

博士論文

犬の筋疾患の診断および病態解明に関する研究

志賀 崇徳

目次

緒論	1
第1章 犬のホルマリン固定骨格筋組織の免疫組織化学的解析法の確立	
序論	7
材料と方法	9
結果	13
考察	15
要約	17
図表	18
第2章 犬の筋疾患における針筋電図所見と筋病理所見との関連	
序論	22
材料と方法	24
結果	27
考察	30
要約	33
図表	34
第3章 電気生理学的および病理組織学的解析に基づく犬の筋原性筋疾患の 診断および病態解明	
序論	41
材料と方法	44
結果	48
考察	53
要約	57
図表	58
総括	75
謝辞	82
参考文献	83

緒 論

筋疾患は、筋自体に一次的な原因が存在する筋原性筋疾患と、筋を支配する神経系の異常により、二次的に筋が傷害される神経原性筋疾患に大別される（表 0-1）^{1,2}。筋原性筋疾患と神経原性筋疾患は、それぞれ病態発生機序と治療法が大きく異なるため、これらを鑑別することがきわめて重要である。筋原性筋疾患では近位筋や顔面筋が侵され、神経原性筋疾患では遠位筋が侵される傾向にあるが、遠位筋が選択的に侵される遠位型ミオパチーや全身での筋力低下が見られる脊髄性筋萎縮症など例外的な疾患も多い³。正確な疾患鑑別には様々な臨床検査が必要であるが、以下に述べる針筋電図検査と筋病理検査が特に重要である。

針筋電図検査は、臨床的に筋力低下や筋萎縮が明らかでない初期段階でも、骨格筋の機能異常を検出することができる有用な検査法である⁴。針筋電図検査を行う目的は、骨格筋の活動性異常と慢性異常の判別や病変分布の確認、筋原性と神経原性の鑑別など多岐に渡り、医学領域では、針筋電図検査と神経伝導検査、神経筋接合部検査などをあわせて病態を評価する電気生理学的診断法が確立されている^{5,6}。ヒトの針筋電図検査では、まず刺入時・安静時の自発電位を観察し、次に患者の随意収縮下で運動単位電位を観察し、さらに随意収縮を徐々に強めて運動単位電位の動員と干渉パターンを観察する⁵。なかでも、強い随意収縮による動員と干渉を観察することが筋原性と神経原性の鑑別に最も重要である。代表的な所見として、筋原性筋疾患では低振幅の重合電位で構成される干渉波が観察され、神経原性筋疾患では杭垣（picket fence）のような重合しない干渉波が観察される（図 0-1a）^{5,7}。電気生理学的検査やその他の臨床学

的検査の結果から、神経原性と筋原性を鑑別できない場合には、筋生検を実施することで病理形態学的に鑑別する⁸。

筋病理検査は筋疾患の診断において中心的な役割を果たしており、筋原性と神経原性の鑑別だけでなく、筋組織の病理組織学的特徴に基づいて、筋ジストロフィー、炎症性筋疾患、代謝性筋疾患、先天性ミオパチーなど、様々な筋原性筋疾患の診断が可能である⁸。特に、ネマリンミオパチーや中心核ミオパチーなどの先天性ミオパチーは、病名そのものが筋組織の形態学的な変化に基づくものであり、病理検査なしには診断することが不可能である⁹。ヒトの筋病理診断では、凍結筋組織を用いた多くの組織化学染色法が発達しており、筋生検検体を新鮮凍結固定することが重要である。ドライアイスや超低温冷凍庫（-79℃）を用いた凍結では、氷の結晶によるアーティファクトが発生し、筋組織の形態評価が困難になる。そこで、液体窒素で間接的に凝固点（-160℃）まで冷却したイソペンタン中で検体を急速凍結させる²。凍結組織切片を用いた組織化学染色のうち、筋線維タイプを染め分ける ATPase 染色が筋原性と神経原性の鑑別に最も重要である。代表的な所見としては、筋原性筋疾患では、**type1** 線維（遅筋線維）、**type2** 線維（速筋線維）のモザイクパターンが観察されるのに対し、神経原性筋疾患では、同じタイプの筋線維のグループ化（筋線維タイプ群化）が観察される（図 0-1a）²。以上のように、医学領域では針筋電図検査および筋病理検査の評価方法や検体固定法などが細かく整備されており、これらの検査所見に基づいた筋疾患の鑑別法が確立されている。

筋ジストロフィーは、筋の変性、壊死を主病変とし、進行性の筋力低下をみる遺伝性の筋原性筋疾患であり、臨床症状や発症年齢、原因遺伝子等に基づいて、様々な病型に分類される²。ヒトの筋ジストロフィーのうち頻度が高いものとして、

Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーや筋強直性ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーなどが知られている¹⁰。特に、Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーはヒトの代表的な遺伝性筋疾患であり、完全欠損型のデュシェンヌ型筋ジストロフィー Duchenne muscular dystrophy (DMD) と部分欠損型のベッカー型筋ジストロフィー Becker muscular dystrophy (BMD) に分類される²。DMD、BMD の確定診断は、凍結筋組織を用いた免疫組織化学的手法あるいはウエスタンブロット法により、Dystrophin タンパク質の欠損を証明することで行われる。また、DMD 患者で報告されている *Dystrophin* 遺伝子変異の 70%は、大きな領域にわたる欠失・重複変異であることから、欠失・重複変異の検出に優れた MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法が遺伝子診断の第一選択肢として定着している^{11,12}。上記のような診断体制に基づいて、欧州の TREAT-NMD (Treat NeuroMuscular Disease) や日本の Remudy (Registry of Muscular Dystrophy) など、DMD、BMD 患者レジストリが設立されており、患者の家系情報や症状、治療経過、遺伝子変異などの膨大な疫学的データに基づいた研究が盛んに行われている¹²⁻¹⁵。一方、獣医学領域では、マウス、ラット、犬、猫、豚など様々な動物で Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーが報告されており、ヒトの疾患モデルとして検討されてきた¹⁶⁻²²。筋ジストロフィーの治療法としては、上述の動物モデルを用いた遺伝子治療の前臨床試験が行われてきたが、一般的に動物モデルはヒトの筋ジストロフィーのような重篤な症状を示さないことが問題点として指摘されており、動物の Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーの病態研究は未だ十分とはいえない²³⁻²⁵。また、動物の Dystrophin 欠損型以外の筋ジストロフィーに関する知見は、さらに乏しいものと考えられる。

近年、動物医療にも針筋電図検査、神経伝導検査などに使用する電気生理学

的診断装置が普及したことにより、動物病院で筋疾患を診察、治療する機会が増えている。そのなかで、動物の筋疾患を診断するうえで次の2つの課題があり、正確な診断や病態解明を困難にしている。すなわち、(1) 筋病理検査には液体窒素で急速凍結した筋材料が必要であるが、獣医学領域ではこの特殊な筋凍結の設備が一般的でなく、病理検査に提出される筋組織のほとんどがホルマリン固定材料であるため、凍結切片を必要とする酵素染色等が実施できない。(2) 筋疾患の臨床診断に有用な針筋電図検査は、ヒトでは覚醒下で筋の随意収縮による筋電図を観察するが、動物の針筋電図検査は麻酔下で実施されるため、安静時の筋電図しか観察できない。そのため、安静時の筋電図と病態の関連については不明な点が多い(図 0-1b)。正確な診断ができないことが動物の筋疾患で治療および発生機序解明の妨げになっている。そこで本研究では、犬のホルマリン固定筋組織を用いた病理学的検索法を検討し、犬の筋疾患において安静時の針筋電図所見と筋病理所見とを比較する体系的な研究を行うことで、犬の筋疾患の診断に有用な検査法の確立を目指した。次に、これらの検索法を応用して、筋ジストロフィーが疑われた犬の症例について、それぞれ病理発生機序を解明することを試みた。

本論文は3章から構成される。第1章では、犬の筋疾患症例のホルマリン固定筋組織を用いて、筋疾患の診断を目的とした免疫組織化学的手法を検討した。第2章では、犬の筋疾患において針筋電図所見と筋病理所見とを比較し、筋疾患における骨格筋の機能と形態との関連性を調べた。第3章では、犬の **Dystrophin** 欠損型筋ジストロフィー、柴犬の筋強直(ミオトニア)を伴う筋疾患、国内の単一群に群発したラブラドル・レトリバーの原因不明の筋疾患について、病理発生や病因を検討した。

表 0-1 代表的なヒトの筋原性筋疾患および神経原性筋疾患

(Muscle Biopsy: A Practical Approach. 4th ed. Saunders Elsevier, 2013による)

筋原性	神経原性
筋ジストロフィー	脊髄性筋萎縮症 (SMA)
遠位型ミオパチー	筋萎縮性側索硬化症 (ALS)
筋強直性ジストロフィー	先天性ミエリン形成不全症
先天性ミオパチー	シャルコ・マリー・トゥース病
代謝性筋疾患	ギラン・バレー症候群
ミトコンドリア病	慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー
炎症性筋疾患	

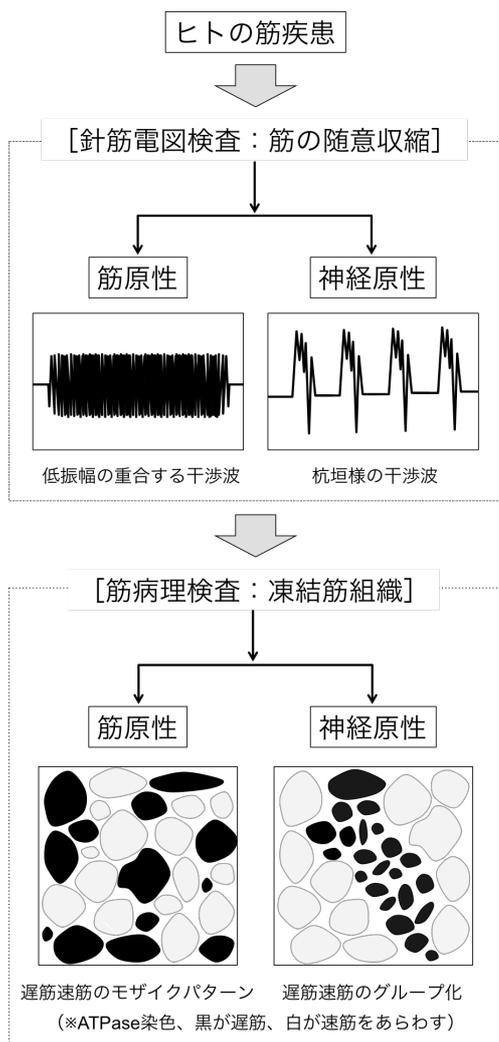


図 0-1a

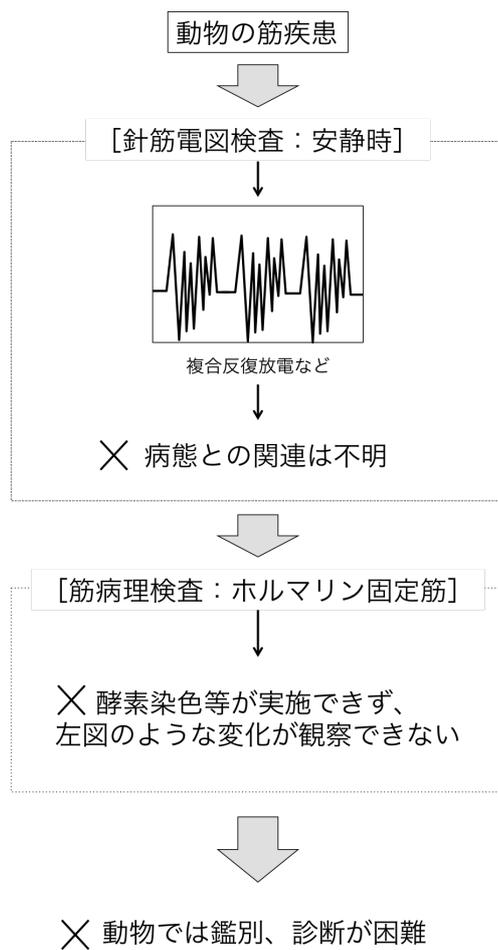


図 0-1b

図 0-1 針筋電図検査および筋病理検査による筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の鑑別

(a) ヒトの針筋電図検査では、筋の随意収縮による筋電図を観察することで、筋原性と神経原性の鑑別が可能である。また、筋病理検査では、凍結筋組織の形態学的変化を観察することで、筋原性と神経原性の鑑別が可能である。(b) 動物の針筋電図検査では、安静時の筋電図しか観察できないため、筋原性と神経原性の鑑別が困難である。また、ホルマリン固定筋組織を用いた筋病理検査では、酵素染色等が実施できないため筋原性と神経原性の鑑別が困難である。

第1章

犬のホルマリン固定骨格筋組織の 免疫組織化学的解析法の確立

序論

筋疾患は、筋原性筋疾患と神経原性筋疾患に大別される^{1,2}。神経原性筋疾患における骨格筋の病理組織学的変化は、小角化線維、群萎縮（小群萎縮、大群萎縮）、**Pyknotic nuclear clumps** によって特徴づけられる。一方、筋原性筋疾患における病理組織学的変化は様々であるが、主に筋線維の大小不同、壊死、再生が認められる^{1,2}。しかし、上述の筋原性変化を神経原性筋疾患において、また神経原性変化を筋原性筋疾患において認める場合があり、実際の筋疾患の診断において両者の鑑別は容易ではない。したがって、**HE** 染色の他に酵素染色を実施して、総合的に筋傷害の原因を判断する必要がある²⁶。

筋疾患の診断に有用な酵素染色として、**ATPase** 染色やアルカリホスファターゼ染色が知られている²⁷⁻³¹。**ATPase** 染色は筋線維タイプの分布を調べるために用いられ、正常または筋原性筋疾患では **type1** 線維（遅筋線維）、**type2** 線維（速筋線維）のモザイクパターンを認める^{1,2}。神経原性筋疾患では、遅筋線維、速筋線維の両方が萎縮する群萎縮や同じタイプの筋線維のグループ化（筋線維タイプ群化）が特徴的に認められ、脱神経と神経再支配による変化と考えられている^{1,2}。一方、アルカリホスファターゼ染色は再生線維が陽性で、筋原性筋疾患において陽性線維が多く観察される²⁹⁻³¹。これらの酵素染色は筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の鑑別に有用であるが、染色

を実施するためには凍結組織切片が必要である。獣医学領域では病理検査に提出される筋組織のほとんどがホルマリン固定材料であるため、これらの染色が実施できない。

筋線維タイプは各タイプに対応して発現するミオシン重鎖のアイソフォームによって決定されるため^{32,33}、ヒトの筋疾患の病理検査ではATPase染色の代替として、抗 Slow myosin 抗体と抗 Fast myosin 抗体を用いた免疫染色が検討されている^{34,35}。また、筋発生や筋再生の段階で筋管細胞（再生線維）に Nestin や Myogenin が発現することが知られており³⁶⁻⁴⁴、アルカリホスファターゼ染色の代替として、抗 Nestin 抗体と抗 Myogenin 抗体を用いた免疫染色が検討されている⁴⁵⁻⁴⁷。これらの免疫組織化学的手法は酵素染色と同様に凍結切片を用いて実施されるが、ホルマリン固定パラフィン切片にも応用が可能である。

本章では犬の筋疾患症例を対象に、ホルマリン固定パラフィン組織切片で実施可能な免疫組織化学的手法を検討し、神経原性筋疾患と筋原性筋疾患の免疫組織化学的特徴を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

【症例】

2013年から2019年の7年間に、東京大学獣医病理学研究室で実施した剖検により、骨格筋および神経組織（末梢神経、神経根、脊髄）を採取した犬5例、筋生検を実施した犬10例の計15例の組織を用いた。症例の情報および筋の採材部位を表1-1に示した。症例1、3については、末梢神経生検も実施した。

【骨格筋および神経組織の病理組織学的評価】

採取した組織は10%中性緩衝ホルマリンで固定後、定法に従い厚さ2 μ mのパラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を実施した。神経組織の病変の評価については、ルクソール・ファスト・ブルー（LFB）染色、PAS染色、抗Neurofilament抗体を用いた免疫染色を実施した。また、末梢神経炎あるいは筋炎と診断した症例については、抗CD3抗体、抗CD20抗体を用いた免疫染色により、T細胞とB細胞を同定した。

【疾病診断および疾患群の分類】

病理組織学的所見をもとに症例の疾病診断を確定した。筋ジストロフィーについては、抗Dystrophin抗体を用いた免疫染色の結果をあわせて診断した。すべての症例を神経原性筋疾患あるいは筋原性筋疾患に暫定的に分類し、2群間で免疫染色の結果を比較検討した。

【抗体作製】

犬の Myosin heavy chain 2 (UniProt ID Q076A7) の 1929 から 1937 番アミノ酸残基の配列 ([H] SREVHTKVI [OH]) に、6-Aminocarponic acid (Ahx) を導入した抗原ペプチド ([H] CXSREVHTKVI [OH]、X=Ahx) を合成し、ウサギに接種した (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)。初回の抗原接種から、14 日後、28 日後、42 日後に追加の抗原接種を行い、56 日後に採血した。採取したウサギ血清を抗 Canine fast myosin 抗体として免疫染色に使用した。

【パラフィン切片を用いた免疫染色】

抗 Dystrophin 抗体による染色に際しては厚さ 8 μ m のパラフィン切片を作製し、その他の抗体による免疫染色には厚さ 4 μ m の切片を作製した。パラフィン切片を脱パラフィンし、再水和した後、表 1-2 に示した方法で抗原賦活化の処理を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制するために、3%の過酸化水素水を含むメタノールに 4 分間浸漬した。Tris-buffered-saline (TBS) で 5 分×3 回洗浄後、非特異反応を防ぐために、8%のスキムミルク添加 TBS で 37°C、30 分間インキュベートした。一次抗体として、TBS で希釈した抗 Neurofilament 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体、抗 Iba-1 抗体または抗 Dystrophin 抗体 (表 1-2) と 4°Cで一晩反応させた。TBS で 5 分×3 回洗浄後、二次抗体として、Envision+System, HRP-Labelled Polymer Anti-Rabbit IgG (Dako, Tokyo, Japan) または Envision+System, HRP-Labelled Polymer Anti-Mouse IgG (Dako) を使用し、37°C、40 分間インキュベートした。TBS で 5 分×3 回洗浄後、過酸化水素と 0.05% 3-3'-diaminodezidine (DAB) を用いて発色し、ヘマトキシリンで対比染色した。

【パラフィン切片を用いた二重免疫染色】

厚さ 4 μ m のパラフィン切片を脱パラフィンし、再水和した後、表 1-2 に示した方法で抗原賦活化の処理を行った。3%の過酸化水素水を含むメタノールに 4 分間浸漬した。TBS で 5 分 \times 3 回洗浄後、8%のスキムミルク添加 TBS で 37 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートし、非特異反応をブロックした。第一の一次抗体として、TBS で希釈した抗 Slow myosin 抗体または抗 Nestin 抗体 (表 1-2) と常温で 1 時間半反応させた。TBS で 5 分 \times 3 回洗浄後、再び、8%のスキムミルク添加 TBS で 37 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートした。第二の一次抗体として、TBS で希釈した抗 Canine fast myosin 抗体または抗 Myogenin 抗体 (表 1-2) とそれぞれ 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。TBS で 5 分 \times 3 回洗浄後、二次抗体として、Envision+System, HRP-Labelled Polymer Anti-Rabbit IgG、Envision+System, HRP-Labelled Polymer Anti-Mouse IgG (Dako) および N-Histofine[®] Simple Stain Universal Immuno-Alkaine-Phosphatase Polymer, Anti-Mouse、N-Histofine[®] Simple Stain Universal Immuno-Alkaine-Phosphatase Polymer, Anti-Rabbit (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を使用し、37 $^{\circ}$ C、40 分間インキュベートした。TBS で 5 分 \times 3 回洗浄後、DAB および New Fuchsin を用いて発色し、ヘマトキシリンで対比染色した。

【凍結切片を用いた免疫染色】

症例 14、15 の診断を確定するために、厚さ 8 μ m の凍結切片を作製して Dystrophin の免疫染色を実施した。標本は流水洗後、3%の過酸化水素水を含むメタノールに 4 分間浸漬した。TBS で 5 分 \times 3 回洗浄後、8%のスキムミルク添加 TBS で 37 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートした。その後、抗 Dystrophin 抗体と 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。TBS

で 5 分×3 回洗浄後、二次抗体として、Envision+System, HRP-Labelled Polymer Anti-Mouse IgG (Dako) を使用し、37°C、40 分間インキュベートした。TBS で 5 分×3 回洗浄後、最後に DAB を用いて発色し、マイヤーのヘマトキシリンで対比染色した。また、正常な犬の骨格筋組織を陽性コントロールとして用いた。

結果

【犬の症例の病理学的特徴】

末梢神経、神経根、脊髄における病変の分布を表 1-3 に示した。症例 1～8 の神経組織に顕著な病理学的変化を認め、症例 1～3、5、7 では神経線維の脱落を、症例 4、6、8 では脱髄を認めた。また、症例 1、2 では線維化を認めた。症例 3 では末梢神経組織に CD3 陽性の T 細胞と CD20 陽性の B 細胞が重度に浸潤していた。以上の結果をもとに、症例 1、2 は末梢性ニューロパチー、症例 3 は末梢神経炎、症例 4、5 は多発性根神経症 (polyradiculoneuropathy)、症例 6 はポリニューロパチー、症例 7、8 は変性性脊髄症と診断した。症例 9～15 の神経組織に病変は観察されなかった。

症例 9～12 では筋組織にリンパ球が重度に浸潤する像を認めた。症例 9～11 では、浸潤する炎症細胞は CD3 陽性の T 細胞と CD20 陽性の B 細胞が混在し、症例 12 では CD3 陽性の T 細胞が優勢であった。症例 13 では筋組織内の小血管に線維軟骨片が塞栓する像を認めた。症例 14、15 では、凍結切片を用いた免疫染色で Dystrophin の欠損所見を認めた。以上の結果をもとに、症例 9～11 は咀嚼筋筋炎、症例 12 は多発性筋炎、症例 13 は線維軟骨塞栓症、症例 14、15 は Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーと診断した。なお、パラフィン切片を用いた免疫染色では、Dystrophin の安定した染色結果が得られなかった。

【犬の筋組織の病理組織学的特徴および免疫組織化学的特徴】

主に小角化線維、群萎縮、筋線維の大小不同、壊死、再生が認められた (表 1-3)。症例 1～8 では、小角化線維または群萎縮を認めた (図 1-1a, 1-1b)。これら

すべての症例において、抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた二重免疫染色で、遅筋、速筋線維の両方が萎縮する小角化線維と群萎縮を認めた（図 1-1c）。また、症例 4、6 では、筋線維タイプ群化を認めた（図 1-1d）。症例 1～3、6 では稀に筋線維の再生を認め、Myogenin 陽性核を有する Nestin 陽性線維を認めた。また、症例 6 では一部の Pyknotic nuclear clumps が Myogenin 陽性であった。症例 4、5、8 では、Nestin 陽性線維を認めたが、筋核は Myogenin 陰性であった。

症例 9～15 では、筋線維の大小不同を認め（図 1-2a）、抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた二重免疫染色で、遅筋、速筋線維のモザイクパターンを認めた（図 1-2b）。これらの症例で筋線維の壊死を認め、壊死線維内に浸潤する筋芽細胞の核が Myogenin 陽性であった。また、症例 9～12、14、15 では筋線維の再生像を多見し（図 1-3a）、再生線維の細胞質が Nestin 陽性であり、再生線維が有する核小体明瞭な大型核が Myogenin 陽性であった（図 1-3b）。以上の結果をもとに、症例 1～8 を神経原性筋疾患、症例 9～15 を筋原性筋疾患と診断した（表 1-3）。

考察

神経原性筋疾患と診断した 8 例中 3 例では、神経組織において脱髄を認めた
が、軸索の脱落は観察されなかった。アラスカン・マラミュートのポリニューロパチー
では、遠位神経における軸索変性や神経線維の脱落が報告されているが⁴⁸⁻⁵⁰、本章の症
例は神経根における脱髄が特徴的であり、過去の報告と病変のパターンが異なっていた。
また、ミニチュア・シュнауザーで脱髄性ポリニューロパチーの症例報告があり⁵¹、本
章の症例も同様に脱髄を認めた。脱髄のみでは骨格筋の脱神経は起こらないため、これ
らの症例では検索した範囲外の神経組織に軸索変性がある可能性が推測された。

免疫組織化学的手法は、**Dystrophin** などのタンパク質欠損を確認することで
筋ジストロフィーの診断に有用であるが、通常は凍結切片を必要とする⁵²⁻⁵⁴。本章では、
パラフィン切片を用いた **Dystrophin** の免疫染色を行ったが、安定した染色結果が得ら
れなかった。したがって、犬の **Dystrophin** 欠損型筋ジストロフィーについては、ホル
マリン固定材料では確定診断ができないと考えられた。

一方、本章で行った抗 **Slow myosin** 抗体と抗 **Fast myosin** 抗体を用いた免疫
染色により、犬の筋組織のパラフィン切片でも、筋線維タイプの分類が可能であること
が示された。ヒトの **Fast myosin** を抗原とする市販抗体は犬に反応しなかったため、
犬の **Fast myosin** を抗原とする抗体を新規作製した。脱神経および神経再支配による
筋組織の変化の重要な特徴は、遅筋、速筋線維の両方が萎縮する小角化線維、群萎縮お
よび筋線維タイプ群化である^{1,2}。本章の研究で観察された遅筋、速筋線維の両方が萎
縮する小角化線維と群萎縮は、犬の神経原性筋疾患のすべての症例において、診断に有
用な所見であった。筋線維タイプ群化も犬の神経原性筋疾患に特異性の高い変化であつ

たが、すべての症例では観察されなかった。その理由として、筋線維タイプ群化を認めなかった症例では、神経再支配が起こらなかった可能性が考えられた。

ヒトの神経筋疾患において、筋芽細胞および再生線維における **Myogenin** または **Nestin** の発現が報告されている⁴⁵⁻⁴⁷。本章の犬の筋疾患症例においても同様の発現パターンを認め、特に筋原性筋疾患において、細胞質が **Nestin** 陽性、核が **Myogenin** 陽性の筋線維は再生線維と解釈された。一方で、神経原性筋疾患においても同様の染色パターンを示す筋線維や **Myogenin** 陽性の **Pyknotic nuclear clumps** を認めた。**Myogenin** または **Nestin** は脱神経筋でも発現が上昇することが知られているが^{42,55-57}、その発現が再生または脱神経のいずれに起因するかについては判別できなかった。

以上より、本章で用いたホルマリン固定パラフィン切片で実施可能な免疫組織化学的手法により、特に神経原性筋疾患に特異性の高い変化を検出することができたことから、この手法は犬の神経原性筋疾患と筋原性筋疾患の鑑別に有用であることが示された。

要約

犬のホルマリン固定パラフィン切片で実施可能で筋疾患の診断に応用できる免疫組織化学的手法を検討した。筋疾患診断においては、まず筋原性筋疾患と神経原性筋疾患を鑑別することがきわめて重要である。そこで、神経原性筋疾患と筋原性筋疾患の免疫組織化学的特徴を明らかにする目的で、犬の筋疾患症例 15 例（犬の神経原性筋疾患 8 例、筋原性筋疾患 7 例）の筋組織のホルマリン固定パラフィン標本を用いて、通常の組織検索に加えて免疫染色を行なった。抗 Slow myosin 抗体と抗 Fast myosin 抗体を用いた免疫染色により、神経原性筋疾患において、遅筋、速筋線維の両方が萎縮する小角化線維と群萎縮および筋線維タイプ群化が観察された。これらの所見は筋原性筋疾患ではみられなかった。また、抗 Nestin 抗体と抗 Myogenin 抗体を用いた免疫染色では、筋原性筋疾患において、細胞質が Nestin 陽性、核が Myogenin 陽性の再生線維が観察された。神経原性筋疾患においても同様の染色性を示す筋線維あるいは筋核を認めしたが、再生または脱神経のいずれに起因する変化かは判別できなかった。以上の結果から、抗 Slow myosin 抗体と抗 Fast myosin 抗体を用いた免疫染色は、犬の神経原性筋疾患と筋原性筋疾患の鑑別に有用であり、抗 Nestin 抗体と抗 Myogenin 抗体を用いた免疫染色は、筋原性筋疾患における再生線維の描出に有用であることが示された。

表1-1 症例の情報および筋の採材部位

症例	動物	犬種	性別	年齢	筋の採材部位
1	イヌ	ラサアプソ	メス	4歳	上腕三頭筋、上腕二頭筋
2	イヌ	ラブラドル・レトリバー	メス	9歳	側頭筋、中臀筋、多裂筋
3	イヌ	雑種	メス	8歳2ヶ月	上腕二頭筋
4	イヌ	アラスカン・マラミュート	オス	8歳4ヶ月	前肢近位、前肢遠位、後肢近位、後肢遠位
5	イヌ	ミニチュア・シュナウザー	オス	6歳	側頭筋、上腕三頭筋、上腕二頭筋、橈側手根伸筋、 大腿四頭筋、大腿二頭筋、前頸骨筋、腓腹筋
6	イヌ	ラブラドル・レトリバー	メス	11歳	側頭筋、上腕三頭筋、橈側手根伸筋、大腿四頭筋、 前頸骨筋、腓腹筋
7	イヌ	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	オス	12歳	上腕二頭筋、浅指屈筋、大腿二頭筋、腓腹筋、最長筋
8	イヌ	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	メス	14歳5ヶ月	上腕三頭筋、橈側手根伸筋、大腿四頭筋、大腿二頭筋、 前頸骨筋
9	イヌ	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	オス	1歳	前頭筋、側頭筋
10	イヌ	雑種	メス	4歳5ヶ月	側頭筋、咬筋
11	イヌ	ビーグル	オス	11歳6ヶ月	側頭筋、大腿四頭筋
12	イヌ	パグ	メス	11歳9ヶ月	多裂筋
13	イヌ	ミニチュア・シュナウザー	メス	6歳2ヶ月	多裂筋
14	イヌ	ポメラニアン	オス	0歳11ヶ月	顎舌骨筋、深胸筋、外腹斜筋
15	イヌ	ミニチュア・シュナウザー	オス	1歳2ヶ月	上腕三頭筋、大腿四頭筋

表1-2 免疫染色に使用した一次抗体

抗体	クローン	販売元	希釈倍率	抗原賦活化の処理
Neurofilament	Mm, 2F11	Cell Marque, Rocklin, CA	1:250	なし
CD3	Rp	Dako, Tokyo, Japan	Rtu	熱処理 (121°C、10分、 クエン酸バッファー pH6.0)
CD20	Rp	Thermo Scientific, Waltham, MA	1:400	なし
Dystrophin	Mm, 1808	Kamiya Biomedical, Seattle, WA	1:100	熱処理 (121°C、10分、 EDTAバッファー pH9.0)
Slow myosin	Mm, NOQ7.5.4D	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	1:4000	熱処理 (121°C、10分、 EDTAバッファー pH9.0)
Canine fast myosin	Rp	Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan (自作抗体)	1:100	熱処理 (121°C、10分、 EDTAバッファー pH9.0)
Nestin	Rp, N1602	Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan	1:20	なし
Myogenin	Mm, F5D	Dako, Tokyo, Japan	1:50	熱処理 (121°C、10分、 EDTAバッファー pH9.0)

Abbreviations: Rp, Rabbit polyclonal; Mm, Mouse monoclonal; Rtu, Ready-to-use.

表1-3 症例の病理組織学的および免疫組織化学的特徴、筋疾患の鑑別

症例	最終診断	神経組織の病変分布				筋組織の病理組織学的特徴				免疫組織化学的特徴			
		末梢神経		神経根		小角化		筋線維の		Slow myosinとFast myosin		NestinとMyogenin	
		末梢神経	神経根	線維	群萎縮	筋線維の	筋線維の	遅筋、速筋線維両方の	筋線維	Nestin陽性線維/	Myogenin陽性核	筋疾患の	鑑別
1	末梢性ニューロパチー	+	NA	-	+	-	+	+	+	-	+	+/+	神経原性
2	末梢性ニューロパチー	+	NA	+	+	-	+	+	+	-	+	+/+	神経原性
3	末梢神経炎	+	NA	-	+	-	+	+	+	-	+	+/+	神経原性
4	多発性根神経症	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	神経原性
5	多発性根神経症	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+/-	神経原性
6	ポリニューロパチー	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+/+	神経原性
7	変性性脊髄症	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-/-	神経原性
8	変性性脊髄症	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	神経原性
9	咀嚼筋筋炎	-	NA	-	-	+	+	+	+	-	+	+/+	筋原性
10	咀嚼筋筋炎	-	NA	-	-	-	+	+	+	-	+	+/+	筋原性
11	咀嚼筋筋炎	-	NA	-	-	+	+	+	+	-	+	+/+	筋原性
12	多発性筋炎	NA	NA	-	-	+	+	+	+	-	+	+/+	筋原性
13	線維軟骨骨塞栓症	NA	NA	-	-	-	+	+	+	-	+	-/-	筋原性
14	筋ジストロフィー	-	NA	-	-	+	+	+	+	-	+	+/+	筋原性
15	筋ジストロフィー	NA	NA	-	-	-	+	+	+	-	+	+/+	筋原性

+ : 病変あり、- : 病変なし、NA : 採取組織なし

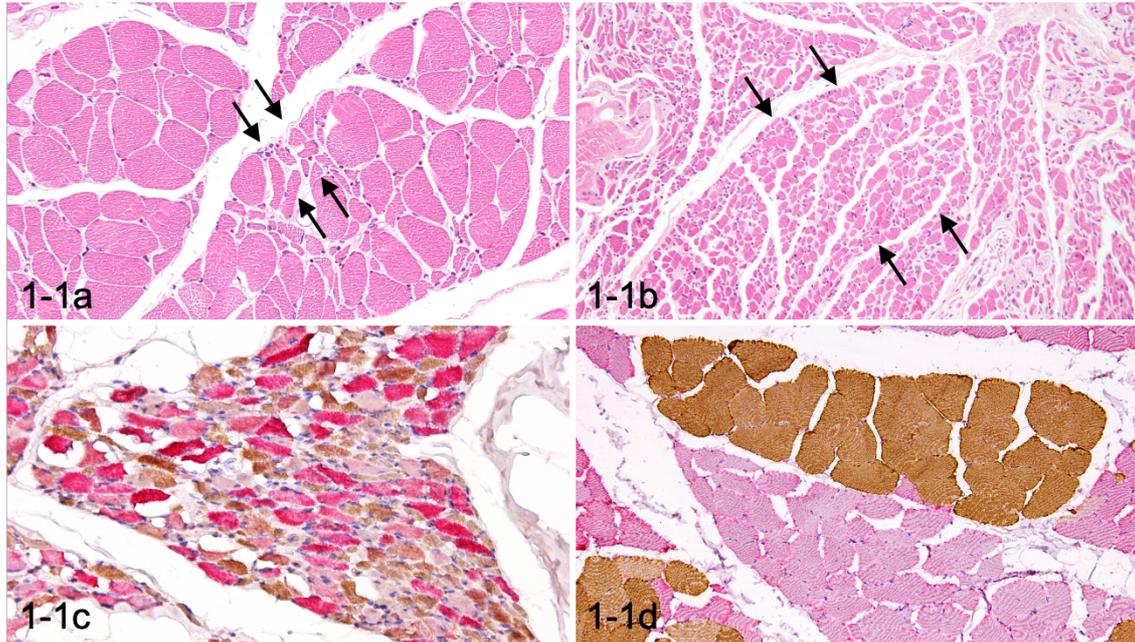


図 1-1 犬の神経原性筋疾患の組織学的特徴 (a, b) および免疫組織化学的特徴 (c, d)。

症例 7 (変性性脊髄症)、上腕二頭筋 (a)、大腿二頭筋 (b)、腓腹筋 (c)。症例 4 (多発性根神経症)、前肢遠位の筋 (d)。

(a) HE 染色。小角化線維および小群萎縮。(b) HE 染色。大群萎縮。(c) 抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた二重免疫染色。Slow Myosin 陽性の遅筋線維 (赤色) および Canine fast myosin 陽性の速筋線維 (茶色) の両方が萎縮する大群萎縮。(d) 抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた二重免疫染色。Slow myosin 陽性の遅筋線維 (赤色) および Canine fast myosin 陽性の速筋線維 (茶色) それぞれがグループを形成する (筋線維タイプ群化)。

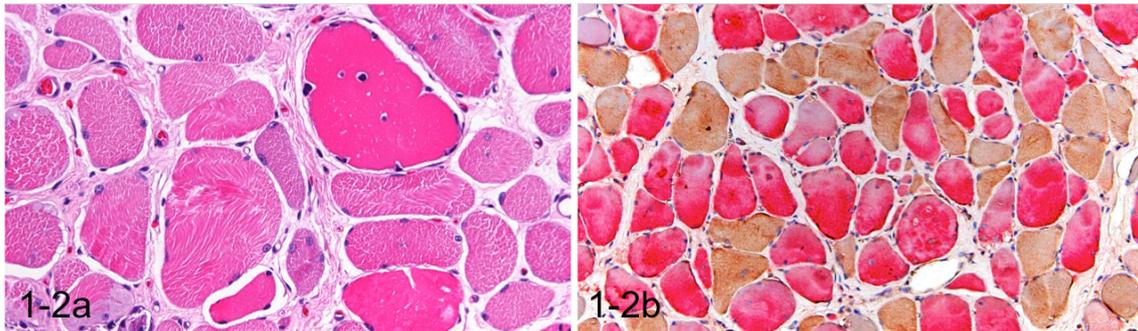


図 1-2 犬の筋原性筋疾患の組織学的特徴 (a) および免疫組織化学的特徴 (b)。

症例 14 (筋ジストロフィー)、外腹斜筋。

(a) HE 染色。萎縮線維および肥大線維が混在し、筋線維の大小不同を呈する。(b) 抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた二重免疫染色。Slow myosin 陽性の遅筋線維 (赤色) および Canine fast myosin 陽性の速筋線維 (茶色) がモザイク状に分布する (筋線維タイプのモザイクパターン)。

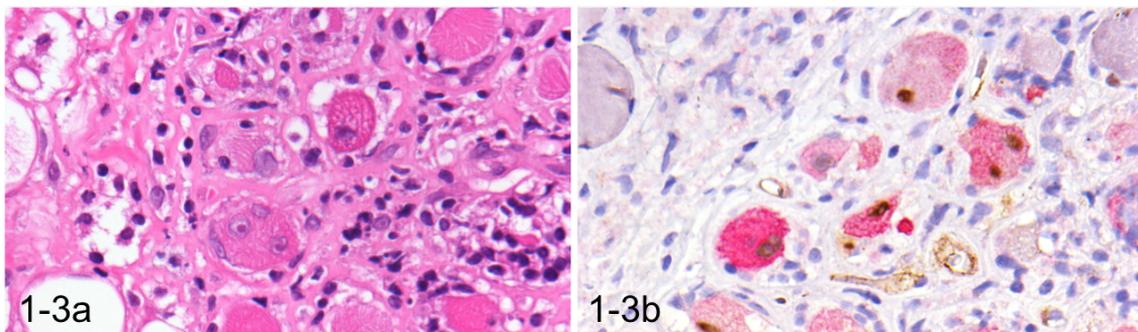


図 1-3 犬の筋原性筋疾患の組織学的特徴 (a) および免疫組織化学的特徴 (b)。

症例 12 (多発性筋炎)、多裂筋。

(a) HE 染色。核小体明瞭な大型の複数核を有する再生線維。(b) 抗 Nestin 抗体および抗 Myogenin 抗体を用いた二重免疫染色。再生線維の細胞質が Nestin 陽性 (赤色) を示し、再生線維の核小体明瞭な大型核が Myogenin 陽性 (茶色) を示す。

第2章

犬の筋疾患における

針筋電図所見と筋病理所見との関連

序論

第1章では、犬のホルマリン固定筋組織における、筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の免疫組織化学的特徴を明らかにした。特に、免疫染色で遅筋、速筋の分布の変化を観察することにより、犬の筋疾患を形態学的により詳細に検証することが可能となった。緒論で述べたように、ヒトでは筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の鑑別に、針筋電図検査と筋病理検査の両方が重要であり、両検査の所見に基づき精度の高い鑑別や病態解明を実施している。これに対し、動物の針筋電図検査は麻酔下安静時に制限され、筋電図所見と病態の関連については不明な点が多いため、一般的な診断法としては用いられていない^{58,59}。そこで本章では、犬の安静時の筋電図所見の診断的意義を明らかにする目的で、犬の筋疾患における針筋電図所見と筋病理所見の関連について検討した。

針筋電図検査は、運動単位（骨格筋、神経筋接合部、末梢神経、脊髄の運動ニューロン）の傷害を検出する検査である⁵⁸⁻⁶⁰。ヒトでは、覚醒下で主に筋の随意収縮による筋電図を観察することで、筋疾患における骨格筋の活動性異常と慢性異常との判別や病変分布の確認、筋原性と神経原性の鑑別を行う⁶⁰。また、筋電図の異常の有無に基づいて、筋生検で組織病変を検出しやすい筋の選定にも用いられる^{61,62}。一方、動物の針筋電図検査は麻酔下で実施されるため、針電極刺入に伴う活動電位（刺入時電位）と力を抜いた筋より得られる安静時電位を評価する⁵⁸。刺入時電位は正常筋でも観察さ

れ、骨格筋の傷害にともない電位が増大あるいは減少する。安静時電位には、筋線維の変性に起因する線維自発電位、陽性鋭波、複合反復放電、ミオトニー放電や、神経末端の傷害に起因する線維束電位などの異常電位が知られている⁶³⁻⁶⁶。線維束電位は筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の鑑別に唯一有効な安静時電位であるが、動物の疾患との関連性は十分に検討されていない。また、線維束電位を除いたその他の異常電位は疾患特異性に欠けるため、安静時に実施した針筋電図検査の結果をもとに、動物の神経筋疾患を診断することはできない^{58,59}。

ヒトの筋疾患に関する、針筋電図所見と筋病理所見との関連を検討した過去の研究では、筋の随意収縮による筋電図を評価した研究が多く⁶⁷⁻⁷⁴、刺入時電位および安静時電位と特定の病理組織学的変化の関連について詳細に検討した研究は少ない⁷⁵。本章では、神経筋疾患が疑われた48頭の犬において、針筋電図検査および筋生検を実施し、刺入時電位および安静時電位と筋病理所見をもとに、骨格筋の機能と形態的变化の関連を検証した。

材料と方法

【症例および筋材料】

2014年から2019年の6年間に、血液生化学検査、画像検査、一般神経学的検査などにより筋疾患が疑われ、針筋電図検査を実施後に筋生検を行った犬48例を用いた。針筋電図検査または画像検査で異常が認められた筋、あるいは神経伝導検査で異常が認められた神経の支配を受けている筋から、開放生検または針生検（14G、16G Tru-cut 針）により骨格筋を採取した。いずれの症例も末梢神経生検は実施されなかった。

【電気生理学的評価】

電気生理学的検査は、筋電図・誘発電位検査装置 Neuropack MEB-9404 (Nihon Koden, Tokyo, Japan) を用いて実施した。すべての検査をアルファキサロン静脈内投与・イソフルラン吸入麻酔下で行い、直腸温度を 38.0°C 以上に維持した。神経伝導検査として、運動神経伝導検査、感覚神経伝導検査、F 波検査を、神経筋接合部機能検査として反復刺激誘発筋電図検査を実施した。これらの検査は、脛骨神経または尺骨神経において行った。また、四肢および体幹、症状によっては頭部の筋に対して、同心針電極を用いた針筋電図検査を実施した。なお、筋電図検査および筋生検は同一の筋に実施し、筋生検の部位を避けるように針電極を刺入した。

筋電図検査では、①刺入時電位の増大あるいは②減少、③線維自発電位/陽性鋭波、④線維束電位、⑤複合反復放電、⑥ミオトニー放電の6つの異常電位の有無について、症例ごとに記録した。なお、線維自発電位および陽性鋭波は筋電図上では波形が

異なるが、いずれも神経支配を失った筋線維から発生する電位であるため、同一の項目にまとめた。

【病理組織学的評価および疾病診断】

採取した筋組織は 10%中性緩衝ホルマリンで固定後、定法に従い厚さ 2 μ m のパラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソン・トリクローム染色を実施した。筋内末梢神経組織の病変の評価については、PAS 染色を実施した。また、それぞれ第 1 章で使用した、抗 Dystrophin 抗体、抗 Nestin 抗体を用いた免疫染色、抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた二重免疫染色を行った。抗 Dystrophin 抗体を用いた免疫染色については凍結切片を使用した。

主に病理組織学的所見をもとに症例の疾病診断を確定した。神経原性疾患については、神経伝導検査の異常、筋内末梢神経の異常、筋組織の神経原性変化のうち、2 つ以上を認めることを診断基準とした。また、椎間板ヘルニア、甲状腺機能低下症については、画像検査、血液生化学検査の結果から診断した。

【筋病理所見のグレーディング】

①筋線維の萎縮（小角化線維および群萎縮）、②筋線維の壊死および再生、③ネスチン陽性筋線維（脱神経筋線維）の存在、④筋線維タイプ群化、⑤脂肪浸潤および線維化の 5 つの所見について、程度によりそれぞれグレード 0 から 3 までスコア化した（表 2-1）。1 個体から複数の筋を採取した場合は、最も高いスコアを採用した。

【針筋電図所見と筋病理所見との比較】

上述した 6 つの異常電位の有無と 5 つの筋病理所見との関連について、症例ごとに解析した。

結果

【電気生理学的解析】

検索した 48 例中 17 例で運動神経（末梢）または運動ニューロン（中枢）の傷害を示唆する異常な神経伝導検査所見を認めた。主に、運動神経伝導速度、F 波伝導速度の遅延、F 波出現率の低下、複合筋活動電位の振幅低下あるいは時間的分散を認めた。神経筋接合部機能検査（反復刺激誘発筋電図検査）の結果は全例で正常だった。

48 例中 40 例の筋電図検査で異常電位を認め、観察した代表的な異常電位を図 2-1 に示した。線維自発電位/陽性鋭波は 32 例、複合反復放電は 15 例、刺入時電位の増大は 5 例、ミオトニー放電は 4 例、線維束電位は 3 例、刺入時電位の減少は 2 例でそれぞれ認められた。また、14 例で複数の異常電位が観察され、特に線維束電位はいずれも線維自発電位/陽性鋭波と同時に観察された。

【病理学的解析および疾病診断】

開放生検を実施した 14 例中 12 例、針生検を実施した 34 例中 21 例で採取した筋組織に評価可能な末梢神経組織を認めた。そのうち、1 例で神経線維の減少および線維化、4 例で軸索の膨化、粘液変性、水腫などの病変を認めた。パラフィン標本では、軽度の脱髄とアーティファクトの区別は困難であった。筋組織では、神経原性変化として、遅筋、速筋線維両方の群萎縮や筋線維タイプ群化、筋原性変化として、筋線維の壊死、再生や炎症細胞の浸潤などを認めた。神経伝導検査で異常所見を認めた 17 例中 7 例で筋内末梢神経の異常あるいは筋組織の神経原性変化を認め、1 例で間質の炎症を認めた。その他の 9 例では疾患特異的な変化は観察されなかった。

検索した 48 例のうち、7 例を神経原性疾患、4 例を筋炎（うち 1 例は間質の炎症）、2 例を筋ジストロフィー（Dystrophin 欠損型）、3 例を椎間板ヘルニアに伴う筋萎縮、2 例を甲状腺機能低下症に伴う筋萎縮、1 例を線維軟骨塞栓症による筋線維の壊死と診断した。その他 29 例については、特定の疾患群に分類することができなかった。なお、椎間板ヘルニアと診断した症例では、MRI 検査でヘルニア物質による脊髄圧迫を確認した。線維軟骨塞栓症と診断した症例では、MRI 検査で脊髄梗塞を疑う像を認め、病理検査では筋組織内の小血管に線維軟骨片が塞栓する像を認めた。

【針筋電図所見と疾患との関連】

線維自発電位/陽性鋭波および複合反復放電は、線維軟骨塞栓症を除いたすべての疾患群で認められた。また、線維束電位は神経原性疾患でのみ認められた。間質の炎症あるいは線維軟骨塞栓症と診断した 2 例では異常電位は観察されなかった。各異常電位を認めた疾患を表 2-2 にまとめた。

【針筋電図所見と筋病理所見との関連】

筋病理所見のグレーディングにおいて観察した代表的な病理組織像を図 2-2 に示した。筋線維タイプ群化については 48 例中 15 例で認めたが、遅筋あるいは速筋の片方の群化が 12 例、遅筋、速筋両方の筋線維タイプ群化が 3 例であった。

疾病診断がついた 19 例の針筋電図所見と筋病理所見を表 2-3 にまとめた。刺入時電位の減少を認めた 2 例で、グレード 2 の脂肪浸潤および線維化が認められた。線維自発電位/陽性鋭波が観察された症例の筋病理所見は、いずれの項目についてもグレード 0 の割合が最も高く、所見を認めた場合はグレード 1 から 3 まで様々な程度であ

った（図 2-3）。複合反復放電が観察された症例の筋病理所見は、いずれの項目についてもグレード 0 の割合が最も高く、所見を認めた場合は高グレードの割合が高かった（図 2-4）。具体的には、グレード 3 の筋線維タイプ群化（15 例中 4 例）、グレード 2、3 の脂肪浸潤および線維化（15 例中 5 例）、グレード 3 のネスチン陽性筋線維（脱神経筋線維）（15 例中 4 例）であった。線維束電位を認めた 3 例中 2 例で遅筋、速筋両方の筋線維タイプ群化を認めた。刺入時電位の増大、ミオトニー放電と筋病理所見の間に関連はみられなかった。

考察

神経伝導検査における異常所見は末梢神経傷害の指標であり、ヒトでは特に神経原性疾患を鑑別する際に評価される⁶⁶。犬における本研究で、48例中17例に神経伝導検査の異常所見を認めたが、そのうち10例の組織検査で筋内末梢神経の異常および筋組織の神経原性変化が観察されなかった。このような症例の診断には、末梢神経生検の実施を検討する必要があると考えられる。また本研究では、神経原性疾患あるいは筋原性筋疾患（筋炎、筋ジストロフィー）とは別の疾患群として、椎間板ヘルニアおよび甲状腺機能低下症、線維軟骨塞栓症を分類した。これらの疾患では、神経伝導検査の異常所見や脱神経を示唆する針筋電図検査所見を認めることが過去に報告されているが⁷⁶⁻⁷⁸、椎間板ヘルニアおよび甲状腺機能低下症、線維軟骨塞栓症の症例は、いずれも本研究で定めた神経原性疾患の診断基準を満たさなかった。線維軟骨塞栓症の症例では、脊髄梗塞による脱神経と血管障害による筋組織の壊死の両方が病態に関与すると考えられた。

本研究における異常電位と疾患の関連の検証から、線維束電位は動物においても神経原性疾患に特異性の高い異常電位であることが示唆された。線維束電位は同一の運動ニューロンに支配される筋線維のグループから発生する異常電位であり、神経末端の傷害に起因する⁶⁰。線維束電位は正常な骨格筋でも観察されることがあるが（benign fasciculation と呼ばれる）、線維自発電位/陽性鋭波と同時に認められる線維束電位は神経原性疾患に特異性が高く、ヒトでは特にALSの診断に重要な所見である^{4,79}。本研究では、線維束電位は線維自発電位/陽性鋭波と同時に、神経原性疾患のみに認められた。また、線維束電位を認めた症例の筋組織では、神経原性疾患に特異性の高

い変化である筋線維タイプ群化が観察された。

線維束電位以外の異常電位は、過去の報告と同様、いずれも疾患特異性は認められなかった^{58,59}。本研究では、ミオトニー放電は筋原性筋疾患（筋炎、筋ジストロフィー）のみで認められたが、ヒトでは神経原性疾患でも認められることがある⁶⁰。筋間質の炎症を認めた症例に異常電位が観察されなかった理由としては、筋組織の傷害がなかったことが考えられる。また、線維軟骨塞栓症と診断した症例に異常電位が観察されなかった理由としては、急性発症の直後（発症4日後）に筋電図検査が実施されたことが考えられる。犬の神経原性疾患では、神経傷害の5日から8日後に筋電図の異常が検出されるという報告がある^{80,81}。

本研究における異常電位と筋組織の病理学的変化との関連の検証では、特に線維自発電位/陽性鋭波および複合反復放電と病理組織学的変化の関連が明らかになった。まず、線維自発電位/陽性鋭波および複合反復放電が観察された症例では、筋病理所見はいずれの項目についてもグレード0の割合が最も高く、これらの異常電位が形態学的変化に先立って観察される可能性が考えられた。

線維自発電位/陽性鋭波は、神経支配が断たれた単一の筋線維が発する異常電位であり、ニューロパチーや筋炎、筋ジストロフィーなどの様々な疾患で観察される^{58,60}。ヒトでは、線維自発電位/陽性鋭波と関連がある病理組織学的所見として、筋線維の萎縮、壊死、再生、脱神経筋線維、線維化が報告されている^{75,82}。本研究において、線維自発電位/陽性鋭波が観察された犬の症例においても、ヒトと同様の所見や筋線維タイプ群化が様々な程度で観察された。したがって、線維自発電位/陽性鋭波は、急性から慢性の様々な病理組織変化と関連すると考えられた。また、複合反復放電は多数の筋線維から発生する異常電位であるが、組織学的変化との関連については不明な点が多

い^{58,60}。本研究では、線維自発電位/陽性鋭波が観察された症例に比べて、複合反復放電が観察された症例の方が、より高グレードの病理組織学的所見を示していた。この結果は、複合反復放電が神経筋疾患の慢性期に観察されることが多いという過去の報告と矛盾しない⁵⁸。なお、刺入時電位の減少を認めた症例数は少なかったが、脂肪浸潤および線維化との関連が示唆され、過去の報告を支持する結果であった⁸³⁻⁸⁵。刺入時電位の増大、ミオトニー放電を認めた症例も少なく、筋病理所見との関連は不明であった。

以上のことから、犬の筋電図検査において、線維自発電位/陽性鋭波と複合反復放電は、筋の病理変化に先立って観察される可能性があるが、前者は急性から慢性の様々な組織変化に関連し、後者は慢性期の重度の組織変化と関連することが示された。また、線維束電位は神経原性疾患に特異性の高い異常電位であることが示唆された。これらの知見から、筋電図検査と筋病理検査をあわせて筋疾患を鑑別、診断することが有用であると考えられた。本章の研究では、症例ごとに筋生検実施部位が異なっていたが、今後は個々の筋疾患において筋生検の実施部位を統一して同様の検討を行い、異常電位の種類に基づいて筋病理検査に適した筋を選定する方法を探る必要があると思われる。

要約

動物の針筋電図検査は麻酔下で実施されるため、刺入時電位および安静時電位を評価している。しかし、これらの筋電図所見と筋病理所見との関連については不明な点が多い。本章では、針筋電図検査および筋生検を実施した犬 48 例について、6 つの筋電図所見と 5 つの筋病理所見の関連について解析した。筋病理所見は、程度によりそれぞれグレード 0 から 3 までスコア化した。線維束電位は神経原性疾患でのみ認められたのに対し、線維自発電位/陽性鋭波および複合反復放電はほぼ全ての疾患群で認められた。線維自発電位/陽性鋭波あるいは複合反復放電が観察された症例の筋病理所見は、いずれの項目についてもグレード 0 の割合が最も高かった。病理所見がある場合、線維自発電位/陽性鋭波が観察された症例の筋病理所見は、いずれの項目でもグレード 1 から 3 まで様々であり、複合反復放電が観察された症例の筋病理所見は、高グレードの割合が高かった。以上の結果から、線維束電位は神経原性疾患に特異性が高く、線維自発電位/陽性鋭波および複合反復放電は疾患特異性がないことが示された。また、線維自発電位/陽性鋭波と複合反復放電は、筋の形態学的変化に先立って観察される可能性があるが、前者は急性から慢性の様々な組織変化に関連し、後者は慢性期の重度の筋組織変化と関連することが示された。

表2-1 筋病理所見のグレーディング

タイプ	筋病理所見	グレード
定量的	①筋線維の萎縮（小角化線維および群萎縮）	0：正常あるいは萎縮線維が単独で存在する
		1：萎縮線維が10本以下の小群を形成する
		2：萎縮線維が11本以上50本以下の中規模な群を形成する
	②筋線維の壊死および再生	3：萎縮線維が51本以上の大群を形成する
	③ネスチン陽性筋線維	0：正常
		1：100倍1視野あたり1本未満
		2：100倍1視野あたり1本以上2本未満
		3：100倍1視野あたり2本以上
定性的	④筋線維タイプ群化	0：筋線維タイプがランダムに分布する
		1：タイプ群化が稀に認められる
		2：タイプ群化が時折認められる
	⑤脂肪組織浸潤および線維化	3：タイプ群化が頻繁に認められる
		0：正常
		1：軽度
		2：中度
		3：重度

表2-2 異常筋電図所見を認めた疾患

線維自発電位/陽性鋭波	複合反復放電	ミオトニー放電	線維束電位	刺入時電位の増大	刺入時電位の減少
神経原性疾患	神経原性疾患	筋炎	神経原性疾患	神経原性疾患	筋炎
筋炎	筋炎	筋ジストロフィー		筋ジストロフィー	
筋ジストロフィー	筋ジストロフィー				
椎間板ヘルニア	椎間板ヘルニア				
甲状腺機能低下症	甲状腺機能低下症				

表2-3 疾病診断、針筋電図所見および筋病理所見のグレード

症例	疾病診断	針筋電図所見						筋病理所見のグレード						
		刺入時電位	安静時異常電位		線維自発電位/ 陽性鋭波		複合反復放電	ミオトニー 放電	線維束電位	①筋線維の 萎縮	②筋線維の 壊死、再生	③ネスチン 陽性 筋線維	④筋線維 タイプ群化	⑤脂肪浸潤、 線維化
	増大 減少													
1	神経原性疾患	+	-	-	-	+	-	-	2	0	0	0	0	0
2	神経原性疾患	-	-	-	-	+	-	-	3	0	2	0	0	1
3	神経原性疾患	-	-	-	-	+	-	-	3	3	2	2	2	2
4	神経原性疾患	-	-	-	-	+	-	+	2	3	1	3	1	1
5	神経原性疾患	-	-	-	-	+	-	-	2	0	0	0	2	2
6	神経原性疾患	-	-	-	-	+	-	+	0	2	0	2	0	0
7	神経原性疾患	-	-	-	-	-	+	-	3	0	1	3	0	0
8	筋炎	-	+	-	-	-	-	-	0	3	1	0	2	2
9	筋炎	-	+	-	-	-	-	-	0	0	0	0	2	2
10	筋炎	-	-	+	-	-	+	-	0	2	3	0	3	3
11	筋炎 (間質の炎症)	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
12	筋ジストロフィー	-	-	-	-	+	-	-	0	3	3	0	0	0
13	筋ジストロフィー	-	-	-	-	+	+	-	0	1	3	0	0	0
14	椎間板ヘルニア	-	-	-	-	+	-	-	0	0	0	0	0	0
15	椎間板ヘルニア	-	-	-	-	+	+	-	1	2	0	0	0	0
16	椎間板ヘルニア	-	-	-	-	+	-	-	3	0	0	0	0	0
17	甲状腺機能低下症	-	-	-	-	+	-	-	1	0	0	0	0	2
18	甲状腺機能低下症	-	-	-	-	+	+	-	0	2	1	3	0	0
19	線維軟骨塞栓症	-	-	-	-	-	-	-	0	3	1	0	0	0

+：あり、-：なし

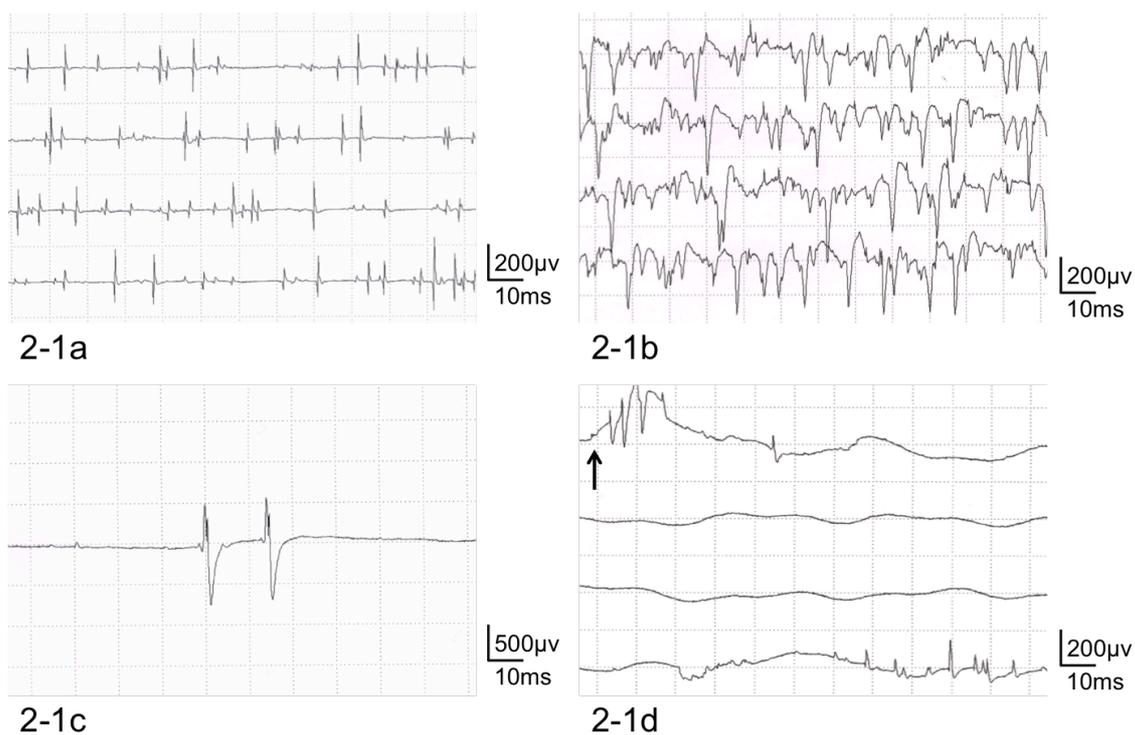


図 2-1 犬の筋疾患における代表的な針筋電図所見

(a) 症例 13 (筋ジストロフィー)。振幅は $20\sim 200\mu\text{V}$ 程度で、二相性または三相性の波形。線維自発電位。(b) 症例 10 (筋炎)。多相性の複雑な波形 (群放電) が一定の頻度で反復する。複合反復放電。(c) 症例 4 (神経原性疾患)。振幅が 1mV 以上あり、運動単位電位に類似した波形。線維束電位。(d) 症例 9 (筋炎)。図の矢印の点で針電極を動かしているが、活動電位が低電位であり、ほとんど持続しない。刺入時電位の減少。

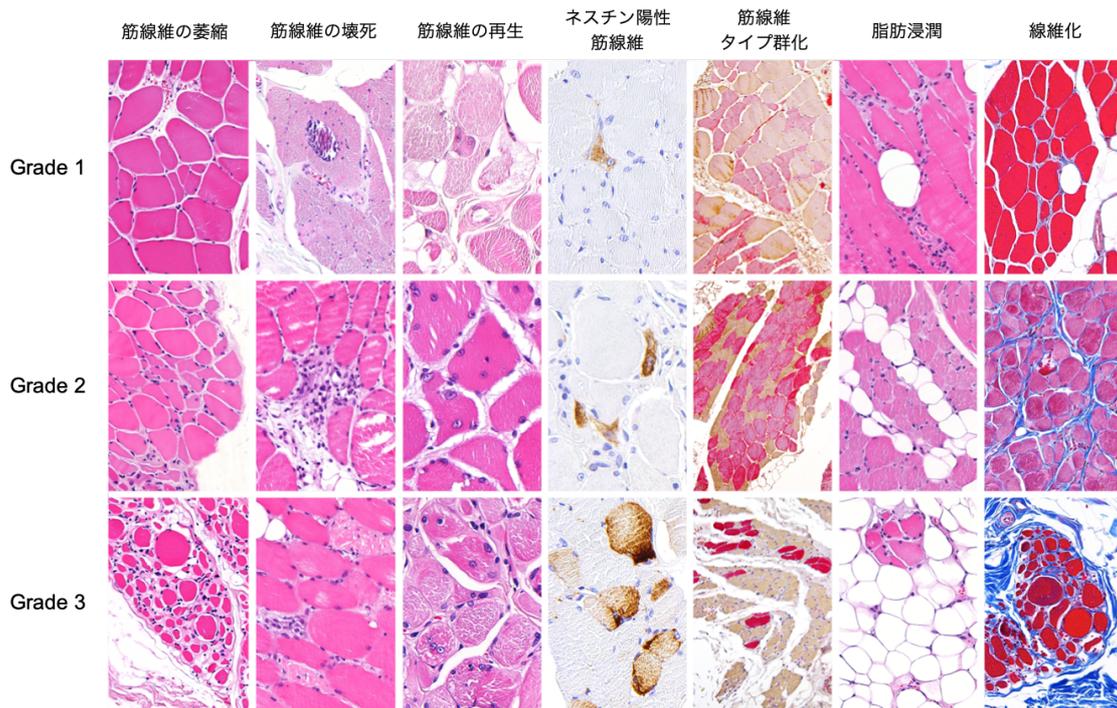
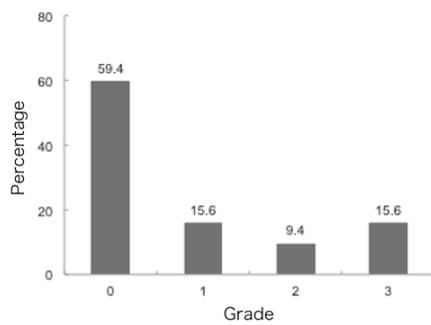


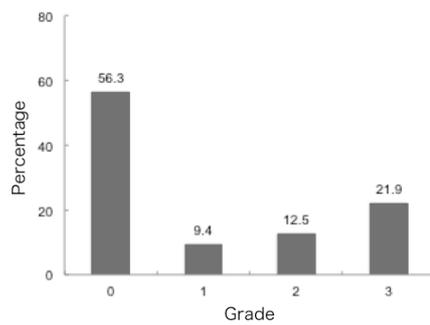
図 2-2 犬の筋疾患における代表的な筋病理所見

筋線維の萎縮、筋線維の壊死および再生、脂肪浸潤は HE 染色、ネスチン陽性筋線維は抗 Nestin 抗体を用いた免疫染色、筋線維タイプ群化は抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた二重免疫染色、線維化はマッソン・トリクローム染色で評価。

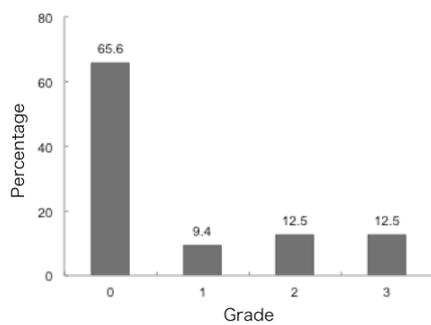
①筋線維の萎縮



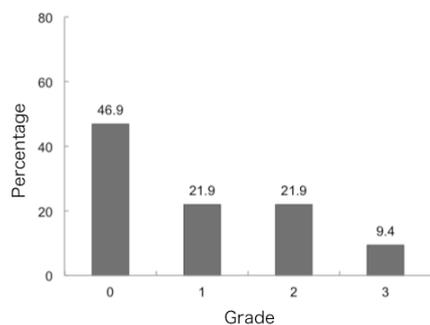
②筋線維の壊死および再生



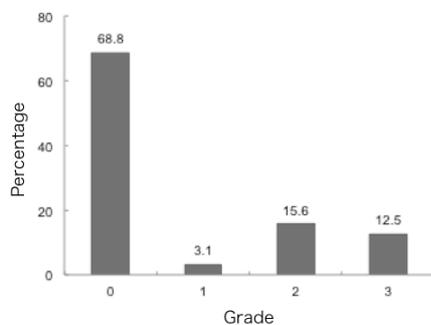
③ネスチン陽性筋線維



④筋線維タイプ群化



⑤脂肪浸潤および線維化

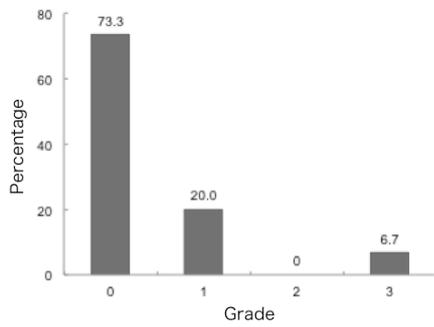


2-3

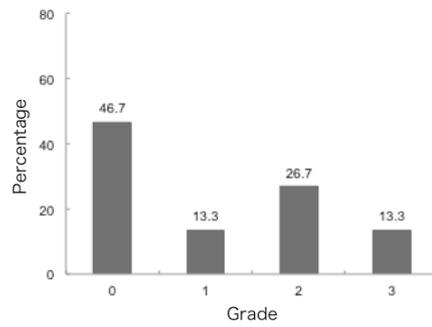
図 2-3 線維自発電位/陽性鋭波が観察された症例の筋病理所見のグレードの割合

線維自発電位/陽性鋭波が観察された症例の筋病理所見は、いずれの項目についてもグレード0の割合が最も高い。所見がある場合はグレード1から3まで様々。

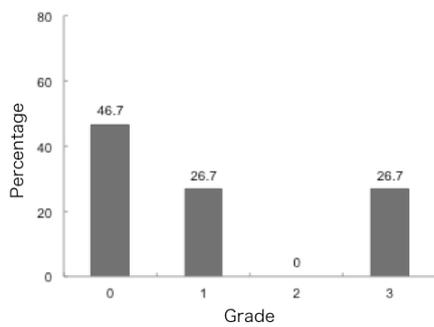
①筋線維の萎縮



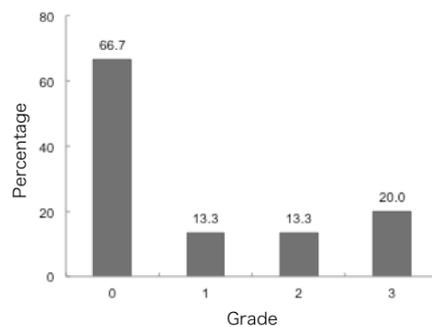
②筋線維の壊死および再生



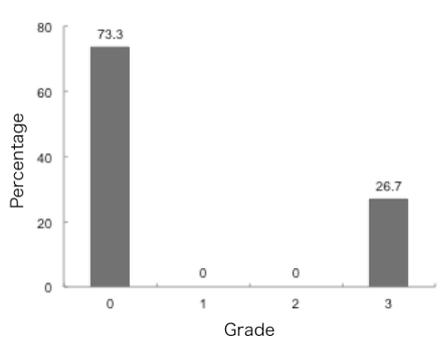
③ネスチン陽性筋線維



④筋線維タイプ群化



⑤脂肪浸潤および線維化



2-4

図 2-4 複合反復放電が観察された症例の筋病理所見のグレードの割合

複合反復放電が観察された症例の筋病理所見は、いずれの項目についてもグレード 0 の割合が最も高い。所見がある場合は高グレードの割合が高い。

第3章

電気生理学的および病理組織学的解析に基づく

犬の筋原性筋疾患の診断および病態解明

序論

第1章および第2章では、犬の筋疾患の病理組織学的および筋電図学的診断法を検討した。犬の遺伝性筋原性筋疾患のなかでは、筋ジストロフィーが最もよく研究されており、ヒトの筋疾患のモデルとしての有用性も示されている。特に、**Dystrophin** 欠損型筋ジストロフィーは、最も一般的な筋ジストロフィーで、多くの犬種で報告されている^{23,86}。したがって、犬の筋疾患研究では、筋ジストロフィーの正確な診断および病態解明が重要である。本章では、筋ジストロフィーが疑われた犬について、病理学的および電気生理学的検査法を用いて疾患解析を行った。

犬の **Dystrophin** 欠損型筋ジストロフィーは、X連鎖劣性遺伝で、主に若齢の雄犬に発生する⁸⁶。ヒトと同様に、完全欠損型と部分欠損型に分類され、筋細胞膜を保持、強化するタンパク質である **Dystrophin** が完全または部分的に欠損することで、筋線維の変性、壊死が進行する²³。完全欠損型は「犬の X 染色体連鎖性筋ジストロフィー canine X-linked muscular dystrophy (CXMD)」と総称され、ヒトの Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に相当する⁸⁷。CXMD は、ゴールデン・レトリバー、ラブラドル・レトリバー、ビーグルなどを含む 20 犬種以上で報告されているが、犬種やコロニーによって症状や生存期間が異なるなど、表現型の多様性が指摘されている²³。また、部分欠損型は日本スピッツおよびラブラドル・レトリバーで報告があ

り、ヒトの **Becker** 型筋ジストロフィー (**BMD**) に相当すると考えられている^{88,89}。第 1 章で検討したように、ホルマリン固定パラフィン切片を用いた **Dystrophin** の免疫染色では安定した結果を得られないため、犬の **Dystrophin** 欠損型筋ジストロフィーの確定診断には、従来通り凍結切片を用いた免疫染色またはウエスタンブロットによる解析が必要である⁵²⁻⁵⁴。

筋強直性ジストロフィー **myotonic dystrophy, dystrophia myotonica (DM)** は、筋強直状態の病的延長 (ミオトニア) と進行性の筋力低下を特徴とする常染色体優性遺伝性筋疾患である。DM は変異遺伝子が異なる **DM1** と **DM2** に分類され、**DM1** では **DMPK** 遺伝子、**DM2** では **ZNF9** 遺伝子に **CTG** または **CCTG** の反復配列が挿入される⁹⁰⁻⁹²。DM の病理発生機序は完全に解明されていないが、いずれの病型でも異常に伸張した **RNA** が核内で凝集することで、種々のスプライシング異常が起こると考えられている⁹³⁻⁹⁵。ヒトでは **Dystrophin** 欠損型筋ジストロフィーと並んで発生頻度の高い遺伝性筋疾患とされ、神経学的検査、電気生理学的検査および遺伝子検査で診断されるため、一般的には筋生検は実施されない⁹⁰。一方で、犬の **DM** の症例報告は少数のみであり、原因遺伝子が不明であるため、診断には電気生理学的検査に加えて筋病理検査が必要である⁹⁶⁻¹⁰⁰。

ラブラドル・レトリバーは筋疾患の好発犬種であり、上述した **Dystrophin** 欠損型筋ジストロフィーに加えて、中心核ミオパチー **centronuclear myopathy (CNM)** が海外で報告されている¹⁰¹⁻¹⁰⁷。ラブラドル・レトリバーの **CXMD** は、出生直後あるいは 6 週齢以下の雄に発症し、後肢の硬直や虚弱、嚥下障害が認められ、進行性疾患のため予後不良である¹⁰⁸。これに対し、**CNM** は 2~7 ヶ月齢で性差なく発症し、運動不耐性や運動失調、疼痛を伴わない筋萎縮が認められる。遺伝

様式は常染色体劣性遺伝で、生後 6~12 ヶ月で臨床症状が安定し、予後が良い¹⁰¹⁻¹⁰⁴。

CNM は *PTPLA* 遺伝子に原因変異があり、PCR 検査により変異型では野生型より長い断片が検出される^{106,107}。*PTPLA* は脂肪酸代謝に関連する小胞体局在性酵素であるが^{109,110}、CNM の病理発生機序については不明な点が多い。

本章の研究では、筋ジストロフィーが疑われた犬の 9 例について、電気生理学的検査および筋病理検査を実施した。このうち 5 例は、国内の単一コロニーで繁殖、管理されているラブラドル・レトリバーに多発した、遺伝性と考えられる筋疾患の症例の一部である。これらの疾患の電気生理学的特徴および病理学的特徴を明らかにすることで、病理発生や病因を検討し、第 1 章および第 2 章で検討した診断法の有用性を検証することを目的とした。

材料と方法

【症例】

症例の概要を表 3-1 に示した。筋生検を実施した若齢の雄犬 3 例 (症例 1~3)、中年齢の雄の柴犬 1 例 (症例 4)、剖検を実施したラブラドル・レトリバー 5 例 (症例 5~9) について検索した。症例 5~9 については、死後に病理解剖し、食道、側頭筋、四肢の筋、脊髄、末梢神経を含む全身臓器を採材した。症例 1、3、4、7、9 については、電気生理学的検査も実施した。なお、症例 1~3 は、第 1 章および第 2 章で検索に用いた症例である。

症例の臨床症状について、表 3-2 にまとめた。症例 5~9 は、いずれも国内の同一コロニー内で維持され、同時期 (発症時の年齢は 3~5 歳) に頻回の吐出および進行性の全身性筋萎縮を示し、臨床的に巨大食道症と診断された個体である。これらの症例については、コロニーの家系図を作成し、コロニー内の各個体の臨床症状の有無について調べた。

【電気生理学的検査】

電気生理学的検査は、筋電図・誘発電位検査装置 Neuropack MEB-9404 (Nihon Koden, Tokyo, Japan) を用いて実施した。神経伝導検査として、運動神経伝導検査、感覚神経伝導検査、F 波検査を、神経筋接合部機能検査として反復刺激誘発筋電図検査を実施した。また、四肢および体幹、症状によっては頭部の筋に対しては、同心針電極を用いた針筋電図検査を実施した。

【病理組織学的検査および免疫染色】

筋生検または剖検により採取した筋組織は、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、定法に従い厚さ 2 μ m のパラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。それぞれ第 1 章で使用した抗体を用いて、抗 Nestin 抗体を用いた免疫染色、抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた二重免疫染色を行った。

【凍結切片を用いた免疫染色】

Dystrophin の発現を評価するために、採取した筋組織の一部を、液体窒素で間接的に凝固点まで冷却したイソペンタン中で凍結固定し、厚さ 8 μ m の凍結切片を作製、免疫染色を実施した。標本は流水後、3%の過酸化水素水を含むメタノールに 4 分間浸漬した。TBS で 5 分×3 回洗浄後、8%のスキムミルク添加 TBS で 37 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートした。その後、第 1 章で使用した抗 Dystrophin 抗体と 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。TBS で 5 分×3 回洗浄後、二次抗体として、Envision+System, HRP-Labelled Polymer Anti-Mouse IgG (Dako) を使用し、37 $^{\circ}$ C、40 分間インキュベートした。TBS で 5 分×3 回洗浄後、最後に DAB を用いて発色し、マイヤーのヘマトキシリンで核を対比染色した。正常な犬の骨格筋組織を陽性コントロールとして用いた。

【Dystrophin タンパク質の抽出およびポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)】

クリオスタットにて薄切した筋切片を 1.5 ml 遠心チューブに集め、100-200 μ L の Modified Laemmli sample buffer (70 mM Tris-HCl (pH6.7)、10%SDS、10 mM EDTA) を加え、20,000 \times g、30 分間の遠心を行ったのち、上層をタンパク質抽出液と

して回収した。回収した抽出液のタンパク質濃度を BCA protein assay reagent (Fujifilm Wako Pure Chemical, Tokyo, Japan) により測定した。タンパク質濃度測定後の溶液に 2-mercaptoethanol を 5%の濃度で加え、95°C で 5 分熱処理した。抽出したタンパク質は、10%の SDS を含むポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。総タンパク質量 20-30mg の試料を各レーンにアプライし、泳動バッファ― (25mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS) 中で 150 V の定電圧下にて 1~1.5 時間泳動した。

【ウエスタンブロット】

ウェット式転写装置ミニトランスブロットセル (BIO-RAD, Hercules, CA) を用いて、45V の定電圧下で一晩メンブレンへのブロッティングを行った。ブロッティングには転写バッファ― (10%MetOH, 25 mM Tris, 190 mM glycine) を用いた。ブロッティング終了後、メンブレンを取り出し、5%スキムミルク、0.1% Tween 20 添加 Tris-buffered-saline (TBS-T) に浸し、室温で 1 時間ブロッキング処理した。抗 Dystrophin 抗体 (免疫染色で使用したものと同一) を TBS-T で希釈し、4°Cにて一晩、ブロッキング後のメンブレンと反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを取り出し、振盪しながら TBS-T で 30 分間洗浄した。二次抗体反応では、1%スキムミルク添加 TBS-T で 5,000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA) を用い、室温で 1 時間反応させた。再び TBS-T で 30 分間洗浄したのち、ECL Western blotting analysis system (GE Healthcare Life Sciences, Tokyo, Japan) により発光させ、BIO-RAD Chemi Doc XRS+ (BIO-RAD) によりバンドを検出、撮影した。

【PCR 法による遺伝子解析】

症例 5、6 および正常犬 2 頭（症例が属するコロニーとは血縁関係のないラブラドル・レトリバー）の肝臓から、DNeasy® Blood & Tissue Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を用いてメーカーのプロトコルに従い DNA を抽出した。CNM の原因遺伝子である *PTPLA* の exon2 について、特異的なプライマーを用いた PCR 法を実施した。変異型の *PTPLA* では、短鎖散在反復配列（SINE）が exon2 に挿入され、野生型では 610bp、変異型では 848bp のバンドが検出される^{14,15}。使用したプライマーは、Forward, ‘5-CCT CGA AGA AGG GTC AGT GTA-3’; Reverse, ‘5-CCA GCC ACA ATC ACA GAA GTA-3’ である。

結果

雄の若齢犬の筋疾患 (症例 1~3)

【電気生理学的所見】

電気生理学的特徴を表 3-2 にまとめた。症例 1 の針筋電図検査では、線維自発電位、陽性鋭波、複合反復放電、ミオトニー放電を認めた。症例 3 の針筋電図検査では、線維自発電位、陽性鋭波を認めた。神経伝導検査において、運動神経伝導速度、感覚神経伝導速度、複合筋活動電位の振幅はいずれも正常であった。また、F 波検査において、F 波伝導速度、F 波出現率、F 波振幅もいずれも正常であった。神経筋接合部機能検査（反復刺激誘発筋電図検査）の結果も正常であった。

【病理組織学的所見および免疫組織化学的所見】

病理組織学的、免疫組織化学的特徴を表 3-2 にまとめた。組織観察では、主に筋線維の大小不同、壊死および再生が観察された。症例 1 では筋線維の壊死は稀であった（図 3-1a）。症例 2 では筋線維の大小不同が顕著であり、肥大線維を多見した。また、筋線維の壊死を散在性に認め、間質の線維増生を認めた（図 3-1b）。症例 3 では、筋線維の大小不同は軽度であったが、壊死が顕著であり、壊死線維内に単核細胞（マクロファージあるいは筋芽細胞）が重度に浸潤していた（図 3-1c）。症例 2、3 では、症例 1 に比べて、筋病変が重度であった。

抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた二重免疫染色では、全ての症例で正常な遅筋、速筋線維のモザイクパターンを認めた。抗 Nestin 抗体を用いた免疫染色では、症例 1 で Nestin 陽性の再生線維が散在性に認められたのに

対し(図 3-2a)、症例 2、3 では Nestin 陽性の再生線維が群を形成していた(図 3-2b,c)。

いずれの症例も採材部位による病変の顕著な違いはみられなかった。

【抗 Dystrophin 抗体を用いた免疫染色】

免疫染色において、症例 1 で筋細胞膜の Dystrophin の発現低下、症例 2、3 で筋細胞膜の Dystrophin の発現欠損を認めた(図 3-3)。

【抗 Dystrophin 抗体を用いたウエスタンブロット】

ウエスタンブロットにおいて、正常犬では 427kDa の Dystrophin のバンドが検出されたが、症例 2、3 では検出されなかった(図 3-4)。なお、症例 1 についてはウエスタンブロットを実施するのに十分な量の凍結筋材料を確保できなかった。

柴犬の筋疾患 (症例 4)

【電気生理学的所見】

電気生理学的特徴を表 3-2 にまとめた。針筋電図検査では、刺入時電位の低下および低電位のみオトニー放電を認めた(図 3-5)。神経伝導検査において、運動神経伝導速度、感覚神経伝導速度、複合筋活動電位振幅はいずれも正常であった。また、F 波検査において、F 波伝導速度、F 波出現率、F 波振幅もいずれも正常であった。神経筋接合部機能検査(反復刺激誘発筋電図検査)の結果も正常であった。

【病理組織学的所見および免疫組織化学的所見】

病理組織学的、免疫組織化学的特徴を表 3-2 にまとめた。組織観察では、筋

線維の大小不同、高頻度の内在核および脂肪組織浸潤を認めた（図 3-6a）。また、小角化線維を散見した。一部の筋束では、濃染核集塊（Pyknotic nuclear clump）を有する筋線維を認めた（図 3-6b）。なお、採取した筋組織には評価可能な末梢神経組織を認めなかった。

抗 Slow myosin 抗体および抗 Canine fast myosin 抗体を用いた免疫染色では、筋線維タイプのモザイクパターンが失われ、採取組織に含まれるほぼ全ての筋線維が Slow myosin 陽性であった（遅筋線維優位、type 1 fiber predominance）（図 3-7a）。また、Slow myosin および Canine fast myosin の両方に陽性を示す筋線維が多数認められ、濃染核集塊を有する萎縮線維は Canine fast myosin 陽性、Slow myosin 陰性であった（図 3-7b,c）。抗 Nestin 抗体を用いた免疫染色では、内在核を有する筋線維は Nestin 陰性であった。抗 Dystrophin 抗体を用いた免疫染色では、Dystrophin の正常な発現を認めた。

ラブラドル・レトリバーの同一コロニーにおける筋疾患（症例 5～9）

【家系図解析】

症例 5～9 を含む、ラブラドル・レトリバーの家系図の一部を図 3-8 に示した。特定の遺伝様式はみられなかった。

【電気生理学的所見】

電気生理学的特徴を表 3-2 にまとめた。症例 7、9 の針筋電図検査では、食道筋および後肢の筋群から線維自発電位、陽性鋭波を認めた。神経伝導検査において、運動神経伝導速度、感覚神経伝導速度は正常だったが、複合筋活動電位振幅の低下および

波形の時間的分散を認めた。また、F波検査において、F波伝導速度の遅延、F波出現率の低下、F波振幅の低下を認めた。神経筋接合部機能検査(反復刺激誘発筋電図検査)の結果はいずれも正常であった。

【病理解剖学的所見】

全例に四肢骨格筋の萎縮を認め(図 3-9a)、症例 5~7 では側頭筋の萎縮が顕著であった(図 3-9b)。また、全例で重度の食道拡張、食道壁の菲薄化が認められた(図 3-9c,d)。死因は、すべての個体で誤嚥性肺炎であった。症例 9 では、L3-4 椎間部において椎間板物質が突出し、脊髄を圧迫していた。症例 5~8 の脳、脊髄および末梢神経に著変はみられなかった。その他の臓器に著変は見られなかった。

【神経組織の病理組織学的所見】

症例 8 では脊髄神経根の軽度の脱髄および軸索膨化を認めた。症例 9 では、圧迫されていた部位(腰髄)で脊髄軟化を認めた。その他の症例では、中枢神経組織および末梢神経組織に形態学的異常はみられなかった。

【筋組織の病理組織学的所見および免疫組織化学的所見】

病理組織学的、免疫組織化学的特徴を表 3-2 にまとめた。食道横紋筋には、筋線維の萎縮、筋線維の壊死および再生、石灰沈着、線維化を認めたが、壊死および再生、線維化の程度は症例により異なっていた。筋線維の萎縮による筋層の菲薄化は全例に共通して認められた(図 3-10)。

側頭筋の組織病変は症例により様々であった。症例 5、7 では筋線維の重度の

萎縮および大小不同、線維化、症例 6 では筋線維のびまん性の萎縮と筋線維の変性、症例 8、9 では筋線維の軽度の大小不同を認めた（図 3-11）。中心核筋線維については、症例 6 で散見し、症例 8、9 で多見した。

四肢の骨格筋では、筋線維の大小不同、筋線維の変性、壊死、石灰沈着、線維化を認めた。筋線維の再生は稀であり、中心核筋線維は見られなかった。また、全例で小角化線維および群萎縮を認めた（図 3-12）。これらの病変は全例で、前肢に比べ後肢でより顕著であったが、遠位と近位では病変の程度に差を認めなかった。

抗 *Slow myosin* 抗体および抗 *Canine fast myosin* 抗体を用いた免疫染色の結果、全例の四肢骨格筋で遅筋、速筋線維の両方が萎縮する小角化線維あるいは群萎縮を認めた（図 3-13a）。また、症例 8、9 の一部の筋では、筋線維タイプ群化を認めた（図 3-13b）。全例の食道横紋筋で、正常犬に比べて *Slow myosin* 陽性の筋線維の割合が著しく増加していた（遅筋線維優位）（図 3-14）。また、同部位では、*Slow myosin* および *Canine fast myosin* の両方に陽性を示す筋線維が多数認められた。抗 *Nestin* 抗体を用いた免疫染色では、全例の食道横紋筋および症例 5、9 の骨格筋の一部で *Nestin* 陽性の再生線維を散見した（図 3-15a,b）。症例 8、9 における抗 *Dystrophin* 抗体を用いた免疫染色では、*Dystrophin* の正常な発現を認めた。

【*PTPLA* 遺伝子解析】

PTPLA 遺伝子の exon2 に特異的なプライマーを用いた PCR では、正常犬および症例 5、6 の増幅産物の各バンドはいずれも 800bp から 900bp の位置に検出され、野生型の 610bp のバンドは検出されなかった（図 3-16）。

考察

本章では、筋ジストロフィーが疑われた犬の症例について、電気生理学および病理学組織的解析を行った。また、Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーを診断するために、全例で Dystrophin タンパク質の発現を評価した。さらに、ラブラドル・レトリバーの筋疾患症例については、遺伝様式の推定と CNM の遺伝子検査も実施した。

抗 Dystrophin 抗体を用いた免疫染色あるいはウェスタンブロットの結果から、症例 1～3 を Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーと診断し、症例 1 を部分欠損型、症例 2、3 を完全欠損型に分類した。犬の Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーの主な臨床症状は、筋力低下、歩様異常、嚥下障害などであり、症例 1、2 の臨床症状は過去の報告と類似していた¹¹⁾。一方、症例 3 では骨格筋に安静時異常電位を認め、重度の筋組織病変を認めたにも関わらず、臨床症状は明らかでなかった。犬の Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーでは、筋組織に壊死、再生が観察されるが、筋力低下などの臨床症状を示さない例外的な症例が報告されている^{24,25)}。これらを考え合わせると、犬の Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーでは、症状と筋病変の程度が関連せず、異常電位が発生している状態でも骨格筋がほぼ正常に機能する可能性があると考えられた。筋ジストロフィーにおける筋病変の程度と異常電位の関連については、さらに症例数を増やして検討する必要があると思われる。また、群をなして存在する Nestin 陽性の再生線維は症例 2、3 でのみ認められたことから、DM やラブラドル・レトリバーの筋疾患に比べて、Dystrophin 完全欠損型の筋ジストロフィーでは筋再生が活発であることが示唆された。

ヒトの DM では、臨床症状としてミオトニアを認め、ミオトニー放電を特徴とする筋電図所見と、高頻度の内在核および濃染核集塊、遅筋線維の割合が増加する遅筋線維優位などの病理組織学的所見を特徴的に認める⁹⁰。今回の犬の症例 4 においても、同様の臨床症状、筋電図所見、病理組織学的所見を認めたため、本症例を犬の DM と診断した。特に、遅筋線維優位については、正常な犬の頸部多裂筋の遅筋線維の割合が 70%であるのに対し¹¹²、本症例では遅筋線維の割合がほぼ 100%であった。犬の DM についての過去の報告では、本症例と同様にミオトニアおよびミオトニー放電、高頻度の内在核などの所見が認められたが、遅筋線維優位については言及されておらず、本症例で認めなかった筋線維の断裂 (myofiber splitting) が報告されている⁹⁶⁻¹⁰⁰。ミオトニー放電は本研究の症例 1 でも認められ、ヒトでもミオトニアを伴わない筋原性筋疾患で認められると報告されているように、疾患特異的な異常電位ではない⁶⁰。しかし、ミオトニアを伴うミオトニー放電は、DM や先天性ミオトニーなどの疾患を強く疑う所見である⁹¹。遅筋線維優位も同様に疾患特異的な組織変化ではないが、高頻度の内在核とあわせて認められた場合は、DM が強く疑われる⁹⁰。また、遅筋線維優位はヒトの DM1 と DM2 に共通の特徴であるが、本症例の濃染核集塊を有する萎縮線維の免疫染色結果はヒトの DM2 と類似していた⁹⁰。さらに、Slow myosin および Canine fast myosin の両方に陽性を示した筋線維は、遅筋と速筋の中間的な性質を有する type2C 線維 (ハイブリッド筋線維) に相当すると考えられ、高頻度のハイブリッド筋線維は、ヒトの DM の過去の報告と一致する⁹⁰。以上より、DM の診断においては、電気生理学的特徴および病理学的特徴を総合的に判断することが特に重要と考えられた。

症例 5~9 については、従来のラブラドル・レトリバーの CNM とは異なる新たな筋疾患と考えられた。ラブラドル・レトリバーに好発する CNM では、特

に側頭筋、四肢の近位筋の萎縮が見られ、組織学的に筋線維の大小不同、筋線維の壊死および再生などの筋原性変化に加えて、中心核筋線維を特徴的に認める。さらに、小角化線維や群萎縮、筋線維タイプ群化などの神経原性変化および速筋線維（type2 線維）の選択的萎縮を認めることも報告されている^{101,102}。臨床的に巨大食道症と診断された重症例の報告もあるが、CNM に特異的な所見ではない¹⁰⁵。症例 5～9 の全例に共通する特徴は、巨大食道症と食道横紋筋の重度の組織病変、四肢骨格筋の筋原性変化と神経原性変化が混在する組織病変である。側頭筋の萎縮および中心核筋線維は全例に共通した所見ではなく、遺伝子検索の結果、特異的な遺伝子変異が認められなかったことから CNM を否定した。また、発症年齢、性別および Dystrophin の発現低下がみられなかったことから、Dystrophin 異常症も否定した。本症については、同一コロニーで同年齢に発生していることおよび病態の共通性から遺伝性筋疾患が疑われたが、その遺伝様式は単純ではないと推測された。

症例 5～9 の四肢骨格筋では、症例 9 を除いて神経組織に顕著な病理組織学的異常を認めなかったにもかかわらず、遅筋、速筋線維の両方が萎縮する小角化線維あるいは群萎縮、筋線維タイプ群化などの神経原性変化を認めた。また、神経伝導検査および筋電図検査の結果は、運動神経近位部の脱髄または軸索変性、および脱神経による骨格筋の異常放電を示唆する所見であり、電気生理学的解析と病理学的解析の結果が一致しなかった。一方、食道筋組織で認められた遅筋線維優位は、DM や筋ジストロフィー、先天性ミオパチーなど、様々な筋原性疾患に認められる非特異的变化である²。食道筋では神経原性変化は認められず、四肢骨格筋とは異なる病理発生機序が考えられた。筋原性変化と神経原性変化が混在する原因については不明であったが、猫の代表的な筋原性筋疾患である Laminin $\alpha 2$ 欠損型筋ジストロフィーでは、神経組織および筋組織の両

方に分布する Laminin $\alpha 2$ の欠損により、脱髄性ニューロパチーが生じることが報告されている^{113,114}。従って、ラブラドル・レトリーバーの本症においても、神経組織および筋組織の両方に分布する分子の異常について検索する必要があると考えられた。

以上より、第 1 章、第 2 章で検討した診断法は、特に DM の診断に有用であったが、ラブラドル・レトリーバーの新規筋疾患については、筋原性と神経原性の鑑別が困難であった。病理学的および筋電図学的診断法はいずれも、筋組織または神経組織が傷害された結果を観察することで疾患の鑑別を行っている。したがって、筋原性と神経原性の両方の特徴を有するような筋疾患の鑑別には、傷害の原因である分子学的異常を検索する必要があると考えられた。

要約

本章では、筋ジストロフィーが疑われた犬 9 例について、第 1 章および第 2 章で検討した病理学および筋電図学的診断法を用いて解析した。抗 Dystrophin 抗体を用いた免疫染色およびウエスタンブロットの結果から、症例 1~3 を Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーと診断し、症例 1 を部分欠損型、症例 2、3 を完全欠損型に分類した。症例 4 については、臨床症状のミオトニア、ミオトニー放電を特徴とする筋電図所見、高頻度の内在核および濃染核集塊、遅筋線維優位などの病理組織学的所見に基づいて、犬の筋強直性ジストロフィー (DM) と診断した。症例 5~9 は筋疾患の好発犬種であるラブラドル・レトリバーで、巨大食道症と食道横紋筋の重度の病変、四肢骨格筋の筋原性変化と神経原性変化が混在する病変が全例に共通する特徴であった。側頭筋の萎縮および中心核筋線維は全例に共通した所見ではなく、また遺伝子検索で特異的な遺伝子変異が認められなかったことから、本犬種で報告がある中心核ミオパチー (CNM) を否定した。同一コロニーで、ほぼ同一の年齢に発生していることや病態の共通性より、巨大食道症を特徴とする新規の遺伝性筋疾患が疑われた。

以上より、第 1 章および第 2 章で検討した診断法は、特に DM の診断に有用であった。しかしながら、ラブラドル・レトリバーの新規筋疾患については、筋原性と神経原性の鑑別が困難であった。

表3-1 症例の情報

症例	犬種	性別	年齢	採材方法	筋の採材部位
1	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	オス	2歳9ヶ月	生検	上腕三頭筋、橈側手根伸筋、腓腹筋
2	ボメラニアン	オス	0歳11ヶ月	生検	深胸筋、外腹斜筋、顎舌骨筋
3	ミニチュア・シュнауザー	オス	1歳2ヶ月	生検	上腕三頭筋、大腿四頭筋
4	柴犬	オス	8歳	生検	頸部多裂筋
5	ラブラドル・レトリバー	オス	4歳8ヶ月	剖検	側頭筋、前肢近位、前肢遠位、後肢筋
6	ラブラドル・レトリバー	オス	5歳10ヶ月	剖検	側頭筋、咬筋、最長筋、前肢近位、前肢遠位、後肢遠位
7	ラブラドル・レトリバー	メス	5歳	剖検	側頭筋、咬筋、最長筋、前肢近位、前肢遠位、後肢近位、後肢遠位
8	ラブラドル・レトリバー	メス	8歳6ヶ月	剖検	側頭筋、大腿四頭筋、大腿二頭筋、前頸骨筋、腓腹筋、脊椎周囲の筋
9	ラブラドル・レトリバー	オス	11歳3ヶ月	剖検	側頭筋、棘上筋、上腕三頭筋、大腿直筋、前脛骨筋

表3-2 症例の臨床症状、電気生理学的、病理組織学的および免疫組織化学的特徴

症例	主な臨床症状	電気生理学的所見		病理組織学的特徴	筋病理所見	
		神経伝導検査所見	針筋電図所見		免疫組織化学的特徴	
				筋線維タイプの分布 (Slow & Fast myosin)		脱神経筋線維の分布 (Nestin)
1	歩様異常	正常	線維自発電位 陽性鋭波 複合反復放電 ミオトニー放電	筋線維の大小不同、 筋線維の壊死、再生 (症例1：軽度、 症例2、3：重度)	遅筋、速筋線維の 正常なモザイクパターン (全例)	散在性
2	嚙下困難	NA	NA			群形成
3	なし	正常	線維自発電位 陽性鋭波			群形成
4	ミオトニア 頭部下垂 表情消失	正常	刺入時電位の低下 ミオトニー放電	筋線維の大小不同 高頻度の内在核 濃染核集塊	遅筋線維優位	なし
5		NA	NA			
6		NA	NA			
7	吐出 (巨大食道症) 全身性筋萎縮	複合筋活動電位振幅低下 F波伝導速度の遅延 F波出現率の低下 F波振幅の低下	線維自発電位 陽性鋭波	筋線維の萎縮、大小不同 筋線維の変性、壊死、再生 線維化、小角化線維、群萎縮 (全例)	遅筋、速筋線維の 両方が萎縮する 小角化線維あるいは群萎縮 (全例)	散在性
8		NA	NA	中心核筋線維 (症例6、8、9)	筋線維タイプ群化 (症例8、9)	
9		複合筋活動電位振幅低下 時間的分散 F波出現率の低下 F波振幅の低下	線維自発電位 陽性鋭波			

NA：評価なし

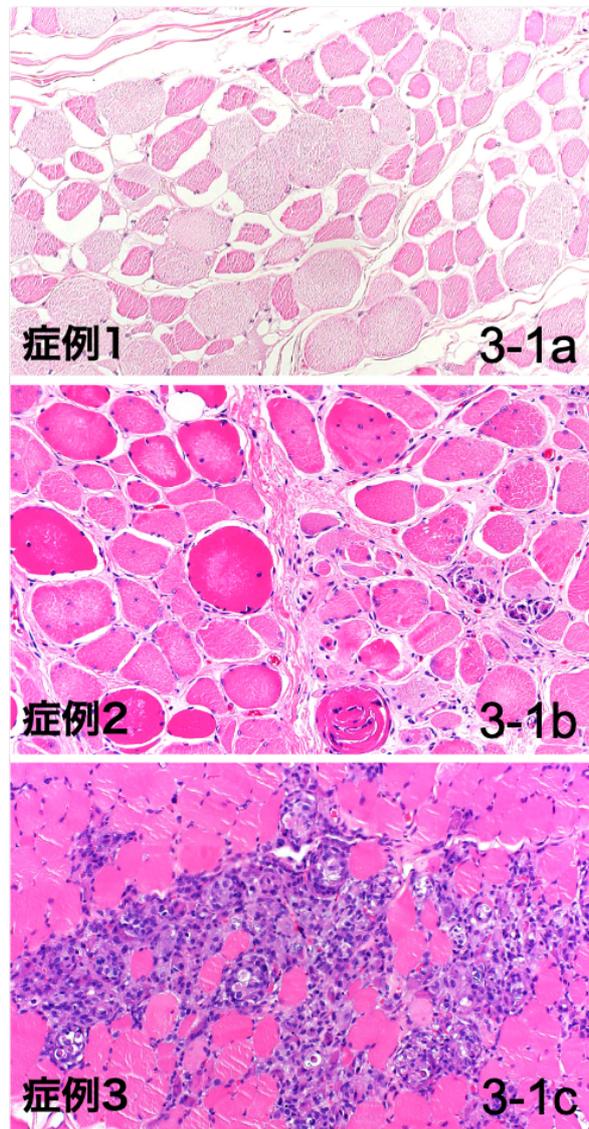


図 3-1 症例 1～3 の筋病理所見。HE 染色。ホルマリン固定筋組織。

(a) 症例 1、橈側手根伸筋。筋線維の壊死は稀。(b) 症例 2、外腹斜筋。筋線維の大小不同が顕著であり、肥大線維を多見する。また、筋線維の壊死を散在性に認める。(c) 症例 3、上腕三頭筋。筋線維の大小不同は軽度であり、重度の筋線維の壊死を認める。壊死線維内に単核細胞（マクロファージあるいは筋芽細胞）が重度に浸潤する。

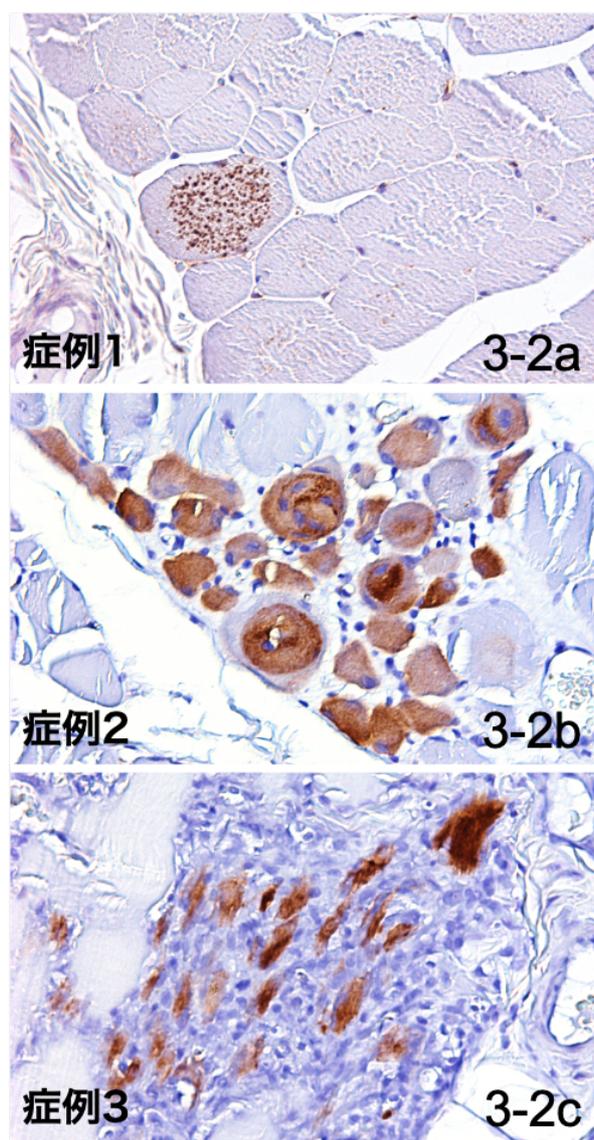


図 3-2 症例 1～3 の免疫組織化学的特徴。抗 Nestin 抗体を用いた免疫染色。ホルマリン固定筋組織。

(a) 症例 1、橈側手根伸筋。Nestin 陽性の再生線維を散在性に認める。(b) 症例 2、外腹斜筋。Nestin 陽性の小径から大径の再生線維が群を形成する。(c) 症例 3、上腕三頭筋。壊死部において、Nestin 陽性の小径の再生線維が群を形成する。

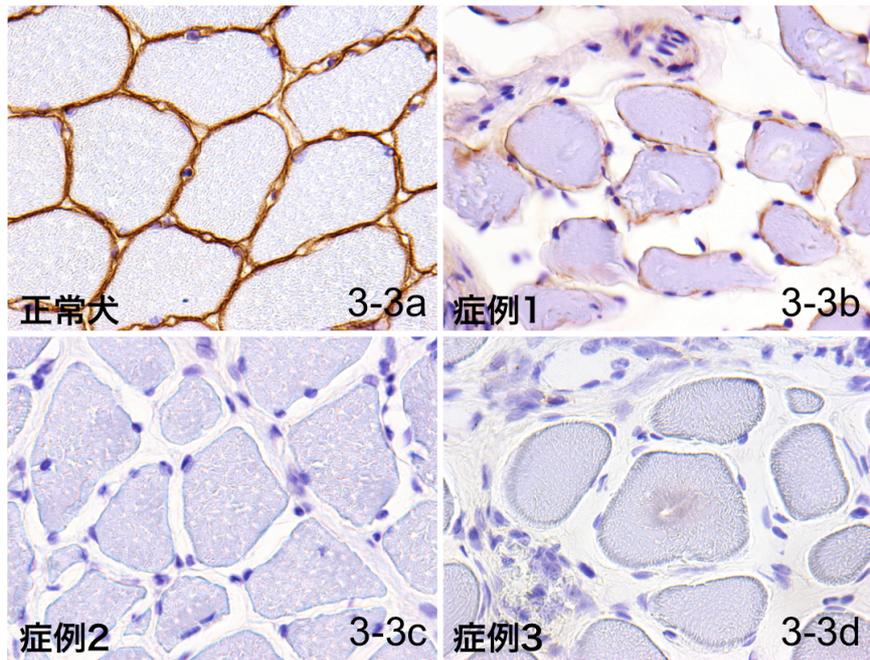
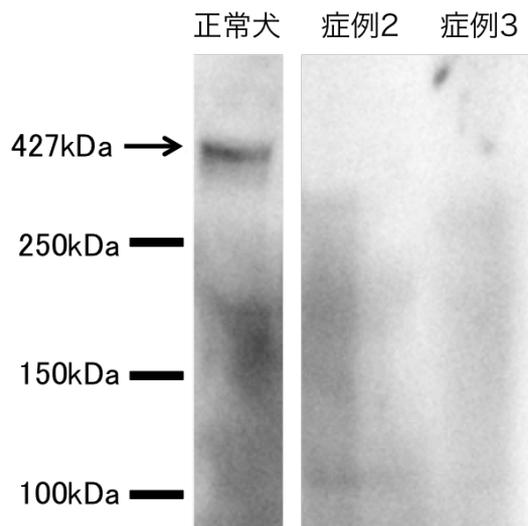


図 3-3 抗 Dystrophin 抗体を用いた免疫染色。凍結筋組織。

(a) 正常犬。筋細胞膜に Dystrophin の正常な発現を認める。(b) 症例 1。筋細胞膜の Dystrophin の発現低下を認める。(c, d) 症例 2 および症例 3 では、いずれも筋細胞膜の Dystrophin の欠損を認める。



3-4

図 3-4 抗 Dystrophin 抗体を用いたウエスタンブロット

正常犬では 427kDa の Dystrophin のバンドを認めるが、症例 2、3 では認めない。

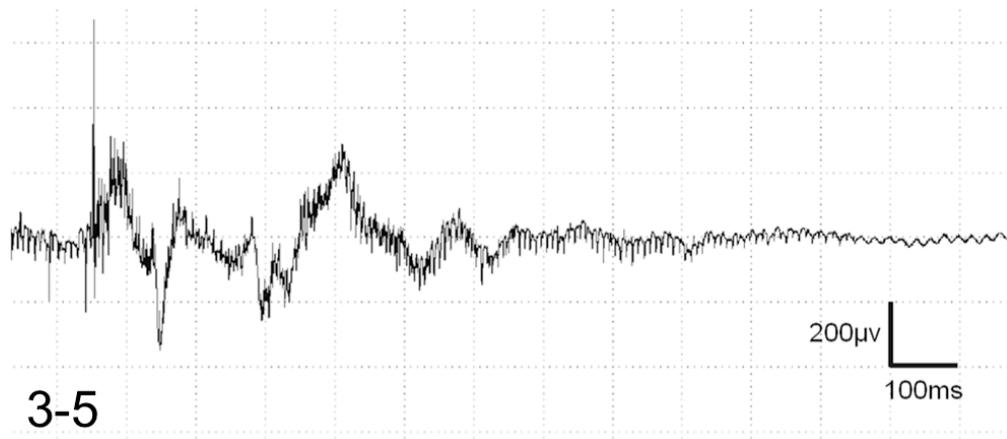


図 3-5 症例 4 の針筋電図所見。頸部多裂筋。

刺入時電位の低下および振幅の漸減と周波数の変化を特徴とする低電位のみオトニー放電を認める。

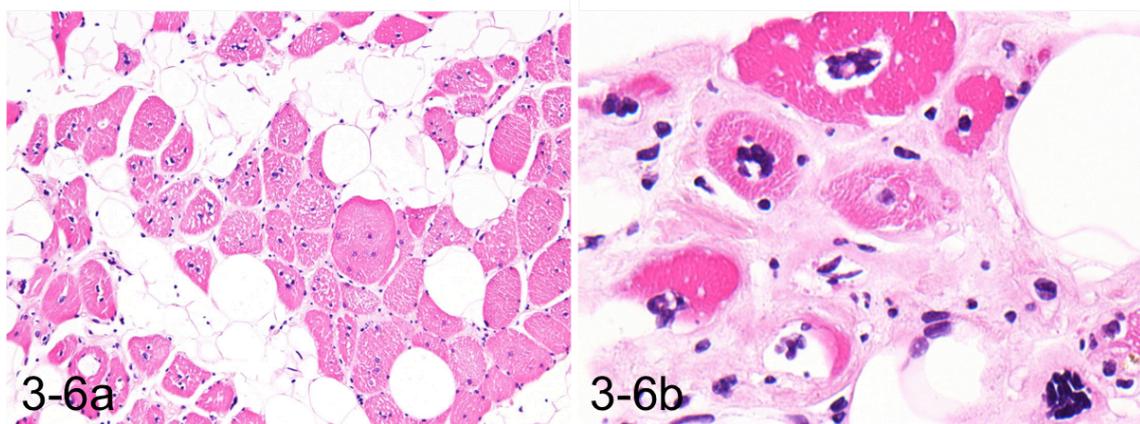


図 3-6 症例 4 の筋病理所見。頸部多裂筋。HE 染色。ホルマリン固定筋組織。

(a) 筋線維の大小不同および脂肪組織浸潤を認め、小角化線維を散見する。また、内在核を有する筋線維を多見する。(b) 一部の筋束では、濃染核集塊 (Pyknotic nuclear clump) を有する筋線維を認める。

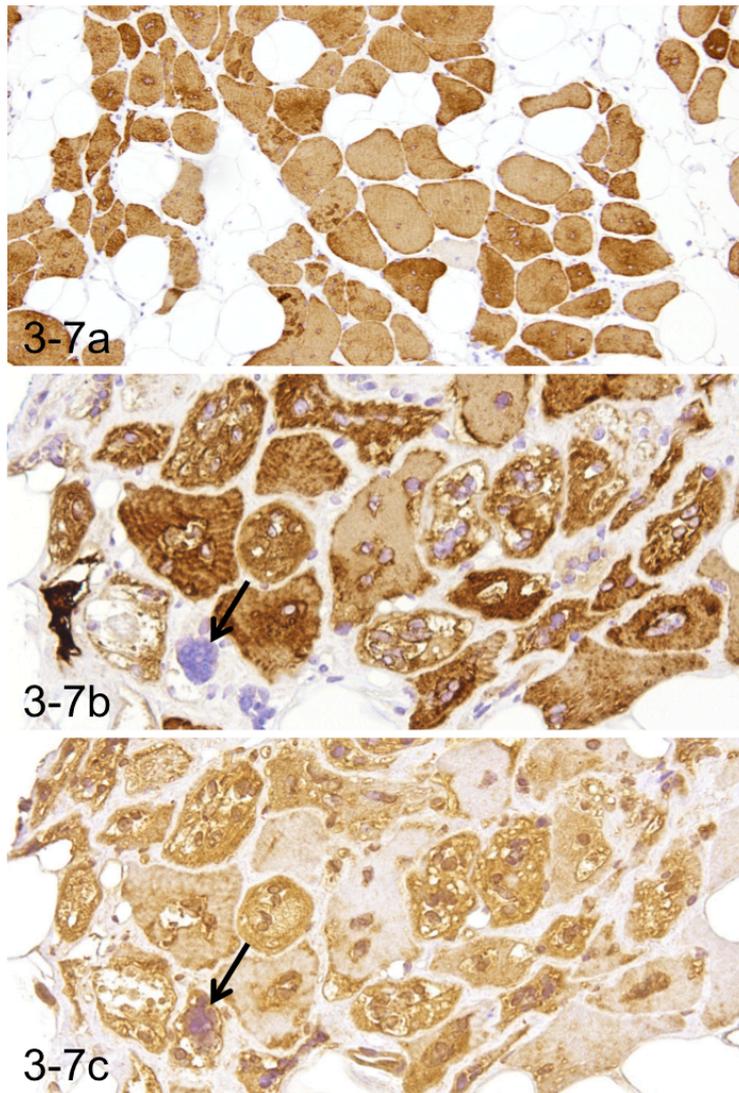


図 3-7 症例 4 の免疫組織化学的特徴。頸部多裂筋。抗 Slow myosin 抗体 (a, b) および抗 Canine fast myosin 抗体 (c) を用いた免疫染色 (b, c は連続切片)。ホルマリン固定筋組織。

(a) 筋線維タイプのモザイクパターンが失われ、遅筋線維 (type1 線維) が優位である (type 1 fiber predominance)。 (b, c) Slow myosin (b) および Canine fast myosin (c) の両方に陽性を示す筋線維を多数認める。また、濃染核集塊を有する萎縮線維 (矢印) は Canine fast myosin 陽性 (c)、Slow myosin 陰性 (b) (矢印)。

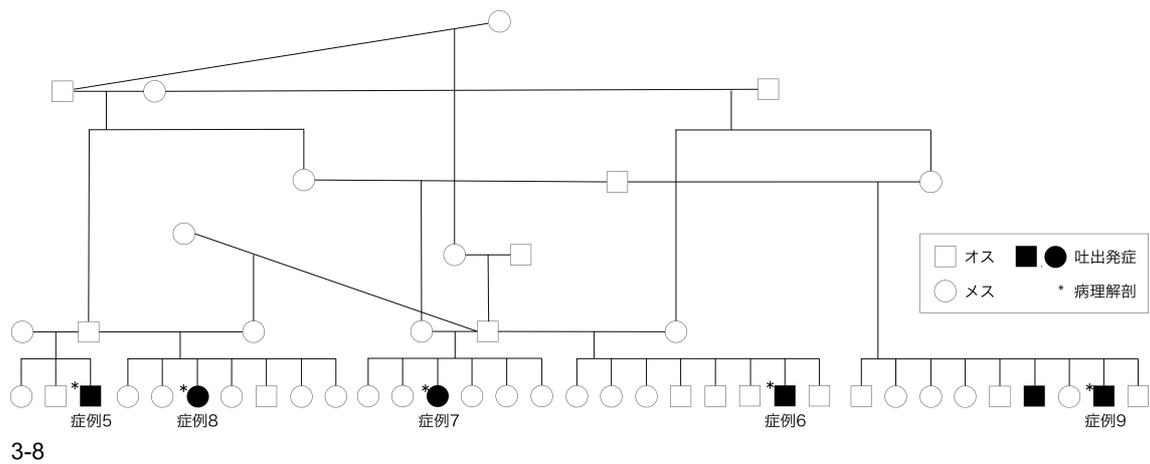


図 3-8 症例 5～9 を含むラブラドル・レトリバーコロニーの家系図（一部抜粋）。
 臨床的に巨大食道症を認めた症例を黒い四角（雄）または丸（雌）で示した。特定の遺
 伝様式はみられなかった。

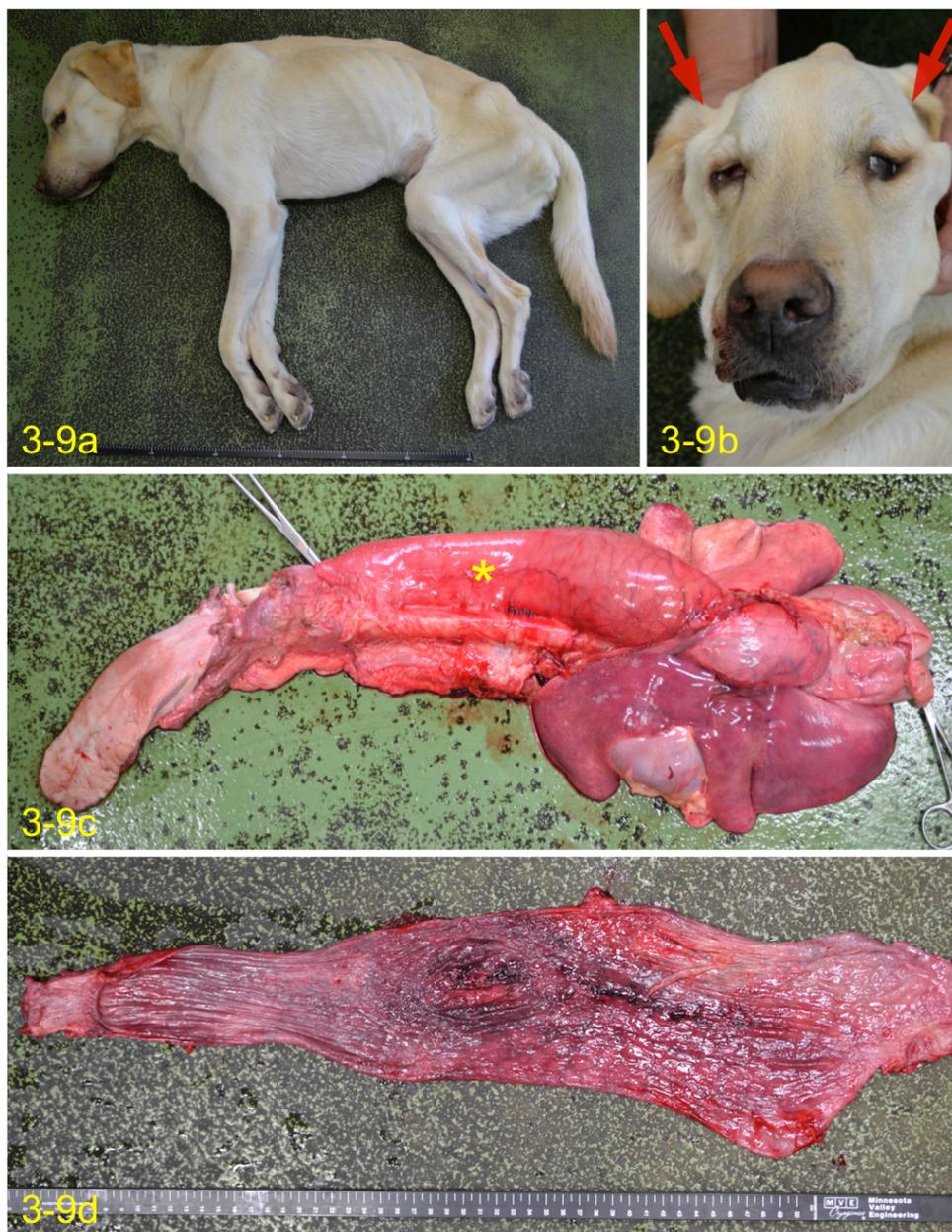


図 3-9 症例 5～9 の代表的な肉眼所見。左側が頭側、右側が尾側。

(a) 症例 6。四肢骨格筋が重度に萎縮する。(b) 症例 6。側頭筋の萎縮が顕著 (矢印)。

(c) 症例 5。食道 (*) が重度に拡張し、特に下部 (尾側) で顕著。(d) 症例 8。食道壁が菲薄化し、特に下部 (尾側) で顕著。粘膜面は全体的に発赤し、糜爛、潰瘍も認められる。

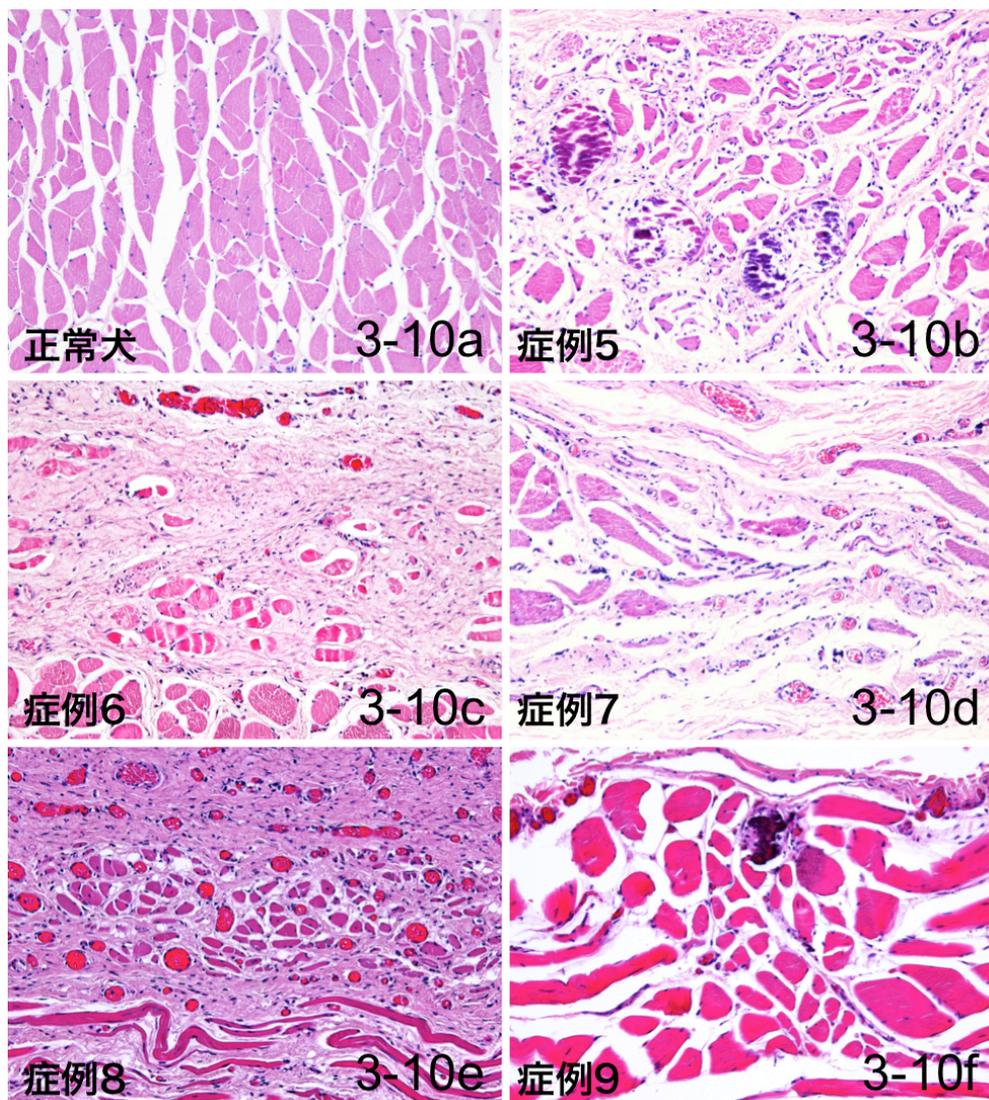


図 3-10 症例 5～9 の食道筋の筋病理所見。HE 染色。ホルマリン固定筋組織。

全例に共通して、筋線維の萎縮による筋層の菲薄化を認める。症例 5 (b)、9 (f) では筋線維の壊死、石灰沈着を認め、症例 6 (c)、8 (e) では重度の線維化を認める。症例 7 (d) では、筋線維の萎縮、消失が顕著。

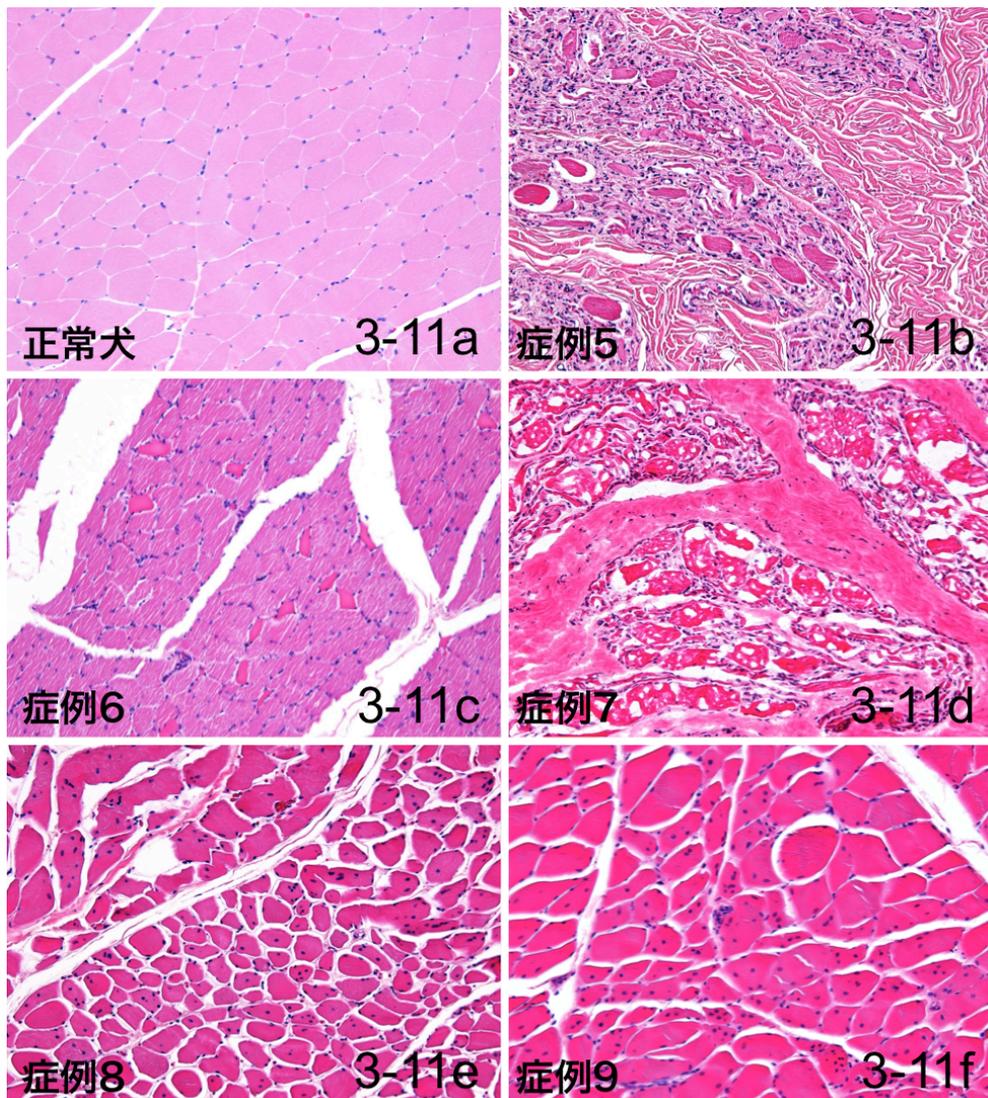


図 3-11 症例 5～9 の側頭筋の筋病理所見。HE 染色。ホルマリン固定筋組織。
 症例 5 (b)、7 (d) では筋線維が重度に萎縮し、重度の線維化も認める。症例 6 (c) では筋線維がびまん性に萎縮し、筋線維の変性を多見する。症例 8 (e)、9 (f) では筋線維の萎縮は軽度であるが、中心核筋線維を多見する。

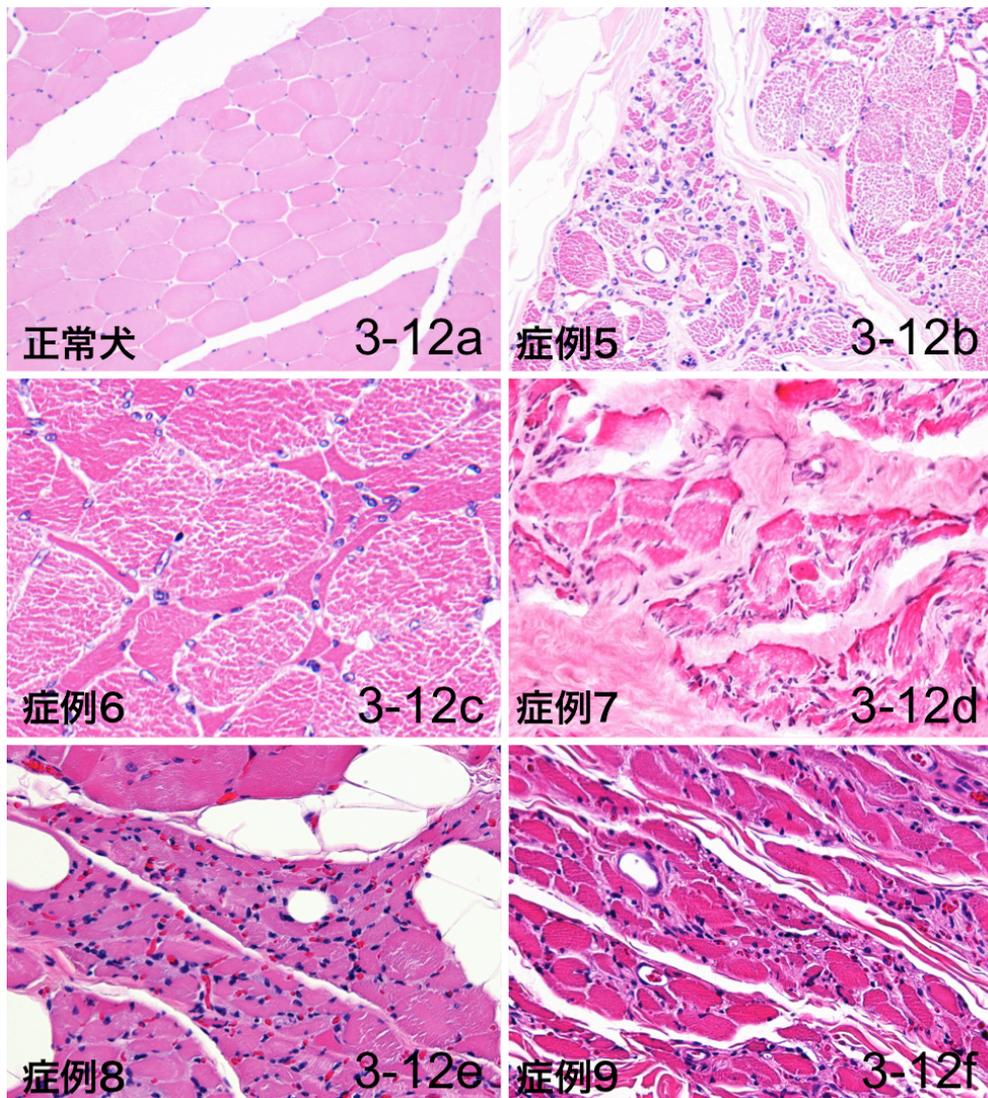


図 3-12 症例 5～9 の後肢筋の筋病理所見。HE 染色。ホルマリン固定筋組織。

症例 6 (c) では小角化線維および小群萎縮、症例 5 (b) 、7～9 (d, e, f) では大群萎縮を認める。症例 7 (d) では線維化、症例 8 (e) では脂肪組織浸潤も認める。

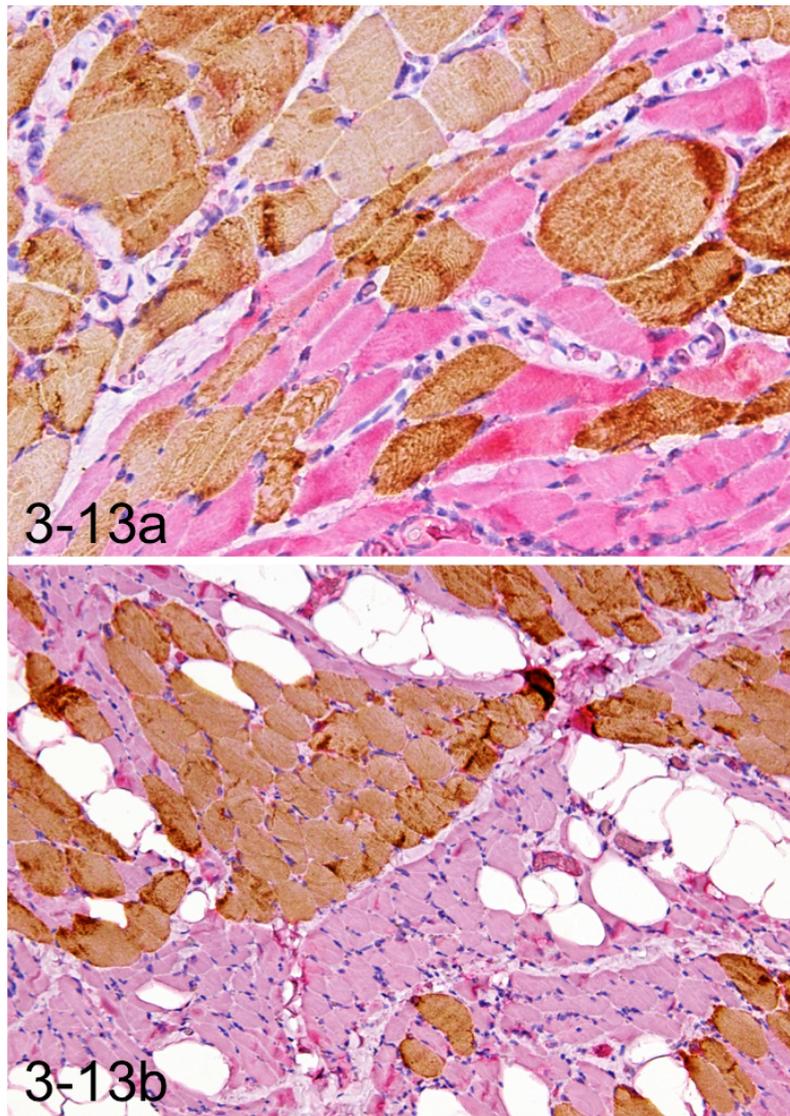


図 3-13 症例 8 の免疫組織化学的特徴。抗 Slow myosin 抗体（赤色）および抗 Canine fast myosin 抗体（茶色）を用いた二重免疫染色。ホルマリン固定筋組織。

(a) 後肢筋。遅筋、速筋線維の両方が萎縮する群萎縮。(b) 後肢筋。遅筋、速筋線維それぞれがグループ化する（筋線維タイプ群化）。

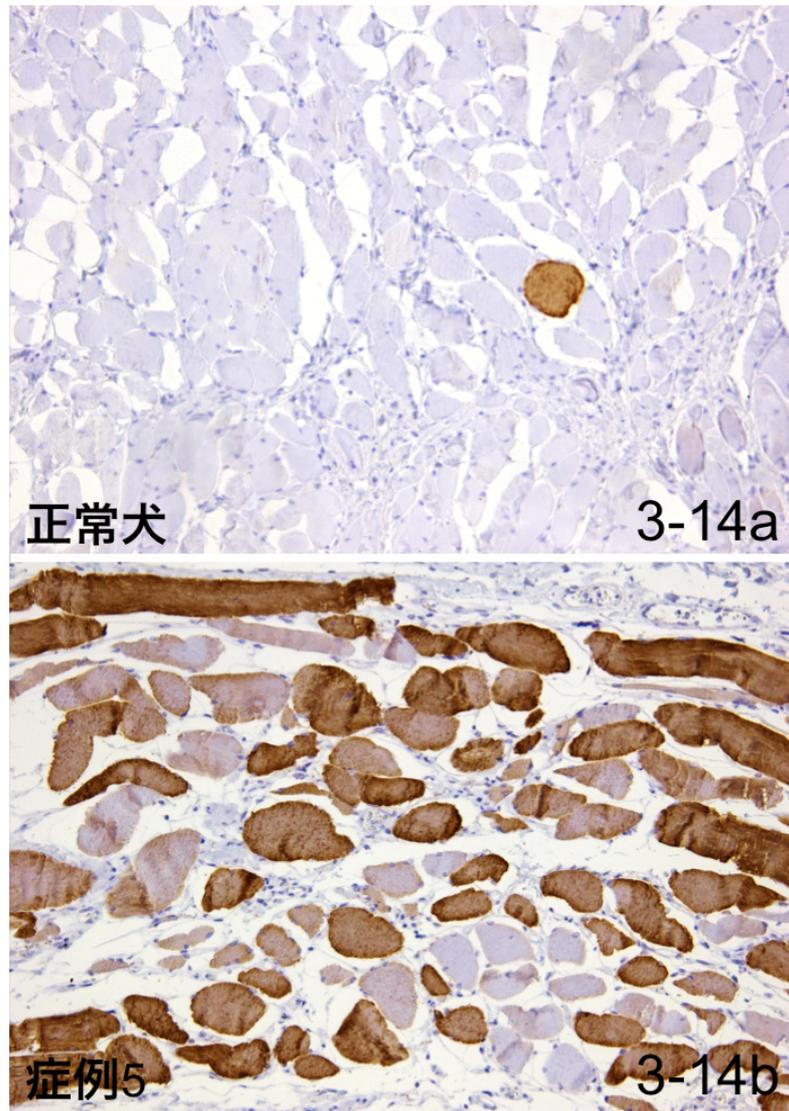


図 3-14 症例 5 の代表的な免疫組織化学的特徴。抗 Slow myosin 抗体を用いた免疫染色。ホルマリン固定筋組織。

正常犬 (a) の食道横紋筋に比べて、症例 5 (b) の食道横紋筋では、Slow myosin 陽性の筋線維の割合が著しく増加する (遅筋線維優位)。

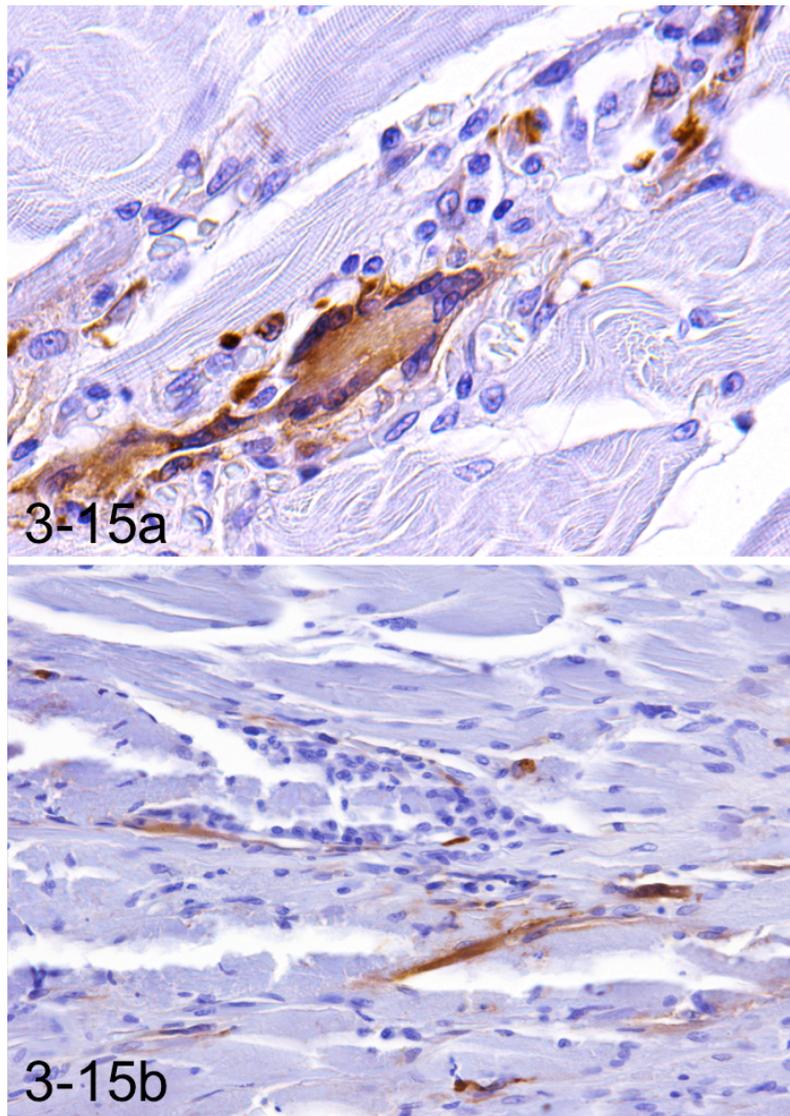


図 3-15 症例 9 の免疫組織化学的特徴。抗 Nestin 抗体を用いた免疫染色。ホルマリン固定筋組織。

(a) 食道。核小体明瞭な大型核を有する再生線維の細胞質が Nestin 陽性を示す。(b) 後肢筋。核が明瞭でない細長い筋線維の細胞質が Nestin 陽性を示す。

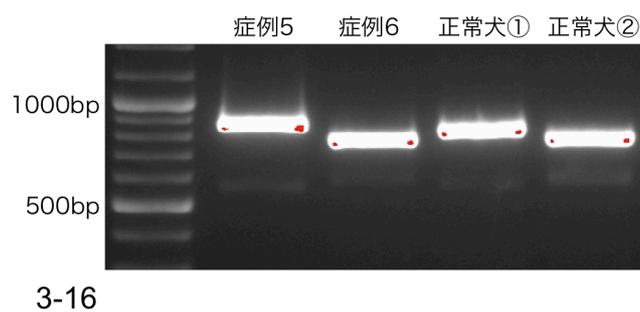


図 3-16 PCR 法による *PTPLA* 遺伝子の解析

正常犬および症例 5、6 の増幅産物のバンドはいずれも 800bp から 900bp の位置に検出され、野生型の 610bp のバンドは検出されない。

総括

本研究では、筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の鑑別に着目して、犬の筋疾患の病理学および筋電図学的検査法を検討した。第1章では、犬のホルマリン固定パラフィン切片を用いて筋疾患の診断に応用できる免疫組織化学的手法を検討した。その結果、抗 Slow myosin 抗体と抗 Fast myosin 抗体を用いた免疫染色は、神経原性筋疾患における遅筋、速筋線維の両方が萎縮する小角化線維と群萎縮および筋線維タイプ群化を描出することで、犬の神経原性筋疾患と筋原性筋疾患の鑑別に有用であることが示された。また、抗 Nestin 抗体と抗 Myogenin 抗体を用いた免疫染色は、筋原性筋疾患における再生線維の描出に有用であることが示された。第2章では、筋疾患の針筋電図所見と筋病理所見の関連について解析した。線維束電位は神経原性疾患に特異性が高く、線維自発電位/陽性鋭波および複合反復放電は疾患特異性がないことが示された。また、線維自発電位/陽性鋭波と複合反復放電は、筋の病理組織学的変化に先立って観察される可能性があるが、前者は急性から慢性の様々な組織変化に関連し、後者は慢性期の重度の組織変化と関連することが示唆された。第3章では、第1章および第2章で検討した病理学および筋電図学的診断法をもとに、筋ジストロフィーが疑われた症例について解析した。その結果、ミオトニー放電を特徴とする筋電図所見、高頻度の内在核および遅筋線維優位などの病理組織学的所見に基づいて、筋強直性ジストロフィーの診断が可能であることが示され、本研究で提示された診断法の有用性が示された。

本研究で明らかにした電気生理学的特徴および病理学的特徴に基づいて、犬の筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の鑑別フローチャートを作成した(図4-1)。このフ

ローチャートでは、まず、安静時の筋電図検査で認められる4つの異常電位に基づいて疾患を分類し、次に、ホルマリン固定筋組織を用いた病理組織学的特徴に基づいて疾患を分類、診断する。最後に、必要に応じて、凍結筋組織を用いた Dystrophin タンパク質の発現を評価して、筋ジストロフィーを診断する。特に、安静時異常電位として線維束電位を、免疫組織化学的特徴として、遅筋、速筋線維の両方が萎縮する小角化線維と群萎縮および筋線維タイプ群化を観察することで、神経原性筋疾患の診断が可能である。また、ミオトニアを伴う筋疾患の診断では、安静時異常電位としてミオトニー放電を、免疫組織化学的特徴として遅筋線維優位を観察することで、筋強直性ジストロフィーの診断が可能である。この鑑別フローチャートは、犬の筋疾患の診断に応用できるが、病因が明確にならなかった疾患（図の点線で囲まれた疾患）も存在した。今後これらの疾患についての診断法を発展させるうえでの課題を検討するために、これらの疾患の予想される病因について以下に述べる。

安静時異常電位を認めるにもかかわらず、筋病変を認めない疾患や非特異的な筋病変しか認めない疾患については、神経原性筋疾患(ニューロパチー)が疑われる。このような疾患の診断には、末梢神経生検を実施することが望ましい。ニューロパチーは、その原因により脱髄型と軸索変性型に分類されるが、電気生理学的にこれらの病型を鑑別するためには、時間をあけて複数回の神経伝導検査を実施する必要がある¹¹⁵。本研究では、単回の神経伝導検査の結果に基づいて末梢神経傷害の有無を判定したため、ニューロパチーの病型を特定できなかった。ヒトでは、筋萎縮性側索硬化症やギラン・バレー症候群などの発生頻度が高いニューロパチーにおいて、脱髄型および軸索変性型のサブタイプの鑑別まで含めた電気生理学的診断基準が確立されている^{4,115}。一方、犬では、急性多発性神経根神経炎(アライグマ猟犬麻痺)や変性性脊髄症などの疾患で電

電気生理学的解析に関する報告があるが、いずれも明確な電気生理学的診断基準は確立されていない¹¹⁶⁻¹¹⁹。人医学では侵襲性が高い末梢神経生検はほとんど実施されず、同様の理由で獣医学においても敬遠される傾向にあるが、電気生理学的知見の乏しい獣医学領域においては、ルーチンの診断として末梢神経生検の実施を検討する必要があると考えられる。

本研究の第3章では筋強直性ジストロフィーを診断したが、ミオトニアおよびミオトニー放電を認める疾患のうち、筋組織病変がほとんど認められない疾患として、先天性または後天性ミオトニーが挙げられる。先天性ミオトニーは、骨格筋の電位依存性 Cl チャネルの異常による遺伝性筋疾患であり、後天性ミオトニーは中年齢から高齢の犬において、副腎皮質機能亢進症に続発して発症することが知られている¹²⁰⁻¹²⁵。先天性ミオトニーは多くの犬種で症例報告があるが、遺伝子変異の同定はジャック・ラッセル・テリアにおいてのみ報告されており、ほとんどは原因が明らかでない¹²⁰⁻¹²²。先天性ミオトニーに限らず、骨格筋のイオンチャネル (Na, Cl, Ca, K チャネル) に関連する遺伝子異常により、ミオトニアや四肢麻痺などの臨床症状を呈する疾患群を筋チャネロパチーと呼ぶ^{126,127}。ヒトでは、筋電図検査でミオトニー放電の有無を確認したうえで、運動負荷直後や皮膚冷却後に神経伝導検査を行う特殊な電気生理学的診断法により、筋チャネロパチーを鑑別している¹²⁸。犬においても、本研究の電気生理学的知見を土台として、先天性ミオトニーを含む筋チャネロパチーの電気生理学的診断法を研究する必要がある。

本研究で診断したミオトニアを伴わない筋ジストロフィーは、Dystrophin 欠損型筋ジストロフィーのみであるが、ヒトでは欠損タンパク質の種類が異なる 50 種類以上の筋ジストロフィーが報告されている¹²⁹。高グレードの筋原性変化を認めたにも

かかわらず、確定診断できなかつた疾患については、**Dystrophin** 欠損型以外の病型の筋ジストロフィーが疑われる。犬では、**Sarcoglycan** 欠損型および **Laminin α2** 欠損型筋ジストロフィーについて少数の症例報告があるが^{130,131}、他の病型の筋ジストロフィーの多くも **Dystrophin** 欠損型と同様に、免疫染色またはウエスタンブロットによって診断が可能である。ただし、犬の **Laminin α2** は市販抗体と反応せず、**Shelton** らの **Laminin α2** 欠損型筋ジストロフィーに関する報告では、犬の **Laminin α2** を抗原とする抗体を作製することで診断を実施している¹³⁰。本研究の第 1 章では、犬の **Fast myosin** を抗原とする抗体を新規作製したが、筋ジストロフィーの診断においても、犬に特異的な抗体の作製などを検討する必要がある。

第 3 章で検討した新たなラブラドル・レトリバーの筋疾患は筋原性と神経原性の両方の特徴を有しており、特定の遺伝様式がみられなかつたことから、遺伝的素因ばかりでなく、環境因子などを含む複合的な原因が考えられた。このような疾患が筋原性筋疾患と神経原性筋疾患のいずれに属するのか、または混合型の筋疾患なのか、電気生理学的検査および筋病理検査だけでは判断ができなかつた。これらの検査では、筋組織または神経組織が傷害された結果を観察することで鑑別を実施しているが、傷害の原因である分子学的異常や遺伝学的異常に遡って検索しなければ、筋原性と神経原性の両方の特徴を有するような筋疾患の病態を解明できないと考えられる。ヒトでは、上述したニューロパチー（代表例はシャルコ・マリー・トゥース病）、筋チャネロパチー、**Dystrophin** 欠損型以外の病型の筋ジストロフィー（代表例は肢帯型筋ジストロフィー）のいずれにおいても、様々な原因遺伝子が特定されている（表 4-1）。対して、犬の神経筋疾患で遺伝子変異が明らかにされている疾患は、変性性脊髄症や先天性ミオトニーなどのごく一部の疾患に限られている。従って、筋原性と神経原性の鑑別の精度をさら

に向上させるためには、遺伝子学的診断法を検討することが必要であり、犬でも筋電図、筋病理および遺伝子を総合的に評価する診断法の確立が求められる。本研究で確立した筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の鑑別法は、遺伝子検索に際しての候補遺伝子の選定にも役立つと考えられる。

最後に、**Dystrophin** 欠損型筋ジストロフィー治療の前臨床試験として、ゲノム編集による遺伝子治療やアンチセンス核酸を用いたエキソン・スキッピング療法が筋ジストロフィー犬を用いて検討されている^{132,133}。本研究で得られた一連の知見によって、犬の筋疾患の診断および病態解明が可能になれば、ヒトの筋疾患のモデルとして有用な犬の筋疾患を発見、研究し、積極的な遺伝子治療を行うことができる。加えて、ヒトの類似筋疾患の病理発生機序を理解する上で、有用な比較生物学的情報を提供するものとする。

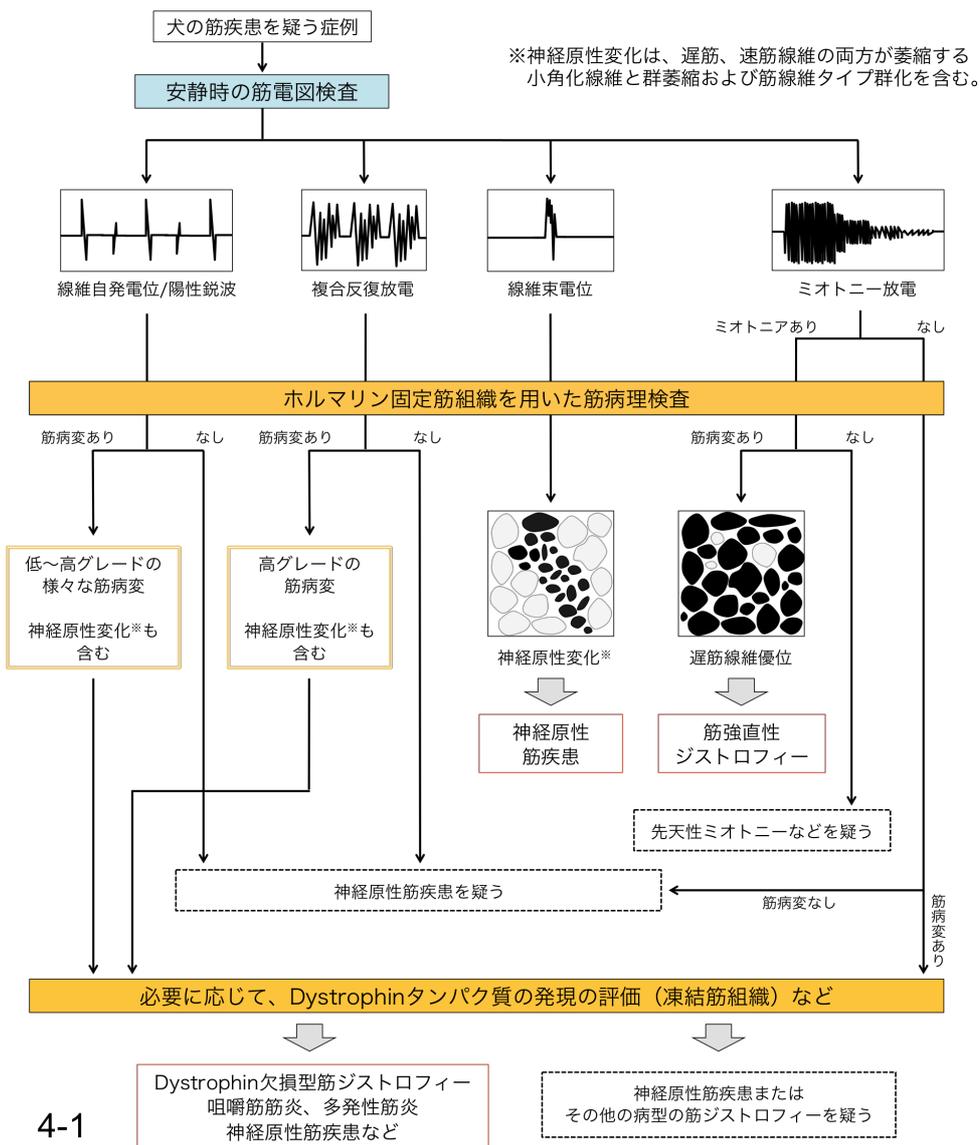


図 4-1 犬の筋疾患の鑑別フローチャート

線維束電位、遅筋と速筋線維の両方が萎縮する小角化線維および群萎縮、筋線維タイプ群化は、神経原性筋疾患に特異性の高い所見であり、ミオトニー放電、遅筋線維優位は、筋強直性ジストロフィーを強く疑う所見である。これらの電気生理学的特徴および病理学的特徴に基づいて、犬の筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の鑑別が可能である。なお、図では神経伝導検査による鑑別を省略した。

表 4-1 ヒトの代表的な遺伝性筋疾患およびその原因遺伝子

(Muscle Biopsy: A Practical Approach. 4th ed. Saunders Elsevier, 2013より作成)

シャルコ・マリー・トゥース病 (CMT) 原因遺伝子		筋チャネロパチー	
常染色体優性遺伝		常染色体優性遺伝	
AD-CMT1A	<i>PMP-22</i>	Myotonia Congenita (Thomsen)	<i>CLCN1</i>
1B	<i>PO (MPZ)</i>	Potassium-aggravated myotonia	<i>SCN4A</i>
1C	<i>LITAF</i>	Paramyotonia congenita	<i>SCN4A</i>
1D	<i>EGR2</i>	Hyperkalaemic peiodic paralysis	<i>SCN4A</i>
1E	<i>PMP-22</i>	Hypokalaemic peiodic paralysis	<i>CACNA1S/SCN4A</i>
1F	<i>NEFL</i>	Anderson syndrome	<i>KCNJ2</i>
AD-CMT2A1	<i>KIF1B</i>	Thyrotoxic peiodic paralysis	<i>KCNJ18</i>
2A2	<i>MFN2</i>	Malignant hyperthermia	<i>CACNA1S/RYR1</i>
2B	<i>RAB7A</i>	常染色体劣性遺伝	
2C	<i>TRPV4</i>	Myotonia Congenita (Becker)	<i>CLCN1</i>
2D	<i>GARS</i>	Congenital myasthenic syndrome	<i>SCN4A</i>
2E	<i>NEFL</i>	肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 原因遺伝子	
2F	<i>HSPB1</i>	常染色体優性遺伝	
2I/J	<i>PO (MPZ)</i>	LGMD1A	<i>TTID</i>
2K	<i>GDAP1</i>	1B	<i>LMNA</i>
2L	<i>HSPB8</i>	1C	<i>CAV3</i>
2M	<i>DNM2</i>	1D	<i>DES</i>
2N	<i>AARS</i>	1E	<i>DNAJB6</i>
2O	<i>DYNC1H1</i>	常染色体劣性遺伝	
2P	<i>LRSAM1</i>	LGMD2A	<i>CAPN3</i>
常染色体劣性遺伝		2B	<i>DYSF</i>
AR-CMT1 (CMT4) A	<i>GDAP1</i>	2C	<i>SGCG</i>
1B1	<i>MTMR2</i>	2D	<i>SGCA</i>
1B2	<i>MTMR13</i>	2E	<i>SGCB</i>
1C	<i>KIAA1985</i>	2F	<i>SGCD</i>
1D	<i>NDRG1</i>	2G	<i>TCAP</i>
1E	<i>EGR2</i>	2H	<i>TRIM32</i>
1F	<i>PRX</i>	2I	<i>FKRP</i>
1G	<i>HK1</i>	2J	<i>TTN</i>
1H	<i>FGD4</i>	2K	<i>POMT1</i>
1J	<i>FIG4</i>	2L	<i>ANO5</i>
AR-CMT2B1	<i>LMNA</i>	2M	<i>FKTN</i>
2B2	<i>MED25</i>	2N	<i>POMT2</i>
2H	<i>GDAP1</i>	2O	<i>POMGNT1</i>
		2P	<i>DAG1</i>
		2Q	<i>PLEC</i>

謝 辞

本稿を作成するにあたり多大なご指導、ご助言くださいました東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医病理学研究室の中山裕之 教授、内田和幸 准教授およびチェンバースジェームズ 助教に深く敬意を表し、感謝いたします。

また、本研究を行ううえで欠かすことの出来ない貴重な症例をご提供いただきました奥野征一 先生（獣医神経病クリニック）、ウエスタンプロット解析に関してご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医生理学研究室の山内啓太郎 准教授および同期の寺本奈保美さん、様々な援助をしていただいた獣医病理学研究室室員の皆様に心より感謝致します。

参考文献

1. DickinsonPJ, LeCouteur RA. Muscle and nerve biopsy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002;32:63-102.
2. Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A. Histological and histochemical changes. In: *Muscle Biopsy: A Practical Approach.* 4th ed. Elsevier, 2013:55-94.
3. Barohn RJ, Dimachkie MM, Jackson CE. A pattern recognition approach to patients with a suspected myopathy. *Neurol Clin.* 2014 Aug;32(3):569-93.
4. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J, Swash M. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol.* 2008 Mar;119(3):497-503.
5. Daube JR, Rubin DI. Needle electromyography. *Muscle Nerve.* 2009 Feb;39(2):244-70.
6. Daube JR, Rubin DI. *Clinical neurophysiology.* 4th ed. Oxford University Press, 2016.
7. Preston C, Shapiro E. *Electromyography and neuromuscular disorders: clinical-electrophysiologic correlations.* 3th ed. Elsevier, 2013.
8. Schoser B. Diagnostic muscle biopsy: is it still needed on the way to a liquid muscle pathology? *Curr Opin Neurol.* 2016 Oct;29(5):602-5.
9. North KN, Wang CH, Clarke N, Jungbluth H, Vainzof M, Dowling JJ, Amburgey K, Quijano-Roy S, Beggs AH, Sewry C, Laing NG, Bönnemann CG;

International Standard of Care Committee for Congenital Myopathies.

Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscul Disord*. 2014 Feb;24(2):97-116.

10. Theadom A, Rodrigues M, Roxburgh R, Balalla S, Higgins C, Bhattacharjee R, Jones K, Krishnamurthi R, Feigin V. Prevalence of muscular dystrophies: a systematic literature review. *Neuroepidemiology*. 2014;43(3-4):259-68.
11. Lalic T, Vossen RH, Coffa J, Schouten JP, Guc-Scekic M, Radivojevic D, Djuriscic M, Breuning MH, White SJ, den Dunnen JT. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet*. 2005 Nov;13(11):1231-4.
12. Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, Dawkins H, Lamont L, Roy AJ, Chamova T, Guergueltcheva V, Chan S, Korngut L, Campbell C, Dai Y, Wang J, Barišić N, Brabec P, Lahdetie J, Walter MC, Schreiber-Katz O, Karcagi V, Garami M, Viswanathan V, Bayat F, Buccella F, Kimura E, Koeks Z, van den Bergen JC, Rodrigues M, Roxburgh R, Lusakowska A, Kostera-Pruszczyk A, Zimowski J, Santos R, Neagu E, Artemieva S, Rasic VM, Vojinovic D, Posada M, Bloetzer C, Jeannet PY, Joncourt F, Díaz-Manera J, Gallardo E, Karaduman AA, Topaloğlu H, El Sherif R, Stringer A, Shatillo AV, Martin AS, Peay HL, Bellgard MI, Kirschner J, Flanigan KM, Straub V, Bushby K, Verschuuren J, Aartsma-Rus A, Bérout C, Lochmüller H. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more

- than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat.* 2015 Apr;36(4):395-402.
13. Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, Komaki H, Matsuda Y, Goto K, Hayashi YK, Nishino I, Takeda S, Kawai M. Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy). *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Apr 19;8:60.
 14. Takeuchi F, Yonemoto N, Nakamura H, Shimizu R, Komaki H, Mori-Yoshimura M, Hayashi YK, Nishino I, Kawai M, Kimura E, Takeda S. Prednisolone improves walking in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients. *J Neurol.* 2013 Dec;260(12):3023-9.
 15. Bladen CL, Rafferty K, Straub V, Monges S, Moresco A, Dawkins H, Roy A, Chamova T, Guergueltcheva V, Korngut L, Campbell C, Dai Y, Barišić N, Kos T, Brabec P, Rahbek J, Lahdetie J, Tuffery-Giraud S, Claustres M, Leturcq F, Ben Yaou R, Walter MC, Schreiber O, Karcagi V, Herczegfalvi A, Viswanathan V, Bayat F, de la Caridad Guerrero Sarmiento I, Ambrosini A, Ceradini F, Kimura E, van den Bergen JC, Rodrigues M, Roxburgh R, Lusakowska A, Oliveira J, Santos R, Neagu E, Butoianu N, Artemieva S, Rasic VM, Posada M, Palau F, Lindvall B, Bloetzer C, Karaduman A, Topaloğlu H, Inal S, Oflazer P, Stringer A, Shatillo AV, Martin AS, Peay H, Flanigan KM, Salgado D, von Rekowski B, Lynn S, Heslop E, Gainotti S, Taruscio D, Kirschner J, Verschuuren J, Bushby K, Bérout C, Lochmüller H. The TREAT-NMD

- Duchenne muscular dystrophy registries: conception, design, and utilization by industry and academia. *Hum Mutat.* 2013 Nov;34(11):1449-57.
16. Manning J, O'Malley D. What has the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease? *J Muscle Res Cell Motil.* 2015 Apr;36(2):155-67.
 17. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science.* 1989 Jun 30;244(4912):1578-80.
 18. Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M. Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci Rep.* 2014 Jul 9;4:5635.
 19. Brinkmeyer-Langford C, Kornegay JN. Comparative Genomics of X-linked Muscular Dystrophies: The Golden Retriever Model. *Curr Genomics.* 2013 Aug;14(5):330-42.
 20. Carpenter JL, Hoffman EP, Romanul FC, Kunkel LM, Rosales RK, Ma NS, Dasbach JJ, Rae JF, Moore FM, McAfee MB, et al. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am J Pathol.* 1989 Nov;135(5):909-19.
 21. Gaschen FP, Hoffman EP, Gorospe JR, Uhl EW, Senior DF, Cardinet GH 3rd, Pearce LK. Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci.* 1992 Jul;110(1-2):149-59.
 22. Selsby JT, Ross JW, Nonneman D, Hollinger K. Porcine models of muscular dystrophy. *ILAR J.* 2015;56(1):116-26.

23. Kornegay JN. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle*. 2017 May 19;7(1):9.
24. Vieira NM, Guo LT, Estrela E, Kunkel LM, Zatz M, Shelton GD. Muscular dystrophy in a family of Labrador Retrievers with no muscle dystrophin and a mild phenotype. *Neuromuscul Disord*. 2015 May;25(5):363-70.
25. Zucconi E, Valadares MC, Vieira NM, Bueno CR Jr, Secco M, Jazedje T, da Silva HC, Vainzof M, Zatz M. Ringo: discordance between the molecular and clinical manifestation in a golden retriever muscular dystrophy dog. *Neuromuscul Disord*. 2010 Jan;20(1):64-70.
26. Shelton GD. Routine and specialized laboratory testing for the diagnosis of neuromuscular diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*. 2010 Sep;39(3):278-95.
27. Braund KG, Amling KA, Mehta JR, Steiss JE, Scholz C. Histochemical and morphometric study of fiber types in ten skeletal muscles of healthy young adult cats. *Am J Vet Res*. 1995 Mar;56(3):349-57.
28. Braund KG, Hoff EJ, Richardson EY. Histochemical identification of fiber types in canine skeletal muscle. *Am J Vet Res*. 1978 Apr;39(4):561-5.
29. Connolly AM, Pestronk A, Planer GJ, Yue J, Mehta S, Choksi R. Congenital muscular dystrophy syndromes distinguished by alkaline and acid phosphatase, merosin, and dystrophin staining. *Neurology*. 1996 Mar;46(3):810-14.

30. Engel WK. The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. 1962. *Neurology*. 1998 Sep;51(3):655-671.
31. Schmidt A. The significance of the detection of alkaline phosphatase in the diagnosis of neuromuscular diseases. *Biomed Biochim Acta*. 1986;45(1-2):S115-7.
32. Acevedo LM, Rivero JL. New insights into skeletal muscle fibre types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes. *Cell Tissue Res*. 2006 Feb;323(2):283-303.
33. Strbenc M, Smerdu V, Zupanc M, Tozon N, Fazarinc G. Pattern of myosin heavy chain isoforms in different fibre types of canine trunk and limb skeletal muscles. *Cells Tissues Organs*. 2004;176(4):178-86.
34. Behan WM, Cossar DW, Madden HA, McKay IC. Validation of a simple, rapid, and economical technique for distinguishing type 1 and 2 fibres in fixed and frozen skeletal muscle. *J Clin Pathol*. 2002 May;55(5):375-80.
35. Raheem O, Huovinen S, Suominen T, Haapasalo H, Udd B. Novel myosin heavy chain immunohistochemical double staining developed for the routine diagnostic separation of I, IIA and IIX fibers. *Acta Neuropathol*. 2010 Apr;119(4):495-500.
36. Bennett GS, Fellini SA, Toyama Y, Holtzer H. Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro. *J Cell Biol*. 1979 Aug;82(2):577-84.

37. Carlsson L, Li Z, Paulin D, Thornell LE. Nestin is expressed during development and in myotendinous and neuromuscular junctions in wild type and desmin knock-out mice. *Exp Cell Res*. 1999 Aug 25;251(1):213-23.
38. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*. 1993 Aug 5;364(6437):501-6.
39. Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*. 1993 Aug 5;364(6437):532-5.
40. Osborn M, Geisler N, Shaw G, Sharp G, Weber K. Intermediate filaments. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1982;46 Pt 1:413-29.
41. Sejersen T, Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci*. 1993 Dec;106 (Pt4):1291-300.
42. Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Rantanen J, Hurme T, Lendahl U, Eriksson JE, Kalimo H. Specific and innervation-regulated expression of the intermediate filament protein nestin at neuromuscular and myotendinous junctions in skeletal muscle. *Am J Pathol*. 1999 Feb;154(2):591-600.
43. Walsh K, Perlman H. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 1997 Oct;7(5):597-602.

44. Zhang P, Wong C, Liu D, Finegold M, Harper JW, Elledge SJ. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* 1999 Jan 15;13(2):213-24.
45. Sjöberg G, Edström L, Lendahl U, Sejersen T. Myofibers from Duchenne/Becker muscular dystrophy and myositis express the intermediate filament nestin. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994 Jul;53(4):416-23.
46. Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Hurme T, Rantanen J, Lendahl U, Eriksson JE, Kalimo H. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Jun;60(6):588-97.
47. Wanschitz JV, Dubourg O, Lacene E, Fischer MB, Höftberger R, Budka H, Romero NB, Eymard B, Herson S, Butler-Browne GS, Voit T, Benveniste O. Expression of myogenic regulatory factors and myo-endothelial remodeling in sporadic inclusion body myositis. *Neuromuscul Disord.* 2013 Jan;23(1):75-83.
48. Braund KG, Shores A, Lowrie CT, Steinberg HS, Moore MP, Bagley RS, Steiss JE. Idiopathic polyneuropathy in Alaskan malamutes. *J Vet Intern Med.* 1997 Jul-Aug;11(4):243-9.
49. Rentmeister K, Bilzer T, Petri S, Schanen G, Fehr M, Distl O, Tipold A. Hereditary polyneuropathy in the Alaskan Malamute. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2012;40(1):26-34.
50. Bruun CS, Jäderlund KH, Berendt M, Jensen KB, Spodsberg EH, Gredal H, Shelton GD, Mickelson JR, Minor KM, Lohi H, Bjerckås I, Stigen O, Espenes A,

- Rohdin C, Edlund R, Ohlsson J, Cizinauskas S, Leifsson PS, Drögemüller C, Moe L, Cirera S, Fredholm M. A Gly98Val mutation in the N-Myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) in Alaskan Malamutes with polyneuropathy. *PLoS One*. 2013;8(2):e54547.
51. Vanhaesebrouck AE, Couturier J, Cauzinille L, Mizisin AP, Shelton GD, Granger N. Demyelinating polyneuropathy with focally folded myelin sheaths in a family of Miniature Schnauzer dogs. *J Neurol Sci*. 2008 Dec 15;275(1-2):100-105.
52. Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JN, Nonaka I, Takeda S. Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). *Exp Anim*. 2003 Apr;52(2):93-7.
53. Valentine BA, Cooper BJ, de Lahunta A, O'Quinn R, Blue JT. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J Neurol Sci*. 1988 Dec;88(1-3):69-81.
54. Valentine BA, Winand NJ, Pradhan D, Moise NS, de Lahunta A, Kornegay JN, Cooper BJ. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am J Med Genet*. 1992 Feb 1;42(3):352-6.
55. Merlie JP, Mudd J, Cheng TC, Olson EN. Myogenin and acetylcholine receptor alpha gene promoters mediate transcriptional regulation in response to motor innervation. *J Biol Chem*. 1994 Jan 28;269(4):2461-7.

56. Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Potthoff MJ, McAnally J, Shelton JM, Backs J, Klein WH, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell*. 2010 Oct 1;143(1):35-45.
57. Tang H, Macpherson P, Marvin M, Meadows E, Klein WH, Yang XJ, Goldman D. A histone deacetylase 4/myogenin positive feedback loop coordinates denervation-dependent gene induction and suppression. *Mol Biol Cell*. 2009 Feb;20(4):1120-31.
58. Cuddon PA. Electrophysiology in neuromuscular disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2002 Jan;32(1):31-62.
59. Aleman M. Miscellaneous neurologic or neuromuscular disorders in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2011 Dec;27(3):481-506.
60. Daube JR, Rubin DI. Needle electromyography. *Muscle Nerve*. 2009 Feb;39(2):244-70.
61. Fuglsang-Frederiksen A. The role of different EMG methods in evaluating myopathy. *Clin Neurophysiol*. 2006 Jun;117(6):1173-89.
62. Liguori R, Fuglsang-Frederiksen A, Nix W, Fawcett PR, Andersen K. Electromyography in myopathy. *Neurophysiol Clin*. 1997 Jun;27(3):200-3.
63. Braund KG. Diagnostic Techniques. In: *Clinical syndromes in Veterinary Neurology*. 2th ed. Mosby, 1994:332-52.
64. Farnbach GC. Clinical electrophysiology in veterinary neurology. Part I: Electromyography. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1980;2:791-7.

65. Kimura J. *Electrodiagnosis in Diseases of Nerve and Muscle: Principles and Practice*. 3th ed. FA Davis, 1981:624.
66. Daube JR. Basic neurophysiology. In: *Clinical Neurophysiology*. 3th ed. Oxford University Press, 2009:69-95.
67. Buchthal F, Kamieniecka Z. The diagnostic yield of quantified electromyography and quantified muscle biopsy in neuromuscular disorders. *Muscle Nerve*. 1982 Apr;5(4):265-80.
68. Chang J, Park YG, Choi YC, Choi JH, Moon JH. Correlation of electromyogram and muscle biopsy in myopathy of young age. *Arch Phys Med Rehabil*. 2011 May;92(5):780-4.
69. Rabie M, Jossiphov J, Nevo Y. Electromyography (EMG) accuracy compared to muscle biopsy in childhood. *J Child Neurol*. 2007 Jul;22(7):803-8.
70. Dardiotis E, Papathanasiou E, Vonta I, Hadjigeorgiou G, Zamba-Papanicolaou E, Kyriakides T. A correlative study of quantitative EMG and biopsy findings in 31 patients with myopathies. *Acta Myol*. 2011 Jun;30(1):37-41.
71. Black JT, Bhatt GP, Dejesus PV, Schotland DL, Rowland LP. Diagnostic accuracy of clinical data, quantitative electromyography and histochemistry in neuromuscular disease. A study of 105 cases. *J Neurol Sci*. 1974 Jan;21(1):59-70.
72. Buchthal F. Electrophysiological signs of myopathy as related with muscle biopsy. *Acta Neurol (Napoli)*. 1977 Jan-Feb;32(1):1-29.

73. Werneck LC, Lima JG. Muscle biopsy correlated with electromyography. Study of 100 cases. *Arq Neuropsiquiatr.* 1988 Jun;46(2):156-65.
74. Warmolts JR, Engel WK. Open-biopsy electromyography. I. Correlation of motor unit behavior with histochemical muscle fiber type in human limb muscle. *Arch Neurol.* 1972 Dec;27(6):512-7.
75. Naddaf E, Milone M, Mauermann ML, Mandrekar J, Litchy WJ. Muscle Biopsy and Electromyography Correlation. *Front Neurol.* 2018 Oct 9;9:839.
76. Sisson AF, LeCouteur RA, Ingram JT, Park RD, Child G. Diagnosis of cauda equina abnormalities by using electromyography, discography, and epidurography in dogs. *J Vet Intern Med.* 1992 Sep-Oct;6(5):253-63.
77. Oliver JE Jr, Selcer RR, Simpson S. Cauda equina compression from lumbosacral malarticulation and malformation in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1978 Jul 15;173(2):207-14.
78. Giza EG, Płonek M, Nicpoń JM, Wrzosek MA. Electrodiagnostic studies in presumptive primary hypothyroidism and polyneuropathy in dogs with reevaluation during hormone replacement therapy. *Acta Vet Scand.* 2016 May 21;58(1):32.
79. de Carvalho M, Swash M. Fasciculation potentials and earliest changes in motor unit physiology in ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013 Sep;84(9):963-8.
80. Griffiths IR, Duncan ID. Some studies of the clinical neurophysiology of denervation in the dog. *Res Vet Sci.* 1974 Nov;17(3):377-83.

81. Griffiths IR, Duncan ID. The use of electromyography and nerve conduction studies in the evaluation of lower motor neurone disease or injury. *J Small Anim Pract.* 1978 Jun;19(6):329-40.
82. Sener U, Martinez-Thompson J, Laughlin RS, Dimberg EL, Rubin DI. Needle electromyography and histopathologic correlation in myopathies. *Muscle Nerve.* 2019 Mar;59(3):315-320.
83. Bowen JM. Electromyography. Section 2. In: *Veterinary Neurology.* WB Saunders, 1987:145–68.
84. Kimura J. The F wave. In: *Electrodiagnosis in Diseases of Nerve and Muscle: Principles and Practice.* FA Davis, 1981:332–52.
85. Kimura J. *Electrodiagnosis in Diseases of Nerve and Muscle: Principles and Practice.* FA Davis, 1981:624.
86. Shelton GD, Engvall E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. *Neuromuscul Disord.* 2005 Feb;15(2):127-38.
87. Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, Scott MO, Fischbeck KH, Kornegay JN, Avery RJ, et al. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature.* 1988 Jul 14;334(6178):154-6.
88. Jones BR, Brennan S, Mooney CT, Callanan JJ, McAllister H, Guo LT, Martin PT, Engvall E, Shelton GD. Muscular dystrophy with truncated dystrophin in a family of Japanese Spitz dogs. *J Neurol Sci.* 2004 Feb 15;217(2):143-9.

89. Baroncelli AB, Abellonio F, Pagano TB, Esposito I, Peirone B, Papparella S, Paciello O. Muscular dystrophy in a dog resembling human becker muscular dystrophy. *J Comp Pathol.* 2014 May;150(4):429-33.
90. Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A. Facioscapulohumeral myotonic and oculopharyngeal muscular dystrophies. In: *Muscle Biopsy: A Practical Approach.* 4th ed. Elsevier, 2013:345-57.
91. Hahn C, Salajegheh MK. Myotonic disorders: A review article. *Iran J Neurol.* 2016 Jan 5;15(1):46-53.
92. Meola G, Cardani R. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Apr;1852(4):594-606.
93. Wheeler TM, Thornton CA. Myotonic dystrophy: RNA-mediated muscle disease. *Curr Opin Neurol.* 2007 Oct;20(5):572-6.
94. Machuca-Tzili L, Brook D, Hilton-Jones D. Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve.* 2005 Jul;32(1):1-18. Review.
95. Day JW, Ranum LP. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 2005 Jan;15(1):5-16.
96. Duncan ID, Griffiths IR, McQueen A. A myopathy associated with myotonia in the dog. *Acta Neuropathol.* 1975;31(4):297-303.
97. Griffiths IR, Duncan ID. Myotonia in the dog: a report of four cases. *Vet Rec.* 1973 Aug 18;93(7):184-8.

98. Poncelet L, Fontaine J, Balligand M. Myotonia in two aged poodles. *Vet Rec.* 1991 Jun 22;128(25):599.
99. Simpson ST, Braund KG. Myotonic dystrophy-like disease in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1985 Mar 1;186(5):495-8.
100. Smith BF, Braund KG, Steiss JE, Simpson ST, Cox NR, Sorjonen DC. Possible adult onset myotonic dystrophy in a boxer. *J Vet Intern Med.* 1998 Mar-Apr;12(2):120.
101. Kramer JW, Hegreberg GA, Bryan GM, Meyers K, Ott RL. A muscle disorder of Labrador retrievers characterized by deficiency of type II muscle fibers. *J Am Vet Med Assoc.* 1976 Oct 15;169(8):817-20.
102. McKerrell RE, Braund KG. Hereditary myopathy in Labrador retrievers: a morphologic study. *Vet Pathol.* 1986 Jul;23(4):411-7.
103. McKerrell RE, Braund KG. Hereditary myopathy in Labrador retrievers: clinical variations. *J Small Anim Pract.* 1987;28:479-89.
104. Gortel K, Houston DM, Kuiken T, Fries CL, Boisvert B. Inherited myopathy in a litter of Labrador retrievers. *Can Vet J.* 1996 Feb;37(2):108-10.
105. Watson AD, Farrow BR, Middleton DJ, Smyth JB. Myopathy in a Labrador retriever. *Aust Vet J.* 1988 Jul;65(7):226-7.
106. Pelé M, Tiret L, Kessler JL, Blot S, Panthier JJ. SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum Mol Genet.* 2005 Jun 1;14(11):1417-27.

107. Maurer M, Mary J, Guillaud L, Fender M, Pelé M, Bilzer T, Olby N, Penderis J, Shelton GD, Panthier JJ, Thibaud JL, Barthélémy I, Aubin-Houzelstein G, Blot S, Hitte C, Tiret L. Centronuclear myopathy in Labrador retrievers: a recent founder mutation in the PTPLA gene has rapidly disseminated worldwide. *PLoS One*. 2012;7(10):e46408.
108. Bergman RL, Inzana KD, Monroe WE, Shell LG, Liu LA, Engvall E, Shelton GD. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Labrador retriever. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2002 May-Jun;38(3):255-61.
109. Denic V, Weissman JS. A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell*. 2007 Aug 24;130(4):663-77.
110. Ikeda M, Kanao Y, Yamanaka M, Sakuraba H, Mizutani Y, Igarashi Y, Kihara A. Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Lett*. 2008 Jul 9;582(16):2435-40.
111. Valentine BA, Winand NJ, Pradhan D, Moise NS, de Lahunta A, Kornegay JN, Cooper BJ. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am J Med Genet*. 1992 Feb 1;42(3):352-6.
112. Puustjärvi K, Tammi M, Reinikainen M, Helminen HJ, Paljärvi L. Running training alters fiber type composition in spinal muscles. *Eur Spine J*. 1994;3(1):17-21.

113. O'Brien DP, Johnson GC, Liu LA, Guo LT, Engvall E, Powell HC, Shelton GD. Laminin alpha 2 (merosin)-deficient muscular dystrophy and demyelinating neuropathy in two cats. *J Neurol Sci.* 2001 Aug 15;189(1-2):37-43.
114. Poncelet L, Résibois A, Engvall E, Shelton GD. Laminin alpha2 deficiency-associated muscular dystrophy in a Maine coon cat. *J Small Anim Pract.* 2003 Dec;44(12):550-2.
115. Uncini A, Kuwabara S. The electrodiagnosis of Guillain-Barré syndrome subtypes: Where do we stand? *Clin Neurophysiol.* 2018 Dec;129(12):2586-93.
116. Añor S. Acute lower motor neuron tetraparesis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2014 Nov;44(6):1201-22.
117. Cuddon PA. Electrophysiologic assessment of acute polyradiculoneuropathy in dogs: comparison with Guillain-Barré syndrome in people. *J Vet Intern Med.* 1998 Jul-Aug;12(4):294-303.
118. Hirschvogel K, Jurina K, Steinberg TA, Matiasek LA, Matiasek K, Beltrán E, Fischer A. Clinical course of acute canine polyradiculoneuritis following treatment with human IV immunoglobulin. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2012 Sep-Oct;48(5):299-309.
119. Coates JR, March PA, Oglesbee M, Ruaux CG, Olby NJ, Berghaus RD, O'Brien DP, Keating JH, Johnson GS, Williams DA. Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. *J Vet Intern Med.* 2007 Nov-Dec;21(6):1323-31.

120. Bhalerao DP, Rajpurohit Y, Vite CH, Giger U. Detection of a genetic mutation for myotonia congenita among Miniature Schnauzers and identification of a common carrier ancestor. *Am J Vet Res.* 2002 Oct;63(10):1443-7.
121. Lobetti RG. Myotonia congenita in a Jack Russell terrier. *J S Afr Vet Assoc.* 2009 Jun;80(2):106-7.
122. Rhodes TH, Vite CH, Giger U, Patterson DF, Fahlke C, George AL Jr. A missense mutation in canine C1C-1 causes recessive myotonia congenita in the dog. *FEBS Lett.* 1999 Jul 30;456(1):54-8.
123. Duncan ID, Griffiths IR, Nash AS. Myotonia in canine Cushing's disease. *Vet Rec.* 1977 Jan 8;100(2):30-1.
124. Greene CE, Lorenz MD, Munnell JF, Prasse KW, White NA, Bowen JM. Myopathy associated with hyperadrenocorticism in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1979 Jun 15;174(12):1310-5.
125. Swinney GR, Foster SF, Church DB, Malik R. Myotonia associated with hyperadrenocorticism in two dogs. *Aust Vet J.* 1998 Nov;76(11):722-4.
126. Raja Rayan DL, Hanna MG. Skeletal muscle channelopathies: nondystrophic myotonias and periodic paralysis. *Curr Opin Neurol.* 2010;23(5):466–76.
127. Statland JM, Barohn RJ. Muscle channelopathies: the nondystrophic myotonias and periodic paralyses. *Continuum (Minneap Minn).* 2013;19(6 Muscle Disease):1598–614.

128. Arimura Y, Nakamura T, Yoshimura M, Uehara A, Arimura K, Sakoda S, Takashima H. [The electrophysiologic diagnosis for muscle ion channelopathies]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2012;52(11):1252-5.
129. Laing NG. Genetics of neuromuscular disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2012 Mar-Apr;49(2):33-48.
130. Shelton GD, Liu LA, Guo LT, Smith GK, Christiansen JS, Thomas WB, Smith MO, Kline KL, March PA, Flegel T, Engvall E. Muscular dystrophy in female dogs. *J Vet Intern Med*. 2001 May-Jun;15(3):240-4.
131. Deitz K, Morrison JA, Kline K, Guo LT, Shelton GD. Sarcoglycan-deficient muscular dystrophy in a Boston Terrier. *J Vet Intern Med*. 2008 Mar-Apr;22(2):476-80.
132. Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol*. 2009 Jun;65(6):667-76.
133. Shimizu-Motohashi Y, Miyatake S, Komaki H, Takeda S, Aoki Y. Recent advances in innovative therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy: from discovery to clinical trials. *Am J Transl Res*. 2016 Jun 15;8(6):2471-89.