

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 荒木 隆次

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 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

審査委員

主査 教授 山下 和人（獣医麻酔学）

副査 教授 岩野 英知（獣医生化学）

副査 教授 上野 博史（運動器・神経病治療学）

副査 准教授 佐野 忠士（獣医麻酔学）

副査 准教授 井坂 光宏（循環器病学）

学位論文要旨

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

獣医麻酔学 荒木隆次

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、人医療では腎臓や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。その中の一つが腸であり、「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変性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濃度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左心房大動脈比（LA/Ao）、拡張早期波（Early

wave velocity, Evel) 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椎体心臓サイズ (VHS)、脊椎左房サイズ (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ーと、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。

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、健常およびMMVDに罹患した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型乳酸および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た。さらに、L型乳酸に関しては、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、L型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に一致したが、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た。

第III章では、健常犬およびMMVDに罹患した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、標準化左室拡張末期径 (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、左室内径短縮率 (LVFS) $\leq 35\%$ 群において、有意に腸内細菌叢の α 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、LVFS $\leq 35\%$ 群にてBacteroides属菌の有意な減少、65% $<$ 左室駆出率 (LVEF) $< 75\%$ 群にてBacteroides属菌の有意な増加が認められた。MMVD罹患チワワでは、LVFS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。

本研究によって、MMVDに罹患したチワワでは、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を明らかにした。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

荒木氏は、獣医療において「心腸連関」という概念の基盤を作ることを目的に、伴侶動物として広く飼養されている小型犬種のチワワを調査対象として、健常チワワ 19 頭および粘液腫様変性性僧帽弁閉鎖不全症 (Myxomatous Mitral Valve Disease, MMVD) に罹患したチワワ 50 頭について血清中の腸管粘膜障害マーカーと糞便中の腸内細菌叢を調査した。具体的には、本研究を第 I ～ III 章で構成し、第 I 章では腸管由来脂肪酸結合蛋白 (Intestinal Fatty Acid-Binding Protein, I-FABP) を用いて MMVD 罹患チワワの腸管粘膜障害リスクを評価し、第 II 章では D 型乳酸および L 型乳酸を用いて MMVD 罹患チワワの末梢組織の低酸素状態を評価した。第 III 章では MMVD 罹患チワワの糞便中の腸内細菌叢を特定し、心臓病と腸や腸内細菌叢との関連性について検討した。

研究の背景と目的

近年、複数の臓器や組織が免疫、代謝、自律神経などの高次ネットワークを介して連携する多臓器円環 (ホメオダイナミクス) が注目されている。例えば、「心腸連関」として、心不全患者では心拍出量減少や右心房圧上昇による静脈鬱滞などにより腸管粘膜毛細血管に低灌流や透過性亢進が引き起こされ、腸のバリア機能が低下して腸内細菌に含まれるリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) などの細胞内毒素が腸を通過して全身循環に侵入する可能性があり、LPS は全身性炎症反応症候群を引き起こして心不全の増悪を招く。また、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いる。

MMVD は小型犬種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。重症の MMVD 罹患犬では、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が引き起こされる。MMVD による慢性心不全は全身性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ことが示唆されている。しかしながら、獣医療における「心腸連関」に関する報告は非常に少ない。

本研究では、獣医療において「心腸連関」という概念の基盤を作ることを目的に、MMVD に罹患したチワワと健常チワワを調査対象として血清中の腸管粘膜障害マーカーの変動と糞便中の腸内細菌叢を調査し、犬の MMVD が腸に及ぼす影響について検討した。

研究の成果

第 I 章では、MMVD 罹患チワワ 50 頭において、既報と同様に胸部レントゲン検査で得られる心拡大の指標である椎体心臓サイズ (Vertebral heart size, VHS) や脊椎左房サイズ (Vertebral left atrial size, VLAS) が MMVD の重症度に応じて増加し、心臓超音波検査で得られる MMVD の予

後不良因子である拡張期大動脈基部の左房径・大動脈比 (Left atrium/aorta, LA/Ao) および拡張早期波 (Early wave velocity, E vel) が MMVD の重症度に応じて増加することを再確認した。また、MMVD 罹患チワワにおいてその重症度に比例して血清 I-FABP 濃度が増加し、心不全のあるチワワ 14 頭では健常チワワ 19 頭より高値であった (2.32 ± 0.43 vs 5.50 ± 0.57 ng/ml)。MMVD の重症度が高いほど腸管粘膜障害リスクが増加し、心不全のあるチワワでは腸管粘膜障害リスクが存在することを示した。

第 II 章では、第 I 章と同じ MMVD 罹患チワワ 50 頭において、D 型乳酸および L 型乳酸の血清濃度が健常チワワ 10 頭 (0.36 ± 0.06 および 0.20 ± 0.08 mmol/L) に比較して高く、MMVD の重症度に応じて増加することを示した (心拡大のあるチワワ 15 頭で 0.55 ± 0.08 および 0.57 ± 0.06 mmol/L, 心不全のあるチワワ 14 頭で 0.82 ± 0.10 および 0.92 ± 0.07 mmol/L)。MMVD 罹患チワワではその重症度が高いほど末梢組織の低酸素状態が存在することを示唆した。

第 III 章では、健常チワワおよび MMVD 罹患チワワ 63 頭を調査対象に 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスを用いた糞便のメタゲノム解析を実施し、心臓超音波検査で左室短縮率 (LVFS) $\leq 35\%$ を認めた MMVD 罹患チワワに腸内細菌叢の α 多様性 (菌種の豊富さ) の低下、左室短縮率 (FS) $\leq 35\%$ を認めた MMVD 罹患チワワに *Bacteroides* 属菌の減少および $65\% <$ 左室駆出率 (LVEF) $< 75\%$ を認めた MMVD 罹患チワワに *Bacteroides* 属菌の増加を認めた。チワワにおいて、心臓の左室収縮能が腸内細菌叢に関連することを示した。

以上の結果から、MMVD に罹患したチワワには腸管粘膜障害と末梢組織の低酸素状態が存在し、左心室の収縮能が腸内細菌叢の多様性や菌の種類に関連することが明らかになった。荒木氏は、本研究の結果から伴侶動物として広く飼養されている小型犬種のチワワにおいて「心腸連関」という概念が成立することを示した。

研究の評価

荒木氏は、本研究において、MMVD に罹患したチワワでは MMVD の重症度に応じて腸管粘膜障害リスクと末梢組織の低酸素状態が存在し、左室収縮能が腸内細菌叢の多様性や菌の種類に関連することを示し、獣医療において「心腸連関」という概念の基盤を作るという目的を達成した。本研究は、新規性があり、その内容は獣医学の発展に寄与すると評価された。

学位論文の一部を公表した論文

Araki R, Iwanaga K, Ueda K, Isaka M. Intestinal Complication With Myxomatous Mitral Valve Diseases in Chihuahuas. *Front Vet Sci.* 8:777579, 2021.

以上のことから、荒木 隆次 氏は博士 (獣医学) の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 5 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2022 年 2 月 8 日

審査委員

主査 教授 山下 和人
副査 教授 岩野 英知
副査 教授 上野 博史
副査 准教授 佐野 忠士
副査 准教授 井坂 光宏