の機能は、酸化型グルタチオンから還元型グルタチオンに変換することである。本研究において、抗がん剤投与後 1 から 3 週間でシスタチオニンが低下したことは、還元型グルタチオンの合成が関連している可能性が考えられた。一方で、抗がん剤投与後 6 週間

でシスタチオン濃度が増加した。本研究で抗がん剤は 0 週間と 3 週間で計 2 回投与しており、2 回目の抗がん剤投与後にシスタチオンの濃度は増加した。つまり、初回投与後はシスタチオンの取り込みが促進し、薬物の代謝のためにグルタチオン合成に利用され、2 回目の投与後は明らかな腫瘍の増大や臨床症状の悪化が認められなかったことから、がん細胞へ抗がん剤が効果的に作用し、シスタチオンの取り込みが行われなかった可能性が考えられた。

第 2 章の 2 節で、移行上皮癌罹患犬において有意な変化が認められたグリシン、メチオニン、1-メチルヒスチジン、トリプトファン、アルギニン、タウリン、芳香族アミノ酸およびフィッシャー比に関しては、6 週目の試験終了時と健常犬を比較したところ、メチオニン、アルギニン、タウリンおよびフィッシャー比では有意な変化が認められなかったが、その他の PFAAs は有意な変化が認められた。有意な変化が認められなかった PFAAs に関しては、抗がん剤の投与により健常犬の値に近づいたといえる。ヒトの膀胱腫瘍患者において、抗がん剤投与前後の PFAAs を測定した先行研究では、治療前に生じていた PFAAs の不均衡が小さくなったと報告されている【Nefyodov LI *et al.*, 2000】。また、抗がん剤を投与すると PFAAs は増加し、腫瘍細胞内のアミノ酸濃度は低下した【Nefyodov LI *et al.*, 2000】。つまり、抗がん剤ががん細胞の栄養源であるアミノ酸の取り込みを阻害したことが示され、PFAAs の測定は治療効果判定として有用であると報告されている【Nefyodov LI *et al.*, 2000】。本研究で用いた個体の腫瘍径は増大しておらず、臨床症状も抗がん剤の投与を開始してから改善された。がんは無くなってはいないが、抗がん剤の効果が認められたことは明らかである。移行上皮癌罹患犬で認められた PFAAs のうちいくつかは、試験終了時に健常犬の値と差がなくなった。つまり、移行上皮癌罹患犬においても、治療モニタリングとして PFAAs の変化を利用できる可能性が示唆された。一方で、膀胱腫瘍ではないが、ヒトの乳がん、胃がんおよび

甲状腺癌患者において、周術期の PFAAs を調べた報告では【Gu Y *et al.*, 2015】、手術によって完全にがんを切除することで、変化した PFAAs が健常者の濃度まで戻ったと示されている。本研究で用いたがんの治療法は、化学療法でありがんの完全切除を行ったわけではない。抗がん剤投与開始から腫瘍の増大は認められていないが、膀胱内にがんは存在している。つまり、本研究のように生体内に存在すると治療を施しても有意な変化が認められない可能性も示唆された。

本研究より、イヌにおいても抗がん剤投与は PFAAs に影響を与えているということが示された。

小括

ヒトのがん患者の研究において、化学療法前後の PFAAs が変化することが知られているが、イヌにおいては明らかではない。そこで、全身療法である化学療法が推奨されている移行上皮癌に焦点を当てた。第 3 章では、移行上皮癌 (TCC) 罹患犬における化学療法前後の PFAAs を測定し、その変動を調べた。

化学療法前後で血漿中のシスタチオン濃度に有意な変動が認められた。シスタチオンは抗がん剤投与前 (0 週目) と比較し、抗がん剤投与後 1 および 3 週間目で減少、抗がん剤投与後 6 週間目に増加した。TCC 罹患犬の血漿中のシスタチオンは、がん細胞内に取り込まれ、薬物解毒作用のあるグルタチオン合成に利用された可能性が考えられた。臨床症状の改善や明らかな腫瘍の増大は認められなかったことから、2 回目の投与後はシスタチオンがグルタチオン合成に利用されず、がん細胞に抗がん剤が効果的に作用したと考えられた。以上より、PFAAs は抗がん剤投与に影響されることが示された。

図および表

Table 10 移行上皮癌罹患犬プロフィール

	犬種	年齢 (歳)	性別	体重 (kg)	BCS(9段階評価)
Case 1	ポメラニアン	12	避妊雌	6.2	5
Case 2	ミニチュア・シュナウザー	12	避妊雌	7.4	4
Case 3	ミニチュア・ダックスフント	10	避妊雌	5.4	5

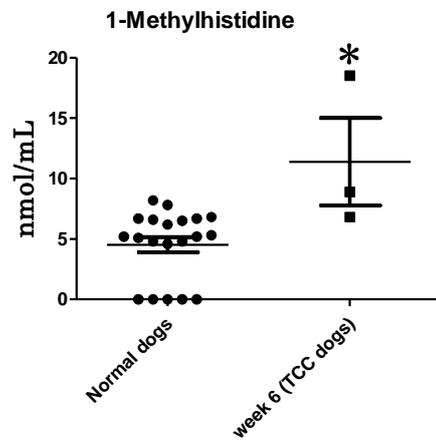
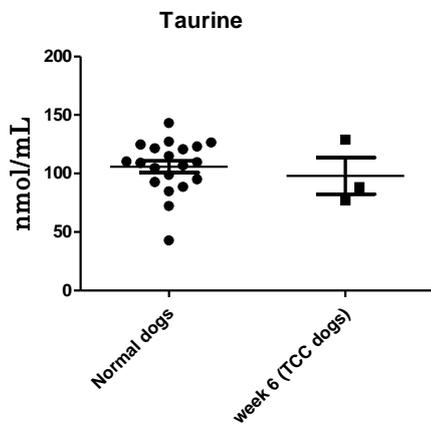
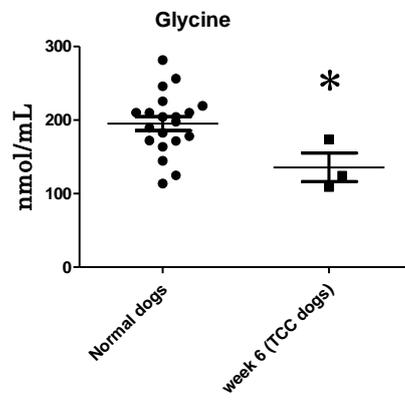
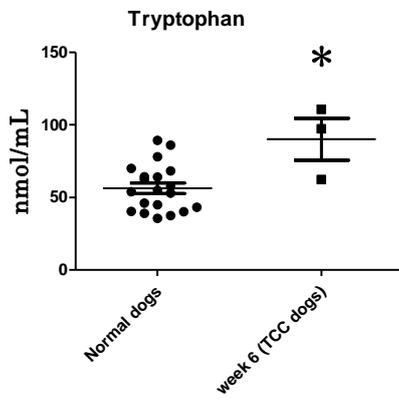
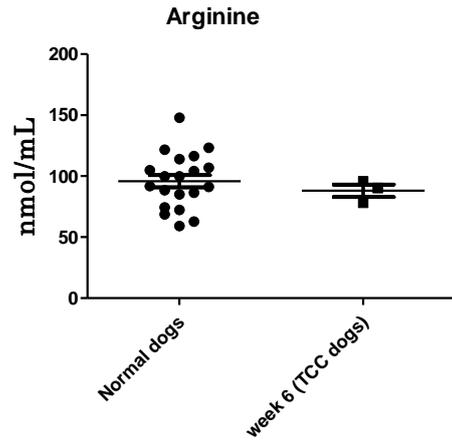
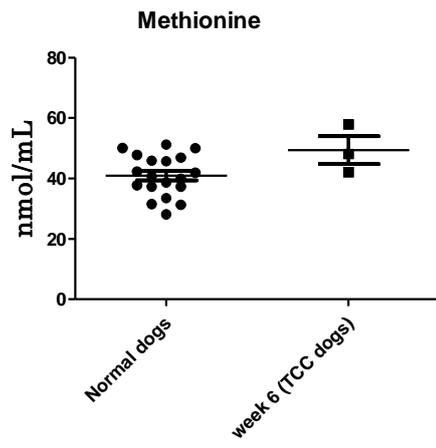
Table 11 TCC を罹患した 3 頭のイヌにおける抗がん剤投与前後 (0、1、3 および 6 週目)の PFAAs

項目	TCC			
	weeks			
	0	1	3	6
Tau	80.1 ± 10.8	82.1 ± 22.4	76.8 ± 22.6	98.0 ± 15.8
Asp	4.3 ± 0.8	5.3 ± 0.9	3.9 ± 0.9	4.5 ± 0.6
Hypro	7.9 ± 4.0	19.1 ± 2.6	15.8 ± 2.8	10.8 ± 5.8
Thr	188.7 ± 32.0	199.7 ± 34.0	151.5 ± 10.4	170.2 ± 4.6
Ser	98.1 ± 19.0	109.4 ± 18.1	88.2 ± 20.4	99.9 ± 14.4
Asn	41.7 ± 7.2	50.8 ± 10.9	39.4 ± 4.4	40.6 ± 4.0
Glu	32.5 ± 7.0	33.4 ± 4.7	31.1 ± 7.8	29.4 ± 3.2
Gln	569 ± 44.0	619.5 ± 83.5	456.7 ± 22.2	552.7 ± 37.0
Sarco	0.0 ± 0.0	2.4 ± 2.4	0.0 ± 0.0	2.6 ± 2.6
α-AAA	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0	2.0 ± 2.0	2.0 ± 1.1
Pro	147.7 ± 16.6	195.8 ± 57.6	126.2 ± 19.3	109.9 ± 19.7
Gly	116.0 ± 7.9	156.2 ± 23.6	109.3 ± 13.7	135.6 ± 19.5
Ala	446.9 ± 113.1	534.0 ± 91.0	361.9 ± 22.5	329.1 ± 30.0
Cit	44.3 ± 6.8	48.6 ± 14.4	45.7 ± 16.8	71.1 ± 31.9
α-ABA	18.6 ± 3.1	16.2 ± 2.1	17.9 ± 6.0	22.8 ± 4.8
Val	165.0 ± 6.1	199.8 ± 20.6	202.2 ± 38.7	166.9 ± 23.6
Cys	3.8 ± 1.3	3.2 ± 2.0	2.1 ± 1.3	3.8 ± 0.2
Cysthio*	4.1 ± 2.2	3.2 ± 2.0	2.7 ± 1.4	6.3 ± 2.0
Met	44.5 ± 4.0	50.7 ± 9.5	43.8 ± 8.1	49.5 ± 4.6
Ileu	54.6 ± 6.0	66.2 ± 6.0	63.5 ± 15.5	54.8 ± 7.5
Leu	104.5 ± 6.5	118.7 ± 8.5	121.6 ± 31.2	100.5 ± 15.2
Tyr	36.2 ± 7.4	43.0 ± 2.2	36.5 ± 4.7	35.3 ± 6.1
Phe	49.1 ± 2.1	58.4 ± 1.4	49.6 ± 3.5	52.4 ± 7.1
MEA	4.3 ± 2.2	5.7 ± 2.8	5.7 ± 3.0	7.5 ± 0.6
His	69.8 ± 5.4	69.2 ± 3.2	63.0 ± 3.0	62.3 ± 3.8
3-Me His	12.8 ± 5.7	12.3 ± 4.1	14.0 ± 7.3	15.4 ± 6.1
1-Me His	23.8 ± 8.1	16.4 ± 6.9	16.9 ± 5.7	11.4 ± 3.6
Carno	33.5 ± 3.6	42.4 ± 6.1	33.5 ± 3.9	36.5 ± 3.5
Trp	93.5 ± 7.5	106.2 ± 16.6	93.2 ± 22.4	90.1 ± 14.5
Orni	10.4 ± 1.2	16.6 ± 5.5	10.3 ± 3.1	13.6 ± 2.6
Lys	181.2 ± 34.8	202.1 ± 37.6	148.1 ± 31.1	196.9 ± 31.3
Arg	70.5 ± 5.8	89.6 ± 11.0	62.5 ± 12.8	88.1 ± 5.2
総アミノ酸	2759.0 ± 265.3	3177.2 ± 364.4	2495.7 ± 184.1	2671.6 ± 49.3
非必須アミノ酸	1577.1 ± 176.1	1832.7 ± 244.8	1332.1 ± 94.8	1438.8 ± 16.4
必須アミノ酸	1021.4 ± 86.0	1160.7 ± 100.1	999.2 ± 166.7	1031.5 ± 80.0
分岐鎖アミノ酸	324.1 ± 18.5	384.7 ± 33.7	387.3 ± 85.3	322.2 ± 45.3
芳香族アミノ酸	178.8 ± 2.0	207.7 ± 19.4	179.3 ± 25.4	177.8 ± 21.8
フィッシャー比	0.7 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.3 ± 0.3

結果は平均 ± SE で表記した。

抗がん剤の投与前後で有意な変化が認められた PFAAs は* ($P < 0.05$, One-

Way Repeated Measures ANOVA)で表記した。



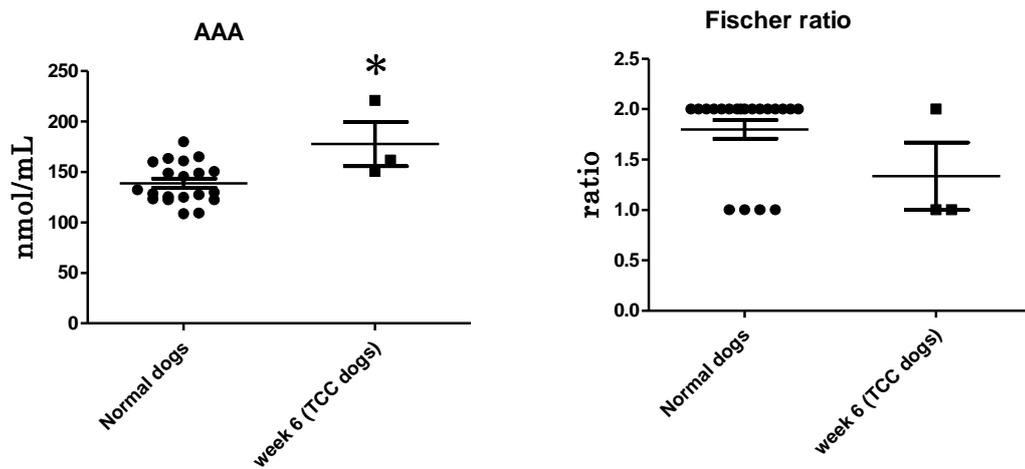


Fig. 7 TCC 罹患犬の抗がん剤投与後 6 週目と健常犬の PFAAs の比較

第 2 章の 2 節で、TCC 罹患犬において有意な変化が認められた PFAAs の抗がん剤投与後 6 週目の値と健常犬を比較した。抗がん剤の投与後 6 週目で有意な変化が認められた PFAAs は* ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test) で表記した。

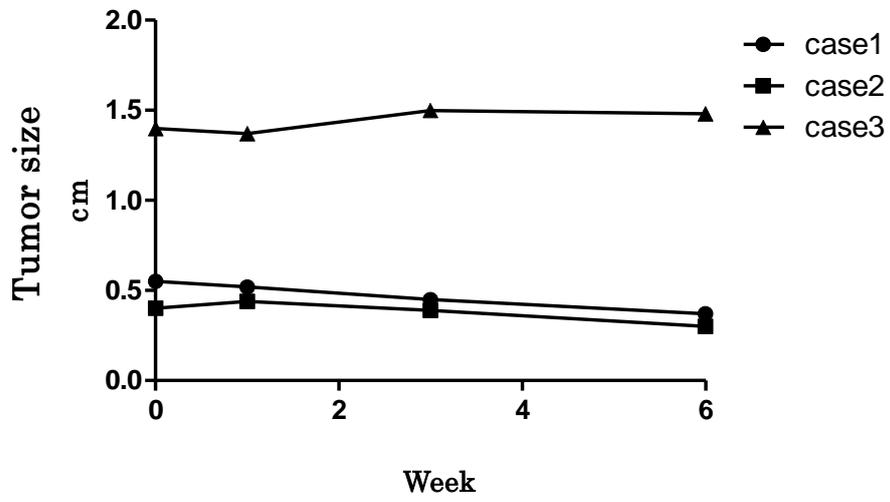


Fig. 8 TCC を罹患したイヌ 3 頭の腫瘍径の変化

0、1、3 および 6 週間目に腫瘍の長径を測定した。単位は cm で表記した。

総括

日本においてイヌやヒトのがんは死亡原因第一位の疾患である。現在に至るまで、臨床検査法や治療法に関する研究が多くされており、早期発見や早期治療が重要であると多く報告されている。近年、医学領域では生体内の代謝産物である血漿遊離アミノ酸 (Plasma free amino acids concentration: PFAAs) を網羅的に解析する技術の発展により、一度の採血で複数種類のがんのリスク評価が可能となった。しかし、獣医学領域でこのような検査法は確立されておらず、がんと網羅的なアミノ酸解析に関する報告も少ない。そこで、本研究ではがんと罹患したイヌにおいて PFAAs の変動を調査し、がんと PFAAs の関係性を示す新たな知見を得ることを目的とした。

第1章 イヌにおける血漿遊離アミノ酸濃度測定の基礎的研究

はじめに、イヌの PFAAs の測定における液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC/MS) の再現性および信頼性について調べた。次いで、PFAAs は食事の影響を受けて変動するため、食事の影響を受けない適切な採血時間を検討した。本研究では 39 種類の PFAAs を測定した。

健常犬のプール血漿を用いて、同時再現性の検討を行ったところ、全ての PFAAs において変動係数 (coefficient of variation: CV) は 15% 以内であり、同時再現性が得られたと考えられた。また、プール血漿を 1 週間おきに 8 週間測定し、日差再現性の検討を行った。シスチン以外の PFAAs の CV は 15% 以内と良好であったが、シスチンの CV が 66% と高かった。シスチンは 8 週目まで安定した値が得られなかったため、採血後は直ちに検体を処理し、1 週間以内に測定することが望ましいと考えられた。希釈直線性の検討では、プール血漿を 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に段階希釈し測定したところ、多

くの種類の PFAAs で原点を通る直線 ($P < 0.05$) が得られた。血中濃度が低い PFAAs は、直線性が得られなかったが、 P 値は 0.05 以下であった。以上より、イヌの血漿を用いた LC/MS の信頼性および再現性を得ることが出来た。

また、イヌにおける PFAAs の食事前後の変化を調べたところ、 α -アミノ酪酸を除いて、食後 14 時間経過していれば、食事の影響を受けないことが明らかとなった。さらに、日中と夜間で変動が異なる PFAAs も認められた。朝と夜では活動性の違いからタンパク質代謝が異なる可能性が考えられたため、採血時間を午前中に統一するなど、採血時の条件設定が必要であると考えられた。

以上より、イヌの PFAAs は LC/MS によって測定可能であり採血後はできるだけ速やかに測定をすることおよび食後 14 時間以上絶食させ、臨床現場での実用面を考慮し、午前中に採血を行うことが良いと考えられた。

第 2 章 イヌにおけるがんの罹患およびがんの種類による血漿遊離アミノ酸濃度の変動

がん細胞のアミノ酸代謝に関して明らかとなっている知見があることからはじめにがんの種類を問わず、がんを罹患したイヌの PFAAs を調べた。39 頭のがんを罹患したイヌと 20 頭の健常犬の PFAAs の比較を行った。次いで、医学領域においてがんの種類によって PFAAs の変動に違いがあることから、がんを罹患したイヌ 39 頭のうち移行上皮癌 (8 頭)、乳腺腫瘍 (3 頭)、肝細胞癌 (8 頭)、悪性黒色腫 (6 頭) および甲状腺癌 (4 頭) を罹患したイヌで群分けをし、がんの種類による PFAAs の違いについて検討した。

がんを罹患したイヌは健常犬と比較してスレオニン、 α -アミノアジピン酸、シスチン、シスタチオニン、フェニルアラニン、3-メチルヒスチジン、1-メチルヒスチジン、トリプトファンおよび芳香族アミノ酸が有意に増加し、グリシン、ヒスチジンおよびフィッシャー比が有意に低下した。有意に低下

した PFAAs は、がん細胞への取り込みが促進している可能性が考えられ、有意に増加した PFAAs は、タンパク質異化により産生したアミノ酸ががん細胞に利用されなかった、あるいはがん細胞内で産生したアミノ酸が細胞外に分泌し血中へと移行したため、血中濃度が増加した可能性があるということが明らかとなった。これらの PFAAs は、がんを罹患していることの指標になり得るということが示唆された。骨格筋に存在している PFAAs の有意な増加は、宿主の筋タンパク質異化が亢進されていることを反映していると考えられた。特に、ヒトにおいて 3-メチルヒスチジンは筋タンパク質異化亢進の指標とされていることから、イヌにおいても同様に 3-メチルヒスチジンを筋タンパク質異化の指標として利用できる可能性が考えられた。

次いで、移行上皮癌ではタウリンおよびアルギニンが有意に低下、悪性黒色腫ではグルタミンが有意に低下、悪性乳腺腫瘍ではグリシンが有意に低下、チロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンが有意に増加した。肝細胞癌では他のがんと共通して変動した PFAAs が多数認められたが、肝機能を反映する分岐鎖アミノ酸と芳香族アミノ酸は有意に増加していた。甲状腺癌ではスレオニンとプロリンが有意に増加した。また、イソロイシンに関しては、甲状腺癌で有意に低下、肝細胞癌で有意に増加した。このようにがんの種類により特徴的な PFAAs の違いが認められた。これらはがんの種類による特異的な代謝変化を反映している可能性が示唆された。また、グリシン、メチオニン、3-メチルヒスチジンおよび 1-メチルヒスチジンなど複数種類のがんに共通して変動する PFAAs も確認された。このようにがんの種類に分けて調べることでがんの特異的な変動が明らかとなった。以上より、イヌにおいてがんを罹患およびがんの種類によって PFAAs が変動することが示された。

第 3 章 がんを罹患したイヌにおける治療前後の血漿遊離アミノ酸濃度の変動

ヒトのがん患者の研究において、化学療法前後の PFAAs が変化する

ことが知られているが、イヌにおいては明らかではない。そこで、全身療法である化学療法が推奨されている移行上皮癌に焦点を当てた。第 3 章では、移行上皮癌 (TCC) 罹患犬における化学療法前後の PFAAs を測定し、その変動を調べた。

化学療法前後で血漿中のシスタチオン濃度に有意な変動が認められた。シスタチオンは抗がん剤投与前 (0 週目) と比較し、抗がん剤投与後 1 および 3 週間目で減少、抗がん剤投与後 6 週間目に増加した。TCC 罹患犬の血漿中のシスタチオンは、がん細胞内に取り込まれ、薬物解毒作用のあるグルタチオン合成に利用された可能性が考えられた。臨床症状の改善や明らかな腫瘍の増大は認められなかったことから、2 回目の投与後はシスタチオンがグルタチオン合成に利用されず、がん細胞に抗がん剤が効果的に作用したと考えられた。以上より、PFAAs は抗がん剤投与に影響されることが示された。

今回、がんの種類別や治療前後で変動する PFAAs を網羅的に測定した。これらの解析結果より、イヌにおいてがんと PFAAs の関係について新たな知見を得ることができ、将来のイヌにおける早期発見のためのがんリスク評価開発や治療モニタリングとして PFAAs 測定が有用である可能性が示された。

謝辞

稿を読み終わるに臨み、本研究に際し終始御指導御助言賜りました日本獣医生命科学大学獣医保健看護学臨床部門 左向敏紀教授に心から感謝の意を表します。

また、終始御指導御教授を頂いた日本獣医生命科学大学獣医保健看護学臨床部門 森昭博講師、皆上大吾准教授、石岡克己准教授、水越美奈准教授、百田豊講師、小田民美助教に深謝致します。

さらに、研究の遂行に際して御協力頂いた日本獣医生命科学大学獣医学科生体分子学研究室 佐藤稲子講師、当時同研究室室員だった野澤聡司博士に心より深謝致します。

最後に、本研究の実施に際して多大なる御協力を頂きました、日本獣医生命科学大学獣医保健看護学臨床部門在籍室員の皆様、そして日本獣医生命科学大学附属動物医療センター所属の助教ならびに研修医の皆様に心より深謝致します。

結びに、これまで長きに亘り御支援と暖かい励ましにより支えて頂いた両親に心より感謝致します。

参考文献

- Abbassi-Ghadi N, Kumar S, Huang J, Goldin R, Takats Z, Hanna GB. Metabolomic profiling of oesophago-gastric cancer: a systematic review. *Eur J Cancer*. 2013 **49**(17): 3625-37.
- Abd-Allah AR, Gado AM, Al-Majed AA, Al-Yahya AA, Al-Shabanah OA. Protective effect of taurine against cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005 **32**(3): 167-72.
- Agrawal V, Alpini SE, Stone EM, Frenkel EP, Frankel AE. Targeting methionine auxotrophy in cancer: discovery & exploration. *Expert Opin Biol Ther*. 2012 **12**(1): 53-61.
- Azuma K, Osaki T, Tsuka T, Imagawa T, Minami S, Okamoto Y. Plasma free amino acid profiles of canine mammary gland tumors. *J Vet Sci*. 2012 **13**(4): 433-6.
- Barnes T, Bell K, DiSebastiano KM, Vance V, Hanning R, Russell C, Dubin JA, Bahl M, Califaretti N, Campbell C, Mourtzakis M. Plasma amino acid profiles of breast cancer patients early in the trajectory of the disease differ from healthy comparison groups. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014 **39**(6): 740-4.
- Barollo S, Bertazza L, Watutantrige-Fernando S, Censi S, Cavedon E, Galuppini F, Pennelli G, Fassina A, Citton M, Rubin B, Pezzani R, Benna

C, Opocher G, Iacobone M, Mian C. Overexpression of L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) and 2 (LAT2): Novel Markers of Neuroendocrine Tumors. *PLoS One*. 2016 **11**(5): e0156044

Barzał JA, Szczylik C, Rzepecki P, Jaworska M, Anuszevska E. Plasma citrulline level as a biomarker for cancer therapy-induced small bowel mucosal damage. *Acta Biochim Pol*. 2014 **61**(4): 615-31.

Bedoya AM, Tate DJ, Baena A, Córdoba CM, Borrero M, Pareja R, Rojas F, Patterson JR, Herrero R, Zea AH, Sanchez GI. Immunosuppression in cervical cancer with special reference to arginase activity. *Gynecol Oncol*. 2014 **135**(1): 74-80.

Bellance N, Pabst L, Allen G, Rossignol R, Nagrath D. Oncosecretomics coupled to bioenergetics identifies α -amino adipic acid, isoleucine and GABA as potential biomarkers of cancer: Differential expression of c-Myc, Oct1 and KLF4 coordinates metabolic changes. *Biochim Biophys Acta*. 2012 **1817**(11): 2060-71.

Brenner U, Schindler J, Müller JM, Walter M, Keller HW. [Changes in plasma amino acid level as a possible tumor marker in cancers of the gastrointestinal tract]. *Infusionsther Klin Ernahr*. 1985 **12**(5): 241-5.

Bronson RT. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res*. 1982 **43**(11): 2057-9.

Caso G, McNurlan MA, McMillan ND, Eremin O, Garlick PJ. Tumour cell growth in culture: dependence on arginine. *Clin Sci (Lond)*. 2004 **107**(4): 371-9.

Chiba M, Toki A, Kawano S, Nakagami T, Suzuki J, Sugiyama A, Suganuma R, Nakayama N, Kozima T, Oosawa S, Isoyama K, Toyama D, Matsuno R, Tsukada D, Sanada, Y. Clinical investigation of the relationship between changes in plasma amino acids and adverse events after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Jap J Surg Metab Nutr*. 2013 **47**: 45-52.

De Micheli E, Alfieri A, Pinna G, Bianchi L, Colivicchi MA, Melani A, Pedata F, Della Corte L, Bricolo A. Extracellular levels of taurine in tumoral, peritumoral and normal brain tissue in patients with malignant glioma: an intraoperative microdialysis study. *Adv Exp Med Biol*. 2000 **483**: 621-5.

Desai TK, Maliakkal J, Kinzie JL, Ehrinpreis MN, Luk GD, Cejka J. Taurine deficiency after intensive chemotherapy and/or radiation. *Am J Clin Nutr*. 1992 **55**(3): 708-11.

Fukumoto S, Hanazono K, Fu DR, Endo Y, Kadosawa T, Iwano H, Uchide T. A new treatment for human malignant melanoma targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a pilot study in a canine model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 **439**(1): 103-8.

Fukumoto S, Hanazono K, Komatsu T, Iwano H, Kadosawa T, Uchide T. L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in canine mammary gland tumors. *J Vet Med Sci.* 2013 **75**(4): 431-7.

Fukumoto S, Hanazono K, Komatsu T, Ueno H, Kadosawa T, Iwano H, Uchide T. L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a new therapeutic target for canine mammary gland tumour. *Vet J.* 2013 **198**(1): 164-9.

Fukutake N, Ueno M, Hiraoka N, Shimada K, Shiraishi K, Saruki N, Ito T, Yamakado M, Ono N, Imaizumi A, Kikuchi S, Yamamoto H, Katayama K. A Novel Multivariate Index for Pancreatic Cancer Detection Based On the Plasma Free Amino Acid Profile. *PLoS One.* 2015 **10**(7): e0132223.

Gamagedara S, Shi H, Ma Y. Quantitative determination of taurine and related biomarkers in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012 **402**(2): 763-70.

Glazev AA, Nefedov LI. [Changes in amino acid patterns of blood plasma in tumor patients treated with anticancer drug NSC-631570: possible approaches to cancer diagnostics]. *Biomed Khim.* 2008 **54**(3): 289-300.

Grigoryan RS, Panosyan EH, Seibel NL, Gaynon PS, Avramis IA, Avramis VI. Changes of amino acid serum levels in pediatric patients with higher-risk acute lymphoblastic leukemia (CCG-1961). *In Vivo.* 2004 **18**(2): 107-12.

Gu Y, Chen T, Fu S, Sun X, Wang L, Wang J, Lu Y, Ding S, Ruan G, Teng L, Wang M. Perioperative dynamics and significance of amino acid profiles in patients with cancer. *J Transl Med.* 2015 13:35.

Hasim A, Aili A, Maimaiti A, Mamtimin B, Abudula A, Upur H. Plasma-free amino acid profiling of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia patients and its application for early detection. *Mol Biol Rep.* 2013 40(10): 5853-9.

Hens JR, Sinha I, Perodin F, Cooper T, Sinha R, Plummer J, Perrone CE, Orentreich D. Methionine-restricted diet inhibits growth of MCF10AT1-derived mammary tumors by increasing cell cycle inhibitors in athymic nude mice. *BMC Cancer.* 2016 16: 349.

He YU, Li QQ, Guo SC. Taurine Attenuates Dimethylbenz[a]anthracene-induced Breast Tumorigenesis in Rats: A Plasma Metabolomic Study. *Anticancer Res.* 2016 36(2): 533-43.

Hu L, Gao Y, Cao Y, Zhang Y, Xu M, Wang Y, Jing Y, Guo S, Jing F, Hu X, Zhu Z. Association of plasma arginine with breast cancer molecular subtypes in women of Liaoning province. *IUBMB Life.* 2016 68(12): 980-984.

Ikeda K, Takeishi M, Ishikawa N, Hori H, Sakurai F, Ishibashi T. Relationships between dietary protein levels and concentration of plasma free amino acids in adult dogs. *J.Pet Anim.Nutr.* 2002 5(3): 120-127.

Inoue M, Hasegawa A, Hosoi Y, Sugiura K. A current life table and causes of death for insured dogs in Japan. *Prev Vet Med.* 2015 **120**(2): 210-8.

Islambulchilar M, Asvadi I, Sanaat Z, Esfahani A, Sattari M. Taurine attenuates chemotherapy-induced nausea and vomiting in acute lymphoblastic leukemia. *Amino Acids.* 2015 **47**(1): 101-9.

Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, Kafri R, Kirschner MW, Clish CB, Mootha VK. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science.* 2012 **336**(6084): 1040-4.

Kim HJ, Jang SH, Ryu JS, Lee JE, Kim YC, Lee MK, Jang TW, Lee SY, Nakamura H, Nishikata N, Mori M, Noguchi Y, Miyano H, Lee KY. The performance of a novel amino acid multivariate index for detecting lung cancer: A case control study in Korea. *Lung Cancer.* 2015 **90**(3): 522-7.

Kim T, Kim AK. Taurine enhances anticancer activity of cisplatin in human cervical cancer cells. *Adv Exp Med Biol.* 2013 **776**: 189-98.

Kobayashi S, Sato M, Kasakoshi T, Tsutsui T, Sugimoto M, Osaki M, Okada F, Igarashi K, Hiratake J, Homma T, Conrad M, Fujii J, Soga T, Bannai S, Sato H. Cystathionine is a novel substrate of cystine/glutamate

transporter: implications for immune function. *J Biol Chem.* 2015 **290**(14): 8778-88.

Letocha H, Ahlström H, Malmström PU, Westlin JE, Fasth KJ, Nilsson S. Positron emission tomography with L-methyl-11C-methionine in the monitoring of therapy response in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Urol.* 1994 **74**(6): 767-74.

Li P, Tao J, Wei D, Yang X, Lu Z, Deng X, Cheng Y, Gu J, Yang X, Wang Z, Lu Q, Wang J, Yin C. Serum metabolomic analysis of human upper urinary tract urothelial carcinoma. *Tumour Biol.* 2015 **36**(10): 7531-7.

Luo Y, Yoneda J, Ohmori H, Sasaki T, Shimbo K, Eto S, Kato Y, Miyano H, Kobayashi T, Sasahira T, Chihara Y, Kuniyasu H. Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. *Cancer Res.* 2014 **74**(1): 330-40.

Maeda J, Higashiyama M, Imaizumi A, Nakayama T, Yamamoto H, Daimon T, Yamakado M, Imamura F, Kodama K. Possibility of multivariate function composed of plasma amino acid profiles as a novel screening index for non-small cell lung cancer: a case control study. *BMC Cancer.* 2010 **10**:690.

Mamtimin B, Kedena, Kong B, Hasim A, Matsidik A, Hizbulla M, Kurbantay N, Upur H. Plasma amino acid profiling of cancer patients with abnormal savda based on high-performance liquid chromatography. *J Tradit Chin Med.* 2014 **34**(5): 560-5.

Mamtimin B, Upur H. [Plasma metabonomics analysis of tumor patients of phlegm-stasis syndrome]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2011 **31**(4): 492-5.

Meadows GG, Pierson HF, Abdallah RM, Desai PR. Dietary influence of tyrosine and phenylalanine on the response of B16 melanoma to carbidopa-levodopa methyl ester chemotherapy. *Cancer Res*. 1982 **42**(8): 3056-63.

Meyer A, Eberle N, Bullerdiek J, Nolte I, Simon D. High-mobility group B1 proteins in canine lymphoma: prognostic value of initial and sequential serum levels in treatment outcome following combination chemotherapy. *Vet Comp Oncol*. 2010 **8**(2): 127-37.

Miller JA, Pappan K, Thompson PA, Want EJ, Siskos AP, Keun HC, Wulff J, Hu C, Lang JE, Chow HH. Plasma metabolomic profiles of breast cancer patients after short-term limonene intervention. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015 **8**(1): 86-93.

Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, Saruki N, Bando E, Kimura H, Imamura F, Moriyama M, Ikeda I, Chiba A, Oshita F, Imaizumi A, Yamamoto H, Miyano H, Horimoto K, Tochikubo O, Mitsushima T, Yamakado M, Okamoto N. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PLoS One*. 2011 **6**(9): e24143.

Munoz-Pinedo C, Mjiyad NE, Ricci J-E. *Cell Death Disease*. 2012; **3**: e248.

Muscaritoli M, Conversano L, Petti MC, Torelli GF, Cascino A, Mecerocci S, Annicchiarico MA, Rossi Fanelli F. Plasma amino acid concentrations in patients with acute myelogenous leukemia. *Nutrition*. 1999 **15**(3): 195-9.

Mutsaers, A. J., Widmer, W. R. and Knapp, D. W. Canine transitional cell carcinoma. *J Vet Intern Med*. 2003 **17**: 136-44.

Nefyodov LI, Uglyanitsa KN, Nechiporenko NA, Smirnov VY, Brzosko W, Karavay NL. New biochemical mechanisms of the anticancer effect of Ukrain in the treatment of cancer of the urinary bladder. *Drugs Exp Clin Res*. 2000 **26**(5-6): 195-9.

Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab*. 2009 **9**(4): 311-26.

Nishioka M, Imaizumi A, Ando T, Tochikubo O. The overnight effect of dietary energy balance on postprandial plasma free amino acid (PFAA) profiles in Japanese adult men. *PLoS One*. 2013 **8**(5).

Norris AM, Laing EJ, Valli VE, Withrow SJ, Macy DW, Ogilvie GK, Tomlinson J, McCaw D, Pidgeon G, Jacobs RM. Canine bladder and urethral tumors: a retrospective study of 115 cases (1980-1985). *J Vet Intern Med.* 1992 **6**(3): 145-53.

Ochiai H, Morishita T, Onda K, Sugiyama H, Maruo T. Canine Lat1: molecular structure, distribution and its expression in cancer samples. *J Vet Med Sci.* 2012 **74**(7): 917-22.

Ogihara K, Naya Y, Sato R, Onda K, Ochiai H. Analysis of L-type amino acid transporter in canine hepatocellular carcinoma. *J Vet Med Sci.* 2015 **77**(7): e1-2.

Ogihara K, Onda K, Sato R, Naya Y, Ochiai H. Evidence of LAT1 expression in canine caput epididymis. *J Vet Med Sci.* 2015 **77**(1): 85-8.

Ogilvie GK, Vail DM. Nutrition and cancer. Recent developments. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1990 **20**(4): 969-85.

Opitz CA, Litzzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, von Deimling A, Wick W, Platten M. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 2011 **478**(7368): 197-203.

Park KG, Heys SD, Harris CI, Steele RJ, McNurlan MA, Eremin O, Garlick PJ. Arginine metabolism in benign and malignant disease of breast and colon: evidence for possible inhibition of tumor-infiltrating macrophages. *Nutrition*. 1991 **7**(3): 185-8.

Perez G, Olivares IM, Rodriguez MG, Ceballos GM, Garcia Sanchez JR. Arginase activity in patients with breast cancer: an analysis of plasma, tumors, and its relationship with the presence of the estrogen receptor. *Onkologie*. 2012 **35**(10): 570-4.

Polat MF, Taysi S, Polat S, Büyük A, Bakan E. Elevated serum arginase activity levels in patients with breast cancer. *Surg Today*. 2003 **33**(9): 655-61.

Poschke I, Mao Y, Kiessling R, de Boniface J. Tumor-dependent increase of serum amino acid levels in breast cancer patients has diagnostic potential and correlates with molecular tumor subtypes. *J Transl Med*. 2013 **11**: 290.

Shah SH, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Crosslin DR, Haynes C, Dungan J, Newby LK, Hauser ER, Ginsburg GS, Newgard CB, Kraus WE. Association of a peripheral blood metabolic profile with coronary artery disease and risk of subsequent cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 **3**(2): 207-14.

Shah SH, Crosslin DR, Haynes CS, Nelson S, Turer CB, Stevens RD, Muehlbauer MJ, Wenner BR, Bain JR, Laferrère B, Gorroochurn P, Teixeira J, Brantley PJ, Stevens VJ, Hollis JF, Appel LJ, Lien LF, Batch B, Newgard CB, Svetkey LP. Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss. *Diabetologia*. 2012 **55**(2): 321-30.

Sterenczak KA, Joetzke AE, Willenbrock S, Eberle N, Lange S, Junghanss C, Nolte I, Bullerdiek J, Simon D, Murua Escobar H. High-mobility group B1 (HMGB1) and receptor for advanced glycation end-products (RAGE) expression in canine lymphoma. *Anticancer Res*. 2010 **30**(12): 5043-8.

Susan N, Tania B. 2011. Principles of chemotherapy. Small Animal Oncology AN INTRODUCTION. pp.31-43. Saunders Elsevier, USA.

Timosenko E, Ghadbane H, Silk JD, Shepherd D, Gileadi U, Howson LJ, Laynes R, Zhao Q, Strausberg RL, Olsen LR, Taylor S, Buffa FM, Boyd R, Cerundolo V. Nutritional Stress Induced by Tryptophan-Degrading Enzymes Results in ATF4-Dependent Reprogramming of the Amino Acid Transporter Profile in Tumor Cells. *Cancer Res*. 2016 **76**(21): 6193-6204.

Unni SN, Lakshman LR, Vaidyanathan K, Subhakumari KN, Menon NL. Alterations in the levels of plasma amino acids in polycystic ovary syndrome--A pilot study. *Indian J Med Res*. 2015 **142**(5): 549-54.

Valli VE, Norris A, Jacobs RM, Laing E, Withrow S, Macy D, Tomlinson J, McCaw D, Ogilvie GK, Pidgeon G, et al. Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. *J Comp Pathol.* 1995 **113**(2): 113-30.

Wang TJ, Larson MG, Vasani RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, Lewis GD, Fox CS, Jacques PF, Fernandez C, O'Donnell CJ, Carr SA, Mootha VK, Florez JC, Souza A, Melander O, Clish CB, Gerszten RE. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med.* 2011 **17**(4): 448-53.

Wang W, Nag S, Zhang R. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Breast Cancer Animal Models. *Methods Mol Biol.* 2016 **1406**: 271-87.

Wolf H, Brown RR. Tryptophan metabolism in bladder cancer patients from Copenhagen. *Scand J Urol Nephrol.* 1979 **13**(2): 143-8.

Yamakado M, Tanaka T, Nagao K, Ishizaka Y, Mitushima T, Tani M, Toda A, Toda E, Okada M, Miyano H, Yamamoto H. Plasma amino acid profile is associated with visceral fat accumulation in obese Japanese subjects. *Clin Obes.* 2012 **2**(1-2): 29-40

Yamamoto T, Takano N, Ishiwata K, Ohmura M, Nagahata Y, Matsuura T, Kamata A, Sakamoto K, Nakanishi T, Kubo A, Hishiki T, Suematsu M. Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. *Nat Commun.* 2014 **5**: 3480.

Yamazaki Y. Metabolome Analysis of Human Serum: Implications for Early Detection of Colorectal Cancer. *Rinsho Byori*. 2015 **63**: 328-35.

Zhang Q, Takahashi M, Noguchi Y, Sugimoto T, Kimura T, Okumura A, Ishikawa T, Kakumu S. Plasma amino acid profiles applied for diagnosis of advanced liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatol Res*. 2006 **34**(3): 170-7.

Zhao Q, Cao Y, Wang Y, Hu C, Hu A, Ruan L, Bo Q, Liu Q, Chen W, Tao F, Ren M, Ge Y, Chen A, Li L. Plasma and tissue free amino acid profiles and their concentration correlation in patients with lung cancer. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2014 **23**(3): 429-36.

小川原陽子, 北林一生 細胞工学 第33巻 145-150 2014

山下 進, タンパク異化指標としての血中 3-メチルヒスチジン; 基準値および重度侵襲患者値の推移 山口医学 第56巻 第6号 193-200 2007

平成 27 年 人口動態統計月報年計(概数)の概況

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai15/index.html>