

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 28 年度博士課程 入学

氏名 志賀 崇徳

指導教員 中山 裕之

論文題目：犬の筋疾患の診断および病態解明に関する研究

筋疾患は、筋原性筋疾患と神経原性筋疾患に大別される。このうち、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は筋ジストロフィーと呼ばれる。代表的な筋ジストロフィーとして、**Dystrophin** 欠損型筋ジストロフィーが様々な動物で報告されており、ヒトの筋ジストロフィーの疾患モデルとされている。近年、獣医臨床分野でも、針筋電図検査などの電気生理学的診断法が普及したことにより、筋疾患を診断する機会が増えている。しかし、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り、凍結切片を必要とする酵素染色等が実施できないため、正確な診断や病態解明が困難である場合が多い。そこで本研究では、犬のホルマリン固定筋組織で実施可能な病理学的検索手法を検討し、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する体系的な研究を行った。次に、これらの検討した検索手法を応用して、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。

第 1 章では、犬筋組織のホルマリン固定パラフィン切片を用い、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。筋疾患の診断においては、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、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確にする目的で、原因が明確な犬の筋疾患症例 15 例の筋組織を用いて検討した。これらは、犬の筋原性筋疾患 7 例（咀嚼筋筋炎、多発性筋炎、線維軟骨塞栓症、**Dystrophin** 欠損

型筋ジストロフィー)と神経原性筋疾患 8 例(末梢性または多発性ニューロパチー、多発根ニューロパチー、変性性脊髄症)であり、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の結果、神経原性筋疾患で、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が、これらの所見は筋原性筋疾患では認められなかった。また、抗 Nestin 抗体と抗 Myogenin 抗体を用いた免疫染色の結果では、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、犬の筋原性筋疾患と神経原性筋疾患の鑑別に有効であり、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効であることが示された。

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た。ヒトの筋電図検査では、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、刺入時電位と安静時電位を評価する。しかし、動物の刺入時電位、安静時電位と病態の関連については不明な点が多い。本研究では、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(刺入時電位増大、刺入時電位減少、線維自発電位/陽性鋭波、線維束電位、複合反復放電、ミオトニー放電)と 5 つの筋病理所見(筋線維の萎縮、筋線維の壊死・再生、脱神経筋線維、筋線維タイプ群化、脂肪浸潤・線維化)の相関について解析した。筋病理所見については、重症度によりそれぞれグレード 0 から 3 までスコア化した。また、19 例については、病理組織学的所見をもとに疾病診断を確定した。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。形態学的変化があった場合、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についてもグレード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に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、後者は高グレードの病理組織学的所見と関連することが示された。

第3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的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、また遺伝子検索で中心核ミオパチー (CNM) に特異的な遺伝子変異が認められなかったことから、本犬種に好発するとされる本疾患を否定した。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が、その遺伝様式は単純ではないと推測された。本症例の骨格筋に筋原性変化と神経原性変化が混在した原因としては、ラミニン $\alpha 2$ など神経および筋組織の両方に分布する分子の異常などが考えられた。

本研究の第1章、第2章の結果をあわせて、犬の筋疾患の診断に有用な病理学的および筋電図学的検査法を確立した。これらの検査法は、特に DM の診断に有用であったが、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。病理

学的小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、これらの組織傷害の根本的な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る。また、ラブラドル・レトリバーの新規筋疾患は特定の遺伝様式がみられなかったことから、遺伝的素因ばかりでなく、環境因子なども加わった複合的な原因が考えられた。以上、本研究で得られた一連の知見は、犬の筋疾患の臨床および病理学的診断、病態解明に応用できるものであり、同時に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。