

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成26年3月17日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580367

研究課題名（和文） 犬の胸腰部椎間板疾患における予後判定因子の検討

研究課題名（英文） Evaluation of the biomarker of the prognosis in dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease.

研究代表者

上野 博史（Ueno Hiroshi）

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：70322881

研究成果の概要（和文）：犬の進行性脊髄軟化症(PM)は、胸腰部椎間板ヘルニア(IVDH)に続発する致死的な疾患である。したがって、IVDH発生時にPMに移行する可能性を評価することは治療方針を決定するために重要である。しかしながら、PM発生の可能性を評価するための確たる因子は存在しない。今回、犬の胸腰部IVDH症例の血清中マトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)活性を測定した。その結果、PM症例の血清中MMP活性値は、健康犬および深部痛覚を消失したIVDH症例(Grade V; GV)と比較して有意に増加した。以上の結果から、血清中MMP活性値はPM発生の評価因子として適用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Canine progressive myelomalacia (PM) is a death-dealing disease which happen in succession to acute thoracolumbar intervertebral disc hernia (IVDH). Therefore, in order to determine a treatment policy, it is important to evaluate a possibility that in early stages of IVDH comes worse at PM. However, the sure factor for evaluating the possibility of PM generating does not exist. In this study, the matrix metalloproteinase (MMP) activity in serum of acute thoracolumbar IVDH dogs was evaluated. As a result, the serum MMP activity of PM case was increased than that of the healthy dog significantly. The MMP activity in serum of PM case was also increased than that of IVDH cases without deep pain (Grade V; GV) significantly. From these results, a possibility that the MMP activity value in serum would be applicable as an evaluation factor of PM generating was suggested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：犬、椎間板疾患、予後判定因子、マトリックスメタロプロテナーゼ、軟骨異栄養犬種、血清、ゼラチンゼイモグラフィ

1. 研究開始当初の背景

椎間板ヘルニア(IVDH)は、犬における脊髄障害の原因として最も多い疾患の1つである。IVDHの病態には、背側線維輪の破裂に伴う

椎間板髄核（以下、髄核）の脊柱管内への急性脱出（Hansen I型）、および変性した背側線維輪の脊柱管内への緩徐性突出（Hansen II型）が存在する。前者は、ミニチュアダック

クスフンド(MD)やビーグルなどの軟骨異栄養犬種に多く発生する。Hansen I型の急性圧迫により生じる脊髄傷害の臨床症状は様々である。胸腰部 IVDH の重症度について Windsor らは、背部痛のみで神経学的異常を認めない (Grade I)、歩行可能な不全麻痺 (Grade II)、歩行不可能な不全麻痺または全麻痺 (Grade III)、歩行不可能かつ排尿障害を認める全麻痺 (Grade IV)、深部痛覚が欠損した全麻痺 (Grade V) の 5 段階に分類している。

深部痛覚が存在する場合、外科手術を受けた症例の 80-90%は機能回復するといわれている。一方、Grade Vにおける回復率は 30-76%と報告され、深部痛覚の有無が予後の指標とされてきた。さらに Grade V の症例においては、致死性である進行性脊髄軟化症 (PM) を発症する個体も存在し、予後不良と判定されて安楽死が推奨される場合がある。したがって、PM に移行する可能性を評価することは、臨床上非常に重要であり、新たな予後評価因子の確立が望まれる。

Levine らは、IVDH 罹患犬の脳脊髄液 (CSF) におけるマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) 活性についてゼラチンザイモグラフィを用いて定性的に評価した結果、健康な軍用犬と比較して有意に認められることを報告し、IVDH の予後評価因子として注目した。CSF は硬膜内において脊髄と接している。そのため、脊髄の病態を直接的に反映するため、細胞診や生理活性物質の測定により脊髄疾患の診断に応用されている。しかしながら、CSF 採取は全身麻酔の施術が必須であり、小動物臨床においては飼い主からの同意が得られない場合もある。さらに技術的難易度から、すべての獣医師が実施できる検査とはいえない。一方、血清の採取は容易であることから、血清を利用した IVDH 症例の予後評価が可能となれば、一時診療機関においても利用可能なツールとなりうる。Levine らは、IVDH 罹患犬の血清中においても MMP 活性が健康な軍用犬と比較して有意に認められることを報告した。

我々は非 IVDH 罹患健康ビーグルの血清中 MMP 活性をゼラチンザイモグラフィにより評価した。その結果、全供試犬において MMP 活性を認め、Levine らの報告とは異なった結果が得られた。

したがって、血清中 MMP 活性値を IVDH 罹患犬の予後評価因子として応用する場合、① IVDH 非罹患犬と比較して IVDH 罹患犬の MMP 活性値が有意に高値を示すこと、② PM 罹患犬の MMP 活性が IVDH 罹患犬の MMP 活性値よりも有意に高値を示すことが必要と考えられる。

2. 研究の目的

1) 複数の犬種における 非 IVDH 罹患健康犬の MMP 活性を測定する。2) IVDH 罹患犬の

MMP 活性を測定し、健康犬の MMP 活性値と比較検討する。3) 臨床的に PM が疑われた症例の MMP 活性を測定し、IVDH 罹患犬の MMP 活性値と比較検討する。これらの結果により、血清中 MMP 活性値が IVDH 罹患犬、特に PM に移行する可能性を評価できるか否かを検討する。

3. 研究の方法

[研究 1] 非 IVDH 罹患健康犬の血清中 MMP 活性の評価：軟骨異栄養犬種であるビーグル、軟骨異栄養犬種であり IVDH 好発犬種の MD、非軟骨異栄養犬種のラブラドルレトリバー (LR) の血清中 MMP 活性を評価する。

[研究 2] IVDH 罹患犬の血清中 MMP 活性の評価：胸腰部 IVDH 罹患犬を臨床グレードに分類して血清中 MMP 活性を評価する。さらに PM 罹患犬における血清中 MMP 活性を GV 症例と比較し、PM に移行する可能性を評価できるか否かを検討する。

MMP 活性は、ゼラチンザイモグラフィにより定性的に、蛍光強度測定キット (SensoLyte 490 MMP-9 Assay Kit Fluorimetric AnaSpec Fremont CA USA) を用いて定量的に評価する。

2 群間の有意差検定は Mann-Whitney U test により評価する。3 群間以上の有意差検定は Kruskal-Wallis test により評価し、Scheffe test により多重比較する。

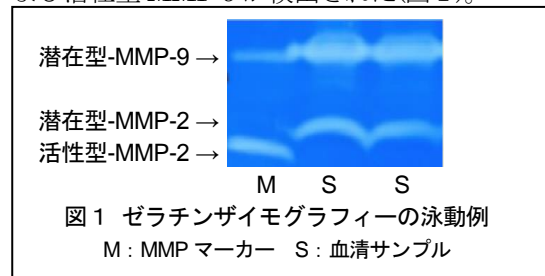
4. 研究成果

[研究 1] IVDH 非罹患犬における血清中 MMP 活性の評価：供試犬の年齢構成および頭数を表 1 に示す。

表 1 非 IVDH 罹患健康犬の頭数

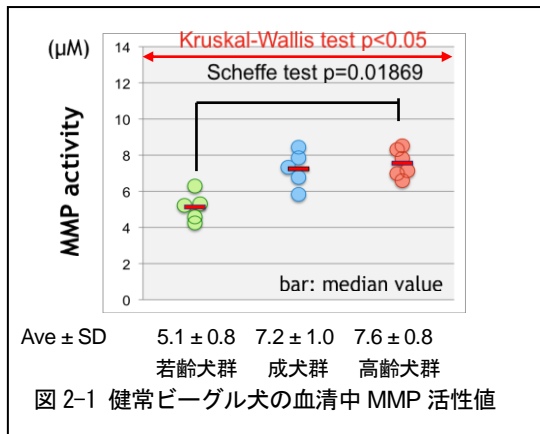
	若齢犬群 (1 歳未満)	成犬群 (1-6 歳)	老齢犬群 (7 歳以上)
ビーグル	5	5	6
LR	6	9	7
MD	2	8	4

ゼラチンザイモグラフィでは、ビーグル犬、MD および LR 全頭で潜在型 MMP-2 および潜在型 MMP-9 が検出された (図 1)。

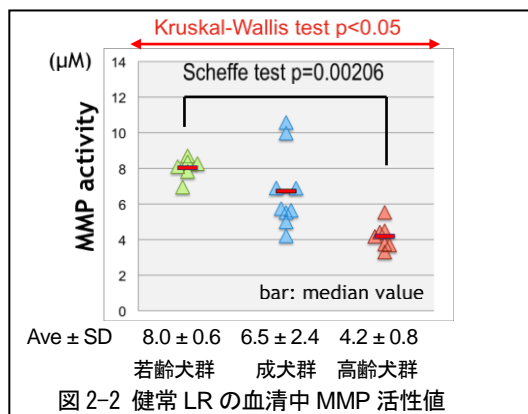


Levine らの報告とは異なり、犬種に関係なく健康犬全頭において MMP 活性が認められた。

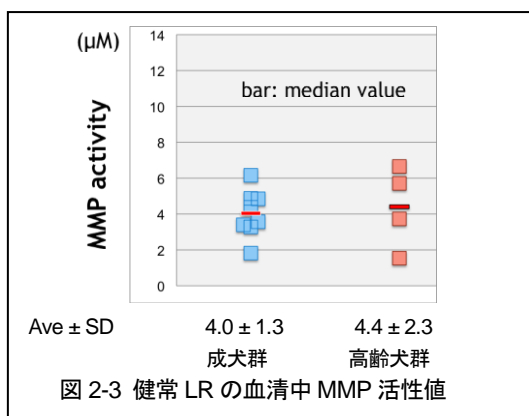
MMP 活性値による定量的評価においてビーグル犬では、若齢犬群と比較して高齢犬群において有意に高値を示した(図 2-1)。



LR では、若齢犬群と比較して高齢犬群において有意に減少していた(図 2-2)。

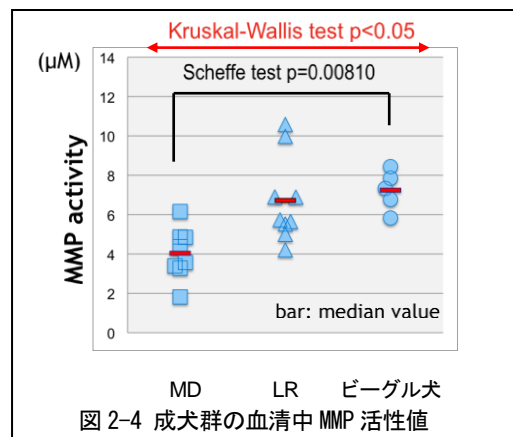


MD では、成犬群と高齢犬群の 2 群間に有意差が認められなかった(図 2-3)。

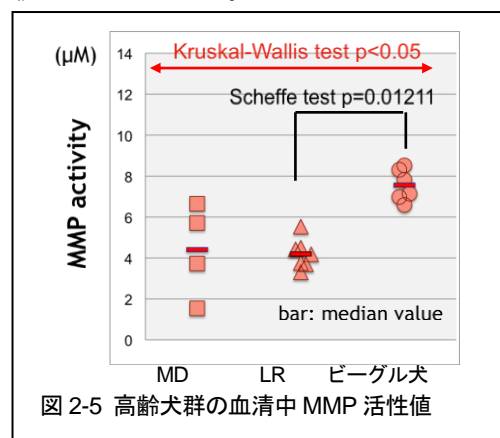


なお、若齢犬群は頭数が少なく(n=2)、有意差検定には供さなかった。

成犬群において 3 犬種間の比較をしたところ、MD はビーグル犬と比較して有意に低値を示した(図 2-4)。



高齢犬群において 3 犬種間の比較をしたところ、LR はビーグル犬と比較して有意に低値を示した(図 2-5)。



研究 1 において、IVDH 非罹患犬の MMP 活性値を評価したところ、年齢および犬種間により有意差が認められた。したがって、IVDH 症例、さらに PM 症例と非罹患犬の MMP 活性値を比較する場合には、年齢や犬種を考慮するべきであり、IVDH 好発犬種である MD を健康犬の MMP 活性値の標準とすることが望ましいと考えられた。

[研究 2] IVDH 罹患犬における血清中 MMP 活性の評価: 今回研究に供した IVDH 罹患犬は以下の条件を全て満たした場合とした。

- ①急性発症であり発症から 7 日以内、②CT あるいは MRI により T3 から L3 の領域に Hansen I 型の単一病変を認める、③慢性進行性の神経症状を有していない、④腫瘍疾患、関節疾患、重度の歯周疾患、膀胱炎など血清中 MMP-9 が増加する疾患を有していない、⑤過去に IVDH に罹患歴がない

また、PM の臨床的診断は以下の条件を満たした場合とした。

- ①両後肢の深部痛覚消失、②両後肢の完全麻痺、③尾力と肛門反射の消失、④両後肢の反射が亢進から低下または消失に変化、⑤体幹皮筋反射の消失範囲が頭側へ拡大、⑥経時的

な両前肢の虚脱および反射の低下または消失、⑦経時的な腹筋の虚脱、⑧意識レベルの低下、⑨高体温、⑩経時的な胸式呼吸の消失、⑪経時的なホルネル症候群の出現

供試犬の臨床グレード別および犬種毎の頭数を表2に示す。

表2 IVDH 罹患犬

グレード	神経学的特徴	犬種	頭数	総数
G III	自力歩行不可	MD	7	8 (6)
	能不全麻痺	WC	1	
G IV	自力歩行不可	MD	13	16 (8)
	能完全麻痺	FB	1	
	で深部痛覚が	ACS	1	
	存在する	WC	1	
G V	自力歩行不可	MD	9	12 (10)
	能完全麻痺	BF	1	
	で深部痛覚が	CKCS	1	
	存在する	PK	1	
PM		MD	7	7 (5)

MD:ミニチュアダックスフンド WC:ウエルシュコーギー
 FB:フレンチブルドッグ ACS:アメリカンコッカースパニエル
 BF:ビションフリーゼ CKCS:キャバリアキングチャールズスパニエル PK:パキーンズ
 ():コハク酸メチルプレドニゾン(MPSS)、プレドニゾン(Pre)、デキサメタゾン(Dex)、シルベスタットナトリウム(SS)を採血前に使用していた症例数

なお、PM 症例は全頭において外科処置は実施されていない。また、PM 症例は全頭死亡したが、剖検は全頭において実施されていない。

ゼラチンザイモグラフィでは、IVDH 罹患犬全頭で潜在型 MMP-2 および潜在型 MMP-9 が検出された。研究1における健常犬におけるゼラチンザイモグラフィの結果と相違はなかった。したがって、血清中 MMP の定性的評価は、IVDH の予後評価因子として有用ではないことが明らかとなった。

各臨床グレードにおける血清中 MMP 活性値の平均値および標準偏差を図 3-1 に示す。

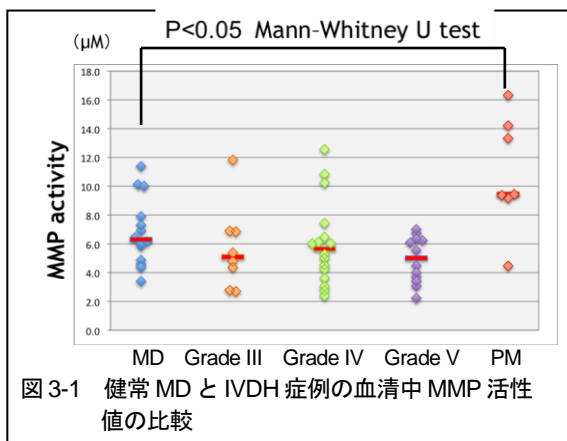


図 3-1 健常 MD と IVDH 症例の血清中 MMP 活性値の比較

Grade III(5.7±2.9)、GradeIV(6.0±3.0)、Grade V(4.9±1.6)であった。また、PM 症例では 10.9±4.0 であった。健常 MD 全頭(6.8±2.4)を対照として各 IVDH 群との 2 群間における血清中 MMP 活性値の有意差検定をおこなったところ、健常 MD と PM 症例との間に有意差を認めた。

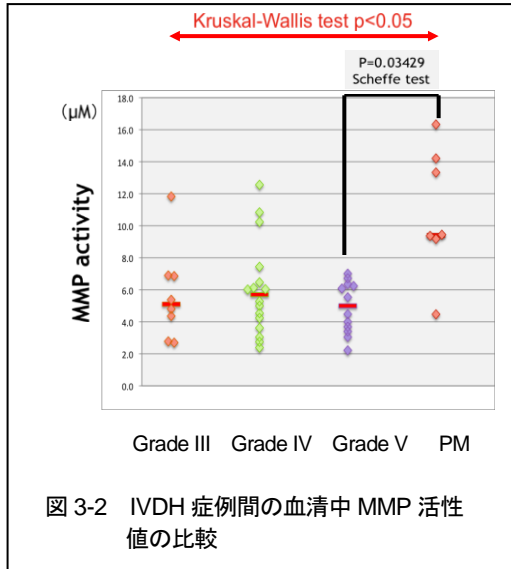


図 3-2 IVDH 症例間の血清中 MMP 活性値の比較

また、IVDH 症例の臨床グレード間において有意差検定をおこなったところ、Grade V と PM 症例の間において有意差が認められた(図 3-2)。

さらに採血前に MMP 産生に影響を与えると考えられる薬剤(MPSS、Pre、Dex、SS)を使用した症例と採血後にこれらの薬剤を使用した症例を臨床グレード毎に比較した(図 3-3)。

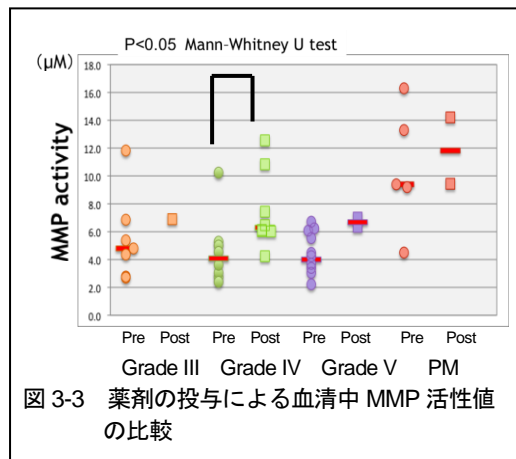


図 3-3 薬剤の投与による血清中 MMP 活性値の比較

したがって、本研究の結果から、①血清中 MMP 活性に関して、IVDH に罹患していない健常犬において認められるため、ゼラチンザイモグラフィを用いた定性的評価では評価できない。②血清中 MMP 活性値は

Grade V 症例と PM 症例の鑑別に適用できる可能性が示唆された。③血清の採材前にステロイドを使用した場合、MMP 活性が低下する傾向が認められたため、血清の採材はステロイドなどの薬剤を使用する前に実施する必要があると考えられた。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① H. Ueno, Y. Fujisaki, T. Matsunagi, S. Isoda, H. Soma, K. Fujita. Evaluation of matrix metalloproteinase (MMP)-9 as a biomarker of the prognosis in dogs with thoracolumbar intervertebral disc hernia (IVDH), 26th Annual Symposium of ESVN and ECVN, 2013.9.27. Paris.

② 磯田成志、藤崎雄介、馬縹智之、相馬浩晶、藤田和繁、上野博史、健常犬における血清中マトリックスメタロプロテイナーゼ-9 活性の評価、第 156 回日本獣医学会学術集会、平成 25 年 9 月 22 日、岐阜大学

③ 上野博史、藤崎雄介、馬縹智之、磯田成志、相馬浩晶、藤田和繁、犬の胸腰部椎間板ヘルニアの予後判定因子としての血清中 Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) の有用性、第 156 回日本獣医学会学術集会、平成 25 年 9 月 22 日、岐阜大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 博史 (UENO HIROSHI)

酪農学園大学獣医学群獣医学類・教授

研究者番号：70322881

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし