

僧帽弁閉鎖不全症犬の

血清中脂肪酸組成に関する基礎的研究

(Basic study on serum fatty acid compositions in dogs
with mitral insufficiency)

吉松 宏基

僧帽弁閉鎖不全症犬の
血清中脂肪酸組成に関する基礎的研究
(Basic study on serum fatty acid compositions in dogs
with mitral insufficiency)

吉松 宏基

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授 小山 秀一)

平成 28 年 3 月

目次

略語一覧	1
第1章 序論	3
第2章 犬の血清中脂肪酸の測定法の検討	7
1 材料と方法	7
1) 血清サンプル	7
2) ガスクロマトグラフィー用の標準物質	7
3) 血清中脂肪酸のメチル化と精製	8
4) GC法による脂肪酸濃度の測定	10
5) 内部標準物質の回収率	10
6) 分析法のバリデーション	10
7) 統計学的処理	11
2 結果	12
1) 血清中脂肪酸のメチル化とメチル化脂肪酸の精製	12
2) 脂肪酸の検出と定量	12
3) 用いた血清量の違いによる脂肪酸濃度の直線性	13
4) 内部標準物質の回収率	14
5) 今回の測定法と従来法の測定値の相関	14
6) 血清中脂肪酸濃度の検者内誤差	14
(1) 血清中脂肪酸濃度の同時再現性	14
(2) 血清中脂肪酸濃度の日差再現性	14
7) 血清中脂肪酸濃度の検者間誤差	15
3 考察	16
4 小括	19

5 図表	21
第3章 犬の血清中脂肪酸を測定するための採血時間についての検討	45
1 材料と方法	45
1) 供試動物	45
2) 血清検体	45
3) 血清中脂肪酸濃度の測定と重量比の算出	46
4) 血清中トリグリセリド(TG)と総コレステロール(T-Cho)の測定	46
5) フード中の脂肪酸濃度の測定	46
6) 統計学的処理	46
2 結果	47
1) 血清中脂肪酸濃度	47
2) 血清中脂肪酸重量比	48
3) 血清中の TG および T-Cho の濃度	49
4) フード中の脂肪酸濃度	49
3 考察	51
4 小括	53
5 図表	55
第4章 健常犬における血清中脂肪酸組成の基準値の検討	61
1 材料と方法	61
1) 供試動物	61
2) 血清検体	62
3) 血清中脂肪酸濃度の測定	62
4) 測定値分布における中央の95%区間の算出	62

5) 統計学的処理	63
2 結果	64
1) 血清中脂肪酸濃度の群間比較	64
2) 血清中脂肪酸濃度の 95%区間	65
3) 血清中脂肪酸重量比の 95%区間	66
4) 血清中脂肪酸比率の 95%区間	67
3 考察	68
4 小括	72
5 図表	73
第 5 章 僧帽弁閉鎖不全症犬の血清中脂肪酸組成の検討	79
1 材料と方法	79
1) 供試動物	79
2) 血清検体	80
3) 血清中脂肪酸の測定方法と測定項目	80
4) 心エコー検査	80
5) 参照値との比較	81
6) EPA 濃度と EPA/AA のカットオフ値の設定	81
7) 統計学的処理	81
2 結果	82
1) MI の I 群と II 群における群内比較	82
(1) 血清中脂肪酸濃度の比較	82
(2) 血清中脂肪酸重量比の比較	82
(3) 脂肪酸比率の比較	82
(4) 心エコーパラメーターの比較	82

2) MI 群の群間比較	83
(1) 血清中脂肪酸濃度の比較	83
(2) 血清中脂肪酸重量比の比較	83
(3) 脂肪酸比率の比較	84
(4) 心エコーパラメーターの比較	84
3) 血清中脂肪酸組成と心エコーパラメーターの関係	84
(1) 血清中脂肪酸濃度と心エコーパラメーターの関係	84
(2) 血清中脂肪酸重量比と心エコーパラメーターの関係	85
(3) 脂肪酸比率と心エコーパラメーターの関係	85
4) 血清中脂肪酸の参照値との比較	85
5) EPA 濃度と EPA/AA のカットオフ値	85
3 考察	86
4 小括	90
5 図表	91
第 6 章 総括	111
謝辞	115
参考文献	117
Summary of Doctor Thesis	127

略語一覧

AA: アラキドン酸

ALA: α -リノレン酸

DGLA: ジホモ- γ -リノレン酸

DHA: ドコサヘキサエン酸

DPA: ドコサペンタエン酸

DTA: ドコサテトラエン酸

EPA: エイコサペンタエン酸

FA: 脂肪酸

FS: 左室内径短縮率

GC: ガスクロマトグラフ

IL: インターロイキン

LA: リノール酸

LA/Ao: 左房径/大動脈径比

LT: ロイコトリエン

LVIDd/Ao: 拡張末期左室内径指数

LVIDs/Ao: 収縮末期左室内径指数

MA: 5, 8, 11-エイコサトリエン酸

MI: 僧帽弁閉鎖不全症

MUFA: 一価不飽和脂肪酸

PG: プロスタグランジン

PUFA: 多価不飽和脂肪酸

SFA: 飽和脂肪酸

TNF- α : 腫瘍壊死因子- α

第 1 章 序論

僧帽弁閉鎖不全症(MI)は、僧帽弁自体やそれを支える腱索の病変により左室から左房へ血液の逆流が生じる場合や、左室が拡張あるいは肥大することで二次的に僧帽弁逆流がおこる病態である。前者では主に僧帽弁の粘液腫様変性による弁の逸脱や腱索の断裂などが主な原因となり¹⁻³、後者では拡張型あるいは肥大型心筋症が原因としてあげられる。そのうち、粘液腫様変性による MI は、犬における最も一般的な慢性心疾患である⁴。近年、犬の MI の治療には、一般的な心疾患治療薬以外に種々のサプリメントが使用されるようになってきている。そして、それらの中には脂肪酸を主成分とする製品があり MI 症例にも使用されているが、病態と血清中脂肪酸組成に関する検討はわずかである。

脂肪酸は、正常な心筋の主要なエネルギー源であり、それは心筋における ATP 産生の 60~90%を占める^{5,6}。しかし、心筋に負荷が加わると、そのエネルギーは脂肪酸利用からブドウ糖利用へと傾く *switch from fatty acid to glucose oxidation* 現象が起こる。脂肪酸が代謝されて CO₂ となる方が、CO₂ 当たりの ATP 産生量はブドウ糖よりも多い。しかし、脂肪酸はグルコースに比べより多くの酵素を必要とするため、消費する酸素当たりの ATP 産生量は、脂肪酸に比べブドウ糖が上回るため、心不全においては脂肪酸よりもブドウ糖をエネルギーとする方が有利となる。さらに、心不全では交感神経の活性化により血清中の遊離脂肪酸は増加する^{7,8}。こうした心不全における脂肪酸代謝の変化は、心筋中への脂肪蓄積を引き起こし、心筋細胞膜の構築の変化と心筋細胞内のカルシウムイオン調節の破綻を引き起こすため、心

不全をさらに悪化させるといわれている^{6,9,10}。

脂肪酸の中でもエイコサペンタエン酸(EPA)、ジホモ- γ -リノレン酸(DGLA)そしてアラキドン酸(AA)は、プロスタグランジン(PG)、プロスタサイクリン、トロンボキサンそしてロイコトリエン(LT)などのエイコサノイドの基質¹¹であり、EPAからは3シリーズのPGや5シリーズのLTなどの炎症抑制性エイコサノイドが産生される。一方、AAからは2シリーズのPGや4シリーズのLTなどの炎症増強性エイコサノイドが産生される¹²。EPAの組織親和性はAAよりも優位なため、EPAはAAの代謝を競合的に阻害する¹²。そのため、ヒトではEPAが不整脈、高血圧そして動脈硬化症などの心血管系疾患に対して抵抗性を増強すると考えられており¹¹⁻¹³、特に冠動脈疾患では、血清中EPA濃度の上昇は、その発症率と反比例することが報告されている¹⁴。

無症候性の慢性弁膜疾患犬に対してEPAを投与した報告では、病態の進行による左房径と左室径の拡張を抑制している¹⁵。さらに、MIモデル犬に対するEPAの投与は、心筋中のEPA濃度の増加と心拍数を低下させることが報告されている¹⁶。また、うっ血性心不全の犬における血清中のEPA、ドコサヘキサエン酸(DHA)およびAAの濃度は、健常犬よりも低値であり、EPAとDHAを経口投与することで心臓悪液質は改善し¹⁷、心筋のリモデリングを抑制することで不整脈の発現率を低下させることが報告されている^{18,19}。このように、MIを含む心不全犬に対するEPA投与の有用性は報告されているが、血清中脂肪酸組成と心不全の病態との関係は明らかとなっていない。そのため、MI犬に対するEPA投与の根拠は経験的なものであり、その投与のタイミングについては検討されていない。さらに、犬の血清中脂肪酸の測定方法についても詳細な検討はされていない。

犬の血清中脂肪酸の測定には、通常ガスクロマトグラフ(GC)法や高速液体クロマトグラフ法が用いられる²⁰。GC法は、分離能が高く、少量の試料で測定が可能であることから多用されている。脂肪酸の測定用試料をGC法に供するためには、試料を気化しやすい状態にする必要があるため、血清から抽出された脂質はメチル化しなければならない。その脂質抽出方法として、Folch法²¹やBligh and Dyer法²²などが一般的であるが、それらの方法には数mL単位の試料や還流装置などの特殊な器具を必要とする。また、脂肪酸のメチル化にはジアゾメタン法や三フッ化ホウ素法が用いられている。三フッ化ホウ素法による処理過程には100℃程度の加熱を必要とすることから、不安定な状態にあるPUFAは熱分解する恐れがある。他方、ジアゾメタン法はジアゾメタン自体による皮膚や呼吸器に対する毒性および衝撃や熱などによる爆発の危険性をともなうため、その扱いに注意を要する²³。

近年、主に植物や酵母に含まれる脂肪酸を測定することを目的に、脂肪酸のメチル化やメチル化脂肪酸を精製するためのキットが開発された。このメチル化キットを用いることにより、従来別々に行っていた脂肪酸の抽出とメチル化が短時間のうちに同時に行うことが可能となる。さらに、メチル化脂肪酸の精製キットは、メチル化処理後の試料中に含まれる不純物による測定器へのダメージを払拭し、安定した測定値を得ることが可能だといわれている。犬において、これらのキットを用いた血清中脂肪酸の測定に関しては、GC-MS法での重量比を求めた報告が一報のみ存在するが²⁴、水素炎イオン化検出器のGCによる犬の血清中脂肪酸測定に関しては未だ報告がない。

そこで、犬の心不全の原因として最も多いMIに注目し、心不全の病態と血清中脂肪酸組成の関係を検討する目的のために、本研究では、

第 2 章において脂肪酸メチル化キットとメチル化脂肪酸精製キットを利用した犬の血清中脂肪酸の測定方法について検討した。第 3 章では、脂肪酸測定用の血清を得る目的で適切な採血時点を決定するために、健常犬における血清中脂肪酸の日内変動について検討した。第 4 章では、健常犬の血清中脂肪酸組成の基準値について検討した。そして、第 5 章では MI 犬を病期で分類し、血清中脂肪酸組成を比較した。さらに、脂肪酸と心エコーパラメーターの関連を確認した。また、MI 犬に対する EPA 投与のタイミングについて検討した。

第 2 章 犬の血清中脂肪酸の測定法の検討

脂肪酸のメチル化とメチル化脂肪酸の精製のためのキットを用いたガスクロマトグラフ(GC)法の獣医領域での実用性を確認するために、今回の測定法を従来法による測定値と比較し、同時再現性と日差再現性による検者内誤差、および検者間誤差を検討した。

1 材料と方法

1) 血清サンプル

血液は、日本獣医生命科学大学で飼育管理され身体検査、完全血球算定(CBC)および血液化学検査において明らかな異常を認めない 7 歳齢の雌ビーグル(8.0kg)と 3 歳齢の雄ビーグル(11.2kg)の頸静脈から無麻酔下で採血した。採血後、血液は 30 分間室温で静置した後、3000rpm で 15 分間遠心して血清を分離した。得られた血清は、脂肪酸の測定まで-20℃で冷凍保存した。

2) ガスクロマトグラフィー用の標準物質

ガスクロマトグラフィー用の標準物質は、脂肪酸の同定用と検量線作成用、定量用そしてメチル化処理用の 3 種類を用いた。同定用と検量線作成用の標準液として用いる脂肪酸の種類は、ヒトにおいて一般的に測定されている 24 種類の脂肪酸²⁵を参考にして選択した(Table 1)。

脂肪酸の同定と定量用の検量線を作成するために、ヒトの血清中脂肪酸の測定項目である 24 種類の脂肪酸のうち 21 種類を含むスペルコ 37 脂肪酸メチルエステル(FAME)ミックス(シグマアルドリッチジャパン, 東京)に加えて、ドコサテトラエン酸(DTA)メチルエステル(シグマ

アルドリッチジャパン)、ドコサペンタエン酸(DPA)メチルエステル(シグマアルドリッチジャパン)およびエイコサトリエン酸(MA)メチルエステル(シグマアルドリッチジャパン)を用いた。

定量用の内部標準物質は、同定用と検量線作成用の標準液中に含まれないヘプタン酸メチル(シグマアルドリッチジャパン)をヘキサンで 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整して用いた。メチル化処理のための内部標準物質は、37FAME ミックスに含まれており、血清中に含まれない炭素数が奇数であるペンタデカン酸(シグマアルドリッチジャパン)を選択し、ヘキサンで 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した。

検量線の作成用のスペルコ 37FAME ミックスは、ヘキサン(和光純薬工業, 大阪)で 50mg/mL に調整した後、さらにヘキサンで 2.5 倍から 5000 倍まで 6 段階に希釈して用いた(Table 2)。また、DTA、DPA そして MA の 3 種類の FAME は、それぞれ 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ そして 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した後に混合し、その混合液をヘキサンで 10 倍から 10000 倍までの 5 段階に希釈して用いた(Table 3)。これら 11 種類の溶液に定量用の内部標準物質であるヘプタン酸メチルをそれぞれ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した。

3) 血清中脂肪酸のメチル化とメチル化脂肪酸の精製

脂肪酸のメチル化のために脂肪酸メチル化キット(ナカライテスク株式会社, 京都)を用いた。処理過程での血清中脂肪酸の酸化を防ぐために酸化防止剤としての 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol(BHT)(ナカライテスク株式会社)は、アセトンで 0.05%の濃度に調整して用いた。血清を吸着させるための濾紙(定性濾紙 No.2, 東洋濾紙株式会社, 東京)は、0.05%BHT 溶液に 5 分間浸し、さらに抗酸化作用を強固にするために別の 0.05%BHT 溶液に再度 5 分間浸した後に風乾した。風乾した BHT

濾紙のサイズは 1.5×1.5cm を基本としたが、試料として用いる血清の量に応じて 1.5×3.0cm と 1.5×5.0cm のサイズも用いた。血清量は、脂肪酸メチル化キットに付属していた血液を用いた際の扱い方法の説明を参考に、1 回量としてそれぞれ 25 μ L、50 μ L、100 μ L そして 200 μ L を用いた。それぞれの血清と 150 μ g/mL のペンタデカン酸溶液 200 μ L は、同一の BHT 処理濾紙に吸着させ減圧デシケーターで少なくとも 1 時間乾固し、得られた乾燥濾紙を脂肪酸のメチル化のためのサンプルとした。サンプルをメチル化する手順は、三フッ化ホウ素法とアルキルエステル化法を基本とした脂肪酸メチル化キットの使用方法に従った (Fig. 1)。すなわち、第 1 工程は、有機酸を含む試料を炭素数 1~4 の低級アルコールおよび炭素数 1~4 のアルコキシドと反応させ、エステル結合した有機酸をアルキルエステル化させる。第 2 工程は三フッ化ホウ素の存在下で前の工程で得られた反応混合物と炭素数 1~4 の低級アルコールを 37°C で反応させることによる遊離有機酸のアルキルエステル化である²⁶。さらに、メチル化脂肪酸は、精製しないまま GC 法に用いると、疎水性溶媒や不純物のためにカラムの劣化やクロマトグラフ分析におけるテーリングが生じるため、メチル化した脂肪酸は、直ちにメチル化脂肪酸精製キット(ナカライテスク株式会社)に供した (Fig. 2)。メチル化脂肪酸の精製は、試験管に設置したシリカゲルカートリッジに前洗浄液としてヘキサン 3mL を注入し、自然滴下によりカートリッジを洗浄した。前洗浄液が滴下した後に、メチル化した試料をカートリッジに注入し、自然滴下によりカートリッジに吸着させた。その後、洗浄液としてヘキサン 3mL をカートリッジに注入し、自然滴下による洗浄を行った。その後、カートリッジを別の試験管に移設し、1.5%の酢酸メチルを含むヘキサン溶液 3mL をカートリッジに注入し、

メチル化脂肪酸を溶出させた。得られた溶液は、窒素ガスで乾固した後、200 μ L のヘプタン酸メチル溶液と 800 μ L のヘキサン溶液で溶解し、GC 法による測定に用いた。

4) GC 法による脂肪酸濃度の測定

GC 法には水素炎イオン化検出器を備えた GC 装置(GC-2010, 島津製作所, 京都)を用いた。カラムは、Rtx-2560(100m \times 0.25mm \times 0.25 μ m, RESTEK Corporation, PA, U.S.A.)を用い、キャリアガスであるヘリウムガスの流速は 20cm/秒とした。検出器には水素炎イオン化検出器を用いて、注入口と検出器の温度はともに 250 $^{\circ}$ Cとした。カラムオープンの温度は、140 $^{\circ}$ Cで 2 分間保持した後、240 $^{\circ}$ Cまで毎分 4 $^{\circ}$ Cずつ昇温させ、240 $^{\circ}$ Cで 23 分間保持し、スプリット比は 1:25 とした。脂肪酸濃度は、専用解析ソフトである GCsolution(島津製作所)を用いて内部標準法により求めた。検出限界値は、検量線を基に GCsolution を用いて残渣標準偏差から求めた。GCsolution を用いて得られた脂肪酸の濃度は、ペンタデカン酸の検出濃度を基準に補正し、1mL 当たりの濃度として求めた。

5) 内部標準物質の回収率

内部標準物質であるヘプタン酸とペンタデカン酸の回収率は、添加した標準物質の濃度を、それぞれの測定後に求められた濃度で除することで求めた。

6) 分析法のバリデーション

分析法のバリデーションは、今回の測定方法と従来法の測定値の比較、検者内誤差そして検者間誤差により行った。まず、3 つの血清を今回の測定方法および、Folch 法と三フッ化ホウ素法を原法とする従来法でそれぞれ測定し、それらの測定値の相関係数を求めた。次に、

検者内誤差は、同時再現性と日差再現性により確認した。同時再現性は、同一検者が同一検体を同一時間帯に 5 回測定し変動係数(CV)として求めた。そして、日差再現性は、同一検者が同一検体を 5 回測定することを 3 日間行い、その平均値の CV を求めた。さらに、検者間誤差の確認のために、3 人の検者が同一検体を 3 回ずつ測定し、検者間の測定値を比較した。

7) 統計学的処理

血清中脂肪酸の濃度は平均±標準偏差(SD)で示した。CV は、SD を平均値で除して得られた値を 100 倍することにより百分比として求めた。統計学的処理は、統計処理ソフト SPSS[®] (Ver.15.0J for Windows, International Business Machines Corporation, NY, U.S.A)と R コマンドー(ver.1.4-8, <http://dl.dropbox.com/u/8196796/MyProgram.zip>)を用いて行った。検者間の比較は、一元配置分散分析を行い統計学的に有意であったものに対しては *Tukey* 検定を行った。危険率は 5% 未満をもって有意とした。

2 結果

1) 血清中脂肪酸のメチル化とメチル化脂肪酸の精製

脂肪酸のメチル化処理の第 1 段階である血清を BHT 濾紙に吸着させる操作では、定法通りの 1.5×1.5cm の BHT 濾紙には 50 μ L までの血清は完全に吸着可能であった。しかし、血清量が 100 μ L と 200 μ L の場合は BHT 濾紙のサイズが 1.5×5.0cm でなければ血清の吸着は不十分であった。そのため、これ以後の脂肪酸のメチル化処理に用いる BHT 濾紙のサイズは、1.5×5.0cm とした。また、メチル化された脂肪酸の精製は、いずれの血清量を用いて得られたメチル化脂肪酸の場合においてもメチル化脂肪酸精製キットの定法通りに処理することが可能であった。脂肪酸のメチル化とメチル化脂肪酸の精製は、それぞれ 4 時間以内と 1 時間以内に完了した。

2) 脂肪酸の検出と定量

GC 法により得られた標準液のクロマトグラムは Fig. 3 に示した。同定用標準物質 40 種類と内部標準物質 2 種類の合計 42 種類の脂肪酸はすべて検出可能であった。これらの脂肪酸を用いて作成した各脂肪酸のうち、血清において定量可能であった脂肪酸の検量線は、いずれの脂肪酸においても相関係数 0.999 以上の高い相関を示した (Fig. 4 ~17)。血清中脂肪酸のクロマトグラムは Fig. 18 に示した。血清量を 25 μ L と 50 μ L とした場合に定量可能であった脂肪酸は、飽和脂肪酸 (SFA) ではパルミチン酸とステアリン酸の 2 種類、一価不飽和脂肪酸 (MUFA) ではオレイン酸の 1 種類、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) では DPA、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、リノール酸 (LA)、アラキドン酸 (AA)、DTA そして MA の 6 種類であり、合計で 9 種類であった。それぞれの脂肪酸の濃度は Table 4 に示した。一方、100 μ L と 200 μ L の血清量を用

いた場合に定量可能であった脂肪酸の種類は、前述の 9 種類に加え MUFA のパルミトレイン酸、PUFA の α -リノレン酸(ALA)、エイコサペンタエン酸(EPA)そしてジホモ- γ -リノレン酸(DGLA)の 4 種類の合計 13 種類であった(Table 4)。パルミチン酸やオレイン酸のような濃度の高い脂肪酸のクロマトグラム上のピーク面積は、血清量が 25 μ L から 200 μ L までのすべてで明確に求めることができた。しかし、ALA のような濃度の低い脂肪酸のピーク面積は、血清量が 100 μ L 未満では求めることができなかった。そして、血清量が 200 μ L の方が 100 μ L よりもピーク面積が大きく明瞭であった(Fig. 19, 20)。

3) 用いた血清量の違いによる脂肪酸濃度の直線性

総 SFA、総 MUFA そして総 PUFA の測定値から得られた近似直線は、いずれも高い相関を示した (Fig. 21)。SFA のパルミチン酸とステアリン酸の測定値から得られた近似直線の相関係数は、それぞれ 0.9998 と 0.9994 であった(Fig. 22)。MUFA のパルミトレイン酸は、25 μ L と 50 μ L の血清量で検出できなかったため、その近似直線は得られなかった。オレイン酸の測定値の近似直線は、相関係数 0.9996 であった(Fig. 23)。総 n-3 脂肪酸、総 n-6 脂肪酸そして総 n-9 脂肪酸の測定値から得られた近似直線は、いずれも相関係数が 0.999 以上であった(Fig. 24)。n-3 脂肪酸の ALA と EPA は、25 μ L と 50 μ L の血清量で検出できなかったことから、これらの近似直線は得られなかった。DPA そして DHA の測定値から得られた近似直線の相関係数は、それぞれ 0.9988 と 0.9998 であった(Fig. 25)。n-6 脂肪酸の DGLA は、25 μ L と 50 μ L の血清量で検出できなかったために、近似直線は得ることができなかった。LA、AA そして DTA の測定値から得られた近似直線の相関係数は、それぞれ 0.9999、0.9999 そして 0.9992 であった(Fig.

26)。n-9 脂肪酸のオレイン酸と MA の測定値から得られた近似直線の相関係数はそれぞれ 0.9996 と 0.9901 であり、MA の相関係数はすべての脂肪酸の中で最低値であった(Fig. 27)。

4) 内部標準物質の回収率

内部標準物質であるヘプタン酸とペンタデカン酸は、それぞれ 11.69 分と 20.56 分に検出した。それぞれ測定前の濃度を測定後の濃度で除することで求めた回収率は、ヘプタン酸が $109 \pm 3.1\%$ ($n=30$) であり、ペンタデカン酸は $69.7 \pm 3.6\%$ ($n=30$) であった。

5) 今回の測定法と従来法の測定値の相関

今回の測定法と従来法による測定値の相関関係を確認した結果、定量可能であった 13 種類の脂肪酸の相関係数は 0.875 から 1.000 の範囲であり、高い相関を示した(Table 5)。

6) 血清中脂肪酸濃度の検者内誤差

(1) 血清中脂肪酸濃度の同時再現性

同一検者が同一検体を同一時間帯に 5 回測定して求めた血清中脂肪酸濃度の結果は、Table 6 に示した。総脂肪酸、総 SFA、総 MUFA そして総 PUFA 濃度の CV は、それぞれ 2.0%、2.3%、2.1%そして 1.9% であった。総 n-3、総 n-6 そして総 n-9 脂肪酸の濃度の CV は、それぞれ 1.9%、1.9%そして 2.2%であった。SFA と MUFA の各脂肪酸濃度の CV は、2.0~3.7%の範囲であった。PUFA の中では、MA と EPA の濃度の CV はそれぞれ 5.4%と 7.4%であったが、その他の PUFA の濃度の CV はすべて 4.8%未満であった。

(2) 血清中脂肪酸濃度の日差再現性

同一検者が 3 日連続で同一検体を 5 回測定し求めた血清中脂肪酸濃度の結果は、Table 7 に示した。総脂肪酸、総 SFA、総 MUFA そして

総 PUFA の濃度の CV は、それぞれ 1.8%、2.6%、2.1%そして 1.2%であった。総 n-3、総 n-6 そして総 n-9 脂肪酸の濃度の CV は、それぞれ 0.3%、1.4%そして 2.1%であった。各種脂肪酸の濃度の CV は、MA が 2.8%と最も高値であったが、いずれの脂肪酸でも CV は 0.4~2.8%の範囲であった。

7) 血清中脂肪酸濃度の検者間誤差

検者間比較の結果は、Table 8 に示した。総脂肪酸、総 SFA、総 MUFA そして総 PUFA の濃度は、検者間で有意な差を認めなかった。そして、総 n-3、総 n-6 そして総 n-9 脂肪酸の濃度も検者間にも有意な差は生じなかった。種類別に比較した各脂肪酸の濃度は、いずれの種類においても検者間で有意な差を認めなかった。

3 考察

今回用いた脂肪酸メチル化キットによる脂肪酸のメチル化法の原理は三フッ化ホウ素法である。原法では、100℃の高温処理により、PUFAなどの不安定な脂肪酸では加熱分解を生じる可能性があるが、本測定系の最高温度は37℃であり、原法よりも低温の環境で処理を行えたことから、試料中に含まれる脂肪酸の加熱分解は生じにくかったと考えられる。また、脂肪酸をメチル化するためのジアゾメタン法に比べ、用いる試薬の爆発性や毒性は低いことに加えて、4時間以内に脂肪酸のメチル化が可能であった。さらに、この脂肪酸メチル化キットは、血清中のアシルグリセロール、リン脂質そしてコレステロールエステルに含まれる脂肪酸のメチル化が可能のため、Folch法のような試料からの脂肪酸の抽出処理が不要である。また、今回はメチル化した脂肪酸の精製を脂肪酸メチル化キットでの作業に引き続きメチル化脂肪酸精製キットにより行った。メチル化した脂肪酸を精製せずにGC装置のカラムに通すと、疎水性溶媒や不純物の影響でカラムの劣化やクロマトグラフ分析におけるテーリングが生じるため、メチル化した脂肪酸の精製は必須である。今回の精製工程には付属のカートリッジを用いて精製したが、キットに付属するもの以外で準備を必要とした用具は、試験管のみであり、さらにその操作は1時間以内で完了したため容易に精製が可能であった。そして、この処理によりクロマトグラフ分析におけるテーリングは認められなかった。したがって、これらのキットをセットで用いたGC法による犬の血清中脂肪酸の測定は、従来法に比べ安全かつ短時間で完了できる方法であることが確認できた。

本来、脂肪酸メチル化キットは植物に利用するために開発されたた

め、犬の血清中脂肪酸の測定に関する情報は少ない。そのため、試料として用いる血清量を決定するための検討を行った結果、本測定方法では、25 μ L と 50 μ L の血清量では 9 種類の脂肪酸が測定可能であり、100 μ L 以上の血清量では 13 種類の脂肪酸が測定可能であることが明らかとなった。また、異なる血清量から得られた脂肪酸濃度の近似直線の相関係数は、MA の 0.9901 が最低値であったが、その他の脂肪酸の測定値から得られた近似直線の相関係数は、いずれも 0.999 以上の値であったことから、本測定法は血清量の違いによる血清中脂肪酸濃度の差を高い精度で反映すると考えられた。さらに、今回の測定方法で測定可能であった 13 種類の脂肪酸の測定値を従来法と比較した結果、すべての種類が高い相関を認めた。また、GC 法によるヒト血清中の脂肪酸濃度の測定値の精度は、一般に同時再現性および日差再現性で評価され、それらの CV がそれぞれ 11.3%未満と 23.1%未満である場合には再現精度は良好と判断されている²⁷。本研究では、同時再現性および日差再現性に加えて検者間誤差も確認したが、CV の値は過去の報告に比べ明らかに低値であり、検者間には有意な差を認めなかった。しかし、検者間の比較において、ALA のピーク面積が小さいために、測定値の誤差は大きかった。そのため、200 μ L より少ない血清量を用いることは、それにともないピーク面積がさらに小さくなることから、測定に適さないと考えられる。また、測定可能な脂肪酸の種類そして定量の感度は血清量を 200 μ L 用いた結果が最良であったことから、血清中脂肪酸の測定に供する血清の量としては、200 μ L が最も適していると判断した。さらに、その血清量を用いるための BHT 濾紙のサイズは従来の 1.5 \times 1.5cm ではなく 1.5 \times 5.0cm が最適であることを確認した。

これらのことから、今回の測定方法は、従来法と比較して安全かつ簡便に犬の血清中脂肪酸のメチル化とメチル化脂肪酸の精製が可能であり、脂肪酸の検出と測定の精度は高い方法であることが示された。

4 小括

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

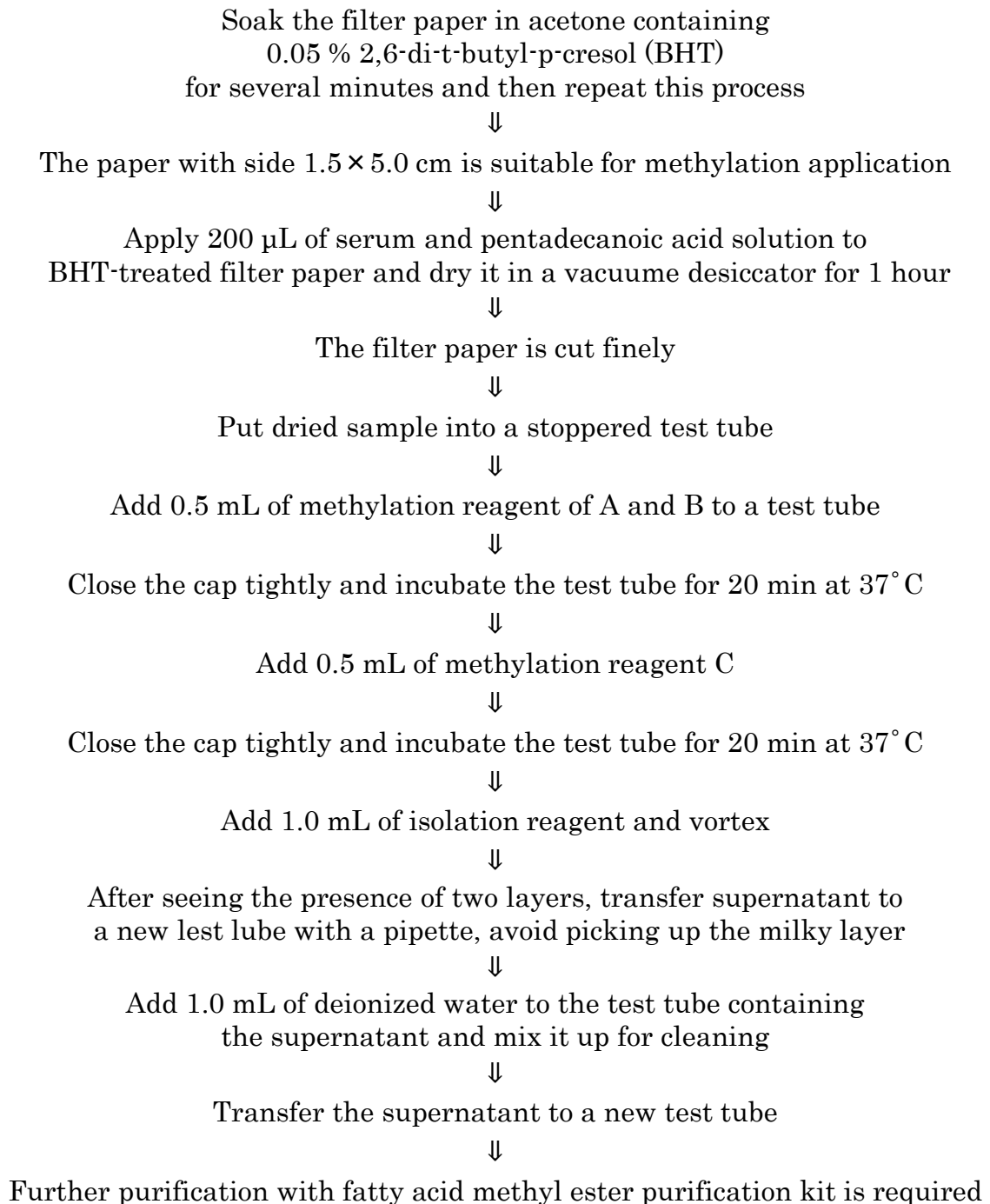


Fig. 1 Procedure of fatty acid methylation by using the kit*. Methylation of fatty acids, was applied the described method of fatty acid methylation kit. These procedures were performed for the extraction and methylation in serum fatty acids.

* Fatty acid methylation kit: Nacalai Tesque.

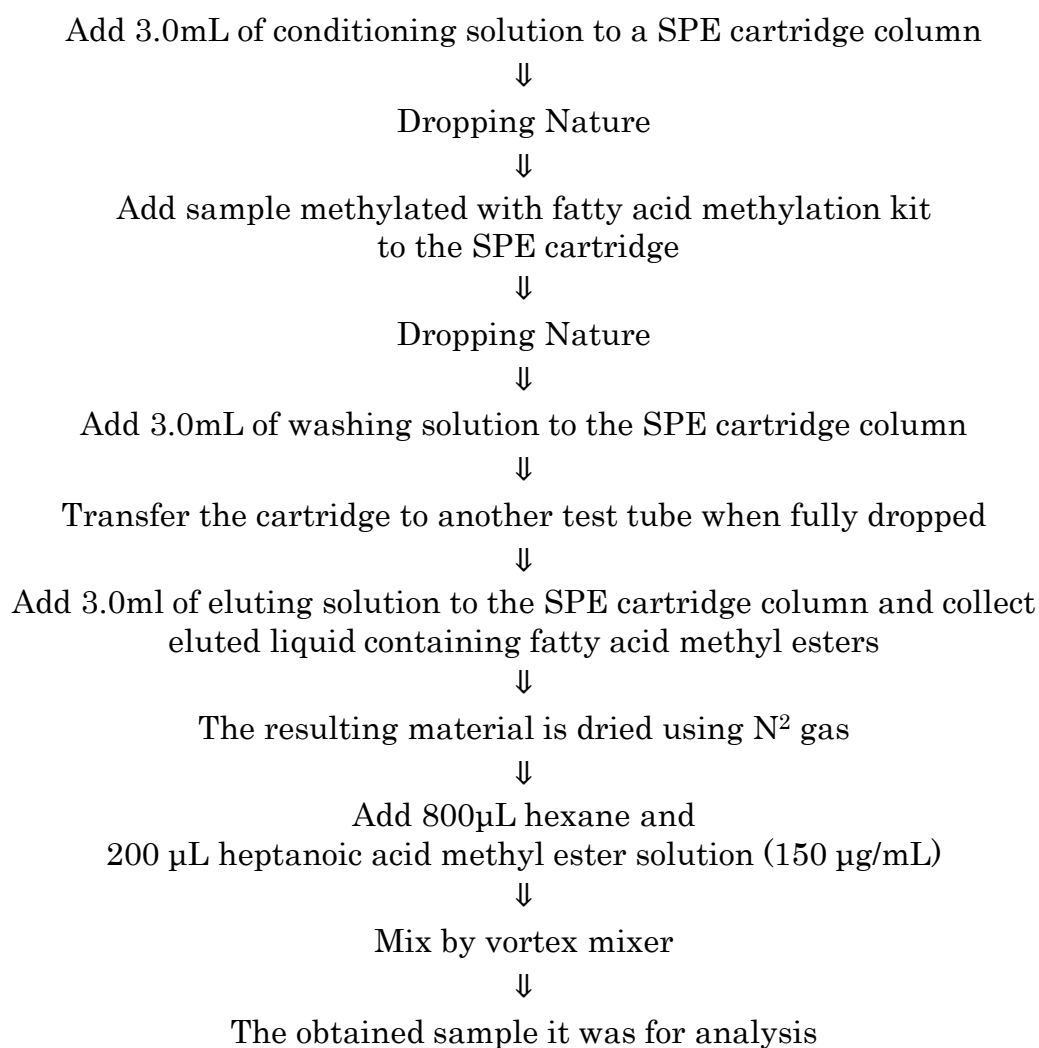


Fig. 2 Procedure of methylated fatty acid purification by using the kit*. Purification of methylated fatty acids is according to the described method of methylation fatty acid purification kit. These procedures were performed for the purification of methylated fatty acids. * Purification of methylated fatty acid kit: Nacalai Tesque.

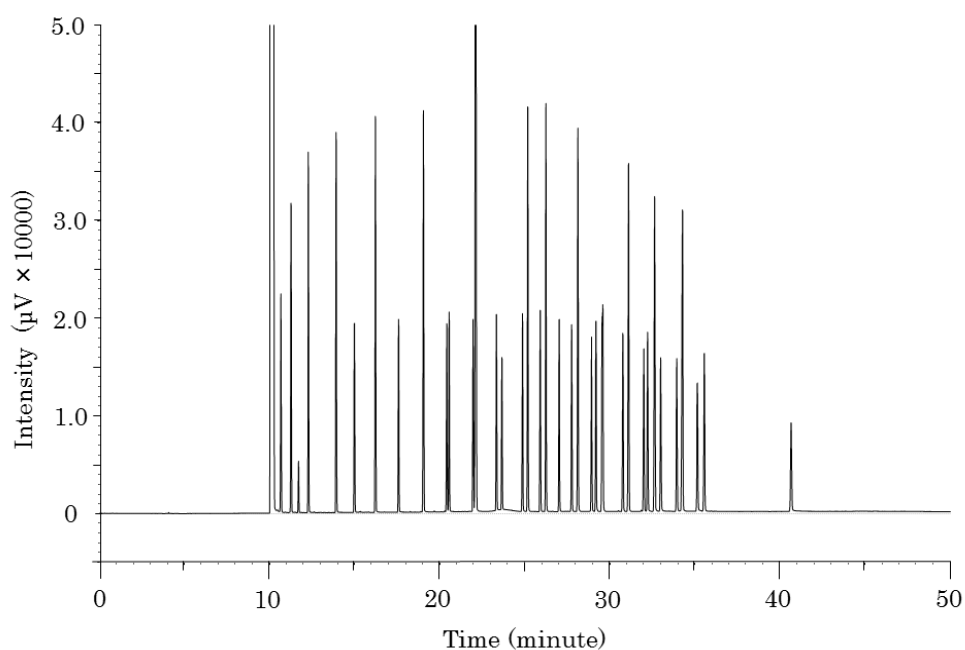


Fig. 3 The chromatogram was obtained from internal standard fatty acid concentration of 500 µg/mL.
The peak of the fatty acids was observed between 11.7 to 40.67 min.

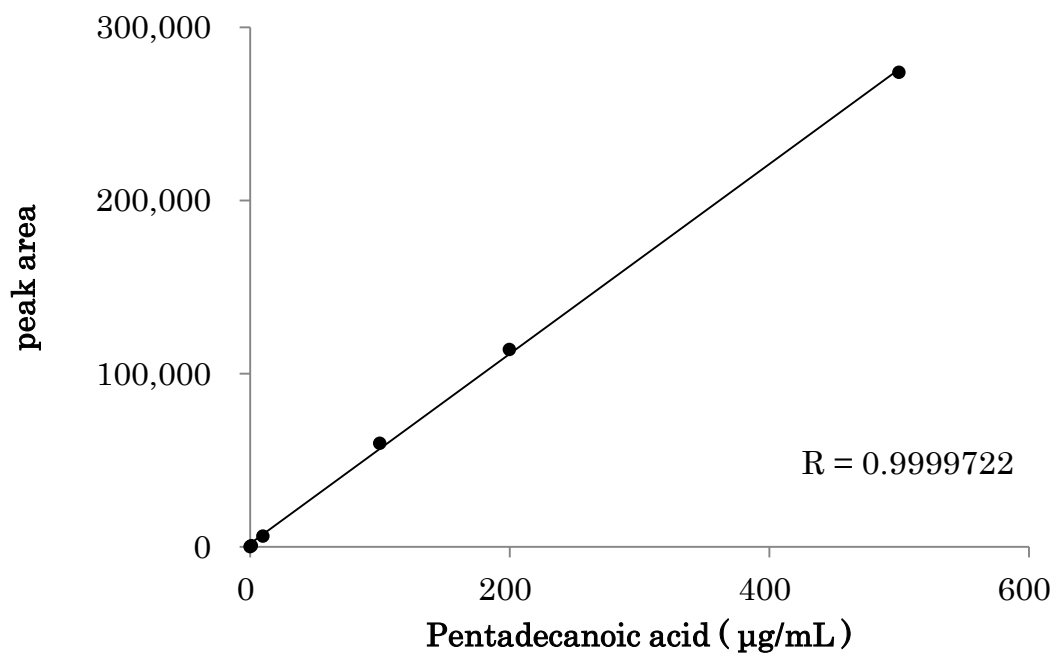


Fig. 4 The calibration curve of pentadecanoic acid.

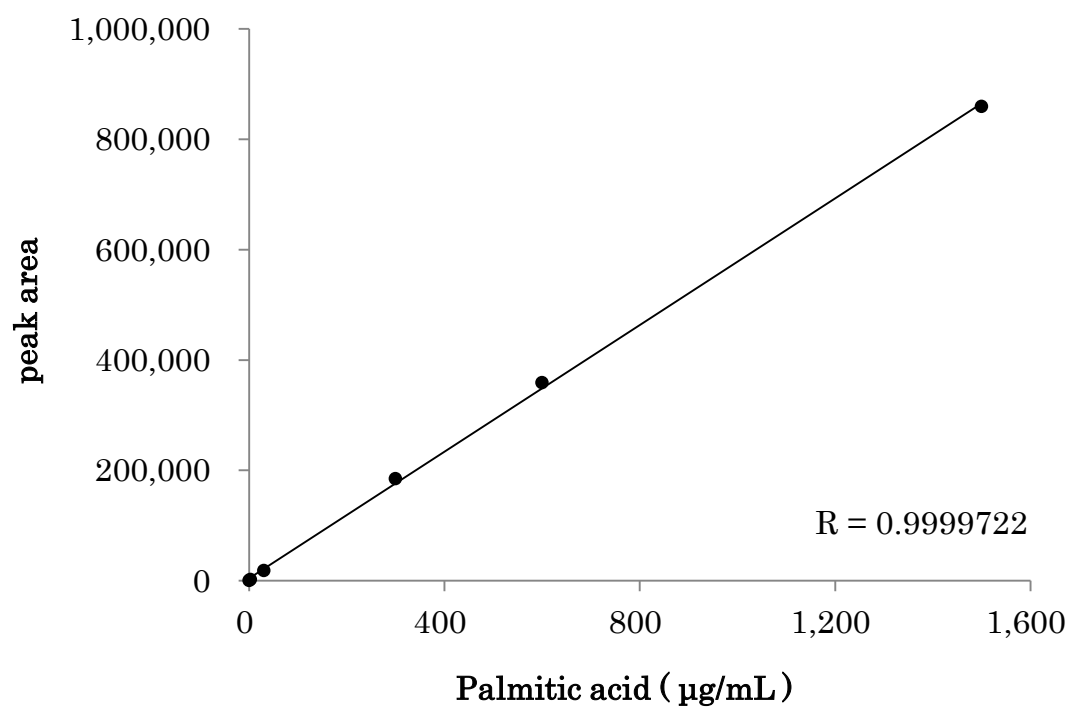


Fig. 5 The calibration curve of palmitic acid.

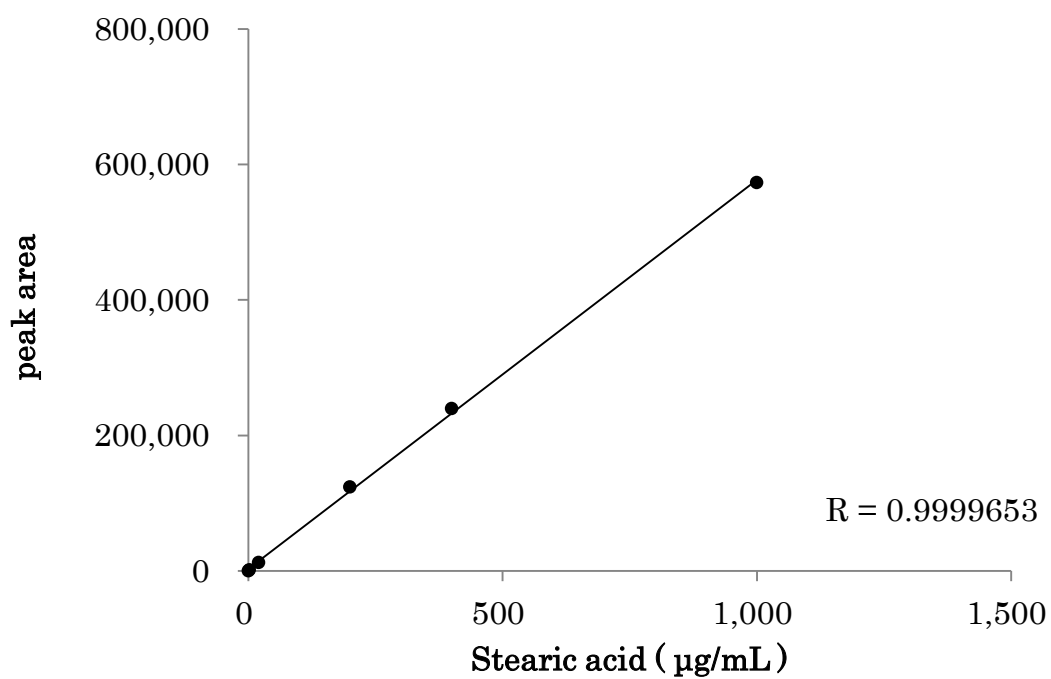


Fig. 6 The calibration curve of stearic acid.

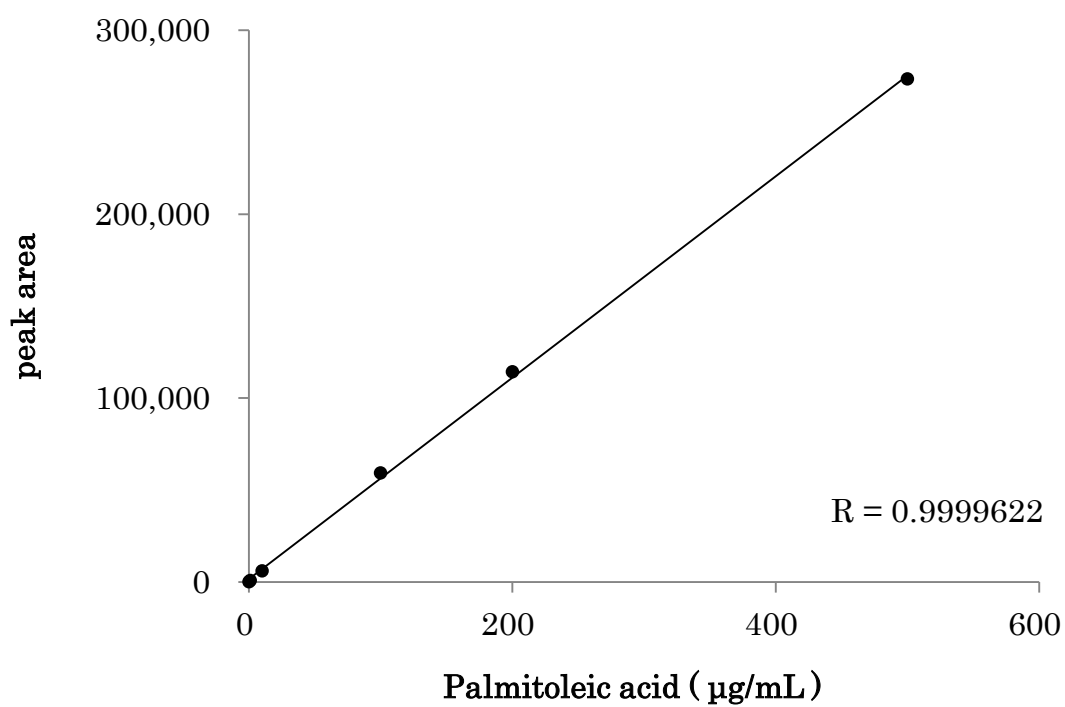


Fig. 7 The calibration curve of palmitoleic acid.

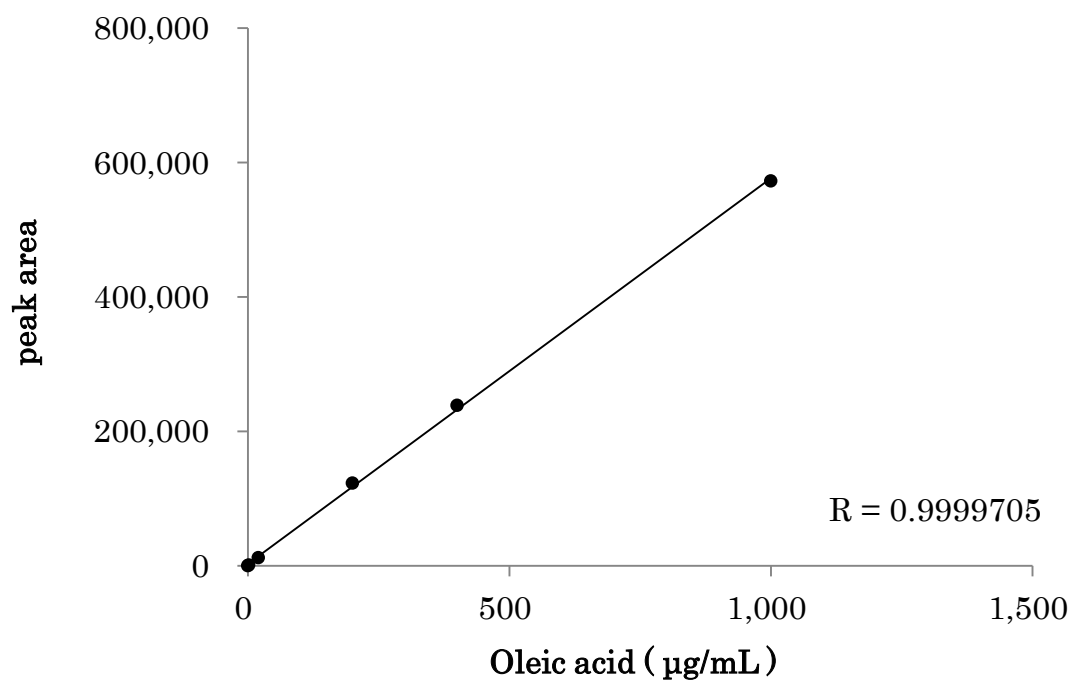


Fig. 8 The calibration curve of oleic acid.

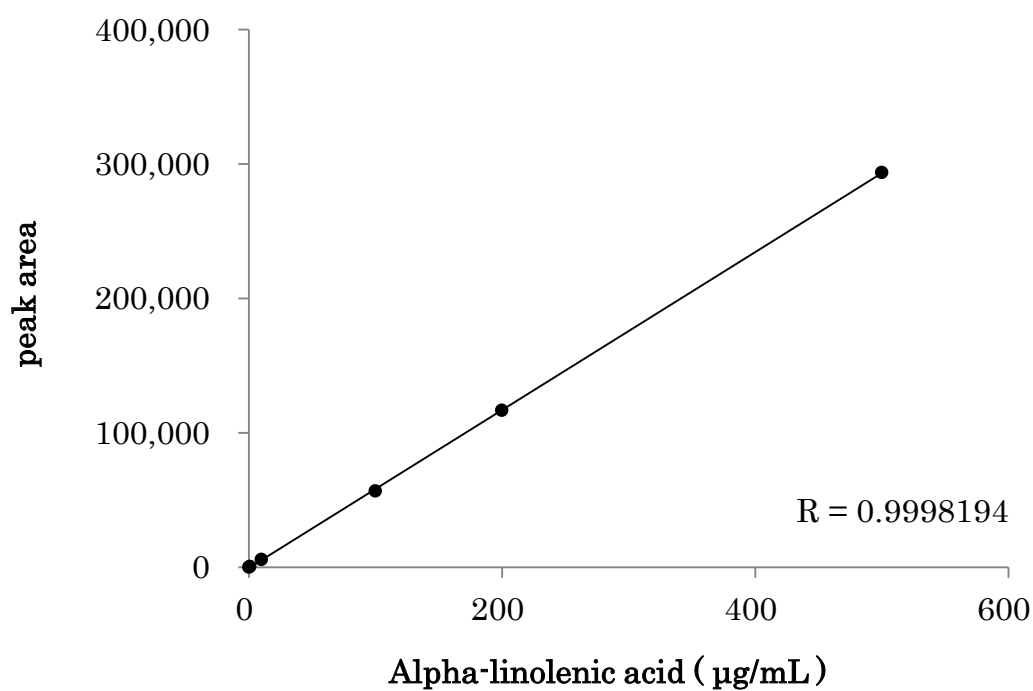


Fig. 9 The calibration curve of alpha-linolenic acid.

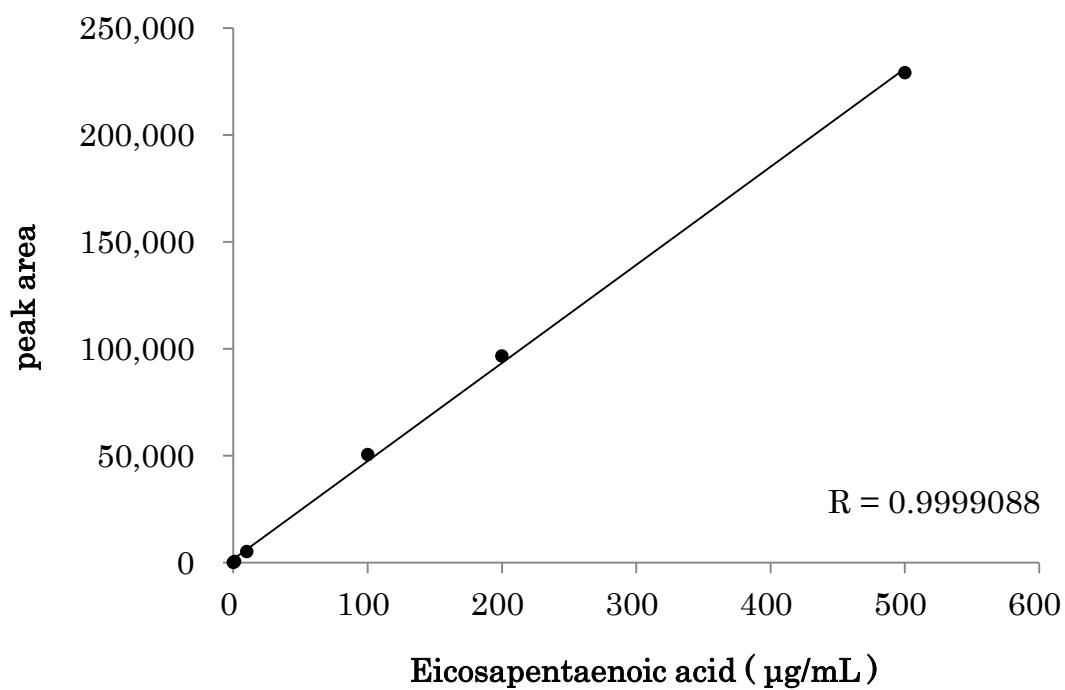


Fig. 10 The calibration curve of eicosapentaenoic acid.

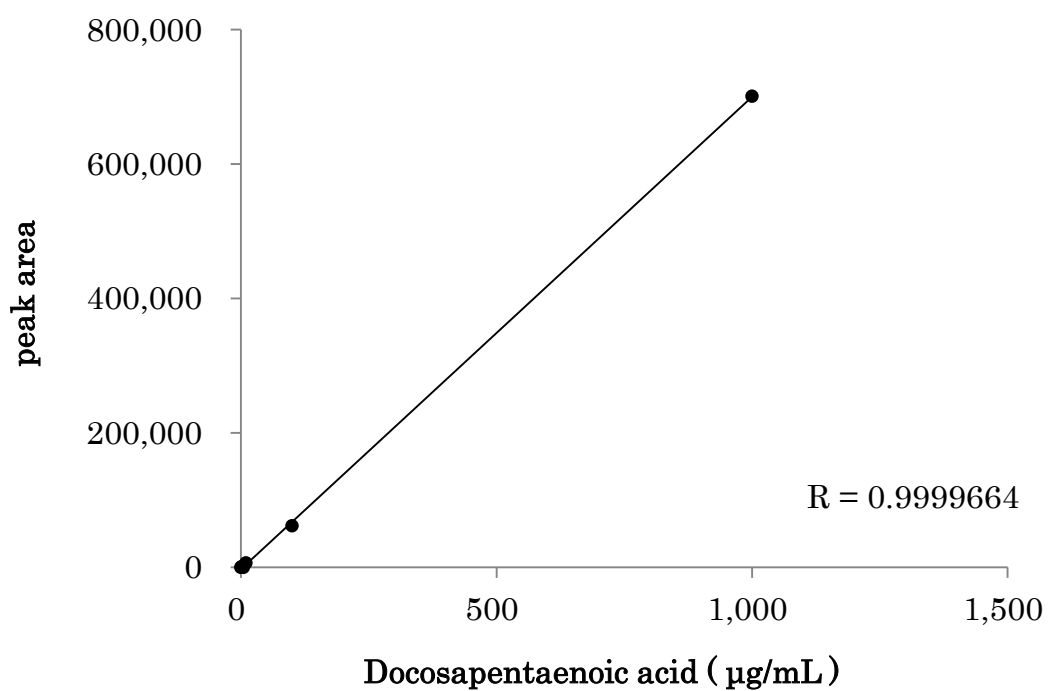


Fig. 11 The calibration curve of docosapentaenoic acid.

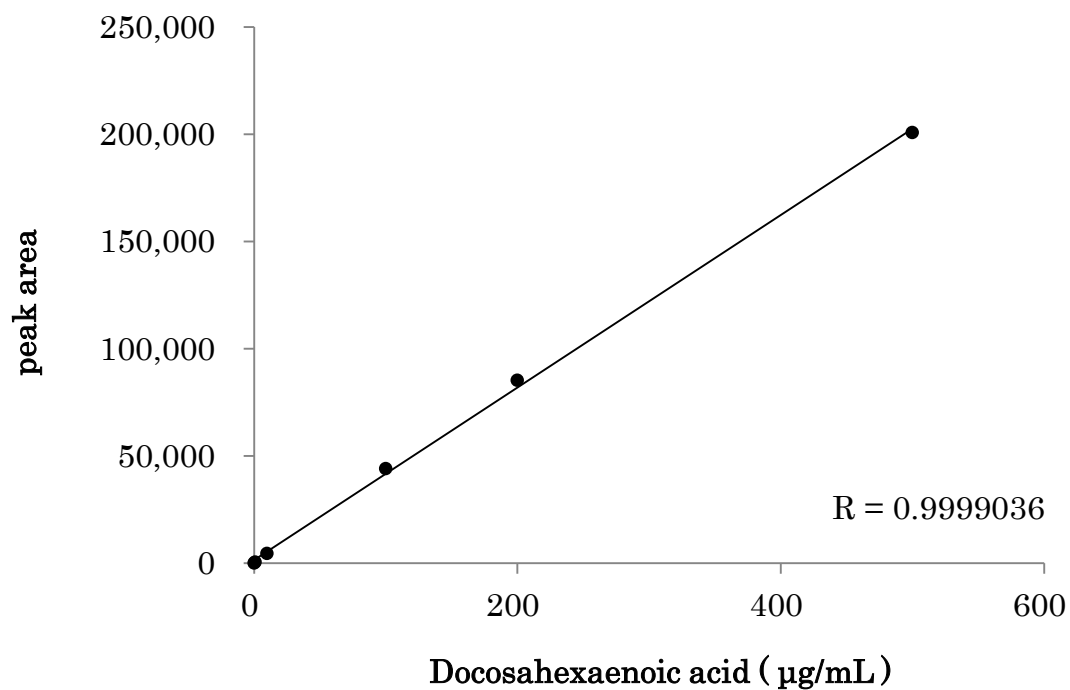


Fig. 12 The calibration curve of docosahexaenoic acid.

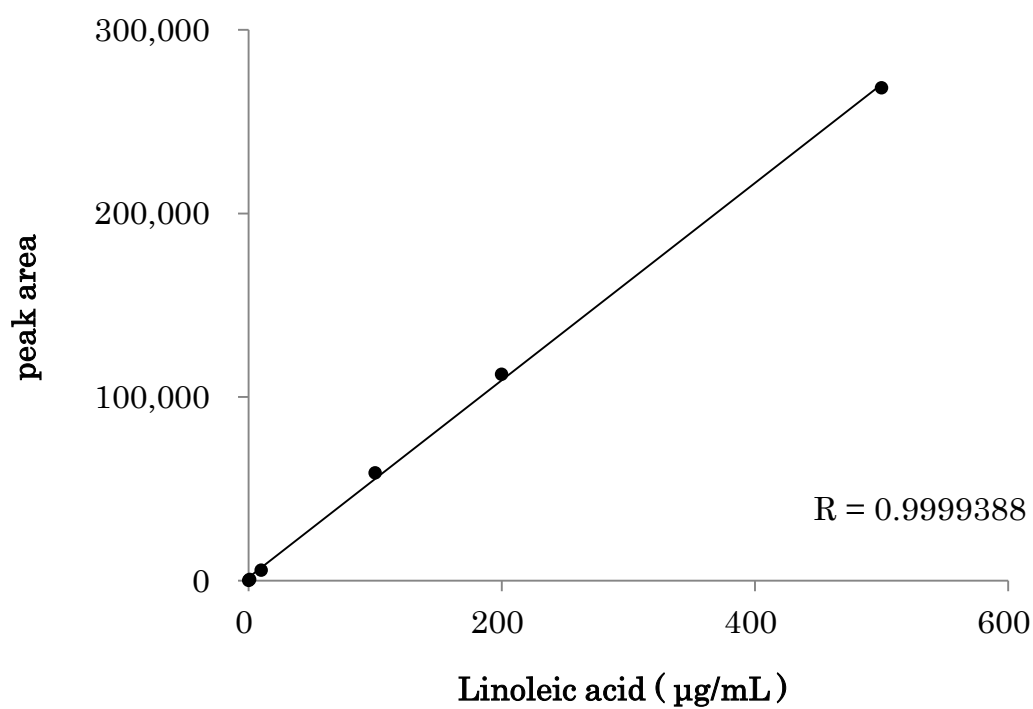


Fig. 13 The calibration curve of linoleic acid.

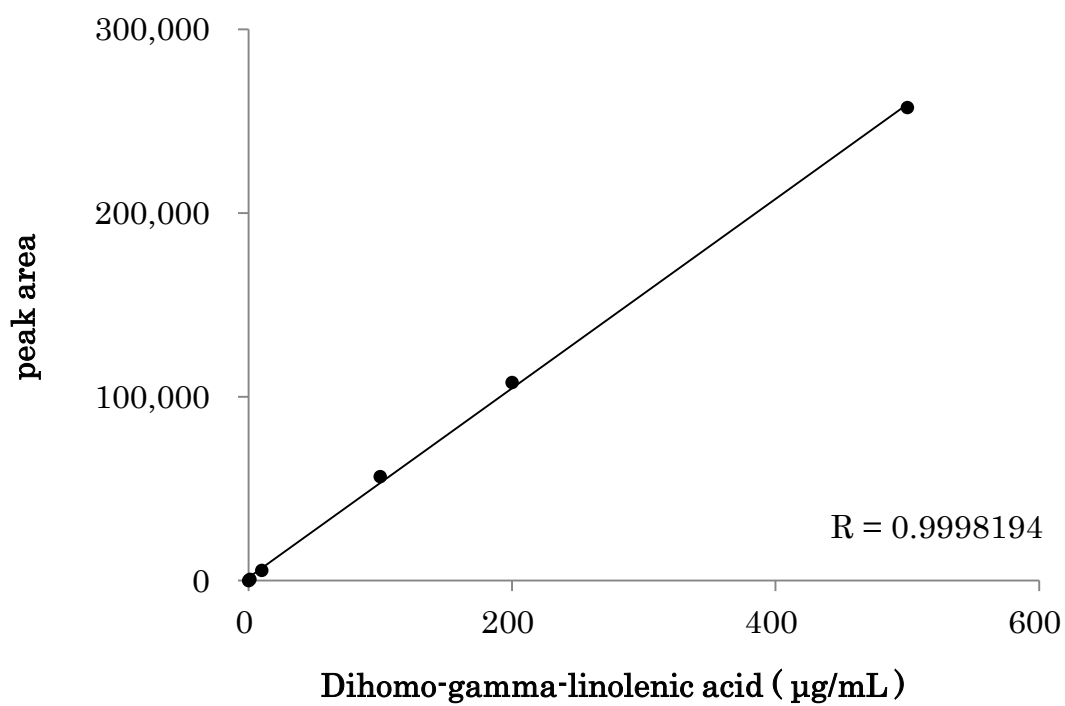


Fig. 14 The calibration curve of dihomogamma-linolenic acid.

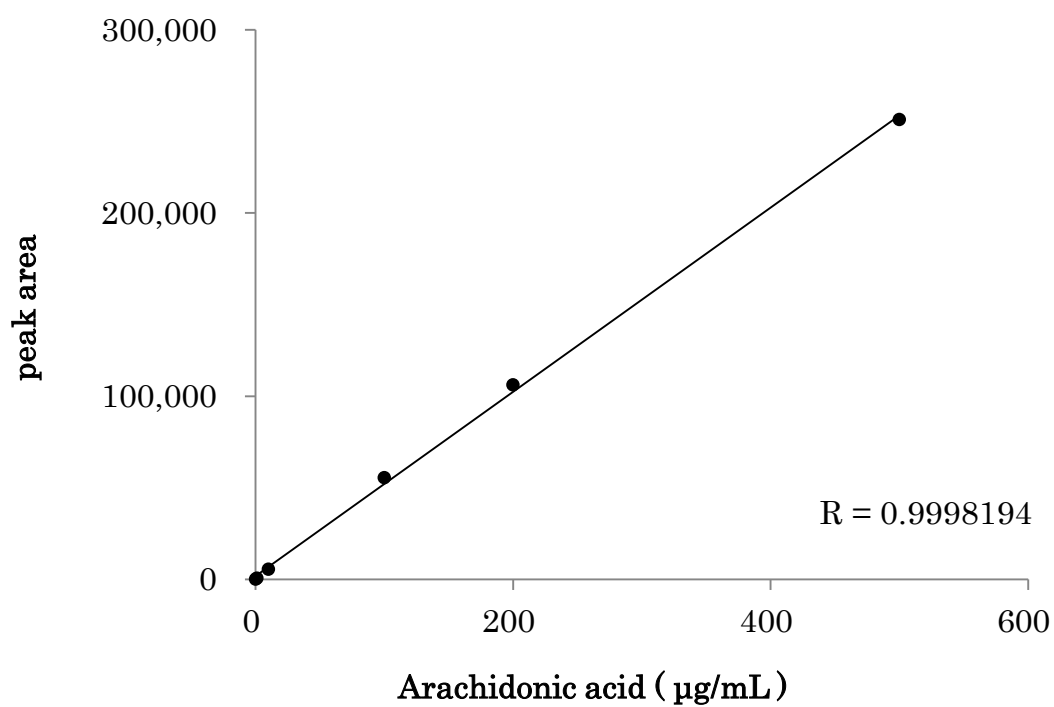


Fig. 15 The calibration curve of arachidonic acid.

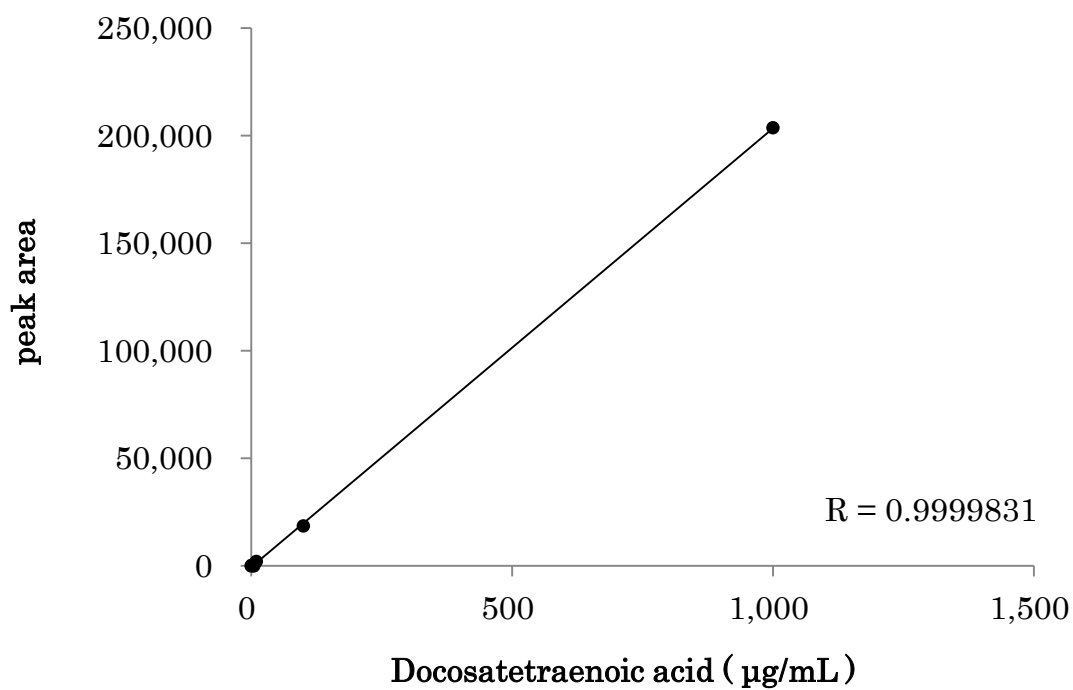


Fig. 16 The calibration curve of docosatetraenoic acid.

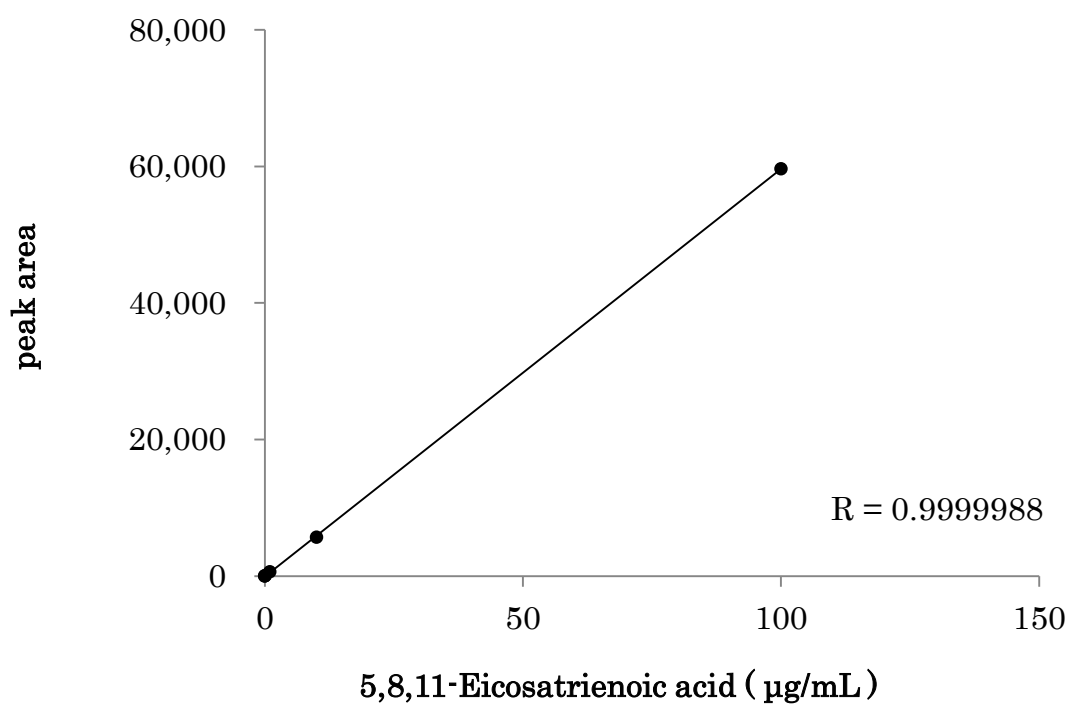


Fig. 17 The calibration curve of 5, 8, 11-eicosatrienoic acid.

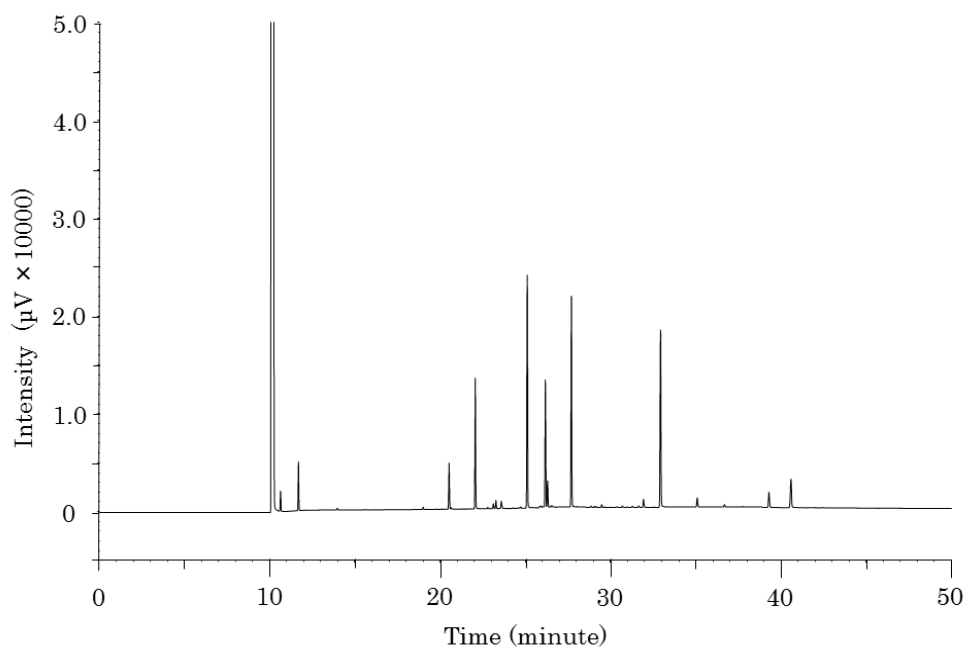


Fig. 18 The chromatogram was obtained from serum fatty acids.
The peak of the fatty acids was observed between 11.7 to 40.67 min.

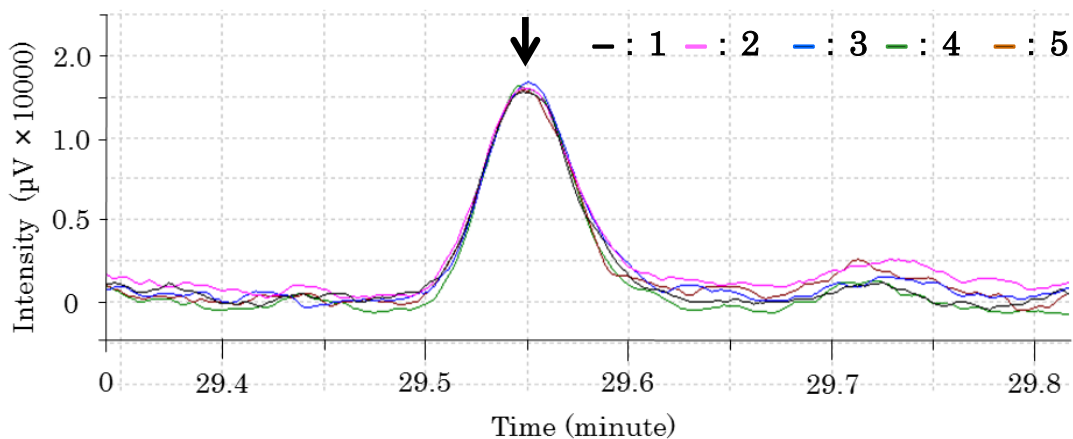


Fig. 19 Chromatograph of the α -linolenic acid using serum quantity of 200 μL .

The arrow shows the peak. There is shown a peak in five measurements.

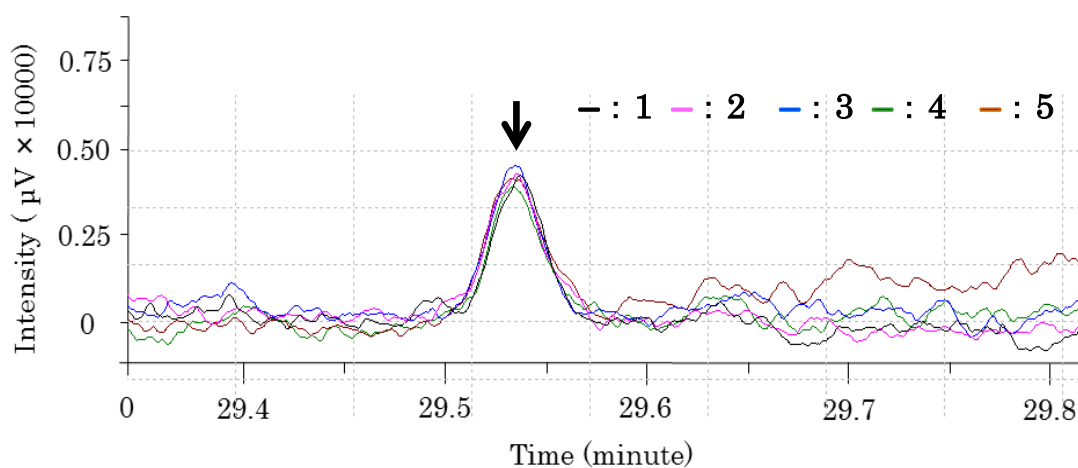


Fig. 20 Chromatograph of the α -linolenic acid using serum quantity of 100 μL .

The arrow shows the peak. There is shown a peak in five measurements.

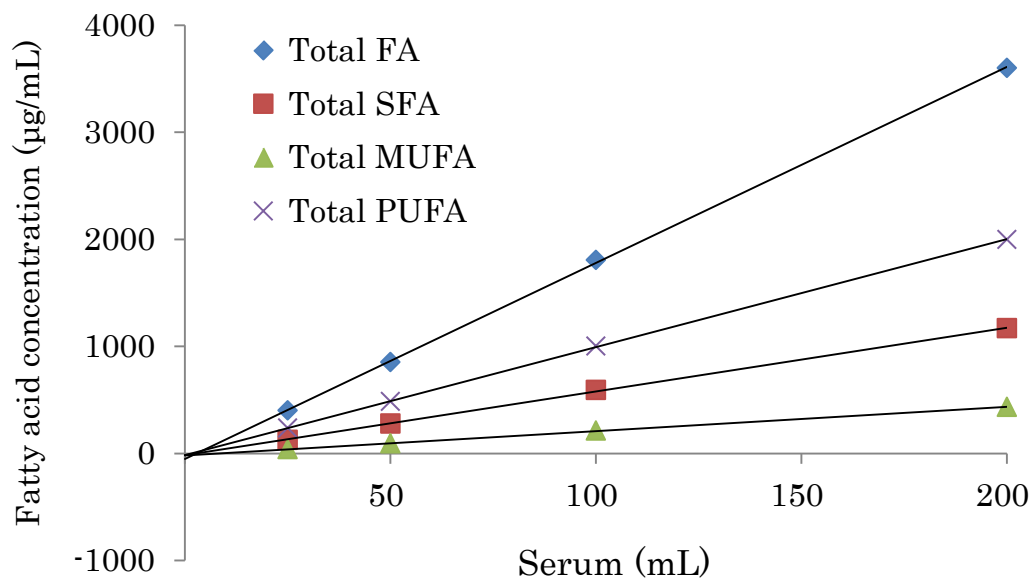


Fig. 21 Sum of serum fatty acid concentrations according to the classification in saturation.

Linearity of total FA ($y = 18.305x - 51.138$, $R^2 = 0.9998$),

total SFA ($y = 10.079x - 15.33$, $R^2 = 0.9999$),

total MUFA ($y = 5.9573x - 17.358$, $R^2 = 0.9996$)

and total PUFA ($y = 2.2693x - 18.45$, $R^2 = 0.9998$).

FA: fatty acid, SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid.

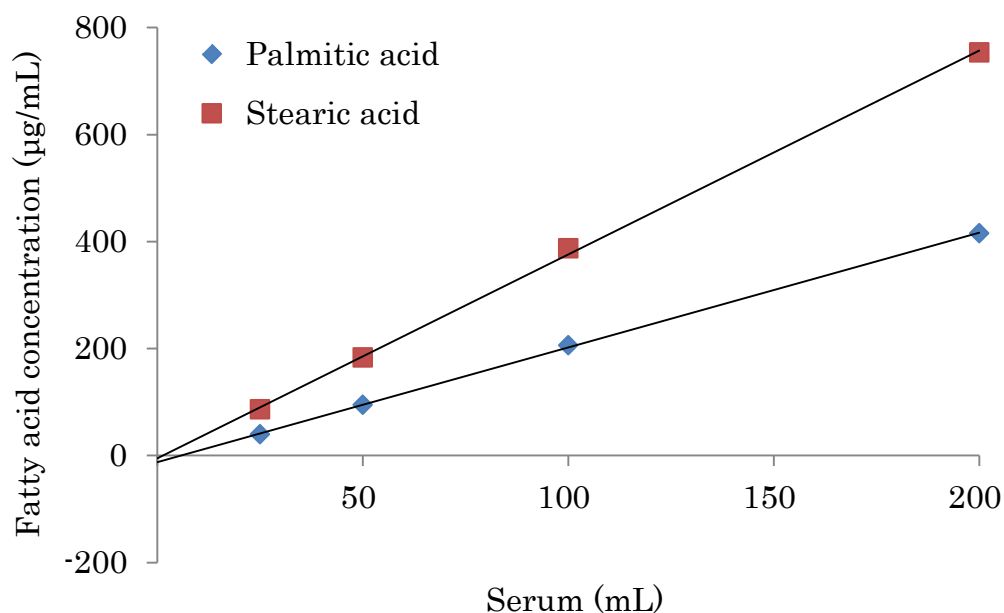


Fig. 22 Fatty acid concentrations in saturated fatty acid by the difference of quantity of serum.

Linearity of palmitic acid ($y = 2.1459x - 12.417$, $R^2 = 0.9998$)

and stearic acid ($y = 3.8114x - 4.9408$, $R^2 = 0.9994$).

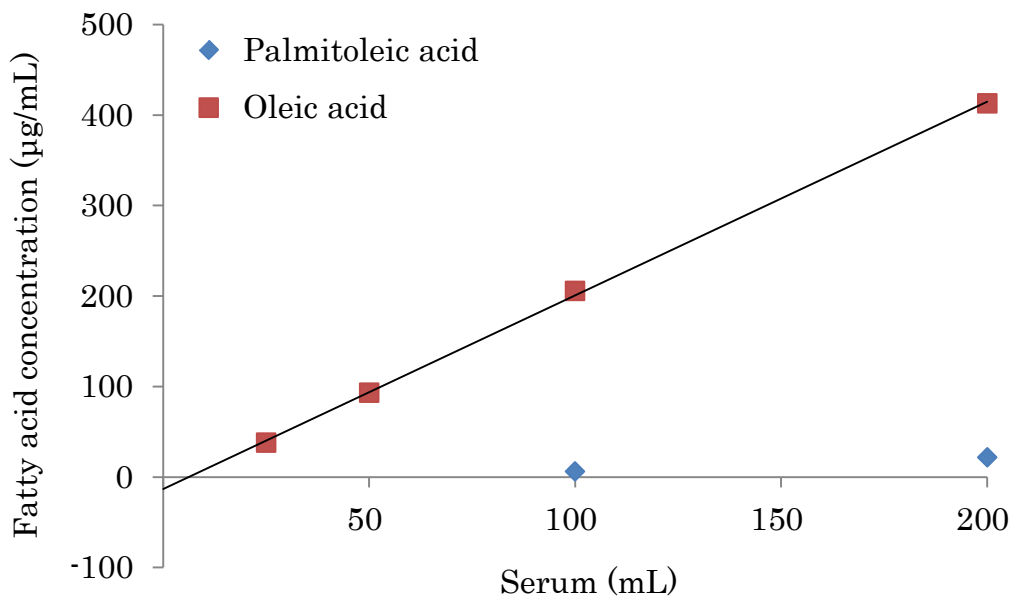


Fig. 23 Fatty acid concentrations in monounsaturated fatty acid by the difference of quantity of serum.

Linearity of and oleic acid ($y = 2.1398x - 13.238$, $R^2 = 0.9996$).

Palmitoleic acid could not be quantified in the serum amount of 25 µL and 50 µL.

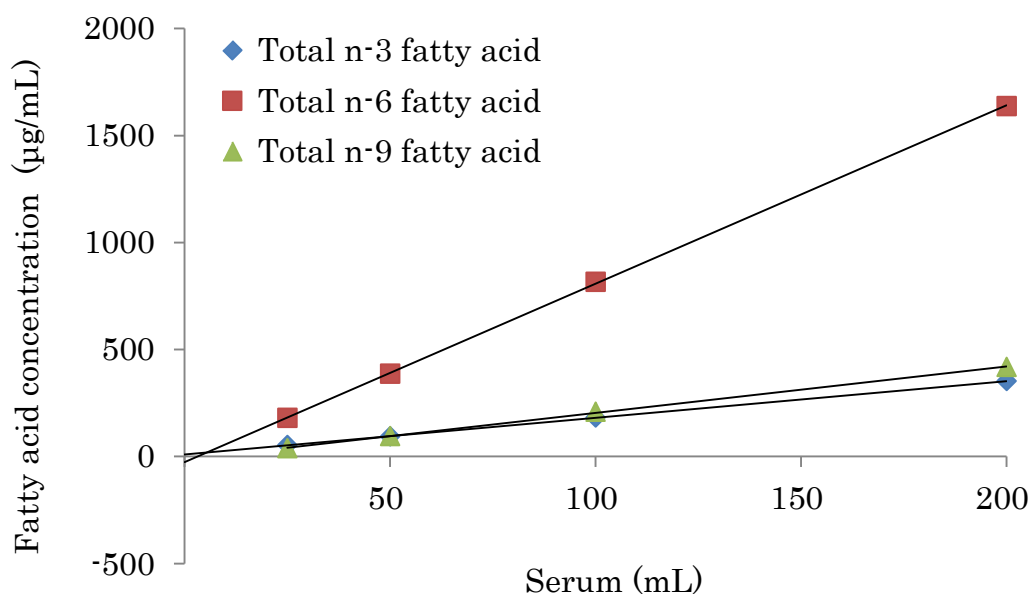


Fig. 24 Fatty acid concentrations in fatty acid of n-3, n-6 and n-9 by the difference of quantity of serum.

Linearity of total n-3 fatty acid ($y = 8.3384x - 25.99$, $R^2 = 0.9999$),

total n-6 fatty acid ($y = 1.7125x + 10.114$, $R^2 = 0.9999$) and

total n-9 fatty acid ($y = 2.1675x - 12.692$, $R^2 = 0.9996$).

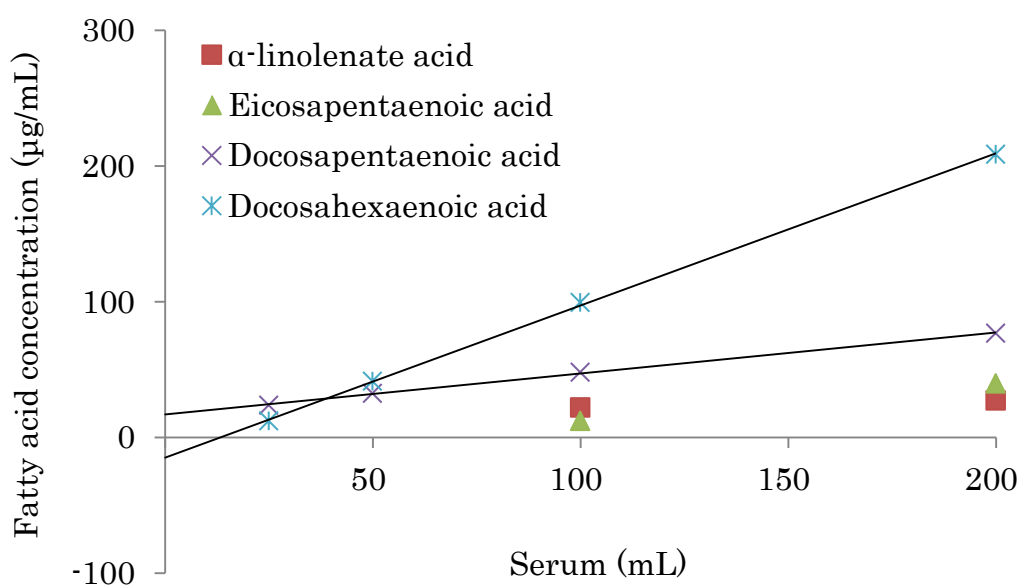


Fig. 25 Fatty acid concentrations in n-3 fatty acid by the difference of quantity of serum.

Linearity of docosapentaenoic acid ($y = 0.3016x + 17.033$, $R^2 = 0.9988$) and docosahexaenoic acid ($y = 1.1213x - 14.705$, $R^2 = 0.9998$). Alpha-linolenate acid and eicosapentaenoic acid could not be quantified in the serum amount of 25 μL and 50 μL .

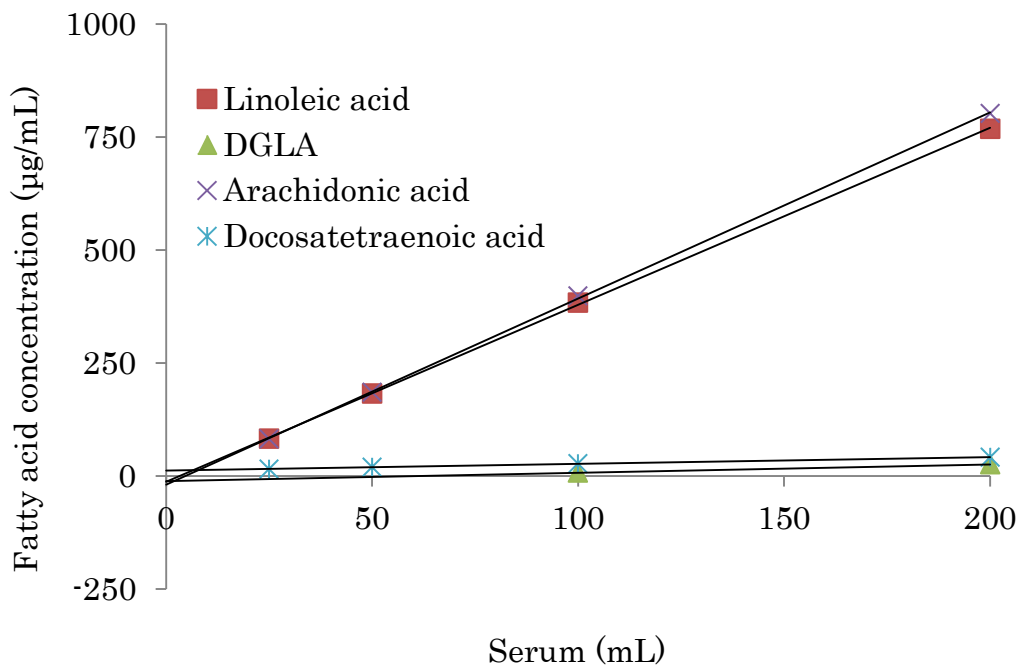


Fig. 26 Fatty acid concentrations in n-6 fatty acid by the difference of quantity of serum.

Linearity of linoleic acid ($y = 3.9164x - 12.792$, $R^2 = 0.9999$), arachidonic acid ($y = 4.1189x - 19.23$, $R^2 = 0.9999$) and docosatetraenoic acid ($y = 0.1481x + 12.279$, $R^2 = 0.9992$). DGLA could not be quantified in the serum amount of 25 μL and 50 μL .

DGLA: Dihomo-gamma-linolenic acid.

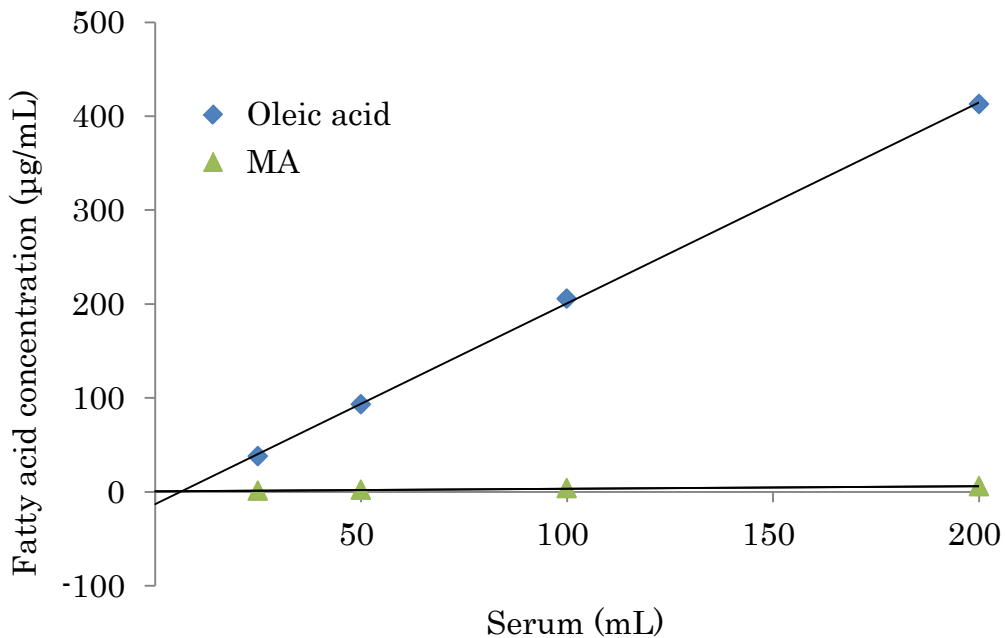


Fig. 27 Fatty acid concentrations in n-9 fatty acid concentration by the difference of quantity of serum..

Linearity of oleic acid ($y = 2.1398x - 13.238$, $R^2 = 0.9996$) and MA ($y = 0.0277x + 0.5458$, $R^2 = 0.9901$).

MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid.

Table 1 Kind of fatty acids measured in human

	Kind of fatty acid	C:D
1	Lauric acid	12:0
2	Myristic acid	14:0
3	Myristoleic acid	14:1
4	Palmitic acid	16:0
5	Palmitoleic acid	16:1
6	Stearic acid	18:0
7	Oleic acid	18:1
8	Linoleic acid	18:2
9	γ -linolenic acid	18:3
10	α -linolenic acid	18:3
11	Arachidic acid	20:0
12	Eicosenoic acid	20:1
13	Eicosadienoic acid	20:2
14	cis-5,8,11-Eicosatrienoic acid	20:3
15	Dihomo- γ -linolenic acid	20:3
16	Arachidonic acid	20:4
17	Eicosapentaenoic acid	20:5
18	Behenic acid	22:0
19	Erucic acid	22:1
20	Docosatetraenoic acid	22:4
21	Docosapentaenoic acid	22:5
22	Lignoceric acid	24:0
23	Docosahexaenoic acid	22:6
24	Nervonic acid	24:1

C: the number of carbon atoms in the fatty acid, D: the number of double bonds in the fatty acid

Table 2 Dilute concentration of each fatty acid for making calibration curve by 37 fatty acid methyl mixture

Kind of fatty acid methyl ester	C:D	Diluted concentrations of fatty acid standard					
		1	2.5	5	50	500	5000
Butyric acid	4:0	1000	400	200	20	2	0.2
Caproic acid	6:0	1000	400	200	20	2	0.2
Caprylic acid	8:0	1000	400	200	20	2	0.2
Capric acid	10:0	1000	400	200	20	2	0.2
Undecanoic acid	11:0	500	200	100	10	1	0.1
Lauric acid	12:0	1000	400	200	20	2	0.2
Tridecanoic acid	13:0	500	200	100	10	1	0.1
Myristic acid	14:0	1000	400	200	20	2	0.2
Myristoleic acid	14:1	500	200	100	10	1	0.1
Pentadecanoic acid	15:0	500	200	100	10	1	0.1
cis-10 Pentadecenoic acid	15:1	500	200	100	10	1	0.1
Palmitic acid	16:0	1500	600	300	30	3	0.3
Palmitoleic acid	16:1	500	200	100	10	1	0.1
Heptadecanoic acid	17:0	500	200	100	10	1	0.1
cis-10 Heptadecenoic acid	17:1	500	200	100	10	1	0.1
Stearic acid	18:0	1000	400	200	20	2	0.2
Elaidic acid	18:1	500	200	100	10	1	0.1
Oleic acid	18:1	1000	400	200	20	2	0.2
Linolelaidic acid	18:2	500	200	100	10	1	0.1
Linoleic acid	18:2	500	200	100	10	1	0.1
Arachidic acid	20:0	1000	400	200	20	2	0.2
γ -linolenic acid	18:3	500	200	100	10	1	0.1
Eicosenoic acid	20:1	500	200	100	10	1	0.1
α -linolenic acid	18:3	500	200	100	10	1	0.1
Heneicosanoic acid	21:0	500	200	100	10	1	0.1
cis-11,14-Eicosadienoic acid	20:2	500	200	100	10	1	0.1
Behenic acid	22:0	1000	400	200	20	2	0.2
Dihomo- γ -linolenic acid	20:3	500	200	100	10	1	0.1
Erucic acid	22:1	500	200	100	10	1	0.1
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid	20:3	500	200	100	10	1	0.1
Tricosanoic acid	23:0	500	200	100	10	1	0.1
Arachidonic acid	20:4	500	200	100	10	1	0.1
cis-13,16-Docosadienoic acid	22:2	500	200	100	10	1	0.1
Lignoceric acid	24:0	1000	400	200	20	2	0.2
Eicosapentaenoic acid	20:5	500	200	100	10	1	0.1
Nervonic acid	24:1	500	200	100	10	1	0.1
Docosahexaenoic acid	22:6	500	200	100	10	1	0.1

C: the number of carbon atoms in the fatty acid, D: the number of double bonds in the fatty acid, FAME: fatty acid methyl ester, Fatty acid concentrations are expressed as $\mu\text{g/mL}$

Table 3 Dilute concentration of each fatty acid for making calibration curve by three types of fatty acid methyl

Kind of fatty acid methyl ester	C:D	Diluted concentrations of fatty acid standard				
		1	10	100	1000	10000
cis-5,8,11-Eicosatrienoic acid	20:3	100	10	1	0.1	0.01
Docosapentaenoic acid	22:5	1000	100	10	1	0.1
Docosatetraenoic acid	22:4	1000	100	10	1	0.1

C: the number of carbon atoms in the fatty acid, D: the number of double bonds in the fatty acid, FAME: fatty acid methyl ester, Fatty acid concentrations are expressed as $\mu\text{g/mL}$

Table 4 Fatty acid concentrations measured by the differing amounts of serum

Kind of fatty acid	Amount of serum (μL)			
	25	50	100	200
Total fatty acid	399.6 \pm 3.3	853.7 \pm 1.0	1807.2 \pm 13.0	3599.5 \pm 92.8
Total SFA	126.0 \pm 1.1	277.3 \pm 0.9	592.9 \pm 3.6	1168.3 \pm 29.2
Palmitic acid	39.7 \pm 0.8	94.2 \pm 0.6	205.9 \pm 1.4	415.3 \pm 11.0
Stearic acid	86.3 \pm 0.6	183.1 \pm 0.4	387.0 \pm 2.8	753.1 \pm 18.2
Total MUFA	38.0 \pm 0.5	93.2 \pm 0.6	211.7 \pm 1.6	434.3 \pm 10.6
Palmitoleic acid	ND	ND	6.2 \pm 0.5	21.5 \pm 0.7
Oleic acid	38.0 \pm 0.5	93.2 \pm 0.6	205.5 \pm 1.7	412.7 \pm 10.3
Total PUFA	235.6 \pm 2.3	483.1 \pm 1.5	1002.6 \pm 8.0	1996.9 \pm 53.7
Total n-3 fatty acid	54.2 \pm 0.7	94.0 \pm 1.8	181.8 \pm 1.8	352.7 \pm 8.7
α -linolenate acid	ND	ND	22.0 \pm 0.4	27.2 \pm 1.2
Eicosapentaenoic acid	ND	ND	12.3 \pm 0.3	39.8 \pm 2.0
Docosapentaenoic acid	23.7 \pm 0.3	32.5 \pm 0.5	48.1 \pm 0.8	76.9 \pm 2.6
Docosahexaenoic acid	12.2 \pm 0.6	41.3 \pm 0.5	99.4 \pm 1.5	208.7 \pm 4.4
Total n-6 fatty acid	180.4 \pm 1.7	387.2 \pm 1.0	817.2 \pm 6.0	1638.2 \pm 45.2
Linoleic acid	82.9 \pm 0.3	182.3 \pm 0.9	383.8 \pm 2.4	768.4 \pm 19.3
DGLA	ND	ND	7.4 \pm 0.3	25.8 \pm 1.6
Arachidonic acid	81.8 \pm 1.1	185.1 \pm 0.5	398.5 \pm 3.9	802.3 \pm 25.1
Docosatetraenoic acid	15.7 \pm 1.2	19.8 \pm 1.1	27.5 \pm 1.6	41.7 \pm 2.2
Total n-9 fatty acid	39.0 \pm 0.6	95.2 \pm 0.6	209.1 \pm 1.9	418.7 \pm 10.3
MA	1.0 \pm 0.1	2.0 \pm 0.2	3.6 \pm 0.3	6.0 \pm 0.2

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid, MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA, ND: not detected, Fatty acid concentrations are expressed as $\mu\text{g}/\text{mL}$, Data are expressed as mean \pm standard deviation

Table 5 The correlation coefficient of the measured values from the current measurement method and the conventional method

Kind of fatty acid	coefficient of correlation
SFA	
Palmitic acid	0.996
Stearic acid	0.998
MUFA	
Palmitoleic acid	0.875
Oleic acid	0.909
PUFA	
n-3 fatty acid	
α -linolenate acid	1.000
Eicosapentaenoic acid	0.999
Docosapentaenoic acid	1.000
Docosahexaenoic acid	0.978
n-6 fatty acid	
Linoleic acid	0.999
DGLA	1.000
Arachidonic acid	0.999
Docosatetraenoic acid	1.000
n-9 fatty acid	
MA	1.000

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid, MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid

Table 6 Within-run reproducibility of the serum fatty acid concentration

Kind of fatty acid	Within-run reproducibility		
	Mean	SD	CV
Total fatty acid	3683.1	73.8	2.0
Total SFA	1209.0	28.0	2.3
Palmitic acid	423.5	8.5	2.0
Stearic acid	785.5	19.6	2.5
Total MUFA	448.1	9.4	2.1
Palmitoleic acid	22.2	0.8	3.7
Oleic acid	425.9	9.1	2.1
Total PUFA	2026.0	38.0	1.9
Total n-3 fatty acid	354.5	6.8	1.9
α -linolenate acid	26.3	0.4	1.5
Eicosapentaenoic acid	39.9	2.2	5.4
Docosapentaenoic acid	78.1	1.5	1.9
Docosahexaenoic acid	210.2	4.2	2.0
Total n-6 fatty acid	1665.4	31.5	1.9
Linoleic acid	780.8	15.3	2.0
DGLA	26.6	1.2	4.5
Arachidonic acid	814.6	14.3	1.8
Docosatetraenoic acid	43.4	1.9	4.3
Total n-9 fatty acid	432.0	9.4	2.2
MA	6.1	0.4	7.2

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid, MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA, SD: standard deviation, CV: coefficient of variance, Fatty acid concentrations are expressed as $\mu\text{g/mL}$

Table 7 Between-run repeatability of the serum fatty acid concentration

Kind of fatty acid	Between-run reproducibility		
	Mean	SD	CV
Total fatty acid	3613.0	64.4	1.8
Total SFA	1175.3	30.7	2.6
Palmitic acid	416.1	7.0	1.7
Stearic acid	759.2	23.8	3.1
Total MUFA	437.6	9.3	2.1
Palmitoleic acid	21.9	0.4	1.6
Oleic acid	415.7	9.0	2.2
Total PUFA	2000.1	24.5	1.2
Total n-3 fatty acid	353.2	1.2	0.3
α -linolenate acid	26.7	0.5	1.7
Eicosapentaenoic acid	39.9	0.1	0.2
Docosapentaenoic acid	77.3	0.7	0.9
Docosahexaenoic acid	209.3	0.8	0.4
Total n-6 fatty acid	1640.8	23.5	1.4
Linoleic acid	769.5	10.8	1.4
DGLA	26.2	0.4	1.6
Arachidonic acid	802.6	11.8	1.5
Docosatetraenoic acid	42.5	0.9	2.1
Total n-9 fatty acid	421.8	9.0	2.1
MA	6.1	0.2	2.8

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid, MA: 5, 8, 11-eicosatrienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA, SD: standard deviation, CV: coefficient of variance, Fatty acid concentrations are expressed as $\mu\text{g/mL}$

Table 8 Measurement values due to the difference in the examiner of A, B and C

Kind of fatty acid	Examiner		
	A	B	C
Total fatty acid	3775.8 ± 189.4	3739.1 ± 218.7	3520.8 ± 193.8
Total SFA	1123.2 ± 66.1	1103.3 ± 76.0	1042.0 ± 65.3
Palmitic acid	497.6 ± 24.3	487.8 ± 22.8	459.3 ± 24.0
Stearic acid	621.1 ± 42.2	608.8 ± 49.3	578.7 ± 41.4
Total MUFA	499.1 ± 28.4	494.7 ± 30.5	468.0 ± 35.4
Palmitoleic acid	13.6 ± 1.3	13.6 ± 1.8	12.0 ± 0.8
Oleic acid	480.8 ± 27.1	473.7 ± 28.0	450.4 ± 33.3
Total PUFA	2153.5 ± 95.7	2141.2 ± 112.7	2010.8 ± 93.5
Total n-3 FA	391.0 ± 11.2	390.6 ± 18.5	365.7 ± 10.4
α-linolenate acid	8.0 ± 3.9	9.4 ± 4.7	8.7 ± 2.2
Eicosapentaenoic acid	115.6 ± 7.4	114.4 ± 4.4	106.7 ± 5.4
Docosapentaenoic acid	18.4 ± 0.8	19.6 ± 2.1	19.4 ± 1.8
Docosahexaenoic acid	248.9 ± 7.7	247.1 ± 11.9	230.8 ± 6.8
Total n-6 FA	1759.8 ± 86.0	1748.1 ± 93.7	1642.4 ± 84.2
Linoleic acid	1128.5 ± 57.5	1116.4 ± 59.4	1043.3 ± 59.0
DGLA	43.6 ± 2.0	45.4 ± 2.7	43.8 ± 4.5
Arachidonic acid	569.9 ± 27.2	567.6 ± 32.3	534.4 ± 23.5
Docosatetraenoic acid	4.8 ± 0.7	5.0 ± 1.5	5.0 ± 1.6
Total n-9 FA	485.8 ± 26.9	478.9 ± 28.1	455.9 ± 33.8
MA	2.7 ± 0.2	2.5 ± 0.5	2.7 ± 0.3

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid,
 PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid,
 MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA
 Fatty acid concentrations are expressed as µg/mL,
 Data are expressed as mean ± standard deviation

第 3 章 犬の血清中脂肪酸を測定するための採血時点についての検討

ヒトの血中脂肪酸組成は摂食により変動するために、その測定のための採血は早朝空腹時に行われている。しかしながら、犬の血清中脂肪酸組成において摂食後の変動についての報告はなく、適切な採血のタイミングは明らかでない。そのため、犬の血清中脂肪酸組成を測定するための最適な採血時点を決めるために健常犬における血中脂肪酸の日内変動を調査した。

1 材料と方法

1) 供試動物

日本獣医生命科学大学、獣医内科学研究室で飼育管理され、一般身体検査、完全血球算定(CBC)および血液生化学検査に明らかな異常がない雄ビーグル 6 頭(年齢: 3.9 ± 0.2 歳, 体重: 10.2 ± 0.5 kg)を用いた。すべての犬は、犬用総合栄養フード(プロステージポーク & ライス; イースター株式会社, 兵庫)を 2 カ月以上継続給与した後を用いた。このフードの栄養組成は Table 1 に示した。1 日当たりの給与カロリーは $1.8 \times 70 \times \text{体重(kg)}^{0.75}$ の計算式²⁸から求めた。フードは毎日 7 時と 19 時の定時に与え、摂水は自由飲水とした。供試犬はケージ内で単頭飼育され、照明の点灯時間は 7 時から 19 時までの 12 時間とした。

本研究の実験手順および動物の管理取扱いについては、日本獣医生命科学大学動物実験ガイドラインに従い、動物実験委員会および動物実験に関わる生命倫理審査委員会の承認を得た(27-S11)。

2) 血清検体

採血は無麻酔下で頸静脈から行い、採血の時間は、午前 7 時の給餌

前を Pre とし、その後 3 時間毎(3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h)に 24 時間まで行った。12h の採血は夕食を与える直前に行った。採取された血液は 30 分間室温で静置した後、3000rpm で 15 分間遠心し、得られた血清は測定まで-20℃で凍結保存した。

3) 血清中脂肪酸濃度の測定と重量比の算出

脂肪酸濃度の測定は第 2 章に記した方法で行った。脂肪酸の重量比は、定量した脂肪酸濃度の合計から各脂肪酸の百分比として求めた。

4) 血清中のトリグリセリド(TG)と総コレステロール(T-Cho)の測定

TG と T-Cho の測定は、富士ドライケム 7000V(富士フイルムメディカル株式会社, 東京)で行った。

5) フード中の脂肪酸濃度の測定

供試フードは、初めに乳鉢と乳棒を用いて粉末にした。次に粉砕したフードを減圧デシケーターにより乾燥した後に 5 つに分け、それらから 25mg ずつを秤量し、試料とした。これらの試料は共栓試験管に移し、ペンタデカン酸溶液 200 μ L を加えた後に、脂肪酸メチル化キットとメチル化脂肪酸精製キットを用いて処理を行った。フード中脂肪酸の測定は血清と同様に行った。それらの脂肪酸濃度は、フード 1g 当たりの濃度として求めた。

6) 統計学的処理

血清中の脂肪酸の濃度と重量比は、平均 \pm 標準偏差で示した。統計学的処理は、統計処理ソフト SPSS[®] (Ver.15.0J for Windows, International Business Machines Corporation) を用いた。各時点間の比較は、一元配置分散分析により行い、有意差を認めた脂肪酸はさらに *Dunnnett* の方法を用いて Pre との間で多重比較を行った。危険率は 5% 未満をもって有意とした。

2 結果

1) 血清中脂肪酸濃度

血清中脂肪酸濃度は Table 2 に示した。Pre の総飽和脂肪酸(SFA)は、837.6 $\mu\text{g/mL}$ とすべての総 SFA 測定値の中で最低値であり、最高値は 3h の 1078.9 $\mu\text{g/L}$ であった。しかし、Pre との間にはいずれの時点も有意な差は認めなかった。SFA であるパルミチン酸とステアリン酸も Pre と比較していずれの時点にも有意な差は認めなかった。Pre の総一価不飽和脂肪酸(MUFA)は 394.3 $\mu\text{g/mL}$ であったが、3h(597.7 $\mu\text{g/mL}$)では有意($P < 0.05$)に上昇し、その値は最高値であった。しかし、3h 以後は徐々に低下し、それ以後は Pre との間には有意な差を認めなかった。オレイン酸は、Pre(367.3 $\mu\text{g/mL}$)と比較して、3h(556.5 $\mu\text{g/mL}$)において有意($P < 0.05$)な上昇を認めたが、Pre との間には 3h 以後は有意な差を認めなかった。しかし、いずれの時点においてもパルミトレイン酸は Pre との間には有意な差を認めなかった。

Pre の総 PUFA は 1542.2 $\mu\text{g/mL}$ であったが、いずれの時点においても Pre との間には有意な差は認められなかった。そして、総 n-3 脂肪酸もいずれの時点においても Pre との間には有意な差を認めなかった。n-3 脂肪酸のうち 3h の α -リノレン酸(ALA)(24.8 $\mu\text{g/mL}$)は Pre(12.2 $\mu\text{g/mL}$)よりも有意($P < 0.05$)に増加したが、それ以後の時点は Pre の間に有意な差を認めなかった。その他の n-3 脂肪酸は、Pre との間にはいずれの採血時点においても有意な差を認めなかった。総 n-6 脂肪酸の Pre は、1244.0 $\mu\text{g/mL}$ であったが、すべての時点で測定値は類似し、Pre との間には有意な差は認めなかった。各 n-6 脂肪酸も Pre と比較していずれの時点においても有意な差は認められなかった。総 n-9 脂肪酸は、オレイン酸と 5,8,11-エイコサトリエン酸(MA)の和として求めた。

総 n-9 脂肪酸の Pre は、376.7 µg/mL であったが、3h では 568.3 µg/mL と有意($P < 0.05$)な上昇を認めた。しかし、それ以後は Pre との間に有意な差は認めなかった。MA は、いずれの時点においても Pre との間にも有意な差を認めなかった。いずれの脂肪酸においても、夕食後の時点における各脂肪酸濃度は、Pre との間に有意な差を一切認めなかった。

2) 血清中脂肪酸重量比

血清中脂肪酸の重量比の日内変動は、Table 3 に示した。総 SFA の Pre(31.12%)は、他の採血時点との間に有意な差を認めなかった。パルミチン酸とステアリン酸は、いずれの時点においても Pre との間に有意差を認めなかった。Pre の総 MUFA(14.07%)は、すべての時点の測定値は Pre と類似しており、有意な差を認めなかった。オレイン酸とパルミトレイン酸も Pre との間に有意な差を認めた時点はなかった。Pre の総 PUFA(54.81%)は、すべての時点と比較して有意な差は認めなかった。総 n-3 脂肪酸はいずれの時点においても Pre(10.37%)との間に有意な差を認めなかった。しかし、n-3 脂肪酸のうちエイコサペンタエン酸(EPA)は、Pre(3.02%)よりも、3h(2.70%)と 6h(2.78%)では有意($P < 0.05$)に減少したが、それ以後は Pre との間に有意な差を認めなかった。また、Pre のドコサペンタエン酸(DPA)(0.85%)に比べ、3h(0.71%)は有意($P < 0.05$)に減少したが、それ以後は Pre との間にすべての時点で有意な差を認めなかった。ドコサヘキサエン酸(DHA)は、いずれの時点においても Pre(0.33%)との間に有意な差を認めなかった。Pre の総 n-6 脂肪酸は 44.24%であったが、3h(41.47%)と 6h(42.68%)は Pre よりも有意($P < 0.05$)に低下した。しかし、9h 以後の総 n-6 脂肪酸の測定値は、Pre との間に有意な差は認めず類似した

値であった。リノール酸(LA)、ジホモ- γ -リノレン酸(DGLA)、アラキドン酸(AA)およびドコサテトラエン酸(DTA)は、すべての時点の測定値が Pre(それぞれ 26.08%, 1.58%, 15.68%そして 0.33%)と類似した値であり、Pre との間に有意な差を認めなかった。Pre の総 n-9 脂肪酸は 13.53%であったが、3h では 16.75%と有意($P < 0.05$)に上昇した。しかし、それ以後の総 n-9 脂肪酸は、いずれの時点においても Pre との間に有意な差を認めなかった。Pre の MA は 0.20%であったが、いずれの時点の測定値も類似した値であり、Pre との間に有意な差を認めなかった。すべての脂肪酸の重量比は、濃度と同様に夕食後には有意な差を一切認めなかった。

3) 血清中の TG および T-Cho の濃度

TG と T-Cho の結果は Table 4 に示した。Pre の TG(33.7mg/dL)に比べ 3h(90.7mg/dL)と 6h(72.8mg/dL)はともに有意($P < 0.05$)に増加したが、9h 以後は Pre との間に有意な差は認めなかった。一方の T-Cho は、いずれの時点の値も Pre(109.0mg/dL)と類似しており、すべての時点においても Pre との間に有意な差は認めなかった。脂肪酸と同様に、TG と T-Cho は、夕食後には有意な差を一切認めなかった。

4) フード中の脂肪酸濃度

フード中の脂肪酸濃度は Table 5 に示した。本研究で用いたフード中の総脂肪酸濃度は、81mg/g であった。そのうち、総 SFA は 26.4mg/g であり、その中でもパルミチン酸とステアリン酸の含有量はそれぞれ 16.3mg/g と 8.2mg/g であった。総 MUFA は 36.6mg/g であり、その中ではパルミトレイン酸とオレイン酸がそれぞれ 2.1mg/g と 33.6mg/g であった。総 PUFA(18.1mg/g)のうち総 n-3 脂肪酸は 3.9mg/g であった。その中の ALA は 2.8mg/g であり、n-3 脂肪酸の中では最も含有量

が多く、EPA、DPA そして DHA はそれぞれ 0.4mg/g、0.1mg/g そし
て 0.6mg/g であった。そして、総 n-6 脂肪酸は 14.2mg/g であり、LA、
DGLA、AA および DTA は、それぞれ 13.0mg/g、0.4mg/g、0.2mg/g
そして 0.0mg/g であった。総 n-9 脂肪酸は、MUFA であるオレイン酸
と PUFA である MA の和から求めた結果、34.2mg/g であった。

3 考察

The Association of American Feed Control Officials(AAFCO)の基準によると、健康な成犬用のフードにおける脂肪の最低含量は、乾物量 5%以上、LA は 1%以上であるべきとしている^{29,30}。本研究に用いたフードの脂肪酸含有量は、乾物量が 11%以上であり、LA は 1.3%含まれていたことから、AAFCO による脂質の基準を満たす成犬用フードであることが確認できた。

血清中脂肪酸濃度は、午前の給餌後 3h までに急増するが、その後の 9h までには給餌前と同程度の数値となった。また、血清中脂肪酸の重量比も濃度の変動と同様の経過をたどった。血清中の遊離脂肪酸の経時変化は、血中のインスリン濃度の変動と負の相関関係を認め、インスリンはグルコースの細胞内への取り込みを促進し、脂質の血清中へ放出を抑制する^{31,32}。犬では、午後の給餌後は午前の給餌後に比べインスリンの血中濃度が高値となることが報告されている³³。また、インスリンの分泌は交感神経の活性化によって抑制されるが、犬では明期に交感神経が優位となり、暗期には副交感神経が優位となる³⁴ことから、本研究における血清中脂肪酸濃度の変動の違いは、明期と暗期の違いによる交感神経の優位性にともなうインスリン分泌量の違いが関連すること推察された。

血清中の TG 分画は、コレステロール分画に比べパルミチン酸、ステアリン酸そしてオレイン酸を多く含む。それに対してコレステロール分画は、LA、AA、EPA そして DHA といった脂肪酸カスケードの下位に位置する PUFA を多く含む³⁵。本研究に用いたフードにはオレイン酸を最も多く含み、次いでパルミチン酸を含有していた。それらの 3h の血清中濃度は最も高値であり、Pre に比べ有意に上昇していた。

同一のフードを長期間継続して給餌すると、食後のコレステロールの変動は食前の15%以内であるが、SFAの一時的な過剰摂取は、給餌後のT-Cholを15%から25%上昇させる³⁶。それに対して不飽和脂肪酸の摂取量を増加すると、T-Cholは給餌前よりも食後の方が僅かに低下する³⁶ことが知られている。これらのことから、本研究におけるTGの変化にはオレイン酸やパルミチン酸が最も影響し、T-Cholの変動にはPUFAであるEPA、DPA、DHA、DTAそしてMAの変化が影響していたと考えられる。しかしながら、日常与えているフードを異なる種類に変更した直後、あるいは副食の摂取により、T-Cholは食後に有意な増加を示す可能性がある。そのため、血清中脂肪酸の測定には、採血前に最近の主食の変更や副食の給餌について確認すべきである。

3hでPreと有意な差があった種類は、ALA濃度とEPAとDPAの重量比であった。また、6hでは総MUFAの濃度およびEPAと総n-6脂肪酸の重量比であった。それらの測定値は、9h以降にはPreとの間に有意な差を認めなかった。これらのことから、1日に2食を給餌している犬において血清中脂肪酸の測定のための採血時点は、午前の給餌前あるいはその9時間以後が適当であると判断した。

4 小括

血清中脂肪酸の濃度と重量比の評価に適した採血時点を決定するために、血清中脂肪酸の日内変化を調査した。脂肪酸の濃度は、3h では MUFA のオレイン酸そして n-3 脂肪酸の ALA が有意 ($P < 0.05$) に高値となった。しかし、それらの 6h における濃度は、Pre との間に有意差を認めなかった。一方の重量比では、3h において、総 n-9 脂肪酸は Pre よりも有意 ($P < 0.05$) に高値であり、n-3 脂肪酸である EPA と DPA と総 n-6 脂肪酸は、給餌前と比較して有意 ($P < 0.05$) に低値であった。さらに、6h には EPA と総 n-6 脂肪酸が有意 ($P < 0.05$) に低値であった。しかしながら、いずれの種類 of 脂肪酸においても、その濃度と重量比は、9h には Pre との間に有意差を認めなかった。

これらのことから、1 日に 2 食を給餌している犬の場合には、血清中脂肪酸の測定のための採血時点は、午前の給餌前あるいはその 9 時間以後が適当であると判断した。

Table 1 Nutritional composition of the dog food

Nutrient	Content
Crude protein (%)	24.0 \leq
Crude fat (%)	11.0 \leq
Crude fiber (%)	\leq 4.0
Crude ash (%)	\leq 8.5
Moisture (%)	\leq 10.0
Calcium (%)	0.9 \leq
Phosphorus (%)	0.7 \leq
Sodium (%)	0.2 \leq
Vitamin A (IU/kg)	12000 \leq
Vitamin D (IU/kg)	1100 \leq
Vitamin E (IU/kg)	150 \leq
Vitamin B1 (mg/kg)	3.0 \leq
Vitamin B2 (mg/kg)	5.0 \leq
Metabolic energy (kcal/100g)	350 \leq

Table 2 Diurnal variation of serum fatty acid concentrations in the healthy dogs

Kind of fatty acid	Blood sampling time from feeding (hours)										
	Pre	3	6	9	12	15	18	21	24		
Total fatty acid	2810.1 ± 361.5	3391.3 ± 629.0	3258.4 ± 381.7	3144.4 ± 474.9	2854.2 ± 544.1	3026.3 ± 616.2	2932.2 ± 385.5	2870.8 ± 453.8	2977.2 ± 432.6		
Total SFA	873.6 ± 112.1	1078.9 ± 199.8	1033.7 ± 115.5	976.7 ± 150.3	918.1 ± 177.3	968.7 ± 184.5	930.4 ± 136.4	900.3 ± 126.0	933.8 ± 114.1		
Palmitic acid	378.2 ± 49.8	500.2 ± 101.1	474.4 ± 54.5	436.9 ± 62.0	402.5 ± 73.0	427.5 ± 88.7	415.9 ± 59.7	401.5 ± 54.9	411.3 ± 51.0		
Stearic acid	485.3 ± 61.5	559.6 ± 97.1	542.0 ± 65.7	527.4 ± 91.0	504.4 ± 103.0	528.0 ± 94.1	502.0 ± 77.0	488.8 ± 69.6	511.3 ± 65.2		
Total MUFA	394.3 ± 43.0	597.7 ± 146.0*	532.8 ± 83.6*	466.2 ± 65.4	420.7 ± 69.9	448.7 ± 119.1	431.4 ± 70.5	409.5 ± 69.6	417.0 ± 57.1		
Palmitoleic acid	20.6 ± 4.6	31.5 ± 7.6	28.0 ± 4.6	24.0 ± 2.9	24.1 ± 7.3	23.5 ± 6.1	21.9 ± 3.5	20.6 ± 5.7	23.1 ± 7.5		
Oleic acid	367.3 ± 43.8	556.5 ± 138.9*	496.4 ± 80.7	434.7 ± 66.2	390.4 ± 66.4	417.6 ± 113.3	402.4 ± 67.9	382.9 ± 65.6	387.1 ± 52.6		
Total PUFA	1542.2 ± 230.8	1714.7 ± 306.1	1691.9 ± 241.1	1701.5 ± 267.1	1615.5 ± 300.9	1608.9 ± 330.3	1570.3 ± 184.9	1560.9 ± 263.5	1626.5 ± 282.7		
Total n-3 FA	292.8 ± 67.5	308.0 ± 69.4	294.1 ± 47.6	291.4 ± 58.1	294.4 ± 76.0	304.4 ± 75.1	283.7 ± 60.1	281.1 ± 62.2	306.7 ± 60.5		
α-linolenate acid	12.2 ± 5.0	24.8 ± 9.6*	20.9 ± 6.0	16.7 ± 5.6	13.8 ± 6.0	15.6 ± 9.5	15.2 ± 6.0	13.6 ± 5.9	13.4 ± 5.0		
Eicosapentaenoic acid	85.1 ± 14.5	91.9 ± 20.4	90.9 ± 15.6	93.5 ± 21.2	90.2 ± 21.0	89.6 ± 22.6	88.0 ± 15.5	87.3 ± 18.6	91.4 ± 19.7		
Docosapentaenoic acid	24.0 ± 5.3	23.7 ± 3.9	23.1 ± 3.3	23.5 ± 4.6	25.5 ± 5.1	26.2 ± 3.1	23.2 ± 3.6	23.2 ± 3.4	26.7 ± 4.7		
Docosahexaenoic acid	171.5 ± 51.7	167.5 ± 39.9	159.1 ± 28.6	157.7 ± 31.0	164.9 ± 46.4	173.0 ± 43.8	157.2 ± 37.5	156.9 ± 38.1	175.2 ± 36.0		
Total n-6 FA	1244.0 ± 173.1	1401.0 ± 239.1	1392.1 ± 198.0	1404.1 ± 212.3	1314.9 ± 227.4	1298.7 ± 258.4	1281.0 ± 128.5	1274.5 ± 204.7	1313.9 ± 229.6		
Linoleic acid	736.2 ± 152.2	869.1 ± 212.5	861.9 ± 169.9	870.2 ± 176.8	795.4 ± 174.9	783.4 ± 215.3	782.0 ± 119.6	780.6 ± 173.3	785.8 ± 187.8		
DGLA	44.7 ± 11.4	47.7 ± 10.5	47.2 ± 10.1	46.1 ± 12.1	46.2 ± 12.4	47.7 ± 12.8	44.8 ± 10.3	43.4 ± 9.9	47.1 ± 11.6		
Arachidonic acid	438.0 ± 55.3	458.2 ± 47.5	458.5 ± 59.3	463.3 ± 43.2	448.3 ± 61.5	443.3 ± 51.2	431.3 ± 37.6	427.2 ± 39.4	455.0 ± 60.2		
Docosatetraenoic acid	9.1 ± 1.6	9.4 ± 1.6	8.9 ± 1.4	8.9 ± 1.2	9.6 ± 1.1	9.1 ± 2.0	8.2 ± 1.6	8.2 ± 1.0	9.4 ± 1.5		
Total n-9 FA	376.7 ± 44.0	568.3 ± 138.6*	507.6 ± 80.1*	444.8 ± 65.5	399.7 ± 66.1	427.9 ± 112.4	412.1 ± 67.2	391.5 ± 65.2	396.8 ± 51.7		
MA	5.4 ± 1.6	5.7 ± 2.0	5.7 ± 2.4	6.1 ± 2.3	6.1 ± 2.1	5.8 ± 2.1	5.5 ± 1.7	5.4 ± 1.4	5.9 ± 1.9		

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid, MA: 5, 8, 11-eicosatrienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA,

Fatty acid concentrations are expressed as µg/mL, Data are expressed as mean ± standard deviation, *: Significantly different from Pre ($P < 0.05$)

Table 3 Diurnal variation of serum fatty acid weight ratios in the healthy dogs

Kind of fatty acid	Blood sampling time from feeding (hours)								
	Pre	3	6	9	12	15	18	21	24
Total SFA	31.12 ± 1.80	31.83 ± 1.09	31.76 ± 1.31	31.05 ± 0.19	31.04 ± 0.60	32.12 ± 1.75	31.69 ± 0.97	31.46 ± 1.26	31.50 ± 2.16
Palmitic acid	13.47 ± 0.97	14.73 ± 1.01	14.59 ± 1.05	13.92 ± 0.51	13.64 ± 0.44	14.14 ± 0.86	14.17 ± 0.56	14.04 ± 0.58	13.89 ± 1.15
Stearic acid	17.28 ± 0.90	16.55 ± 0.74	16.63 ± 0.60	16.73 ± 0.57	17.02 ± 0.53	17.54 ± 1.14	17.09 ± 0.66	17.08 ± 0.78	17.23 ± 1.06
Total MUFA	14.07 ± 0.84	17.50 ± 1.87	16.39 ± 2.22	14.88 ± 0.98	14.29 ± 0.68	14.73 ± 1.43	14.67 ± 0.79	14.25 ± 0.70	14.05 ± 0.94
Palmitoleic acid	0.74 ± 0.19	0.93 ± 0.12	0.86 ± 0.12	0.78 ± 0.16	0.83 ± 0.26	0.77 ± 0.12	0.75 ± 0.09	0.71 ± 0.16	0.78 ± 0.22
Oleic acid	13.10 ± 0.89	16.28 ± 1.88	15.27 ± 2.14	13.86 ± 0.99	13.25 ± 0.62	13.70 ± 1.41	13.68 ± 0.82	13.32 ± 0.65	13.04 ± 0.86
Total PUFA	54.81 ± 2.45	50.68 ± 2.64	51.85 ± 3.12	54.07 ± 1.00	54.67 ± 0.78	53.15 ± 2.10	53.64 ± 1.08	54.29 ± 0.93	54.45 ± 2.63
Total n-3 FA	10.37 ± 1.58	9.03 ± 0.46	8.99 ± 0.50	9.22 ± 0.60	9.86 ± 0.90	9.99 ± 0.45	9.60 ± 0.86	9.72 ± 0.75	10.25 ± 0.77
α -linolenic acid	0.43 ± 0.12	0.71 ± 0.18	0.64 ± 0.15	0.52 ± 0.12	0.46 ± 0.14	0.49 ± 0.20	0.51 ± 0.14	0.46 ± 0.15	0.44 ± 0.11
Eicosapentaenoic acid	3.02 ± 0.18	2.70 ± 0.17*	2.78 ± 0.19*	2.95 ± 0.26	3.03 ± 0.21	2.94 ± 0.23	2.99 ± 0.17	3.02 ± 0.19	3.04 ± 0.29
Docosapentaenoic acid	0.85 ± 0.17	0.71 ± 0.13*	0.72 ± 0.13	0.75 ± 0.14	0.87 ± 0.12	0.89 ± 0.19	0.80 ± 0.11	0.83 ± 0.20	0.91 ± 0.21
Docosahexaenoic acid	6.07 ± 1.53	4.91 ± 0.39	4.86 ± 0.39	4.99 ± 0.34	5.50 ± 0.64	5.67 ± 0.30	5.31 ± 0.64	5.41 ± 0.54	5.85 ± 0.52
Total n-6 FA	44.24 ± 1.48	41.47 ± 2.47*	42.68 ± 2.92*	44.65 ± 1.03	44.59 ± 0.80	42.95 ± 2.09	43.85 ± 1.58	44.38 ± 1.03	44.00 ± 2.66
Linoleic acid	26.08 ± 3.01	25.44 ± 2.34	26.27 ± 2.65	27.49 ± 1.57	26.78 ± 1.54	25.58 ± 2.60	26.64 ± 1.52	26.96 ± 2.21	26.13 ± 3.33
DGLA	1.58 ± 0.32	1.42 ± 0.30	1.45 ± 0.29	1.45 ± 0.31	1.56 ± 0.32	1.58 ± 0.37	1.52 ± 0.27	1.52 ± 0.33	1.58 ± 0.34
Arachidonic acid	15.68 ± 2.01	13.82 ± 2.32	14.20 ± 2.20	14.91 ± 1.77	15.38 ± 1.90	14.97 ± 2.29	14.89 ± 2.08	15.09 ± 1.85	15.41 ± 1.96
Docosatetraenoic acid	0.33 ± 0.07	0.29 ± 0.10	0.28 ± 0.06	0.29 ± 0.04	0.33 ± 0.05	0.31 ± 0.09	0.28 ± 0.07	0.29 ± 0.05	0.32 ± 0.07
Total n-9 FA	13.53 ± 0.94	16.75 ± 1.83*	15.71 ± 2.14	14.30 ± 0.99	13.68 ± 0.69	14.16 ± 1.36	14.12 ± 0.78	13.73 ± 0.63	13.48 ± 0.87
MA	0.20 ± 0.07	0.18 ± 0.10	0.18 ± 0.09	0.20 ± 0.10	0.22 ± 0.10	0.21 ± 0.10	0.19 ± 0.08	0.19 ± 0.07	0.20 ± 0.08

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid,

DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid, MA: 5, 8, 11-eicosatrienoic acid,

Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA,

Fatty acid weight ratios are expressed as %,

Data are expressed as mean \pm standard deviation,

*: Significantly different from Pre ($P < 0.05$)

Table 4 Diurnal variation of fat marker in serum of the healthy dogs

Blood sampling time(hours)	Fat marker	
	TG (mg/dl)	T-Cho (mg/dl)
Pre	33.7 ± 8.5	109.0 ± 22.6
3	90.7 ± 36.3*	112.2 ± 27.6
6	72.8 ± 17.4*	107.2 ± 25.2
9	38.3 ± 9.8	104.8 ± 25.7
12	28.0 ± 6.8	106.5 ± 27.4
15	48.2 ± 26.2	105.5 ± 23.3
18	50.3 ± 15.4	97.2 ± 30.7
21	40.2 ± 12.3	101.0 ± 20.4
24	33.8 ± 9.7	105.0 ± 25.8

TG: triglyceride, T-Cho: total cholesterol,

Data are expressed as mean ± standard deviation,

*: Significantly different from Pre ($P < 0.05$)

Table 5 Fatty acid composition of the dog food

Fatty acid	Concentrations
Total FA	81.1 ± 1.4
Total SFA	26.4 ± 0.4
Palmitic acid	16.3 ± 0.3
Stearic acid	8.2 ± 0.1
Total MUFA	36.6 ± 0.8
Palmitoleic acid	2.1 ± 0.1
Oleic acid	33.6 ± 0.7
Total PUFA	18.1 ± 0.6
Total n-3 FA	3.9 ± 0.1
α-linolenate acid	2.8 ± 0.1
Eicosapentaenoic acid	0.4 ± 0.0
Docosapentaenoic acid	0.1 ± 0.0
Docosahexaenoic acid	0.6 ± 0.0
Total n-6 FA	14.2 ± 0.5
Linoleic acid	13.0 ± 0.5
DGLA	0.4 ± 0.0
Arachidonic acid	0.2 ± 0.0
Docosatetraenoic acid	0.0 ± 0.0
Total n-9 FA	34.2 ± 0.8
MA	0.0 ± 0.0

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid,
 PUFA: polyunsaturated fatty acid,
 DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid,
 MA: 5, 8, 11-eicosatrienoic acid,
 Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA, Fatty acid
 concentrations are expressed as mg/g,
 Data are expressed as mean ± standard deviation

第4章 健康犬における血清中脂肪酸組成の基準値の検討

僧帽弁閉鎖不全症(MI)犬の血清中脂肪酸の測定値を評価するためには基準値との比較も必要であると考えられる。現在までに、犬の血清中脂肪酸の基準値を定めた報告はない。そのため、本章では、第3章までの方法により健康犬の血清中脂肪酸組成の基準値について検討した。

1 材料と方法

1) 供試動物

The Association of American Feed Control Officials (AAFCO) の定めた健康犬に対する栄養素供給の基準²⁹を満たした市販の総合栄養食のみを最低2カ月の間、1日に朝と夜の2食を与えられ、脂肪酸含有のサプリメントを含む副食を一切与えられていない105頭を用いた。また、総合栄養食は各年齢に応じた40種類以上が選択されていた。これらの犬は、2013年3月から2015年7月の間に健康診断を目的に個人動物病院に来院し、身体検査と血液化学検査で明らかな異常を認めなかったトイ・プードル20頭、雑種13頭、ミニチュア・ダックスフンド13頭、柴9頭、チワワ6頭、ミニチュア・シュナウザー5頭、ラブラドル・レトリバー4頭、ボーダー・コリー4頭、フレンチ・ブルドック4頭、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル3頭、ヨークシャー・テリア3頭、ゴールデン・レトリバー2頭、ジャック・ラッセル・テリア2頭、ビーグル2頭、ボストン・テリア2頭、ポメラニアン2頭、そしてその他の品種は1種類ずつが13頭であった。年齢による群構成は、1歳未満を幼年齢群(n=10)、1~7歳を中年齢群(n=59)、そして8歳以上を高年齢群(n=36)とした。さらに、それらの

群内で雄群、去勢群、雌群そして避妊群に分類したが、幼年齢群では去勢群と避妊群は存在しなかったため、計 10 の群が構成された。去勢群の精巣摘出手術と避妊群の卵巣摘出手術は本研究に供する 3 カ月以上前に完了していることを条件とした。各群の個別の年齢、体重そして頭数は、Table 1 に示した。本研究はすべての供試犬の飼い主から研究に対する同意を得て行った。

2) 血清検体

血清は、午前の給餌前の空腹時に行った採血により得た。血液は、血清分離管に分注し、室温で 30 分以上静置した後 3000rpm で 5 分間遠心した。遠心により得た血清は、脂肪酸濃度の測定まで -20°C で凍結保存した。

3) 血清中脂肪酸濃度の測定

血清中脂肪酸濃度の測定は、第 2 章に記した方法により行った。

4) 測定値分布における中央の 95%区間の算出

正規性の認められた血清中脂肪酸濃度の測定値分布における中央の 95%を含む範囲は、平均 ± 1.96 標準偏差(SD)として求めた³⁷。また、正規性の認められなかった脂肪酸濃度は、全ての測定値を対数変換することにより正規分布化し、その中央の 95%の区間を求め、その上限と下限の値を逆対数変換した^{37,38}。すべての群間において、有意差を認めなかった種類の脂肪酸濃度は、全群から得た測定値を用いて算出した。一方、群間で有意差を認めた種類の脂肪酸は、それぞれの群で 95%の区間を算出した。さらに、脂肪酸濃度から求めた脂肪酸の重量比および比率は、算出した脂肪酸濃度から求めた。脂肪酸の重量比は、総脂肪酸に対する各脂肪酸の百分率とした。脂肪酸の比率は、二重結合の数の違う脂肪酸である飽和脂肪酸(SFA)と多価不飽和脂肪酸

(PUFA)の比(SFA/PUFA)、一価不飽和脂肪酸(MUFA)と PUFA の比(MUFA/PUFA)を求めた。また、二重結合の位置の違う脂肪酸である総 n-6 脂肪酸と総 n-3 脂肪酸の比(n-6/n-3)および総 n-9 脂肪酸と総 n-3 脂肪酸の比(n-9/n-3)を算出した。さらに、ヒトの心血管系疾患のリスク評価に頻用されているエイコサペンタエン酸(EPA)とアラキドン酸(AA)の比(EPA/AA)を求めた。

5) 統計学的処理

血清中脂肪酸の濃度は平均 \pm SD で示した。統計学的処理には、統計処理ソフト SPSS[®] (Ver.15.0J for Windows, International Business Machines Corporation)と R コマンドー(ver.1.4-8, <http://dl.dropbox.com/u/8196796/My Program.zip>)を用いた。すべての値の正規性は、*Shapiro-Wilk* の正規性検定により確認した。正規性の認められた群間の比較は、一元配置分散分析を行い、統計学的に有意であったものに対しては *Tukey* 検定を行った。一方、正規性を認めなかった群間の比較には *Kruskal-Wallis* 検定を行い、統計学的に有意であったものに対しては *Steel-Dwass* 検定を行った。危険率は 5%未満をもって有意とした。

2 結果

1) 血清中脂肪酸濃度の群間比較

年齢と性の組み合わせで分類した各群の血清中脂肪酸の濃度は Table 2 に示した。総脂肪酸の測定値は、高年齢雄群、高年齢雌群、中年齢雌群、幼年齢雌群、高年齢去勢群、中年齢去勢群、高年齢避妊群、中年齢避妊群、中年齢雄群そして幼年齢雄群の順に高値であった。しかし、いずれの群間においても有意差は認めなかった。

総 SFA と総 MUFA は、いずれの群においても類似した値であり、すべての群間で有意差は認めなかった。そして、総 PUFA においては、高年齢の雄群と雌群が他の 8 群と比較して高値であったが、いずれの群間においても有意な差は認めなかった。SFA のパルミチン酸とステアリン酸は、すべての群間で有意差を認めず類似した値であった。MUFA のパルミトレイン酸もいずれの群間においても有意差は認めなかった。また、高年齢の去勢群と避妊群のオレイン酸は、他の群よりも高値であったが、すべての群間で有意な差は認めなかった。幼年齢の雄群と雌群の総 n-3 脂肪酸は、他の群よりも高値であったが、いずれの群間においても有意な差は認めなかった。また、高年齢の雄群と雌群の総 n-6 脂肪酸は、他群と比較して高値であったが、いずれの群間でも有意な差は認めなかった。さらに、高年齢の去勢群の総 n-9 脂肪酸はすべての群の中で最も高値であったが、群間で有意な差は認めなかった。各 n-3 脂肪酸において、 α -リノレン酸(ALA)は、加齢にともない増加する傾向を示した。幼年齢雌群の EPA は他群よりも高値であり、中年齢と高年齢の避妊群は低値であった。幼年齢雄群のドコサペンタエン酸(DPA)は、すべての群の中で最高値であり、中年齢の雄群は他群よりも低値であった。幼年齢雌群のドコサヘキサエン酸(DHA)

の値は高年齢の雄群と雌群と類似し、ともに他群よりも高値であった。しかし、すべての n-3 脂肪酸の種類は、いずれの群間においても有意な差を認めなかった。n-6 脂肪酸において、高年齢の雄群と雌群の LA は他群よりも高値であり、最低値は幼年雄群であった。高年齢の雄群と去勢群の DGLA は、他群よりも高値であったが、幼年雌群は、全群中で最低値であった。高年齢雄群の AA は、すべての群の中で最高値であったが、幼年、中年そして高年齢の雌群は類似した値であり、高年齢雄群に次いで高値であった。中年雄群の AA は全群中で最低値であり、幼年雄群、中年の去勢群と避妊群そして高年齢の去勢群と避妊群は類似した値であった。中年と高年齢の雌群と避妊群の DTA は類似した値であり、すべての群の中で最も高値の 2 群であったが、残りの 8 群の DTA は類似した値であった。しかし、測定されたすべての n-6 脂肪酸の濃度は、すべての群間で有意差を認めなかった。n-9 脂肪酸である MA は、いずれの群においても類似した値であり、すべての群間で有意な差を認めなかった。

2) 血清中脂肪酸濃度の 95% 区間

血清中の脂肪酸濃度の 95% 区間は Table 3 に示した。すべての脂肪酸の種類は、いずれの群間においても有意差を認めなかったことから、すべての脂肪酸は、全群から得た測定値から算出した。総 FA は、2955.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 10014.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であった。総 SFA は、900.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 2842.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。そのうち、ステアリン酸 (484.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1544.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は、パルミチン酸 (386.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1294.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) よりも高値であった。総 MUFA は、292.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1492.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。そのうち、パルミトレイン酸 (14.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 131.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に比べ、オレイン酸 (263.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1375.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は高値で

あった。総 PUFA は、1572.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 6189.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、総脂肪酸の 50%以上を占めた。総 n-3 脂肪酸 68.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1065.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。そのうち、DHA(24.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 654.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)が最も高値であった。次いで、EPA(12.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 362.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$)が高値であった。DPA(16.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 133.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)は、ALA(4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 124.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)よりも高値であったが、DPA と ALA の上限は類似していた。総 n-6 脂肪酸は、1377.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 5642.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、総 PUFA の約 90%を占めていた。そのうち LA(768.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 3351.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)は最も割合が高く、すべての脂肪酸の中で最も高値であった。そして、n-6 脂肪酸において AA(466.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 2368.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、DGLA(11.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 162.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)そして DTA(4.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 121.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の順に高値であった。総 n-9 脂肪酸は、270.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1402.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、オレイン酸がその 95%以上を占めていた。MA(1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)は、すべての脂肪酸の中で、最も低い値であった。

3) 血清中脂肪酸重量比の 95%区間

脂肪酸重量比の 95%区間は Table 4 に示した。総 SFA は、21.18% から 40.83%であった。SFA の中で、ステアリン酸(11.08%から 22.83%)は、パルミチン酸(9.08%から 18.62%)よりも高値であった。総 MUFA は 7.47%から 19.76%であった。MUFA のうち、その大部分がオレイン酸(6.74%から 18.18%)であり、パルミトレイン酸は 0.31%から 2.07%であった。総 PUFA は、46.43%から 70.82%であり、総 SFA や総 MUFA と比較して高い値であった。総 n-3 脂肪酸は 1.42%から 17.48%であり、その中でも DHA(0.49%から 10.89%)と EPA(0.24%から 6.54%)が大部分を占めていた。次いで、DPA(0.34%から 2.13%)と ALA(0.09%から 1.90%)の順に高かった。総 n-6 脂肪酸は、40.9%から 64.21%であった。

LA(21.49%から 40.50%)と AA(12.60%から 29.66%)の値が高く、DGLA(0.24%から 2.54%)と DTA(0.09%から 1.96%)は類似した値であった。総 n-9 脂肪酸は、6.98%から 18.58%であり、濃度と同様にオレイン酸はその 95%以上を占めた。MA(0.03%から 0.33%)はすべての比率の中で最も低い値であった。

4) 血清中脂肪酸比率の 95%区間

脂肪酸の比率の 95%区間は Table 5 に示した。SFA/PUFA は 0.31 から 0.86 であった。MUFA/PUFA は 0.11 から 0.41 の範囲であった。そして、n-6/n-3 は 2.77 から 38.35 と今回求めた比率の中で、最も広い範囲であった。また、n-9/n-3 は 0.49 から 10.61 であった。EPA/AA は 0.01 から 0.42 であった。

3 考察

各種血液化学検査における基準値は、健常集団から求めた測定値を統計的に処理し、測定値分布における中央の95%を含む範囲である平均 $\pm 1.96SD$ から求められている³⁷。また、対象集団の測定値が正規性を認めない場合は、全ての測定値を対数変換により正規分布に変換し、その中央の95%区間の上限と下限の値を逆対数変換することで求められている³⁸。しかしながら、基準値の設定には技術的、個体内そして個体間などの変動因子による影響を考慮しなければならない。第2章での検討により測定方法の精度が確認されていたことから、今回の測定値に技術的な因子による変動はないと判断した。そして、給餌から採血までの時間、季節の変化、運動習慣あるいは性周期などが個体内の変動因子としてあげられる。前章において、給餌からの採血時点の違いは、血清中の脂肪酸濃度に影響を与えることが示されたことから、本研究では供試犬の採血時点を午前の給餌前に統一した。また、更年期や卵巣摘出術を受けた女性では、雌性ホルモン分泌の消失のために、健常な成人女性に比べて血清中のパルミチン酸とオレイン酸の濃度が高くなり、LAは低値となる³⁹。さらにウサギにおいて、卵巣摘出後にプロジェステロン投与の有無による血清中脂肪酸濃度の比較では、両群の間に有意な差を認めないことから、血清中脂肪酸濃度の変動にはプロジェステロンではなくエストロジェンが強く影響すると結論付けられている³⁹。犬において、発情期のエストロジェンの分泌量は、発情休止期に比べ4倍から5倍である⁴⁰ことから、本研究では去勢群と避妊群は中性化の精巣摘出術または卵巣摘出術を行ってから最低3カ月を経過している犬を供し、雌群には発情期の犬を含めなかった。その結果、雌群の血清中脂肪酸の濃度は、いずれの群間においても有

意な差を認めなかったことから、今回の供試犬では性周期の影響による変動はなかったと判断した。これらのことから、本研究では季節の違いや運動習慣などに関しては明らかではなかったが、採血時点と性周期についての条件は統一しており、個体内の変動因子による影響は少ない条件による 95%区間であると考えられる。

食習慣、年齢および性などが個体間の変動因子として挙げられる。ヒトでは血清中の SFA と MUFA は年齢による差異を認めないが、PUFA では、特に LA、AA、EPA そして DHA が加齢にともない増加するが、それは年齢自体よりも成長にともなう食生活の変化が原因であると考えられている^{41,42}。本研究の供試犬は、すべて AAFCO の基準を満たしたフードが与えられていたことで、食習慣の影響は小さかったと考えられる。また、ヒトでは加齢による脂質代謝の低下や性ホルモンの分泌量の違いが、血清中脂肪酸濃度に影響することが報告されている^{43,44}。そのため、本研究では年齢と性を組み合わせる方法で分類した血清中の脂肪酸濃度を比較した。統計学的な差はなかったが高年齢の雄群と雌群の LA と AA は、ともに他群よりも高値であり、高年齢の去勢群と避妊群のそれらは幼年齢群や中年齢群と類似した値であった。また、n-3 脂肪酸でも統計学的な差はなかったが、ALA は性の違いに関係なく加齢にともない増加傾向を示した一方で、EPA は加齢にともない雄群と雌群では低下傾向であった。ヒトにおいて、女性は男性に比べ DHA よりも上位の脂肪酸である ALA や EPA の代謝活性が高いために、その結果として血清中 DHA の値は高くなることが報告されている⁴⁵。これらのことから、犬においては性ホルモンの血中脂肪酸に対する影響がヒトとは異なる可能性があるものの、すべての脂肪酸はいずれの群間においても統計学的な差を認めなかったこ

とから、血清中脂肪酸濃度は性と年齢による影響は少ないと判断した。

ヒトにおいて、血清中脂肪酸の濃度は食生活の影響を強く受けるため、その影響が少ない重量比による評価も行われている。EPA/AA は心血管系疾患の発症リスクとしての関連が報告されており、個々の脂肪酸濃度に加え、これらのバランスの確認は病態との関連性を評価する上で有用であると考えられている^{41,42,46,47}。さらに、催不整脈性の右室原性心筋症の犬において、血清中の EPA/AA とともに n-3/n-6 の上昇は、個々の心室期外収縮の発現頻度と有意な負の相関を示す⁴⁸。さらに、ラットの炎症性疾患ではその抵抗性の指標として血清中の EPA/AA や組織中の n-6/n-3 を求めることの有用性が検討されている⁴⁹。加えて、ヒトの炎症性腸症では、血清リン脂質中や赤血球中の n-6/n-3 と EPA/AA は低下する⁵⁰。これらのことから、犬の心疾患や炎症性疾患においても、血清中のそれらの比率を算出することの有用性は高いと考えられる。SFA と MUFA は体内で合成可能であるが、PUFA は ALA や LA などの基質の存在下でのみ合成可能である。そのため、血清中の PUFA の濃度は経口的な摂取量に依存する。健常犬ではフードを変更した際の n-3/n-6 が調査されているが⁵¹、その基準値については報告がない。また、副腎皮質機能亢進症や甲状腺機能低下症などのコルチゾールやサイロキシンの分泌や活性の異常を引き起こす疾患では、PUFA だけではなく SFA や MUFA の合成酵素の活性を変化させる⁵²。そのため、SFA から合成される不飽和脂肪酸である n-9 脂肪酸を用いた n-9/n-3、そして SFA/PUFA や MUFA/PUFA などを求めることは、性ホルモンを含む種々のホルモン異常疾患の病態を把握するための指標となる可能性が考えられる。これらのことから、健常犬の血清中脂肪酸濃度の基準値は、年齢や性に関わらず設定できると

考えられるが、各個体の血清中脂肪酸を基準値と比較する場合には、種々の変動因子の影響を確認する必要がある。本研究では食べ物や品種の違いについての検討は十分ではなかったため、さらにデータを蓄積し検討する必要があると考えられた。そのため、今回得られた 95% 区間は、本研究では参照値として用いることにした。

4 小括

健常犬における血清中脂肪酸の濃度、重量比そして比率の基準値を決定するために、基準値の設定に影響をおよぼす技術的、個体内そして個体間の変動因子を可能な限り除外して検討した。すなわち、個体内の変動因子としては、給餌後から採血までの時間と性周期について統一した。また、個体間の変動因子としては食習慣を統一し、年齢と性に基づいて分類した群で比較した。技術的な精度については前章で確認した。そして、血清中脂肪酸濃度の基準値は、この条件で得られた血清中の脂肪酸濃度の測定値分布における中央の95%を含む範囲である平均 $\pm 1.96SD$ から得た。それにより、健常犬の血清中脂肪酸濃度は、年齢や性の違いに関わらず基準値を設定できることが示唆された。しかし、食べ物や品種の違いに関することについては、さらにデータを蓄積し検討する必要があると考えられた。そのため、今回得られた95%区間は、本研究では参照値として用いることにした。

Table 1 Age and body weight classified by gender and growth degree in healthy dogs

Gender	Puppy	Young adult	Mature adult
	7	15	5
Male			
Number			
Age	0.7 ± 0.1	3.5 ± 2.0	8.8 ± 1.1
BW	7.6 ± 3.1	6.5 ± 5.2	12.6 ± 11.0
	0	21	8
Castrated	ND	4.0 ± 1.8	9.1 ± 2.0
Age	ND	8.1 ± 6.2	9.5 ± 8.3
BW			
	3	6	5
Female			
Number			
Age	0.8 ± 0.2	4.2 ± 1.8	9.0 ± 1.6
BW	7.5 ± 3.1	12.9 ± 9.8	6.2 ± 4.1
	0	17	18
Spayed	ND	4.6 ± 1.2	9.5 ± 2.0
Age	ND	9.9 ± 7.6	7.8 ± 4.1
BW			

Puppy: age of less than 1 year old, Young adult: age from 1 to 7 years,

Mature adult: age of 7 years or older, BW: body weight,

ND: no data,

Age are expressed as years,

BW are expressed as kg,

Data are expressed as mean ± standard deviation

Table 2 Serum fatty acid concentrations in the healthy dogs

Kind of fatty acid	Puppy				Young adult				Mature adult					
	Male	Female	Male	Female	Castrated male	Female	Male	Female	Spayed female	Female	Male	Castrated male	Female	Spayed female
Total fatty acid	5087.6 ± 822.3	6273.4 ± 2574.1	5164.5 ± 1861.3	6276.3 ± 2200.0	5724.3 ± 2494.3	6276.3 ± 2200.0	7068.1 ± 2168.5	6179.9 ± 2774.7	6402.4 ± 2255.5	5717.2 ± 1603.3				
Total SFA	1567.6 ± 143.2	1828.3 ± 667.6	1579.1 ± 428.0	1952.3 ± 584.5	1771.2 ± 699.3	1952.3 ± 584.5	1937.6 ± 689.9	1761.4 ± 761.4	1485.5 ± 324.1	1520.5 ± 367.1				
Palmitic acid	684.0 ± 65.9	815.6 ± 292.1	708.7 ± 212.2	838.3 ± 321.2	764.1 ± 288.1	838.3 ± 321.2	851.0 ± 375.5	774.7 ± 355.7	655.3 ± 109.7	694.1 ± 182.3				
Stearic acid	871.4 ± 109.3	1005.7 ± 378.7	849.1 ± 220.5	1069.7 ± 289.3	980.5 ± 415.9	1069.7 ± 289.3	1069.4 ± 341.7	957.6 ± 397.0	825.2 ± 207.8	805.9 ± 201.2				
Total MUFA	514.4 ± 117.5	681.7 ± 385.7	693.0 ± 366.6	772.6 ± 457.1	699.6 ± 396.1	772.6 ± 457.1	709.5 ± 208.6	870.2 ± 604.0	701.9 ± 130.9	783.9 ± 315.8				
Palmitoleic acid	39.0 ± 13.1	49.1 ± 40.6	49.2 ± 23.9	53.5 ± 25.7	44.8 ± 21.3	53.5 ± 25.7	50.7 ± 32.1	57.1 ± 50.8	52.7 ± 17.0	62.1 ± 65.0				
Oleic acid	467.5 ± 116.5	620.9 ± 342.7	635.4 ± 348.9	707.4 ± 434.5	641.4 ± 376.8	707.4 ± 434.5	647.1 ± 213.9	802.2 ± 546.0	636.0 ± 116.0	711.1 ± 272.2				
Total PUFA	3005.6 ± 679.3	3763.3 ± 1545.9	2892.4 ± 1146.4	3551.4 ± 1203.3	3253.5 ± 1476.3	3551.4 ± 1203.3	4421.1 ± 1621.1	3548.2 ± 1480.2	4205.0 ± 1860.0	3412.7 ± 1292.9				
Total n-3 fatty acid	370.9 ± 116.4	542.5 ± 339.2	277.1 ± 188.9	398.9 ± 281.9	337.7 ± 197.2	398.9 ± 281.9	361.0 ± 196.0	429.8 ± 300.9	439.5 ± 397.8	264.6 ± 182.9				
α-linolenic acid	6.6 ± 6.6	11.8 ± 10.4	11.5 ± 9.2	25.2 ± 19.6	32.8 ± 23.8	25.2 ± 19.6	28.6 ± 29.9	35.5 ± 30.7	45.3 ± 43.7	35.4 ± 42.5				
Eicosapentaenoic acid	119.2 ± 42.2	200.0 ± 164.8	110.4 ± 103.7	101.3 ± 110.0	94.4 ± 96.6	101.3 ± 110.0	79.5 ± 67.9	101.7 ± 100.7	99.1 ± 93.6	62.7 ± 55.1				
Docosapentaenoic acid	56.3 ± 17.5	106.1 ± 65.7	31.0 ± 12.8	75.6 ± 45.9	58.0 ± 35.9	75.6 ± 45.9	45.9 ± 5.6	59.0 ± 19.9	68.9 ± 38.6	52.7 ± 49.6				
Docosahexaenoic acid	188.9 ± 95.0	224.6 ± 113.3	124.1 ± 87.4	196.8 ± 126.0	152.5 ± 95.3	196.8 ± 126.0	206.9 ± 153.5	233.6 ± 214.8	226.1 ± 269.7	113.8 ± 90.8				
Total n-6 fatty acid	2629.8 ± 693.8	3216.7 ± 1219.2	2608.6 ± 1149.6	3144.7 ± 1230.9	2909.1 ± 1408.3	3144.7 ± 1230.9	4054.7 ± 1609.4	3111.4 ± 1312.1	3760.3 ± 1561.5	3140.3 ± 1122.6				
Linoleic acid	1459.3 ± 420.1	1756.7 ± 409.4	1589.9 ± 679.3	1705.8 ± 615.1	1717.5 ± 828.7	1705.8 ± 615.1	2363.1 ± 1006.8	1803.3 ± 726.4	2167.3 ± 906.7	1784.9 ± 719.8				
DGLA	37.0 ± 16.7	19.2 ± 18.3	39.9 ± 20.2	50.6 ± 16.0	54.9 ± 28.9	50.6 ± 16.0	78.2 ± 39.0	69.7 ± 53.5	47.0 ± 31.9	54.4 ± 34.3				
Arachidonic acid	1091.1 ± 264.4	1407.8 ± 801.5	936.7 ± 490.8	1305.9 ± 597.9	1080.3 ± 561.0	1305.9 ± 597.9	1555.9 ± 599.6	1181.0 ± 601.4	1467.9 ± 628.4	1227.6 ± 493.9				
Docosatetraenoic acid	17.1 ± 15.0	18.4 ± 11.7	24.9 ± 25.5	51.7 ± 53.9	28.7 ± 30.1	51.7 ± 53.9	26.4 ± 21.7	25.8 ± 15.0	41.0 ± 23.4	40.5 ± 20.9				
Total n-9 fatty acid	477.6 ± 114.4	634.8 ± 354.7	648.2 ± 352.3	725.1 ± 447.5	658.1 ± 385.2	725.1 ± 447.5	659.5 ± 214.8	816.3 ± 554.7	649.5 ± 120.2	725.8 ± 278.3				
MA	4.9 ± 2.2	4.1 ± 3.4	6.7 ± 10.7	7.8 ± 4.4	6.8 ± 5.4	7.8 ± 4.4	5.3 ± 4.6	7.0 ± 8.0	5.2 ± 2.1	7.7 ± 6.3				

Puppy: age of less than 1 year old, Young adult: age from 1 to 7 years, Mature adult: age of 7 years or older, SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-γ-linolenic acid, MA: 5, 8, 11-eicosatrienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA, Fatty acid concentrations are expressed as µg/mL, Data are expressed as mean ± standard error

Table 3 95% interval of serum fatty acid concentrations in the healthy dogs

Kind of fatty acid	95% interval
Total fatty acid	2955.9 – 10014.2
Total SFA	900.8 – 2842.3
Palmitic acid	386.8 – 1294.1
Stearic acid	484.7 – 1544.7
Total MUFA	292.9 – 1492.1
Palmitoleic acid	14.4 – 131.8
Oleic acid	263.9 – 1375.0
Total PUFA	1572.5 – 6189.6
Total n-3 fatty acid	68.8 – 1065.8
α -linolenate acid	4.0 – 124.2
Eicosapentaenoic acid	12.8 – 362.7
Docosapentaenoic acid	16.3 – 133.2
Docosahexaenoic acid	24.3 – 654.3
Total n-6 fatty acid	1377.9 – 5642.1
Linoleic acid	768.8 – 3351.8
DGLA	11.1 – 162.4
Arachidonic acid	466.9 – 2368.9
Docosatetraenoic acid	4.4 – 121.3
Total n-9 fatty acid	270.8 – 1402.7
MA	1.3 – 20.0

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid,
 PUFA: polyunsaturated fatty acid,
 DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid,
 MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid,
 Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA
 Fatty acid concentrations are expressed as $\mu\text{g/mL}$,
 95% intervals are expressed as mean \pm 1.96 standard deviation

Table 4 95% interval of serum fatty acid weight ratios in the healthy dogs

Kind of fatty acid	95% interval
Total SFA	21.18 – 40.83
Palmitic acid	9.08 – 18.62
Stearic acid	11.08 – 22.83
Total MUFA	7.47 – 19.76
Palmitoleic acid	0.31 – 2.07
Oleic acid	6.74 – 18.18
Total PUFA	46.43 – 70.82
Total n-3 fatty acid	1.42 – 17.48
α-linolenate acid	0.09 – 1.90
Eicosapentaenoic acid	0.24 – 6.54
Docosapentaenoic acid	0.34 – 2.13
Docosahexaenoic acid	0.49 – 10.89
Total n-6 fatty acid	40.90 – 64.21
Linoleic acid	21.49 – 40.50
DGLA	0.24 – 2.54
Arachidonic acid	12.60 – 29.66
Docosatetraenoic acid	0.09 – 1.96
Total n-9 fatty acid	6.98 – 18.58
MA	0.03 – 0.33

SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid,
 PUFA: polyunsaturated fatty acid,
 DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid,
 MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid,
 Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA
 Fatty acid weight ratios are expressed as %,
 95% intervals are expressed as mean \pm 1.96 standard deviation

Table 5 95% interval of serum fatty acid ratios in the healthy dogs

Kind of ratio	95% interval
SFA/PUFA	0.31 – 0.86
MUFA/PUFA	0.11 – 0.41
n-6/n-3	2.77 – 38.35
n-9/n-3	0.49 – 10.61
EPA/AA	0.01 – 0.42

SFA/ PUFA: total saturated fatty acid/ total polyunsaturated fatty acid ratio, MUFA/ PUFA: total monounsaturated fatty acid/ total polyunsaturated fatty acid ratio, n-6/ n-3: total n-6 fatty acid/ total n-3 fatty acid ratio, n-9/ n-3: total n-9 fatty acid/ total n-3 fatty acid ratio, EPA/ AA: eicosapentaenoic acid/ arachidonic acid ratio, 95% intervals are expressed as mean \pm 1.96 standard deviation

第 5 章 僧帽弁閉鎖不全症犬の血清中脂肪酸組成の検討

正常な心筋において、脂肪酸は主要なエネルギー源として主に血中から受動的に取り込まれる⁵。しかし、心不全の心筋では酸素消費の効率性から脂肪酸の利用は低下する^{7,8}。そのため、僧帽弁閉鎖不全症(MI)犬の血清中脂肪酸組成は、健常犬とは異なると考えられるが、その変化は明らかではない。本章では、病期で分類した MI 犬の血清中脂肪酸組成を健常犬と比較した。そして、MI 犬の脂肪酸と心エコーパラメーターの関係を調べた。加えて、MI 犬に対する治療としてのエイコサペンタエン酸(EPA)投与のタイミングについて検討した。

1 材料と方法

1) 供試動物

健常群は、身体検査および血液化学検査において明らかな異常を認めない 12 頭の犬(年齢: 8.4 ± 2.2 歳, 体重: 4.4 ± 2.2 kg, 雄 6 頭, 雌 6 頭)を用いた。MI 群は、2012 年 8 月から 2015 年 2 月の間に日本獣医生命科学大学附属動物医療センター循環器科で併発疾患を有さない単独の MI と診断された 30 頭を用いた。MI 群は International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC)の心機能分類⁵³により I 群、II 群そして III 群の 3 群に分類した。各群の品種、年齢、体重そして性は Table 1 に示した。すべての犬は The Association of American Feed Control Officials (AAFCO)の基準²⁹を満たしたフードのみが与えられ、主食の他に脂肪酸サプリメントや副食は与えられていなかった。MI 群のうち、I 群と II 群は、MI に対するアンジオテニン変換酵素阻害(ACEI)薬投与の有無により、未治療群と ACEI 群

に細分した。ACEI 群に分類された MI 犬への投薬は ACEI 薬のみであったが、III 群の MI 犬は、ACEI に加えホスホジエステラーゼ III 阻害薬あるいは利尿薬をいずれかの組み合わせで併用していたため、内服薬による細分は行わなかった。本研究はすべての供試犬の飼い主から研究に対する同意を得て行った。

2) 血清検体

供試犬の採血は、午前の給餌前に行った。血清は、血液を 30 分間室温で静置した後、3000 rpm で 15 分間遠心することによって得た。これらの血清は脂肪酸の測定まで -20°C で凍結保存した。

3) 血清中脂肪酸の測定方法と測定項目

脂肪酸濃度の測定は第 2 章に記した方法で行った。脂肪酸の重量比は、総脂肪酸に対する各脂肪酸の百分率とした。また、血清中脂肪酸濃度から求める比率は、飽和脂肪酸(SFA)と多価不飽和脂肪酸(PUFA)の比(SFA/PUFA)、一価不飽和脂肪酸(MUFA)と PUFA の比(MUFA/PUFA)、総 n-6 脂肪酸と総 n-3 脂肪酸の比(n-6/n-3)、総 n-9 脂肪酸と総 n-3 脂肪酸の比(n-9/n-3)そして EPA とアラキドン酸(AA)の比(EPA/AA)とした。

4) 心エコー検査

心エコー検査の診断装置は、Vivid 7(GE ヘルスケアジャパン, 東京)を用いた。収縮末期左室内径(LVIDs)と拡張末期左室内径(LVIDd)は、右傍胸骨左室短軸像の M モードから測定した。右傍胸骨心基部短軸像の大動脈レベルにおける左房径(LA)と大動脈径(Ao)は 2 次元心エコーで測定した。これらの測定値から、MI 犬における心エコー検査診断の指標とされる LA/Ao、LVIDd/Ao、LVIDs/Ao そして左室内径短縮率(FS)を算出した⁵⁴⁻⁵⁶。

5) 参照値との比較

健常群と MI 群の血清中脂肪酸の濃度、重量比そして比率は、第 4 章で求めた参照値と比較した。

6) EPA 濃度と EPA/AA のカットオフ値の設定

MI 群と健常群の判別のために、EPA 濃度と EPA/AA のカットオフ値を求めた。

7) 統計学的処理

血清中脂肪酸の濃度、重量比、比率および心エコーパラメーターの計測値は、平均±標準誤差で示した。統計学的処理は、SPSS®(ver. 15.0, International Business Machines Corporation)と R コマンダー(ver.1.4-8, <http://dl.dropbox.com/u/8196796/MyProgram.zip>)を用いて行った。すべての値の正規性は、*Shapiro-Wilk* 検定により確認した。群間の比較は、正規性の確認されたものに対しては一元配置分散分析を行い、統計的に有意であったものに対しては *Tukey* 検定を行った。一方、正規性の認めなかった値の比較は、*Kruskal-Wallis* 検定を行い、統計的に有意であったものに対しては *Steel-Dwass* 検定を行った。

脂肪酸の濃度と比率に対する心エコーパラメーターとの相関関係の処理は、正規性の認められた値に対しては *Pearson* の相関係数を用いた。一方、正規性を認めなかった値は *Spearman* の順位相関係数を用いた。また、MI 群における EPA と EPA/AA のカットオフ値は、ROC 解析により得た。危険率は 5%未満をもって有意とした。

2 結果

1) MI の I 群と II 群における群内比較

(1) 血清中脂肪酸濃度の比較

I 群において、未治療群と ACEI 群の血清中脂肪酸濃度は Table 2 に示した。総脂肪酸、総 SFA、総 MUFA そして総 PUFA は、未治療群と ACEI 群の間に有意な差を認めなかった。さらに、脂肪酸の種類ごとに比較した結果、両群の間には有意な差のある種類は認めなかった。II 群においても未治療群と ACEI 群の間には濃度に有意な差の認める脂肪酸はなかった (Table 3)。

(2) 血清中脂肪酸重量比の比較

I 群における未治療群と ACEI 群の血清中脂肪酸重量比の結果は Table 4 に示した。未治療群と ACEI 群の間には、総 SFA、総 MUFA そして総 PUFA に有意な差は認めなかった。さらに、各脂肪酸においても両群の間に有意な差のある種類は認めなかった。II 群においても I 群と同様に未治療群と ACEI 群の重量比に有意な差を認めるものはなかった (Table 5)。

(3) 脂肪酸比率の比較

I 群における脂肪酸比率は Table 6 に示した。未治療群と ACEI 群の間には、SFA/PUFA、MUFA/PUFA、n-6/n-3、n-9/n-3 そして EPA/AA のすべてにおいて有意な差を認めなかった。II 群においても I 群と同様に有意な差は認めなかった (Table 7)。

(4) 心エコーパラメーターの比較

I 群の LA/Ao、LVIDd/Ao、LVIDs/Ao そして FS は Table 8 に示した。未治療と ACEI 群の間にはいずれの種類的心エコーパラメーターにも有意な差を認めなかった。II 群においても I 群と同様に未治療群と

ACEI 群の間に有意な差は認めなかった (Table 9)。

これらの結果から、I 群と II 群はともに今後は投薬の有無で細分せずにそれぞれ単一群として扱うこととした。

2) MI 群の群間比較

(1) 血清中脂肪酸濃度の比較

各群における血清中脂肪酸の濃度は Table 10 に示した。I 群の PUFA と総 n-6 脂肪酸は、健常群よりも有意(それぞれ $P < 0.05$ と $P < 0.05$)に低値であった。II 群の PUFA と総 n-6 脂肪酸も I 群と同様に健常群よりも有意(それぞれ $P < 0.05$ と $P < 0.05$)に低値であった。また、II 群の総 n-3 脂肪酸は、III 群と同様に健常群よりも有意($P < 0.05$)に低値であった。各脂肪酸の比較において、I 群のリノール酸(LA)、AA そしてドコサテトラエン酸(DTA)などの n-6 脂肪酸は、健常群よりも有意(それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$ そして $P < 0.05$)に低値であった。そして、II 群では AA と n-3 脂肪酸である EPA が有意(それぞれ $P < 0.05$ と $P < 0.05$)に低値であった。また、III 群では EPA のみが健常群よりも有意($P < 0.01$)に低値であった。

(2) 血清中脂肪酸重量比の比較

各群における血清中脂肪酸重量比は Table 11 に示した。I 群において、総 SFA と総 PUFA そして総 n-6 脂肪酸が健常群よりも有意(それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.05$ そして $P < 0.01$)に高値であった。II 群では、総 SFA、総 PUFA が健常群と比較して有意(それぞれ $P < 0.01$ と $P < 0.05$)に高値であった。III 群の総 SFA は、健常群よりも有意($P < 0.01$)に高値であったが、総 n-3 脂肪酸は健常群よりも有意($P < 0.05$)に低値であった。各脂肪酸の比較では、I 群のステアリン酸は健常群よりも有意($P < 0.01$)に高値であったが、その他の脂肪酸に有意な差は認めな

かった。II群においては、ステアリン酸と5,8,11-エイコサトリエン酸(MA)が健常群よりも有意(それぞれ $P < 0.01$ と $P < 0.05$)に高値であったが、EPAは健常群よりも有意($P < 0.05$)に低値であった。III群は、I群やII群と同様にステアリン酸が健常群に比べ有意($P < 0.01$)に高値であり、EPAは健常群よりも有意($P < 0.01$)に低値であった。また、III群の総n-3脂肪酸とドコサペンタエン酸(DPA)は、I群のそれらと比べ有意(それぞれ $P < 0.05$ と $P < 0.05$)に低値であった。

(3) 脂肪酸比率の比較

各群における脂肪酸比率はTable 12に示した。I群とII群のSFA/PUFAは、健常群よりも有意(それぞれ $P < 0.01$ と $P < 0.05$)に高値であった。しかし、II群とIII群のEPA/AAは健常群よりも有意(それぞれ $P < 0.05$ と $P < 0.01$)に低値であった。それ以外の比率は、いずれの群間においても有意な差を認めなかった。

(4) 心エコーパラメーターの比較

I群からIII群の心エコーパラメーターの測定値はTable 13に示した。LA/Aoは、グレードの進行にともないより高値となり、I群とIII群の間には有意($P < 0.01$)な差を認めた。II群とIII群のLVIDd/Aoは、I群と比べて高値であったが、いずれの群間にも有意な差は認めなかった。LVIDs/Aoは、I群とII群の方がIII群よりも高値であったが、いずれの群間においても有意な差を認めなかった。

II群とIII群のFSは、I群よりも高値であったが、いずれの群間にも有意な差は認めなかった。

3) 血清中脂肪酸組成と心エコーパラメーターの関係

(1) 血清中脂肪酸濃度と心エコーパラメーターの関係

脂肪酸濃度と心エコーパラメーターの間で求めた相関係数(R)と P

値は Table 14 に示した。n-6 脂肪酸の AA と DTA は、LVIDd/Ao との間には有意な正の相関(それぞれ $R = 0.389$, $P = 0.034$ と $R = 0.436$, $P = 0.016$)を認めた(Fig. 1, 2)。また、n-3 脂肪酸の DPA は、FS との間には有意な負の相関($R = -0.449$, $P = 0.013$)を認めた(Fig. 3)。しかし、その他の脂肪酸と心エコーパラメーターの間には有意な相関を認めなかった。

(2) 血清中脂肪酸重量比と心エコーパラメーターの関係

脂肪酸重量比と心エコーパラメーターの間における R と P 値は Table 15 に示した。DPA は LA/Ao と FS との間には有意な負の相関(それぞれ $R = -0.428$, $P = 0.018$ と $R = -0.421$, $P = 0.021$)を認めた(Fig. 4, 5)。しかし、その他の間には有意な相関を認めなかった。

(3) 脂肪酸比率と心エコーパラメーターの関係

脂肪酸比率と心エコーパラメーターの間における R と P 値は Table 16 に示した。EPA/AA は LA/Ao との間には有意な負の相関($R = -0.376$, $P = 0.040$)を認めた(Fig. 6)。SFA/PUFA、MUFA/PUFA、n-6/n-3 そして n-9/n-3 は、有意な相関を認めなかった。

4) 血清中脂肪酸の参照値との比較

健常群と MI 群の濃度、重量比そして比率は、全て参照値の範囲内であった。

5) EPA 濃度と EPA/AA のカットオフ値

EPA 濃度のカットオフ値は、 $47.5 \mu\text{g/mL}$ であり、その曲線下面積 (AUC) は 0.865 であった。そして、その感度と特異度はともに 83.33% であった(Fig. 7)。また、EPA/AA のカットオフ値は 0.029 であり、AUC は 0.753 であった。そして、その感度と特異度はそれぞれ 83.33% と 66.67% であった(Fig. 8)。

3 考察

MI の初期は、左室から左房への血液の逆流による容量負荷のため左房は拡張し、左室は駆出血流量の低下から過剰運動が誘発される。そのため、左房拡張の指標である LA/Ao と左室収縮能の指標である FS はともに軽度な上昇を認めるが、拡張期と収縮期の左室拡大の指標である LVIDd と LVIDs は正常である⁴。しかし、病態が進行すると左房と左室の容量負荷は増加するため、左房の拡張に追随するように左室内径は拡張期と収縮期ともに拡大する^{57,58}。本研究の供試動物の体重には群間で有意な差はなかったが、心臓のサイズの違いによる LVIDd と LVIDs の測定値の差異を補正するために、LVIDd と LVIDs は、それぞれの Ao で除することにより標準化した⁵⁹。それにより、今回の心エコーパラメーターは、MI の形態的変化の違いを過去の報告と同様に精度高く評価できた。

正常な心筋において、脂肪酸は ATP 産生の 60~90% を占める主要なエネルギー源ある^{5,6}。しかし、心不全の心筋では脂肪酸代謝よりも酸素消費量の少ないグルコースの代謝が有意になるため、脂肪酸の利用効率が低下するといわれている⁶⁰。心不全における脂肪酸代謝の変化は、心筋中への脂肪の蓄積を引き起こし心筋細胞膜構築の変化と心筋細胞内のカルシウムイオン調節の破綻を引き起こすため、さらに病態を悪化させることが考えられる^{6,9,10}。また、心不全では交感神経の活性化が起こり、脂肪細胞から血中への脂肪酸放出が亢進するため、血清中の遊離脂肪酸濃度が増加する^{7,8}。本研究では、各 MI 群の総脂肪酸濃度は、総 PUFA 濃度の低下を理由に健常群と比べて低値であった。しかしながら、心不全と分類される II 群と III 群における総 SFA と総 MUFA は、それぞれパルミチン酸とオレイン酸の上昇により、有

意ではないものの健常群よりも増加傾向を示した。これらの脂肪酸は、心筋での利用効率が高い脂肪酸であり^{5,6}、心筋への脂肪酸の取り込みは主に血中から受動的に行われることから⁵、MI 犬では心不全の進行とともに心筋でのこれらの脂肪酸の利用率が低下していると思われた。

ヒトでは、血清中の EPA、DHA そして AA の濃度は、食生活に最も影響を受けると考えられている^{14,20,61,62}。本研究の MI 犬は、AAFCO の基準を満たしたフードのみが与えられており、n-3 脂肪酸と n-6 脂肪酸のカスケードの基質となる ALA と LA といった必須脂肪酸の給与不足はなかったと考えられた。これまでの報告では、うっ血性心不全犬において血清中の EPA、DHA そして AA が、健常犬よりも低値であったとされているが¹⁷、心臓病治療薬や併発疾患の関与については検討されておらず、その原因は明らかではない。本研究では、併発疾患を有さない同じ病期に分類された MI 犬において、投薬の有無によるこれら脂肪酸濃度に有意差を認めなかったことから、MI 犬における血清中脂肪酸の低下には薬剤や基礎疾患の影響はないものと考えられた。しかし、同じグレードに分類された症例の中には、治療により病態が改善し無投薬の MI 犬と同等の血中脂肪酸の組成を維持している可能性も考えられるため、さらなる検討が必要である。

I 群では AA が低下し、II 群では AA と EPA が低下したが、III 群では EPA のみが低下していた。うっ血性心不全の犬において、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)やインターロイキン(IL)-1 などの炎症性サイトカインの過剰な活性が悪液質状態を増悪させることが報告されている¹⁷。また、ヒトの心不全では、状態の悪化にともない IL-6、IL-18 および TNF- α の血中濃度が上昇することで重症度が進行することが知られている⁶³⁻⁶⁵。そして、そのような状態では、AA 由来の炎症促進性エイ

コサノイドである 4 シリーズのプロスタグランジン、ロイコトリエンそしてトロンボキサンの作用が亢進し、その AA カスケードの代謝の活性化に遅れて抑制性エイコサノイドの基質である EPA の代謝が活性化すると報告されている⁶⁵。さらには、炎症抑制性の脂質メディエーターであるレゾルビンやプロテクチンを産生するために EPA の代謝は亢進するとされている⁶⁶⁻⁶⁸。また、n-3 脂肪酸と n-6 脂肪酸は、同一の律速酵素で代謝されるが、その酵素の親和性は n-6 脂肪酸よりも n-3 脂肪酸の方が高い。そのため、炎症抑制性脂質メディエーターの基質である EPA は、炎症促進性脂質メディエーターの基質である AA の代謝を競合的に抑制するため、通常は n-3 脂肪酸活性の方が優位な状態にある¹¹。本研究では、心不全ではない I 群の AA が低値であったことから、MI では心不全の発現に先行して AA の代謝が過剰になっていたと考えられた。そして、代謝的に AA の上下に位置する脂肪酸である LA と DTA の低値は AA の代謝過剰が原因であると推察された。これらのことから、MI 犬において、AA の変化は心不全の前段階から心筋自体や全身的な炎症に関連し、EPA の代謝は AA の代謝過剰に追隨した反応であったと推察された。

PUFA は、EPA や AA の低下により減少していたが、SFA はどの群間においても有意差を認めなかった。それにより、I 群と II 群の SFA/PUFA は、健常群よりも有意に高値となった。SFA は、心筋のエネルギー源としての利用率が高い一方で生理活性作用は EPA と AA よりも低い。このことから、MI 犬の血清中脂肪酸はエネルギー効率よりも、生理活性により大きく変化しており、SFA/PUFA はそれらのバランスを評価するための有用な比率と考えられた。さらに、II 群と III 群の EPA/AA は、健常群に比べ有意に低値であった。II 群の EPA/AA

は、AA と EPA の両者が低値であるための低下であったが、III 群では AA の正常化に反して EPA は II 群よりもさらに低下した。このため、II 群と III 群の EPA/AA はともに健常群よりも低値であったが、その要素は異なっていた。このため、EPA/AA を求める際にはそれぞれの濃度の確認が必要であるが、この比率はヒトと同様に心疾患のリスクの指標として期待できることが示唆された。

脂肪酸濃度と心エコーパラメーターの間には、AA と LVIDd/Ao、DTA と LVIDd/Ao、DPA と FS、そして EPA/AA と LA/Ao の間に有意な関係を認めた。さらに、脂肪酸の重量比では、DPA と FS そして DPA と LA/Ao の間に有意な関係を認めた。これらのことから、血清中脂肪酸は、心臓各部位の画像診断学的な形態変化や機能変化を反映していると考えられた。

ヒトでは EPA 濃度と EPA/AA が、種々の心血管系疾患の予後因子として用いられていることから、これらのカットオフ値を求めたところ、両者の感度は同じであったが、EPA 濃度の特異度は EPA/AA よりも高かった。これまで心疾患犬に対する EPA の投与が有効であることが報告されているが、投与するタイミングを示唆した報告はない。したがって、今回求めた EPA 濃度と EPA/AA のカットオフ値は、MI を中心とした慢性心不全犬で EPA を含有する脂肪酸サプリメントの投与時期を決定する指標として有効であると考えられた。今後さらに、これらの指標をもとにした EPA の投与による臨床的効果と血清中脂肪酸組成の関連を明らかにする必要があると考えられる。

4 小括

ISACHC 分類された MI 犬の脂肪酸の変化は、グレードの進行にともなう SFA、MUFA そして PUFA の濃度の増減から、心筋のエネルギーとしての利用よりも生理活性作用に大きく影響していると考えられる。I 群と II 群の AA 濃度は健常群よりも有意に低値であったが、II 群と III 群の EPA 濃度は健常群よりも有意に低値であった。これらの変化から、MI 犬は病期によって n-6 と n-3 の脂肪酸のバランスが健常犬とは異なることが示された。また、ステアリン酸、DPA そして MA の重量比は、PUFA 濃度の低下にともない相対的に増加した。さらに、SFA/PUFA と EPA/AA この変化から、血清中脂肪酸の濃度と重量比は両方を合わせて評価する必要性が示された。また、脂肪酸の濃度、重量比そして比率は心エコーパラメーターと有意な相関を認めたことから、心臓の画像診断学的な形態異常や機能異常が心筋エネルギー代謝あるいは全身的な炎症反応と関連することが示唆された。

MI 犬に対する治療としての EPA 投与のタイミングを計るために EPA 濃度と EPA/AA のカットオフ値を求めたが、これらのカットオフ値は、MI を中心とした慢性心不全犬で EPA を含有する脂肪酸サプリメントの投与時期を決定する指標として有効であると考えられた。今後さらに、これらの指標をもとにした EPA の投与による臨床的効果と血清中脂肪酸組成の関連を明らかにする必要があると考えられる。

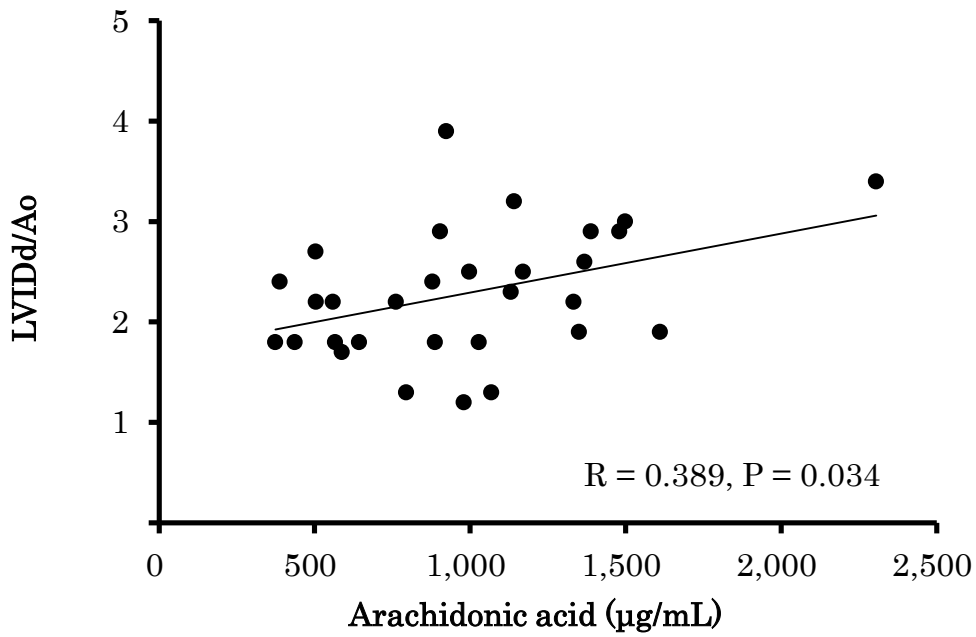


Fig. 1 Scatter plot with the approximate straight line of arachidonic acid concentration and LVIDd/Ao.
LVIDd/Ao: left ventricular end-diastolic diameter index.

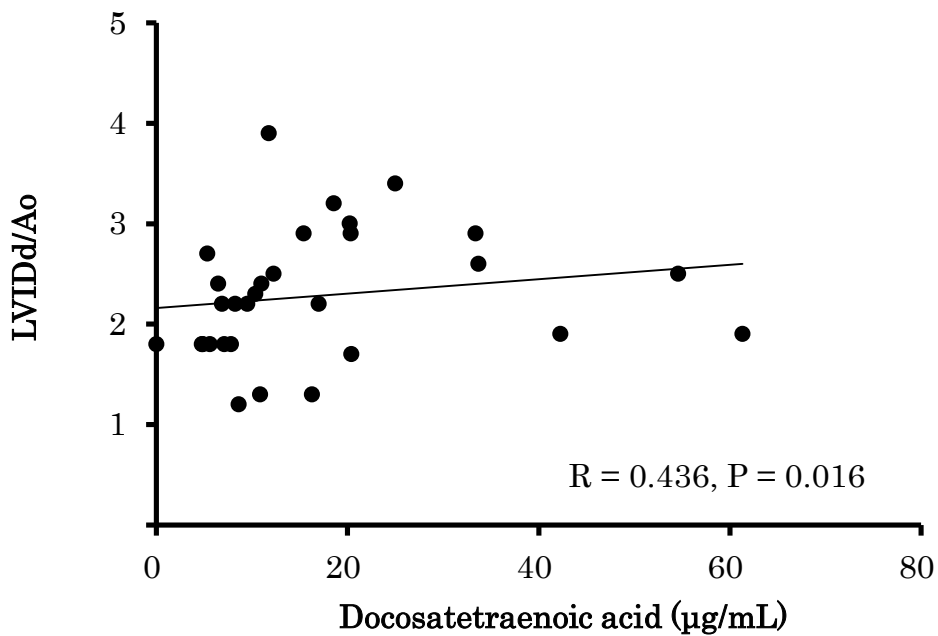


Fig. 2 Scatter plot with the approximate straight line of docosatetraenoic acid concentration and LVIDd/Ao.
LVIDd/Ao: left ventricular end-diastolic diameter index.

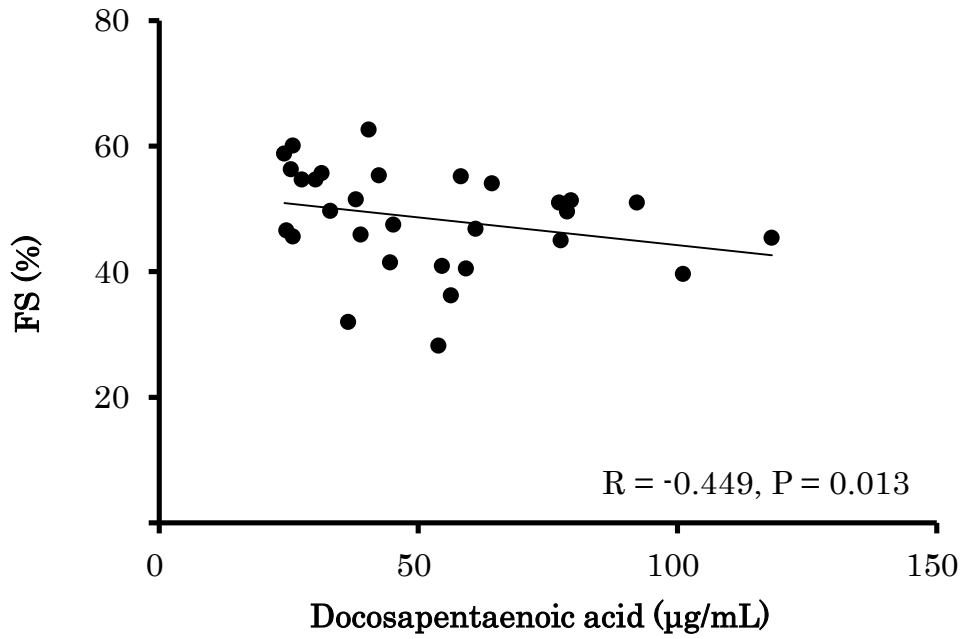


Fig. 3 Scatter plot with the approximate straight line of docosapentaenoic acid concentration and FS.
FS: fractional shortening.

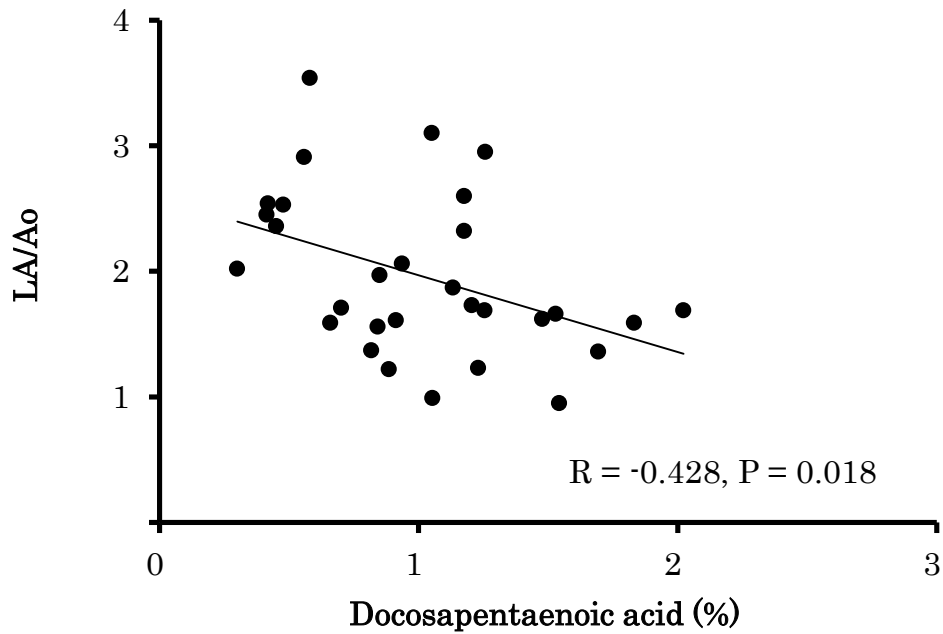


Fig. 4 Scatter plot with the approximate straight line between ratio by weight of docosapentaenoic acid and LA/Ao.
LA/Ao: left atrial to aortic root ratio.

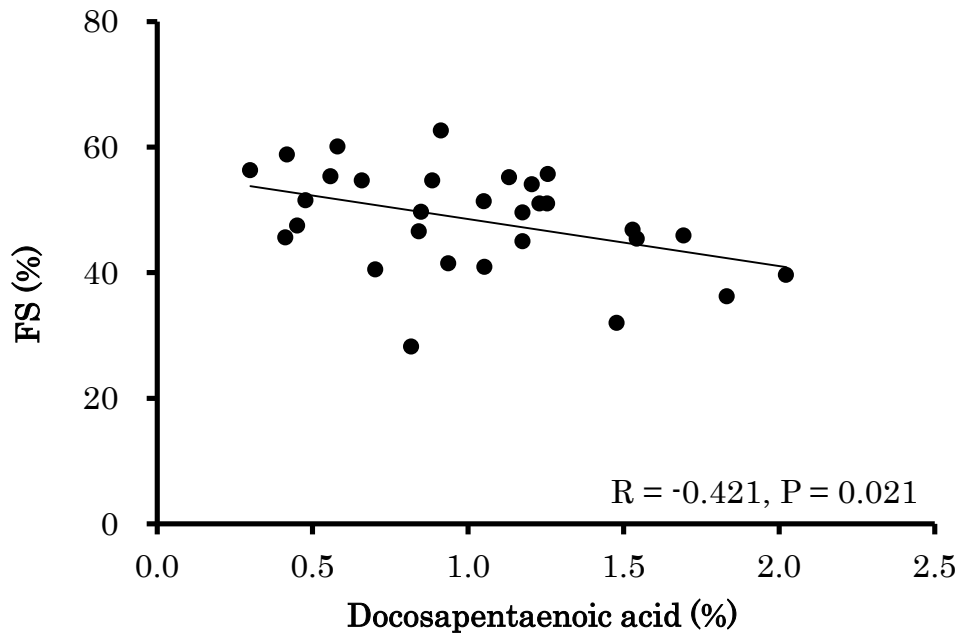


Fig. 5 Scatter plot with the approximate straight line between weight ratio of docosapentaenoic acid and FS.
 FS: fractional shortening.

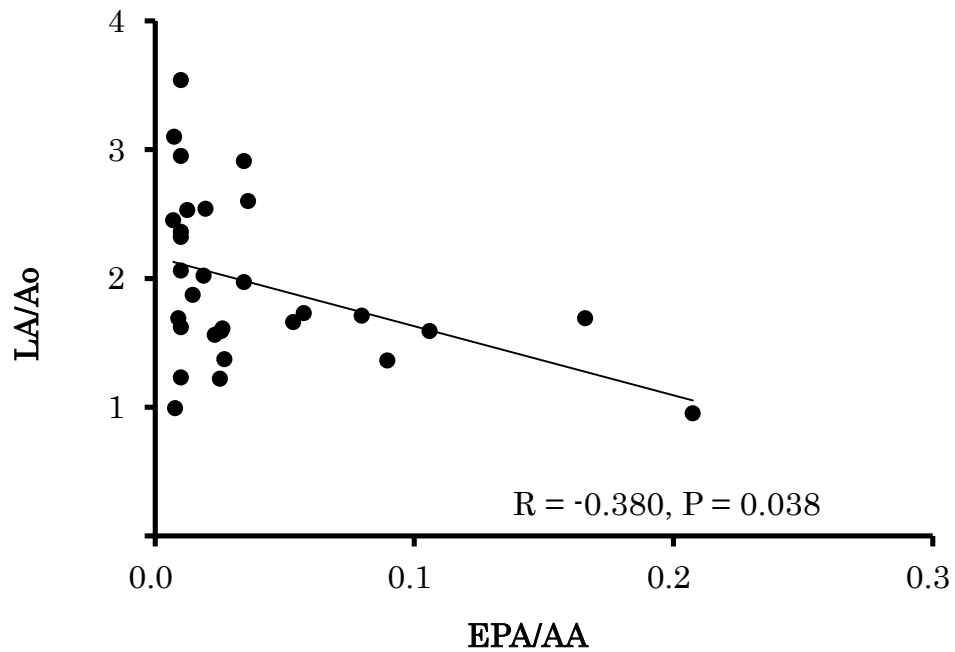


Fig. 6 Scatter plot with the approximate straight line of EPA/AA and LA/Ao.
 EPA/AA: serum eicosapentaenoic acid/ arachidonic acid ratio.
 LA/Ao: left atrial to aortic root ratio.

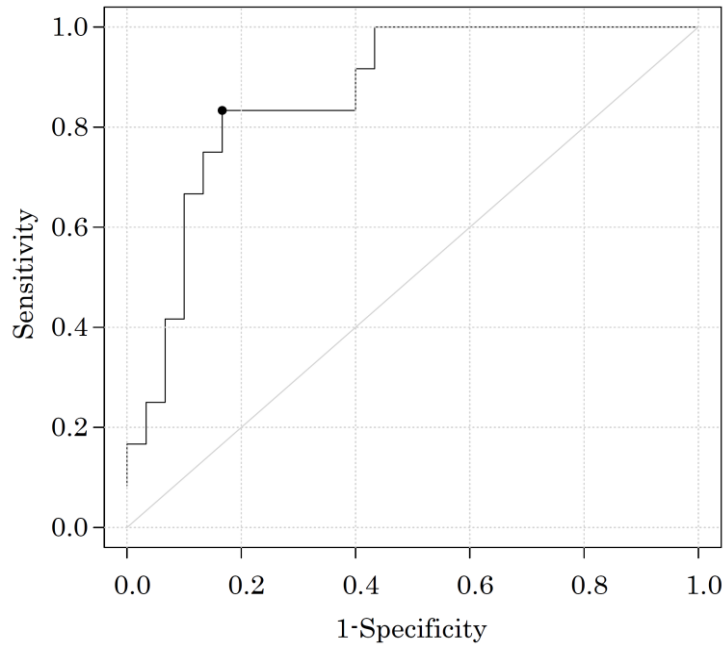


Fig. 7 ROC curve of eicosapentaenoic acid concentration to determine of dogs with mitral valve insufficiency. Point shows a cutoff value (47.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The area under the curve is 0.865. The sensitivity is 83.33% . The specificity is 83.33%.

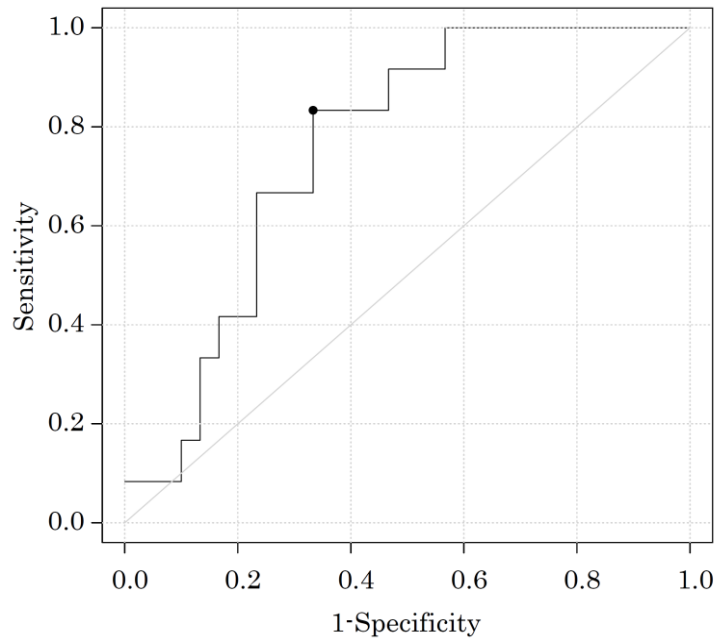


Fig. 8 ROC curve of eicosapentaenoic acid /arachidonic acid ratio to determine of dogs with mitral valve insufficiency. Point shows a cutoff value (0.029). The area under the curve is 0.753. The sensitivity is 83.33%. The specificity is 66.67%.

Table 1 The characteristics data in healthy controls and dogs with mitral insufficiency

Kind of bleed	Controls	ISACHC classification		
		I	II	III
Number	12	13	8	9
Age(years)	8.4±2.2	9.9±4.0	10.4±2.3	10.0±1.7
body weight(kg)	4.4±2.2	5.3±2.2	3.7±1.3	6.6±2.1
Male(castrated male)	3 (3)	1 (3)	5 (1)	3 (1)
Female(spayed female)	2 (4)	4 (5)	1 (1)	1 (4)
Breeds				
Chihuahua	5	3	2	1
CKCS	1	4	0	3
Miniature Schnauzer	0	1	0	0
Mixed breed	1	0	1	1
Norfolk terrier	0	1	0	1
Papillon	1	0	0	1
Pomeranian	0	1	3	1
Shiba	0	1	0	0
Shih Tzu	1	1	2	1
Toy poodle	2	0	0	0
Yorkshire terrier	1	1	0	0

CKCS: Cavalier King Charles Spaniel,

Age and body weight are expressed as mean ± standard deviation

Table 2 Serum fatty acid concentrations in the dogs of ISACHC I group

Kind of fatty acid	Group of ISACHC I	
	Non-Admin	ACEI
Total fatty acid	5959.5 ± 929.9	4406.7±648.7
Total SFA	1901.4 ± 306.9	1438.6 ± 191.8
Palmitic acid	873.4 ± 156.5	632.4 ± 98.0
Stearic acid	1025.5 ± 154.7	803.8 ± 101.3
Total MUFA	917.6 ± 195.3	585.8 ± 92.4
Palmitoleic acid	61.8 ± 14.4	33.2 ± 9.4
Oleic acid	854.0 ± 182.4	551.2 ± 88.3
Total PUFA	3140.4 ± 438.6	2382.3 ± 379.8
Total n-3 fatty acid	283.5 ± 70.8	239.6 ± 50.0
α-linolenate acid	33.0 ± 9.3	25.1 ± 1.8
Eicosapentaenoic acid	63.3 ± 33.2	38.5 ± 16.3
Docosapentaenoic acid	67.7 ± 11.4	59.6 ± 10.3
Docosahexaenoic acid	119.4 ± 29.0	116.4 ± 31.2
Total n-6 fatty acid	2851.2 ± 379.4	2136.6 ± 391.5
Linoleic acid	1776.7 ± 287.2	1266.1 ± 227.9
DGLA	54.7 ± 15.1	30.5 ± 6.2
Arachidonic acid	1002.0 ± 108.0	820.3 ± 161.0
Docosatetraenoic acid	14.3 ± 4.7	15.4 ± 7.7
Total n-9 fatty acid	861.5 ± 182.7	558.7 ± 90.0
MA	5.8 ± 1.1	6.1 ± 1.6

ISACHC, International Small Animal Cardiac Health Council,
 Non-Admin: non administration group,
 ACEI: administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor group,
 SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid,
 PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid,
 MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA,
 Fatty acid concentrations are expressed as µg/mL,
 Data are expressed as mean ± standard error

Table 3 Serum fatty acid concentrations in the dogs of ISACHC II group

Kind of fatty acid	Group of ISACHC II	
	Non-Admin	ACEI
Total fatty acid	5549.2 ± 589.0	5348.1 ± 1006.8
Total SFA	1840.1 ± 243.3	1776.1 ± 407.0
Palmitic acid	867.9 ± 182.7	868.9 ± 254.1
Stearic acid	958.8 ± 52.2	888.3 ± 154.1
Total MUFA	984.7 ± 338.0	997.7 ± 399.2
Palmitoleic acid	54.9 ± 31.5	49.4 ± 19.1
Oleic acid	923.7 ± 302.1	937.2 ± 373.8
Total PUFA	2724.4 ± 164.2	2574.2 ± 375.7
Total n-3 fatty acid	200.1 ± 53.1	139.4 ± 24.7
α-linolenate acid	41.8 ± 24.3	19.6 ± 9.4
Eicosapentaenoic acid	13.5 ± 9.7	26.6 ± 9.9
Docosapentaenoic acid	59.3 ± 10.1	34.9 ± 7.4
Docosahexaenoic acid	85.5 ± 21.0	58.3 ± 9.0
Total n-6 fatty acid	2515.6 ± 160.8	2428.6 ± 356.5
Linoleic acid	1629.2 ± 116.7	1465.1 ± 254.2
DGLA	70.3 ± 26.5	56.6 ± 13.1
Arachidonic acid	786.5 ± 205.0	859.3 ± 154.6
Docosatetraenoic acid	14.4 ± 4.1	23.8 ± 10.3
Total n-9 fatty acid	938.5 ± 308.2	953.6 ± 380.3
MA	8.6 ± 1.2	6.2 ± 1.2

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council,
 Non-Admin: non administration group,
 ACEI: administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor group,
 SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid,
 PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid,
 MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA,
 Fatty acid concentrations are expressed as µg/mL,
 Data are expressed as mean ± standard error

Table 4 Serum fatty acid weight ratios in the dogs of ISACHC I group

Kind of fatty acid	Group of ISACHC I	
	Non-Admin	ACEI
Total SFA	31.70 ± 0.49	33.10 ± 0.61
Palmitic acid	14.29 ± 0.62	14.47 ± 0.76
Stearic acid	17.37 ± 0.60	18.58 ± 0.61
Total MUFA	14.65 ± 1.16	13.22 ± 1.20
Palmitoleic acid	0.96 ± 0.16	0.76 ± 0.21
Oleic acid	13.66 ± 1.06	12.42 ± 1.04
Total PUFA	53.65 ± 1.36	53.69 ± 1.22
Total n-3 fatty acid	4.41 ± 0.79	6.27 ± 1.41
α -linolenate acid	0.49 ± 0.11	0.65 ± 0.12
Eicosapentaenoic acid	0.91 ± 0.43	1.01 ± 0.37
Docosapentaenoic acid	1.21 ± 0.15	1.39 ± 0.17
Docosahexaenoic acid	1.81 ± 0.41	3.21 ± 0.88
Total n-6 fatty acid	49.12 ± 1.65	47.28 ± 1.95
Linoleic acid	29.85 ± 0.99	28.08 ± 1.04
DGLA	0.79 ± 0.16	0.80 ± 0.15
Arachidonic acid	18.11 ± 1.87	18.02 ± 1.08
Docosatetraenoic acid	0.31 ± 0.12	0.29 ± 0.09
Total n-9 fatty acid	13.81 ± 1.05	12.59 ± 1.07
MA	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.02

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council,
 Non-Admin: non administration group,
 ACEI: administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor group,
 SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid,
 PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid,
 MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA,
 Fatty acid weight ratios are expressed as %,
 Data are expressed as mean \pm standard error

Table 5 Serum fatty acid weight ratios in the dogs of ISACHC II group

Kind of fatty acid	Group of ISACHC II	
	Non-Admin	ACEI
Total SFA	33.01 ± 1.09	32.55 ± 1.39
Palmitic acid	15.32 ± 1.52	15.50 ± 1.58
Stearic acid	17.49 ± 1.19	16.77 ± 0.31
Total MUFA	17.00 ± 4.05	16.86 ± 3.37
Palmitoleic acid	0.90 ± 0.43	0.81 ± 0.17
Oleic acid	16.01 ± 3.57	15.89 ± 3.15
Total PUFA	49.98 ± 5.08	50.59 ± 4.75
Total n-3 fatty acid	3.49 ± 0.55	2.77 ± 0.41
α-linolenate acid	0.70 ± 0.36	0.29 ± 0.10
Eicosapentaenoic acid	0.21 ± 0.14	0.49 ± 0.18
Docosapentaenoic acid	1.05 ± 0.07	0.77 ± 0.20
Docosahexaenoic acid	1.52 ± 0.33	1.22 ± 0.21
Total n-6 fatty acid	46.34 ± 5.50	47.70 ± 4.44
Linoleic acid	30.41 ± 4.94	27.87 ± 2.19
DGLA	1.37 ± 0.61	1.13 ± 0.24
Arachidonic acid	14.08 ± 3.61	17.78 ± 3.04
Docosatetraenoic acid	0.25 ± 0.06	0.49 ± 0.23
Total n-9 fatty acid	16.26 ± 3.65	16.17 ± 3.20
MA	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.03

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council,
 Non-Admin: non administration group,
 ACEI: administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor group,
 SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid,
 PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid,
 MA: 5, 8, 11-eicosatorienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA,
 Fatty acid weight ratios are expressed as %,
 Data are expressed as mean ± standard error

Table 6 Ratio of serum fatty acids in the dogs of ISACHC I group

Kind of ratio	Group of ISACHC I	
	Non-Admin	ACEI
SFA/PUFA	0.59 ± 0.02	0.62 ± 0.02
MUFA/PUFA	0.28 ± 0.03	0.25 ± 0.03
n-6/n-3	14.71 ± 4.64	11.86 ± 3.61
n-9/n-3	3.90 ± 0.94	3.00 ± 0.82
EPA/AA	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council,
 Non-Admin: non administration group, ACEI: administration of
 angiotensin-converting enzyme inhibitor group, SFA/ PUFA:
 total saturated fatty acid/ total polyunsaturated fatty acid ratio,
 MUFA/ PUFA: total monounsaturated fatty acid/ total
 polyunsaturated fatty acid ratio,
 n-6/ n-3: total n-6 fatty acid/ total n-3 fatty acid ratio,
 n-9/ n-3: total n-9 fatty acid/ total n-3 fatty acid ratio,
 EPA/ AA: eicosapentaenoic acid/ arachidonic acid ratio,
 Data are expressed as mean ± standard error

Table 7 Ratio of serum fatty acids in the dogs of ISACHC II group

Kind of ratio	Group of ISACHC II	
	Non-Admin	ACEI
SFA/PUFA	0.68 ± 0.09	0.69 ± 0.13
MUFA/PUFA	0.37 ± 0.13	0.39 ± 0.14
n-6/n-3	14.26 ± 3.20	17.96 ± 1.56
n-9/n-3	4.67 ± 0.76	7.14 ± 2.75
EPA/AA	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council,
 Non-Admin: non administration group, ACEI: administration of
 angiotensin-converting enzyme inhibitor group, SFA/ PUFA:
 total saturated fatty acid/ total polyunsaturated fatty acid ratio,
 MUFA/ PUFA: total monounsaturated fatty acid/ total
 polyunsaturated fatty acid ratio,
 n-6/ n-3: total n-6 fatty acid/ total n-3 fatty acid ratio,
 n-9/ n-3: total n-9 fatty acid/ total n-3 fatty acid ratio,
 EPA/ AA: eicosapentaenoic acid/ arachidonic acid ratio
 Data are expressed as mean ± standard error

Table 8 Echocardiographic parameters in the dogs of ISACHC I group

Echocardiography parameter	Group of ISACHC I	
	Non-Admin	ACEI
LA/Ao	1.6 ± 0.4	1.5 ± 0.2
FS (%)	39.7 ± 7.8	49.3 ± 9.3
LVIDd/Ao	2.0 ± 0.5	1.9 ± 0.3
LVIDs/Ao	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.3

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council,
 Non-Admin: non administration group,
 ACEI: administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor
 group, LA/Ao: left atrial to aortic root ratio, FS: fractional
 shortening, LVIDd/Ao: left-ventricular internal dimension in
 diastole to aortic root ratio, LVIDs/Ao: left-ventricular internal
 dimension in systole to aortic root ratio, Data are expressed as
 mean ± standard error

Table 9 Echocardiographic parameters in the dogs of ISACHC II group

Echocardiography parameter	Group of ISACHC II	
	Non-Admin	ACEI
LA/Ao	1.9 ± 0.8	2.2 ± 0.6
FS (%)	44.0 ± 4.9	55.2 ± 0.9
LVIDd/Ao	2.2 ± 0.8	2.5 ± 0.5
LVIDs/Ao	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.2

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council,
 Non-Admin: non administration group,
 ACEI: administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor group, LA/Ao: left atrial to aortic root ratio, FS: fractional shortening, LVIDd/Ao: left ventricular internal dimension in diastole to aortic root ratio, LVIDs/Ao: left-ventricular internal dimension in systole to aortic root ratio, Data are expressed as mean ± standard error

Table 10 Fatty acid concentrations in the group of healthy controls and dogs with mitral insufficiency dogs

Kind of fatty acid	Control	ISACHC Classification		
		I	II	III
Total fatty acid	7124.9 ± 669.2	5123.4 ± 574.0	5423.5 ± 632.9	6262.5 ± 754.5
Total SFA	1689.0 ± 154.4	1652.2 ± 180.2	1800.1 ± 256.2	1883.7 ± 235.7
Palmitic acid	742.3 ± 68.7	743.6 ± 92.2	868.6 ± 163.2	867.4 ± 126.7
Stearic acid	922.5 ± 82.4	906.1 ± 91.6	914.7 ± 94.6	1013.1 ± 115.7
Total MUFA	836.6 ± 80.8	738.9 ± 109.2	992.9 ± 263.0	958.8 ± 154.3
Palmitoleic acid	57.9 ± 9.6	46.4 ± 9.0	51.4 ± 15.4	73.8 ± 13.4
Oleic acid	766.6 ± 73.9	691.0 ± 102.0	932.1 ± 244.3	883.2 ± 142.3
Total PUFA	4599.4 ± 525.2	2732.2 ± 296.2*	2630.5 ± 232.5*	3420.0 ± 475.1
Total n-3 fatty acid	418.4 ± 83.2	259.9 ± 41.0	162.2 ± 25.4*	160.9 ± 15.6*
α-linolenate acid	32.6 ± 9.6	28.8 ± 4.4	27.9 ± 10.5	23.4 ± 5.3
Eicosapentaenoic acid	106.3 ± 25.0	50.0 ± 17.2	21.7 ± 7.1*	12.8 ± 3.1**
Docosapentaenoic acid	68.2 ± 17.3	63.4 ± 7.4	44.0 ± 7.1	43.3 ± 7.1
Docosahexaenoic acid	211.4 ± 50.2	117.8 ± 20.6	68.5 ± 10.1	81.4 ± 11.4
Total n-6 fatty acid	4176.0 ± 484.9	2466.4 ± 282.0*	2461.2 ± 220.0*	3253.8 ± 467.8
Linoleic acid	2426.8 ± 280.8	1501.8 ± 187.7*	1526.6 ± 159.5	1915.5 ± 328.6
DGLA	65.1 ± 5.6	41.6 ± 8.2	61.7 ± 11.9	74.2 ± 11.3
Arachidonic acid	1610.2 ± 207.7	904.2 ± 99.5**	832.0 ± 114.9*	1238.7 ± 182.7
Docosatetraenoic acid	38.3 ± 8.0	14.9 ± 4.5*	20.2 ± 6.5	17.1 ± 2.9
Total n-9 fatty acid	779.0 ± 74.8	698.5 ± 102.5	948.0 ± 248.6	889.9 ± 142.9
MA	4.9 ± 0.8	6.0 ± 0.9	7.1 ± 0.9	5.3 ± 0.8

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council, SFA: saturated fatty acid, MUFA:

monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid,

MA: 5, 8, 11-eicosatrienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA,

Fatty acid concentrations are expressed as µg/mL, Data are expressed as mean ± standard error,

*: Significantly different from the Control group ($P < 0.05$),

***: Significantly different from the Control group ($P < 0.05$)

Table 11 Serum fatty acid weight ratios in the group of healthy controls and dogs with mitral insufficiency

Kind of fatty acid	Control	ISACHC Classification		
		I	II	III
Total SFA	24.38 ± 1.52	32.45 ± 0.43**	32.72 ± 0.91**	30.41 ± 1.20**
Palmitic acid	10.81 ± 0.79	14.38 ± 0.48	15.43 ± 1.07	13.89 ± 0.86
Stearic acid	3.23 ± 0.68	18.02 ± 0.45**	17.04 ± 0.45**	16.47 ± 0.59**
Total MUFA	12.21 ± 0.89	13.88 ± 0.83	16.92 ± 2.41	15.46 ± 1.62
Palmitoleic acid	0.87 ± 0.16	0.86 ± 0.13	0.85 ± 0.18	1.22 ± 0.20
Oleic acid	11.15 ± 0.76	13.00 ± 0.74	15.93 ± 2.22	14.21 ± 1.45
Total PUFA	63.41 ± 2.21	53.67 ± 0.87*	50.36 ± 3.29*	54.13 ± 2.42
Total n-3 fatty acid	5.94 ± 1.20	5.41 ± 0.85	3.04 ± 0.33	2.80 ± 0.29†
α-linolenic acid	0.44 ± 0.12	0.58 ± 0.08	0.45 ± 0.15	0.41 ± 0.08
Eicosapentaenoic acid	1.57 ± 0.45	0.97 ± 0.27	0.38 ± 0.13*	0.24 ± 0.07**
Docosapentaenoic acid	0.92 ± 0.17	1.30 ± 0.12	0.87 ± 0.13	0.72 ± 0.10†
Docosahexaenoic acid	3.01 ± 0.72	2.56 ± 0.53	1.33 ± 0.18	1.44 ± 0.20
Total n-6 fatty acid	57.40 ± 2.03	48.13 ± 1.27**	47.19 ± 3.22	51.25 ± 2.39
Linoleic acid	33.29 ± 1.39	28.89 ± 0.74	28.82 ± 2.13	29.96 ± 2.10
DGLA	0.95 ± 0.06	0.80 ± 0.10	1.22 ± 0.25	1.19 ± 0.09
Arachidonic acid	22.13 ± 1.46	18.06 ± 0.99	16.39 ± 2.27	19.70 ± 1.82
Docosatetraenoic acid	0.53 ± 0.08	0.30 ± 0.07	0.40 ± 0.14	0.27 ± 0.04
Total n-9 fatty acid	11.40 ± 0.77	13.15 ± 0.74	16.21 ± 2.26	14.33 ± 1.45
MA	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02*	0.08 ± 0.01

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council, SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid, DGLA: dihomogamma-linolenic acid, MA: 5, 8, 11-eicosatrienoic acid, Total n-9 FA: sum of oleic acid and MA, Fatty acid weight ratios are expressed as %, Data are expressed as mean ± standard error,

*: Significantly different from the Control group ($P < 0.05$),

** : Significantly different from the Control group ($P < 0.01$), †: Significantly different from the I group ($P < 0.05$)

Table 12 Ratio of serum fatty acids in the group of healthy controls and dogs with mitral insufficiency

Kind of ratio	Control	ISACHC Classification		
		I	II	III
SFA/PUFA	0.40 ± 0.04	0.61 ± 0.01**	0.69 ± 0.08*	0.58 ± 0.04
MUFA/PUFA	0.20 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.38 ± 0.09	0.30 ± 0.05
n-6/n-3	14.97 ± 3.19	13.18 ± 2.80	16.57 ± 1.56	20.92 ± 3.67
n-9/n-3	3.22 ± 0.83	3.42 ± 0.61	6.22 ± 1.72	5.82 ± 1.03
EPA/AA	0.09 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.01*	0.01 ± 0.00**

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council, SFA/ PUFA: total saturated fatty acid/ total polyunsaturated fatty acid ratio, MUFA/ PUFA: total monounsaturated fatty acid/ total polyunsaturated fatty acid ratio, n-6/ n-3: total n-6 fatty acid/ total n-3 fatty acid ratio, n-9/ n-3: total n-9 fatty acid/ total n-3 fatty acid ratio, EPA/AA: eicosapentaenoic acid/ arachidonic acid ratio,

Data are expressed as mean ± standard error,

*: Significantly different from the Control group ($P < 0.05$),

**: Significantly different from the Control group ($P < 0.05$)

Table 13 Echocardiographic parameters in dogs with mitral insufficiency

Echocardiography parameter	ISACHC Classification		
	I	II	III
number	13	8	9
LA/Ao	1.6 ± 0.3	2.1 ± 0.7	2.4 ± 0.6**
FS (%)	44.9 ± 9.7	51.0 ± 6.4	51.4 ± 5.1
LVIDd/Ao	2.0 ± 0.4	2.4 ± 0.6	2.3 ± 1.0
LVIDs/Ao	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council,
 LA/Ao: left atrial to aortic root ratio, FS: fractional shortening,
 LVIDd/Ao: left-ventricular internal dimension in diastole to aortic root
 ratio, LVIDs/Ao: left-ventricular internal dimension in systole to aortic
 root ratio

Data are expressed as mean ± standard error,

** : Significantly different from I group ($P < 0.01$)

Table 14 Correlation between serum fatty acid concentrations and echocardiographic parameters

Kind of fatty acid	LA/Ao		FS		LVIdd/Ao		LVIDs/Ao	
	R	P value	R	P value	R	P value	R	P value
Total fatty acid	0.191	0.313	0.025	0.896	0.199	0.292	0.228	0.226
Total SFA	0.127	0.504	0.012	0.950	0.129	0.495	0.154	0.418
Palmitic acid	0.152	0.424	0.011	0.956	0.125	0.510	0.145	0.445
Stearic acid	0.220	0.244	-0.052	0.784	0.256	0.171	0.189	0.318
Total MUFA	0.324	0.081	0.084	0.659	0.328	0.077	0.255	0.173
Palmitoleic acid	0.270	0.149	0.163	0.388	0.273	0.144	0.228	0.225
Oleic acid	0.324	0.080	0.071	0.709	0.339	0.067	0.271	0.148
Total PUFA	0.196	0.298	-0.009	0.963	0.186	0.324	0.226	0.230
Total n-3 fatty acid	-0.106	0.578	-0.357	0.053	0.050	0.792	0.233	0.215
α -linolenate acid	0.023	0.903	-0.159	0.402	0.095	0.616	0.153	0.420
Eicosapentaenoic acid	-0.208	0.269	-0.141	0.457	-0.129	0.498	-0.055	0.774
Docosapentaenoic acid	-0.188	0.319	-0.449*	0.013	-0.118	0.536	0.133	0.483
Docosahexaenoic acid	-0.118	0.533	-0.295	0.113	0.053	0.782	0.256	0.172
Total n-6 fatty acid	0.226	0.230	0.023	0.905	0.194	0.305	0.210	0.265
Linoleic acid	0.178	0.348	-0.072	0.704	0.131	0.489	0.083	0.663
DGLA	0.329	0.075	0.028	0.883	0.312	0.093	0.330	0.075
Arachidonic acid	0.335	0.070	0.160	0.399	0.389*	0.034	0.344	0.063
Docosatetraenoic acid	0.322	0.083	0.204	0.279	0.436*	0.016	0.351	0.057
Total n-9 fatty acid	0.326	0.079	0.074	0.697	0.339	0.066	0.269	0.150
MA	0.016	0.932	0.078	0.681	0.135	0.475	0.217	0.250

LA/Ao: left atrial to aortic root ratio, FS: fractional shortening, LVIdd/Ao: left-ventricular internal dimension in diastole to aortic root ratio, LVIDs/Ao: left-ventricular internal dimension in systole to aortic root ratio, R: correlation coefficient, *: Significant correlation ($P < 0.05$)

Table 15 Correlation between serum fatty acid weight ratios and echocardiographic parameters

Kind of fatty acid	LA/Ao		FS		LVIDd/Ao		LVIDs/Ao	
	<i>R</i>	<i>P</i> value	<i>R</i>	<i>P</i> value	<i>R</i>	<i>P</i> value	<i>R</i>	<i>P</i> value
Total SFA	-0.156	0.411	-0.105	0.582	-0.117	0.539	-0.074	0.699
Palmitic acid	-0.116	0.541	-0.024	0.900	-0.042	0.827	-0.027	0.888
Stearic acid	-0.209	0.269	-0.106	0.577	-0.329	0.076	-0.333	0.072
Total MUFA	0.208	0.271	0.196	0.298	0.241	0.200	0.170	0.368
Palmitoleic acid	0.238	0.205	0.311	0.094	0.224	0.234	0.067	0.724
Oleic acid	0.154	0.415	0.152	0.421	0.188	0.319	0.147	0.439
Total PUFA	-0.058	0.761	-0.079	0.678	-0.112	0.557	-0.095	0.616
Total n-3 fatty acid	-0.344	0.063	-0.332	0.073	-0.189	0.318	-0.022	0.909
α -linolenate acid	-0.102	0.591	-0.085	0.653	0.008	0.967	0.100	0.599
Eicosapentaenoic acid	-0.343	0.063	-0.144	0.446	-0.219	0.245	-0.153	0.419
Docosapentaenoic acid	-0.428*	0.018	-0.421*	0.021	-0.349	0.059	-0.063	0.742
Docosahexaenoic acid	-0.232	0.217	-0.236	0.209	-0.083	0.664	0.017	0.931
Total n-6 fatty acid	0.101	0.596	-0.003	0.986	0.012	0.952	-0.015	0.938
Linoleic acid	-0.156	0.409	-0.241	0.199	-0.341	0.065	-0.246	0.189
DGLA	0.205	0.276	0.108	0.571	0.216	0.252	0.160	0.399
Arachidonic acid	0.243	0.196	0.188	0.320	0.290	0.120	0.185	0.327
Docosatetraenoic acid	0.145	0.443	0.258	0.169	0.310	0.096	0.252	0.180
Total n-9 fatty acid	0.166	0.382	0.164	0.386	0.208	0.271	0.164	0.386
MA	-0.190	0.315	-0.021	0.914	-0.071	0.710	0.024	0.901

LA/Ao: left atrial to aortic root ratio, FS: fractional shortening, LVIDd/Ao: left-ventricular internal dimension in diastole to aortic root ratio, LVIDs/Ao: left-ventricular internal dimension in systole to aortic root ratio, *R*: correlation coefficient, *: Significant correlation ($P < 0.05$)

Table 16 Correlation between serum fatty acid ratios and echocardiographic parameters

Kind of ratio	LA/Ao		FS		LVIDd/Ao		LVIDs/Ao	
	<i>R</i>	<i>P</i> value	<i>R</i>	<i>P</i> value	<i>R</i>	<i>P</i> value	<i>R</i>	<i>P</i> value
SFA/PUFA	-0.083	0.664	-0.069	0.718	-0.018	0.925	0.032	0.867
MUFA/PUFA	0.201	0.286	0.205	0.278	0.234	0.213	0.159	0.403
n-6/n-3	0.330	0.075	0.274	0.142	0.212	0.260	0.069	0.718
n-9/n-3	0.347	0.060	0.260	0.165	0.208	0.270	0.106	0.577
EPA/AA	-0.376*	0.040	-0.189	0.317	-0.299	0.109	-0.218	0.248

LA/Ao: left atrial to aortic root ratio, FS: fractional shortening, LVIDd/Ao: left-ventricular internal dimension in diastole to aortic root ratio, LVIDs/Ao: left-ventricular internal dimension in systole to aortic root ratio, *R*: correlation coefficient, *: Significant correlation ($P < 0.05$)

第 6 章 総括

本研究は、犬の僧帽弁閉鎖不全症(MI)の病態メカニズム解析のため、MI の病態に関連があるとされる血中の脂肪酸組成を測定した。本論文は以下のように序論(第 1 章)を含めて 5 章にまとめられた。

1 犬の血清中脂肪酸の測定方法の検討(第 2 章)

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

2 犬の血清中脂肪酸濃度を測定するための採血時点の検討(第 3 章)

血清中脂肪酸を測定するための最適な採血時点を決めるために、健康犬を用いて血清中脂肪酸の日内変動を確認した。供試犬は、The Association of American Feed Control Officials の基準を満たした同一のフードを2ヵ月以上継続して給与中の健康雄ビーグル6頭を用いた。給餌は毎日7時と19時の2回行い、採血は午前7時の給餌前をPreとし、

その後3時間毎に24時間行った。

その結果、Preから3時間後の総MUFA、総n-9脂肪酸そしてオレイン酸の濃度は、Preよりも有意($P < 0.05$)に上昇したが、それ以後はPreとの間に有意な差を認めなかった。n-3脂肪酸においては、3時間後の α -リノレン酸(ALA)濃度が、Preよりも有意($P < 0.05$)に増加したが、6時間後からは有意な差を認めなかった。重量比のうち、エイコサペンタエン酸(EPA)はPreと比べて3時間後と6時間後、そしてドコサペンタエン酸(DPA)は3時間後が有意($P < 0.05$)に減少した。しかし、両者ともに9時間後からは有意な変化を認めなかった。これらのことから、1日に2食を給餌している犬の採血時点は、午前の給餌前あるいはその9時間以後が適当であると判断した。

3 健康犬における血清中脂肪酸組成の基準値の検討(第4章)

臨床的に健康な105頭の犬を用いて、血清中脂肪酸の濃度、重量比そして比率の基準値を検討した。供試犬は、幼年齢群、中年齢群そして高年齢群に分類し、さらにそれらの群内を雄群、去勢群、雌群そして避妊群に細分した。測定値が正規分布していた脂肪酸濃度の95%区間は、平均 ± 1.96 標準偏差から求めた。正規分布していない場合は、対数変換により正規化した後に95%区間を求め、その最小値と最大値を逆対数変換した。その結果、脂肪酸の変動因子である技術的因子(測定精度、検者内誤差、検者間誤差)、個体内因子(採血時点、性周期、運動習慣、季節の違い)そして個体間因子(食習慣、年齢、性)のうち、測定精度、検者内および検者間の誤差、採血時点、性周期、食習慣などの因子を除外することにより、年齢と性に関わらず脂肪酸の濃度、重量比そして比率に有意な差は認めなかった。このことから、脂肪酸濃度の基準

値は、年齢や性に関わらず設定可能であると考えられた。しかし、各個体の血清中脂肪酸を基準値と比較する場合には、種々の変動因子の影響を確認する必要があると考えられた。今回は供試犬の頭数が少なく、食べ物や品種の違いについてはさらにデータを蓄積し検討する必要があると考えられた。そのため、今回得られた95%区間は、本研究では参照値として用いることにした。

4 MI 犬の血清中脂肪酸組成の検討(第 5 章)

MI 犬における血清脂肪酸組成の変化について検討する目的で、MI 犬 30 頭を International Small Animal Cardiac Health Council の心機能分類にしたがって I、II そして III の 3 つの群に分類し、それらの血清中脂肪酸の濃度、重量比および比率を健常群と比較した。そして、血清中脂肪酸と心エコーパラメーターの相関関係について調べた。さらに、MI と健常犬を分別するため EPA および EPA とアラキドン酸の比(EPA/AA)の ROC 解析を行い、それらのカットオフ値を求めた。その結果、I 群と II 群のアラキドン酸(AA)濃度は、健常群に比べ有意(それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.05$)に低値であった。II 群と III 群の EPA 濃度と重量比は、健常群に比べ有意に低値であった(それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$)。また、II 群と III 群の EPA/AA は、健常群よりも有意(それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$)に低値であった。AA とドコサテトラエン酸の濃度は拡張末期左室内径指数との間に有意な正の相関(それぞれ $R = 0.396$, $P = 0.048$ と $R = 0.426$, $P = 0.027$)を認めた。そして、DPA 濃度は、左室内径短縮率(FS)との間に有意な負の相関($R = -0.437$, $P = 0.023$)を認めた。DPA の重量比は、左房径/大動脈径比(LA/Ao)および FS との間に有意な負の相関(それぞれ $R = -0.421$, $P = 0.021$ と $R =$

-0.428, $P = 0.018$)を認めた。さらに、EPA/AA は、LA/Ao との間に有意な負の相関($R = -0.383$, $P = 0.048$)を認めた。しかし、すべてのMI犬の脂肪酸濃度は参照値の範囲内であった。EPA濃度のカットオフ値は47.5 $\mu\text{g/mL}$ であり、感度と特異度はともに83.33%であった。一方、EPA/AAのカットオフ値は0.029であり、感度は83.33%そして特異度は66.67%であった。これらのことから、AAのみが低下していたI群では心筋の器質的変化がAAの代謝を活性化させ、II群におけるEPAとAAの濃度の低下は、AA代謝の活性化に追随してEPAの代謝が活性化した、あるいはサイトカインの慢性的な高濃度化が原因であると考えられた。さらに、III群では、サイトカインの慢性的な影響よりも、EPA代謝のさらなる活性化によりAA代謝が抑制されたことが推察された。また、脂肪酸と心エコーパラメーターの間には相関関係が認められたことから、血清中脂肪酸の測定は、心エコー検査による機能変化にともなう心機能異常による心筋エネルギー代謝の変化を反映することが示唆された。MI犬に対する治療としてのEPA投与のタイミングを計るためにEPA濃度とEPA/AAのカットオフ値を求めたがこれらのカットオフ値は、MIを中心とした慢性心不全犬でEPAを含有する脂肪酸サプリメントの投与時期を決定する指標として有効であると考えられた。今後さらに、これらの指標をもとにしたEPAの投与による臨床的効果と血清中脂肪酸組成の関連を明らかにする必要があると考えられる。

謝辞

稿を終わるに臨み、本研究に際して終始御指導御助言を賜りました日本獣医生命科学大学臨床獣医学部門治療学分野 I 獣医内科学研究室 小山秀一教授に心から感謝致します。

本研究に対し、多大なる御指導と御助言を賜りました、日本獣医生命科学大学臨床獣医学部門治療学分野 I 獣医内科学研究室・松本浩毅講師、水谷尚講師ならびに手嶋隆洋講師に心から感謝いたします。

本研究に対し、測定法に対する御指導と御助言を賜りました日本獣医生命科学大学獣医学総合教育部門獣医学総合教育分野生体分子化学研究室・田崎弘之教授、片山欣哉准教授、佐藤稲子助教に深謝致します。

本研究に多大なる御支援を頂いた、安房中央動物病院，作佐部有人先生、くにたち TLC 動物病院，佐野正継院長、だいき動物病院，高橋大記院長、モノカ動物病院，小林清佳院長ならびに、やよい動物病院，太田亮院長に深甚の謝意を表します。

本研究における実験および膨大なるデータの解析に対し、多大なる御協力と御支援を頂きました、日本獣医生命科学大学臨床獣医学部門治療学分野 I 獣医内科学研究室の卒業生および室員各位に心から感謝致します。

本研究を行うに際し、経済的及び精神面の両面において長きにわたり応援して頂いた、父郁夫、母秀美、妹綾香、祖父次郎そして祖母登美に心から感謝致します。

最後になりましたが、本研究に御協力頂いた多くの動物たちに心から感謝するとともに、将来この研究成果が多くの動物たちのために活用されることを願います。

参考文献

- 1 高野裕史 (2013): 犬の僧帽弁閉鎖不全症-慢性変性性房室弁疾患を中心に. 北海道獣医師会誌, **57**, 37-44.
- 2 小暮一雄 (1987): 犬の僧帽弁閉鎖不全症. 動物の循環器 **30**, 13-23.
- 3 関慶久・早山陽子・町田登 (2003): 犬の僧帽弁弁膜症病変の形態形成に関する病理学的検索. 動物の循環器, **36**, 55-65.
- 4 Kitteleson, M.D.: Myxomatous Atrioventricular valvular degeneration, pp. 297-303. In: Small animal cardiovascular medicine, Kitteleson, M.D., Kienle, R.D. ed., Mosby, St. Louis, 1998.
- 5 Kitteleson, M.D., Kienle, R.D.: Normal Clinical Cardiovascular Physiology, pp. 11-35, In: Small Animal Cardiovascular medicine, Kitteleson, M.D., Kienle, R.D. ed., Mosby, St. Louis, 1998.
- 6 岳中典男・堤悦朗・中村亮一 (1971): 心筋の糖質および脂質利用の相関, 心臓, **3**, 401.
- 7 Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D. L., Jaswal, J. S. and Stanley, W. C. (2010): Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological reviews*, **90**, 207-258.
- 8 高橋俊博・山口優・佐久間清美・渡辺賢一・M. Wahed・蕾馬梅・G. Narasimman・P. Suresh・文絹・F. Kamal・白井健・曾我真也子・長井悠輔・瀬賀朋子・田沢周作 (2005): 標識脂肪酸を用いた不全心筋の評価 -心筋集積性と肥大度-, 日本薬学会要旨集, **2**, 75.
- 9 Kataoka, K., Nohara, R., Hosokawa, R., Hirai, T., Okuda, K., Li-Guang, C., Fujibayashi, Y., Fujita, M., Konishi, J., and Sasayama, S. (2001): Myocardial lipid metabolism in compensated and advanced stages of heart failure: evaluation by canine pacing model with

- BMIPP. *J. Nucl. Med.*, 42 (1), 124–129.
- 10 友田春夫; 心筋の代謝, 17–19 頁, (友田春夫編集), 心不全 循環生理からみた診断と治療, 医学書院, 東京, 2010.
- 11 Das, U. N. (2008): Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules., *Lipids Health Dis.*, 7, 37,.
- 12 有田誠 (2014): 脂肪酸代謝と炎症のメタボロミクス (AYUMI メタボローム解析の進歩). 医学のあゆみ, 249, 318–322.
- 13 伊藤浩: beyond LDL, なぜいま脂肪酸?, 1–9 頁. そうだったんだ! 脂肪酸 (伊藤浩編集), 文光堂, 東京, 2013.
- 14 Dyerberg, J., Bang, H. O. and Hjorne, N. (1975): Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 958–966.
- 15 Freeman, L. M., Rush, J. E. and Markwell, P. J. (2006): Effects of dietary modification in dogs with early chronic valvular disease. *J. Vet. Intern. Med.*, 20, 1116–1126.
- 16 Billman, G. E., Nishijima, Y., Belevych, A. E., Terentyev, D., Xu, Y., Haizlip, K. M., Monasky, M. M., Hiranandani, N., Harris, W. S., Gyorke, S., Carnes, C. a. and Janssen, P. M. L. (2010): Effects of dietary omega-3 fatty acids on ventricular function in dogs with healed myocardial infarctions: in vivo and in vitro studies. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 298, H1219–1228.

- 17 Freeman, L. M., Rush, J. E., Kehayias, J. J., Ross, J. N., Meydani, S. N., Brown, D. J., Dolnikowski, G. G., Marmor, B. N., White, M. E., Dinarello, C. a and Roubenoff, R. (1998): Nutritional alterations and the effect of fish oil supplementation in dogs with heart failure. *J. Vet. Intern. Med.*, 12, 440–448.
- 18 Ramadeen, A., Connelly, K. a., Leong-Poi, H., Hu, X., Fujii, H., Laurent, G., Domenichiello, A. F., Bazinet, R. P., and Dorian, P. (2012): Docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, supplementation reduces vulnerability to atrial fibrillation. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, 5, 978–983.
- 19 Ramadeen, A., Laurent, G., Dos Santos, C. C., Hu, X., Connelly, K. a., Holub, B. J., Mangat, I. and Dorian, P. (2010): n-3 Polyunsaturated fatty acids alter expression of fibrotic and hypertrophic genes in a dog model of atrial cardiomyopathy. *Heart Rhythm*, 7, 520–528.
- 20 Stoeckel, K., Bachmann, L., Dobeleit, G. and Fuhrmann, H. (2012): Response of plasma fatty acid profiles to changes in dietary n-3 fatty acids and its correlation with erythrocyte fatty acid profiles in dogs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*, 97, 1142-1151.
- 21 Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem*, 226, 497-509.
- 22 Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911–917.
- 23 Eder, K.(1995): Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 671, 113–131.

- 24 藤原めぐみ・佐藤稲子・田崎弘之 (2012): GC/MS 分析を用いた健常犬の血漿中脂肪酸分画の測定. 予防動物医学. **4**, 63–68.
- 25 田島紀子・関孝之・南健治・奈良部安 (2003): 脂肪酸 24 分画測定法確立および基準値に関する検討. 医学検査, **52**, 436.
- 26 中島史雄・市原謙一・堤浩子・秦洋二: 有機酸のアルキルエステル化方法及びキット, 特開 2007-1769182007.
- 27 Nishijima, F., Hidaka, E., Kubota, N., Ono, T., Nakamura, T., Honda, T., Hongo, M. and Hidaka, H. (2015): Rapid and Easy Measurement of Serum Fatty Acid Composition of Neonates, Infants and Young People Using the Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Rinsho Byori.*, 63, 187–193.
- 28 Gross, K. L., Jewell, D. E., Yamka, R. M., Schoenherr, W. D., Khoo, C., Debraekeleer, J., Friesen, K. G. and Zicker, S. C. (2010): Macronutrient, pp. 49–105. In: Small Animal Clinical Nutrition, 5th ed., Hand, M. S., Thatcher, C. D., Remillard, R. L., Roudebush, P. and Novotny, B. J ed., Mark Morris Institute, Topeka, KS, 2010.
- 29 Dzanis, D. A. (1994): The Association of American Feed Control Officials Dog and Cat Food Nutrient Profiles: substantiation of nutritional adequacy of complete and balanced pet foods in the United States. *J. Nutr.*, 124, Suppl, 2535S–2539S.
- 30 Press, N. A.: National Research Council., Nutrient requirements and signs of deficiency, pp. 2–38. In: Nutrient Requirements of Dogs, National Academy Press, Washington, D.C., 1985.
- 31 Renauld, A. and Garrido, D. (1992): Effect of glucose infusion in dogs on blood sugar, insulinemia and serum free fatty acid responses.

- Medicina (B. Aires)*, 52, 150–156.
- 32 Renauld, A., Sverdlik, R. C. and Garrido, D. (1980): Blood sugar, serum insulin and serum free fatty acid responses to slow graded glucose in thyroxine-treated dogs. *Acta Diabetol. Lat.*, 17, 189–197.
- 33 小田民美・秋山蘭・生野佐織・上田香織・丸山夏輝・佐伯香織・森昭博・左向敏紀(2013): 健常犬におけるホルモンリズムが血糖値日内変動におよぼす影響. ペット栄養学会誌, 16, Suppl_30–31.
- 34 Kimura, Y. and Hara, S. (2008): The effect of electro-acupuncture stimulation on rhythm of autonomic nervous system in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 70, 349–352.
- 35 Moilanen, T. and Nikkari, T. (1981): The effect of storage on the fatty acid composition of human serum. *Clin.Chim.Acta.*, 114,111–116.
- 36 コレステロール. ガイトン生理学 第 11 版 (御手洗玄洋総監訳), 894–895 頁 , エルゼビア・ジャパン, 東京, 2010.
- 37 河合忠 (2006): 基準値と境界値とカットオフ値,基準値と異常値の間-その判定と対策-. 改訂 6 版 (河合忠編集), 1–5 頁, 中外医学社, 東京, 2006.
- 38 Ichihara, K., Boyd, J. C. and IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL). (2010): An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 48, pp. 1537–1551.
- 39 北尾学・長谷川清・井庭信幸・金田健一・沢原光信・田頭稔弘(1976): 性ホルモンと脂質代謝. 産婦人科の世界, 28, 983–990.
- 40 Phemister, R. D., Holst, P. a, Spano, J. S. and Hopwood, M. L. (1973):

- Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol. Reprod.*, 8, 74–82.
- 41 佐久間一郎・岸本憲明・筒井裕之 (2011): わが国男女における年齢別 EPA・アラキドン酸比の現況 若年層での低下と動脈硬化性疾患若年発症への懸念. 日本未病システム学会雑誌, 16, 407–409.
- 42 Matsumura, K. (2013): Plasma fatty acid composition and eicosapentaenoic acid (EPA)/arachidonic acid (AA) ratio in healthy people and patients with coronary artery disease living in local urban area surrounding farm villages. *J. Japanese Coron. Assoc.*, 19, 209–215.
- 43 Kritchevsky, D. (1980): Age-related changes in lipid metabolism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 165, 193–199.
- 44 中谷矩章: 血清脂質を左右する因子. 血清脂質 標準値の設定 (山本章, 中村治雄, 八杉忠雄編集), 67–77 頁, 協和企画通信, 東京, 1988.
- 45 Lohner, S., Fekete, K., Marosvölgyi, T. and Decsi, T. (2013): Gender differences in the long-chain polyunsaturated fatty acid status: systematic review of 51 publications. *Ann. Nutr. Metab.*, 62, 98–112.
- 46 Nakabou, M., Kai, T., Maeshima, T. and Kanamasa, K. (2011): Relationship between EPA or EPA/AA and arteriosclerosis in elderly patients over 80 years old. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi.*, 48, 672–678.
- 47 佐久間一郎 (2013): 脂肪酸のバランスが崩れてきている現代人. そうだったんだ! 脂肪酸 (伊藤浩編集), 40–45 頁, 文光堂, 東京, 2013.
- 48 Smith, C. E., Freeman, L. M., Rush, J. E., Cunningham, S. M. and Biourge, V. (2007): Omega-3 fatty acids in Boxer dogs with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J. Vet. Intern.*

- Med.*, 21, 265–273.
- 49 Kang, J. X. (2007): Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids.*, 77, 263–267.
- 50 清水俊明 (2003): n-3 系多価不飽和脂肪酸の各種病態に対する有用性の検討. 順天堂医学, **49**, 12.
- 51 Wander, R. C., Hall, J. a, Gradin, J. L., Du, S. H. and Jewell, D. E. (1997): The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. *J. Nutr.*, 127, 1198–1205.
- 52 板倉弘重: 脂肪酸をわかりやすく説明しましょう. そうだったんだ! 脂肪酸(伊藤浩編集), 11–31 頁, 文光堂, 東京, 2013.
- 53 International Small Animal Cardiac Health Council. Recommendations for diagnosis of heart disease and treatment of heart failure in small animals.pp.883-901, In: Textbook of canine and feline cardiology 2nd ed., Fox, P. R., Sisson, D. and Moise, S. N. ed., W.B. Saunders: Philadelphia, 1999.
- 54 Chetboul, V. and Tissier, R. (2012): Echocardiographic assessment of canine degenerative mitral valve disease. *J. Vet. Cardiol.*, 14, 127–148.
- 55 Sargent, J., Muzzi, R., Mukherjee, R., Somarathne, S., Schranz, K., Stephenson, H., Connolly, D., Brodbelt, D. and Fuentes, V. L. (2015): Echocardiographic predictors of survival in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J. Vet. Cardiol.*, 17, 1–12.
- 56 Reynolds, C. A., Brown, D. C., Rush, J. E., Fox, P. R., Nguyenba, T. P., Lehmkuhl, L. B., Gordon, S. G., Kellihan, H. B., Stepien, R. L.,

- Lefbom, B. K., Kate Meier, C. and Oyama, M. A. (2012): Prediction of first onset of congestive heart failure in dogs with degenerative mitral valve disease: The PREDICT cohort study. *J. Vet. Cardiol.* 14, 193–202.
- 57 Suzuki, R., Matsumoto, H., Teshima, T., Mochizuki, Y. and Koyama, H. (2013): Left ventricular geometrical differences in dogs with various stages of myxomatous mitral valve disease. *J. Small Anim. Pract.*, 54, 234–239.
- 58 Suzuki, R., Matsumoto, H., Teshima, T. and Koyama, H. (2013): Clinical assessment of systolic myocardial deformations in dogs with chronic mitral valve insufficiency using two-dimensional speckle-tracking echocardiography. *J. Vet. Cardiol.* 15, 41–49.
- 59 Brown, D. J., Rush, J. E., MacGregor, J., Ross, J. N., Brewer, B. and Rand, W. M. (2003): M-mode echocardiographic ratio indices in normal dogs, cats, and horses: a novel quantitative method. *J. Vet. Intern. Med.*, 17, 653–662.
- 60 山村雄一 (1971): 総説 心筋の代謝. 心臓, 3, 3.
- 61 Kuriki, K., Nagaya, T., Tokudome, Y., Imaeda, N., Fujiwara, N., Sato, J., Goto, C., Ikeda, M., Maki, S., Tajima, K. and Tokudome, S. (2003): Plasma concentrations of (n-3) highly unsaturated fatty acids are good biomarkers of relative dietary fatty acid intakes: a cross-sectional study. *J. Nutr.*, 133, 3643–3650.
- 62 Hall, J. A., Picton, R. A., Skinner, M. M., Jewell, D. E. and Wander, R. C. (2006): The (n-3) fatty acid dose, independent of the (n-6) to (n-3) fatty acid ratio, affects the plasma fatty acid profile of normal dogs.

- J. Nutr.*, 136, 2338–2344.
- 63 Feldman, A M., Combes, A., Wagner, D., Kadakomi, T., Kubota, T., Li, Y. Y. and McTiernan, C. (2000): The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 35, 537–544.
- 64 Testa, M., Yeh, M., Lee, P., Fanelli, R., Loperfido, F., Berman, J. W. and LeJemtel, T. H. (1996): Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 28, 964–971.
- 65 Endo, J., Sano, M. and Isobe, Y. (2014): 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling. *J. Exp. Med.*, 211, 1673-1687.
- 66 有田誠 (2013): 炎症のメタボローム解析から明らかになった好酸球の新規機能. 生化学, **85**, 97–102.
- 67 有田誠 (2011): メタボローム解析から明らかになった 炎症の収束にかかわる好酸球と脂質メディエーターの新規機能. 内分泌・糖尿病・代謝内科, **33**, 573.
- 68 有田誠 (2012): 炎症の収束に関わる脂質メディエーターの代謝と網羅的解析. 日本鼻科学会会誌, **51**, 60.

Basic study on serum fatty acid compositions in
dogs with mitral insufficiency

Summary of Doctor Thesis

Hiroki Yoshimatsu

Graduate school of Veterinary and Life Science
Nippon Veterinary and Life Science University

Mitral insufficiency (MI) is caused by myxomatous transformation degeneration, and is the most common chronic heart disease in dogs. A variety of supplements for the MI, have become popular, in addition to the general heart disease therapeutic agents. Products mainly composed of fatty acids are also used for MI patients, but studies on the pathogenesis of MI with blood fatty acid composition are small. Fatty acids are a major energy source for normal myocardium, which occupies 60-90% of the ATP production in the myocardium. However, if the heart muscle is subjected to a load, the energy is known to change to utilization of glucose from fatty acids. Changes in the fatty acid metabolism in heart failure caused by the aberrance of the regulation of calcium ion in myocardial cell construction and of the cardiac muscle cell membrane, by the accumulation of fat in the myocardium are considered as further worsen the heart failure.

The gas chromatograph (GC) and high-performance liquid chromatography are commonly used for the measurement of canine serum fatty acid. The GC method is suited with can be measured by small sample and the capacity of separation is high. However become this method requires the processes of extraction and methylation of the fatty acids from serum. These processes require specialized equipment and high-temperature heating. Because of compensation, serum fatty acid measurement has not become common in the veterinary field. This is one of the reasons, the relationship between serum fatty acid composition and

pathophysiology in dogs have not been investigated.

In this study we 1) examined the method with the fatty acid methylation kit and the methylated fatty acid purification kit, to measure serum fatty acids in dogs, 2) examined the circadian variation in serum fatty acids to determine the optimal blood sampling time point for measuring in healthy dogs, 3) set a criterion range for serum fatty acid compositions in healthy dogs and 4) compared serum fatty acid compositions in dogs with MI by the stage of the classification and then correlations between fatty acids and echocardiographic parameters were confirmed.

1. Methods for measuring canine serum fatty acids (Chapter 2)

We examined the practicality of fatty acid measurements by gas chromatography (GC) method using the kits for the methylated fatty acid and purification of methylated fatty acid. First, the results of this method were compared with the conventional method. Secondly, reproducibility of the within - run and between-run, and the inter class reliability was confirmed. As a result, a total of 13 kinds of fatty acids were quantifiable; the saturated fatty acids (SFA) 2 types, monounsaturated fatty acids (MUFA) 2 kinds and polyunsaturated fatty acids (PUFA) 9 types.

This method demonstrated a high correlation with all kinds of fatty acids between the conventional method (correlation coefficient: 0.875 to 1.000). Range of coefficient of variance (CV) in within-run reproducibility was 2.0% to 7.4%. In addition, CV in the

between-run reproducibility was 0.4% to 2.8%. Further, no significant differences were observed between examiners. The current method can be used safely and conveniently with high accuracy as compared with the conventional method.

2. Blood sampling point for measuring the serum fatty acid level of dogs. (Chapter 3)

We examined the circadian variation in serum fatty acids to determine the optimal blood sampling time point for measuring in healthy dogs. Six healthy male beagles were fed the same food that meets the criteria of the Association of American Feed Control Officials for more than 2 months. They were fed twice daily at 7:00 and 19:00. The blood samples collected immediately before food provision at 7:00 am (Pre) and every 3rd hour for 24 hours. The results indicate that the total MUFA of 3 hours after the Pre, the level of total n-9 fatty acid and oleic acid increased significantly ($P < 0.05$) than the Pre. There were no significant differences from Pre, however. In the n-3 fatty acid, the levels of α -linoleic acid (ALA) at 3 hours after the meal in the morning were significantly higher than the corresponding Pre levels ($P < 0.05$), and there were no significant difference of 6 hours or more after. In the serum fatty acid weight ratios, 3h and 6h eicosapentaenoic acid (EPA) and 3h docosapentaenoic acid (DPA) decreased significantly ($P < 0.05$) than the Pre. There were no significant changes at 9 hours or more. These results indicate that the optimal timing of blood sampling is

when the animals are hungriest, i.e., before breakfast, and that it is desirable to interpose a 9-hour or more interval when sampling is performed after morning meal.

3. Setting a criterion range for serum fatty acid compositions in healthy dogs (Chapter 4)

The level, weight ratio and proportion of each serum fatty acids of 105 clinically healthy dogs were examined for setting criterion range. The dogs were divided into groups of puppy, young adults and mature adults. Further, these groups were subdivided into an uncastrated male group, a castrated male group, an unsterilized female group, and a sterilized female group. The variable factors of fatty acids were the technical, the intraindivisual and interindividisual. By excluding factor of the blood sampling point, sexual cycle and dietary habits no significant differences by age or sex were observed in the level, weight ratio and the ratio of serum fatty acids. Therefore, the criterion range of the fatty acid level was considered to be fixed regardless of age or sex. However, in order to compare the serum fatty acids of individuals, it is necessary to confirm the effects of various fluctuation factors. Because of the small number of dogs used in this study, further data needs to be accumulated to determine the effect of food and breed. Therefore, these 95% intervals were to be used as a reference range in the present study.

4. Serum fatty acid compositions in dogs with MI (Chapter 5)

We divided 30 dogs with MI into groups I, II, and III, based on MI severity, based guideline with the International Small Animal Cardiac Heart Council and compared levels, weight ratios and the ratios of serum fatty acid among these groups and a healthy control group. The changes in serum fatty acid composition of MI dogs were examined and compared. In addition, correlations of serum fatty acid compositions with echocardiographic parameters in dogs with MI were analyzed. In order to differentiate healthy dogs and dogs with MI, we analyzed and determined the cutoff values, EPA and the ratio of EPA and arachidonic acid (EPA/AA) by the ROC. As a result, arachidonic acid (AA) level in groups I and II were significantly lower than that in the healthy group ($P < 0.01$, $P < 0.05$, respectively). Serum level and weight ratio of EPA in groups II and III were significantly lower than that in the healthy group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). In addition, the EPA / AA ratio in groups II and III were significantly lower than that in healthy group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). In group I, with low AA, the structural change of myocardium activated AA metabolism and in group II, the decrescence of serum EPA and AA levels is caused by the metabolic activation of EPA following AA. These changes might be concerned in the cytokines as tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 that increased in chronic heart failure. Furthermore, the decrease of AA in group III is thought to be caused by the activation of EPA metabolism by these cytokines.

Significant positive correlations of serum AA and docosatetraenoic acid levels by the left ventricular end-diastolic diameter index were noted in the MI group. A significant negative correlation was noted between the DPA level and fractional shortening (FS). The DPA weight ratio had a significant negative correlation with both left atrial to aortic root ratio (LA/Ao) and FS. Furthermore, a significant negative correlation was noted between EPA/AA and LA/Ao. From these results, the expansion of the left ventricle increases the n-6 fatty acids in the serum fatty acid that are substrates of pro-inflammatory eicosanoids. Additionally, increase of FS and LA/Ao that suggested to develop of mitral regurgitation, decrease n-3 fatty acids and EPA/AA which is a substrate of anti-inflammatory eicosanoids. Therefore, serum fatty acids suggested that reflect changes in myocardial energy metabolism associated with the progress of the heart failure.

Then, the cutoff value of EPA level, determined to timing of administration of the fatty acid supplements used as a therapeutic adjunct to MI, was 47.5 µg/mL, that sensitivity and specificity were both 83.33%. On the other hand, the cutoff value of EPA/AA was 0.029, with sensitivity and specificity of 83.33% and 66.67%, respectively. Therefore, these values were likely to be the indicative of the timing of treatment of EPA.

The GC method with kits for the purification of methylated fatty acid and methylated fatty acids proved to be a stable and

convenient method, with comparable accuracy of the conventional method, for measuring the fatty acid composition in the blood that is to be associated with the pathology of MI. The recommended timing of blood sampling for measuring the serum fatty acids is in the morning feeding before or at least 9 hours thereafter. The reference value of serum fatty acids of healthy dogs, age or sex, showed no significant difference. Further studies with more subjects and different breeds are recommended. The serum fatty acid composition in dogs with MI was different from the healthy dogs, and it reflected the grade of cardiac function. The correlation between fatty acid ratio and the echocardiographic parameters were observed. It was suggested that changes in serum fatty acid value reflect the abnormal form of the myocardium. The cutoff values of EPA level and EPA/AA were likely to be the indicative of the timing of treatment of EPA. We need to find out the association of clinical effect and serum fatty acid composition by the administration of EPA based on these indicative.