

氏名(本籍)	俣田和也(群馬県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第160号
学位授与年月日	令和2年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	犬の僧帽弁修復術のリスク因子とチワワにおける 僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子に関する研究
論文審査委員	(主査) 村上賢 (副査) 折戸謙介 青木卓磨

論文内容の要旨

【緒言】

犬において、僧帽弁閉鎖不全症は後天性心疾患の中で最も発生率の高い疾患である。僧帽弁閉鎖不全症は小型犬で多く認められ、特定の犬種で発症率が高いことから、本疾患の発生に遺伝的な関与が考えられている。しかし、これまで僧帽弁閉鎖不全症の発生に関わる遺伝的なメカニズムは明らかにされておらず、根治治療は行われていないのが実際である。僧帽弁閉鎖不全症の治療は内科治療が一般的であるが、重症例の場合、うっ血性心不全を続発する。うっ血性心不全を発症した症例では、予後が制限されることが明らかになっている。近年、犬においても僧帽弁閉鎖不全症に対する外科治療が行われるようになり、予後の改善が可能となった。しかしながら、現在まで僧帽弁閉鎖不全症に対する外科治療のリスク因子や合併症に関する情報は少なく、これらの手術成績への影響は不明である。本研究は犬の僧帽弁閉鎖不全症の臨床学的な側面として、外科治療の手術成績の向上を目的に、合併症のリスク因子と合併症の手術成績に与える影響について検討した。また遺伝学的な側面として、好発犬種の中でも日本で飼育頭数が多く、外科治療を受ける犬種の中で高い割合を占めるチワワに着目し、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の調査を行った。

【第1章】 僧帽弁修復術における大動脈遮断解除後に発生する心室細動に関する検討

[目的] 心室細動は電気的な心室の興奮は認められるものの、心臓のポンプ機能は失われた状態であり、すみやかに治療が奏功しない場合、致死性の不整脈である。本章では、手術成績の向上を目的に術中の致死的な合併症である大動脈遮断解除後に発生する心室細動を予測するリスク因子の調査を行った。

[方法] 2015年11月から2017年9月までに僧帽弁修復術を実施した犬237例を対象とした。心筋保護液は晶質液カルディオプレジア (CCP) または CCP と自己血液を 1:1 で混合した血液カルディオプレジア (BCP) を使用した。心室細動の予測因子として年齢、体重、左心房・大動脈径比 (LA/Ao)、標準化左室拡張末期径 (LVIDDN)、大動脈遮断時間、心筋保護液の種類、カルディオプレジア投与量について検討を行った。また心筋保護液の違いによる影響の評価として、術中の輸血使用量、術後1ヵ月の時点での生存率と心臓サイズの縮小効果を比較した。

[結果] 心室細動を発症した症例群では、体重、LA/Ao、LVIDDN、大動脈遮断時間の有意な高値を認め、特に LVIDDN が心室細動の発生に密接に関わっていることが明らかとなった。また、心筋保護液として BCP を使用した場合、CCP 使用時と比較して有意に心室細動の発生率が減少した。術中の輸血使用量は BCP 使用症例群において有意に少なかった。術後1ヵ月の時点での生存率と心臓サイズの縮小効果は心筋保護液の種類によって差は認められなかった。

[小括] 大動脈遮断解除後に発生する心室細動のリスク因子として体重、LA/Ao、LVIDDN、大動脈遮断時間の高値が指標となることが明らかとなった。また心筋保護液として BCP は CCP と同等の安全性が確認された。さらに BCP の使用は心室細動の発生率を低下させ、術中の輸血使用量を減らすことが明らかとなった。

【第2章】 僧帽弁修復術の術後に発生する横隔神経麻痺に関する検討

[目的] 横隔神経は主な呼吸筋である横隔膜を支配する重要な神経である。横隔神経の損傷は横隔神経麻痺の原因となり、横隔膜の機能障害をもたらす。本章では手術成績に関わる術中の合併症に続き、術後の合併症である横隔神経麻痺について発生率と回復時期、手術成績への影響について評価した。

[方法] 2014年8月から2017年3月に僧帽弁修復術を実施した犬284例を対象とした。横隔神経麻痺の診断は、手術翌日の胸部 X 線検査で得た吸気時背腹像を用い、左側横隔膜が右側横隔膜より1肋間以上挙上した症例を横隔神経麻痺と診断した。回復時期については退院時、術後1ヵ月検診時、術後3ヵ月検診時で評価した。

[結果] 本章では、横隔神経麻痺の発生率は 30.3%であった。また術後3ヵ月の時点でほぼすべての症例で横隔神経麻痺の改善が認められた。横隔神経麻痺の有無は術後の死亡について有意な関連は認められなかった。しかし、死亡原因を呼吸不全とその他の死亡原因に分けた場合、呼吸不全で死亡した症例における横隔神経麻痺の発生率は有意に高値であった。さらに呼吸不全で死亡した症例の多くが術前に呼吸器疾患を有していたことが明らかとなった。

[小括] 横隔神経麻痺は発生率の高い合併症であるが、術後早期に改善することが明らかとなった。また横隔神経麻痺の手術成績への関与として、横隔神経麻痺は単独では直接的な死亡原因となる可能性は低いが、他の呼吸器疾患と合併した場合、術後の呼吸不全による死亡リスクを高めることが明らかとなった。

【第3章】 チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索

〔目的〕 チワワは僧帽弁閉鎖不全症の好発犬種であることが知られている。また本研究の第1章、第2章において僧帽弁閉鎖不全症の外科治療を受けた症例の過半数がチワワであったことから、本章ではチワワに着目し、僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の調査を行った。

〔方法〕 本研究では7歳以上のチワワを対象とした。僧帽弁逆流の認められないまたは僧帽弁逆流は認められるものの、逆流量はごく軽度である個体を健常群とした。僧帽弁閉鎖不全症罹患群（MR群）は、重度の僧帽弁逆流が認められ、心拡大を呈したACVIM stage B2以降の症例を対象とした。それぞれの個体から得た末梢血液よりDNAを抽出し、健常群とMR群の塩基配列を比較することで原因候補遺伝子の探索を行った。調査した遺伝子多型はマルチーズにおいて僧帽弁閉鎖不全症との関連が報告されているSerotonin Transporter（SERT）遺伝子、人において僧帽弁逸脱症との関連が報告されているXeroderma Pigmentosum Complementation Group C（XPC）遺伝子、DCHS1遺伝子について比較を行った。

〔結果〕 SERT遺伝子について、調査した全エクソン13領域において健常群とMR群の塩基配列は同一であり、明らかな遺伝子多型は認められなかった。XPC遺伝子においては902番目のアミノ酸においてアデニン-グアニンの遺伝子多型が認められたが、遺伝子多型の割合は健常群とMR群で有意な差は認められなかった。またアデニン-グアニンの遺伝子多型により翻訳されるアミノ酸は同一であった。DCHS1遺伝子において、エクソン19相当箇所に2つの遺伝子多型、エクソン21相当箇所に1つの遺伝子多型が認められた。認められた遺伝子多型のうち1つはアミノ酸の変化を生じるミスセンス変異であったが、健常群とMR群でそれぞれの遺伝子多型の発生頻度の差は認められなかった。

〔小括〕 XPC遺伝子、DCHS1遺伝子についてはチワワにおいて遺伝子多型が認められたが、僧帽弁閉鎖不全症との関連性は低いと考えられた。また本章では、チワワにおいて健常群とMR群でSERT遺伝子の塩基配列の差異は認められなかったことから、原因候補遺伝子は犬種により異なる可能性が示唆された。

【総括】

本研究は僧帽弁閉鎖不全症に対する外科手術の代表的な合併症のリスク因子、合併症が与える手術成績への影響について明らかにし、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症に関与する原因候補遺伝子を特定することを目的とした。

本研究の結果から、致死的な不整脈である大動脈遮断解除後に発生する心室細動について、LVIDDNの高値が優れたリスク因子となることが明らかとなった。また心室細動の発生率を減少させる方法として心筋保護液に自己血液を混合するBCPの有用性が示され、BCPの使用は手術成績を向上させる新たな手技となることが示唆された。

呼吸不全は術後の主な死亡原因のひとつであるが、本研究から横隔神経麻痺は他の呼吸器疾患と合併することで呼吸不全による死亡リスクを高めることが明らかとなった。また横隔神経麻痺は高率で

発生することが示され、横隔神経麻痺の発生を減らすことは術後の呼吸不全のリスクを下げることに繋がると考えられた。今回の研究では、横隔神経麻痺の原因を明らかにすることはできなかった。さらなる調査として、手術中のどのような操作が横隔神経麻痺の原因となるか明らかにすることが必要であると考えられた。

さらに、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索を行った。本研究では SERT 遺伝子、XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子の遺伝子多型について検討したが、僧帽弁閉鎖不全症の発症にかかわると考えられる遺伝子多型を確認することはできなかった。

本研究の成果は、犬の僧帽弁閉鎖不全症の外科治療の手術成績の向上、合併症の発生率の低下に貢献すると考えられる。今後はさらにチワワの僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索を進める。

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

本論文は、イヌの僧帽弁閉鎖不全症について、臨床学的観点として、外科手術の成績の向上を目的に、代表的な合併症のリスク因子と合併症が及ぼす手術成績への影響を明らかにした内容であり、また遺伝学的観点として、チワワにおける僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索をした内容である。論文は3章から構成されている。第1章では、僧帽弁修復外科手術中の大動脈遮断解除後に発生する致死的な合併症である心室細動に着目し、僧帽弁修復術を実施した犬 237 例を対象として心室細動を予測するリスク因子の調査を行った。その結果、心室細動を発症した症例群では、体重、大動脈径比 (LA/Ao)、標準化左室拡張末期径 (LVIDDN)、大動脈遮断時間の有意な高値を認め、特に LVIDDN が心室細動の発生と密接に関わっていることを明らかにした。また、晶質液カルディオプレジア (CCP) 及び CCP と自己血液を 1:1 で混合した血液-晶質液カルディオプレジア (BCP) による2種類の心筋保護液の影響も検討し、BCP は CCP と同様に安全であり、CCP に比べて心室細動の発生率を低下させ、手術中の輸血使用量を減らす利点があることを明らかとした。第2章では、僧帽弁修復外科手術後に発生する横隔神経麻痺に着目し、僧帽弁修復術を実施した犬 284 例を対象として横隔神経麻痺の発生率と回復時期、手術成績への影響について評価した。その結果、横隔神経麻痺は発生率の高い合併症であるが、術後早期に改善することを明らかとした。また、横隔神経麻痺は単独では直接的な死亡原因となる可能性は低いが、他の呼吸器疾患と合併すると、術後の呼吸不全による死亡リスクを高めることを明らかとした。第3章では、国内において僧帽弁閉鎖不全症の好発犬種であるチワワに注目して、僧帽弁閉鎖不全症群と健常群の7歳以上のチワワを対象として僧帽弁閉鎖不全症の原因候補遺伝子の探索を行った。その結果、調べた SERT 遺伝子、XPC 遺伝子、DCHS1 遺伝子において遺伝子多型は認められたものの、僧帽弁閉鎖不全症との関連性を特定するまでには至らなかった。

本研究の成果は、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の外科治療における手術成績の向上、合併症の発生率の低下に貢献する有用な知見である。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

申請者は、循環器を専門とする小動物病院の臨床獣医師であり、現場で直面しているイヌの心臓疾患である僧帽弁不全症について、その外科治療におけるリスク要因や合併症を明らかにすることと疾患の遺伝的要因を探索することで、イヌの僧帽弁不全症を臨床学的、遺伝学的に捉え、現場での獣医療への貢献を目指したものであり、明確なテーマが設定されている。

2) 研究の背景

僧帽弁閉鎖不全症はイヌの後天性心疾患の中で最も発生率の高い疾患であり、特定の小型犬種で高い発症率が認められる。本疾患の治療は内科治療が一般的であるが、重症例ではうっ血性心不全を続発し予後が良くないことがわかっており、近年、予後の改善のため外科治療が行われるようになってきている。しかし、外科治療のリスク因子や合併症の影響に関する情報は不明である。また、本疾患の発生に遺伝的な関与が考えられているが、本疾患発生に関わる遺伝的なメカニズムは明らかにされておらず、根治治療はできないのが現状である。これらの課題を踏まえ、解決に向けて本研究に取り組んでいる。

3) 研究の方法

僧帽弁修復術を実施した十分量のイヌを対象として、術中の合併症である心室細動を引き起こす複数の予測因子を設定し、それらを統計学的に評価している。また術中に使用する心筋保護液の影響も調べている。術後については、合併症である横隔神経麻痺に注目し、十分量のイヌ手術例を用いて、その発生率と回復時期、手術成績への影響について統計学的に評価している。僧帽弁閉鎖不全症の国内の好発犬種であるチワワに注目し、僧帽弁閉鎖不全症群と健常群を対象に、既知の情報から選定した有力な3つの原因候補遺伝子について塩基配列を調べて多型を解析している。このように、研究の目的とテーマにふさわしい複数の研究方法を用いて、分析している。

4) 研究の結果

僧帽弁修復術の術中に心室細動が発生する有意な最大のリスク因子として、標準化左室拡張末期径(LVIDDN)であることを明らかにし、また術中の心筋保護液として血液-晶質液カルディオプレジア(BCP)の使用は心室細動の発生率を有意に抑制し、輸血量も減少させ、有用であることを示した。呼吸器疾患をもつイヌが僧帽弁修復術後の横隔神経麻痺術を合併すると呼吸不全による死亡リスクを有意に高めることを明らかとした。調べた3つの原因候補遺伝子は、僧帽弁閉鎖不全症との関連性は

低いと考えられたものの、遺伝子多型を示し、犬種により候補原因遺伝子が異なる可能性を示唆した。いずれも十分なデータをまとめて解析している。

5) 考察と結論

致死的な不整脈である大動脈遮断解除後に発生する心室細動について、LVIDDN の高値が優れたリスク因子となることが明らかとなった。また心室細動の発生率を減少させる方法として心筋保護液に自己血液を混合する BCP の有用性が示され、BCP の使用が手術成績を向上させる新たな手技となることを示唆した。僧帽弁修復術後に発生率の高い合併症である横隔神経麻痺は、単独では直接的な死亡原因となる可能性は低いものの、他の呼吸器疾患と合併した場合、術後の呼吸不全による死亡リスクを高めることを明らかとし、横隔神経麻痺の発生を減らすことが術後の呼吸不全のリスクを下げることに繋がると考えた。チワワにおいて XPC 遺伝子と DCHS1 遺伝子の多型と僧帽弁閉鎖不全症との関連性は低いと考え、SERT 遺伝子の配列解析から原因候補遺伝子は犬種により異なる可能性を示した。いずれも研究結果から明らかになったことを踏まえ、論理的に説明できている。

6) 参考論文

適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

3. 審査結果

本論文の内容と発表会での質疑応答に対する適切な回答を考慮すると、専門知識を十分に有することが認められ、本研究は獣医学上及び基礎生物学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しいと判定した。