

## 論文審査の結果の要旨

申請者名 小野沢 栄里

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（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知見が非常に少ない。本研究は、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ものである。

医学領域において、がんと PFAAs の研究では主に液体クロマトグラフィ質量分析計（LC/MS）を用いて測定している報告が多い。しかし、イヌの PFAAs に関する研究では HPLC を用いたものしかなく、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。また、医学領域において、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が、獣医学領域において臨床的に 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。そこで第 1 章では、イヌにおける血漿遊離アミノ酸濃度測定の基礎的研究として、第 1 節でイヌの PFAAs（39 種類）の測定における LC/MS の再現性および信頼性について調べ、次いで、第 2 節で食事の影響を受けない適切な採血時間を検討している。

第 1 節で健常犬のプール血漿を用いて、同時再現性、日差再現性および希釈直線性の検討を行った結果、同時再現性では全ての PFAAs において CV は 15% 以内であり、良好な結果が得られた。また、8 週間にわたる

日差再現性の検討では、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いうことを明らかにしている。希釈直線性の検討では全ての PFAAs において  $P < 0.05$  となる直線を得ることが出来た。第 2 節では、 $\alpha$ -アミノ酪酸を除いて、食後 14 時間経過後、食事の影響を受けないことを明らかにした。さらに、日中と夜間で日内変動が異なる PFAAs も明らかにし、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ことが示された。以上より、イヌの PFAAs は LC/MS によって測定可能であり、採血条件として食後 14 時間以上絶食させ、臨床現場における実用面を考慮し、午前中に採血を行う必要があるということを明らかとした。これら結果は、イヌの PFAAs 測定に関する研究の基本となる有用なデータであり、獣医学領域における臨床応用に繋がり、新たな検査ツールになりえる基礎的研究である。

PFAAs の変化はがんの種類により異なることが明らかとなっており、医学領域において、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。第 2 章では、第 1 章で得られた採血条件を用い、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の検討をしている。第 1 節では、がんを罹患することで変化する PFAAs を調べるため、がんを罹患したイヌと健常犬の PFAAs の比較を行い、次いで、第 2 節ではがんを罹患したイヌのうち移行上皮癌、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ている。

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 ( $P < 0.05$ , Mann–Whitney U test)。がんを罹患したイヌにおいて濃度が有意に低下した PFAAs においては、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、濃度が有意に増加した PFAAs においては、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は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明らかにしている。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を明らかにした。また、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が示唆され、イヌにおいてヒトと同様に 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を明らかとした。

次いで、第 2 節の結果として、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 ( $P < 0.05$ , Mann–Whitney U test)。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 ( $P < 0.05$ , Mann–Whitney U test)。甲状腺癌ではスレオニンとプロリンが有意に増加した ( $P < 0.05$ , Mann–Whitney U test)。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 ( $P < 0.05$ , Mann–Whitney U test)。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有意に変動する PFAAs も確認された ( $P < 0.05$ , Mann–Whitney U test)。がんの種類に分けて調べることでがんの特異的な変動を明らかにすることができた。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 が変動することを示した。

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、特に化学療法前後で認められた PFAAs の変化は効果と副作用と関連するという報告もされている。しかし、獣医学領域において、がんを罹患したイヌにおける抗がん剤投与前後の PFAAs 濃度の変化を調査した報告はない。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ている。

結果より、ミトキサントロンによる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 ( $P < 0.05$ , One-Way Repeated Measured ANOVA)。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。1 回目の抗がん剤後は、抗がん剤曝露によりがん細胞内にシスタチオンの取り込みが促進し、グルタチオンの合成に利用されたと考察している。また、2 回目投与後は腫瘍の増大が認められず、臨床症状も改善されたことから、シスタチオンがグルタチオンの合成に利用されず、効果的に抗がん剤ががん細胞に作用した可能性を明らかとした。以上より、PFAAs は抗がん剤投与に影響を受け、変動することが明らかとなった。

本研究結果は、イヌにおける PFAAs 測定の採血および測定条件を明らかにし今後の研究の基盤を提示した。また、イヌにおけるがんによる PFAAs の変化およびがんの種類ごとの PFAAs の変化を観察している。将来の犬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。獣医学領域において PFAAs 測定を臨床応用する上で、重要な知見を得ている。

以上のように、本論文は獣医学領域において PFAAs 測定を臨床応用する上で、重要な知見を得ており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (獣医保健看護学) の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。