

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23580450

研究課題名(和文) イヌの変性性脊髄症の臨床的・病理学的特質の解明とL-カルニチン投与の有効性の検討

研究課題名(英文) Clinical and histopathological characteristics and efficacy of Levocarnitine treatment in canine degenerative myelopathy

研究代表者

齋藤 弥代子 (Saito, Miyoko)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80367242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：人の筋萎縮性側索硬化症(ALS)で用いられる評価項目とパラレルな方法にて、変性性脊髄症(DM)に罹患したペンブローク・ウェルシュ・コーギーを縦断的に評価し、DMに適した評価項目を確立した。ALSの機能評価法として有望視されている運動単位数推定法(MUNE)を犬で確立することができた。レボカルニチン(LC)のオープントライアルでは、有害事象は認められず、DMスコアの減少度を用いてLCの有効性が示された。我々の開発したDMスコアは、DM機能評価スケールとして有用であり、また、今後、LCの有効性を検証する大規模な治験の実施は適当であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Outcome measures for disease progression of degenerative myelopathy (DM) were established through the longitudinal evaluation of Pembroke Welsh Corgis with DM by using the measurements parallel to amyotrophic lateral sclerosis (ALS). MUNE is a promising potential biomarker for ALS and we developed a new technique of MUNE, which is applicable in dogs. Levocarnitine open trial showed safety and efficacy of this medication. Efficacy of levocarnitine was demonstrated by DM score that we developed. These results showed that DM score is useful as a DM functional rating scale and a large-scale clinical trial of levocarnitine is indicated.

研究分野：獣医臨床神経病学

キーワード：変性性脊髄症 ALS ウェルシュ・コーギー DMスコア レボカルニチン バイオマーカー 臨床治験
犬

1. 研究開始当初の背景

人の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と犬の変性性脊髄症 (DM) は共に有効な治療法のない致死性進行性神経変性疾患である。スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) 遺伝子の変異は、家族性 ALS を引き起こすことが知られているが、DM においてもこの遺伝子変異が存在し、発症に強く関連することが最近明らかとなった。そこで、DM 罹患犬を唯一の ALS 自然発症モデル動物として用い、臨床研究を進めることにより、DM と ALS の両者の病態解明や治療法の開発に役立つことが期待される。しかし、ALS とパラレルに比較するための、DM の病態や神経機能の客観的評価法はまだ存在しない。

DM、ALS とともにその病態はほとんど不明であるが、変異 SOD1 がミトコンドリアの機能低下を介した細胞死 (アポトーシス) を引き起こし、運動神経細胞の変性が生じると考えられている。脂肪酸の酸化における必須補因子であるレボカルニチン (LC) は、ミトコンドリア損傷やアポトーシスを抑制する作用を有し、SOD1 変異マウスモデルに投与したところ生存期間が 50%増加したとの報告がある [Kira Y, et al. Brain Res 1070 : 2006]。しかし LC の DM や人の ALS への有効性はまだわかっていない。

2. 研究の目的

犬と人の医療の発展に寄与するために、人の ALS とできるだけパラレルな犬の DM の評価方法を開発し、それを使用して犬の DM の臨床的・病理学的特質を解明することと、開発した評価項目を用いて、DM における LC 投与の有効性を検証することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) DM 罹患犬の神経機能の客観的評価方法の開発 : ALS 機能評価スケール改訂版 (ALSFRS-R) は、ALS の臨床試験において、エンドポイントとして必須とされる評価項目である。犬には、脊髄損傷時の後肢の運動機能を評価する方法 (Open Field Score) は存在するが、これは進行性に四肢麻痺を呈す DM の評価には適応できない。そこで、Open Field Score を ALSFRS-R を参考に、DM に合わせて大幅に改良し、DM 機能評価スケール (DM スコア) を作成した。次に、DM に罹患した 5 頭のペンブローク・ウェルシュ・コーギー (PWC) の歩様動画から DM スコアを求め、臨床症状の推移を比較した。また本スコアリング法の再現性を評価するために、3 名の検査者が前述の歩様動画を見てスコアリングを行い、検査者間の級内相関係数を求めた。

四肢などの脂肪量の継時的測定が ALS の病期進行のバイオマーカーとして有望視されている。人の本測定には CT や MRI が用いられるが、犬ではそれらの検査に全身麻酔を必要とするため、臨床例での頻回の測定は現実

的でない。そこで犬用体脂肪計を用い、四肢の脂肪量が測定可能かどうかを、様々な犬種からなる健常な実験犬 13 頭を用いて検討した。具体的には、背中、上腕部の屈筋・伸筋、大腿部の屈筋・伸筋の脂肪量を生体インピーダンス法にて測定し、測定した四肢のそれぞれの実測値 (脂肪値) を背中で測定した体脂肪率で除して、脂肪比率 (%) を求めた。

ALS 末期では横隔膜機能障害が起こることが知られている。超音波検査装置を用いて横隔膜厚と運動範囲の測定が可能かどうかを健常実験犬を用いて検討した。犬の横隔膜筋厚の基準値が存在しないため、健常ビーグル犬 21 頭の横隔膜筋厚を測定し、基準値を求めた。

電気生理学的検査の一つであり、ALS の機能評価方法として有望視されている運動単位数推定法 (MUNE) を犬で確立することを目的に、まず人で最も一般的な方法 (Incremental Stimulation 法) にて健常犬での測定を試みたが、MUNE は求められなかったため、他の方法として、F 波法と、F 波法を独自に改良した多点刺激 F 波法を試みた。

(2) 様々な評価項目を用いた DM 罹患犬の縦断的評価

DM と病理学的に確定診断された、あるいは、臨床症状、MRI、脳脊髄液検査等を含む臨床検査と経過により臨床的に DM と診断された PWC について、DM に特徴的に見られる様々な臨床徴候の発現時期を前向き及び後ろ向きに調査した。さらに前向きに調査した症例については、(1) で開発した DM スコア、脂肪比率、横隔膜筋厚と運動範囲の計測に加え、ALS にてバイオマーカーとして有望視されている、四肢周囲径、血中の CK, AST, ALT, LDH, Cl, Cre, pNF-H 濃度、そして動脈血液ガスを、1 から 3 ヶ月ごとの来院時に測定、あるいは検体を採取保存したのちに測定した。これらの推移を、臨床徴候や病期の推移と比較した。

(3) 胸郭および腹部の拡張率を利用した各病期における呼吸機能の継時的変化

DM は、最終的に呼吸筋麻痺が進行し、死亡すると考えられているが、DM の進行に伴う呼吸機能の継時的変化の詳細は不明である。DM に罹患した PWC の各病期における呼吸機能の継時的変化を明らかにするために、臨床的に DM と診断された 19 頭の PWC を以下の方法にて前向きに評価した。DM の病期は Coates らの方法に従いグレード分類した。呼吸機能は動脈血ガス分析により評価した。呼吸筋の運動は、症例を右側横臥位に保定し、腹側からビデオ撮影を行い、胸郭および腹部の拡張率を測定した。また、血液ガス分析値と胸郭および腹部の拡張率の相関性を評価した。

(4) LC 高用量投与における血中と CSF 中のカルニチン濃度の推移

犬の LC 高用量投与の安全性は報告されているが、中枢神経内への

移行性や投与量調整のための血中濃度測定の適切なタイミングについてはわかっていない。3頭の中高齢の健常ビーグル犬に、LC(エルカルチン®:大塚製薬株式会社)を1回10mg/kgを12時間ごとに、6週間連続経口投与した。LCの投与量は、SOD1変異マウスモデルにて有効性が認められた用量を参考にした。採血および脳脊髄液(CSF)採取は投与前、投与2週、3週、4週、以降1週毎に濃度が安定するまで行ない、血清中及びCSF中のカルニチン濃度を酵素サイクリング法にて測定した。

(5)LCのオープントライアル:臨床的にDMと診断されたPWCで、飼い主の希望があり同意の得られた個体にはLCの連続投与を行い(トラフ値の血中濃度約100 μ mol/Lとなるよう投与量を調節)(2)と同様の方法で前向きに評価し、非投与症例との比較検討を行った。またLC投与に伴う有害事象の有無を調査した。これにより、今後の二重盲検LC投与試験実施の適否を検討した。

(6)病理組織検査:研究に組み入れた犬が死亡した場合、病理検査を行いDM罹患犬であることを病理学的に証明し、さらにALSとの同源性について検索した。

4. 研究成果

(1)DM罹患犬の神経機能の客観的評価方法の開発 DMにおける神経機能の客観的評価パラメーターの開発:5頭とも、症状の進行に伴ってDMスコアが減少した。3人の検査者におけるDMスコアの級内相関係数は0.96と高値であり、検査者間の影響が少ない検査であることが示された。脂肪値については、各部位3回ずつ測定し誤差が2%以内であればその平均値を採用した。3回の誤差が2%以上の場合には再度3回測定し、これを誤差が2%以内となるまで繰り返すことにより、安定した数値を得ることができた。各部位における脂肪比率の基準値を算出することができた。腹部超音波検査による横隔膜筋厚と運動範囲の計測は、すべての犬で実施が容易であり、安定した数値が得られた。健常犬における横隔膜筋厚は1.78 \pm 0.36 mm/1.49 \pm 0.27mm(吸気時/呼気時)であった。Incremental Stimulation法にて健常犬でのMUNEの測定を試みたが、計測できなかった。これは、この検査に用いられる本邦の機器の刺激増加幅が大きすぎることが原因であり、人と比べ運動単位数が少ない犬では既存の方法では測定できないことが確認できた。そこで、刺激増加幅の影響が少ないF波法を用いたが得られるF波が少なく正確なMUNEを得られなかったため、多点にて神経を刺激しF波を誘発したところ、安定した多数のF波を得ることができた。我々が開発した多点刺激F波法によって得られた推定運動単位数は、報告のある犬の同筋の運動単位数に近似しており、検査の再現性

にも優れていたため、犬におけるMUNEの検査法として有用であると考えられた。多点刺激F波法をDM罹患犬2頭で実施したところ、発症から比較的初期の症例であったが、MUNEの値は健常犬と比べ低下していた。

(2)様々な評価項目を用いたDM罹患犬の縦断的評価:筋周囲径、肢の脂肪比率、動脈血液ガス、およびDMスコアはいずれも症状進行に伴って継続的に変化したため、これらはDMの症状進行度合いの客観的な指標となりうるということがわかった。一方で、血液検査項目については、いずれの症例においても症状進行に伴って変化する、あるいは持続的に異常値を呈す項目はなかった。pNF-H濃度は、全症例で基準値よりも高値を示したが、症状進行に伴い一定の傾向を示して変化した症例は認められなかったため、DM進行度のバイオマーカーとしての利用は難しいが、診断のバイオマーカーとしての有用性を今後検討する価値はあるかもしれない。DM罹患犬の横隔膜筋厚は、1.10 \pm 0.44mm/0.87 \pm 0.32mm(吸気時/呼気時)であり、健常犬と比較し有意に薄かった。DM罹患犬の横隔膜筋厚と動脈血の酸素分圧及び二酸化炭素分圧には強い相関関係が認められた。DM罹患犬の横隔膜の運動範囲は9.2 \pm 1.7mmであり、健常犬と比較して低下はなかった。縦断的評価としては、発症からおよそ50週以降では経過とともに横隔膜の厚さは薄くなった。横隔膜の運動範囲については、すべてが基準値内であったが、DM末期においていったん増加し、その後低下する傾向が見られた。早期に酸素療法を開始した症例で、末期においても横隔膜筋厚のさらなる低下を見ない症例がいた(経過観察中)。病理検査を行った犬においては横隔膜筋の神経原性萎縮が認められた。以上より、終末期DM罹患犬では健常犬と比較し、横隔膜の運動範囲は減少していないが、厚さが薄くなっていることが明らかになった。超音波による横隔膜厚の測定は簡便かつ非侵襲的であり、血液ガス検査項目と強い相関関係が認められたことから、呼吸障害のマーカーとして有用であることが示唆された。今後の継続的な研究により、横隔膜筋厚と運動範囲の測定が、呼吸介助開始時期の判断の目安や本疾患の呼吸不全の機序解明の一助になる可能性が示されるかもしれない。

(3)胸郭および腹部の拡張率を利用した各病期における呼吸機能の継続的変化:DMの進行に伴い、呼吸機能の低下が認められた。酸素分圧(PaO₂)はグレード1と2の症例では正常値だった。グレード3では8.3%、グレード4では76.9%の症例においてPaO₂は低下していた(図1A)。グレード4は他のグレードと比較しPaO₂が有意に低下していた。二酸化炭素分圧(PaCO₂)はグレード1および2の症例では正常であったが、グレード3(4.2%)および4(53.8%)では上昇し

ていた(図1B)。グレード4のPaCO₂は他のグループと比較し、有意に高値であった。

呼吸筋運動の評価において、グレード1および2の症例では胸郭および腹部運動に差は認められなかったが、グレード4では、胸郭の運動が低下し、グレード1および2に対して有意に低値であった(図1C)。腹部の運動は病期の進行に伴い増加し、グレード1と4の間に有意な差が認められた(図1D)。

呼吸機能と胸腹部拡張率の相関性を評価したところ、胸郭運動はPaO₂と正の相関があり、PaCO₂と負の相関を有する事が明らかになった(図2A, B)。逆に腹部運動はPaO₂と負の相関があり、PaCO₂と正の相関があった(図2C, D)。以上の結果から、DMの病期の進行に伴い呼吸機能は進行性に低下すること、また、呼吸機能の低下を代償するため、呼吸様式は胸腹式呼吸から腹式呼吸に変化することが明らかになった。

図1 DMの病期と呼吸機能の変化

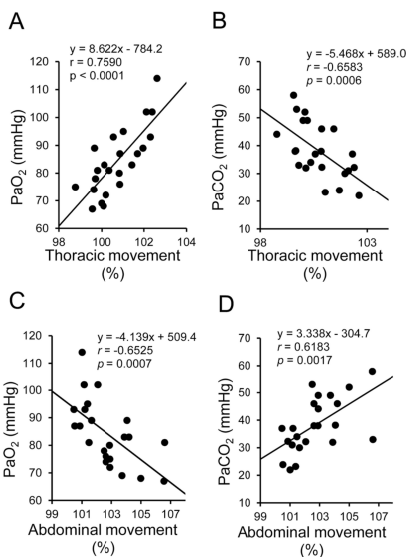
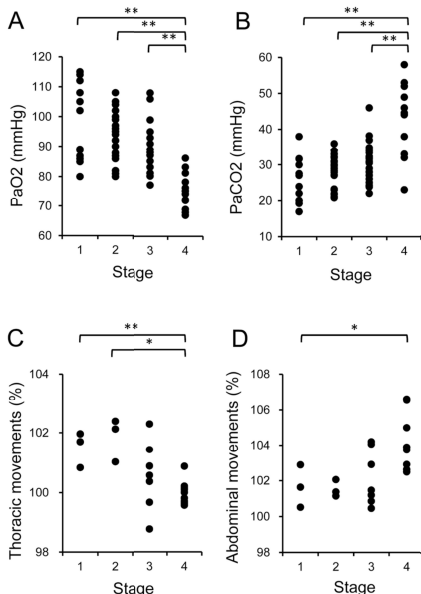


図2 呼吸機能と胸腹部拡張率の相関性



(4) LC の中枢神経内移行の有無と血中濃度上昇時期の把握

すべての犬において血中、CSF ともに投与前と比べ投与後のカルニチン濃度は上昇していた。従って、LC の経口投与により CSF 中のカルニチン濃度が上昇していることが示された。体重あたり同じ投与量であっても、血中と CSF 中のカルニチン濃度には個体差があった。血中カルニチン濃度は LC 投与開始から 2 週間後のトラフ値の測定にて上昇しており、それ以降の測定において、一頭では多少の濃度の変化が見られたが、残りの 2 頭ではほぼ安定していた。ラットにおいて 30mg/kg/day の用量で 21 日間連続経口投与した場合、15 日で血中濃度が安定したとの報告があり、おおよそ、これに近い結果になったと考えられる。今回は供試動物が 3 頭と少なかったために統計処理はしていないが、今回の結果から、臨床例にて LC 投与の有効性の研究を行う際は、血中濃度をモニタリングして投与量を設定するのが望ましく、その際は、投与開始から 2 週以上経過した後に血中濃度測定を行うのが適切であると考えられた。高齢犬の 1 頭では他の 2 頭の中年齢犬より濃度が低い傾向にあった。人において組織中のカルニチン貯蔵量は加齢に伴って減少するとの報告があり、犬においても同様の現象が起こりうるのかもしれない。

(5) LC のオープントライアル

LC 投与群 (n=5) と非投与群 (n=44) の臨床徴候発現時期の比較において、差が認められたのは臨床徴候 12 項目中の 4 項目のみであり、それら 4 項目ともに LC 群は発現病月が有意に遅かった。死亡時期は LC 群 45.5 ± 7.78 病月 (n=2)、非投与群 36.18 ± 11.52 病月 (n=28) であった。DM スコアの減少度については、DM 発症から 24 カ月 (LCC 群 n=4、非投与群 n=11)、30 カ月 (LCC 群 n=4、非投与群 n=9) 及び 42 カ月間 (LCC 群 n=3、非投与群 n=3) で調べたが、いずれの期間においても LC 群の方が減少度が有意に小さかった。よって、LC の投与は症状の発現を遅らせ、また症状を軽減させる効果がある可能性が示唆された。LC に起因すると考えられる有害事象は観察されなかった。横隔膜筋厚と運動範囲については、調べた症例数がまだ少なく、現時点での比較には用いなかった。それら以外の評価項目において、LC 群と非投与群とに有意差を認めるものはなかった。以上より、我々の開発した DM スコアは、DM における神経機能の変化を示すパラメーターとして有用であり、今後 DM における様々な臨床試験のエンドポイントとして活用されることが期待される。また、LC の有効性の検証を目的とした、二重盲検 LC 投与試験を今後実施することは適当であると考えられた。

(6) 病理組織検査

死亡し病理組織検査を行った犬はすべて DM と病理学的に確定診断され、症例における病理学的診断と臨床的診断

とは一致していた。横隔膜の萎縮は、神経原性萎縮であることが明らかになった。DM 剖検症例の病理組織学的解析において、ALS と同様に脊髄運動神経細胞には変異 SOD1 蛋白の蓄積が認められ、これらの変異蛋白は多量体を形成していることが明らかとなった。

(7) **その他** : PWC における遺伝子検査を他施設から得られた検体を含め実施したところ、DM の臨床徴候を呈さない122頭のPWCにおいて、69.7%という高い割合で変異 SOD1 アレルが認められ、本邦における高い変異率が明らかとなった。

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 3 件)

Oyake K, Kobatake Y, Shibata S, Sakai H, Saito M, Yamato O, Kushida K, Maeda S, Kamishina H. Changes in respiratory function in Pembroke Welsh Corgi dogs with degenerative myelopathy. *J Vet Med Sci*. 査読有、2016 in press
<http://doi.org/10.1292/jvms.15-0521>

Nakamae S, Kobatake Y, Suzuki R, Tsukui T, Kato S, Yamato O, Sakai H, Urushitani M, Maeda S, Kamishina H. Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience*. 査読有、2015 10;303:229-40.
doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.066

Chang H.S, Kamishina H, Mizukami K, Momoi Y, Katayama M, Rahman M.M, Uddin M.M, Yabuki A, Kohyama M, Yamato O. Genotyping Assays for the Canine Degenerative Myelopathy-Associated c.118G>A (p.E40K) Mutation of the SOD1 Gene Using Conventional and Real-Time PCR Methods: A High Prevalence in the Pembroke Welsh Corgi Breed in Japan. *J Vet Med Sci*. 査読有、2013;75:795-8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328634>

[学会発表](計 12 件)

G. Togawa, M. Saito, Y. Fujita, A.

Ishihara, R. Watanabe. Development of F- response method using multiple-point stimulation for motor unit number estimation technique in normal dogs. The ACVIM Forum. 2015年06月03日~2015年06月06日 Indianapolis, USA

齋藤弥代子 神経病の本質である神経徴候を見逃さないために. 第17回日本臨床獣医学フォーラム年次大会(招待講演)2015年9月27日 ホテルニューオータニ(東京)

G. Togawa, M. Saito, H. Kamishina, R. Watanabe, E. Takeda, O. Yamato. Investigation of biomarker for disease progression in dogs with degenerative myelopathy. *Asian Society of Veterinary Surgery (AiSvS)*. 2014年12月06日~2014年12月07日 Osaka, Japan

Kobatake Y, Oyake K, Tsukui T, Sakai H, Yamato O, Saito M, Urushitani M, Kato S, Sasaki J, Shibata S, Maeda S, Kamishina H. Clinical, histopathological, and biochemical characterization of the canine model of SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis. 第37回日本神経科学大会、2014年9月13日、パシフィコ横浜(横浜)

小宅 香苗、小嶋 結、柴田 早苗、大和 修、前田 貞俊、神志那 弘明. 犬の変性性脊髄症における呼吸機能の経時的変化 H26年度中部地区獣医師大会 獣医学術中部地区学会2014年08月30日~2014年08月31日静岡市

小嶋結, 漆谷真, 加藤信介, 酒井洋樹, 大和修, 津久井利広, 鈴木理恵子, 前田貞俊, 神志那弘明. イヌ変性性脊髄症に認められる変異型 SOD1 蛋白 (E40K) に対するモノクローナル抗体の作製と特異性の解析. 第156回日本獣医学会学術集会 2013年09月20日 岐阜大学(岐阜)

竹田絵美, 齋藤弥代子, 渡邊亮太, 大和修, 神志那弘明. ウェルシュ・コーギーの変性性脊髄症における症状進行度の客観的指標の開発と治療評価法の検討. 第39回獣医神経病学会 2013年07月13日 東京

山田修平, 酒井洋樹, 千村直輝, 漆谷真, 大和修, 加藤信介, 内田和幸, 小川瑞恵, 前田貞俊, 神志那弘明. イヌの変

性性脊髄症におけるミクログリアの組織学的解析と細胞傷害因子の定量. 第154回日本獣医学会学術集会. 2012年9月16日、岩手大学(盛岡)

並木まり子, 漆谷真, 大和修, 津久井利広, 鈴木理恵子, 加藤信介, Janice Robertson, Kate Banks, 前田貞俊, 神志那弘明. イヌの変性性脊髄症に認められる変異型 SOD1 蛋白の生化学的解析. 第154回日本獣医学会学術集会. 2012年9月16日、岩手大学(盛岡)

中前早百合, 漆谷真, 加藤信介, 酒井洋樹, 大和修, 内田和幸, 小川瑞恵, 津久井利広, 鈴木理恵子, 前田貞俊, 神志那弘明. イヌの変性性脊髄症における変異型 SOD1 蛋白凝集体の証明. 第154回日本獣医学会学術集会. 2012年9月16日、岩手大学(盛岡)

神志那弘明. 変性性脊髄症とその類似疾患との鑑別法. 日本獣医臨床学フォーラム 第8回京都地区大会(招待講演). 2012年3月18日、京都

齋藤弥代子. 末梢神経と筋疾患. 第13回日本臨床獣医学フォーラム年次大会(招待講演). 2011年9月17日、ホテルニューオータニ(東京)

〔図書〕(計 3件)

齋藤弥代子 他、緑書房、犬と猫の神経病学 総論編、2016、in press

齋藤弥代子 他、緑書房、犬と猫の神経病学 各論編 DAMNIT-V 分類と代表的疾患、2015、648

齋藤弥代子、神志那弘明 他、interzoo、図解 小動物神経病学、2011、595

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
よくある病気のチェックポイント 神経科
ウエルシュ・コーギーの変性性脊髄症
http://avth.azabu-u.ac.jp/service/checkpoint_neuropathy.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 弥代子(SAITO, Miyoko)
麻布大学・獣医学部・准教授
研究者番号：80367242

(2) 研究分担者

神志那 弘明(KAMIAHINA, Hiroaki)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：50506849

(3) 連携研究者

大和 修(YAMATO, Osamu)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授
研究者番号：80261337

加藤 信介(KATO, Shinsuke)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：60194817

内田 和幸(UCHIDA, Kazuyuki)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：10223554