

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)

学位論文の内容の要約

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

小野沢 栄里  
(指導教員：左向 敏紀)

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。

## 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、同様のプール血漿を 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、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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に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。