

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18793

研究課題名(和文) アミノ酸代謝に着目した犬および猫の腫瘍遠隔転移指標の開発

研究課題名(英文) Development of metastasis factor for canine and feline cancer by plasma free amino acids

研究代表者

東 和生 (Azuma, Kazuo)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：50721841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血液中のアミノ酸濃度測定が、犬および猫の腫瘍における遠隔転移の有用な指標になりうるかどうかを検討した。まず、犬における簡便かつ迅速な血漿中アミノ酸濃度分析法を確立した。また、犬の食餌摂取が血漿中のアミノ酸濃度に大きく影響することを確認した。空腹時血漿を用いて、犬の脳腫瘍における血漿中アミノ酸濃度変化を測定したところ、特徴的な変化を見出した。これらの結果より、犬あるいは猫において血漿中アミノ酸濃度変化は遠隔転移指標として使用可能である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the efficiency of plasma free amino acids levels (PFAA) as a metastasis factor for canine and feline cancer is investigated. We developed the simple and quick analysis method for canine PFAA levels. We observed food intakes affects PFAA levels in dogs. In the canine brain tumor patients, some PFAA levels were altered according to the brain tumor. These results indicate that we might tumor metastasis by measuring PFAA levels in companion animals.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：アミノ酸 腫瘍 犬 脳腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

近年では代謝産物の網羅的解析を行うメタボローム解析等の発達により、腫瘍の代謝に関する研究はますます盛んになっている。Hirayamaらは、ヒトの腫瘍化した組織中には正常な組織(胃、大腸)と比較しグルコースが少なく、乳酸や解糖系中間代謝産物が多く存在することおよびアミノ酸要求量が増加していることを報告している(Cancer Research, 69, 4918-25, 2009)。Miyagiらは乳がん、大腸がん、胃がん、肺がんおよび胃がん患者では、早期より末梢血中のアミノ酸濃度に変化が生じることを報告している(PLoS One, 6, e24143, 2011)。さらには、代謝物の変動は腫瘍の臨床ステージの進行に従って変化することも示されている。これらの知見をもとに、ヒト医学領域では癌の代謝をターゲットとした診断指標の作製が進められている。

申請者らは、世界に先駆けて乳腺腫瘍罹患犬の末梢血中のアミノ酸濃度測定を実施した(Azuma et al., 2012, 13, 433-6)。乳腺腫瘍罹患犬では、末梢血中アミノ酸濃度が減少することを報告している。特に、アスパラギン酸とオルニチン濃度は遠隔転移例で有意に減少していた。これらの結果は、遠隔転移例のほうが生体でのアミノ酸要求量が高いことを示唆している。

## 2. 研究の目的

現在の動物医療では、簡便・低侵襲ながん遠隔転移指標は存在しない。本研究では、犬および猫の腫瘍自然発症例を用いて末梢血のアミノ酸および関連代謝産物から、広く臨床現場で汎用される腫瘍の遠隔転移指標(マーカー)の樹立を行うことを最終的な目的とした。

その目標を達成するために、まず犬および猫における血液中アミノ酸濃度測定の迅速かつ比較的簡便な方法の確立を行う。次に、食事摂取、検体採取時間、犬および猫の種・性別・年齢および各背景疾患が血液中アミノ酸濃度測定に及ぼす影響を調査する。それらをもとに、血液中のアミノ酸濃度測定が腫瘍の遠隔転移の有用な指標になりうるかどうかを明らかにすることを、研究目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)プレカラム誘導体化法による犬および猫の血液中アミノ酸濃度分析法の確立

誘導体化試薬として o-フタルアルデヒドを用い、プレカラム誘導体化法による犬の血漿中アミノ酸濃度分析を行った。血漿 25 μL に対し、225 μL のメタノールで徐蛋白後、遠心分離によって得た上清を分析に供した。特に、最も煩雑な誘導体化について、オートサンプラを使用することで時間及び労力の削減を試みた(図 1)。

## プレカラム誘導体化アミノ酸分析の概要

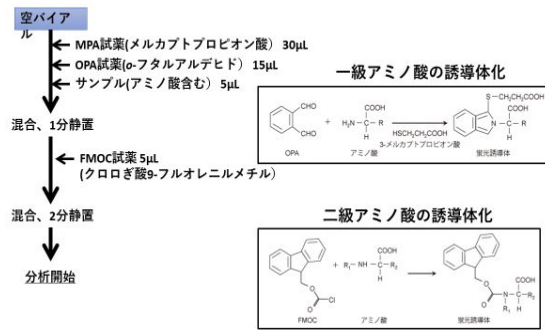


図 1. プレカラムアミノ酸法(前処理)の概要

(2) 各種項目が血液中アミノ酸濃度に及ぼす影響

食餌摂取、血液の採取時間が血漿中アミノ酸濃度に及ぼす影響を、ビーグル犬から経時的に採血を実施することにより検討した。血漿分離後は、(1)の方法に従いアミノ酸濃度分析を実施した。

また犬の性別、年齢、犬種および疾患が血漿中アミノ酸濃度に及ぼす影響を動物診療施設に来院した犬の血漿をランダムに採取・収集し検討した。アミノ酸濃度分析法は、(1)の方法に従った。

(3) 脳腫瘍における血液中アミノ酸濃度変化

脳腫瘍と診断された犬 12 頭、临床上健康な犬 16 頭および特発性てんかんと診断された犬 8 頭を対象とした。血漿中のアミノ酸濃度分析は(1)の方法に従い実施した。

## 4. 研究成果

(1)プレカラム誘導体化法による犬および猫の血液中アミノ酸濃度分析法の確立

プレカラム誘導体化法においても、ポストカラム誘導体化法と同様に、犬の血漿中アミノ酸濃度分析が実施可能であることが確認された。特に、分析時間の短縮が可能となり、1検体当たり約30分での分析が可能であることが示された。

(2) 各種項目が血液中アミノ酸濃度に及ぼす影響

各種要因が血漿中アミノ酸濃度に及ぼす影響を検討した。最も顕著に血漿中アミノ酸濃度に影響を及ぼすのは、食餌の摂取であった。分岐差アミノ酸を中心に食後 1-2 時間後には食事前に比べその血漿中濃度は約 2-30% 上昇した。しかし、食後 4 時間以降では血漿中アミノ酸濃度の上昇は確認されなかった(図 2)。また、血漿中アミノ酸濃度の明らかな日内および日間変動は確認されなかった(図 3)。

また、性別による血漿中アミノ酸濃度の差

異は確認されなかった。年齢および犬種による血漿中アミノ酸濃度の差異がある可能性が示唆される結果を得ている。また、各種疾患(腎疾患、肝疾患、糖尿病など)による血漿中アミノ酸濃度の特徴的変化があることも明らかとなった。

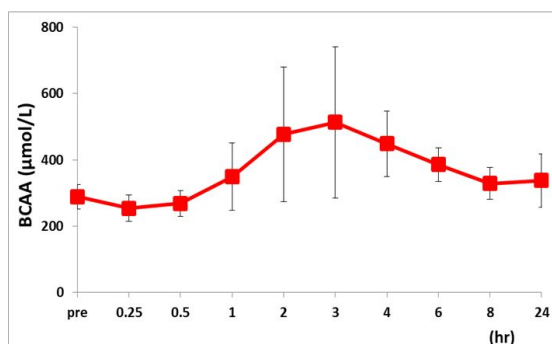


図2. 犬の食餌後の分岐鎖アミノ酸濃度変化  
投与2-3時間後に、投与前と比較して分岐鎖アミノ酸濃度の上昇が確認された。

#### 日間変動(必須アミノ酸)

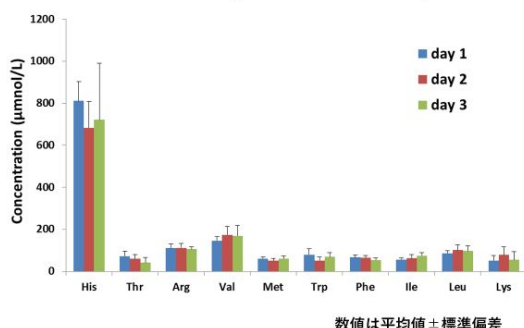


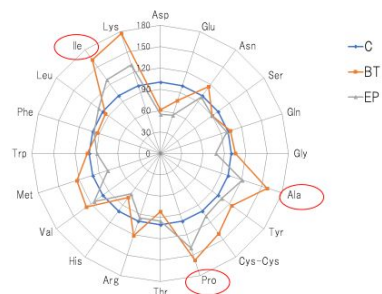
図3. 犬の必須アミノ酸の日間変動  
日間変動は確認されなかった。

#### (3) 脳腫瘍における血液中アミノ酸濃度変化

脳腫瘍症例では、健全な犬と比較し血漿中イソロイシン、アラニンおよびプロリン濃度の有意な上昇が確認された。また、特発性てんかんの症例ではこれらアミノ酸の有意な変化は観察されなかった(図4)。

上記より、血漿中アミノ酸濃度は各腫瘍の肺のみならず脳への遠隔転移の指標となりうる可能性が明らかとなった。併せて、より臨床上有用な指標として使用するためには、各種背景疾患等も考慮する必要があることが示された。

#### 脳腫瘍と特発性てんかんにおける血中アミノ酸濃度変化



C群: コントロール(n=16); BT群: 脳腫瘍症例(n=12); EP群: 特発性てんかん症例(n=8)

図4. 脳腫瘍における血漿中アミノ酸変化  
Cはコントロール(健全)、BTは脳腫瘍、EPは特発性てんかんの症例を示している。アラニン、プロリンおよびイソロイシンにおいて脳腫瘍にて血漿中濃度の有意な上昇が確認された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

1) S. Utsugi, K. Azuma, T. Osaki, Y. Murahata, T. Tsuka, N. Ito, T. Imagawa, Y. Okamoto: Analysis of plasma free amino acid profiles in canine brain tumors. Biomedical reports, 6, 195-200, 2017, 査読有, DOI: 10.3892/br.2016.825.

2) K. Azuma, Y. Hirao, Y. Hayakawa, Y. Murahata, T. Osaki, T. Tsuka, T. Imagawa, Y. Okamoto, N. Ito\*: Application of Pre-Column Labeling Liquid Chromatography for Canine Plasma-Free Amino Acid Analysis. Metabolites, 6, 3, 2016, 査読有, DOI: 10.3390/metabo6010003.

〔学会発表〕(計8件)

1) 東 和生, 山下真路, 大崎智弘, 村端悠介, 柄 武志, 今川智敬, 岡本芳晴, 伊藤典彦: 犬における血漿遊離アミノ酸濃度測定の意義, 平成29年度獣医学術中国地区学会, 山口, 2017

2) 東 和生, 窪田大樹, 大智宏佑, 村端悠介, 大崎智弘, 柄 武志, 今川智敬, 岡本芳晴, 伊藤典彦: 犬の各種疾患が血漿中アミノ酸濃度に及ぼす影響, 第160回日本獣医学会学術集会, 鹿児島, 2017

3) K. Azuma, Y. Okamoto, N. Ito: Pre-Column Labeling Liquid Chromatography for Canine Plasma-Free Amino Acid Analysis, 11th International Medicinal Chemistry Symposia (AIMECS), Melbourne, Australia,

2017

4) 東 和生, 村端悠介, 大崎智弘, 伊藤典彦, 柄 武志, 山岸淑恵, 勝呂 菜, 今川智敬, 岡本芳晴: 血中アミノ酸濃度変化が教えてくれる動物の疾患, 第 58 回比較統合医療学会, 東京, 2016

5) 東 和生, 平尾美子, 松村有里子, 岩澤篤郎, 村端悠介, 大崎智弘, 柄 武志, 今川智敬, 岡本芳晴, 伊藤典彦: 犬の血液中アミノ酸濃度に影響を及ぼす各種背景因子の検討, 日本アミノ酸学会 10 周年記念大会, 東京, 2016

6) 東 和生, 平尾美子, 松村有里子, 岩澤篤郎, 村端悠介, 大崎智弘, 柄 武志, 今川智敬, 岡本芳晴, 伊藤典彦: 犬の血漿中アミノ酸濃度に影響を及ぼす因子の検討, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 2016

7) 東 和生, 宇津木真一, 衛藤展功, 村端悠介, 大崎智弘, 今川智敬, 柄 武志, 岡本芳晴, 伊藤典彦: 自動プレカラム誘導体法を用いた犬脳疾患における血中アミノ酸濃度測定, 第 91 回日本獣医麻酔外科学会, 札幌, 2015

8) 東 和生, 平尾美子, 松村有里子, 岩澤篤郎, 村端悠介, 大崎智弘, 今川智敬, 柄 武志, 岡本芳晴, 伊藤典彦: 自動プレカラム誘導体法を用いた高速犬血漿アミノ酸分析法の確立, 第 158 回日本獣医学会学術集会, 十和田, 2015

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 和生 (AZUMA, Kazuo)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号: 50721841