

ゾニサミド抵抗性の特発性てんかん犬に対する
中鎖トリグリセリドによる抗発作作用と副作用として
生じる消化管障害メカニズムに関する研究

2023年

鳥取大学大学院共同獣医学研究科

中塚 一将

目次

略語一覧.....	1
-----------	---

総合緒言.....	3
-----------	---

第Ⅰ章

ゾニサミドで治療した特発性てんかんの犬に対するMCT強化食の有効性評価

1. 緒言.....	6
------------	---

2. 方法.....	8
------------	---

3. 結果.....	11
------------	----

4. 考察.....	14
------------	----

図、表.....	18
----------	----

第Ⅱ章

MCT摂取に伴う消化器症状のメカニズムの解明：MCFAsによる腸クロム親和性細胞か

らの5-HT放出

1. 緒言.....	29
------------	----

2. 方法.....	30
------------	----

3. 結果.....	33
4. 考察.....	34
図.....	36
総合考察	41
結論	43
謝辞.....	44
参考文献.....	45

略語一覧

5-HT 5-hydroxytryptamine

A96 A967079

AMPA α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸)

ANOVA Analysis of variance (分散分析)

ASM Anti-seizure medication (抗発作薬)

BCS Body condition score (ボディーコンディションスコア)

BW Body weight (体重)

CA Cinnamaldehyde (シンナムアルデヒド)

CBC Complete blood count (全血球計算)

DA Decanoic acid (デカン酸)

DHA Docosahexaenoic Acid (ドコサヘキサエン酸)

DMSO dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)

EPA Eicosapentaenoic Acid (エイコサペンタイン酸)

ES Epileptic seizure (てんかん発作)

GABA γ -amino acid (γ -アミノ酪酸)

HC HC-030031

IE Idiopathic epilepsy (特発性てんかん)

LA Lauric acid (ラウリン酸)

MCFAs Medium-chain fatty acids (中鎖脂肪酸)

MCT Medium-chain triglyceride (中鎖トリグリセリド)

MCTD MCT diet (MCT 食)

NC NeuroCare (ニューロケア)

OA Octanoic acid (オクタン酸)

PB Phenobarbital (フェノバルビタール)

PL Placebo diet (プラセボ食)

QOL Quality of life (生活の質)

TRPA1 Transient Receptor Potential Ankyrin 1

VAS Visual analogue scale (ビジュアルアナログスケール)

総合緒言

てんかんは人や犬の慢性神経疾患の中で、最も一般的な疾患の一つである (1,2)。犬におけるてんかんの有病率は 0.6-0.75%と推定されており、特定の純血種ではより高いことが報告されている (3-6)。特発性てんかんは犬で最も多いてんかんの病因である慢性的な脳疾患で (3)、24 時間以上の間隔をあけて生じる少なくとも 2 回の非誘発性発作が認められ、遺伝的な原因が疑われる以外に根本的な原因が特定できない場合、臨床的にその病名が適応される (3)。特発性てんかんの原因として、ラゴット・ロマニョーロの LGI2 変異 (4)、ベルジアン・シェパードにおける ADAM23 変異 (5)、そしてローデシアン・リッジバックの DIRAS1 変異が報告されている (6)。LGI2 と ADAM23 複合体は神経突起伸長と樹状突起の樹枝形成の刺激に関与するとされ、シナプス前膜とシナプス後膜を引き寄せ、シナプス神経伝達を安定化および強化する役割を果たすことが知られている (7)。しかしながら、原因となる遺伝子が同定されているのはごく僅かであり、特発性てんかんについては病態が不明な点も多い。また、特発性てんかん以外では、脳における器質的な異常が原因となる構造的てんかんがあり、その原因として水頭症や皮質形成不全などによる奇形性疾患、脳腫瘍、免疫介在性脳炎、頭部外傷あるいは高齢発症では脳血管障害や認知機能不全症候群に関連したてんかんがある (8)。

抗発作薬はてんかん発作をコントロールするための主な治療法である。米国獣医内科学会が各薬剤の単剤使用の推奨リストを報告しているが (9)、その中でフェノバルビタール、イメピトインは 6 ヶ月以上の盲目無作為化臨床研究において $\geq 50\%$ の有効率であったことから、ファーストラインとして世界的には最も高頻度に使用されている。一方で、ゾニサミドはエビデンスレベルが乏しく、症例報告、学会発表などにおける 15 例以下の非盲目非無作為化臨床研究で $\geq 50\%$ の有効率が報告されているに留まるため、ファーストラインとしての推奨度は 4 段階のうち下から 2 番目となっている。次いで、併用薬としての推奨がレベチラセタム、臭化カリウム、プリミドン、フェノバルビタール、ゾニサミドで高いことから、これらを含む抗発作薬がセカンドラインとして発作のコントロール状況に応じて、ファーストラインと併用する形で追加されることとなる。サードラインに関する報告はほとんど存在しないため、臨床獣医師の経験則に基づいて追加

されているという現状がある。

他国と本邦では状況は大きく異なり、本邦ではフェノバルビタールとゾニサミドがファーストラインとして主に使用される(10)。ゾニサミドは本邦の大日本製薬株式会社により開発された薬剤であり、英語文献での報告が乏しいことから他国ではほとんど使用されておらず、犬の特発性てんかんの発作に対する有効性や安全性の報告はほとんどされていない(11,12)。ゾニサミドによる抗てんかん作用の正確な作用機序は不明ではあるが、T 型カルシウムチャネルや電位依存性ナトリウムチャネルの阻害、抑制系神経伝達物質である GABA 放出の促進、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸放出の抑制などが考えられている(13)。ゾニサミド使用時によくみられる副作用には鎮静、嘔吐、運動失調、食欲不振がある。ゾニサミドの使用に関連した食欲不振はフェノバルビタール、臭化カリウム、イメピトインなどの抗発作薬でみられる多食症とは対照的である(14,15)。

人を対象にした研究ではファーストライン、セカンドライン、サードラインの抗発作薬に対する有効率が検討されており、それぞれ 47%、13%、4%との報告がある(16)。犬の特発性てんかんを対象にした研究でも同様の結果が報告されており、それぞれ 37%、11%、6%となっている(17)。重要なこととして、ファーストラインの抗発作薬に反応を示さなかった場合には、セカンドライン、サードラインの抗発作薬が有効である可能性はより一層低下するということである(17)。そのため、薬剤抵抗性のてんかん患者に対する新たな治療が望まれている。人医療においては薬剤抵抗性のてんかん患者に対するてんかん外科が確立されているが(18,19)、イヌのてんかんに対する外科手術は一般に実験的研究や少数の症例報告に限られている(20-25)。ケトン食もまた薬剤抵抗性の人にとっての新たな治療選択肢として存在する。ケトン食は 1920 年代に小児てんかんの治療として用いられた食事療法であり、高脂肪で低炭水化物な組成が特徴的でその比率は最大のものは 4:1 である(26)。てんかん犬での有効性を検証するために古典的なケトン食を用いた食餌介入試験が行われてはいるが、発作頻度に有意な変化は認められていない(26)。それ故、てんかん犬での新たな治療介入として利用可能な食餌療法が期待されている。

てんかん犬に対する治療介入として注目される栄養成分に中鎖トリグリセリド(MCT)が挙

げられる。過去の報告では、フェノバルビタールに有効性を示さない特発性てんかん犬に対して、MCT を強化した食餌療法により、発作頻度が有意に減少したことが報告されている (27)。同時に、MCT 強化食給餌中に全参加患者のうち約 20%で下痢、軟便、嘔吐などの消化器症状が報告されている (27)。MCT は人の医療においても様々な臨床応用がなされている一方で、副作用として用量依存性の下痢や胃腸の不快感を伴うことが知られ、1日に約 23g を摂取すると約 50%の人が同症状を示したとの報告もある (28)。

本邦では、ファーストラインの抗発作薬としてゾニサミドの使用率が最も高いが (29)、ゾニサミドの有効性や安全性に関するエビデンスがほとんどなく、海外での使用率は低いのが実情である。そのため、ゾニサミドに抵抗性を示す犬に対する食餌療法の検証は行われていない。したがって、本研究ではゾニサミドに抵抗性を示す特発性てんかんの犬に対する MCT の食餌療法の効果を検証するとともに、副作用として生じる消化器症状のメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

第 I 章

ゾニサミドで治療した特発性てんかんの犬に対するMCT強化食の有効性評価

1. 緒言

人では実用化されているケトン食に代わるものとして、獣医療で注目されている栄養素の一つに中鎖トリグリセリド (MCTs) があり、用量依存的に抗発作作用を示すことが報告されている (30)。MCTs の摂取、消化、代謝により、中鎖脂肪酸 (MCFA) が生成され生物学的に利用可能になる。MCT はグリセロール骨格と 3 つの MCFA から構成されており、MCFA は 6 個から 12 個の炭素原子を有する (図 1)。MCT を摂取すると胃や腸のリパーゼでグリセリンと MCFA に分解される (31)。その後、MCFA はリンパ管を介することなく血中へと取り込まれる (32)。大部分は肝臓内でケトン体に代謝され、TCA 回路に組み込まれることでエネルギー基質となる (33)。US Department of Agriculture National Nutrient Database によると MCT は自然界ではココナッツオイルやパーム核油に豊富に含まれる (34)。最近の研究で薬剤抵抗性の特発性てんかんの犬に対する MCT 強化食の効果が検証されている (27)。この研究では、プラセボ食使用中の発作頻度と比較して MCT 強化食使用中は 14%(3/21 頭)で発作が消失、48%(10/21 頭)で発作頻度が 50%以上減少、24%(5/21 頭)で発作頻度に変化なし、29%(6/21 頭)で発作頻度が増加するという結果が示されている。更に、この研究では発作日数についても検証されており、14%(3/21 頭)で発作が消失、33%(7/21 頭)で発作日数が 50%以上減少、48%(10/21 頭)で発作日数に変化なし、19%(4/21 頭)で発作日数が増加したと報告されている。試験食に 6.5%の MCTs、高濃度のオメガ 3 脂肪酸、その他栄養素を強化した食餌を犬に給餌したその後の研究でも同様の結果が得られており、9.5%(2/21 頭)で発作が消失、42.9%(9/21 頭)で発作頻度が 50%以上減少、33.3%(7/21 頭)で発作頻度が 50%未満の減少、4.8%(1/21 頭)で発作頻度に変化なし、19.0%(4/21 頭)で発作頻度が増加したとの報告がある (27)。どちらの試験でもフェノバルビタールが主な抗発作薬として使用されており、ゾニサミドを主な抗発作薬として使用していた犬はい

なかった。したがって、ゾニサミド使用中で薬剤抵抗性特発性てんかんをもつ犬に対する補助療法としての MCTs 強化食の有効性を示すエビデンスは現時点では存在しない。

本研究の目的は、6.5%の MCTs とその他の栄養素としてオメガ 3 脂肪酸、アルギニン、ビタミン E などの栄養素を強化した市販の療法食（ニューロケア；NC; Purina Pro Plan NC NeuroCare, Nestlé Purina, St. Louis Missouri, USA）を用いて、ゾニサミドを主な抗発作薬として使用している薬剤抵抗性の特発性てんかん犬での有効性を検討することである。

日本獣医師会によると、療法食は一般的な健康維持食とは異なる特別な栄養特性や製造方法を持つペットフードと定義されている（35）。また、療法食は食事療法に使用することを意図して調整されたものであり、日本ではいくつかの法律により規制されている（35）。ニューロケアは MCT を強化した食餌で、特発性てんかんと認知機能不全症候群が適応となっている療法食である（36）。我々はニューロケアを毎日摂取することでフェノバルビタールや臭化カリウムを内服して治療している特発性てんかんの犬で見られた効果と同様の効果がゾニサミドを内服している犬でも見られると仮定した。この仮定を検証し、ゾニサミドと MCT 強化食の組み合わせの有効性と安全性を確認するために、前向き無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験を実施した。

2. 方法

試験法

前向き無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験は、日本国内の多施設共同研究として実施した。本試験プロトコルは日本獣医生命科学大学附属動物病院による承認を受けた(承認番号: H30-2)。参加犬はすべて飼い主所有の犬で飼い主の同意を得た後に組み込まれた。試験期間中は抗発作薬の用量は変えないことし、試験食以外にはトリーツも含め給餌しないこととした。ニューロケア(NC) (Purina Pro Plan NC NeuroCare, Nestlé Purina, St. Louis Missouri, USA)を商業的に利用可能な試験食として使用し、プラセボ食(PL)は MCTs を含まず(牛脂で代用)、オメガ 3 脂肪酸、アルギニン、ビタミン E は低濃度のものを使用した。その他の栄養素やカロリーは NC と PL で同様であった。成分分析の結果は表 1 で示す。

試験プロトコル

参加犬 1 頭あたりの総試験日数は 222 日であった。参加犬は最初に使う食餌をランダムに振り分けられ、日常使用している食餌から 21 日間かけて NC もしくは PL に完全移行し、最初の 3 か月間の給餌期間(22 日目から 111 日目まで)は切り替えた NC もしくは PL のみを引き続き継続給餌した。続いて、21 日間かけてクロスオーバー方式で食餌を完全に変更した(112 日目から 132 日目まで)。その後、222 日目までの 3 か月間食餌を継続した。プロトコルの時系列およびサンプル採取については図 3 で示した。血液サンプルとデータは 1 日目、111 日目、222 日目に取得し、この中には BW(体重)、BCS(ボディーコンディションスコア)、CBC(全血球計算)および血清生化学検査、および後述する VAS(ビジュアルアナログスケール)スコアを含む飼い主記入式質問票を含む。血液サンプルは 21 日目と 133 日目にも採取した。

国際獣医てんかん特別委員会(IVETF)のコンセンサスレポート(37)に従い、群発発作は 24 時間以内に 2 回以上の発作を起こしたものと定義した。また、治療成功の定義は IVETF のコンセンサス案に従い(37)、NC 使用中および PL 使用中の発作頻度が試験前と比較して 50%以上減少したこととした。

参加犬の募集と組み入れ基準

本試験の組み入れ基準として、すべての参加犬が IVETF の定める特発性てんかんの診断レベル tier1 を満たし、特発性てんかに罹患していると診断されることとした。Tier1 は 24 時間以上あけて 2 回以上の非誘発性てんかん発作がある（てんかんの定義）、初発の発作発生時の年齢が 6 ヶ月以上 6 歳以下、発作が起きていない時に明らかな身体的・神経学的検査で異常がない、抗てんかん薬による影響を除き、血液検査：CBC、Na、K、Cl、Ca、P、ALT、ALP、Bil、BUN、Cre、TP、Alb、Glu、Tcho、TG、TBA、NH₃、尿検査：比重、蛋白、糖、pH、沈渣に異常がない、ことと定められている。この他にも Tier2 では Tier1 に加えて食前食後の TBA が正常値、発作間欠期の MRI、脳脊髄液が正常であることが定められている。Tier3 では Tier1 と Tier2 に加えて脳波検査でてんかん性異常波を同定することと定められており、番号の順に診断の信頼レベルが上昇する。本試験では患者を広く募集するためにも、Tier1 を満たすことを参加条件とした。また、全般性強直間代性てんかん発作を組み入れ前 3 か月に 3 回以上起こしていることとした。この回数設定は、Law らが実施したフェノバルビタールを用いた先行研究（27）における組み入れ条件を参考に、同様の基準を設定した。回数が少ない場合は治療群と対照群での比較が難しくなる一方で、回数を多く設定すると患者の募集で難航することから、比較検討がしやすい 3 回以上を条件とした。さらに、抗発作薬としてゾニサミドを内服しており、参加半年前からゾニサミドを内服していることとした。参加犬の年齢は 1-10 歳の間としたが、体重の制限は設けなかった。

試験組み入れ前に CBC、血清生化学検査、総胆汁酸において臨床的に有意な異常がある、他の特定可能な疾患がある、妊娠中、授乳中の犬は組み入れから除外とした。試験に参加した犬の健康状態が試験継続に適さないと獣医師もしくは飼い主が判断した際には、いつでも試験から離脱出来ることとした。

血液サンプル

血液検査は来院 1 回目～5 回目（図 3）のタイミングで実施し、各参加犬の採血は各食事および抗発作薬の摂取後 2 時間で実施した。CBC は時間と共に血小板数が減少することを防ぐ目的で各動物病院での測定とした。ケトン体濃度測定（総ケトン体、アセト酢酸、 β ヒドロキシ酪酸）、生化学検査は血清を用いて実施した。血清分離用採血管にて採血後 10 分放置し凝固させ、その後 3000rpm で 10 分遠心することで血清を分離した。その後、血清のみを別のマイクロチューブに保存し、速やかな冷凍保存を実施した。ゾニサミドの測定は血漿を用いて実施した。EDTA-2K 入り採血管を使用して採血を実施し、転倒混和後に 3000rpm で 10 分遠心し血漿を分離した。その後血漿のみをマイクロチューブに保存し、速やかに冷凍保存を実施した。各検体は 24 時間以内に検査会社（Marupi Lifetec Co., Ltd., 日本）に冷凍で郵送し、全検体同一の検査会社で測定を実施した。

VAS スコアと副反応

VAS スコアは鎮静、運動失調、QOL、食欲不振の各項目に対して 0-100mm のラインが引かれたものに飼い主が主観で記録をするというものである。本研究で使用した VAS スコアは図 4 であり、過去の研究に基づいて作成したものである(27)。ただし、過去の研究には食欲不振の項目は無かったため、新たに追加した。

飼い主は主観に基づき、各項目の重症度に応じて 100mm の線に交差する線を記入した。0-10mm は正常を表し、100mm が最も重度であることを示す。VAS スコアの最大値は鎮静、運動失調、食欲、QOL のそれぞれの項目における深い睡眠、歩行不可、食欲廃絶、安楽死を検討するほど QOL が低いことを示す。副反応が出た際には、飼い主は日付とその状態を飼い主が記録した。

統計解析

発作頻度(sz/m)はひと月当たりの発作の回数を意味し、発作日数(szd/m)はひと月当たりの発

作が起きた日数を意味する。発作頻度、発作日数、血液検査、VAS スコアに対する食事効果(NC vs PL)はランダム化効果として既報に則り (38) 一般化線形混合モデルで解析した。エントリー時と NC、PL 給餌後の体重、BCS は One-way ANOVA 後、Tukey-Kramer 多重比較テストにて解析した。すべての数値データは平均値および標準偏差 (S.D.) で示した。P<0.05 を有意な差とみなした。

3. 結果

参加犬

15 件の動物病院から 16 頭の犬が本研究に参加したが、8 頭は組み入れ基準に達しなかったため、8 頭の犬が本試験に組み入れられた。組み入れられた 8 頭のうち 1 頭は抗発作薬の投与量が試験中に変更されたためこの 1 頭は除外とし、最終的に 7 頭のみが本研究を完了した。参加犬の犬種、年齢、性別、発作頻度、群発発作の有無、試験開始前 3 ヶ月間の食餌、体重 (BW)、ボディコンディションスコア (BCS)、および抗発作薬の使用状況は表 2 に示すとおりである。試験に参加した犬種は以下の通りである。オーストラリアン・シェパード (#1)、シェットランド・シープドッグ (#2)、チワワ (#3)、トイ・プードル (#4)、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル (#5)、フレンチ・ブルドッグ (#6)、シベリアンハスキー (#7)。雄が 4 頭、雌が 3 頭の構成であった。すべての雌は避妊手術が実施されており、雄は 4 頭中 2 頭が去勢手術を実施されていた。試験開始時の参加犬 7 頭の年齢、体重、BCS は 6.14 ± 2.90 歳、 11.55 ± 8.19 kg、および 4.71 ± 0.45 (平均値 $\pm$ 標準偏差) であった。参加犬全頭でゾニサミド (7.01 ± 2.31 mg/kg、BID) が主な抗発作薬として投与されており、3 頭の犬には追加の抗発作薬が投与されていた。

(#1、臭化カリウムとプレガバリン；#5、プレガバリン；#7、ガバペンチン)。プラセボ (PL) 給餌期間終了時とニューロケア (NC) 給餌期間終了時では、BW と BCS に有意差はなかった。

てんかん発作頻度とてんかん発作日数

PL 給餌時 (図 5 a) と NC 給餌時 (図 5 b) について、各 3 ヶ月間の試験期間における全てん

かん発作の回数をグラフに示した。てんかん発作は NC 給餌時と PL 給餌時で有意な差はなかった ($P = 0.37$)。しかしながら、1 ヶ月当たりのてんかん発作の平均頻度 (sz/m) は、NC 給餌時 (1.90 ± 1.53 sz/m) では PL 給餌時 (2.95 ± 2.14 sz/m) と比較して 35% 減少していた。IVETF の定義 (8) に照らし合わせると、7 頭中 3 頭が治療前と比較して発作頻度が 50% 以下に減少していることから部分的な治療成功と評価され、1 頭 (#7) が発作の消失を達成した。この犬は PL 給餌中に 2 回の群発発作を異なる日 (49 日目と 76 日目にそれぞれ 11 回の発作と 8 回の発作) に起こし、合計 6 日の発作日数を記録した。また、給餌試験直前の 3 ヶ月間では計 5 日間で 20 回以上の群発発作を起こしていた。4 頭の犬 (#1,2,3,6) は給餌試験直前の 3 か月間で 2 回の発作を伴う群発発作を 1 回経験していた。一方で、PL 給餌中と比較して NC の給餌中は 3 頭 (#1,4,7) で発作頻度の 50% 以上の減少が観測され、2 頭 (#2,6) は発作頻度に変化がなかった。2 頭 (#3,5) は発作頻度が増加した。発作頻度を 1 ヶ月毎に比較すると最後の 1 ヶ月では PL 給餌時 (3.57 ± 3.02 sz/m) と比較して NC 給餌時 (0.71 ± 0.70 sz/m) は有意に発作頻度が減少した ($P=0.04$, 図 5 c)。各犬の給餌試験直前 3 か月、PL 給餌中、NC 給餌中の発作頻度は図 5 d で示した。

PL と NC を給餌していた各 3 か月間の発作日数はそれぞれ図 6 a と図 6 b に示した。前述の発作頻度と同様に、1 か月あたりの発作日数 (szd/m) は NC 給餌中と PL 給餌中で有意な差は認められず ($P=0.89$)、NC 給餌中の発作日数が 1.71 ± 1.43 szd/m であったのに対し、PL 給餌中の発作日数が 1.81 ± 0.77 szd/m と平均発作日数の差はわずか 6% であった。給餌直前 3 か月 (1.33 ± 0.44 szd/m) と比較しても NC 給餌中は有意な差はなかった ($P=0.54$)。しかしながら、発作日数を 1 ヶ月毎に比較すると最後の 1 ヶ月では PL 給餌時 (2.29 ± 1.28 szd/m) と比較して NC 給餌時 (0.71 ± 0.70 szd/m) は有意に発作頻度が減少した ($P=0.04$, 図 6 c) 各犬の給餌試験直前 3 か月、PL 給餌中、NC 給餌中の発作日数は図 6 d で示した。

続いて、給餌の順番による影響を検証した。1 回目給餌時の 90 日間の発作回数 (2.14 ± 1.49 sz/m) に対し 2 回目給餌時の 90 日間の発作回数 (2.71 ± 2.26 sz/m) に有意な差はなかった ($P=0.61$ 、図 7 a)。最後の 30 日間の発作回数を比較すると 1 回目給餌時は 2.86 ± 2.30 sz/m であったのに対し 2 回目給餌時は 3.00 ± 3.25 sz/m、 $P=0.93$ で有意な差は無かった (図 7 b)。同様

に 90 日間の発作日数は 1 回目給餌時 (1.81 ± 0.77 szd/m)、2 回目給餌時 (1.71 ± 1.43 szd/m)、 $P=0.89$ (図 7 c) であり、最後の 30 日間の発作日数は 1 回目給餌時 (1.29 ± 1.28 szd/m)、2 回目給餌時 (1.71 ± 1.28 szd/m)、 $P=0.57$ (図 7 d) といずれも有意な差はなく、給餌順による影響は発作回数、発作日数ともに認められなかった。

VAS スコアと副反応

PL および NC 給餌中の VAS スコア (平均値 $\pm$ 標準偏差) を図 8 に示した。4 つの項目全てにおいて有意な差は認められなかったが (運動失調、鎮静、食欲、QOL でそれぞれ $P=0.982$ 、0.964、0.907、0.112)、QOL は改善傾向にあった。

副反応は #1,3,5 の犬では観測されなかった。#2 の犬では NC への切り替え開始 1 日目から 3 日間の軟便が観測された。#4 の犬では NC への切り替え開始 2 日目と 3 日目に食欲減衰、15 日目に嘔吐と食欲廃絶、20 日目に嘔吐、下痢、食欲廃絶、NC に 100%切り替え後 10 日目に下痢、嘔吐、37 日目に下痢、嘔吐、食欲廃絶、40 日目に食欲不振、60 日目に食欲廃絶、71 日目に食欲不振、嘔吐、下痢、87 日目に食欲不振が観察された。PL への切り替え開始 9 日目には下痢、食欲廃絶、PL に 100%切り替え後 46 日目に下痢、食欲廃絶、72 日目に食欲廃絶、下痢が観測された。#6 の犬では NC を 100%給餌開始後の 6 日目に軟便、7 日目に軟便と食欲不振が観測され、PL への切り替え開始後 17 日目に下痢、67 日目に血尿が観測された。#7 の犬では NC に 100%切り替え直後の 1 日だけ吐き気が観測された。

血漿中ゾニサミド濃度、血清ケトン体濃度、CBC、および血清生化学検査

血漿中ゾニサミド濃度、血清ケトン体濃度、その他の血液検査結果を表 3 と表 4 にそれぞれ示した。PL 給餌終了時点 (19.70 ± 6.78 μ g/ml) と NC 給餌終了時点 (20.89 ± 10.68 , μ g/ml) で血漿中ゾニサミド濃度に有意な差は認められなかった ($P=0.822$)。血清総ケトン体濃度 (PL; 37.86 ± 11.29 μ mol/l vs. NC; 43.86 ± 16.13 μ mol/l; $P = 0.102$)、血清アセト酢酸濃度 (PL; 10.41 ± 5.08 μ mol/l vs. NC; 10.43 ± 4.24 μ mol/l; $P = 0.993$)、CBC および血清生化学検査では各項目

に有意な差は認められなかった（表3）。血清 β ヒドロキシ酪酸濃度はPL給餌終了時点($22.65 \pm 4.24 \mu\text{mol/l}$)と比較してNC給餌終了時点($34.14 \pm 12.08 \mu\text{mol/l}$)で有意な上昇が認められた($P=0.048$, 表4)。

4. 考察

本研究の目的はゾニサミドを主たる抗発作薬として使用しつつも薬剤抵抗性を示す特発性てんかんの犬に対する市販のMCT強化療法食(NC)の効果を検証することであった。PLとNCと比較すると90日間の発作頻度および発作日数に有意な差は認められなかったが、90日の給餌期間の最後の30日間でNCは発作頻度および発作日数を減少させる可能性が示唆された(図5c, 図6c)。これとは対照的に、7頭中2頭では発作頻度が増えているが、この結果は過去に報告されているものと同様であった(27)。本研究の重要な制限として、過去の報告と比較しても試験に参加した頭数がわずか7頭と極めて少ないことが挙げられ(27,39)、このために統計解析において十分な検証が出来なかった。また本研究は、NCを摂取した犬における重要なデータを示しており、すべての給餌期間を通じてゾニサミド濃度、各種血清生化学検査、CBC、BW、BCS、運動失調、鎮静、食欲などの各種データに有意な変化が見られなかった。これと同様に、QOLも有意な変化ではないが、NC給餌中の飼い主によるQOLの評価が顕著に改善した症例がいくつか存在した。

消化器症状の副作用を示した個体はPL給餌時には2頭であったのに対し、NC給餌時にはPL給餌時に消化器症状を示した2頭を含む4頭が消化器症状を示した。MCTsを犬に対して給餌すると腸内細菌叢のバランスが変動し、*Erysipelotrichaceae*や*Fusobacteriaceae*が有意に増加したと報告されている(40)。慢性腸症の犬では特定の腸内細菌が有意に変動することも知られる(41)ことから、腸内細菌叢の変動がNC給餌時に下痢を示す犬が多かった理由である可能性もある。異なるメカニズムとして、MCTを高用量で摂取することで浸透圧性下痢が引き起こされることも報告されている(42)。マウスでの研究では、MCTと食物アレルギーの原因となる抗原を同時に摂取すると、上部消化管上皮細胞によるTh2応答を促すサイトカインTSLP、IL-25、

および IL-33 の発現が促進されることが報告されている (43)。これにより本来は起こらない食物アレルギーを発症する可能性が指摘されている。犬においては IgE が関与する食物アレルギーの症状として消化器症状が多い (44)。MCT による下痢などの消化器症状の原因を調べるために、健康な人を対象にした摂食試験が報告されている (45)。この中で、MCT はコレシストキニンの分泌には影響を与えなかったが、食欲を減衰させるペプチド YY の分泌量を増やすとともに、消化管の運動機能が亢進したことが報告されている。ラットを使用した研究では、食欲を抑制するホルモンとして知られるレプチンの分泌量が MCT 摂取により有意に増加すると共に、絨毛あたりの胚細胞の数が増え粘液の分泌を亢進したことも報告されている (46)。腸管ホルモンの分泌をはじめとした各種の影響は MCT 摂取時に引き起こされる一連の消化器症状の一因として関与する可能性はあるものの、未だ明確にはなっておらず、その他にも消化器症状を発現させる機序が存在するかもしれない。

以前報告された、特発性てんかんを発症し、PB での治療を受けた犬に MCT 強化食を給餌した研究では、90 日間に渡って発作頻度が有意に減少したことが報告されている。具体的には、71%の犬で発作頻度が減少し、48%の犬で発作頻度が 50%以上減少し、14%の犬で発作が消失した(27)。本研究と同じ NC を用いた非盲検給餌試験(47)や MCT サプリメントの給餌試験(39)でも同様の結果が報告されている。ゾニサミドを主な抗発作薬として用いた本研究では、42%の犬が 50%以上の発作頻度の減少を示し、1 頭 (14%) が発作を示さなくなった。これらの値は過去の研究報告 (27, 39, 47) と酷似している。本研究では PL 給餌中に 5 頭の犬が群発発作を経験し、5 頭合計で 8 回の群発発作が観測されたが、NC 給餌中は 4 頭で群発発作が起こり、1 日 2 回の群発発作が各犬で 1 回の観測だけに留まった。

NC 給餌終了時の血清 β -ヒドロキシ酪酸濃度は、PL 給餌終了時に比べて有意な増加が認められた。MCTs は MCFA s に速やかに分解され、さらに β -ヒドロキシ酪酸のようなケトン体へと代謝される(44)。ヒト、齧歯類てんかんモデル、犬において、てんかんは脳内グルコースの代謝障害と関連しているとの報告がある (49-52)。 β ヒドロキシ酪酸はこのような状態においてグルコースに替わるエネルギー源となり、発作の軽減に寄与する可能性がある(53,54)。また、 β ヒド

ロキシ酪酸濃度はMCTsを摂取することで上昇する。そのため、飼い主が試験プロトコルを順守し試験食である NC を給餌したことを間接的に証明する。オクタン酸やデカン酸などの MCFAs は、 α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 (AMPA) 受容体の阻害を介して抗発作作用を発揮することが報告されており(30)、これもてんかん発作軽減の一因である可能性がある。ヒトのてんかんに対する比較的新しい抗発作薬であるペランパネルは、AMPA 受容体の非競合的拮抗薬であり、作用部位はMCFAsと類似している(55-57)。側頭葉てんかんのラット扁桃体キンドリングモデルにおいて、ペランパネルの明確な抗てんかん作用と結合部位が明らかにされている(58)。以上のことから、NC に含まれる MCTs が MCFAs に分解され、抗発作効果が示したと考えられる。

本研究では、VAS スコアに有意差は認められなかった。しかし、QOL は NC 給餌中に改善する傾向がみられた ($P=0.11$)。発作頻度の減少が顕著にみられた犬の飼い主からは特に良い印象であったとの報告があった。慢性疾患を持つ動物の飼い主は介護の負担のためにストレス、不安、鬱の徴候を経験することがある(59)。犬のてんかん発作の予測は困難であり、飼い主はいつ発作が発生するか分からないという不安を常に抱え続ける。一方で、発作頻度が3か月に1回以下であることが発作のコントロールに対する満足度に関連するとの報告もある(60)。食欲は食餌療法の成功における重要な因子となる。PB のよく知られている副作用の一つに食欲亢進が挙げられるが、ゾニサミドでは主な副作用に食欲減衰が挙げられる。しかしながら、本研究では VAS スコアにおける食欲および体重に有意な変化は認められなかった。これはゾニサミドで治療中の特発性てんかんの犬において NC の忍容性が良好であることを示す。

本研究の重大な制限は参加頭数が少ないことである。これは COVID-19 のパンデミックが発生したことで、試験について広く周知し地域の動物病院から十分な患者を集めることが出来なかったことも影響した。最終的に本試験を完了したのは7頭であったが、給餌後61日目から90日目の間で、NC 給餌中には PL 給餌中と比べて有意な発作頻度の減少があり、NC をゾニサミド抵抗性の特発性てんかんの犬に併用した際の有効性と安全性を示すことが出来た。加えて、患者に対する有益性はより長期にわたる試験で示される可能性も示唆された。より大規模で長期間の試

験を行うことで MCT とゾニサミドの相互作用がより明確になる可能性がある。

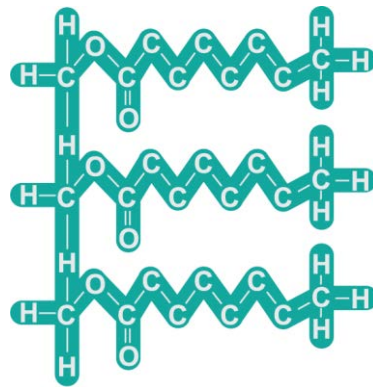


図1 オクタン酸を脂肪酸として有する MCT の構造例。1つのグリセロール骨格と3つのオクタン酸から構成される。

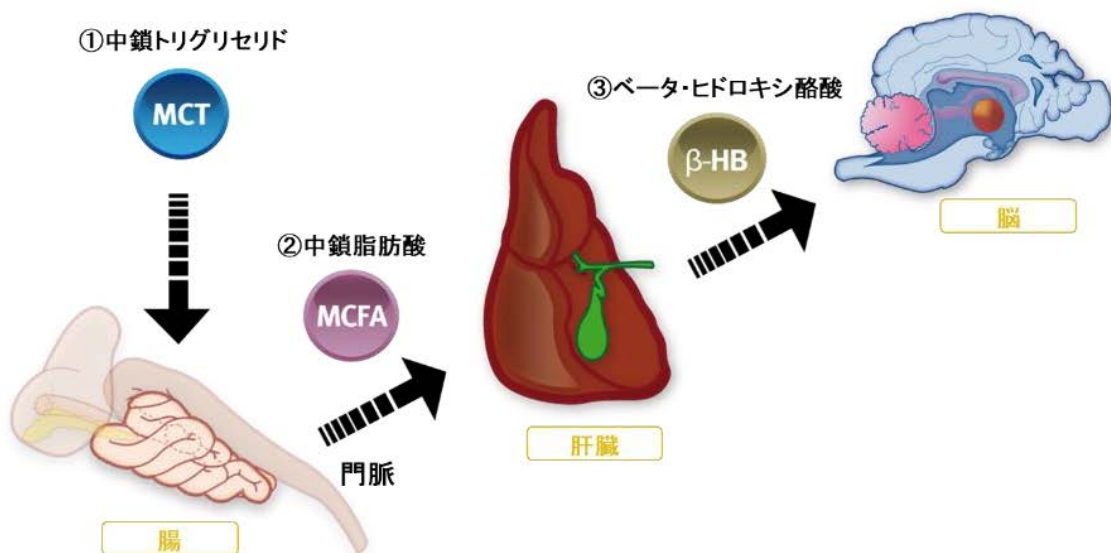


図2 中鎖トリグリセリドの消化および代謝過程。中鎖トリグリセリドはリパーゼにより中鎖脂肪酸とグリセリンに分解される。その後、中鎖脂肪酸は肝臓で代謝され β ヒドロキシ酪酸などのケトン体へと代謝される。

分析値	PL	NC
水分 (%)	7.1	8.4
粗タンパク質 (%)	32.7	32.8
粗脂肪 (%)	19.4	17.6
炭水化物 (%)	38.7	40.7
粗繊維 (%)	1.9	1.8
灰分 (%)	7.3	7.2
クロライド (%)	0.7	1
ビタミン E (IU/kg)	907	1377
EPA + DHA (%)	0.02	0.52
セレン (%)	0.7	0.7
アルギニン (%)	1.9	2.7
MCT オイル (%)	0	6.5
代謝エネルギー (kcal/100g)	385	372

表 1 プラセボ食 (PL) とニューロケア (NC) の乾物重量における栄養成分の分析値

犬の番号	1	2	3	4	5	6	7	平均 ± 標準偏差
犬種	オーストラリアン シェパード	シェットランド シープドッグ	チワワ	トイプードル	キャバリア コッカー スパニエル	フレンチ ブルドッグ	シベリアン ハスキー	
試験開始時の年齢	5	6	9	10	4	1	8	6.14 ± 2.90
性別	NM	NM	M	NF	NF	M	NF	
試験開始前3か月間の てんかん発作回数 (sz/m)	6	3	6	4	5	3	20	
試験開始前3ヶ月間の 群発発作の有無	有	有	有	無	無	有	有	
試験開始前3ヶ月間の 重積発作の有無	無	無	無	無	無	無	無	
試験開始前の給餌食	総合栄養食	下部尿路用 療法食	総合栄養食	総合栄養食	下部尿路用 療法食	総合栄養食	総合栄養食	
試験開始時の体重 (kg)	20.5	11.4	3.4	1.7	7.6	10.3	26.0	11.55 ± 8.19
PL給餌後の体重 (kg)	23.0	12.8	3.0	2.0	7.6	10.9	26.1	12.19 ± 8.64
NC給餌後の体重 (kg)	23.6	12.3	3.3	1.8	7.7	10.8	28.0	12.49 ± 9.16
試験開始時のBCS	5	5	4	5	5	4	5	4.71 ± 0.45
PL給餌後のBCS	6	5	4	5	5	4	5	4.85 ± 0.64
NC給餌後のBCS	7	5	4	5	5	4	5	5.00 ± 0.93
抗発作薬	ゾニサミド ブレガバリン 臭化カリウム	ゾニサミド	ゾニサミド	ゾニサミド	ゾニサミド ブレガバリン	ゾニサミド	ゾニサミド ガバペンチン	

表2 参加犬の犬種、年齢、性、発作頻度、群発発作の有無、発作重積の有無、試験参加前3か月間に使用していた給餌食、体重、BCS、抗発作薬を示す。

	試験開始時		100 % PL給餌開始時		100 % PL給餌終了時		100 % NC給餌開始時		100 % NC給餌終了時	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
TP (g/dL)	5.64	0.55	5.91	0.30	6.23	0.32	5.97	0.25	5.86	0.44
ALB (g/dL)	3.54	0.49	3.64	0.30	3.84	0.29	3.69	0.25	3.53	0.33
総胆汁酸 (nmol/mL)	14.69	11.47	23.98	18.83	21.70	17.05	21.26	18.55	23.24	26.33
T-Bil (mg/dL)	<0.1		<0.1		<0.1	0.00	<0.1		<0.1	
BUN (mg/dL)	18.39	5.83	22.83	7.52	21.24	7.68	22.07	5.29	22.20	7.28
CRE (mg/dL)	0.84	0.20	0.85	0.20	0.94	0.26	0.91	0.23	0.98	0.31
ALP (IU/L)	719.00	1048.25	523.86	810.28	390.71	616.05	409.57	518.11	616.43	964.98
AST (IU/L)	23.57	5.78	25.43	4.56	39.57	29.18	26.57	8.30	26.86	4.70
ALT (IU/L)	38.43	11.85	67.29	39.97	110.14	180.11	66.43	39.23	76.57	54.99
Amy (IU/L)	575.57	170.33	646.14	207.64	679.71	128.10	622.71	164.43	689.43	215.57
Lip (IU/L)	50.71	44.18	55.57	38.67	48.29	36.08	44.86	32.62	62.71	43.79
T-CHO (mg/dL)	280.71	79.57	316.71	95.25	308.57	104.72	235.14	66.21	284.71	94.92
TG(mg/dL)	124.86	67.30	186.14	184.58	263.57	243.90	141.43	122.27	110.86	80.13
Ca (mg/dL)	9.76	0.88	10.16	0.51	10.51	0.45	10.21	0.41	10.11	0.48
IP (mg/dL)	3.63	1.03	4.07	0.96	3.99	0.41	4.13	0.84	4.13	0.87
GLU (mg/dL)	95.00	14.98	95.43	6.95	103.71	9.66	88.14	18.23	95.86	5.54
Na (mEq/L)	145.29	7.42	148.00	1.77	147.71	2.43	146.71	1.67	147.71	2.37
K (mEq/L)	4.39	0.29	4.40	0.27	4.41	0.31	4.56	0.32	4.39	0.29
Cl (mEq/L)	122.86	14.17	129.29	12.61	127.43	13.05	126.14	11.61	128.43	13.15
赤血球 (×10 ⁴ /μl)	640.00	69.17	682.00	77.26	685.71	94.35	656.29	71.75	680.29	85.61
ヘモグロビン (g/dL)	15.07	1.44	16.11	1.68	16.09	2.18	15.63	1.75	15.91	1.78
ヘマトクリット (%)	43.57	5.14	46.77	5.70	46.23	6.78	45.14	5.64	45.84	5.96
白血球 (/μl)	7511.94	4304.10	8632.86	2194.41	8875.71	2272.14	8495.57	2295.56	9618.57	2173.08
血小板 (/μl)	339857	100854	329571	146026	290005	143564	350571	95377	286000	135133

表 3 各時点における CBC、血清生化学検査結果

	試験開始時		100 % PL 給餌開始時		100 % PL 給餌終了時		100 % NC 給餌開始時		100 % NC 給餌終了時	
	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.
ゾニサミド ($\mu\text{g/mL}$)	23.24	6.65	20.89	10.08	19.7	6.78	18.19	11.78	20.89	10.68
総ケトン体 ($\mu\text{mol/L}$)	30.29	22.4	35.29	14.56	37.86	11.29	37.71	14.64	43.86	16.13
アセト酢酸 ($\mu\text{mol/L}$)	6.43	3.81	14.86	15.68	10.41	5.08	14.29	17.19	10.43	4.24
β -ヒドロキシ酪酸 ($\mu\text{mol/L}$)	23.86	18.88	20.66	3.76	22.65	4.24	23.43	6.86	34.14 *	12.08

表 4 各時点における血漿中ゾニサミドとケトン体濃度 β ヒドロキシ酪酸は PL 給餌終了後と比較して NC 給餌終了後に有意に増加していた (P=0.04)。

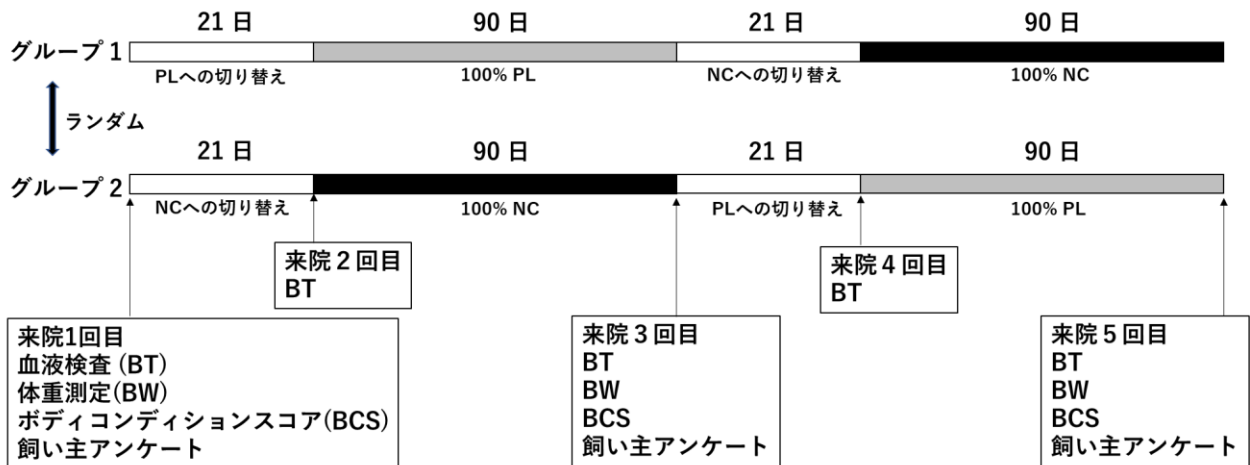


図3 6 か月間にわたる前向き無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験のデザイン。

グループ 1 には 4 頭、グループ 2 には 3 頭が割り振られた。グループ 1 は 4 つの期間から構成されている。最初の 21 日間は日常使用していた食餌から PL への移行期間。続く 90 日は PL のみの給餌期間。3 つ目の期間は NC への移行をするための 21 日間。最後の期間は NC のみを 90 日給餌する期間である。グループ 2 では PL と NC を入れ替えて給餌した。

運動失調							
正常	右へ行くほど重度	歩けないほど重度					
			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%; text-align: center;">Measurement (mm)</td> <td style="width: 20%;"></td> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"></td> <td></td> </tr> </table>	Measurement (mm)			
Measurement (mm)							
鎮静							
正常	右へ行くほど重度	常に寝ている					
			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%; text-align: center;">Measurement (mm)</td> <td style="width: 20%;"></td> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"></td> <td></td> </tr> </table>	Measurement (mm)			
Measurement (mm)							
生活の質							
正常	右へ行くほど重度	安楽死を考えるほど、生活の質が悪い					
			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%; text-align: center;">Measurement (mm)</td> <td style="width: 20%;"></td> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"></td> <td></td> </tr> </table>	Measurement (mm)			
Measurement (mm)							
食欲							
正常	右へ行くほど重度	食事を全く食べない					
			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%; text-align: center;">Measurement (mm)</td> <td style="width: 20%;"></td> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"></td> <td></td> </tr> </table>	Measurement (mm)			
Measurement (mm)							
愛犬名		日付					

図4 VAS スコアの例

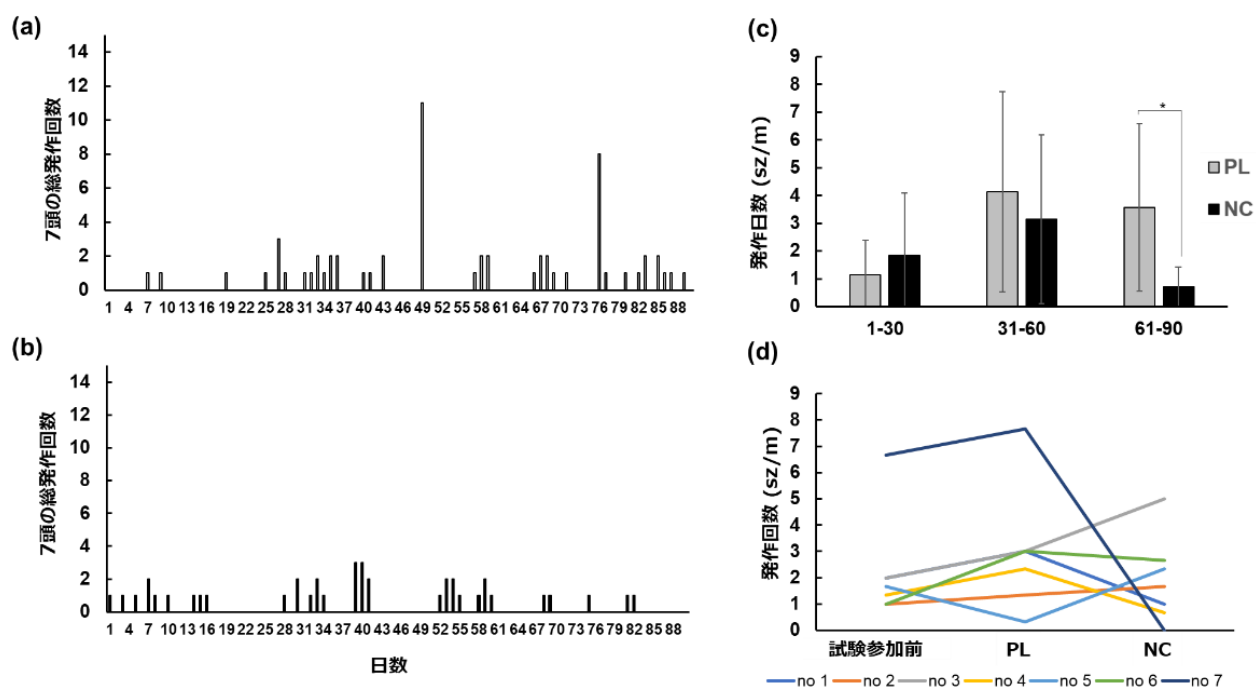


図5 発作頻度における3か月間のPL給餌の効果(a)とNC給餌の効果(b) (N=7). PLとNCの間で最後の1ヶ月にあたる61-90日目では発作頻度に有意な差がみられた (c, $P=0.04$). 給餌試験3か月前、PL、NC使用中の1ヶ月当たりの各犬の発作頻度の変化(d)

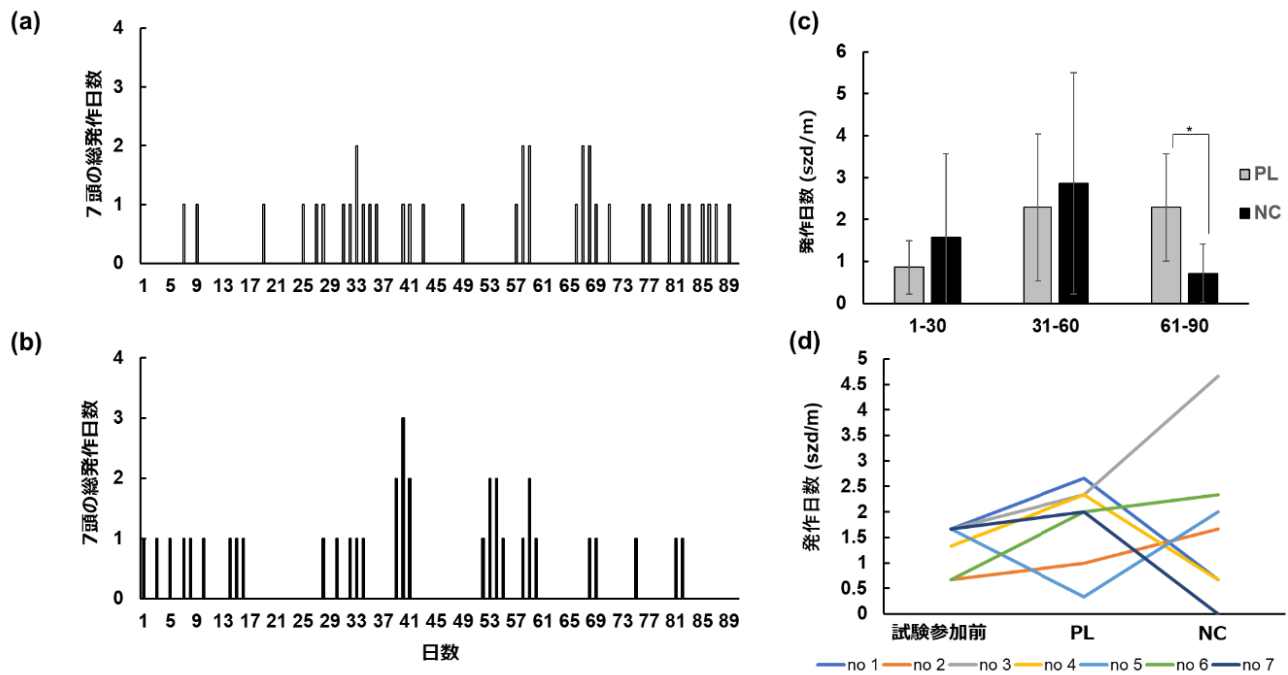


図6 発作日数における3か月間のPL 給餌の効果(a)と NC 給餌の効果(b) (N = 7). PL と NC の間で最後の1ヶ月にあたる61-90日目では発作日数に有意な差がみられた (c, $P=0.04$). 給餌試験3か月前、PL、NC 使用中の1ヶ月当たりの各犬の発作日数の変化(d)

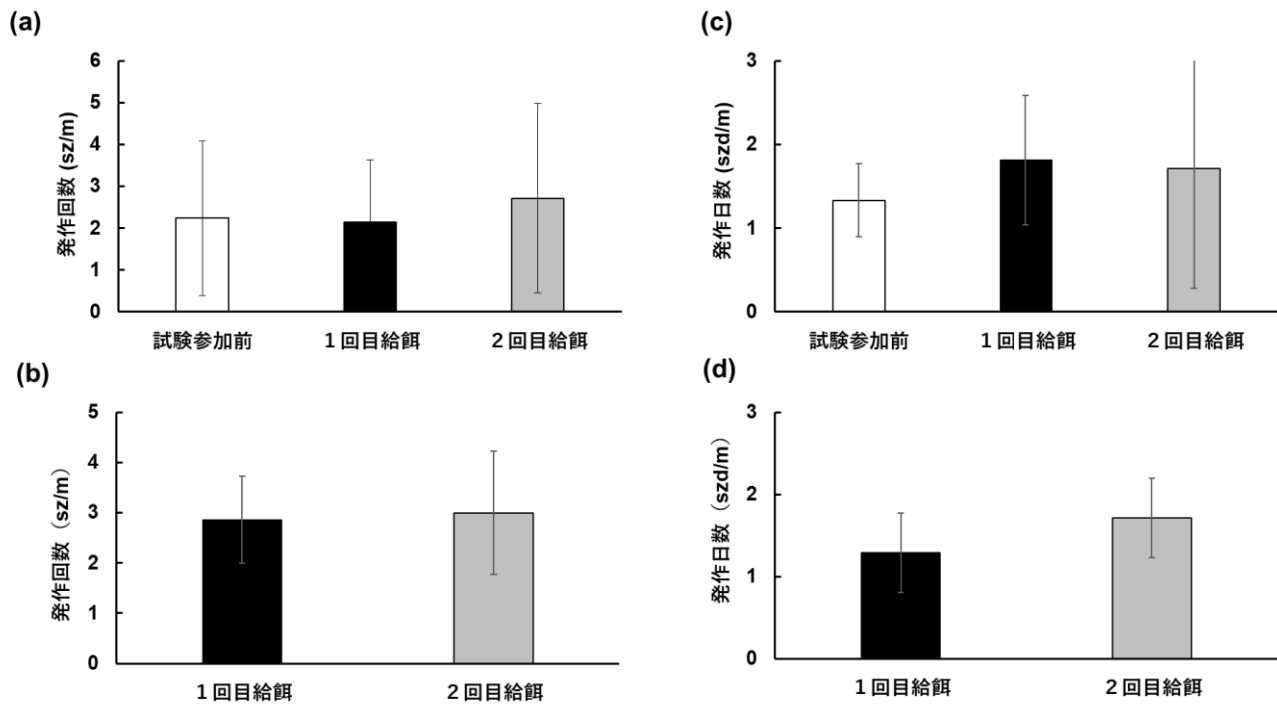


図7 発作頻度に対する90日間の給餌順による影響 (a) と最後の1ヶ月のみの影響 (b)。それぞれ $P=0.61$ 、 0.93 と有意な差は認められなかった。発作日数に対する90日間の給餌順による影響 (c) と最後の1ヶ月のみの影響 (d)。それぞれ $P=0.89$ 、 0.57 と有意な差は認められなかった。

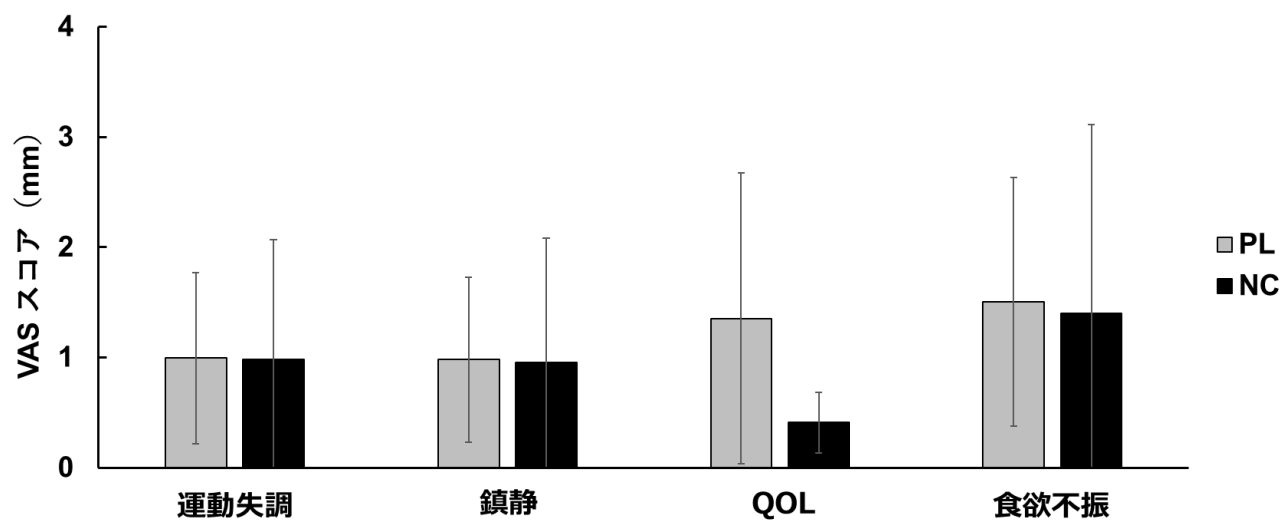


図8 PL 給餌終了時点と NC 給餌終了時点での運動失調、鎮静、QOL、食欲に対する VAS スコア。すべての指標で PL、NC の終了時点間に有意な差はなかったが、QOL では改善傾向が見られた。

第Ⅱ章

MCT 摂取に伴う消化器症状のメカニズムの解明：MCFAs による腸クロム親和性細胞からの 5-HT 放出

1. 緒言

MCTs はてんかん患者にとって発作を抑制する可能性が示唆されている脂肪の一種である。一方で、MCTs は下痢や胃腸の不快感などの消化器症状を引き起こすことも報告されているが、そのメカニズムについては十分に研究されていない(61)。第Ⅰ章において7頭中4頭が MCT 強化食の給餌中に同様の消化器症状を呈した。いずれも重度なものではなく、短期間に収束するものではあったが発生率が参加個体の半数以上と高かったため、その消化器症状の発生メカニズムを明らかにすることは MCT を適正に使用する上で有益である。

人における過敏性腸症候群は下痢や胃腸の不快感を症状として呈する代表的な疾患の一つである(62)。この疾患においてストレスを引き金とした 5-hydroxytryptamine (5-HT) の過剰放出とそれに続く胃腸管平滑筋の蠕動運動の変化が病態として関与することが知られている(63)。また、治療薬として人では 5-HT 受容体の阻害薬であるラモセトロンが実用化されている(64)。犬においても 5-HT 受容体をターゲットとしたオンダンセトロンが実用化されており、吐き気や嘔吐の症状を呈した際に使用されている(65)。

侵害受容体は、刺激性化学物質や環境刺激物質などの侵害刺激による組織障害を防ぎ、動物が生存するために必要な受容体である。TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) は TRP チャンネルの一種であり、化学物質や寒冷を感知するマルチモーダル受容体として機能する(66)。TRPA1 の代表的なアゴニストであるシンナムアルデヒド (CA) は、TRPA1 を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の増加を引き起こす(67)。また、ローヤルゼリーに含まれる脂肪酸の一種によって TRPA1 が活性化し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を引き起こすことが報告されている(68)。これら化合物の作用機序は異なり、脂肪酸はチャンネルの膜貫通セグメントと直接相互作用してゲートを開くと考えられる(69)。一方、HC-030031 や A967079 は代表的な TRPA1 アンタゴニストであり、

TRPA1 アゴニストによるチャネル開口により生じる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制する(70)。TRPA1 はエンテロクロマフィン(EC)細胞に高発現している(71)。RIN14B 細胞株はラット膵臓 δ 細胞由来の EC 細胞のモデルであり、TRPA1 と電位依存性カルシウムチャネルを発現している。RIN14B 細胞は細胞内にセロトニン (5-HT) を含有しており、TRPA1 の刺激に応答して 5-HT を放出する(71)。

そこで本研究では、RIN14B 細胞を用いて MCTs の代謝産物である MCFA が $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こし、5-HT 放出を惹起させるかどうかについて検討した。もし MCFA により 5-HT 放出が生じた場合、これが MCTs による下痢のメカニズムの一つであるかも知れない。

2. 方法

RIN14B 細胞の培養

RIN-14B 細胞は DS Pharma Biomedical Co. Ltd. (大阪, 日本) から購入した。細胞は、10%熱不活性化ウシ胎児血清 (ライフテクノロジーズジャパン, 東京, 日本)、100U/ml ペニシリン (明治製菓ファルマ, 東京, 日本) および 100 μ g/ml ストレプトマイシン (明治製菓ファルマ) を添加した RPMI1640 培地 (富士フィルム和光純薬, 大阪, 日本) を用い、95%空気および 5%CO₂ の湿度の高い環境にて 37°Cで培養した。

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法

本実験で用いたRIN-14B細胞株におけるTRPA1発現を確認するため、ラットTRPA1タンパク質cDNA (GenBank : NM_207608) に対する特異的プライマーを用いたRT-PCRを行った。各プライマーの配列と予想されるPCR産物の長さは、TRPA1 ; 5'-GGAACACAGCACTCCACTT-3' (センス)、5'-CACAGGGTGGTTGAGGAGTT-3' (アンチセンス) で468bp、 β -アクチン (NM007393) ; 5'-GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT-3' (センス)、5'-TGATCCACATCTGCTGGAAG-3' (アンチセンス) で294bpであった。ラット後根神経節およびサブコンフルエントRIN-14B細胞からの全RNAをRNeasy Mini Kit (Qiagen, Bothell, WA) を用いて抽出し、混入したゲ

ノムDNAをDNaseI (Qiagen) により消化した。次いで、ReverTra Ace逆転写酵素

(TOYOBO、東京、日本) を用いて、オリゴ (dT) でプライムした全RNAからcDNAを合成した。反応混合物をTaq DNAポリメラーゼ (プロメガ、東京、日本) を用いてPCR増幅した。

PCR産物は1%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線を照射して可視化した。

[Ca²⁺]_i測定

RIN14B 細胞内の[Ca²⁺]_iは、照明と撮影を制御する蛍光イメージングシステム (Aqua Cosmos, 浜松ホトニクス, 浜松, 日本) を用いて、既報に準じて測定した(72)。簡単に説明すると、RIN14B 細胞をポリ-D-リジンでコートしたカバースリップ上に置いた。カバースリップ上のRIN14B 細胞を 24 時間培養した。10 μM の fura-2-AM (Thermo Fisher Sci, MA, USA) と 0.004 %クレムフォア EL (Sigma-Aldrich, MO, USA) を HEPES 緩衝溶液に溶解し、細胞を 37°C で 40 分間インキュベートすることにより、RIN14B 細胞に fura-2 をロードした。HEPES 緩衝溶液の組成は以下の通りである (mM : 134 NaCl, 6 KCl, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 glucose, 10 HEPES, pH7.4)。細胞内[Ca²⁺]_iを測定するために、RIN14B 細胞に 340nm と 380nm の励起光を照射し、各々の励起光で生じた 510nm の蛍光シグナルの強度を記録し、それらの比(340/380)を求めた。この蛍光から既報に準じて[Ca²⁺]_iを算出した (73)。実験はすべて室温 (22-25°C) で行った。

5-HT 放出量測定

RIN-14B 細胞からの 5-HT 放出は、電気化学検出器を装着した HPLC システム (HTEC-500, HPLC-ECD Eicom Co. 京都、日本) を使用して測定した (74)。サンプルの準備は以下の手順で行った。すなわち、RIN14B 細胞(2.5 × 10⁵) を 24 ウェルプレートに播種し、72 時間培養した。培地を除去後、細胞を洗浄し、阻害剤の添加または非添加の HEPES 緩衝溶液で細胞を 37°C で 20 分間プレインキュベートした。次いで細胞を洗浄し、HEPES 緩衝溶液中で対象となっている

様々な化合物で 37°C、20 分間インキュベーションを行った。その後、サンプル溶液を収集し、遠心分離した。上清を回収し、0.4 N 過塩素酸 (PCA) を含む上清アッセイ溶液 (上清分画) として調製した。プレート上に残った細胞を 0.4 N PCA で抽出し、細胞アッセイ溶液 (細胞分画) として調製した。これらの準備は氷上で行った。サンプル (10 μ l) を HPLC システムに注入し、流速は 0.5 ml/min、電気検出は 0.75 V で実行した。移動相には、17 % メタノール、190 mg/l 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、5 mg/l EDTA2Na、0.1 M 酢酸クエン酸緩衝液の混合液を使用した。5-HT の放出量は 5-HT の総含有量 (細胞分画 + 上清分画) に対する上清分画比で算出した。各試薬の適用は 24well のうち 3well を使用し、且つ少なくとも同様の試験系を 2 回以上行うことで、各試薬の適用は 6well 以上で実施することとした。N の表記は試験系の実施回数を示す。

使用薬物

本研究で使用した薬剤の溶媒、保存濃度は以下のとおりである。Cinnamaldehyde (CA) (dimethyl sulfoxide[DMSO], 1 M) はナカライテクス (東京, 日本) より入手した。HC-030031 (DMSO, 0.1 M)、A967079 (A96) (DMSO 0.01 M) は Sigma-Aldrich より入手した。Decanoic acid (DA) (DMSO, 1M)、Octanoic acid (OA) (DMSO, 1M)、Lauric acid (LA) (DMSO, 2M)、その他一般試薬は富士フィルム和光純薬より入手した。これらの薬物は HEPES 緩衝液で 1000 倍以上に希釈して使用した。0.1 % DMSO を溶媒として使用したが、影響がみられないことを確認した。

統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準誤差、n = 細胞数で示した。対照群との検定では、One-way ANOVA 後、Dunnett 検定を実施した。DA による反応と CA による反応の比較にはピアソン積率相関係数を用いた。P < 0.05 を有意な差とみなした。

3. 結果

RIN14B 細胞における TRPA1 の発現

本実験で用いた RIN-14B 細胞株における TRPA1 の発現を確認するため、サブコンフルエント状態の細胞より cDNA を作成し、ラット TRPA1 とハウスキーピング遺伝子 (β アクチン) に対する RT-PCR を行った。陽性コントロールとして、ラット背根神経節 cDNA を用いた。その結果、RIN-14 細胞には TRPA1 が発現していることが確認された (図 9 A,B) (71)。

MCFA による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応

RIN14B 細胞における MCFA による $[Ca^{2+}]_i$ 増加作用を調べるために、DA、OA、LA を RIN14B 細胞に適用し、蛍光イメージングシステムで測定した。各 MCFA は濃度依存性に $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた (図 10)。 $[Ca^{2+}]_i$ は適用後ピークを示し、その後 MCFA 存在下で持続した。ラウリン酸適用時はデカン酸、オクタン酸適用時と比較して、ピークに到達する時間が遅かった。これらの試薬は 3 mM 以上の濃度では完全に溶解しなかった。そのため、各 50 %有効濃度 (EC50) は調べられなかったが、3 mM での反応の大きさを比較すると、DA > OA > LA の順であった。

上述したように本実験で用いた RIN14B 細胞株には、既報と同様に TRPA1 チャンネルが発現し確認された (68)。一部の脂肪酸には TRPA1 に対する活性作用があることが報告されている。そこで、DA による RIN14B 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に TRPA1 が関与しているか否かを検討するために、DA を TRPA1 作動薬である CA に先立って適用し (図 11A)、DA と続く CA の反応の相関性を調べた (図 11B)。DA と CA の反応の相関性はピアソン積率相関係数により求めた。その結果、両者の反応の大きさに有意な正の相関 ($P < 0.05$) が示された。この結果は、DA により反応した細胞は TRPA1 作動薬によっても活性化することを示し、間接的な証明ではあるものの DA による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応と TRPA1 チャンネルの関係が示唆された。

次に TRPA1 の関与を明らかにするため、TRPA1 阻害剤 (HC、A96) を DA 刺激の前と刺激中に適用し、DA による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応に与える影響を調べた (図 12A-C)。DA による $[Ca^{2+}]_i$ 上

昇は TRPA1 阻害剤により顕著に抑制された (図 12D)。更に DA による反応は細胞外 Ca^{2+} 除去 (0Ca) によっても著しく減少した (図 12D)。これら結果から、DA が RIN14B 細胞に発現している TRPA1 の活性化を介して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を引き起こすことがわかった。

MCFA による 5-HT の放出

DA による TRPA1 活性作用が見出されたため、次に RIN14B 細胞からの 5-HT 放出に対する DA の効果を調べた (図 13)。各データは上清分画の 5-HT に対する上清分画および細胞分画に含まれる 5-HT のパーセンテージで示した。DA 1 mM の適用により著明な RIN14B 細胞からの 5-HT の放出が促された。また、この反応は TRPA1 阻害剤 (HC、A96) および細胞外 Ca^{2+} 除去 (0Ca) で有意に抑制された。

4. 考察

本研究結果は、MCFA が TRPA1 を活性化することを示唆しており、これは過去の報告を支持する (68)。この論文では、ローヤルゼリーに含まれる TRPA1 活性物質を探索し、ローヤルゼリー中に本研究で注目している一部の脂質成分に加えて、ヒドロキシ基修飾された 10-hydroxydecanoic acid (HDAA) が TRPA1 活性を示すことを明らかにしている。TRPA1 に対する多価不飽和脂肪酸 (PUFAs) による活性も報告されており (74)、炭素数の増加と TRPA1 活性の間の相関性も示されている。TRPA1 の活性化を介したエンテロクロマフィン (EC) 細胞からの 5-HT 放出はいくつかの研究で報告されている (71)。過去の研究で、糖代謝の副産物として生じる高反応性のメチルグリオキサールが、RIN14B 細胞に発現している TRPA1 の活性化を介して 5-HT の放出を引き起こすことが示されている (74)。本研究でも MCFA が EC 細胞のモデルと考えられている RIN14B 細胞から 5-HT 放出を引き起こすことを明らかにした。それ故、本研究は MCFA による TRPA1 を介した 5-HT の放出を直接的に示した最初の研究である。我々は RIN14B 細胞に対して 1 mM DA を適用したが、5-HT の放出反応は過去の研究より非常に小さなものであった (70)。これは DA の濃度が低いことによる可能性がある。DA は高濃度では

DMSO に完全に溶解せず、適用可能な濃度は 1 mM 以下であった。そのため、RIN14B 細胞からの 5-HT 放出を調べる実験ではそれ以上の濃度を使用しなかった。

MCTs はてんかんのような一部の疾患では有用な栄養成分となる(27)。しかしながら、MCTs を使用する患者の一部では下痢を呈することがある。浸透圧性の下痢が副反応の原因の主たるものとして考えられている (42)。一般的に、MCTs はてんかんの管理に対しては非常に高濃度で使用されるものであるが、その安全な濃度については十分な検証がなされていない。我々の研究では、1 mM の DA 刺激が TRPA1 を介して RIN14B 細胞からの微量の 5-HT 放出を起こすことを示した。加えて、OA や LA のようなその他の MCFA s も、DA と比べて力価は低いものの、TRPA1 を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした。この結果は MCFA s が 5-HT の放出を介して胃腸の運動性を変化させることを示唆している。したがって、MCFA s を患者に使用する際には、1 mM 以上の濃度の場合に下痢を引き起こす可能性があるため、注意を要する必要がある。しかしながら、本研究は培養細胞を用いた in vitro モデルであり、動物個体を用いた in vivo のモデルでは検証を行っていないため、今後の研究として in vivo モデルや臨床的な患者での追加研究が切望される。

以上の結果から、EC 細胞のモデルである RIN14B 細胞において MCFA s が TRPA1 活性を介して 5-HT 放出を惹起する可能性が示された。それ故、この作用が MCT 摂取で見られた消化器症状の一端を担う可能性が示唆された。

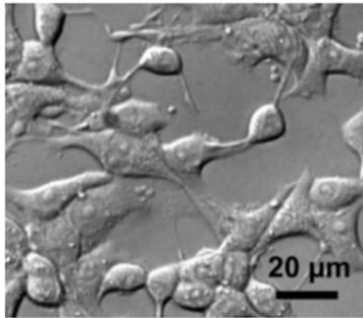
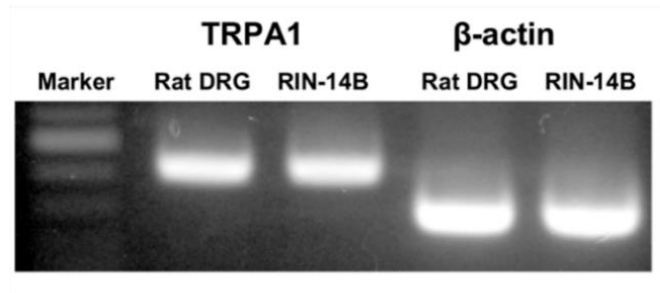
A**B**

図 9 RIN14B 細胞の透過像(A)および、ラット背根神経節 (DRG) を陽性コントロールとした際の、RIN14B 細胞における TRPA1 の発現(B)。ハウスキーピング遺伝子として β -actin を使用した。

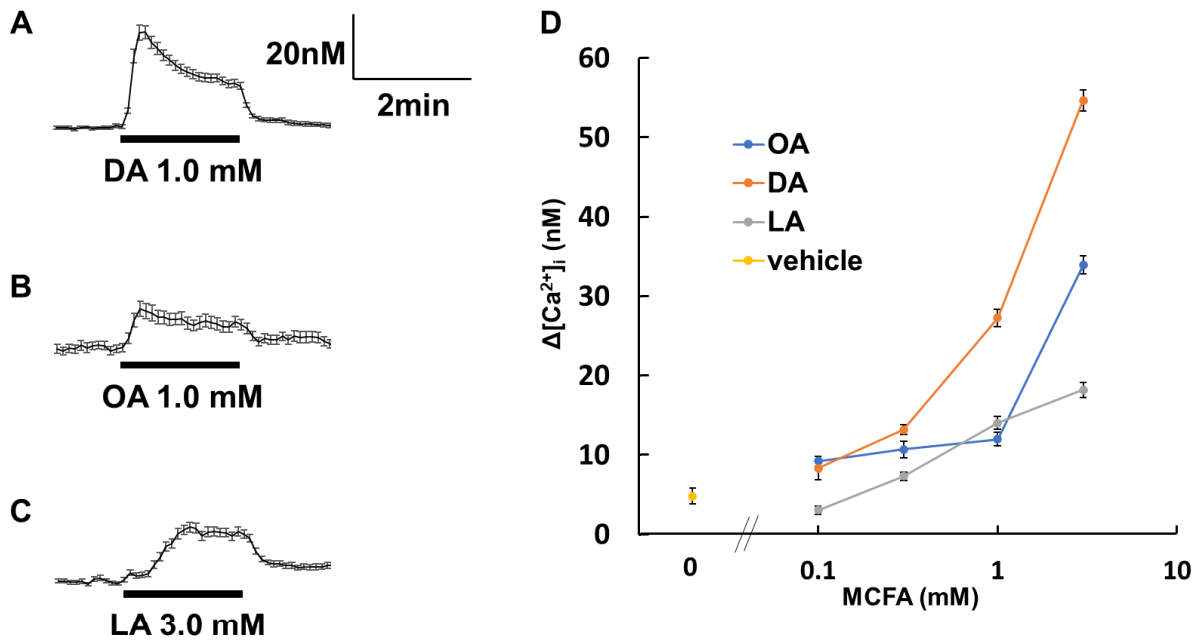


図 10 RIN14B 細胞における MCFA による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応。(A) デカン酸 (DA)、オクタン酸 (OA)、ラウリン酸 (LA) による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応の典型例。各データは同一カバースリップ上の細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。D : MCFA による濃度反応曲線。3 回の実験における結果をまとめた (DA; n=326、OA; n=176、LA; =195)。

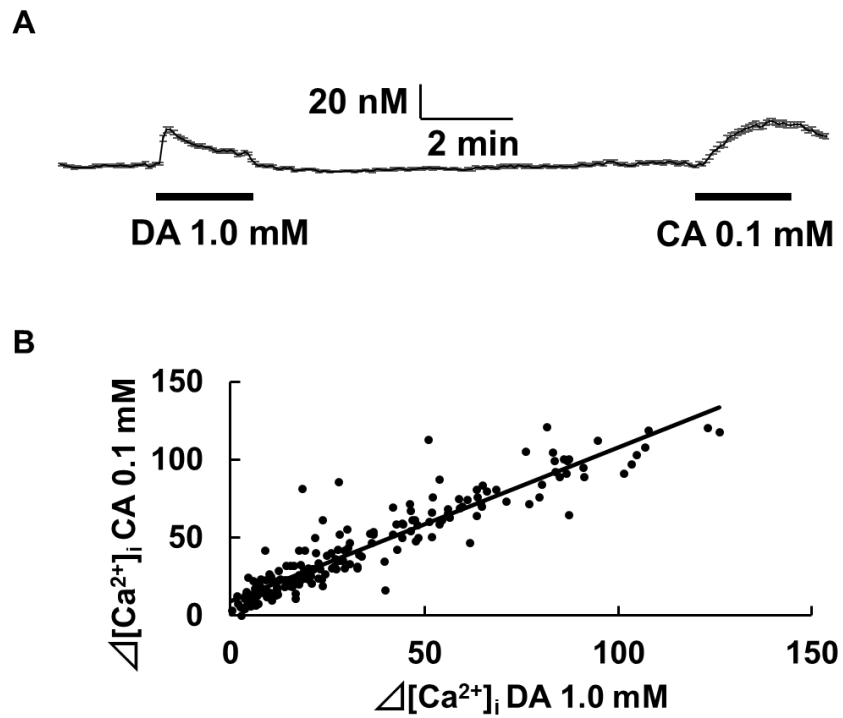


図 11 RIN14B 細胞における DA と CA による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応。(A) RIN14B 細胞に対して DA と CA を適用した際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。(B) DA と CA 適用時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応の相関性。DA に対する反応と CA に対する反応の大きさの間には有意な相関性が認められた ($P < 0.05$)。

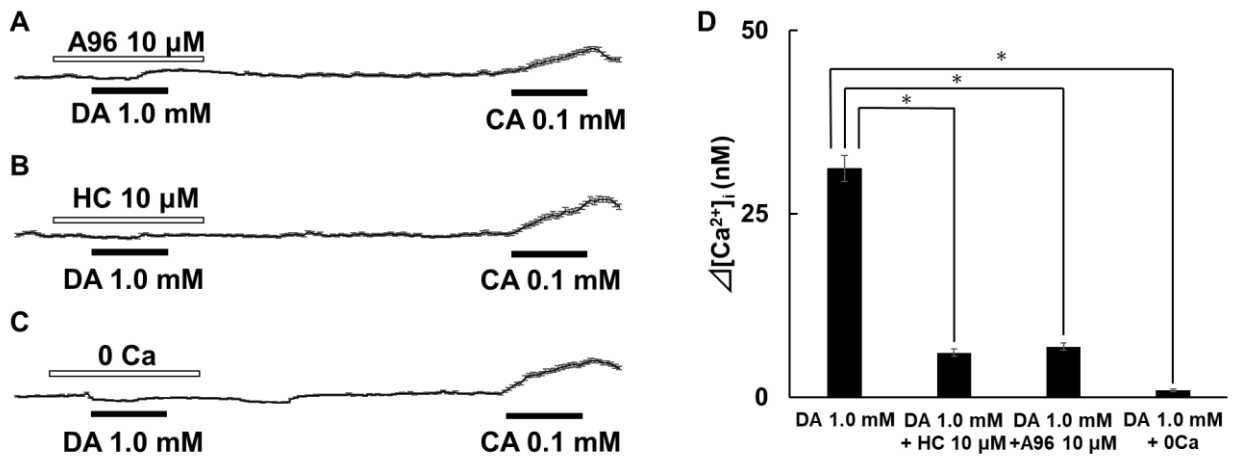


図 12 RIN14B 細胞における DA による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応に対する TRPA1 阻害剤存在下および細胞外 Ca^{2+} 除去 (0Ca) の効果。(A) A967079 (A96)、(B) HC030031 (HC)、(C) 細胞外 Ca^{2+} 除去 (0Ca) を DA 適用中および前後に使用した際の反応。各データは同一カバースリップ上の細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。(D) TRPA1 阻害剤存在下および 0Ca 下での DA 1.0 mM に対する $[Ca^{2+}]_i$ の反応。各データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (N=3). *, $P < 0.05$, one-way ANOVA 後 Dunnett's test.

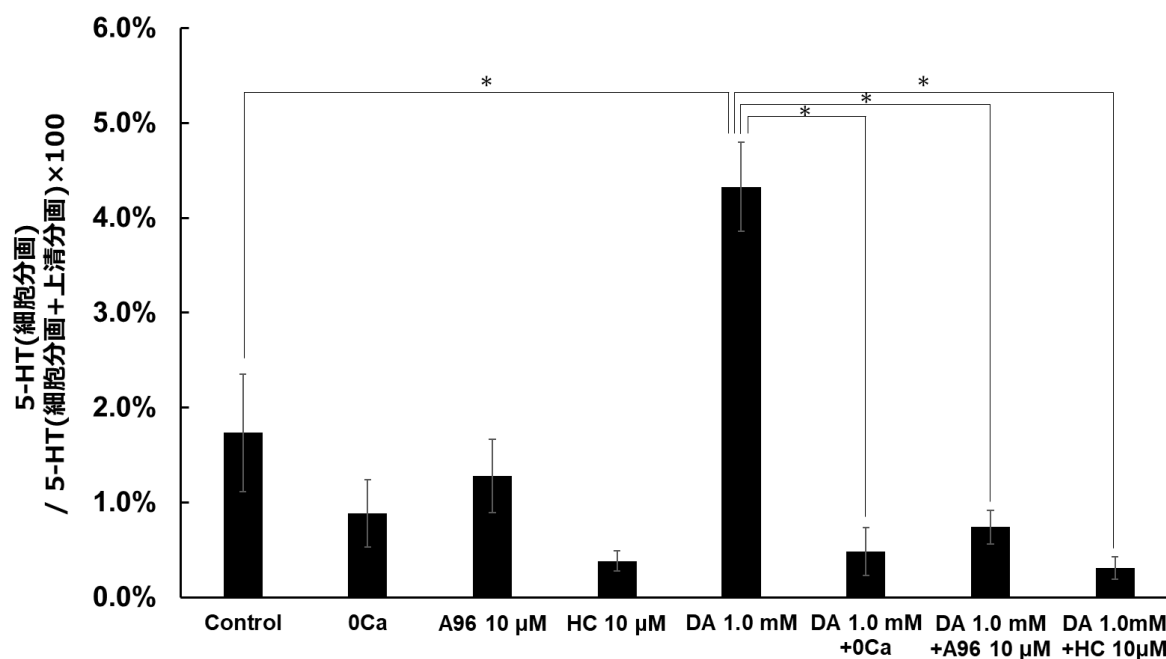


図 13 各溶液中の RIN14B 細胞からの 5-HT の放出に対する DA の効果。DA は 5-HT の放出を惹起し、この反応は TRPA1 阻害剤 (A96、HC) と細胞外 Ca^{2+} 除去 (0Ca) により抑制された。データは平均値 ± 標準誤差で示す (N=2)。*, $P < 0.05$ 、one-way ANOVA 後 Turkey-Kramer test。

総合考察

本研究により、ゾニサミドに抵抗性を示す特発性てんかん犬に対する MCT 強化食の有効性と安全性が確認された。ただし、約半数の犬で MCT 強化食給餌中に消化器症状が呈したことから、この点は MCT 強化食を使用する場合、食餌変更前に飼い主に伝えておくべきことと言える。また、有意な効果が発現したのが給餌期間 3 ヶ月間の内の最後の 1 ヶ月のみであったことから、MCT を使用する際には長期にわたる使用をすべき旨も事前にインフォームすべきと考えられる。MCT 給餌初期に抗発作作用を示さなかった理由は明らかではないが、MCT 以外の抗発作作用を示す油脂成分としてオメガ3脂肪酸が知られている (76)。オメガ3脂肪酸の一種である DHA は給餌開始初期には効果が発現しない一方で、使用開始 2-3 ヶ月後から効果が発現することが報告されている (76)。DHA はまず低密度リポタンパク質プールに捕捉され、低密度リポタンパク質プールが飽和した後に遊離型の DHA が全身に放出される (77)。このことが、作用発現が遅い理由の一つとして考えられている。本試験では、NC への切り替えが完了した 21 日目には β ヒドロキシ酪酸の血中濃度の上昇は見られなかった (表 4) が、90 日間の NC 給餌後には有意な上昇を示していた。このことから、MCT の代謝及び体内動態が遅発性の抗発作作用に関連している可能性がある。

In vitro の研究では、グルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体に対する MCFA の阻害効果が濃度依存性に高まることが過去に報告されている (30)。そのため、AMPA 受容体に対する阻害効果が MCT の主作用であれば、本試験で使用された 6.5 % の MCT より高濃度に給餌することでより強い高発作作用が期待できる。過去には認知機能不全症候群の犬を対象に、MCT を段階的に強化した食餌の認知機能改善効果が過去に報告されている (78)。この研究では MCT の配合比率を 9.0% にすると摂食拒否が一部の犬で起こることが報告されている。本研究の 6.5 % の配合比率では VAS スコアで食欲に有意な影響が見られなかったが、6.5 % を超える濃度で給餌する際には、食欲に対する影響が起こる可能性もインフォームすべき内容と言える。

DA 1 mM を RIN14B 細胞に適用することで TRPA1 を介した 5-HT の放出が起こることが確認されたが、この濃度は今回の給餌試験で給餌した量と比較して非常に低濃度であった。そのこ

とから、今回の MCT を 6.5%含む食餌の給餌が TRPA1 を介した 5-HT の放出を惹起し、消化器症状につながった可能性は十分にある。TRPA1 を介した 5-HT 放出の一連のメカニズムは過去に報告されていないため、臨床的にも検証はされていないが、消化器症状の発現を抑えるために 5-HT 阻害薬の併用が有効である可能性がある。実際に、人では 5-HT の過剰放出が関与するとされる過敏性腸症候群において 5-HT 阻害剤が実用化もされている (64)。また、人では MCT による下痢の発現は非常に個人差が大きいことも知られており、1 g/kg (BW) の摂取で発現することもある (28)。MCT による消化器症状のメカニズムとして TRPA1 を介した 5-HT の放出だけでなく、腸内細菌叢の変動 (41) や浸透圧性下痢 (42) といった複数のメカニズムが関連することが個人差の原因であるかもしれない。

自然界に存在する MCT はグリセリンに対して 3 個の MCFA が結合した様式を取る。この MCFA は DA、OA、LA が混在したものとなっており、いずれかが極端に高いものではない。しかしながら、工業的には自然界に存在しないレベルの高濃度 MCFA を入手することも可能である。また、グリセリンと MCFA をエステル化することで再度 MCT を合成することも可能である (79)。過去の報告で、DA の抗発作作用に対する力価は OA の約 10 倍高いことが示されている (30)。そのため、DA を MCFA の主たる成分とする MCT を合成し、食餌に添加することで抗発作作用の最大化が期待できる。一方で、カルシウムイメージングを用いた本研究から、DA は TRPA1 に対する活性が最も高く、TRPA1 を介した 5-HT の放出による消化器症状の発現の可能性も最も高い。よって、DA を主たる MCFA とした合成 MCT を使用する際には、より一層の消化器症状への注意が必要になると考えられる。

抗発作薬を用いた治療はファーストラインで十分な反応が得られない場合、セカンドラインを追加しても有効性を示さないケースが多く、サードラインにはほとんど反応を示さないことが知られている (17)。フェノバルビタールに反応をしない特発性てんかんの犬に対してセカンドラインとして臭化カリウム、サードラインとしてレベチラセタムなどを使用した際の有効率が報告されているが、セカンドライン追加時に新たに有効性を示した患者は全体の約 11%、サードライン追加時には約 6%だったと報告されている (17)。本研究ではゾニサミド抵抗性の特発性てんか

ん犬に対して MCT 強化食の給餌を行ったが、その有効率は約 42%と非常に高いものであった。ゾニサミドに抵抗性を示す特発性てんかん犬に対する治療選択肢を広げる意味で、本研究は大きな意義があると考えられる。また、犬におけるてんかんの 70%は特発性てんかんだが、残る 30%は構造的てんかんである (80)。構造的てんかんは原因が多岐にわたるが、発作のコントロールのために特発性てんかんと同様に抗発作薬を用いた治療が一般的に行われる。原因が多岐にわたるが故に抗発作薬を用いた有効率はこれまでのところ報告されていないが、特発性てんかんを対象に行った本研究で高い治療成績が確認されたことから、構造的てんかんに対しても MCT を応用できる可能性がある。

結論

本試験は、ファーストラインとしてゾニサミドを用いた特発性てんかんの犬に対する MCTs 強化食 (NC) の効果を明らかにした初めての試験である。90 日間の給餌期間の内、最後の 30 日では有意に発作頻度ならびに発作日数が減少し、副作用も軽度であったことからゾニサミド抵抗性の特発性てんかんの犬に対する安全な治療選択肢となることが明らかになった。更に、一部の MCT 強化食を給餌された犬において見られた消化器症状の原因を調べるため EC 細胞モデルを用いた 5-HT 放出の有無を調べた結果、MCFA は EC 細胞に発現している TRPA1 の活性化を介して 5-HT 放出を引き起こすことが明らかになった。それ故、この作用が MCTs 摂取に伴う下痢発症メカニズムの一つであると考えられた。したがって、MCTs を患者に使用する際には、消化器症状にも注意を払う必要があると思われる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教官として終始多大なご指導を賜った、鳥取大学大学院共同獣医研究科教授 太田 利男先生に深謝致します。並びに同研究科准教授 高橋 賢次先生には、本論文の作成にあたり、副査として適切なご助言を賜りました。

また、論文審査にあたり、副査として適切なご助言を頂きました岐阜大学大学院共同獣医学研究科教授 海野 年弘先生、並びに同研究科教授 椎名 貴彦先生、並びに鳥取大学大学院共同獣医研究科教授 割田 克彦先生に深謝致します。日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科教授 長谷川大輔先生には本論文の作成にあたり、適切なご助言を賜りました。ここに深謝の意を表します。本研究に賛同し、ご参加頂いたすべての飼い主、動物病院に感謝いたします。

参考文献

1. Preston SM, Shihab N, Volk HA. (2013) Public perception of epilepsy in dogs is more favorable than in humans. *Epi and Behav* 27:243–246.
2. March PA. (1998) Seizures: classification, etiologies, and pathophysiology. *Clin Tech Small Anim Pract* 13:119–131.
3. Hülsmeier VI, Fischer A, Mandigers PJJ, DeRisio L, Berendt M, Rusbridge C, Bhatti SFM, Pakozdy A, Patterson EE, Platt S, Packer RMA, Volk HA. (2015) International veterinary epilepsy Task force's current understanding of idiopathic epilepsy of genetic or suspected genetic origin in purebred dogs. *BMC Vet Res* 11:175.
4. Seppälä EH, Jokinen TS, Fukata M, Fukata Y, Webster MT, Karlsson EK, Kilpinen SK, Steffen F, Dietschi E, Leeb T, Eklund R, Zhao X, Rilstone JJ, Toh KL, Minassian BA, Lohi H. (2011) LGI truncation causes a remitting focal epilepsy in dogs. *PLoS Genet* 7: e1002194.
5. Seppälä EH, Koskinen LLE, Gullov CH, Jokinen P, Mortensen PK, Bergamasco L, Körberg IB, Cizinauskas S, Oberbauer AM, Berendt M, Fredholm M, Lohi H. (2012) Identification of a novel idiopathic epilepsy locus in Belgian Shepherd dogs. *PLoS One* 7: e33549.
6. Wielaender F, Sarviaho R, James F, Hytönen MK, Cortez MA, Kluger G, Koskinen LLE, Arumilli M, Kornberg M, Noethen AB, Tipold A, Rentmeister K, Bhatti SFM, Hülsmeier V, Boettcher IC, Tästensen C, Flegel T, Dietschi E, Leeb T, Matiassek K, Fischer A, Lohi H. (2017) Generalized myoclonic epilepsy with photosensitivity in juvenile dogs caused by a defective DIRAS family GTPase 1. *PNAS* 114: 2669—2674.
7. Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, Shigemoto R, Nicoll RA, Fukata M. (2010) Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:3799–3804.
8. Hasegawa D. (2022) 犬猫のてんかん. *日医大医会誌* 18:4.
9. Podell M, Volk HA, Berendt M, Löscher W, Muñana K, Patterson EE, Platt SR. (2016) 2015

- ACVIM small animal consensus statement on seizure management in dogs. *J Vet Intern Med* 30: 477–490.
10. Mizuno S, Asada R, Hasegawa D. (2020) Questionnaire survey on the usage of antiseizure drugs for dogs and cats in Japanese veterinary hospitals. *Vet Med Sci* 2022:1–6,
 11. Bhatti SFM, Risio LD, Munana K, Penderis J, Stein VM, Tipold A, Berendt M, Farquhar RG, Fischer A, Long S, Loescher W, Mandigers PJJ, Matiassek K, Pakozdy A, Patterson EE, Platt S, Podell M, Potschka H, Rusbridge C, Volk HA. (2015) International veterinary epilepsy task force consensus proposal: medical treatment of canine epilepsy in Europe. *BMC Vet Res* 11:176,
 12. Smith TK, Cameron S, Trepanier LA. (2022) Incidence of hepatopathies in dogs administered zonisamide orally: A retrospective study of 384 cases. *J Vet Intern Med* 36:576-579.
 13. Leppik IE. (2004) Zonisamide: chemistry, mechanism of action, and pharmacokinetics. *Seizure* 13: 5–9.
 14. Risio LD, Platt S. (2014) Canine and feline epilepsy. *Diagnosis and Management*. Cab Intl 347–475.
 15. Fischer A, Jurina K, Potschka H, Rentmeister K, Tipold A, Volk HA. (2013) Idiopathische epilepsie bij de hond. *Hoofdstuk 4*: 69–115.
 16. Kwan P, Brodie MJ. (2000) Early identification of refractory epilepsy. *The New Eng J of Med* 342:314–319.
 17. Packer RMA, Shihab NK, Torres BBJ, Volk HA. (2015) Responses to successive anti-epileptic drugs in canine idiopathic epilepsy. *Vet Rec* 176(8):203.
 18. Ryvlin P, Cross JH, Rheims S. (2014) Epilepsy surgery in children and adults. *Lancet Neurol*. 13:1114–1126.
 19. Benbadis SR, Geller E, Ryvlin P, Wheless J, Doyle W, Vale FL. (2018) Putting it all together:

- options for intractable epilepsy. *Epilepsy Behav* 88:33–38.
20. Oliver JEJ. (1965) Surgical relief of epileptiform seizures in the dog. *Vet Med Small Anim Clin* 60:367–368.
21. Shihab N, Summers BA, Benigni L, Mcevoy AW, Volk HA. (2014) Novel approach to temporal lobectomy for removal of a cavernous hemangioma in a dog. *Vet Surg* 43:877–881.
22. Parker AJ, Cunningham JG. (1971) Successful surgical removal of an epileptogenic focus in a dog. *J Small Anim Pract* 12:513–521.
23. Hasegawa D, Asada R, Hamamoto Y, Yu Y, Kuwabara T, Mizoguchi S, Chambers JK, Uchida K. (2021) Focal cortical resection and hippocampectomy in a cat with drug-resistant epilepsy. *Front Vet Sci* 8:719455.
24. Asada R, Mizuno S, Yu Y, Hamamoto Y, Anazawa T, Ito D, Kitagawa M, Hasegawa D. (2021) Corpus callosotomy in 3 cavalier king charles spaniel dogs with drug-resistant epilepsy. *Brain Sci* 11(11): 1462.
25. Hirashima J, Saito M, Igarashi H, Takagi H, Hasegawa D. (2021) Case Report: 1-year follow-up of vagus nerve stimulation in a dog with drug-resistant epilepsy. *Front Vet Sci* 8:708407.
26. Patterson E. (2005) Results of a ketogenic food trial for dogs with idiopathic epilepsy. *ACVIM*
27. Law TH, Davies ESS, Pan Y, Zanghi B, Want E, Volk HA. (2015) A randomised trial of a medium-chain TAG diet as treatment for dogs with idiopathic epilepsy. *Br J Nutr* 114(9):1438-1447.
28. Lin TY, Liu HW, Hung TM. (2021) The ketogenic effect of Medium-chain triglycerides. *Front Nutr* 8: 747284.
29. Mizuno S, Asada R, Hasegawa D. (2022) Questionnaire survey on the usage of antiseizure drugs for dogs and cats in Japanese veterinary hospitals 2020. *Vet Med Sci* 8:1466-1471.
30. Chang P, Augustin K, Boddum K, Williams S, Sun M, Terschak JA, Hardege JD, Chen PE, Walker MC, Williams RSB. (2015) Seizure control by decanoic acid through direct AMPA

- receptor inhibition. *Brain* 25:1-13.
31. Caliari S, Benini L, Sembenini C, Gregori B, Carnielli V, Vantini I. (1996) Medium-chain triglyceride absorption in patients with pancreatic insufficiency. *Scand J Gastroenterol* 31:90-94.
 32. Yoshimura Y. (2018) Sarcopenia updates in concept, diagnosis, and treatment: could medium chain triglycerides be a treatment candidate for sarcopenia? *Jap Oil Chem Soc* 18:8.
 33. Rial SA, AJ Carignan, Bergeron KF, Mounier C. (2020) A high-fat diet enriched in medium chain triglycerides triggers hepatic thermogenesis and improves metabolic health in lean and obese mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 1865:158582.
 34. Wang Y, Liu Z, Han Y, Xu J, Huang W, Li Z. (2018) Medium Chain Triglycerides enhances exercise endurance through the increased mitochondrial biogenesis and metabolism. *PLoS One* 13: e0191182.
 35. Japan Veterinary Medical Association (2013) Challenges and Responses to the Appropriate Use of Therapeutic Diets. <http://nichiju.lin.gr.jp/report/bukai/h25-ryouhousyoku.pdf>
 36. Purina Proplan Veterinary diets product guide (2019) https://nestle.jp/brand/purina/proplan_veterinarydiets/product/dog/nc-neurocare.
 37. Berendt M, Farquhar RG, Mandigers PJ, Pakozdy A, Bhatti SFM, Risio LD, Fischer A, Long S, Matiassek K, Muñana K, Patterson EE, Penderis J, Platt S, Podell M, Potschka H, Pumarola MB, Rusbridge C, Stein VM, Tipold A, Volk HA. (2015) International veterinary epilepsy task force consensus report of epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC Vet Res* 11:182.
 38. Ligout S, Si X, Vlaeminck H, Lyn S. (2020) Cats reorganize their feeding behaviours when moving from ad libitum to restricted feeding. *J Feline Med Surg* 22(10):953-958.
 39. Berk BA, Law TH, Packer RMA, Wessmann A, Nöthen AB, Jokinen TS, Knebel A, Tipold A, Pelligand L, Meads Z, Volk HA. (2020) A multicenter randomized controlled trial of medium-

- chain triglyceride dietary supplementation on epilepsy in dogs. *J Vet Intern Med* 34:1248–1259.
40. Pilla R, Law TH, Pan Y, Zanghi BM, Li Q, Want EJ, Lidbury JA, Steiner JM, Suchodolski JS, Volk HA. (2020) The effects of a ketogenic medium-chain triglyceride diet on the feces in dogs with idiopathic epilepsy. *Front Vet Sci* 22:7:541547.
41. Omori M, Maeda S, Igarashi H, Ohno K, Sakai K, Yonezawa T, Horigome A, Odamaki T, Matsuki N. (2017) Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *J Vet Med Sci* 17;79(11):1840-1847.
42. Silva PD, MP Dias, Virella D, Moreira AC, Serelha M. (2008) Osmolality of preterm formulas supplemented with nonprotein energy supplements. *Eur J Clin Nutr* 62:274–278.
43. Vu MK, Verkijk M, Muller ES, Biemond I, Lamers CB, Masclee AA. (1999) Medium chain triglycerides activate distal but not proximal gut hormones. *Clin Nutr* 18(6):359-63
44. Li J, Wang Y, Tang L, Villiers W, Cohen D, Woodward J, Finkelman FD, Eckhardt E. (2013) Dietary medium-chain triglycerides promote oral allergic sensitization and orally induced anaphylaxis to peanut protein in mice. *J Allergy Clin Immunol* 131:442–50
45. Verlinden A, Hesta M, Millet S, J Janssens GP. (2006) Food allergy in dogs and cats: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46(3):259-73
46. Ishii K, Kono H, Hosomura N, Tsuchiya M, Ohgiku N, Tanaka N, Fujii H. (2009) Medium-chain triglycerides enhance mucous secretion and cell proliferation in the rat. *J Gastroenterol* 44(3):204-11
47. Molina J, Philippe CJ, Conboy L, Añor S, Fuente CDL, Wrzosek MA, Spycher A, Luchsinger E, Riggensbach BW, Montoliu P, Gandini G, Menchetti M, Ribeiro JC, Varejão A, Ferreira A, Zanghi B, Volk HA. (2020) Efficacy of medium chain triglyceride oil dietary supplementation in reducing seizure frequency in dogs with idiopathic epilepsy without cluster seizures: a non-blinded, prospective clinical trial. *Vet Rec* 187:356.

48. Pierre VS, Vandenberghe C, Lowry CM, Fortier M, Castellano CA, Wagner R, Cunnane SC. (2019) Plasma ketone and medium chain fatty acid response in humans consuming different medium chain triglycerides during a metabolic study day. *Front Nutr* 6:46.
49. Benedek K, Juhász C, Chugani DC, Muzik O, Chugani HT. (2006) Longitudinal changes in cortical glucose hypometabolism in children with intractable epilepsy. *J Child Neurol* 21:26–31.
50. Portnow V, Okun T. (2013) History of cerebral PET scanning: from physiology to cutting-edge technology. *Neurol* 80:952–956.
51. Lee EM, Park GY, Im KC, Kim ST, Woo CW, Chung JH, Kim KS, Kim JS, Shon YM, Kim YI, Kang JK. (2012) Changes in glucose metabolism and metabolites during the epileptogenic process in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia* 53:860–869.
52. Viitmaa R, Solin MH, Snellman M, Cizinauskas S, Orro T, Kuusela E, Johansson J, Viljanen T, TS Jokinen, Bergamasco L, Metsähonkala L. (2014) Cerebral glucose utilization measured with high resolution positron emission tomography in epileptic Finnish Spitz dogs and healthy dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 55:453–461.
53. McDonald TS, Carrasco-Pozo C, Hodson MP, Borges K. (2017) Alterations in cytosolic and mitochondrial [U-(13)C]glucose metabolism in a chronic epilepsy mouse model. *eNeuro* 4:1–11.
54. Durie D, McDonald TS, Borges K. (2018) The effect of dichloroacetate in mouse models of epilepsy. *Epilepsy Res* 145:77–81.
55. Hanada T. (2014) The discovery and development of perampanel for the treatment of epilepsy. *Expert Opin Drug Discov* 9:449–458.
56. Rogawski MA. (2013) AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy. *Acta Neurol Scand Suppl* 197:9–18.
57. Rogawski MA, Hanada T. (2013) Preclinical pharmacology of perampanel, a selective non-

- competitive AMPA receptor antagonist. *Acta Neurol Scand Suppl* 197:19–24.
58. Russmann V, Salvamoser JD, Rettenbeck ML, Komori T, Potschka H. (2016) Synergism of perampanel and zonisamide in the rat amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 57:638–647.
 59. Spitznagel MB, Jacobson DM, Cox MD, Carlson MD. (2017) Caregiver burden in owners of a sick companion animal: a cross-sectional observational study. *Vet Rec* 181:321.
 60. Risio LD, Freeman J, Shea A. (2016) Evaluation of quality of life of carers of Italian spinoni with idiopathic epilepsy. *Vet Rec Open* 3: e000174.
 61. Sills MA, Forsythe WI, Haidukewych D, Macdonald A, Robinson M. (1986) The medium chain triglyceride diet and intractable epilepsy. *A of dis in child.* 61, 1168-1172.
 62. Spiller R, Lam C. (2011) The shifting interface between IBS and IBD. *Curr Opin Pharmacol* 11(6):586-592.
 63. Qin HY, Cheng CW, Tang XD, Bian ZX. (2014) Impact of psychological stress on irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 20(39): 14126–14131.
 64. Fukudo S, Kinoshita Y, Okumura T, Ida M, Akiho H, Nakashima Y, Nishida A, Haruma K. (2016) Ramosetron reduces symptoms of irritable bowel syndrome with diarrhea and improves quality of life in women. *Gastroenterology* 150(2):358-366.
 65. Henze L, Foth S, Meller S, Twele F, Charalambous M, Kenward H, Elliott J, Pelligand L, Volk HA. (2022) Ondansetron in dogs with nausea associated with vestibular disease: A double-blinded, randomized placebo-controlled crossover study. *J Vet Intern Med* 36(5):1726-1732.
 66. Bandell M, Macpherson LJ, Patapoutian A. (2007) From chills to chilis. Mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Cur Opin Neurobiol* 17, 490–497.
 67. Saito S, Nakatsuka K, Takahashi K, Fukuta N, Imagawa T, Ohta T, Tominaga M. (2012) Analysis of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates

- both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates. *J Biol Chem* 287, 36;30743–30754.
68. Terada Y, Narukawa M, Watanabe T. (2011) Specific hydroxy fatty acids in royal jelly activate TRPA1. *J Agric Food Chem* 23;59:2627-2635.
 69. Dong X, Kashio M, Peng G, Wang X, Tominaga M, Kadowaki T. (2016) Isoform-specific modulation of the chemical sensitivity of conserved TRPA1 channel in the major honeybee ectoparasitic mite, *Tropilaelaps mercedesae*. *Royal Soci* 6;6.
 70. Nakatsuka K, Gupta R, Saito S, Banzawa N, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. (2013) Identification of molecular determinants for a potent mammalian TRPA1 antagonist by utilizing species differences. *J Mol Neurosci* 51;754–762.
 71. Nozawa K, Shoda EK, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, Sano Y, Inamura K, Matsushime H, Koizumi T, Yokoyama T, Ito H. (2009) TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *PNAS USA* 106, 3408-3413.
 72. Ohkita M, Saito S, Imagawa T, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. (2012) Molecular cloning and functional characterization of *Xenopus tropicalis* frog transient receptor potential vanilloid 1 reveal its functional evolution for heat, acid, and capsaicin sensitivities in terrestrial vertebrates. *J Biol Chem* 287, 2388–2397.
 73. Yamamoto A, Takahashi K, Saito S, Tominaga M, Ohta T. (2016) Two different avian cold-sensitive sensory neurons: Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-dependent and -independent activation mechanisms. *Neuropharmacol* 111:130-141.
 74. Suzawa S, Takahashi K, Shimada T, Ohta T. (2016) Carbonyl stress-induced 5-hydroxytryptamine secretion from RIN-14B, rat pancreatic islet tumor cells, via the activation of transient receptor potential ankyrin 1. *Brain Res Bulle* 125:181–186.
 75. Motter AL, Ahern GP. (2012) TRPA1 is a polyunsaturated fatty acid sensor in mammals. *PLoS ONE* 7: e38439.

76. Yonezawa T, Marasigan CNBB, Matsumiya Y, Maeda S, Motegi T, Momoi Y. (2023) Effects of high-dose docosahexaenoic acid supplementation as an add-on therapy for canine idiopathic epilepsy: A pilot study. *Open Vet J*13(7): 942–947.
77. Taha A.Y, Burnham W.M, Auvin S. (2010) Polyunsaturated fatty acids and epilepsy. *Epilepsia*. 51(8):1348–1358.
78. Pan Y, Landsberg G, Mougeot I, Kelly S, Xu H, Bhatnagar S, Gardner CL, Milgram NW. (2018) Efficacy of a therapeutic diet on dogs with signs of cognitive dysfunction syndrome (CDS): a prospective double blinded placebo controlled clinical study. *Front Nutr* 12:5:127.
79. Jadhav H, Annapure U. (2021) Greener route for intensified synthesis of Tricaprylin using Amberlyst. *J Chem Sci*.133:1.
80. Hamamoto Y, Hasegawa D, Mizoguchi S, Yu Y, Wada M, Kuwabara T, Igarashi AF, Fujita M. (2016) Retrospective epidemiological study of canine epilepsy in Japan using the International Veterinary Epilepsy Task Force classification 2015 (2003-2013) : etiological distribution, risk factors, survival time, and lifespan. *BMC Vet Res* 12:248.