

チワワの腸管由来脂肪酸結合蛋白、D型/L型乳酸、腸内細菌叢解析を用いた粘液腫様変性性僧帽弁閉鎖不全症の腸への合併症の研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

荒木 隆次

伴侶動物医療学 獣医麻酔学

指導教員 教授 山下 和人

2021年度

## 目次

	頁
凡 例	
諸 言	1
第 I 章 チワワにおける腸管由来脂肪酸結合蛋白 (I-FABP) による腸管粘膜障害リスクの測定：健常犬と MMVD 罹患犬との比較	
1.1 小 緒	5
1.2. 材料と方法	7
1) 症例	7
2) 使用機器	7
3) 心臓検査方法	7
4) 腸管由来脂肪酸結合蛋白 (I-FABP) 測定方法	8
5) 統計方法	10
1.3. 結 果	11
1.4. 考 察	15
1.5. 小 括	17
第 II 章 チワワにおける D 型/L 型-乳酸を用いた腸管粘膜障害リスクおよび組織の低酸素状態の評価：健常犬と MMVD 罹患犬との比較	
2.1. 小 緒	19
2.2. 材料と方法	21
1) 症例	21
2) 使用機器	21
3) 心臓検査方法	21
4) D 型乳酸測定方法	21

5)	L型乳酸測定方法	22
6)	統計方法	24
2.3.	結 果	25
2.4.	考 察	28
2.5.	小 括	30
第Ⅲ章	次世代シーケンスを用いた健常犬およびMMVD罹患犬の腸内細菌叢の同定	
3.1.	小 緒	32
3.2.	材料と方法	34
1)	症例	34
2)	使用機器	34
3)	心臓検査方法	35
4)	糞便サンプルからのDNA抽出	35
5)	16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス	35
6)	16S rRNA 遺伝子アンプリコン配列の処理	36
7)	統計解析	36
8)	微生物の存在の解析	37
3.3.	結 果	38
3.4.	考 察	41
3.5.	小 括	45
総 括		46
謝 辞		49
引用文献		50
英文要約		62

## 凡例

ACVIM; American College of Veterinary Internal Medicine, アメリカ獣医内科学会

A vel; Atrial Wave Velocity, 心房収縮波

BCS; Body Condition Score, ボディ・コンディション・スコア

CKD; Chronic Kidney Disease, 慢性腎臓病

E vel; Early Wave Velocity, 拡張早期波

FS; Fraction Shortening, 左室短縮率

I-FABP; Intestinal Fatty Acid-Binding Protein, 腸管由来脂肪酸結合蛋白

IVSDd; Interventricular Septum Diameter in Diastole, 左室中隔壁厚

LA/Ao; Left Atrium/Aorta, 左房径・大動脈比

LVEF; Left Ventricular Ejection Fraction, 左室駆出率

LVIDd; Left Ventricular Internal Diameter in Diastole, 拡張末期左室内径

LVIDs; Left Ventricular Internal Diameter in Systole, 収縮末期左室内径

LVIDDN; Left Ventricular Internal Diameter in Diastole, Indexed to the body weight, 体重標準化拡張末期左室内径

LVPWd; Left ventricular posterior wall thickness in Diastole, 拡張末期左室自由壁厚

MMVD; Myxomatous Mitral Valve Disease, 粘液腫様変性僧帽弁閉鎖不全症

TMAO; Trimethylamine N-Oxide, トリメチルアミンNオキシド

VHS; Vertebral Heart Size, 椎体心臓サイズ

VLAS; Vertebral Left Atrial Size, 脊椎左房サイズ

## 緒 言

身体は小宇宙と言われるように複雑な事象が絡んでいる。そのため、単一臓器だけではその病態を把握、強いては治療を実施する事が困難である事が多々存在する。多臓器円環（ホメオダイナミクス）とは、各臓器、組織が免疫、代謝、自律神経などの高次ネットワークを介して、時間的・空間的に変動連携する事で生命体を維持する恒常性維持機構であり、疾病に対して、特定の臓器を独立的に治療するのではなく、体全体を総合的に診療する必要があるというものである。このような臓器間での相互作用に関する研究が活発に行われており、多くの報告がある[3, 6, 30, 31, 39, 51, 52, 55, 56, 61-65, 69, 75-77]。心臓病と他臓器との相互作用に関しても明らかになっており、肝臓や腎臓、肺といった臓器との関連性に関する報告がされており、「心肝連関」や「心腎連関」といった概念も広まっている[62, 69]。

心臓病と相互作用のある臓器の一つに腸があり、「心腸連関」という新しい概念が構築され研究が行われている[3, 30, 31, 39, 51, 52, 55, 56, 61, 63-65, 69, 75, 76]。心不全患者では、心拍出量の減少や右心房圧上昇による静脈の鬱滞などにより、腸に解剖学的、機能的変化がもたらされる。具体的には、心不全による心臓からの拍出量減少は、腸管膜動脈や腸管粘膜の毛細血管の低灌流を引き起こし、その結果、腸管粘膜の透過性亢進を引き起こす。また、右心房圧上昇による静脈鬱滞は、腸管粘膜の浮腫を引き起こし、その結果、腸管粘膜の透過性亢進を引き起こす。腸管粘膜の透過性が亢進することで腸のバリア機能は低下し、腸内細菌やグラム陰性菌の細胞壁に含まれるリポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）といった細胞内毒素が腸を通過し、腸管膜リンパ節や全身循環に侵入する可能性がある。その結果、全身性の炎症反応が引き起こされ、全身性炎症反応がさらなる心不全の増悪を引き起こす[17, 61, 63-65]。また、腸内細菌由来代謝産物であるトリメチルアミン N オキシド（Trimethylamine N-oxide, TMAO）が、動脈硬化を引き起こす原因であることが明らかになっており、さらには急性冠症候群、心不全、慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease, CKD）患者にて予後不良因子であることが報告されている[31, 52, 75, 76]。

腸内細菌叢の変化や特定の腸内細菌叢の菌種が、肥満や糖尿病、アレルギー疾患といった様々な疾患と関連性があることが明らかになっており、心血管疾患との関連性も報告されている[22, 43, 75]。心不全患者では、腸管虚血などにより腸内細菌叢の変化がもたらされ、腸内細菌叢の多様性が変化することが報告されている[39]。また、腸内細菌叢の変化が冠動脈疾患のリスクを増加させ、腸内細菌叢を整えることで冠動脈疾患のリスクを減少させることも報告されている[75]。このように人の医療では、「心腸連関」の概念のもと多くの研究が行われ早期治療が推奨されており、心臓と腸の相互関係が非常に重要であると理解されている。

犬の粘液腫様変性性僧帽弁閉鎖不全症(Myxomatous Mitral Valve Disease, MMVD)は、小型犬におけるうっ血性心不全の最も一般的な原因であり、房室弁の進行性粘液性変性を特徴とする[4, 7, 35]。キャバリア・キング・チャールズ・スパニエルやマルチーズ、トイ・プードルなどが好発犬種と報告され、臨床現場では飼育頭数の多さからも、チワワにおいて MMVD はよく認められる[4]。MMVD の重症度は、アメリカ獣医内科学会(American College of Veterinary Internal Medicine, ACVIM)が定めたコンセンサスガイドラインが用いられる[35]。MMVD が悪化すると、左房圧上昇や左房拡大により肺水腫や不整脈といった、致命的な合併症を引き起こされる[35]。長期にわたる MMVD による心不全は、体の血流低下を引き起こし、腎臓や膵臓などの重要な臓器に虚血性障害を引き起こす可能性が示唆されている[7, 25, 58]。

人医療において、多くの研究が行われている「心腸連関」であるが、獣医療における報告は少ない。以上のことから、本研究では、獣医療における心臓病と腸との関連性を明らかにすることを目的とし、健常犬および MMVD 罹患犬を対象に、血清中の腸管粘膜障害マーカーや次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を用いた糞便中の腸内細菌叢を調査し、比較検討を行った。

まず第 I 章では、人医療において有用な腸管粘膜障害マーカーとして研究されている腸管由来脂肪酸結合蛋白(Intestinal Fatty Acid-Binding Protein, I-FABP)を用いて、健常犬および MMVD 罹患犬の腸管粘膜障害リスクを比較検討した。次いで、第 II 章では、組織や細胞の低酸素状態を把握するバイオマーカーとして人医療や獣医療でも使用されている L 型乳酸、人医療において腸管粘膜

障害マーカーとして研究されている D 型乳酸を用いて、健常犬および MMVD 罹患犬を比較検討した。そして第 III 章では、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析にて、健常犬および MMVD 罹患犬の糞便中の腸内細菌叢を特定し、結果を比較検討することで、心臓病と腸や腸内細菌叢との関連性について検討した。

## 第 I 章

腸管由来脂肪酸結合蛋白 (I-FABP) による腸管粘膜障害リスクの測定  
：健全犬と粘液腫様変性性僧帽弁疾患 (MMVD) 罹患犬との比較



## 1.1. 小 緒

心不全による拍出量の減少は、腸間膜動脈や腸管粘膜の微小血管への低灌流を引き起こす[30, 31, 39, 51, 52, 61, 63-65]。低灌流による虚血や再灌流が長引くと、細胞の機能障害や細胞死が粘膜の絨毛の先端で起こり、続いて粘膜バリアの変性や脱落が始まる[39]。これに伴い、血管内の血液濃縮、白血球の詰まり、血管運動障害、毛細血管の狭小化が始まり、内皮細胞の膨潤、微小血管の血栓形成、さらには腸管透過性の亢進、細菌の移動、感染による細菌の過剰増殖、腸間膜梗塞などが起こるようになる[21, 44, 61, 63]。このように、腸管粘膜の虚血障害は、不可逆ではなく可逆性であることが多いが、腸管壁を越えた障害は、炎症、壊死、敗血症、多臓器不全を引き起こす[17, 21, 56, 64]。そのため、腸管粘膜障害を早期に診断し、迅速に治療することが必要であると考えられている[44]。しかし、腸管粘膜虚血を早期に診断することは困難で、最終的には、腸管の正確な評価のために、外科的な検査が必要となることがある。コンピューター断層撮影装置での検査においても、急性腸管虚血を見逃すことがあり、放射線学的所見は特異度が低いことが多いと報告されている[44, 59]。白血球や乳酸アシドーシスといった血液学的検査は、いずれも腸管虚血を診断するには特異性が不十分であり、またこれらの炎症マーカーが大きく増加する場合は、すでに腸管壊死や全身性炎症にまで、進行している可能性がある[44]。そのため、腸管虚血に特異的かつ迅速に早期診断できるバイオマーカーの研究がされている。

腸管粘膜障害のバイオマーカーとして、最も有用と注目されているのがI-FABPである[5, 16, 19, 20, 28, 32, 37, 44, 50]。脂肪酸結合蛋白 (Fatty Acid-Binding Protein, FABP) は、細胞質に存在する低分子量の蛋白質で、高い臓器特異性を持つグループである[37]。腸管由来脂肪酸結合蛋白 (I-FABP) は、腸管内腔からの長鎖脂肪酸の取り込みと輸送に関与する15kDの蛋白質で、FABPグループの一つである。最大の特徴として、I-FABPは、小腸粘膜上皮細胞に局限して存在している[37, 54]。また、I-FABPは、比較的 low molecular weight の腎排泄型の可溶性細胞質蛋白のため、小腸粘膜上皮細胞が障害を受けると、速やかに血中に離脱し移行する [60]。腸疾患や全身性炎症反応症候群の患者で、I-FABPが増加することが報告されている[16, 19, 20, 57, 59]。さらに、人の心不全患者ではI-FABP

の増加が認められ、その中でI-FABPが高値の患者は生存予後期間が短いことが報告され、心不全患者での新たな予後不良因子になり得る可能性が示唆されている[37]。

そこで本章は、犬における心臓病と腸との関連性を評価するための研究として、健常犬およびMMVD罹患犬を対象に、血清中のI-FABPを測定し比較検討した。また、MMVD罹患犬における心パラメーターとI-FABPの相関性も比較検討し、MMVDが腸管粘膜におよぼす影響を考察した。

## 1.2. 材料と方法

### 1) 症例

この研究は臨床例を使用した前向き研究である。症例は、年齢  $10.4 \pm 3.1$  歳（平均±標準偏差、3歳～16歳）および体重  $3.0 \pm 1.0$ kg（1.5～6.1kg）の69頭のチワワ（雄7頭、去勢雄26頭、雌2頭、避妊雌33頭）を用いた。全ての症例は、横浜山手犬猫医療センターおよび東京動物心臓病センターの二つの機関で、2019年4月から2020年5月までの期間で、サンプル収集された。性別は、無作為に収集し、全ての症例の飼い主に、本研究に関する同意を頂いた。全ての症例で、身体検査【体重、ボディ・コンディション・スコア（Body condition score、BCS）】、聴診（心雑音の有無、強度）、既往歴、現病歴、内服中の心臓薬、抗生物質の内服の有無、室内飼いか室外飼いか、普段食べている食事内容を問診し記録した。また、胸部レントゲン検査および心臓超音波検査による心臓形態および機能の評価を行なった。得られた情報より、MMVDを有する症例をACVIMガイドラインに基づく重症度グレード（StageB1、B2、C/D）の3群に分類した[35]。心臓病を有さない症例を、健常犬（Healthy dogs、H）に分類した。I-FABPを測定するELISA法に、必要な血清サンプルも同時に採取した。

### 2) 使用機器

心臓超音波検査には、横浜山手犬猫医療センターではデジタル超音波装置（Xario, TOSHIBA, 東京）およびプローブ（セクタ型深触子 PST-50AT, 5MHz, TOSHIBA）、東京動物心臓病センターにおいてはデジタル超音波装置（Vivid E95, GE Health care Japan）およびプローブ（セクタ型深触子 6S, GE Health care Japan）を使用した。胸部レントゲン検査には、小動物専用レントゲン診断装置（VPX-500A, TOSHIBA）を用いて実施した。

### 3) 心臓検査方法

心臓超音波検査は、標準的な技術にしたがって行い、二人の検査者によってデータ収集され、検査は全て静かな部屋で行われた[72]。右側傍胸骨長軸四腔断面像にて僧帽弁の構造と機能の主観的評価、カラードップラー検査にて僧帽弁逆流ジェットの評価を行なった。右側傍胸骨短軸断面像の乳頭筋レベルにおいて、拡張末期左室中隔壁厚 (Interventricular septum thickness in diastole, IVSDd)、拡張末期左室自由壁厚 (Left ventricular posterior wall thickness in diastole, LVPWd)、拡張末期左室内径 (Left ventricular internal diameter in diastole, LVIDd)、体重で標準化した拡張末期左室内径 (Left ventricular internal diameter in diastole, indexed to the body weight, LVIDDN) [15]、収縮末期の左室内径 (Left ventricular internal diameter in systole, LVIDs)、左室短縮率 (shortening fraction, FS)、左室駆出率 (Left ventricular ejection fraction, LVEF) を測定し、記録した。右側傍胸骨短軸断面像の大動脈弁レベルにおいて、拡張期大動脈基部の左房径・大動脈比 (Left atrium/aorta, LA/Ao) を測定し、記録した。左側心尖部四腔断面像において、左室流入血流速波形の拡張早期波 (Early wave velocity, E vel) と心房収縮波 (Atrial wave velocity, A vel) を測定し、記録した。

胸部レントゲン検査は、肺水腫の有無、椎体心臓サイズ (Vertebral heart size, VHS) や脊椎左房サイズ (Vertebral left atrial size, VLAS) の記録のために、右横臥位にて最大吸気時に撮影された。VHS の測定方法は、気管分岐部腹側縁の中央部から、最も離れた心尖部の辺縁へ線を引き (長軸)、その長さが第 4 胸椎頭側縁からカウントして、胸椎何個分に相当するか測定する。また、後大静脈中央部と心陰影尾側が接する部位から、長軸と直交する直線 (短軸) の長さを、第 4 胸椎頭側縁からカウントして胸椎何個分に相当するかを測定し、長軸の測定値と合計し算出した[11]。VLAS の測定方法は、気管分岐部腹側縁の中央部から、後大静脈背側縁の左房尾側の交点へと直線を引き、その長さが第 4 胸椎頭側縁からカウントして、胸椎何個分に相当するか測定し算出した[40]。

#### 4) I-FABP 測定方法

血液サンプルを全症例にて採取した。採取方法は、頸静脈または外側伏在静

脈より採血した。得られた血液を速やかに血清分離チューブに入れ、十分に転倒混和した。凝固完了まで15～30分室温にて静置し、速やかに3000rpmで10～15分遠心を行なった。遠心分離で得られた血清をマイクロチューブに移し、-18℃にて保存し、酪農学園大学に冷凍したまま郵送し、測定まで-80℃で保存した。

I-FABP は、Canine Intestinal Fatty Acid Binding Protein ELISA Kit (Bioassay Technology Laboratory) を用いて測定した。全ての試薬は、事前に室温にて自然に温めた。120  $\mu$ l の標準液 (96 ng/ml) を、120  $\mu$ l の標準液希釈材を用いて希釈し、48ng/ml、24ng/ml、12ng/ml、6ng/ml、3ng/ml の溶液を作成した (図. 1-1)。標準希釈液は、0ng/ml として使用した。標準ウェルに 50  $\mu$ l の標準液を加え、サンプルウェルに 40  $\mu$ l のサンプルと 10  $\mu$ l の抗 I-FABP 抗体を加え、50  $\mu$ l のストレプトアビシン-HRP をサンプルウェルと標準ウェルに加えた。その後、よく混合し、37℃、60 分、インキュベートした。シーラーを除去し、洗浄液でプレート进行を洗浄した。各ウェルに 50  $\mu$ l の基質溶液 A を添加した後、50  $\mu$ l の基質溶液 B を添加し、37℃で 10 分間、暗所でインキュベートした。各ウェルに 50  $\mu$ l の停止液を加えると、青色が黄色に変化するため、10 分以内に 450nm に設定したマイクロプレートリーダーで、各ウェルの光学濃度 (Optical Density 値, OD 値) を測定した。

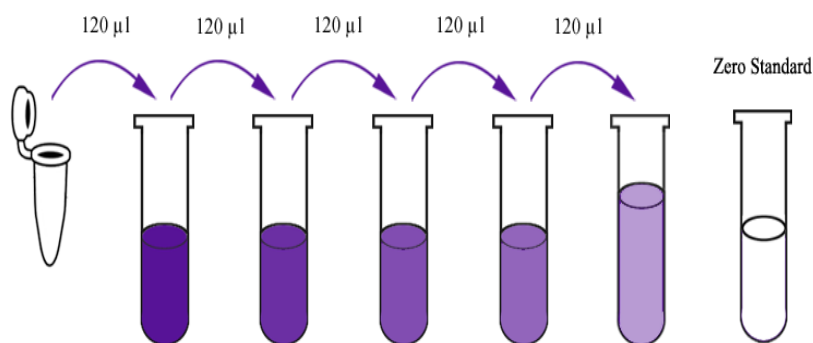


図. 1-1 ELISA 法による I-FABP の測定における試薬の作成

標準液 120  $\mu$ l の標準液 (96ng/ml) を、120  $\mu$ l の標準液希釈剤で再構成し、48ng/ml の標準液を作成した。希釈液を作る前に、穏やかに攪拌しながら 15 分間放置した。標準ストック液 (48ng/ml) を標準希釈液で 1:2 に希釈し、24ng/ml、12ng/ml、6ng/ml、3ng/ml の各溶液を作製し、標準点の複製を作成する。標準希釈液は、ゼロスタンダード (0ng/ml) として使用した。

## 5) 統計方法

データは、スプレッドシートに入力し、統計解析には SPSS ソフトウェア (SPSS statistics ver 24.0 IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。症例を分類した 4 グループに対し有意差があるか、年齢、体重、BCS は Turley-Kramer 事後検定を用いた一次配置分散分析を実施した。性別、内服中の薬剤に関しては、Fisher' s exact test を統計解析に使用した。心臓超音波および胸部レントゲン検査によって得られた各グループの値は Turley-Kramer 事後検定を用いた一次配置分散分析を実施した。ELISA 法で得られた I-FABP の結果は、Turley-Kramer 事後検定を用いた一次配置分散分析を実施した。結果は、平均値 ± 標準偏差で示し、 $p < 0.05$  にて有意差ありと判断した。

### 1.3. 結 果

健常犬および MMVD 罹患犬の症例情報を 表. 1-1 に示した。グループ H の年齢が他のグループに比べ有意に低いことが認められた。年齢に関しては、全体の有意差も認められた。しかし、性別、体重、BCS では有意差は認められなかった。また、全ての症例が室内飼いであった。グループ B2 と C/D の一症例ずつが抗生物質を内服していた。内服している心臓薬は、MMVD の重症度が増加するほど、内服している症例も増加した。グループ C/D の症例は、全ての症例がアンギオテンシン変換酵素阻害薬 (Angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACE-I) とピモベンダンの内服していた。

健常犬および MMVD 罹患犬の心臓超音波検査および胸部レントゲン検査によって得られた結果を 表. 1-2 に示した。LA、Ao、LA/Ao、LVIDd、LVIDs、LVIDDN、E vel、A vel、FS、VHS、VLAS において、全体の有意差が認められた。IVSDd、LVPWd、MR vel、LVEF において、有意差は認められなかった。LA、LA/Ao、E vel、VHS、VLAS において、グループ C/D は他のどのグループより有意に高値を示した。

図. 1-2 に、ELISA 法によって得られた各グループの血清中の I-FABP 濃度を示した。グループ H、B1、B2、C/D の血清中の I-FABP の測定値は、それぞれ、 $2.32 \pm 0.43$  ng/ml、 $3.49 \pm 0.24$  ng/ml、 $3.93 \pm 0.25$  ng/ml、 $5.50 \pm 0.57$  ng/ml であった。MMVD の重症度に比例し、I-FABP の測定値が増加することが認められた。グループ B2 はグループ H に対し、有意に測定値が高かった。グループ C/D は、他のどのグループより有意に高値であった。

表. 1-1 健常犬(H)とMMVD罹患犬(B1, B2, C/D)の症例情報

	H(n=19)	B1(n=21)	B2(n=15)	CD(n=14)	P-value for all
Age (years)	7.3±2.6 <sup>a</sup>	11.1±2.5	12.0±2.4	11.8±1.9	<0.01
Sex(M/F)	9/10	11/10	6/9	8/6	0.812
Male/Casted male	0/9	2/9	2/4	3/5	
Female/Spayed female	0/10	0/10	1/8	1/5	
BW (kg)	3.1±1.2	2.8±1.0	3.0±0.9	3.1±1.0	0.754
BCS	3.1±0.8	2.9±0.4	3.1±0.8	3.1±0.6	0.728
Environment	Indoor(n=19)	Indoor(n=21)	Indoor(n=15)	indoor(n=14)	
Antibiotics	Nothing(n=19)	Nothing(n=20) Erythromycin(n=1)	Nothing(n=15)	Nothing(n=13) Enrofloxacin(n=1)	
Medicine					
ACE-inh	n=1	n=2	n=10	n=14	<0.01
Pimobendan	nothing	n=1	n=13	n=14	<0.01
Loop-diretics	nothing	nothng	n=3	n=9	<0.01

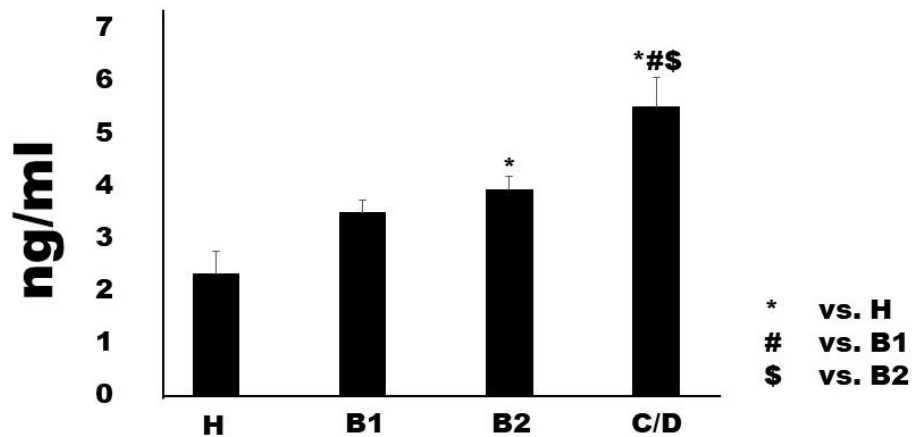
データは平均値±標準偏差で示した。上から年齢、性別、体重、BCS（5段階）、生活環境、抗生物質の内服の有無、心臓薬内服中の頭数を示した。年齢、ACE阻害薬、ピモベンダン、ループ利尿薬において、全体の有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。性別、体重、BCSにおいて、有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ :  $p = 0.728 \sim 0.812$ )。<sup>a</sup>は、グループHが他のグループに比べ、統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。



表 1-2 健康犬(H)とMMVD罹患犬 (B1, B2, C/D) の心臓検査結果

	H(n=19)	B1(n=21)	B2(n=15)	CD(n=14)	P-value for all
LA(mm)	13.2±2.2	15.2±2.7	23.3±6.1 <sup>b,d</sup>	32.0±7.4 <sup>c,e,f</sup>	<0.001
Ao(mm)	9.41±1.0	10.2±1.2	10.9±1.3 <sup>b</sup>	10.5±1.3 <sup>c</sup>	0.005
LA/Ao	1.4±0.2	1.5±0.2	2.1±0.5 <sup>b,d</sup>	3.1±0.9 <sup>c,e,f</sup>	<0.001
IVSDd(mm)	5.2±1.2	5.2±0.8	4.6±0.9	4.4±1.2	0.062
LVPWd(mm)	5.4±0.9	5.6±1.0	5.1±0.8	5.1±1.2	0.292
LVIDd(mm)	17.0±2.6	19.1±3.4	25.5±3.4 <sup>b,d</sup>	27.5±4.1 <sup>c,e</sup>	<0.001
LVIDs(mm)	10.8±2.6	12.0±2.2	14.1±2.3 <sup>b</sup>	15.5±3.6 <sup>c,e</sup>	<0.001
LVIDDN	1.7±0.2	1.8±0.1	1.9±0.1 <sup>b</sup>	1.9±0.2 <sup>c</sup>	<0.001
E vel(m/s)	0.6±0.1	0.7±0.2	0.9±0.2 <sup>b</sup>	1.3±0.5 <sup>c,e,f</sup>	<0.001
A vel(m/s)	0.6±0.2	0.8±0.2 <sup>a</sup>	1.0±0.2 <sup>b</sup>	0.8±0.3	<0.001
MR vel(m/s)	nothing	5.7±0.6	5.4±0.5	5.3±0.6	0.286
FS(%)	35.7±6.3	36.0±6.7	38.8±12.9	44.4±11.0 <sup>c</sup>	0.037
LVEF(%)	68.3±8.4	67.5±7.6	72.0±9.0	72.6±11.7	0.338
VHS(v)	9.2±0.9	9.4±0.8 <sup>a</sup>	10.6±0.7 <sup>b,d</sup>	11.5±1.2 <sup>c,e,f</sup>	<0.001
VLAS(v)	2.0±0.2	2.3±0.3 <sup>a</sup>	3.1±0.3 <sup>b,d</sup>	3.8±0.4 <sup>c,e,f</sup>	<0.001

データは平均値±標準偏差で示した。LA、Ao、LA/Ao、LVIDd、LVIDs、LVIDDN、E vel、A vel、FS、VHS、VLASにおいて、全体の有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。IVSDd、LVPWd、MR vel、LVEFにおいて、有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ :  $p = 0.062 \sim 0.338$ )。<sup>a</sup>は、グループHとグループB1に統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。<sup>b</sup>は、グループHとグループB2に統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。<sup>c</sup>は、グループHとグループC/Dに統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。<sup>d</sup>は、グループB1とグループB2に統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。<sup>e</sup>は、グループB1とグループC/Dに統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。<sup>f</sup>は、グループB2とグループC/Dに統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。



one-way ANOVA with post hoc Tukey-Kramer test. Significant difference was considered  $P < 0.05$ .

図. 1-2 健康犬(H)およびMMVD罹患犬(B1, B2, C/D)の血清中腸管由来脂肪酸結合蛋白(I-FABP)の濃度

図の縦軸は、I-FABPの濃度の単位で、ng/mlである。黒色の棒軸は、各グループの血清中のI-FABP濃度を示しており、左からグループH、B1、B2 C/Dである。右の表は、各グループの血清中のI-FABP濃度の値を示しており、上段が平均値、下段が標準偏差を示した。記号は、各グループ間での有意差を示しており、 $p < 0.05$ にて有意差ありとした。

#### 1.4. 考 察

本章では、犬の心臓病と腸との関連性を明らかにするため、健康犬および MMVD 罹患犬において、人医療で腸管粘膜障害マーカーとして使用されている I-FABP を測定し、各グループの心臓検査結果を用いて比較した。

MMVD による心不全のチワワでは、血清中の I-FABP が増加しており、MMVD の悪化と I-FABP の増加には相関性がある可能性が示唆された。グループ B2 は、グループ H に対し有意に増加しており、グループ C/D は、他のどのグループより有意に増加した。これらの結果より、MMVD の悪化に伴い腸管粘膜障害リスクが高まる可能性があり、心不全のある犬 (グループ C/D) は、心不全のない犬 (グループ H、B1、B2) に比べて、腸管粘膜障害のリスクが有意に高いことが示唆された。

Kitai らは、人の心不全患者における I-FABP のカットオフ値が 853pg/ml であることを報告しており、853pg/ml 以上の症例群は生存期間が短く、I-FABP は心不全患者の予後不良因子となり得る可能性が示唆されている [37]。今回の研究では、グループ C/D において I-FABP が 5.5 ( $\pm 0.6$ ) ng/ml と有意に増加したが、その値は過去の人医療の報告の値とは、大きく異なった。この差は、人と犬という種の違いによるものが原因ではないかと考察した。今後、犬における I-FABP の研究がさらに実施され、犬においても心不全時でのカットオフ値が設定されれば、犬の心不全の新たな予後不良因子となり得る可能性がある。

LA/Ao $>1.7$  および E vel $>1.2$ m/s は、MMVD の予後不良因子であると報告されている [8]。I-FABP は、MMVD の重症度に比例して増加したことから、腸管粘膜の障害と LA/Ao や E vel といった MMVD の予後を示す重要な心臓超音波検査パラメーターとの間には、相関性がある可能性が示唆された。FS と LVEF は、心臓の収縮機能のパラメーターであり、一般的に MMVD が重症になるほど FS が増加し、LVEF が減少すると認識されている。本研究では、有意差こそ認められなかったが、MMVD の悪化に伴い、FS と LVEF がともに増加する傾向が認められた。これは、グループ B2 の多くの症例と、グループ C/D の全症例が、ピモベンダンを内服していた影響によるものと考えられる。Kanno らの報告では、ピモベンダンの投与により FS と LVEF が上昇することが示唆されている [33]。この研究では、

心臓の収縮機能と腸管粘膜傷害を関連付けることは困難であった。Kitai らは、I-FABP の上昇と心臓超音波検査のパラメーターには関連性がないと報告している[37]。これは本研究では、健康な犬から重度の心不全の犬まで、盲目的に収集した症例を重症度分類し、I-FABP を測定した。一方で、Kitai らは、研究対象を心不全患者に限定していた[37]。そのため、元々の母集団の違いにより、本研究とは結果が一致しなかったと考えた。

VHS や VLAS は、心臓超音波検査に比べて実施しやすい検査であり、特に VLAS は、心臓超音波検査で測定した LA/Ao と有意な相関がある[40]。MMVD の重症度が高いほど VHS、VLAS は増加し、心不全の犬は他のグループに比べて有意に増加したことから、MMVD の重症度に応じて増加する I-FABP との相関性がある可能性が示唆された。今後の研究で、VHS、VLAS と腸管粘膜障害マーカーとの相関性が明らかになれば、腸管粘膜障害リスクを判断する簡易検査として、心臓超音波検査よりも有用になるかもしれない。しかし、VHS や VLAS の精度は、犬体の位置やレントゲン撮影技術、胸部異常の併発の有無など多くの要因に左右されるため、心臓超音波検査よりも正確性は劣るとされている。そのため、腸管粘膜障害のリスクを判断する検査として、VHS と VLAS の実用性については、今後の研究が必要である。

本研究における証明制限は、症例の食事内容が統一されていないことである。犬において、食事が腸や健康に与える影響を示す報告は多くあり、食事の内容が本研究の結果に与えた影響を考慮する必要がある[36, 45, 80]。また、併発疾患の有無も本研究の結果に影響を与えている可能性はある。グループ C/D は MMVD の治療に、多くの症例が利尿剤を使用しており、腎数値の軽度から重度の上昇が認められた。尿毒症物質が腸に与える影響は人医療で報告されており、利尿剤による腎数値の増加が、本研究の結果に影響を与えた可能性がある[23]。また、本研究では腸管粘膜の組織検査は実施していない。腸管粘膜の組織の変性や、解剖学的変化を評価するには組織検査が有用である。しかし、本研究は臨床現場による研究のため、組織検査の実施は困難であった。

## 1.5. 小 活

腸管粘膜障害マーカーである I-FABP を用いた。腸管虚血による腸管粘膜障害の診断における報告は多数報告されており、人医療においては、心不全患者において I-FABP の増加が認められることが報告されているが、犬においては、I-FABP を用いた腸管粘膜障害に関する報告はない。本研究では、健康な犬（グループ H）および MMVD 罹患犬（グループ B1、B2、C/D）に分類した症例の、ELISA 法によって得られた血清中の I-FABP の測定値を、比較し検討することで、獣医療における I-FABP の有用性、並びに心臓病による腸への影響について考察した。各グループ（H、B1、B2、C/D）の I-FABP の測定値は、それぞれ  $2.32 \pm 0.43 \text{ ng/ml}$ 、 $3.49 \pm 0.24 \text{ ng/ml}$ 、 $3.93 \pm 0.25 \text{ ng/ml}$ 、 $5.50 \pm 0.57 \text{ ng/ml}$  であった。グループ B2 は、グループ H より有意に高く、グループ C/D は他のグループより有意に高かった（全て  $p < 0.05$ ）。MMVD による心不全犬は、有意に I-FABP が高く、腸管粘膜障害のリスクが高いことが示唆された。また、心臓超音波検査結果において心不全の悪化に伴い、LA/Ao、E vel は有意に高く、胸部レントゲン検査における VHS、VLAS も、心不全犬では有意に高かった。I-FABP の増加と、これらの心臓検査結果の項目において、相関性がある可能性が示唆された。しかし、本研究では腸管粘膜の組織検査は未実施であり、食事や併発疾患など、様々な因子が結果に影響を与えた可能性があり、結果の解釈に注意が必要であると考えられた。

## 第Ⅱ章

D型/L型乳酸を用いた腸管粘膜傷害リスクおよび組織の低酸素状態の評価  
： 健常犬と粘液腫様変性性僧帽弁疾患（MMVD）罹患犬との比較

## 2.1. 小 緒

重症な患者において、組織の低酸素状態を検出し、治療することは非常に重要である。組織の酸素化の間接的な指標として、血中乳酸値の測定は30年以上前から、人医療において行われている[2, 10, 34]。獣医療においては、人医療より遅れてはいるが、重症患者の乳酸値測定は、救急病院や大学病院などでは、日常的に行われている検査である。健康な体（好氣的な条件）でも、グルコース代謝において、アデノシン三リン酸が産生される過程で乳酸は生成される。主な乳酸生成部位は、骨格筋、骨、消化管であるが、脳、皮膚、赤血球など体の様々な組織や細胞で、恒常的に産生されているが、同時にコリ回路と呼ばれる経路で、乳酸代謝もおこなわれている。乳酸代謝の50%は肝臓で、30%は腎臓で行われている。しかし、ショックなど持続的な低酸素状態が続くと、嫌気性代謝により、乳酸が代謝されるよりも早く乳酸が生成され、高乳酸血症になる。乳酸が生成されると水素イオンが生成され、嫌気性代謝が長く続くと代謝性アシドーシスになる[2, 34]。

乳酸には、L体とD体の光学異性体が存在し、L型乳酸がショック時などの低酸素化の間接的な指標として、病院で測定されている。L型乳酸は、腸管虚血に伴う嫌気性代謝によっても産生されるが、あらゆる臓器の低酸素の状況で増加するため、腸管に特異的ではない。一方、D型乳酸は、L型乳酸の非生理的な相方と認識され、生理的条件下ではD型乳酸の体内濃度はL型乳酸に比べ100倍も低いことが報告されている。D型乳酸は、哺乳類の組織では産生されず、グリオキサラーゼ経路によるメチルグリオキサールからD型乳酸への分解か、腸内細菌による産生の2つに大別されると考えられている。血中のD型乳酸の上昇は、これらの代謝経路の障害、もしくは、腸内細菌由来と考えられる[2, 34]。人医療では、糖尿病、感染症、潰瘍性大腸炎、腸管手術後、腸管壊死の患者において、血中D型乳酸が上昇することが知られている[14, 27, 66]。大腸内にて、多くの常在菌が嫌気性解糖の結果としてD型乳酸を産生し、本来であればこのD型-乳酸は常在菌によってさらに酢酸に代謝される。したがって、腸管で産生されたD型乳酸は血中に移行せず、体内血中濃度は上昇しない。しかし、腸管虚血などによる腸管粘膜上皮障害が生じ、腸管の透過性が亢進すると、異常増殖した

腸内細菌が門脈血流に流れ出るので、血中の D 型乳酸の濃度が上昇することがある [2, 34]。以上のことより、人医療においては、D 型乳酸が腸管粘膜障害に特異的なマーカーになり得ると期待されている [44, 50, 53]。獣医療における D 型乳酸の報告は少なく、犬におけるパルボウイルス性腸炎で、血清中の D 型-乳酸が上昇することがある [74]。また、D 型乳酸は、モノカルボン酸トランスポーター (Monocarboxylate Transporter 1, MCT1) を介して全身に吸収される。MCT1 の存在は、犬の腸の全長にわたって確認されており、大腸の上皮細胞の基底膜に、多く存在することが報告されている [74]。以上のことより、人医療にて腸管粘膜障害のリスクマーカーとして報告されている D-乳酸は、犬においても有用な検査の可能性がある。

そこで、本章は犬における心臓病と腸の関連性を評価するための研究として、健常犬および MMVD 罹患犬を対象に、D 型乳酸および L 型乳酸を測定し、比較検討した。また MMVD 罹患犬における心臓パラメーターとの相関性も比較検討し、MMVD が腸粘膜におよぼす影響を考察した。



## 2.2. 材料と方法

### 1) 症例

症例は、第 I 章にて示した症例を、本研究においても研究対象とした（第 I 章 2. 材料および方法 1) 症例 参照）。採取した血液サンプルを、D 型-乳酸および L 型-乳酸の測定でも使用した。

### 2) 使用機器

第 I 章に示した機器を用いて、本研究も行った（第 I 章 2. 材料および方法 2) 使用機器 参照）。

### 3) 心臓検査方法

第 I 章に示した心臓検査方法を用いて、本研究も行った（第 I 章 2. 材料および方法 3) 心臓検査方法 参照）。

### 4) D 型乳酸の測定方法

血液サンプルを全症例にて採取した。頸静脈または外側伏在静脈より採血した。採取した血液を、速やかに血清分離チューブに入れ、十分に転倒混和した。凝固完了まで 15～30 分室温にて静置し、血餅形成後速やかに 3000rpm で 10～15 分遠心を行なった。遠心分離で得られた血清をマイクロチューブに移し、 $-18^{\circ}$ にて保存し酪農学園大学に冷凍し郵送し、測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

D 型乳酸は EnzyChrom™ D-Lactate Assay Kit (EDLC-100) Colorimetric Determination of D-Lactate at 565 nm (Bioassay Technology Laboratory) を用いて測定した。全ての試薬は、事前に室温にて自然に温めた。100  $\mu\text{L}$  の 20mM 標準液と、900  $\mu\text{L}$  の蒸留水を混合し、1000  $\mu\text{L}$  の 2.0mM D-乳酸プレミックスを作成した。プレミックスを以下の表(表. 2-1)のように希釈し、20  $\mu\text{L}$  96 ウェル

プレートのウェルに 20  $\mu$ L の標準液を移した。1 ウェルあたり 20  $\mu$ L のサンプルを、別々のウェルに入れた。血清は内因性の酵素活性を持つ可能性があるので、酵素 A を添加した反応と、酵素 A を添加しないコントロールの 2 つの反応を行った。血清は、測定の前に dH<sub>2</sub>O で 2 倍に希釈した。各サンプルおよびスタンダードウェルに、60  $\mu$ L のアッセイバッファー、1  $\mu$ L の Enzyme A、1  $\mu$ L の Enzyme B、10  $\mu$ L の NAD および 14  $\mu$ L の MTT を混合して、Working Reagent を調製した。No Enzyme A サンプルコントロールでは、60  $\mu$ L の Assay Buffer、1  $\mu$ L の Enzyme B、10  $\mu$ L の NAD、14  $\mu$ L の MTT を混合した。反応ウェルごとに、80  $\mu$ L の Working Reagent を素早く加え、プレートをタップして短時間で完全に混合した。565nm (520-600nm) で “0” の時の OD 0 値と、室温で 20 分間インキュベートした後 OD<sub>20</sub> 値を読みとり、標準ウェルとサンプルウェルの OD<sub>20</sub> から OD<sub>0</sub> を引いた。 $\Delta$ OD<sub>Sample</sub> から  $\Delta$ OD<sub>NoEnz</sub> 値を引き、この  $\Delta$ OD 値を使用して、標準曲線からサンプルの D 型乳酸濃度を決定した。

表. 2-1 D 型乳酸測定における ELISA 法での標準液希釈表

No	Premix + H <sub>2</sub> O	Vol( $\mu$ L)	D-Lactate(mM)
1	100 $\mu$ L + 0 $\mu$ L	100	2.0
2	80 $\mu$ L + 20 $\mu$ L	100	1.6
3	60 $\mu$ L + 40 $\mu$ L	100	1.2
4	40 $\mu$ L + 60 $\mu$ L	100	0.8
5	30 $\mu$ L + 70 $\mu$ L	100	0.6
6	20 $\mu$ L + 80 $\mu$ L	100	0.4
7	10 $\mu$ L + 90 $\mu$ L	100	0.2
8	0 $\mu$ L + 100 $\mu$ L	100	0

8 通りの濃度になるように、標準液の希釈を行なった (表. 2. 1)。左から、番号、プレミックスと希釈液 (H<sub>2</sub>O) の量、容量、D 型乳酸の濃度を示している。

#### 5) L 型乳酸の測定方法

血液サンプルを全症例にて採取した。頸静脈または外側伏在静脈より採血した。得られた血液を速やかに血清分離チューブに入れ、十分に転倒混和した。

凝固完了まで 15～30 分室温にて静置し、血餅形成後速やかに 3000rpm で 10～15 分遠心を行なった。遠心分離で得られた血清をマイクロチューブに移し、-18℃にて保存し酪農学園大学に冷凍し郵送し、測定まで-80℃で保存した。

L 型乳酸 EnzyChrom™ L-Lactate Assay Kit (ECLC-100) Colorimetric Determination of L-Lactate at 565nm (Bioassay Technology Laboratory) を用いて測定した。全ての試薬は事前に室温にて自然に温めた。100  $\mu$ L の 20mM 標準液と 900  $\mu$ L の蒸留水を混合し、1000  $\mu$ L の 2.0mM L-乳酸プレミックスを作成した。プレミックスを以下の表(表. 2-2)のように希釈し、20  $\mu$ L 96 ウェルプレートのウェルに 20  $\mu$ L の標準液を移した。1 ウェルあたり 20  $\mu$ L のサンプルを別々のウェルに入れた。血清は内因性の酵素活性を持つ可能性があるため、酵素 A を添加した反応と、酵素 A を添加しないコントロールの 2 つの反応を行なった。血清は、測定の前に dH<sub>2</sub>O で 2 倍に希釈した。各サンプルおよびスタンダードウェルに、60  $\mu$ L のアッセイバッファー、1  $\mu$ L の Enzyme A、1  $\mu$ L の Enzyme B、10  $\mu$ L の NAD および 14  $\mu$ L の MTT を混合して Working Reagent を調製した。No Enzyme A サンプルコントロールでは、60  $\mu$ L の Assay Buffer、1  $\mu$ L の Enzyme B、10  $\mu$ L の NAD、14  $\mu$ L の MTT を混合した。反応ウェルごとに 80  $\mu$ L の Working Reagent を素早く加え、プレートをタップして短時間で完全に混合した。565nm (520-600nm) で "0 "の時の OD<sub>0</sub> 値と、室温で 20 分間インキュベートした後の OD<sub>20</sub> 値を読みとり、標準ウェルとサンプルウェルの OD<sub>20</sub> から OD<sub>0</sub> を引いた。 $\Delta$ OD<sub>Sample</sub> から  $\Delta$ OD<sub>NoEnz</sub> 値を引き、この  $\Delta$ OD 値を使用して標準曲線からサンプルの L 型乳酸濃度を決定した。

表. 2-2 L-乳酸測定における ELISA 法での標準液希釈表

No	Premix + H <sub>2</sub> O	Vol( $\mu$ L)	L-Lactate(mM)
1	100 $\mu$ L + 0 $\mu$ L	100	2.0
2	80 $\mu$ L + 20 $\mu$ L	100	1.6
3	60 $\mu$ L + 40 $\mu$ L	100	1.2
4	40 $\mu$ L + 60 $\mu$ L	100	0.8
5	30 $\mu$ L + 70 $\mu$ L	100	0.6
6	20 $\mu$ L + 80 $\mu$ L	100	0.4
7	10 $\mu$ L + 90 $\mu$ L	100	0.2
8	0 $\mu$ L + 100 $\mu$ L	100	0

8通りの濃度になるように、標準液の希釈を行なった(表.2.2)。左から、番号、プレミックスと希釈液(H<sub>2</sub>O)の量、容量、L型乳酸の濃度を示している。

#### 6) 統計方法

データは、スプレッドシートに入力し、統計解析には SPSS ソフトウェア (SPSS statistics ver 24.0 IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。症例を分類した 4 グループに対し、有意差があるか、年齢、体重、BCS は Turley-Kramer 事後検定を用いた一次配置分散分析を実施した。性別、内服中の薬剤に関しては、Fisher's exact test を用いた。心臓超音波検査及び胸部レントゲン検査によって得られた各グループの値は、Turley-Kramer 事後検定を用いた一次配置分散分析を実施した。ELASA 法で得られた L 型乳酸、D 型乳酸の結果は Turley-Kramer 事後検定を用いた一次配置分散分析を実施した。結果は、平均値±標準偏差で示し、有意差は  $p < 0.05$  にてありと判断した。

## 2.3. 結果

正常犬および MMVD 罹患犬の、心臓超音波検査および胸部レントゲン検査によって得られた結果を表. 2-3 に示した。LA、Ao、LA/Ao、LVIDd、LVIDs、LVIDDN、E vel、A vel、FS、VHS、VLAS において、全体の有意差が認められた。IVSDd、LVPWd、MR vel、LVEF において、有意差は認められなかった。LA、LA/Ao、E vel、VHS、VLAS において、グループ C/D は他のどのグループより有意に高値を示した。

D 型乳酸の測定値は、グループ H、B1、B2、C/D において、それぞれ  $0.36 \pm 0.06$  mM、 $0.37 \pm 0.04$  mM、 $0.55 \pm 0.08$  mM、 $0.82 \pm 0.10$  mM であった。グループ B2 の測定値は、グループ A、B1 の測定値に対して有意差が認められ、グループ C/D の測定値も、グループ A、B1 の測定値に対して有意差が認められた。グループ B2 と C/D 間には、有意差は認められなかった。結果を図. 2-1 に示す。

L 型乳酸の測定値は、グループ H、B1、B2、C/D において、それぞれ  $0.20 \pm 0.08$  mM、 $0.37 \pm 0.07$  mM、 $0.57 \pm 0.06$  mM、 $0.92 \pm 0.07$  mM であった。グループ B2 の測定値は、グループ A、B1 の測定値に対し有意差が認められた。グループ C/D の測定値は、他のどのグループより有意に増加していた。結果を図. 2-2 に示す。

表. 2-3 健康犬(H)と MMVD 罹患犬 (B1, B2, C/D) の心臓超音波検査結果

	H(n=19)	B1(n=21)	B2(n=15)	CD(n=14)	P-value for all
LA(mm)	13.2±2.2	15.2±2.7	23.3±6.1 <sup>b,d</sup>	32.0±7.4 <sup>c,e,f</sup>	<0.001
Ao(mm)	9.41±1.0	10.2±1.2	10.9±1.3 <sup>b</sup>	10.5±1.3 <sup>c</sup>	0.005
LA/Ao	1.4±0.2	1.5±0.2	2.1±0.5 <sup>b,d</sup>	3.1±0.9 <sup>c,e,f</sup>	<0.001
IVSDd(mm)	5.2±1.2	5.2±0.8	4.6±0.9	4.4±1.2	0.062
LVPWd(mm)	5.4±0.9	5.6±1.0	5.1±0.8	5.1±1.2	0.292
LVIDd(mm)	17.0±2.6	19.1±3.4	25.5±3.4 <sup>b,d</sup>	27.5±4.1 <sup>c,e</sup>	<0.001
LVIDs(mm)	10.8±2.6	12.0±2.2	14.1±2.3 <sup>b</sup>	15.5±3.6 <sup>c,e</sup>	<0.001
LVIDDN	1.7±0.2	1.8±0.1	1.9±0.1 <sup>b</sup>	1.9±0.2 <sup>c</sup>	<0.001
E vel(m/s)	0.6±0.1	0.7±0.2	0.9±0.2 <sup>b</sup>	1.3±0.5 <sup>c,e,f</sup>	<0.001
A vel(m/s)	0.6±0.2	0.8±0.2 <sup>a</sup>	1.0±0.2 <sup>b</sup>	0.8±0.3	<0.001
MR vel(m/s)	nothing	5.7±0.6	5.4±0.5	5.3±0.6	0.286
FS(%)	35.7±6.3	36.0±6.7	38.8±12.9	44.4±11.0 <sup>c</sup>	0.037
LVEF(%)	68.3±8.4	67.5±7.6	72.0±9.0	72.6±11.7	0.338
VHS(v)	9.2±0.9	9.4±0.8 <sup>a</sup>	10.6±0.7 <sup>b,d</sup>	11.5±1.2 <sup>c,e,f</sup>	<0.001
VLAS(v)	2.0±0.2	2.3±0.3 <sup>a</sup>	3.1±0.3 <sup>b,d</sup>	3.8±0.4 <sup>c,e,f</sup>	<0.001

データは平均値±標準偏差で示した。LA、Ao、LA/Ao、LVIDd、LVIDs、LVIDDN、E vel、A vel、FS、VHS、VLASにおいて、全体の有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。IVSDd、LVPWd、MR vel、LVEFにおいて有意差は認められなかった ( $p > 0.05$  :  $p = 0.062 \sim 0.338$ )。<sup>a</sup> は、グループ H とグループ B1 に統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。 <sup>b</sup> は、グループ H とグループ B2 に統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。 <sup>c</sup> は、グループ H とグループ C/D に統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。 <sup>d</sup> は、グループ B1 とグループ B2 に統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。 <sup>e</sup> は、グループ B1 とグループ C/D に統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。 <sup>f</sup> は、グループ B2 とグループ C/D に統計的に有意な差が認められたことを示している ( $p < 0.05$ )。

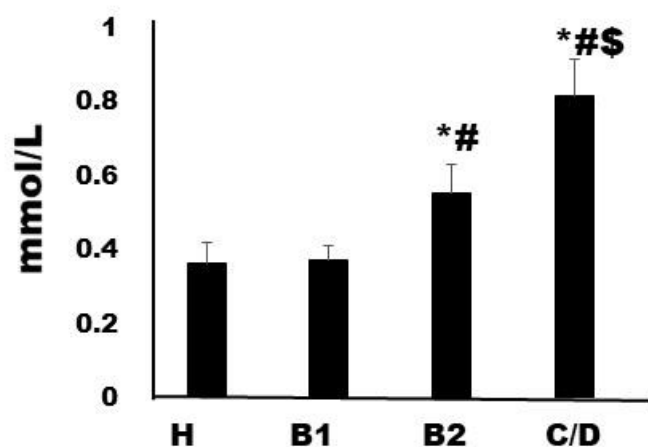


図. 2-1 健常犬(H)およびMMVD罹患犬 (B1、B2、C/D) の血清中のD型乳酸濃度

図の縦軸は、D型乳酸濃度の単位で、mM である。青色の棒軸は、各グループの血清中のD型-乳酸濃度を示しており、左からグループ H、B1、B2、C/D である。記号は、各グループ間での有意差を示しており、 $p < 0.05$  にて有意差ありとした。

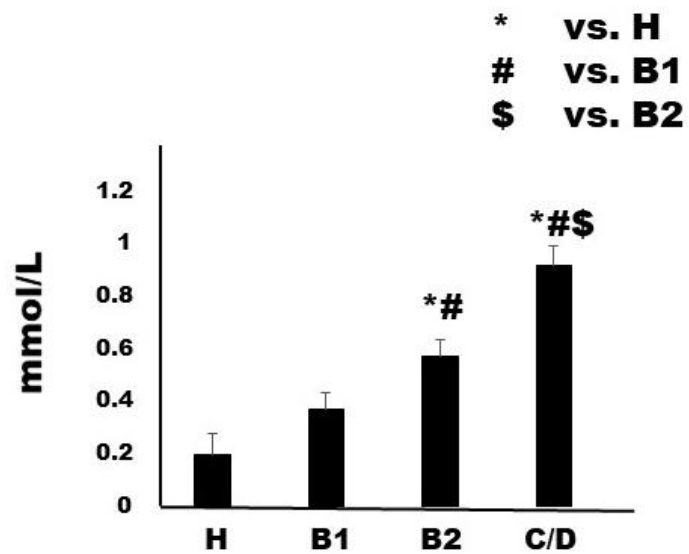


図. 2-2 健常犬(H)およびMMVD罹患犬 (B1、B2、C/D) の血清中のL型乳酸濃度

図の縦軸は、L型乳酸濃度の単位で、mM である。青色の棒軸は、各グループの血清中のL型乳酸濃度を示しており、左からグループH、B1、B2、C/Dである。記号は、各グループ間での有意差を示しており、 $p < 0.05$  にて有意差ありとした。

## 2.4. 考 察

本章では、MMVDが腸におよぼす影響、組織の低酸素状態を調査するため、健康犬とMMVD罹患犬の血清中のD型乳酸、L型乳酸を測定した。D型乳酸、L型乳酸ともにMMVDの悪化に伴い、血清中の濃度が増加していくことが認められた。また、D型乳酸、L型乳酸ともにグループ間での有意差も認められた。心不全のある犬（グループC/D）は、腸管粘膜障害リスクが高く、組織の低酸素状態がより重症である可能性が示唆された。

MMVDの予後不良因子として、LA/Ao $>1.7$ またはE vel $>1.2$ m/sと報告されており、D型乳酸とL型乳酸はMMVDの重症度に比例して増加したことから、腸管粘膜障害、組織の低酸素はLA/AoやE velといった、MMVDの予後を示す重要な心臓超音波検査結果と相関性がある可能性が示唆された[8]。FSやLVEFは、心臓の収縮機能パラメーターであり、一般的にMMVDが重症になるほどFSが増加し、LVEFが減少するとされている。本研究では、有意差は認められなかったが、MMVDの悪化に伴い、FSとLVEFがともに増加した。これは、グループB2の多くの症例とグループC/Dの全ての症例が、ピモベンダンの内服していた影響によるものと考えられる。菅野らの報告によれば、ピモベンダン投与によりFSとLVEFが増加することが認められ、これは本研究にも当てはまると考えられた。この研究では、心臓の収縮機能と腸管粘膜障害、および組織の低酸素状態を関連付けることは困難であった。また、胸部レントゲン検査で得られたVHSやVLASも、MMVDの悪化に伴い有意に増加していくことが認められ、D型乳酸およびL-乳酸の増加との相関性がある可能性が示唆された。しかし、胸部レントゲン検査による心臓評価は、VLASが心臓超音波検査での左房径の測定との相関性は報告されているものの、犬体の位置やレントゲン撮影技術、胸部異常の併発の有無など、多くの要因に左右されるため信頼性に関しては欠けると考えられた[40]。

D型乳酸の正常値は、人が0.25~0.35mMであり、過去の獣医療におけるD型乳酸を用いた研究の報告では、健康な犬の中央値が0.29mM（範囲：0.25~0.4mM）、健康な猫の中央値が0.22mM（範囲：0.04~0.87mM）と報告されており、本研究における、健康犬であるグループHの測定値は、過去の健康な犬の数値と近い数値であった[74]。また、その報告においてパルボウイルス性腸炎の犬では、D型乳



酸の値は $0.47 \pm 0.17$  mMと報告されており、本研究の心不全犬（グループC/D）のD型乳酸の測定値は $0.82 \pm 0.1$  mMであった[74]。この測定値の差は、パルボウイルス性腸炎とMMVDによる腸管粘膜虚血という病態の違いが、測定値に違いを生じている可能性が考えられた。しかし、過去の報告と本研究では、症例数の違いや、犬種、年齢、併発疾患などの多くの違いがあるため、多くの要因が測定値の差を生じていると考えられた。

心不全といった重篤な疾患で、L型乳酸の値が増加することは、人の過去の報告と一致しており、MMVDにおいても重症度が増加することで、血清中のL型乳酸の測定値が相関して増加し、有意差も認められたことは、獣医療における乳酸測定の意義、特にMMVDの重症度や予後予測マーカーとして、さらに重要な位置付けになり得る可能性を支持する結果であり得ると考えられた。また、犬において報告の少ないD型乳酸に関しては、本研究のみでD型乳酸の有用性を証明することはできないため、今後のさらなる研究が必要であると考えられた。

## 2.5. 小 活

L型乳酸は、組織の低酸素状態を示すマーカーとして、人医療および獣医療においてショック時などの予後予測マーカーとして頻繁に用いられ、D型乳酸は、より腸管に特異的なため、腸管虚血などの疾患を診断するためのバイオマーカーとして人医療で研究され、獣医療においてもD型乳酸を用いた研究は、いくつか報告されている。本章では、健常犬およびMMVD罹患犬のD型乳酸とL型乳酸を測定し比較検討することで、MMVDが腸に与える影響について考察した。

結果、D型乳酸およびL型乳酸はMMVDの悪化に伴い比例して増加する傾向が認められ、D型乳酸は心拡大のある犬（グループB2、C/D）が心拡大のない犬（グループH、B1）に対し有意に増加し、L型乳酸は心不全の犬（グループC/D）は心不全のない犬（グループH、B1、B2）に比べ、有意に増加したことが認められた。

結論として、L型乳酸は、MMVDによる重症度および予後予測マーカーとして、人医療と同様に、獣医療においても信頼できる検査であると考察できる結果であった。D型乳酸に関しても、MMVDの悪化に伴い増加したことから、人の報告同様に、犬においても心不全が腸に与える影響があると考察できた。しかし、D型乳酸は、獣医療における報告は少なく、有用性は証明されていない。また、本研究においても、併発疾患や食事など他の腸に影響を与える因子に関して統一ができていない。今後、獣医療におけるD型乳酸の有用性を確立するために大規模な研究が必要である。

## 第Ⅲ章

### 次世代シーケンスを用いた

健常犬および粘液腫様変性性僧帽弁疾患（MMVD）罹患犬の腸内細菌叢の同定

### 3.1. 小 緒

人において、腸内細菌が健康に大きく関わることは、古くより示唆されており、近年は、それが一般の人々にも知られるようになった。そして、腸内細菌叢と肥満、炎症性腸疾患、糖尿病、大腸癌などの疾患との関連性が明らかになった[17, 22]。さらに、アテローム性動脈硬化症といった心血管疾患の発症機序に、腸内細菌叢が関与していることが明確に証明され、心臓病と腸内細菌の関係に注目した研究が精力的に行われている[3, 39, 52, 61, 69, 75, 76]。その中で、腸内細菌由来代謝産物であるTMAOが、動脈硬化を引き起こすと報告され、TMAOが心不全や急性冠症候群における予後不良因子として研究されている報告や、血中TMAO濃度を低下させることで、動脈硬化の進展が抑制されるなど、多くの研究が行われている[30, 52, 61, 71, 75, 76]。また、心不全患者においては、腸の透過性の亢進など腸の機能的、形態学的な変化が起こることで、腸内細菌叢の変化が起こる[39, 51, 55, 56, 61, 63-65, 69]。その変化が、さらなる心血管疾患の悪化や全身炎症につながる可能性が示唆されている[30, 31, 61, 63, 65, 69]。

獣医療における腸内細菌についての研究は、人医療に比べると遅れてはいるが、近年多くの研究が行われている。出生後の犬の腸内細菌叢の変化や、加齢による腸内細菌層の変化、食事による腸内細菌叢の変化など多くの報告がされている[1, 24, 26, 36, 41, 42, 45-47, 49, 60, 67, 70, 80]。また、犬の炎症性腸疾患と腸内細菌叢との関連性も示唆されている[49, 68]。

このように、近年、腸内細菌叢に関する知見が増え、多くの研究が行われている理由は、次世代シーケンスを用いたメタゲノム解析が広く普及したからである[38, 49]。腸管内には、500~1000種類、100兆~1000兆個の腸内細菌が生息し、かつては、この多種多様な細菌叢の正確な同定は困難とされていたが、次世代シーケンスにより可能になった[38]。

人医療においては、心血管疾患と腸内細菌叢の関連性に関して、多くの報告があるが、獣医療における、次世代シーケンサーを用いた心臓病と腸内細菌叢との関連性を調査した報告はなく、健康な犬の腸内細菌や消化器疾患との関連性を調査した報告のみである。

第 I 章では、I-FABPを用いて、MMVDと腸との関連性を調査し、心不全と腸管粘膜障害との関連性を明らかにした。第 II 章では、D型乳酸、L型乳酸を用いて、MMVDと腸との関連性を調査し、心不全と組織の低酸素状態および腸管粘膜傷害との関連性を明らかにした。しかし、MMVDと腸との関連性を明らかにする上で、腸内細菌叢は非常に重要な要素と考えられた。以上のことから、本章では、健常犬およびMMVD罹患犬の糞便中の腸内細菌叢を次世代シーケンスによって同定を行い、比較検討することで、MMVDの腸内細菌叢との関連性を調査し、MMVDと腸との関連性を明らかにすることを目的とした。

## 3.2. 材料と方法

### 1) 症例

横浜山手犬猫医療センターおよび東京動物心臓病センターの二つの機関で、2019年4月から2020年5月までの期間で来院し、サンプルを採取した犬を対象にした。対象動物は、年齢  $10.3 \pm 3.1$  歳（平均±標準偏差, 3歳~16歳）、体重  $2.9 \pm 1.1$  kg (1.4~6.1kg) の63頭のチワワ（雄7頭、去勢雄25頭、雌1頭、避妊雌29頭）を用いた。性別は無作為に収集し、全ての症例の飼い主に、研究の同意をいただいた。全ての症例で、身体検査（体重、BCS）、聴診（心雑音の有無、強度）、既往歴、現病歴、内服中の薬、抗生物質の内服の有無、室内飼いか室外飼いか、普段食べている食事内容を問診し記録した。また、全ての症例で、胸部レントゲン検査および心臓超音波検査による心臓の評価を行なった。心臓検査にて得られた情報より、症例を様々な項目ごとに群分けおよび分類分けを行った。①MMVD群、MMVD+CKD群、MI+CKD以外の併発疾患群、疾患なし群、MMVD以外の疾患のみ現病している群の計5群。②ACVIMガイドラインに基づく重症度グレード（StageB1、B2、C/D）の3群および心疾患を有さない症例を Health dogs 群（H）とした計4群。③心不全群（C/D）と心不全のない群（H, B1, B2）の計2群。④LA/Ao が <1.5 群、>1.5 群の計2群。⑤LVIDDN が 1.7<群、>1.7 群の計2群。⑥FS が  $\leq 35\%$ 群、>35%群の計2群。⑦LVEF が  $\leq 65\%$ 群、 $65\% < LVEF < 75\%$ 群、 $\geq 75\%$ 群の計2群。⑧VHS が  $\leq 10.5v$  群、>10.5v 群の計2群。また、全ての症例で、検査日と同日に排泄した糞便を、検体採取キット（採便容器F, 富士フィルム和光製薬）を用いて採取した。便の状態を記録し、採取した糞便は冷蔵保存しアニコム先進医療研究所に郵送した。

### 2) 使用機器

心臓超音波検査、胸部レントゲン検査は、第I章と第II章で使用した機器と同じものを使用した（第I章 2. 材料と方法 2) 使用機器 参照）。

### 3) 心臓検査方法

心臓検査方法は、第 I 章、第 II 章で記述した方法で行った（第 I 章 2. 材料と方法 3) 心臓検査方法 参照）。

### 4) 糞便サンプルからの DNA 抽出

製造元の指示に従い、Chemagic DNA Stool 200 Kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて、微生物細胞懸濁液から DNA を抽出した。400  $\mu$ l の微生物細胞懸濁液を、1.4mm のセラミックビーズ (CK14 Soft Tissue Homogenizing Kit, Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) を詰めたバイアルに入れ、0.25mg/ml のプロテイナーゼ K を含む 810  $\mu$ l の溶解バッファー (PerkinElmer) と混合した。Precellys Evolution (Bertin Instruments 社) を用いて、6000rpm で 30 秒ずつ、30 秒の休止を挟んで 2 回ホモジナイズした。ホモジナイズ後の懸濁液は、70°C で 10 分間、次に 95°C で 5 分間、順次インキュベートした。最後に、Chemagic 360 装置 (PerkinElmer 社) を用いて DNA を分離した。

### 5) 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス

糞便検体 200  $\mu$ L と chemagic キット付属の Lysis buffer (224  $\mu$ g/mL の ProtenaseK を含む) 810  $\mu$ L を、Precellys 2mL Soft Tissue Homogenizing Ceramic Beads Kit (KT03961-1-003.2, Bertin Instruments, France) に添加し、ビーズ式ホモジナイザー-Precellys Evolution (Bertin Instruments) にてビーズ破砕 (6,000rpm、破砕 20 秒、インターバル 30 秒、破砕 20 秒) を行った。その後、検体を 70°C のヒートブロック上にて 10 分間静置することで Protenase K による溶菌を行い、続いて、95°C のヒートブロック上にて 5 分間静置することで Protenase K を不活化した。溶菌処理を行った検体は、chemagic 360 (PerkinElmer) を用い、chemagic キット stool 用プロトコルにて DNA の自動抽出を行い、100  $\mu$ L の DNA 抽出液を得た。

この DNA を、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスに供した。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域は、Illumina 16S Sample Preparation Guide (Illumina, San Diego, CA, USA) に記載のプライマーを用いて、以下のように PCR で増幅した。フォワード、5′ -TCGTCGGCAG CGTCAGATGTATAAGAGACAG-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′ ; リバーズ、5′ -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTATAAGAGACA-GGACTAC-HVGGGTATCTAATCC-3′ 。PCR 増幅は、KAPA HiFi HotStart Library Amplification Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いて行った。各 PCR 産物は、Agencourt AMPure XP Beads Kit (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) を用いて精製し、Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて定量した。Nextera XT Index Kit v2 (Illumina) を用いて、各アミノプリコンの 100 ナノグラムを 2 回目の PCR ラウンドにかけ、インデキシングを行った。精製後、PCR 産物を NanoPhotometer (Implen, Westlake Village, CA, USA) で定量し、1.6ng/ $\mu$ l の最終濃度で 1 本のチューブにプールした。プールした DNA ライブラリーの濃度は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて検証した。NaOH で変性させた後、9pM DNA ライブラリー 850  $\mu$ l と 9pM PhiX 150  $\mu$ l を混合し、MiSeq Reagent Kit v3 を用いて Illumina MiSeq によるペアエンドシーケンシングを行った (600 サイクル、Illumina 社)。

#### 6) 16S rRNA 遺伝子アンプリコン配列の処理

配列データは、Quantitative Insights into Microbial Ecology 2 (QIIME 2) v2019.4.0 (Bolyen et al., 2019) を用いて処理した。QIIME 2 に組み込まれた DADA2 ソフトウェアパッケージ v2019.4.0 を使用して、アンプリコン配列エラーを修正し、アンプリコン配列バリエーション (ASV) テーブルを構築した。ASV テーブルは希薄化した。微生物の分類は、SILVA 132 99% データベースで訓練された Naïve Bayes 分類器を用いて割り当てた。

#### 7) 統計解析

症例データは、スプレッドシートに入力し、統計解析には SPSS ソフトウェア



ア (SPSS statistics ver 24.0 IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。年齢、体重、BCS は Turley-Kramer 事後検定を使用した、一次配置分散分析が行なわれた。性別、内服中の薬剤に関しては、Fisher's exact test を用いて解析した。心臓超音波及び胸部レントゲン検査によって得られた各グループの値は、Turley-Kramer 事後検定を用いた一次配置分散分析を実施した。腸内細菌叢に関する統計解析は、統計ソフト「R」を用いて行った。微生物の多様性の統計解析では、QIIME 2 パイプラインに実装された統計を用いて、多様性の指標を解析した。メタデータがカテゴリーデータの場合、 $\alpha$  および  $\beta$  の多様性指標は、それぞれ Kruskal-Wallis 検定および並べ替え分散分析により解析した。メタデータがパラメトリックな数値データの場合、 $\alpha$  および  $\beta$  の多様性メトリクスは、それぞれピアソンの相関検定およびピアソンの相関係数を用いたマンテル検定によって分析された。すべての統計解析において、 $P < 0.05$  を有意差ありと見なした。

#### 8) 微生物の存在の解析

門、属群のデータを取得し、オンラインインターフェース Galaxy を用いた線形判別分析 (LDA) 効果量 (LEfSe) 分析により、特定のサンプル群で有意に濃縮された細菌分類群を抽出した (Segata et al., 2011)。LEfSe 解析では、Kruskal-Wallis 検定 ( $\alpha$  値 0.05) と LDA スコア  $> 2.0$  ( $P < 0.01$ ) を閾値とした。

### 3.3. 結果

ACVIMの重症度分類(グループH、B1、B2、C/D)、心不全の有無、LA/Ao、LVIDDN、VHSによる分類の群間における腸内細菌叢の違いは、 $\alpha$ 多様性(Shannon index)、 $\beta$ 多様性(Unweighted unifrac)、腸内細菌叢構成の門レベル、属レベル全てにおいて有意な差は認められず、特徴的な所見も認められなかった。

MMVD群、MMVD+CKD群、MMVD+CKD以外の併発疾患群、疾患なし群、MMVD以外の疾患のみ現病している群の計5群による比較においては、 $\alpha$ 多様性(検出された配列数、種の豊富さ)において、MMVD+others群の種の豊富さがnothing群、MMVD+CKD群に比べ有意に低いことが認められた。 $\alpha$ 多様性(均等度)や $\alpha$ 多様性(均等度+種の豊富さ)においては各群間に有意な差は認められなかった(図.3-1)。 $\beta$ 多様性や、腸内細菌叢構成における門レベルや属レベルにおいても有意な差は認められず、特徴的な所見も認められなかった。

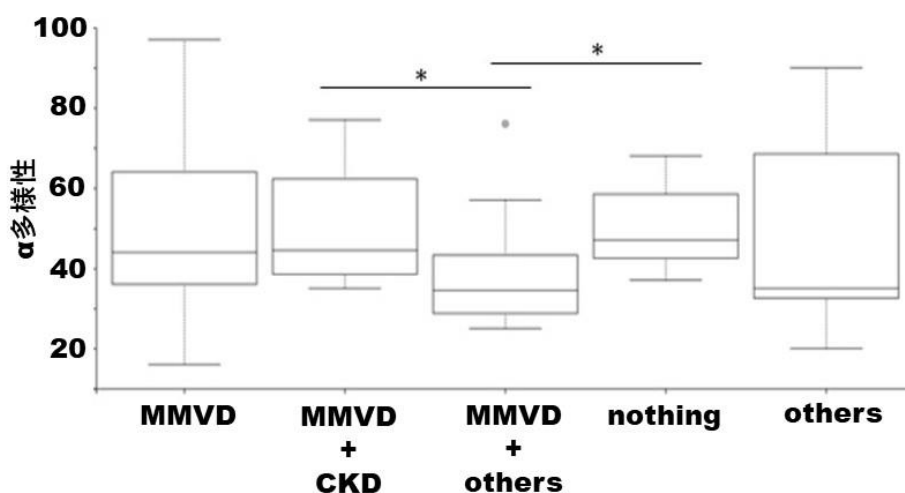


図.3-1 MMVD群、MMVD+CKD群、MMVD+others群、nothing群、others群の群間における $\alpha$ 多様性解析(検出された配列数、種の豊富さ)

FSが $\leq 35\%$ と $> 35\%$ の2群間における解析では、 $\leq 35\%$ が $> 35\%$ に対して、有意に $\alpha$ 多様性が低いことが認められ、FS $\leq 35\%$ の群が腸内細菌叢の種の多様性が少なく、FSと腸内細菌叢の種の多様性が関連することが示唆された（図. 3-2）。

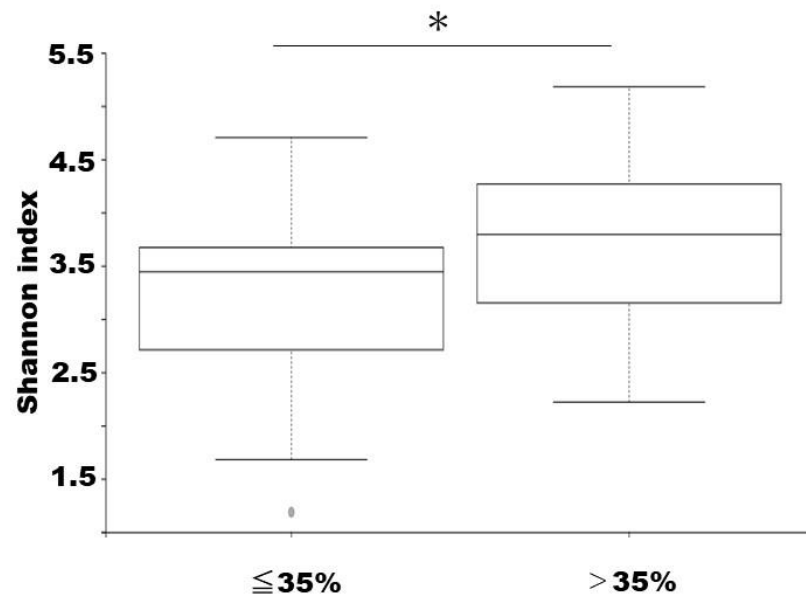


図. 3-2 FSが $\leq 35\%$ の群と $> 35\%$ の群間における $\alpha$ 多様性解析（Shannon index）

次世代シーケンスによるメタゲノム解析によって得られた、FS $\leq 35\%$ と $> 35\%$ の群の糞便中の腸内細菌叢構成を示した（図. 3-3）。左に各色が示す同定された腸内細菌の菌種を示した。 $> 35\%$ の群において、Bacteroides属菌の占有率が多いのが確認できる。LEfSe解析において、Tyzzerella属菌とBacteroides属菌の2菌種が有意に多いことが確認された。 $p < 0.05$ にて有意差ありとした。

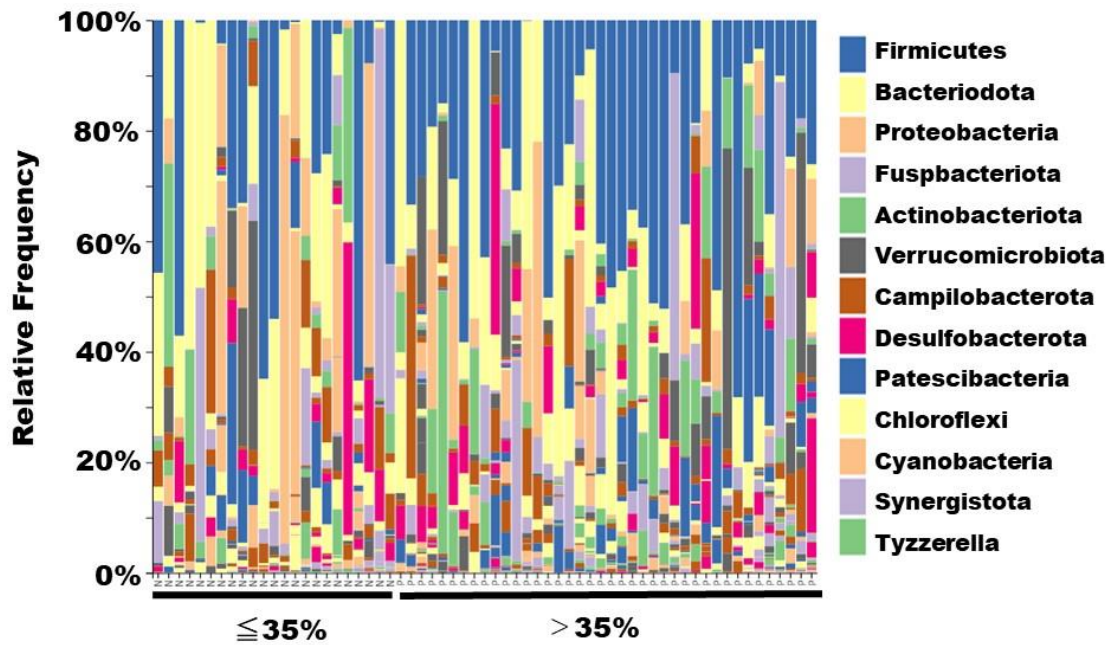


図. 3-3 FSが $\leq 35\%$ の群と $> 35\%$ の群における腸内細菌叢構成

LVEFが $\leq 65\%$ 、 $65\% < \text{LVEF} < 75\%$ 、 $\geq 75\%$ の3群における解析では、 $\alpha$ 多様性 (Shannon index)、 $\beta$ 多様性 (Unweighted unifrac) において、有意な差は認められなかった。腸内細菌叢構成においては、属レベルの解析において、 $65\% < \text{LVEF} < 75\%$ の群においてBacteroides属菌が有意に増加していた (図には示さず)。

### 3.4. 考 察

本章の目的は、心臓病が腸内細菌叢におよぼす影響を調査し、評価することであった。本研究において、MMVDの重症度による腸内細菌叢の変化は認められなかった。次世代シーケンスを用いた人医療の研究では、心不全患者が健常者と比較して腸内細菌叢に変化があることが報告されている[30, 39, 55]。次世代シーケンスを用いた研究では、Dorea属菌とClostridium属菌の存在比率が低下することが報告され、培養法に基づく研究では、心不全患者では、Campylobacter属菌、Shigella属菌、Salmonella属菌、Yersinia enterocolitica属菌といった病原細菌種や、Candida菌種が腸内で増殖することが報告されている[30, 55]。本研究において、MMVDの重症度による腸内細菌叢の違いや、心不全のある犬とない犬での、腸内細菌叢の種の豊富さや構成などにおいて特徴的な所見は認められず、人医療の報告と一致しなかった。その理由として、心疾患の違いがあると考えられる。本研究は、犬の後天性心疾患のMMVDを選んだが、人医療の報告では、虚血性心疾患や心筋症による心不全患者が選ばれていた。また、人医療の報告における心不全患者は、どれもLVEFが低下した患者であった[30]。本研究においては、LVEFによる群分けの腸内細菌叢構成における属レベルの解析において、65% < LVEF < 75%群のBacteroides属菌が有意な増加が認められた。LVEFが腸内細菌叢に影響をおよぼす因子である可能性が示唆された。変化があった細菌種は人医療の報告と異なったが、本研究では、全ての症例を対象にLVEFの群分けをしており、LVEFの低下した心不全患者を対象とした人医療の報告と母集団に違いがあり、それが結果に影響を及ぼした可能性を考慮する必要がある。また、腸内細菌は動物種によって異なり、人と犬も異なる。本来の正常な腸内細菌叢の違いが、本研究の結果と人医療の結果が異なることの一つになると考えられた。

人医療の報告では、心不全患者では腸内細菌叢の多様性は低下するとされ、具体的にはBlautia属菌、Collinsella属菌、他に未知の2つの菌種の大幅な減少が原因である[39]。本研究では、心不全犬での腸内細菌叢の多様性の変化は認められなかったが、FSの違いにより $\alpha$ 多様性において有意な差が認められた。FS $\leq$ 35%の群は、細菌の種の豊富さが低下しており、FSと腸内細菌叢の多様性に

関連性がある可能性が示唆された。犬のMMVDでは重症になるに比例し、FSが増加していくとされているが、病態が進行したMMVDでは、重度の容積負荷による左心筋不全のため収縮機能障害が引き起こされ、FSが低下する可能性が示唆されている[9]。人医療の報告でも、僧帽弁閉鎖不全症による重度な容積負荷は左室肥大や収縮機能障害を引き起こすことが報告されている[12, 13, 73]。また、本研究において、FS $\leq$ 35%群は、健康犬もいるが $>$ 35%群に比べ、StageB2、Cの症例が多い。StageB2、Cの症例の多くはピモベンダンを内服しており、ピモベンダンはFSを増加させることが報告されている[33]。ピモベンダンを内服しているにも関わらず、FS $\leq$ 35%ということは左心筋不全に陥り収縮機能障害になっている可能性が考えられ、左心筋不全まで進行した可能性のあるMMVDは、腸内細菌叢の種の豊富さに変化をもたらす可能性が示唆された。しかし、心臓の収縮機能は年齢、性別、品種、併発疾患、前負荷、後負荷など様々な因子に影響を受けやすく、本研究の結果に影響を与えた可能性を考慮する必要がある[15, 18, 48]。

本研究で得られたFS $\leq$ 35%群の多様性の低下は、主に腸内細菌叢構成におけるTyzzerella属菌とBacteroides属菌の減少によるものと考えられる。また、65% $<$ LVEF $<$ 75%群においては、Bacteroides属菌の有意な増加が認められた。Bacteroides属菌は、偏性嫌気性グラム桿菌で人でも犬でも腸内細菌叢を構成する優勢菌の一つであり、基本的には病原性は低いが体の抵抗力が弱くなった時に病気を引き起こす、いわゆる日和見菌である。人医療において炎症の増悪に関与し、その菌体成分に悪性化作用があると報告されている[43]。このBacteroides属菌を含む嫌気性常在菌が、血管や腹腔内に入ることによって敗血症や腹膜炎などを引き起こす。しかし、有用な働きもあり、Bacteroides属菌が分泌するポリサッカライドAという糖質物質が、免疫のバランスを保ってHelicobacter属菌によって引き起こされる腸の炎症を抑制している可能性がある[79]。犬におけるBacteroides属菌の作用は明確にはなっていないが、人医療の報告と同様であれば、犬においてもBacteroides属菌は、腸および全身の健康において非常に重要な腸内細菌である可能性がある。本研究では、Bacteroides属菌が増減している症例において、軟便や下痢といった症状は認められず、また腸炎を呈している症例もいなかった。しかし、Bacteroides属菌の増減は、腸内環境や全身状態に悪影響をおよぼす可能性があり、Bacteroides属菌の増減を引き起こすFSや

LVEFは、腸内細菌叢に変化をもたらす因子として注意する必要があると考えられた。FSが低下した左心筋不全になっている可能性のある進行したMMVDでは、プロバイオティクスの投与など、腸内細菌叢を改善させる早期治療が必要であると考えられた。また、今後としてFS $\leq$ 35%でBacteroides属菌の減少の認められた症例が、治療によりFSが $>$ 35%以上などに増加した時に、Bacteroides属菌が増加するかなど腸内細菌叢がどう変化するのか、経時的に観察する研究を行うことで、さらにFS、LVEFと腸内細菌叢の関連性について明らかにできると考えられた。

MMVD群、MMVD+CKD群、MMVD+others群、nothing群、others群の5群間における $\alpha$ 多様性解析（検出された配列数、種の豊富さ）にて、MMVD+others群がMMVD+CKD群、nothing群と比較して、有意に低いことが認められた。CKDではないMMVDに併発する疾患が、腸内細菌叢に影響を与えた可能性が示唆された。具体的にMMVD+others群に該当する症例の併発疾患は、甲状腺機能低下症、副腎皮質機能低下症、気管虚脱、糖尿病、犬アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、膝蓋骨内方脱臼であり、これらの疾患や疾患に対する治療が、本研究に影響を与えた可能性がある。人医療では肥満、高血圧、CKDが腸内細菌叢に影響を与えることは判明している[23, 29, 78]。本研究において、明らかな肥満を呈する症例は認められなかった。血圧に関しては、本研究では未測定であったため、今後の研究における課題の一つである。今後、獣医療における腸内細菌叢の研究が活発になれば、様々な疾患と腸内細菌叢の関連性が明らかになると考えられた。

本研究における制限は、腸内細菌叢が個人差、宿主の遺伝子型、生活環境など、様々な多くの因子による影響を受けることであった。一つ目は年齢である。犬において年齢により腸内細菌叢が変化することが明らかになっている[24, 41, 42, 47]。加齢に伴う腸内細菌叢の変化として、Lactobacillus属菌の減少やKlebsiella属菌の増加が報告されている。本研究においても、症例の年齢が $10.3 \pm 3.1$ 歳（3歳～16歳）とかなり年齢層の幅が広がった。この年齢層の幅の広さによる腸内細菌叢の違いが、結果に影響を与えた可能性はあり、今後、症例を増やし年齢に制限をかけて研究を行うことで、心臓病と腸内細菌叢の関連性を追求できると示唆された。また、人医療の報告では、腸内細菌叢に影響を与える薬剤として抗生物質、プロトンポンプ阻害薬、ACE-I、アンギオテンシン受容体拮抗薬があげられている[30]。本研究では、プロトンポンプ阻害薬、アンギオテ

ンシン受容体拮抗薬を内服している症例は認められなかったが、抗生物質2例、ACE-Iを内服している症例は多数認められた。つまり、内服している薬剤が、本研究の結果に影響を与えた可能性が示唆された。また、本研究で一番結果に影響を与えたと考えられたのは食事である。本研究が臨床研究という特性もあり、症例の普段食べているものは家庭によって異なった。人医療と同様に、犬においても食事と腸内細菌叢の関連性を示す研究報告はあり、食事の内容により腸内細菌叢の変化があることは明らかにされている[36, 80]。本研究は、症例の食事内容を統一できていないため、食事内容が本研究に与える影響を考慮する必要性があった。



### 3.5. 小 活

本章では、心臓病と腸の関連性を調査するために、次世代シーケンスを用いてMMVDのチワワ63頭の糞便の腸内細菌叢のメタゲノム解析を行った。

MMVDの重症度や、心不全の有無による腸内細菌叢の変化は認められず、LA/AoやLVIDDN、VHSといった心拡大を評価するパラメーターと腸内細菌叢の関連性も認められなかった。一方、FSと腸内細菌叢の種の豊富さにおいて、関連性があることが示唆され、腸内細菌叢の優位菌であるBacteroides属菌において、FS $\leq$ 35%群では減少、65% $<$ LVEF $<$ 75%群では増加することが確認され、FSやLVEFがBacteroides属菌の数に影響をもたらす可能性があることが示唆された。また、FSが低下するほどの左心筋不全にまで進行した可能性のあるMMVDでは、腸内細菌叢への影響があることが示唆され、プロバイオティクスの投与など、早期の治療が必要であると考えられた。

MMVD+others 群が、有意に $\alpha$ 多様性低いことが認められ、MMVD以外の併発疾患が、腸内細菌叢の種の豊富さに影響を及ぼしている可能性が示唆された。併発疾患以外にも、個体差、遺伝的要因、年齢、食事といった生活環境が、腸内細菌叢に与えている影響を考慮する必要がある。

人医療では、心不全による腸内細菌叢の変化が認められているが、犬においては一致しなかった。人と犬では種としての腸内細菌叢の違いを把握し、食事内容など外的因子を統一した研究が、今後必要であると考えられた。

## 総 括

人医療においては、「多臓器円環」という概念があり、それは体の部位、臓器は独立して存在するものではなく、円のようにつながっている。そのため、特定の臓器の疾病に対しても、体全体、臓器の枠を超えた総合診療が必要であるという理論である。循環器においても、人医療では腎臓、肝臓などの臓器や肥満、高血圧、糖尿病などの疾病との関連性が報告されている。その中の一つに腸があり、「心腸連関」という概念が構築されている。心不全が腸管粘膜障害を引き起こし、腸管透過性が亢進することで、腸内細菌や腸内細菌代謝物が微小血管に移行し、全身性炎症を引き起こし、さらなる心不全の増悪を引き起こす。また、特定の腸内細菌叢が変化することで、心血管疾患に罹患するリスクが増加することなどが明らかになっている。そのため、心血管疾患のリスクを下げるための早期的な治療が行われている。

獣医療においては、人医療と同様に、心臓と他の臓器との関連性が報告されているが、代表的なのは心腎連関であり、心臓と腸との関連性は報告が少ない。本研究では、犬における心腸連関という概念の基盤を作るため、後天性心疾患として最も多い粘液腫様性僧帽弁閉鎖不全症 (Myxomatous Mitral Valve Disease, MMVD) が、腸におよぼす影響について検討した。

第 I 章では、人医療で腸管虚血による腸管粘膜障害のバイオマーカーとして期待されている、腸管由来脂肪酸結合蛋白 (Intestinal Fatty Acid-Binding Protein, I-FABP) を用いて、MMVDによる腸管粘膜障害のリスクについて、健常およびMMVDに罹患した計69頭のチワワを対象に調査した。MMVDの重症度に比例して、症例の血清中のI-FABP濃度の増加が認められ、心不全の犬では、心不全のない犬に比較し、有意なI-FABPの増加が認められた。この結果より、MMVDの重症度が増加するほど腸管粘膜障害のリスクも増加し、心不全の犬では心不全のない犬に比べ、明らかに腸管粘膜障害のリスクを持っている可能性が示唆された。また、心臓超音波検査で得られるLA/Ao、拡張早期波 (Early wave velocity, E vel) の増加は、MMVDの予後不良因子と報告され、本研究においても、MMVDの重症度に伴い有意に増加し、また、胸部レントゲン検査で得られるVHS、VLASもMMVDの重症度に伴い有意に増加した。このようなMMVDの悪化を示すパラメータ

一と、腸管粘膜障害のリスクに相関関係がある可能性が示唆された。人医療では、心不全患者においてI-FABPの増加した患者は、有意に生存期間が短く、I-FABPが予後不良因子になり得る可能性が示唆されている。人医療の報告と、本研究で得られたI-FABPの測定値が異なるため、人医療での報告をそのまま犬に外挿することは不適切であると考えられる。しかし、今後、さらに犬でのI-FABPの研究が行われ、心不全との関連性が明らかになれば、犬でのMMVDによる心不全の新しい予後不良マーカーになり得る可能性が示唆された。

第II章では、人医療で腸管粘膜障害のバイオマーカーとして研究されているD型乳酸、組織や細胞への低灌流による低酸素状態を把握するバイオマーカーとして、人医療や獣医療の救急医療において使用されているL型乳酸を測定することで、MMVDの腸への影響、組織や細胞への低灌流を、健常犬とMMVD罹患犬の69頭のチワワを対象に調査した。D型乳酸、L型乳酸ともにMMVDの重症度に比例し、血清中の濃度が増加する傾向が認められた。D型乳酸に関しては、心拡大のある犬が心拡大のない犬に比べ、有意な増加が認められた。L型乳酸に関しては、心拡大のある犬が心拡大のない犬に比べ、有意な増加が認められ、心不全のある犬が心不全ではない犬に比べ、有意に増加することが認められた。心拡大のある犬では腸管粘膜障害のリスクが高く、心不全の犬ではさらに組織の低酸素状態がより重症であることが示唆された。心不全といった重篤な疾患で、型L-乳酸の値が増加することは人の過去の報告に一致しており、獣医療における乳酸測定の意義、特にMMVDの重症度や予後予測マーカーとしてさらに重要な位置付けになり得る可能性を支持する結果であると考えられた。D型乳酸は、健常犬の測定値が過去の報告と一致したが、犬でのD型乳酸を使った研究は少なく、有用性は低いと考えられる。今後、D型乳酸の有用性を証明するために、犬におけるD型乳酸を使った研究を多く行う必要があると考えられた。

第I章および第II章において、様々なバイオマーカーを使用し、MMVDがおよぼす腸への影響について調査した。第III章では、健常犬およびMMVD罹患犬の63頭のチワワを対象に、次世代シーケンスを用いたメタゲノム解析を行うことで、糞便中の腸内細菌叢を調査し、比較検討した。その結果、MMVDの重症度、心不全の有無、LA/Ao、LVIDDN、VHSといった心臓パラメーターと、腸内細菌叢の変化についての関連性は認められなかった。一方、FS $\leq$ 35%群において、有意

に腸内細菌叢の $\alpha$ 多様性（種の豊富さ）が低下していることが認められ、FSと腸内細菌叢の種の豊富さに関連性があることが示唆された。また、FS $\leq$ 35%群にてBacteroides属菌の有意な減少、65% $<$ LVEF $<$ 75%群にてBacteroides属菌の有意な増加が認められた。MMVDでFSが低下している症例では、腸内細菌叢が変化している可能性があり、プロバイオティクスの投与など、腸に対する早期の治療介入を考慮する必要性あると考えられた。また、併発疾患が腸内細菌叢に影響を与えている可能性が示唆された。腸内細菌叢は、個体差や遺伝的要素、食事といった生活環境などの影響を受けることが判明しており、本研究の結果にも影響を与えた可能性を考慮する必要がある。

本研究によって、MMVDが腸に対して、腸管粘膜障害や腸内細菌叢の変化などの悪影響をおよぼす可能性があることが示された。また、心不全犬は腸管粘膜障害のリスクが高いことや、FSが低下しているMMVD罹患犬では腸内細菌叢が有意に変化していることが明らかになった。本研究に基づき、該当する症例では、臨床症状の有無に関わらず、腸に対する早期の治療介入がされることを期待する。そして、獣医療において、心臓と腸のより詳細な関連性が明らかになり、「心腸連関」の概念が普及することで、多くの症例が救われることを期待している。

## 謝 辞

本論文作成にあたり終始厚く御指導賜りました酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 山下和人教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文作成において、終始丁寧かつ適切なお指導およびご助言を賜りました、酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 岩野英和教授、上野博史教授、井坂光宏准教授、佐野忠士准教授に深く感謝の意を申し上げます。本研究の遂行にあたり御指導いただきました東京動物心臓病センター 岩永孝治先生に厚く御礼申し上げます。第Ⅰ章、第Ⅱ章の実験協力を頂きました本学獣医学伴侶動物外科学の学生の皆さんに心から感謝いたします。本研究の論文作成に多大なご協力とご助言、第Ⅲ章の腸内細菌叢のメタゲノム解析に関し実験協力をいただきましたアニコム先進医療研究所 島綾香先生、石原玄基先生、現在はご退職された清水孝恵先生に深く感謝申し上げます。また本研究の論文作成に多大なご協力をいただいた横浜山手犬猫医療センター 上田一徳先生、川合智行先生、他スタッフの皆様へ感謝いたします。本研究の遂行にご協力いただいた東京動物心臓病センター 青柳祐奈先生に感謝いたします。最後になりますが本研究を進めるにあたり研究対象の症例としてご協力いただいたチワワちゃんたち、またその飼い主様に敬意と感謝の意を表します。

## 引用文献

1. Alessandri, G., Milani, C., Manacabelli, L., Longhi, G., Anzalone, R., Luigli, G. A., Duranti, S., Turrone, F., Ossiprandi, M. C., Slinderen, D. V. and Ventura, M. 2020. Deciphering the bifidobacterial Populations within the Canine and Feline Gut Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **86**: 02815-02819.
2. Allen, S. E. and Holm, J. L. 2008. Lactate: physiology and clinical utility. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* **18**: 123-132.
3. Andersen, L. W., Landow, L., Baek, L., Jansen, E. and Baker, S. 1993. Association between gastric intramucosal pH and splanchnic endotoxin, antibody to endotoxin, and tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Crit. Care Med.* **21**: 210-217.
4. Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Haggstrom, J., Hamlin, R., Keene, B., Luis-Fuentes, V. and Stepien, R. 2009. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J. Vet. Intern. Med.* **23**: 1142-1150.
5. Benkoe, T. M., Mechtler, T. P., Weninger, M., Pones, M., Rebhandl, W. and Kasper, D. C. 2014. Serum levels of interleukin-8 and gut-associated biomarkers in diagnosing necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J. Pediatr. Surg.* **49**: 1446-1451.
6. Bongartz, L. G., Cramer, M. J., Doevendans, P. A., Joles, J. A. and Braam, B. 2005. The severe cardiorenal syndrome: 'Guyton revisited'. *Eur. Heart J.* **26**: 11-17.
7. Borgarelli, M. and Haggstrom, J. 2010. Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: natural history, clinical presentation and therapy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*

- 40: 651-663.
8. Borgarelli, M., Savarino, P., Crosara, S., Santilli, R. A., Chiavegato, D., Poggi, M., Bellino, C., Rosano, G., Zanatta, R., Haggstorm, J. and Tarducci, A. 2008. Survival characteristics and Prognostic Variables of Dogs with Mitral Regurgitation Attributable to Myxomatous Valve Disease. *J. Vet. Intern. Med.* **22**: 120-128.
  9. Borgarelli, M., Tarducci, A., Zanatta, R. and Haggstorm, J. 2007. Decreased Systolic Function and Inadequate Hypertrophy in Large and Small Breed Dogs with Chronic Mitral Valve Insufficiency. *J. Vet. Intern. Med.* **21**: 61-67.
  10. Bosso, G., Mercurio, V., Diab, N., Pagano, A., Porta, G., Allegorico, E., Serra, C., Guiotto, G., Numis, F. G., Tocchetti, C. G. and Schiraldi, F. 2021. Time-weighted lactate as a predictor of adverse outcome in acute heart failure. *ESC. Heart. Fail.* **8**: 539-545.
  11. Buchanan, J. W. and Bucheler, J. 1995. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **206**: 194-199.
  12. Carabello, B. A. 2002. Concentric versus eccentric remodeling. *J. Card. Fail.* **8**: S258-263.
  13. Carabello, B. A., Nakano, K., Corin, W., Biederman, R. and Spann, J. F., Jr. 1989. Left ventricular function in experimental volume overload hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **256**: H974-H981.
  14. Claus, P., Gimenes, A. M., Castro, J. R., Mantovani, M. M., Kanayama, K. K., Simoes, D. M. N. and Schwartz, D. S. 2017. Blood lactate concentration in diabetic dogs. *Can. Vet. J.* **58**: 817-822.
  15. Cornell, C. C., Kittleson, M. D., Torre, P. D., Haggstorm, J., Lombard, C. W., Pedersen, H. D., Vollmar, A. and Wey, A. 2004. Allometric Scaling of M-Mode cardiac Measurements in Normal Adult

- Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **18**: 311-321.
16. de Haan, J. J., Lubbers, T., Derikx, J. P., Relja, B., Henrich, D., Greve, J. W., Marzi, I. and Buurman, W. A. 2009. Rapid development of intestinal cell damage following severe trauma: a prospective observational cohort study. *Crit. Care.* **13**: R86.
  17. Deitch, E. A. 2002. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery.* **131**: 241-244.
  18. Della Torre, P. K., Kirby, A. C., Church, D. B. and Malik, R. 2000. Echocardiographic measurements in greyhounds, whippets and Italian greyhounds--dogs with a similar conformation but different size. *Aust. Vet. J.* **78**: 49-55.
  19. Derikx, J. P., Poeze, M., van Bijnen, A. A., Buurman, W. A. and Heineman, E. 2007. Evidence for intestinal and liver epithelial cell injury in the early phase of sepsis. *Shock.* **28**: 544-548.
  20. Derikx, J. P., van Waardenburg, D. A., Thuijls, G., Willigers, H. M., Koenraads, M., van Bijnen, A. A., Heineman, E., Poeze, M., Ambergen, T., van Ooij, A., van Rhijn, L. W. and Buurman, W. A. 2008. New Insight in Loss of Gut Barrier during Major Non-Abdominal Surgery. *PLoS One.* **3**: e3954.
  21. Doig, C. J., Sutherland, L. R., Sandham, J. D., Fick, G. H., Verhoef, M. and Meddings, J. B. 1998. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**: 444-451.
  22. Emoto, T., Yamashita, T., Sasaki, N., Hirota, Y., Hayashi, T., So, A., Kasahara, K., Yodoi, K., Matsumoto, T., Mizoguchi, T., Ogawa, W. and Hirata, K. 2016. Analysis of Gut Microbiota in Coronary Artery Disease Patients: a Possible Link between Gut Microbiota and Coronary Artery Disease. *J Atheroscler Thromb.* **23**:



- 908-921.
23. Gao, H. and Liu, S. 2017. Role of uremic toxin indoxyl sulfate in the progression of cardiovascular disease. *Life Sci.* **185**: 23-29.
  24. Guard, B. C., Mila, H., Steiner, J. M., Mariani, C., Suchodolski, J. S. and Chastant-Maillard, S. 2017. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLoS One.* **12**: e0175718.
  25. Han, D., Choi, R. and Hyun, C. 2015. Canine pancreatic-specific lipase concentrations in dogs with heart failure and chronic mitral valvular insufficiency. *J. Vet. Intern. Med.* **29**: 180-183.
  26. Handl, S., Dowd, S. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M. and Suchodolski, J. S. 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **76**: 301-310.
  27. Hasegawa, H., Fukushima, T., Lee, J. A., Tsukamoto, K., Moriya, K., Ono, Y. and Imai, K. 2003. Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**: 886-891.
  28. Heida, F. H., Hulscher, J. B., Schurink, M., Timmer, A., Kooi, E. M., Bos, A. F., Bruggink, J. L., Kasper, D. C., Pones, M. and Benkoe, T. 2015. Intestinal fatty acid-binding protein levels in Necrotizing Enterocolitis correlate with extent of necrotic bowel: results from a multicenter study. *J. Pediatr. Surg.* **50**: 1115-1118.
  29. Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y. Y., Knight, R., Ahima, R. S., Bushman, F. and Wu, G. D. 2009. High-fat diet determines the composition

- of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. **137**: 1716–1724 e1711–1712.
30. Kamo, T., Akazawa, H., Suda, W., Saga-Kamo, A., Shimizu, Y., Yagi, H., Liu, Q., Nomura, S., Naito, A. T., Takeda, N., Harada, M., Toko, H., Kumagai, H., Ikeda, Y., Takimoto, E., Suzuki, J. I., Honda, K., Morita, H., Hattori, M. and Komuro, I. 2017. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS One*. **12**: e0174099.
  31. Kamo, T., Akazawa, H., Suzuki, J. I. and Komuro, I. 2017. Novel Concept of a Heart-Gut Axis in the Pathophysiology of Heart Failure. *Korean Circ J*. **47**: 663–669.
  32. Kanda, T., Fujii, H., Tani, T., Murakami, H., Suda, T., Sakai, Y., Ono, T. and Hatakeyama, K. 1996. Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology*. **110**: 339–343.
  33. Kanno, N., Kuse, H., Kawasaki, M., Hara, A., Kano, R. and Sasaki, Y. 2007. Effects of Pimobendan for Mitral Valve Regurgitation in Dogs. *J. Vet. Med. Sci*. **69**: 373–377.
  34. Karagiannis, M. H., Reniker, A. N., Kerl, M. E. and Mann, F. A. 2006. Lactate Measurement as an Indicator of Perfusion. *Compendium*. **3**: 287–300.
  35. Keene, B. W., Atkins, C. E., Bonagura, J. D., Fox, P. R., Haggstrom, J., Fuentes, V. L., Oyama, M. A., Rush, J. E., Stepien, R. and Uechi, M. 2019. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med*. **33**: 1127–1140.
  36. Kim, J., An, J. U., Kim, W., Lee, S. and Cho, S. 2017. Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. *Gut Pathog*. **9**: 68.

37. Kitai, T., Kim, Y. H., Kiefer, K., Morales, R., Borowski, A. G., Grodin, J. L. and Tang, W. H. W. 2017. Circulating intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) levels in acute decompensated heart failure. *Clin. Biochem.* **50**: 491-495.
38. Kwong, J. C., McCallum, N., Sintchenko, V. and Howden, B. P. 2015. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology.* **47**: 199-210.
39. Luedde, M., Winkler, T., Heinsen, F. A., Ruhlemann, M. C., Spehlmann, M. E., Bajrovic, A., Lieb, W., Franke, A., Ott, S. J. and Frey, N. 2017. Heart failure is associated with depletion of core intestinal microbiota. *ESC Heart Fail.* **4**: 282-290.
40. Malcolm, E. L., Visser, L. C., Phillips, K. L. and Johnson, L. R. 2018. Diagnostic value of vertebral left atrial size as determined from thoracic radiographs for assessment of left atrial size in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **253**: 1038-1045.
41. Masuoka, H., Shimada, K., Kiyosue-Yasuda, T., Kiyosue, M., Oishi, Y., Kimura, S., Yamada, A. and Hirayama, K. 2017. Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. *Biosci Microbiota Food Health.* **36**: 27-31.
42. Matumoto, H., Baba, E., Ishikawa, H. and Hodate, Y. 1976. Studies in Bacterial Flora in the Alimentary Canal of Dogs II. Development of the Fecal Bacterial Flora in Puppies. *J. Vet. Med. Sci.* **38**: 485-494.
43. Mazmanian, S. K., Round, J. L. and Kasper, D. L. 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature.* **453**: 620-625.
44. Memet, O., Zhang, L. and Shen, J. 2019. Serological biomarkers for acute mesenteric ischemia. *Ann. Transl. Med.* **7**: 394.
45. Middelbos, I. S., Vester Boler, B. M., Qu, A., White, B. A.,

- Swanson, K. S. and Fahey, G. C., Jr. 2010. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS One*. **5**: e9768.
46. Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M. E., Steiner, J. M. and Suchodolski, J. S. 2014. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Vet. Microbiol.* **174**: 463-473.
47. Mizukami, K., Uchiyama, J., Igarashi, H., Murakami, H., Osumi, T., Shima, A., Ishihara, G., Nasukawa, T., Une, Y. and Sakaguchi, M. 2019. Age-related analysis of the gut microbiome in a purebred dog colony. *FEMS Microbiol. Lett.* **366**.
48. Moise, N. S., Moise, N. S., Scarlett, J., Mohammed, H. and Yeager, A. E. 1992. Effect of Breed and Body Weight on Echocardiographic Values in Four Breeds of Dogs of Differing Somatotype. *J. Vet. Intern. Med.* **6**: 220-224.
49. Mondo, E., Marliani, G., Accorsi, P. A., Cocchi, M. and Di Leone, A. 2019. Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open Vet J.* **9**: 253-258.
50. Montagnana, M., Danese, E. and Lippi, G. 2018. Biochemical markers of acute intestinal ischemia: possibilities and limitations. *Ann. Transl. Med.* **6**: 341.
51. Mullens, W., Abrahams, Z., Skouri, H. N., Francis, G. S., Taylor, D. O., Starling, R. C., Paganini, E. and Tang, W. H. 2008. Elevated intra-abdominal pressure in acute decompensated heart failure: a potential contributor to worsening renal function? *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**: 300-306.
52. Nagatomo, Y. and Tang, W. H. 2015. Intersections Between Microbiome and Heart Failure: Revisiting the Gut Hypothesis. *J. Card. Fail.* **21**: 973-980.

53. Nielsen, C., Lindholt, J. S., Erlandsen, E. J. and Mortensen, F. V. 2011. d-lactate as a marker of venous-induced intestinal ischemia: an experimental study in pigs. *Int. J. Surg.* **9**: 428-432.
54. Ockner, R. K. and Manning, J. A. 1974. Fatty Acid-Binding Protein in Small Intestine. *J. Clin. Invest.* **54**: 326-338.
55. Pasini, E., Aquilani, R., Testa, C., Baiardi, P., Angioletti, S., Boschi, F., Verri, M. and Dioguardi, F. 2016. Pathogenic Gut Flora in Patients With Chronic Heart Failure. *JACC Heart Fail.* **4**: 220-227.
56. Pastor Rojo, O., Lopez San Roman, A., Albeniz Arbizu, E., de la Hera Martinez, A., Ripoll Sevillano, E. and Albillos Martinez, A. 2007. Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**: 269-277.
57. Pelters, M. M., Hanhoff, T., Van der Voort, D., Arts, B., Peters, M., Ponds, R., Honig, A., Rudzinski, W., Spener, F., de Kruijk, J. R., Twijnstra, A., Hermens, W. T., Menheere, P. P. and Glatz, J. F. 2004. Brain- and heart-type fatty acid-binding proteins in the brain: tissue distribution and clinical utility. *Clin. Chem.* **50**: 1568-1575.
58. Pouchelon, J. L., Atkins, C. E., Bussadori, C., Oyama, M. A., Vaden, S. L., Bonagura, J. D., Chetboul, V., Cowgill, L. D., Elliot, J., Francey, T., Grauer, G. F., Fuentes, V. L., Moise, N. S., Polzin, D. J., Van Dongen, A. M. and Van Israel, N. 2015. Cardiovascular-renal axis disorders in the domestic dog and cat: a veterinary consensus statement. *J. Small Anim. Pract.* **56**: 537-552.
59. Relja, B., Szermutzky, M., Henrich, D., Maier, M., de Haan, J. J., Lubbers, T., Buurman, W. A. and Marzi, I. 2010. Intestinal-

- FABP and liver-FABP: Novel markers for severe abdominal injury. *Acad. Emerg. Med.* **17**: 729–735.
60. Robinson, J. W. L. and Mirkovitch, V. 1972. The recovery of function and microcirculation in small intestinal loops following ischemia. *Gut.* **13**: 784–789.
  61. Rogler, G. and Rosano, G. 2014. The heart and the gut. *Eur. Heart J.* **35**: 426–430.
  62. Ronco, C., Haapio, M., House, A. A., Anavekar, N. and Bellomo, R. 2008. Cardiorenal syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52**: 1527–1539.
  63. Sandek, A., Bauditz, J., Swidsinski, A., Buhner, S., Weber-Eibel, J., von Haehling, S., Schroedl, W., Karhausen, T., Doehner, W., Rauchhaus, M., Poole-Wilson, P., Volk, H. D., Lochs, H. and Anker, S. D. 2007. Altered intestinal function in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**: 1561–1569.
  64. Sandek, A., Bjarnason, I., Volk, H. D., Crane, R., Meddings, J. B., Niebauer, J., Kalra, P. R., Buhner, S., Herrmann, R., Springer, J., Doehner, W., von Haehling, S., Anker, S. D. and Rauchhaus, M. 2012. Studies on bacterial endotoxin and intestinal absorption function in patients with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* **157**: 80–85.
  65. Sandek, A., Swidsinski, A., Schroedl, W., Watson, A., Valentova, M., Herrmann, R., Scherbakov, N., Cramer, L., Rauchhaus, M., Grosse-Herrenthey, A., Krueger, M., von Haehling, S., Doehner, W., Anker, S. D. and Bauditz, J. 2014. Intestinal blood flow in patients with chronic heart failure: a link with bacterial growth, gastrointestinal symptoms, and cachexia. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**: 1092–1102.
  66. Scheijen, J. L., Hanssen, N. M., van de Waarenburg, M. P., Jonkers, D. M., Stehouwer, C. D. and Schalkwijk, C. G. 2012. L(+) and D(-) lactate are increased in plasma and urine samples of type 2

- diabetes as measured by a simultaneous quantification of L(+) and D(-) lactate by reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Exp. Diabetes Res.* **2012**: 234812.
67. Suchodolski, J. S. 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **41**: 261-272.
68. Suchodolski, J. S., Camacho, J. and Steiner, J. M. 2008. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **66**: 567-578.
69. Sundaram, V. and Fang, J. C. 2016. Gastrointestinal and Liver Issues in Heart Failure. *Circulation.* **133**: 1696-1703.
70. Swanson, K. S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Middelbos, I. S., Vester, B. M., Barry, K. A., Nelson, K. E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Cann, I. K., White, B. A. and Fahey, G. C., Jr. 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* **5**: 639-649.
71. Tang, W. H., Wang, Z., Fan, Y., Levison, B., Hazen, J. E., Donahue, L. M., Wu, Y. and Hazen, S. L. 2014. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**: 1908-1914.
72. Thomas, W. P., Gaber, C. E., Jacobs, G. J., Kaplen, P. M., Lombard, C. W., Mioise, N. S. and Moses, B. L. 1993. Recommendations for Standards in Transthoracic Two-Dimensional Echocardiography in the Dog and Cat. *J. Vet. Intern. Med.* **7**: 247-252.
73. Urabe, Y., Mann, D. L., Kent, R. L., Nakano, K., Tomanek, R. J., Carabello, B. A. and Cooper, G. t. 1992. Cellular and ventricular contractile dysfunction in experimental canine mitral

- regurgitation. *Circ. Res.* **70**: 131-147.
74. Venn, E. C., Barnes, A. J., Hansen, R. J., Boscan, P. L., Twedt, D. C. and Sullivan, L. A. 2020. Serum D-lactate concentrations in dogs with parvoviral enteritis. *J. Vet. Intern. Med.* **34**: 691-699.
75. Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y. M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Tang, W. H., DiDonato, J. A., Lusis, A. J. and Hazen, S. L. 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* **472**: 57-63.
76. Wang, Z., Roberts, A. B., Buffa, J. A., Levison, B. S., Zhu, W., Org, E., Gu, X., Huang, Y., Zamanian-Daryoush, M., Culley, M. K., DiDonato, A. J., Fu, X., Hazen, J. E., Krajcik, D., DiDonato, J. A., Lusis, A. J. and Hazen, S. L. 2015. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell.* **163**: 1585-1595.
77. Xenoulis, P. G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J. M., Van House, A. M. and Suchodolski, J. S. 2008. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol. Ecol.* **66**: 579-589.
78. Yang, T., Santisteban, M. M., Rodriguez, V., Li, E., Ahmari, N., Carvajal, J. M., Zadeh, M., Gong, M., Qi, Y., Zubcevic, J., Sahay, B., Pepine, C. J., Raizada, M. K. and Mohamadzadeh, M. 2015. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension.* **65**: 1331-1340.
79. Yoshida, N., Emoto, T., Yamashita, T., Watanabe, H., Hayashi, T., Tabata, T., Hoshi, N., Hatano, N., Ozawa, G., Sasaki, N., Mizoguchi, T., Amin, H. Z., Hirota, Y., Ogawa, W., Yamada, T. and Hirata, K. I. 2018. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei*



Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. *Circulation*. **138**: 2486-2498.

80. Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., Ballevre, O. and Rochat, F. 2003. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*. **87**: 397-407.

Intestinal complication of myxomatous mitral valve disease using I-FABP, D/L-Lactate, and gut microbiota by 16S rRNA amplicon sequence analysis in Chihuahuas.

Ryuji Araki

Veterinary Anesthesiology, Doctoral course of Veterinary Medicine,  
Graduate School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University,  
Ebetsu, Hokkaido, Japan

In human medicine, the effects of heart disease on the intestines have been shown. However, there are no reports in veterinary medicine. In this study, we investigated whether myxomatous mitral valve disease (MMVD) causes intestinal complications in Chihuahuas. This study aimed to clarify the relationship between heart disease and the intestine in dogs.

In this study, we investigated the intestinal complications of MMVD using I-FABP, which is used as a marker of intestinal mucosal injury in human medicine. We recorded the profiles of healthy and MMVD Chihuahuas and performed and recorded echocardiography and chest radiography. We then measured I-FABP by ELISA and found a proportional increase in I-FABP with worsening MMVD. Dogs with heart failure showed a significant increase in I-FABP compared to dogs without heart failure. The results suggest that dogs with heart failure are at higher risk of intestinal mucosal injury.

In this study, we investigated the intestinal complications and systemic effects of MMVD using D-Lactate, which has been studied as a marker of intestinal mucosal injury in human medicine, and L-Lactate, which has been used as a marker of tissue and cellular hypoperfusion. The increase in D-Lactate was proportional to the worsening of MMVD and

was significantly higher in dogs with heart failure than in dogs without heart failure. There was also an increase in L-Lactate with worsening MMVD, with a significant increase in dogs with heart enlargement compared to those without, and a significant increase in dogs with heart failure compared to those without. It was suggested that dogs with heart failure may have a higher risk of intestinal mucosal injury and systemic hypoperfusion.

In human medicine, there have been many reports on heart disease and gut microbiota. Patients with heart failure have anatomical and functional changes in the gut. In addition, the diversity of the gut microbiota is reduced and the ratio of microorganisms in the gut microbiota is altered. It has also been reported that certain gut bacterial species are at risk for cardiovascular disease. However, there are no studies on heart disease and gut microbiota in veterinary medicine. In this study, we investigated the gut microbiota in the feces of healthy dogs and dogs with MMVD using 16S rRNA amplicon sequence analysis. No change in gut microbiota was observed with the severity of MMVD. A decrease in gut microbiota diversity was observed in  $FS \leq 35\%$ . In  $FS > 35\%$ , *Bacteroides* spp. There was a significant increase in *Bacteroides* spp. at  $65\% < LVEF < 75\%$ , suggesting that cardiac contractile function, such as FS and LVEF, is related to gut microbiota. The results suggest that MMVD and concomitant diseases may affect the gut microbiota. It is important to consider that age, diet, medications, and individual differences affected the results of this study.

The purpose of this study was to determine the intestinal complications of MMVD by studying the use of intestinal mucosal injury markers and investigating the intestinal microbiota. The risk of intestinal mucosal injury was found to be higher in dogs with heart failure, and cases with reduced FS were found to have altered gut microbiota. It was thought that early treatment to the intestine would

be better in heart failure dogs and patients with reduced FS.