

氏名(本籍)	十川 剛(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第154号
学位授与年月日	平成31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	Risk Factors and Treatments of Idiopathic Epilepsy in Dogs 犬の特発性てんかんの発症の素因および治療に関する研究
論文審査委員	(主査) 藤井 洋子 (副査) 折戸 謙介 阪口 雅弘

## 論文内容の要旨

### Introduction

Epilepsy is one of the most common chronic neurological disorders that affects both dogs and humans. The type of epilepsy affecting about half of the epileptic dogs is idiopathic epilepsy (IE). There is no standardized definitive treatment for IE, and most of the dogs affected by this disease need to be medicated with an anti-epileptic drug (AED) throughout their lifespans to prevent epileptic seizures. Despite being administered adequate doses of AEDs, 20–30% of the epileptic dogs remain inadequately treated for seizure control. Seizures deteriorate the quality of life of both the affected animals and the owners of these animals. Therefore, in Chapter 1, the author retrospectively investigated the clinical data corresponding to dogs with IE in Japan to search for predisposing factors to this condition and to identify problem areas in the treatment of IE that have the potential to be improved upon for further investigation. In Chapter 2, the author focused on potassium bromide (KBr), which is an effective AED to control seizures in dogs; however, there are problems associated with administering this treatment in some clinical cases. Next, in Chapter 3, a search was conducted for the risk loci of IE in a dog breed that was overrepresented in the retrospective study (Chapter 1) using a genome-wide association study (GWAS) and a direct sequence method.

## **Chapter 1: A retrospective study of canine idiopathic epilepsy in referral centers in Japan**

The aim of this chapter was to describe the clinical data associated with dogs affected by IE in Japan and to search for predisposing factors responsible for this condition. Furthermore, another purpose was to address the problems encountered with the AED treatments administered to dogs with epilepsy. The medical records and clinical information corresponding to dogs diagnosed with IE at 2 referral centers between April 2013 and March 2016 were retrospectively reviewed. The review was conducted according to the consensus statements published by the International Veterinary Epilepsy Task Force. The data of a total of 70 dogs that had a median (minimum–maximum) weight of 5.15 (1.85–79.85) kg and were at a median age of 4.2 (0.3–11.8) years at the initial onset of epileptic seizures were used. Forty-four of these dogs were male, and 26 were female. Toy poodles were overrepresented in the present study indicating that this breed may be predisposed to IE and would be a good candidate for a gene study to elucidate the cause of IE in dogs. Moreover, the cases suspected to be refractory among these were being administered 2 or more AEDs. Since 67 % of the dogs with a poor therapeutic outcome were on potassium bromide (KBr), it was hypothesized that optimizing the KBr treatment would contribute to the improvement of the therapeutic outcome.

## **Chapter 2: The effects of chloride in the diet on serum bromide concentrations in dogs**

Since it is known that a high chloride intake decreases the serum bromide concentration, it was considered that elucidating the relationship that exists between these parameters would provide useful data. Therefore, in this chapter, the author clarifies the relationship between the dietary chloride intake and serum bromide concentrations. Steady-state serum bromide concentrations were measured using a gold chloride method in 23 dogs treated with KBr. The content of dietary chloride (per 1 g) was measured using the Mohr's method or calculated from the ingredients label provided by the manufacturer of the dog food. A regression analysis was used to evaluate the relationship between dietary chloride intake (mg/kg/day) and the serum bromide concentration per dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  per mg/kg). Dogs with a higher chloride intake had lower serum bromide concentrations. A strong negative correlation was observed between the dietary chloride intake (mg/kg/day) and the serum bromide concentration per dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  per mg/kg) ( $P < 0.01$ ). These results suggest the importance of considering the dietary chloride content for KBr-treated dogs and may also assist clinicians with the selection of KBr doses and appropriate diets for dogs treated with KBr.

### **Chapter 3: The investigation of the candidate gene associated with IE in toy poodles**

Since toy poodles were overrepresented in the investigation conducted in Chapter 1, it was indicated that this breed may be predisposed to developing IE and, hence, would be a candidate for the gene study to elucidate the cause of IE in dogs. Therefore, in this chapter, the author tried to locate the loci that are related to IE in toy poodles. Using 10 and 22 toy poodles with and without IE, respectively, a genome wide association study (GWAS) was performed. The identified candidate variant was validated using a standard PCR, followed by Sanger sequencing in an additional sample of 39 toy poodles (23 affected and 16 unaffected). The GWAS and confirmation study revealed a significant variant single nucleotide polymorphism (SNP), rs22063361, in chromosome 10. Exonic sequencing was performed on 1 of the candidate genes, ELFN2, and its potential to be involved in the pathogenesis of IE in dogs was evaluated. The analysis of the coding region of ELFN2 did not reveal a causative mutation responsible for IE. Therefore, further investigation is needed to elucidate the relative gene responsible for IE in this breed.

### **Conclusion**

The author described the clinical data corresponding to canine IE in Japan, elucidated the relationship that exists between the dietary chloride intake and serum bromide concentration. Although the present study could not reveal the association between specific candidate gene and toy poodle with IE, these findings of the present study act as a resource to assist clinicians in treating dogs with IE and provide multiple basic data to facilitate further investigations of canine IE.

### **A part of this thesis was published as the following articles.**

1. Togawa G, Saito M, Uebayashi I, Onishi Y, Yamazoe H. 2018. A Retrospective study of canine idiopathic epilepsy in referral centers in Japan. *J Azabu Univ.* (In Press).
2. Togawa G, Saito M, Iwata S, Watanabe N, Orito K. 2018. Effects of chloride in the diet on serum bromide concentration in dogs. *Inter J Appl Res Vet Med.* 16 197–202.

### **論文審査の結果の要旨**

てんかんは、犬の神経疾患のうち最も多く認められる疾患の一つである。てんかんはその病因から特発性てんかんと構造的てんかんに分類され、おおよそ半数が特発性（以下 IE）と診断されている。

IEは通常若齢で発症し、根治療法がないことから罹患犬は若齢時から生涯を通じて対症療法として抗てんかん薬を服用し続けなければならない、適切な治療をしてもその2-3割が治療困難例（難治性）となる。このように、神経病学分野においてIEは、罹患率の高さ、根本的な治療法の欠如、対症療法の不十分さが臨床上の重大な問題点であり、症例犬と家族（オーナー）および臨床獣医師にとって大きな障壁となっている。そこで本研究では、IEの病因の解明、臨床的な問題点の洗い出しとその解決策を模索し、治療成績の向上を最終目的とし、以下の3章からなる研究を行なった。

## 第1章 日本における特発性てんかんの回顧的研究

第1章では、IE発症の素因となりうる因子や治療の改善点を模索することを目的に、本邦におけるIEの臨床データの調査を行なった。これまで同様の研究は行われているものの欧米からの情報であり、本邦で飼育されている犬の母集団は欧米と異なり小型犬が多く異なる結果が得られる可能性も予想されたことから本調査は実施された。

方法は、2カ所の二次診療施設に2013年4月から2016年3月までに来院し、International Veterinary Epilepsy Task ForceのIEの診断基準に基づき診断されたものをIEとして組み入れ、臨床データを後方視的に調査した。同期間に来院しIEと診断されなかった犬を対照群とした。26犬種、70頭の犬がIEと診断され、犬種としてトイ・プードルが最も多く23%を占めており、続いてチワワ（14%）、ミニチュア・ダックスフント（9%）であった。IE罹患に対するトイ・プードルのオッズ比は3.08（95% CI 1.24-7.64）と、他犬種と比較してIE発症リスクが高いことが明らかとなった。これは過去には報告されていない新規性のある情報である。このことからトイ・プードルでは遺伝的関与が疑われ、遺伝的研究の供試犬として本犬種は最も良い候補犬種であると考えられた。IEの治療成績の調査結果から、3割が難治性（no responder）であり、うち67%の症例で臭化カリウム（KBr）が処方されていた。KBrは最もよく使用される併用薬であることからこの結果は必然的ではあるものの、KBr治療を最適化することでIE治療成績を向上させることができると考え、第2章の研究を計画した。

## 第2章 犬におけるBr血中濃度とCl摂取量の関係

KBrは、その排出が体内のClに影響されることが知られているため、KBr処方中の犬では塩分摂取量を一定に保つことが推奨されている。しかしCl摂取量と血中Brの数値的な関係性は分かっていない。そこで、KBr治療を最適化するためにはその関係性を明確にすることが有用であると考え、第2章では食事中Cl摂取量と薬物投与量の関連性を示す計算式を導くことを目的とした。供試動物はKBrを慢性的に服用中で血中濃度が定常状態に達している臨床例の犬23頭とし、臨床情報の収集と（投与量、体重、食事内容）食事中のCl（体重あたりの1日Cl摂取量、モール法により測定、mg/kg/day）、KBr投与量あたりのBr血中濃度（塩化金法により測定、 $\mu\text{g/mL per mg/kg/day}$ ）を算出した。その結果、Br血中濃度  $y = -0.2x + 87$  であり（ $x$ : Cl摂取量）、2つのパラメータの間に有意な強い負の相

関が認められた ( $R^2 = 0.65$ ,  $p < 0.01$ )。

次にこの関係式の臨床例における有用性を臨床例で検討した。症例 1 は、Br 血中濃度が上らず発作のコントロールが得られていなかった。本症例は尿石症既往のため Cl 含有量の高い尿石症処方食 (1 日 Cl 摂取量 543.7 mg/kg) を摂取しており、関係式に症例の Cl の数値を代入すると血中濃度は 0 以下となったことから、Cl の過剰摂取が血中濃度低下の原因であることがわかった。そこで Cl 含有量の低い食事に変更したところ Br 血中濃度の上昇が得られ、発作頻度が減少した。症例 2 は、Br 血中濃度が低値で発作のコントロールが得られていなかった症例である。KBr 投与量の決定に本関係式に基づき投与量を増量したところ、予測通りの血中濃度の上昇が得られ発作のコントロールが可能となった。今後さらなる検証は必要であるものの、本関係式は投与量の決定や食事内容の見直し等において臨床現場で非常に有用である可能性が示唆された。

### 第 3 章 犬の特発性てんかんの関連遺伝子の探索

第 1 章の結果から、トイ・プードルは IE の好発犬種である可能性が示唆されたことから、第 3 章ではトイ・プードルに注目し、IE 関連遺伝子の検索を試みた。材料は、IE に罹患したトイ・プードル 33 例と非罹患のトイ・プードル 38 例を用いた。犬の IE 関連遺伝子として、特定の 3 犬種において *LGI2*, *ADAM23*, *DIRAS1* が報告されているが、調査したトイ・プードルにおいてはこれらの変異は認められなかった。次に、新規の IE 関連遺伝子の探索として全ゲノム関連解析を行い、IE との関連が疑われた SNP については別個体のトイ・プードルにおいて確認実験を行なった。その結果、罹患犬で有意に変異頻度の高かった SNP6 の近くの候補遺伝子 (*ELFN2*) についてその蛋白コード領域を解析したが、罹患犬において有意な変異は認められず、本研究ではてんかんに関連する遺伝子の特定には至らなかった。

以上のように今後も継続研究が必要であるものの、本研究は獣医臨床でその診断治療についてまだ十分に確立されていない犬の IE に対し新しい知見を提供し、獣医神経病学に大きく貢献するものである。このことから、博士 (獣医学) の学位を授与するのにふさわしい業績であると判定した。