

論文審査の結果の要旨

申請者名 生野 佐織

GLP-1 受容体作動薬は、糖尿病の治療薬であり、食後の血糖上昇抑制を促す様々な作用がある。その作用の中でも食後の血糖上昇抑制を促す重要な役割を果たしていると考えられるのが、消化管通過時間（胃内容排出時間および小腸通過時間）遅延作用である。しかし、イヌにおいては、GLP-1 受容体作動薬における消化管通過時間に関する報告はない。そこで、本研究では、まずヒトの消化管通過時間を測定する方法であるアセトアミノフェン（APAP）法およびサラゾスルファピリジン（SASP）法が健常犬の消化管通過時間を測定できるか、さらにこれらを用い、GLP-1 受容体作動薬が健常犬の消化管通過時間におよぼす影響を明らかにすることを目的としたものである。

消化管通過時間は、胃内容排出時間と小腸通過時間に分類され、APAP 法は胃内容排出時間を、SASP 法は小腸通過時間を測定することができるとされている。この方法は、APAP または SASP を経口投与し、経時的に採血を行い、各血清濃度で食物動態を捉えるため、これらの濃度の測定が必要となる。

第 1 章

第 1 章では、イヌにおける血清 APAP 濃度および血清 SASP 濃度測定法の確立のための基礎的研究実施している。第 1 節で、イヌにおいて APAP 検出キット測定法が使用可能か、また、イヌに対する APAP 投与量について検討している。まず、ヒト血清で簡便に APAP 濃度を簡便に測定できるとされる APAP 検出キットを用いて、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、同時再現性および日差再現性は、良好な結果を得ている。希釈直線性の検討では、良好な直線を得たが、原点を通過せず、低濃度の血清濃度は正確に評価することができない結果を示した。イヌにおける安

全で定量可能な APAP 投与量を検討したところ、20 mg/kg が望ましいことを明らかとした。

APAP 検出キットが低濃度領域で正確な結果を得られないと考えられたため、第 2 節では、低濃度まで測定でき、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度を同時に測定可能な HPLC を用いて測定法の精度および信頼性を検討している。信頼性の確保のために添加回収試験、同時再現性、日差再現性および希釈直線性の検討を行っている。添加回収試験では、干渉物質が存在しないことを示し、同時再現性では良好な結果を得ている。一方、日差再現性では、血清 APAP 濃度の高濃度サンプルのみ検体採取 7 日以内に実施することで、測定の信頼性が高くなることを明らかにした。また、希釈直線性試験は、良好な直線性を示すことを明らかにした。これらの結果は、イヌの血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度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研究および臨床応用に繋がる基礎的研究であると考えられる。

第 2 章

第 1 章では、HPLC を用いることで APAP 法および SASP 法は、安価で簡便に測定でき、イヌの身体への負担を最小限に抑え測定できることをしめした。しかし、イヌにおいて APAP 法および SASP 法が胃内容排出時間および小腸通過時間を正確に捉えているかは明らかにされていない。そこで、第 2 章では、目視で容易に消化管運動を捉えることができる放射線不透過マーカー法を用い、APAP 法および SASP 法の正確性を検討している。第 1 節では、胃排泄を確認出来るとされる小動物専用のバリウム含浸ポリエチレン球 (BIPS) と、第 2 節では、液体造影剤および血中代謝マーカーと比較し、APAP 法および SASP 法の正確性を検討している。

BIPS は目視で個数を数えることで消化管動態を確認できるとされ、小動物領域で販売、使用されている。第 1 節では、BIPS を用い、APAP 法および SASP 法と比較している。BIPS の胃排泄と血清 APAP 濃度変動と大きく異なり、胃内容排出時間を確認出来なかった。また、BIPS の小腸および大

腸の判別が困難であったため、血清 SP 濃度と比較することも困難である事を示した。これらの結果から、消化管動態を知るためには BIPS の使用は困難であると示唆すると共に、APAP 法および SASP 法が正確な測定法であるかは、明らかにすることができなかった。

第 2 節では、液体造影剤および血中代謝マーカを測定し、APAP 法および SASP 法の正確性を検討した結果、APAP 法と液体造影剤では、胃内容排出時間は一致し、血清 APAP 濃度は胃内容排出時間を表していると示した。また、SASP 法と液体造影剤の比較では、4 頭中 2 頭で液体造影剤の小腸通過と SASP 法の通過が一致を示し、血清 SP 濃度上昇は、小腸通過時間を表している可能性を明らかとした。また、他の 2 頭は、液体造影剤の小腸通過時間の方が早く、液体造影剤のみの早い通過または、液状造影剤が SP 吸収を抑制した可能性を考察している。さらに、胃排泄時間および小腸通過時間を明確にするために、血中代謝マーカとの連動性について検討している。その結果、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度は、血中代謝マーカである NEFA および TG の血中変動とほぼ類似した変動であった。

これまで、APAP 法および SASP 法は、イヌでは消化管通過時間を正確に評価しているか不明であったが、本試験より、これらが消化管通過時間を正確に捉えている可能性が高いことを明らかとした。今後、様々なフードや動物医薬品の研究開発に使用可能な簡便で低侵襲的な消化管通過時間測定法であることを示した。

第 3 章

APAP 法および SASP 法を用いることで消化管動態を知ることが示されたため、ヒトで消化管通過速度を遅延するとされる GLP-1 受容体作動薬を用いてその効果および消化管通過動態を確認する作業を進めている。GLP-1 受容体作動薬は消化管通過時間を遅延させる作用により、食後の血糖値上昇を抑制する主要なメカニズムであるとされている。しかし、イヌにおいては消化管通過速度を含め、消化管動態、消化吸収における作用は報告はなされ

ていない。

第 3 章では、GLP-1 受容体作動薬が、健常犬の消化管通過時間および血中代謝マーカーにおよぼす影響を APAP 法および SASP 法を用いて検討している。本研究では、GLP-1 受容体作動薬の中でも、短時間作用型であるエキセナチドおよび長時間作用型であるリラグルチドを用い検討し、エキセナチドおよびリラグルチドでは胃内容排出時間の遅延を認めたが、エキセナチドの方が胃内容排出時間の遅延が顕著であるという結果を示した。また、この胃内容排出遅延作用が食後の Glucose、Insulin、TG および GIP 上昇抑制に参与したことを明らかとした。小腸通過時間についての検討では、どちらの GLP-1 受容体作動薬も小腸通過時間を遅延させたが、リラグルチドの方が小腸通過時間の遅延が顕著であることを示した。また、リラグルチドでは副作用である軟便が認められたため、小腸での栄養吸収に影響をおよぼし、消化器症状を起こしやすい可能性も示唆した。

本研究結果により、健常犬における低侵襲的で簡便な消化管通過時間測定法が確立され、さらに GLP-1 受容体作動薬が健常犬において消化管通過時間を遅延させる作用があることを明らかとした。これらは、将来、犬のフードおよび動物医薬品の開発に寄与し、また、糖尿病犬の治療の選択肢の一助となり得る重要な知見であると考えられる。

以上のように、本論文は健常犬における消化管通過時間測定法を確立しただけでなく、イヌにおける新たな糖尿病治療薬の血糖降下作用に繋がる機序の一部を解明したものであり、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。