

学 位 論 文 要 旨

氏名 小澤 剛

題 目：イヌとネコにおける脳血管障害のケースコントロール研究およびバイオマーカー測定
の基礎的検討

論文要旨：

脳血管障害(CVD)とは、梗塞や出血により一時的もしくは恒久的に障害を受けた脳の部位があり、病理学的プロセスにより脳の正常な機能が損なわれるすべての障害を指す。重篤な CVD は致死性であり、2019 年における日本人の死因の第 4 位である。さらに日常生活に多大な支障をきたす後遺症をもたらすことから、人医療では循環器病対策推進計画など国家的施策が実施されている。しかし、獣医領域ではイヌやネコにおける CVD の存在は認識はされつつあるも、その事例についての報告は多くない。そのため CVD の臨床徴候は獣医領域において十分に認知されておらず、その診断、治療、予防手段は未だ明確ではない。獣医領域における限られた CVD の臨床研究では、症例が CVD であることを十分に担保するため症例選択の際に厳格な診断条件がクライテリアとして用いられており、一次診療で遭遇する脳梗塞が疑われる症例における症状と必ずしも一致しないことがある。またそれらの臨床研究は海外における症例報告であり、国内での CVD 症例の特徴を必ずしも表していない可能性がある。したがって、イヌおよびネコにおける CVD の診断、治療、予防手段を明確にするためには、国内の CVD 症例を使ったケースコントロール研究を実施することにより、その臨床的特徴を明らかにする必要がある。

そこで第 1 章にて国内の小動物臨床における CVD の現状を明らかにすることを目的として、イヌおよびネコの CVD 症例におけるケースコントロール研究を実施した。一つの施設で記録、保管されている医療記録簿を基に、2009 年から 2016 年の期間に脳血管障害に罹患したイヌとネコを抽出し調査を行った。脳血管障害の診断は、急性発症、臨床徴候、磁気共鳴画像診断所見を基に実施し、脳血管障害群における病歴、臨床徴候、併発疾患、梗塞部位、脳脊髄液検査所見、発症月、予後を調査した。また、同時期に来院し脳血管障害を持たない症例群をコントロール群として解析を行った。

上記期間中に来院した症例 5312 頭の中から、122 頭が脳血管障害の症例として抽出された。その中で、本研究で設定した対象選択クライテリアと合致するイヌ 66 頭(1.2%)、ネコ 9 頭(0.2%)の症例を、本研究におけるケースコントロール研究で解析した。イヌの前脳梗塞は 66 例中 51 例で、その中での 24 例(47.1%)に CVD 発症時の発作が臨床症状として認められた。脳血管障害の季節性を検討するため発症月を解析した結果、脳血管障害と診断されたイヌの数は、8 月(59 例中 9 例)と 12 月(59 例中 13 例)で有意に高かった。イヌの予後調査では、55 例中の 11 例で悪化が認められた。

CVD 発症時の発作はイヌの脳血管障害において重要な臨床徴候であると示された。また、国内においてイヌにおける脳血管障害の発症には季節変動があることが明らかとなった。本研究において明らかとなった臨床徴候は海外における報告事例と異なるものが示されたことから、国内における脳血管障害症例についてより詳細な調査が必要であると考えられた。

CVD のケースコントロール研究を進めるのを困難にしているその大きな要因は、CVD の診断クライテリ

(別紙様式第 3 号)

アである。CVD の診断におけるもっとも有効な検査は MRI 検査とされるが、その実施には全身麻酔を必要とすることから、すべての CVD 症例に行われる検査ではない。それを解消する一助として、一次診療施設で CVD の発症をより簡便に検出可能な血中バイオマーカーの開発が望まれている。人医療では脳組織の傷害と関連し血液中で検出できるバイオマーカーとして、マイクロパーティクル、IL-6、TNF、S100B など多くの検討がなされている。その中でマイクロパーティクルは、その数の増加だけでなく膜表面の抗原や内包するタンパクや核酸等の特異性からその起源を知り病態を反映することが示唆されているが、獣医学領域におけるマイクロパーティクルの測定方法は確立されていない。

そこで第 2 章では、CVD のバイオマーカーとして臨床応用可能なマイクロパーティクル測定方法について、イヌとウサギの血液を用いて基礎的検討を行った。

マイクロパーティクル (MPs) は、細胞膜の一部から出芽し細胞から体液中に放出される膜小胞である。フローサイトメリーによるイヌ血中 MPs 測定方法については、いまだ標準化されていない。そこで本研究では、フローサイトメーターを用いたイヌ血中 MP 測定法を開発するため、抗凝固剤および MP 染色試薬が MP 測定に与える影響について基礎的な検討を行った。PFP 作成時には、抗血液凝固剤としてクエン酸デキストロース (ACD) とヘパリンを使用し、その効果を比較検討した。さらに、MP 染色試薬として annexinV、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)、calcein tetraacetoxymethyl ester (calcein-AM) を使用し、フローサイトメリーによる MP 検出における各染色試薬の特徴について解析した。本研究において、ACD 処理イヌ血液から作製した PFP 中の MP 測定がフローサイトメリーにより可能であった。そして MP 染色試薬として CFSE 使用した際に、もっとも高い MP 陽性率が観察された。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	小澤 剛
審査委員	主査： 鹿児島大学 教授 白石 光也
	副査： 鹿児島大学 教授 三浦 直樹
	副査： 鳥取大学 教授 竹内 崇
	副査： 鹿児島大学 教授 藤木 誠
	副査： 鹿児島大学 准教授 宇野 泰広
題目	イヌとネコにおける脳血管障害のケースコントロール研究およびバイオマーカー測定の基礎的検討
審査結果の要旨： 脳血管障害（CVD）とは、梗塞や出血により一時的もしくは恒久的に障害を受けた脳の部位があり、病理学的プロセスにより脳の正常な機能が損なわれるすべての障害を指す。重篤な CVD は致死的であり、2019 年における日本人の死因の第 4 位である。さらに、日常生活に多大な支障をきたす後遺症をもたらすことから、人医療では循環器病対策推進計画など国家的施策が実施されている。しかし、獣医領域ではイヌやネコにおける CVD の存在は認識はされつつあるも、その事例についての報告は多くない。そのため、CVD の臨床徴候は獣医領域において十分に認知されておらず、その診断、治療、予防手段は未だ明確ではない。獣医領域における限られた CVD の臨床研究では、症例が CVD であることを十分に担保するため症例選択の際に厳格な診断条件がクライテリアとして用いられており、一次診療で遭遇する脳梗塞が疑われる症例における症状と必ずしも一致しないことがある。また、それらの臨床研究は海外における症例報告であり、国内での CVD 症例の特徴を必ずしも表していない可能性がある。したがって、イヌおよびネコにおける CVD の診断、治療、予防手段を明確にするためには、国内の CVD 症例を使ったケースコントロール研究を実施することにより、その臨床的特徴を明らかにする必要がある。 また、CVD の診断における最も有効な検査は MRI 検査とされるが、その実施には全身麻酔を必要とすることから、全ての CVD 症例に行われる検査ではない。それを解消する一助として、一次診療施設で CVD の発症をより簡便に検出可能な血中バイオマーカーの開発が望まれている。人医療では脳組織の傷害と関連し血液中で検出できるバイオマーカーとして、マイクロパーティクル（MPs）、IL-6、TNF、S100B など多くの検討がなされている。その中で MPs は、その数の増加だけでなく膜表面の抗原や内包するタンパクや核酸等の特異性からそ	

の起源を知り病態を反映することが示唆されているが、獣医学領域における MPs の測定方法は確立されていない。

そこで第 1 章では、国内の小動物臨床における CVD の現状を明らかにすることを目的として、イヌおよびネコの CVD 症例におけるケースコントロール研究を実施した。一つの施設で記録、保管されている医療記録簿を基に、2009 年から 2016 年の期間に CVD に罹患したイヌとネコを抽出し調査を行った。CVD の診断は、急性発症、臨床徴候、磁気共鳴画像診断所見を基に実施し、CVD 群における病歴、臨床徴候、併発疾患、梗塞部位、脳脊髄液検査所見、発症月、予後を調査した。また、同時期に来院し CVD を持たない症例群をコントロール群として解析を行った。上記期間中に来院した症例 5312 頭の中から、122 頭が CVD 症例として抽出された。その中で、本研究で設定した対象選択クライテリアと合致するイヌ 66 頭 (1.2%)、ネコ 9 頭 (0.2%) の症例を、本研究におけるケースコントロール研究で解析した。イヌの前脳梗塞は 66 例中 51 例で、その中での 24 例 (47.1%) に CVD 発症時の痙攣が臨床症状として認められた。CVD の季節性を検討するため発症月を解析した結果、CVD と診断されたイヌの数は、8 月 (59 例中 9 例) と 12 月 (59 例中 13 例) で有意に高かった。イヌの予後調査では、55 例中の 11 例で悪化が認められた。CVD 発症時の痙攣は、イヌの CVD において重要な臨床徴候であることが示された。また、国内において、イヌにおける CVD の発症には季節変動があることが明らかとなった。

第 2 章では、CVD のバイオマーカーとして臨床応用可能な MP 測定方法について、イヌとウサギの血液を用いて基礎的検討を行った。MPs は、細胞膜の一部から出芽し細胞から体液中に放出される膜小胞である。フローサイトメトリー (FCM) は、ヒトの MP 測定において最も一般的に使用されている方法であるが、イヌの血中 MP 測定方法については、いまだ標準化されていない。そこで本研究では、抗血液凝固剤および MP 染色試薬が FCM によるイヌ MP 測定に与える影響について基礎的な検討を行った。Platelet-free plasma (PFP) 作製時には、抗血液凝固剤としてクエン酸デキストロース (ACD) とヘパリンを使用し、その効果を比較検討した。さらに、MP 染色試薬として annexinV、CFSE、calcein-AM を使用し、FCM による MP 検出における各染色試薬の特徴について解析した。本研究において、ACD 処理イヌ血液から作製した PFP 中の MP 測定が FCM により可能であった。また、MP 染色試薬として CFSE 使用した際に、最も高い MP 陽性率が観察された。

以上の研究により、小動物臨床領域における CVD の臨床像についてその詳細を提示するとともに、イヌに MP 測定における抗血液凝固剤と MP 測定試薬の影響を明らかにすることができた。今後、獣医領域における CVD の特徴が広く認識および理解され、CVD バイオマーカーの開発が進むことで、CVD の診断、治療、予防技術の向上に貢献できると考えられる。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。