

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)

学位論文の要約

獣医生命科学研究科獣医学専攻博士課程平成 24 年入学

吉松 宏基

(指導教授 小山 秀一)

粘液腫様変性による僧帽弁閉鎖不全症 (MI) は、犬における最も一般的な慢性心疾患である。近年、慢性心疾患である MI に対して、一般的な心疾患治療薬以外にさまざまな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。しかし、心筋が負荷にさらされると、エネルギーは脂肪酸利用からブドウ糖利用へと傾くことが知られている。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 Ca 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。

犬の血清中脂肪酸の測定には、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ている。GC 法は、分離能が高く少量の試料で測定できるが、血清中からの脂肪酸の抽出とメチル化が必要であり、その処理には特殊な器具や高温加熱などの過程でその扱いに注意が必要であるため一般的な検査項目となっていない。このため、犬の血清中脂肪酸組成に関しては、不明な点が多く、その病態との関連は明らかでない。

そこで本研究では、1) 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。2) 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。3) 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、4) MI 犬を病期で分類し血清中脂肪酸組成を比較し、さらに脂肪酸と心エコーパ

ラメーターとの関連を確認した。

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 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 種類の脂肪酸定量が可能であった。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、その精度が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、健常犬を用いて血清中脂肪酸の日内変動を調べた。供試犬は、米国飼料検査官協会の基準を満たした、同一のフードを 2 ヶ月以上継続して給与中の健常雄ビーグル 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. 健常犬における血清中脂肪酸組成の基準値の検討 (第 4 章)

臨床的に健常な 105 頭の犬を用いて、血清中脂肪酸の濃度、重量比そして脂肪酸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。その結果、脂肪酸の変動因子である技術的因子、個体内因子そして個体間因子のうち、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、重量比そして脂肪酸比率に有意差を認めなかった。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、今回の結果は、多くの変動因子に制限を設けた結果であるため、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ステージ 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、重量比および脂肪酸比率を健常群と比較した。そして、本研究では血清中脂肪酸と心エコーパラメーターとの相関関係についても調べた。さらに、MI 犬と健常犬の間で 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、すべての MI 犬の脂肪酸濃度は参照値の範囲内であったが、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。これらのことから、AA のみが低下していた I 群では軽度の容量負荷においても心筋では AA 代謝の活性化が起こっていると考えられ、II 群における EPA と AA の低下は、AA の代謝活性化に追随して EPA の代謝が活性化したと推察した。そして、これらの変化は慢性心不全で上昇する腫瘍壊死因子- α やインターロイキン-1 などのサイトカインが関与していると考えられた。さらに、III 群ではこれらサイトカインの関与が影響し、EPA のさらなる代謝の活性化により AA の活性が抑制されたことが推察された。

心エコーパラメーターとの検討では、AA とドコサテトラエン酸の濃度は左室拡張末期径指数との間に有意な正の相関を認めた。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を認めた。さらに、EPA/AA は、LA/Ao との間に有意な負の相関を認めた。以上のことから、血清中脂肪酸では、左室の拡張に伴い炎症促進性エイコサノイドの基質である n-6 系脂肪酸が増加し、僧帽弁逆流の増加を示唆する FS や LA/Ao の上昇に伴い炎症抑制性エイコサノイドの基質である n-3 系脂肪酸および EPA/AA が低下することが明らかとなった。このことから、血清中脂肪酸は心不全の病態の進行に伴う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。

次に、MI 犬に対する治療補助として使用されている脂肪酸サプリメントの投与時期を判断するために求めた EPA 濃度のカットオフ値は 47.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

MI 犬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するために、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 法の測定方法を検討した結果、従来法に比べ安全かつ短時間で従来法と同等の精度で測定値を得ることができた。そして、血清中脂肪酸を測定するための採血のタイミングは、午前の給餌前あるいはその 9 時間以後が適当であった。また、健常犬における血清中脂肪酸の基準値について検討した結果、年齢や性による分類では、それらの測定値に有意差を認めないことが示

されたが、品種や頭数などを増やしてさらに検討する必要があると考えられた。さらに、MI 犬の血清中脂肪酸組成は、健常犬とは有意に異なり、その種類は心機能のグレードにより異なった。そして、心エコーパラメーターとの間に相関を認める脂肪酸や比率が認められた。これらのことから、MI 犬の血清中脂肪酸の変化は、心筋の形態異常を反映することが示唆された。そして、EPA 濃度と EPA/AA のカットオフ値は、EPA を給与するタイミングの指標となる可能性が示された。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。