

称号及び氏名	博士（獣医学）	長谷川 哲也
学位授与の日付	平成26年3月31日	
論文名	犬のてんかん症の回顧的研究と GC-MS を用いた脳脊髄液中代謝物プロファイリングによる診断バイオマーカーの検索	
論文審査委員	主査	小森 雅之
	副査	久保 喜平
	副査	大橋 文人
	副査	竹中 重雄

## 論文要旨

### 緒論

てんかん症は、再発性の神経発作症状を特徴とする人と犬の最も一般的な慢性神経性疾患であり、人の有病率は世界中で 10 万人におよそ 50-100 症例、犬の有病率は 0.5~5.7%と推定されている。犬では ILEA の分類をもとに、特発性てんかん症 (**Idiopathic epilepsy: IE**)、症候性てんかん症 (**Symptomatic epilepsy: SE**)、反応性発作 (**Reactive Seizure**) に大別されている。頭蓋内中枢性疾患の確定診断は組織診断を要するため、犬のてんかん症症例における生前の鑑別診断は除外診断とならざるをえない。そのため、その臨床的特徴、系統的問診と脳脊髄液 (**Cerebral spinal fluid: CSF**) 検査、神経学的検査などに基づいて仮診断し、経過観察しながら神経検査を繰り返して対症治療することが推奨されてきた。近年犬の頭蓋内疾患の画像診断情報が増加したため、疾患群別の画像所見分類精度は向上し、臨床仮診断を基にした治療が可能になりつつある。

一方、最近の医学研究において、質量分析装置や核磁気共鳴を使って行われるメタボローム解析をバイオマーカー探索や疾患診断に応用する試みが活発化している。特に質量分析装置を用いた解析技術の進展によって、様々な病態における疾患関連性の細胞・組織内における酵素タンパク質による代謝の変動と、その疾患特有の代謝物パターン (メタボリックプロファイル) の変化について、血液や尿中への反映状況を疾患バイオマーカーとしての検索が

試みられている。

本研究では **MRI** 所見と **CSF** 検査に基づいて診断、治療した症例群を対象とした回顧的研究を行い、第 1 章では、統計学的な推計モデルの構築からてんかん症の病因鑑別診断に関わる臨床クライテリアの相対的な貢献度を検討し、実用的な診断をする上での推奨順序を検索した。続く第 2 章ではてんかん症の長期的予後にかかわる指標を検索し、これらを疾患群ごとに分類して生存分析を行い、治療成果向上を図るための課題について検討した。また第 3 章では、**CSF** 中の低分子量代謝物を検討することで、診断におけるガスクロマトグラフィー-質量分析計 (**gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS**) を用いた代謝物プロファイリングアプローチを行い、多変量解析に基づいた低分子量代謝物成分の変化を基に評価、解析を行った。

## 第 1 章

加古川動物病院において 2005 年 3 月から 2010 年 4 月までの期間にてんかん症として診断治療した 128 症例の内科記録を対象とした。過去、あるいは通院中に 2 回以上全身性の強直性-間代性けいれんを生じた病歴があり、シグナルメント、病歴、系統的問診、身体検査、神経検査、一般血液検査や血清生化学検査所見、完全な **MRI** 検査 (造影前後の **T1** 強調、**T2** 強調、**FLAIR (fluid attenuated inversion recovery)** の各シーケンスにおける横断、長軸断面所見がある) と **CSF** 所見に基づいて診断されている症例を選択してそれらの内科記録を回顧的に評価した。

症例選択に 73 症例が適合し、26 例が **IE**、47 例が **SE** とされた。診断指標や画像所見をクロス集計比較し、 $P \leq 0.15$  以下を示した各項目について変数増加法と減少法を用いてロジスティック回帰分析を行った。**SE** 群鑑別診断への貢献順に、「初診時神経検査の異常」、「急性発症の病歴」、「前庭様症状」、「鎌下/テント下ヘルニアの有無」が最終モデルに共通して採用され、どちらの統計モデルも **SE** 群を鑑別するための **Hosmer** と **Lemeshow** の検定では非常に良好で (変数増加法  $P = 0.949$ ; 減少法  $P = 0.978$ )、推定的中率も高かった (変数増加法 87.7%; 減少法 91.8%)。

「脳ヘルニア」は必ずしも **SE** に特異的所見ではなかったが、その **SE** における出現率 (53%) は視床大脳皮質系の異常を示す一連の神経検査異常の出現率とほぼ一致した。しかし両者に相関は認めなかった ( $R^2 < 0.5$ ) ため、画像診断では小さな構造病変を十分に検出できない可能性が示唆された。「前庭様症状」は **SE** 群の系統的問診の中では突出して認められていた指標であったが、「ふらつく」「歩き方がおかしい」「歩様がおかしくなった」を総称したもので、**SE** 病変の進行や浸潤に伴う一時的な症状発現と、神経回路の機能回復を短期間で繰り返した可能性があった。実測値に対して予測値が  $\pm 2SD$  を超えた外れ値には共通した一例が示され、**SE** 群が進行性疾患であるために一時期だけをとらえる形態学的検査の限界が示された。本章では **SE** 群の検出にはいずれの指標も単独では十分な感度と特異性が得られず、視床大脳皮質系の微細異常の検出についての問診と神経検査に優先的に注意を払う必要があることを統計学的に明らかにした。

## 第2章

前章の症例群を対象に、てんかん症の長期予後に関わる指標を評価するとともに、SE を発症した疾患群ごとに MRI 所見や検査指標と予後についての評価と、治療成果向上を図るための課題について検討した。

てんかん症の病因の違いによって、生存期間には有意な差が認められた。IE 群の平均寿命 ( $8.1 \pm 2.6$  歳) は過去の報告と比較して短い方であったが、これは第一に母集団の犬種の違いや体格の違いに起因する可能性があった。第二に IE 群のてんかん関連死の 12 例のうち半数はてんかん重積または群発発作によって診断後 3 カ月以内に死亡していたが、それ以後の死亡減少は過去の報告と顕著な差異は認められなかったため、急性期の診断と治療に課題があることがわかった。IE 群の Kaplan-Meier 解析では、「CSF 比重 (SG) の異常」という検査指標だけが IE 群の生存に影響していた。CSF-SG 値は CSF-TP 値との間に相関が認められたが ( $P < 0.01$ )、カテゴリー変数化して比較した時には相関が認められなかった ( $P = 0.455$ )。すなわち正常参照値の再考を求める必要があり、微細変化を捉えきれない可能性が示された。

SE 群は炎症性 (i-SE) と腫瘍性疾患 (n-SE) に集約され、その生存解析では i-SE 群と n-SE 群は分離する傾向が認められた。SE 群では診断後 3 カ月で 30% の症例が死亡していたが、i-SE 群は治療法が改善されることで n-SE 群の予後とは異なる可能性があり、そのためには急性期診断法の確立が求められた。n-SE 群の死因の 70% は頭蓋内腫瘍の症状進行に伴う死亡であり、これは最終的に比例ハザード分析で生存に関わるとされた要因でもあった。病状進行を追うことで診断し治療する他ないてんかん症の特性そのものが急性期治療に遅れを生じさせ、同時にその生存にもかかわる課題であることを明らかにした。

## 第3章

加古川動物病院において 2005 年 3 月から 2010 年 4 月までの期間に各種検査と、MRI 検査、CSF 検査、治療経過をもとに IE とした 16 例と、SE とした 19 例、さらに正常群として家庭飼育犬 18 例における CSF を材料として GC-MS 解析を試みた。

てんかん症の病因別の総イオンクロマトグラムに著明な変化は認められなかったが 60 個の判別可能な代謝物のうち 16 個において、正常群に対して IE 群で有意な代謝物レベルの差が認められた。PLS-DA 解析によって病因群は明確に分離され、これらの分離に寄与する代謝物として、ローディングプロットによっていくつかのアミノ酸、脂肪酸、有機酸が明らかとなった。なかでも IE 群におけるグルタミン酸レベルは SE 群や正常群と比較して有意に増加していた。IE ではグルタミン酸調節性の疾患が発症メカニズムに関連している可能性が示された。また、疾患群におけるアスコルビン酸量は有意に減少していたが、IE 群と SE 群間における差は認めなかった。アスコルビン酸の代謝物の 1 種であるトレオニン酸も疾患群において増加していた。つまり抗酸化システム関連性の酸化的ストレスが疾患群に存在している可能性が示された。これらのことから、グルタミン酸は IE 群の有力なバイオマーカーで、アスコルビン酸はてんかん症のバイオマーカーである可能性が示唆され、これらが犬のてんかん症の迅速な機能診断法の確立に寄与する可能性が示された。

## 総括

MRI画像とCSF分析によっててんかん症を回顧的に病因分類し、鑑別診断モデルを構築し、鑑別に寄与する統計学的な順位を明らかにした。いずれの指標でも視床皮質系の病変を検出するには単独では十分な感度と特異性が認められなかった。てんかん症の予後は病因によって有意な生存の差が認められた。SE群を疾患分類し、主として炎症性と腫瘍性原因に集約された。i-SE群の急性期死亡には早期介入と治療法の改善によって予後の改善の可能性が示唆された。n-SE群の生存には疾患の進行そのものが影響することが示された。早期診断法の確立がてんかん症の共通した課題であることを明らかにした。

てんかん症の機能的鑑別診断のためにGC-MSを用いたメタボローム解析を行い、IE群とSE群のCSF代謝物プロファイルが正常健康群と異なっていることを明らかにした。特にグルタミン酸は有力なIE群のバイオマーカーで、アスコルビン酸はてんかん症のバイオマーカーである可能性があり、これらが犬のてんかん症の機能的診断法の確立に寄与する可能性が示された。

## 審査結果の要旨

てんかん症は、再発性の神経発作症状を特徴とする人と犬の最も一般的な慢性神経性疾患であり、人の有病率は世界中で10万人におよそ50-100症例、犬の有病率は0.5～5.7%と推定されている。犬ではInternational League Against Epilepsy (ILEA)の分類をもとに、特発性てんかん症 (Idiopathic epilepsy : IE)、症候性てんかん症 (Symptomatic epilepsy : SE)、反応性発作 (Reactive Seizure) に大別されている。頭蓋内中枢性疾患の確定診断は組織診断を要するため、犬のてんかん症症例における生前の鑑別診断は除外診断とならざるをえない。そのため、その臨床的特徴、系統的問診と脳脊髄液 (Cerebral spinal fluid: CSF) 検査、神経学的検査などに基づいて仮診断し、経過観察しながら神経検査を繰り返して対症治療することが推奨されてきた。近年犬の頭蓋内疾患の画像診断情報が増加したため、疾患群別の画像所見分類精度は向上し、臨床仮診断を基にした治療が可能になりつつある。一方、最近の医学研究において、質量分析装置などを使って行われるメタボローム解析をバイオマーカー探索や疾患診断に応用する試みが活発化している。そこで、本研究では、犬のてんかん発作臨床例をMRI所見とCSF検査を基準として回顧的研究を行うとともに、ガスクロマトグラフィー-質量分析計 (gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS) を用いたメタボローム解析によって、CSF中の代謝物を指標とした早期診断のためのバイオマーカーの検索を行うことを

目的とした。

第1章では、**MRI** 画像と **CSF** 分析によって診断された犬のてんかん症を回顧的に検討することで、ロジスティック回帰分析から **SE** 群の鑑別診断モデルを構築した。多くの診断指標の中で脳ヘルニアや急性の病歴、前庭様症状が重要な指標であることを明らかにしたが、前の二因子については疾患の後半期を検出した可能性があった。また、頭部画像診断単独では疾患の一時期を誤解釈しかねない症例について示した。いずれの検査も単独での診断感度と特異性において十分とは言えず、視床大脳皮質系の微細異常の検出についての問診と神経検査に優先的に注意を払う必要があることを統計学的に明らかにした。

第2章では、犬のてんかん症の予後に関わる指標と危険因子を明らかにした。てんかん症の発症病因が炎症性疾患と腫瘍性疾患に集約されていたこと、炎症性疾患では **MRI** 病変の信号強度ではなく脳領域での広がり、腫瘍性疾患では病状進行が主たる予後因子であること、また、病状進行を追うことで診断し治療するしかないてんかん症の特性そのものが急性期治療の遅れを生じさせることが生存にかかわる共通した課題であることを明らかにした。これらの解決には、急性期の早期鑑別診断と積極的介入が鍵となることが示され、鑑別診断において形態検査を補完する機能検査の構築が求められる。

第3章では、**IE** 群と **SE** 群の機能的鑑別診断のため **GC-MS** を用いた **CFS** 中のメタボローム解析を行い、新しい診断法構築の可能性を検討した。その結果、犬の **IE** 群と **SE** 群の **CSF** 代謝物プロファイルが正常健康群と異なっていることを明らかにした。特に、グルタミン酸は有力な **IE** 群のバイオマーカー、また、アスコルビン酸はてんかん症のバイオマーカーである可能性が示唆された。従って、これらの代謝物が犬のてんかん症の迅速な機能的診断法の確立に寄与する可能性が示された。

以上のように本研究は、犬のてんかん症例を回顧的に検討し、**SE** 群の鑑別診断モデルを構築した。また、てんかん症の予後に関わる指標と危険因子を明らかにするとともに、治療成果向上を図るための課題を明らかにした。さらに、てんかん症の機能的鑑別診断のために **GC-MS** を用いたメタボローム解析を行い、**CFS** 中のグルタミン酸やアスコルビン酸が犬のてんかん症のバイオマーカーである可能性を示唆した。これらの成果は、医学・獣医学の発展に貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。