

筋ジストロフィー犬における骨格筋障害の病態 および画像診断学的研究

小林 正 典

日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科・獣医臨床繁殖学教室

日獣生大研報 60, 23-28, 2011.

は じ め に

筋ジストロフィーは、骨格筋の変性・壊死を主病変とし、臨床的に進行性の筋力低下と筋萎縮をみる遺伝性筋疾患の総称であり、筋線維内の細胞骨格から筋細胞膜を介して細胞外の基底膜を連結しているラミニン $\alpha 2$ などの細胞外基質タンパク質、ジストログリカンやサルコグリカンなどの筋細胞膜タンパク質、ジストロフィンなどの筋細胞膜結合タンパク質をコードする遺伝子の異常により引き起こされ、遺伝形式、原因遺伝子、臨床経過によって多様な病型に分類されている^{1,2)} (図1)。動物においてもヒトと同様に筋ジストロフィーが存在することが知られる。ラミニン $\alpha 2$ 欠損はイヌおよびネコで、サルコグリカン欠損はイヌで、ジストロフィンの欠損はイヌおよびネコで自然発症性に認められている³⁾。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) はX染色体連鎖性遺伝形式を示し、遺伝性筋疾患の中で最も発生頻度が高く (新生男児3500分の1に発生)、重篤な臨床経過を示す⁴⁾。筋病理では、骨格筋や心筋において変性・壊死を主病変とし、中心核を持つ再生筋線維や筋線維の大小不同を示す。病期の進行に伴い、筋線維数の減少と結合織や脂肪組織への置換が認められる。

DMDの原因遺伝子はX染色体短腕(Xp21)に局在し、79個のエクソンを持つ全長約2,300 kbのジストロフィン遺伝子 (*dystrophin* gene) であり、ジストロフィンをコードしている。DMDでは、ジストロフィン遺伝子に欠失、重複、逆位、ナンセンス変異、スプライシング異常などの変異が生ずるためアミノ酸の読み枠がずれるアウト・オブ・フレームとなりジストロフィンが産生されない⁵⁾。ジストロフィンは、筋細胞膜直下に存在する筋細胞膜裏打ちタンパク質であるが、F-アクチンとジストロフィン結合タンパク質に結合して、ジストロフィン糖タンパク質複合体 (Dystrophin associated glycoprotein complex : DGC) を形成し、筋細胞膜の安定性に寄与していると考えられている。ジストロフィンの欠如により、細胞骨格と基底膜の

連結が不安定化となるため筋形質膜は脆弱となり、筋線維の変性・壊死を来すと考えられている^{6,7)}。また、DGCに関連したチャンネルや分子の機能障害により、細胞膜透過性の亢進、細胞内イオン・チャンネルの調節障害、および筋代謝の異常を引き起こす可能性が指摘されている⁸⁻¹²⁾。

近年、筋ジストロフィー症状を持つゴールデン・レトリバー犬が見出され、コロニー化された。このGRMDは後にジストロフィン遺伝子のイントロン6のスプライシング調節領域に点変異を持つことが報告された^{13,14)}。しかしながら、GRMDが大型犬であるために飼育・繁殖が困難であったことから、本邦ではGRMDの凍結精子を用いて小型で系統維持しやすい純系ビーグル犬に人工授精し、キャリア犬を作出、そのキャリア犬を純系ビーグル犬と自然交配させることで、ビーグル種の筋ジストロフィー犬 (Canine X-linked muscular dystrophy in Japan : CXMDJ, 以下筋ジス犬) の作出に成功した¹⁵⁾。筋ジス犬の臨床症状や病理組織学的所見はDMDと類似する¹⁶⁾。

これまでDMD患者やDMDのモデル動物に対し、様々なMRIシーケンスを用いて骨格筋障害の非侵襲的な評価が試みられてきた。しかしながら、臨床で通常用いられているMRIシーケンス (T1強調画像、およびT2強調画像) では急性相反応である筋壊死や炎症性変化と病態の進行に伴って認められる脂肪浸潤、線維化を鑑別することが困難であった¹⁷⁻²⁰⁾。また、細胞膜透過性の亢進した壊死病変を選択的に検出する方法として、ガドリニウム-ジエチレントリアミン-ペンタ酢酸 (Gd-DTPA : Gadoliniumdiethyle-netriaminepentaacetic acid) などのMRI造影剤の投与を組み合わせた撮像方法が検討されてきているが²¹⁻²³⁾、血管や間質も増強しうることで²⁴⁾、DMD患者にとって重大となりうるアナフィラキシーなどの重篤な副作用を生じる可能性がある^{25,26)}。筋壊死や炎症性病変を正確かつ鋭敏に捉えられる安全な撮像法は、病態研究および治療研究を行う上で重要となる。本稿では、選択的に脂肪信号の抑制が可能であるChemical shift selective (CHESS) 法にT2強調画像 (T2WI) を組み合わせたCHESS-T2WIを用いて、筋壊死や炎症性病変の評価を病理組織学的手法と併せて比較し、

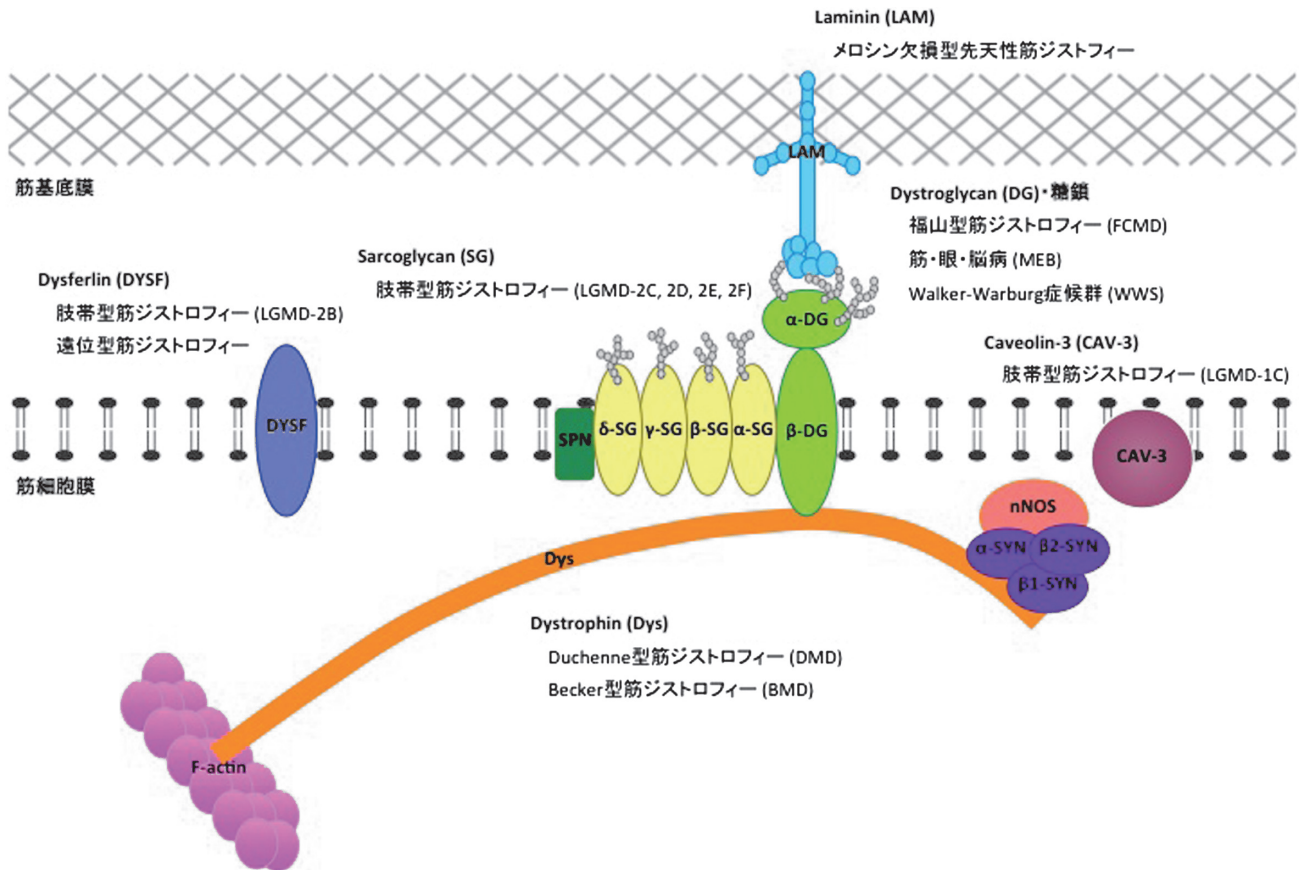


図 1. ジストロフィン糖蛋白質複合体と筋ジストロフィーの病型。筋ジストロフィーは、ジストロフィン・糖蛋白質複合体を構成する筋細胞外基質蛋白質、筋細胞膜蛋白質、または筋細胞膜結合蛋白質の異常によって引き起こされる遺伝性筋疾患である。

その有用性について検討を行った。

供 試 動 物

本研究には、国立精神・神経センター神経研究所総合実験動物棟（中型実験動物研究施設）において繁殖、飼育されている 3 ヶ月齢の雄の正常犬 3 頭、および同腹の雄の筋ジス犬 3 頭、7 歳齢の雄の正常犬 1 頭、および 7 歳齢の雄の筋ジス犬 2 頭の計 9 頭を用いた。

評 価 方 法

正常犬および筋ジス犬の橈側皮静脈に 21G 留置針を用いて血管の確保を行った後、チオペンタールナトリウム (20 mg/kg) にて麻酔を導入し、イソフルラン (2-3%) にて麻酔維持を行った。

MRI 撮像には、3.0-Tesla MRI 装置 (Magnetom Trio; Siemens Medical Solutions)、および直径 18 cm の人用送受信型四肢コイルを用い、下腿筋の T1 強調画像 (T1WI)、T2 強調画像 (T2WI)、脂肪抑制 T1 強調画像 (CHESS-T1WI)、脂肪抑制 T2 強調画像 (CHESS-T2WI)、造影 T1 強調画像 (Gd-T1WI)、脂肪抑制造影 T1 強調画像 (CHESS-Gd-T1WI)、および T2 値測定のためのマルチエ

コー T2 強調画像 (multi-echo T2WI) の撮像を行った。造影剤は、Gadolinium 系造影剤である Gd-DTPA (Magnevist; Bayer Schering Pharma, Berlin, Germany) を用い、各造影画像撮像前に 0.2 ml/kg をボラスで静脈投与した。

MR 画像の定量解析には、MRI 装置付属のソフトウェアを用いた。3 ヶ月齢の正常犬および筋ジス犬の右側前脛骨筋および長趾伸筋、7 歳齢の右側前脛骨筋に 3 点の円形の関心領域 (ROI: regions of interest) を設定し、T2 値および CHESS-T1WI、CHESS-Gd-T1WI、CHESS-T2WI の信号強度 (SI: signal intensity) を測定した。併せて、各画像の background noise の標準偏差 (SD_{air}) も測定した。続いて、それぞれの ROI の信号雑音比 (SNR: signal-to-noise ratio) について、以下のように算出した; $SNR = SI / SD_{air}$ 。造影剤増強率 (CE ratio: contrast enhancement ratio) は、CHESS-T1WI の SNR ($SNR_{pre-contrast}$) と CHESS-Gd-T1WI の SNR ($SNR_{post-contrast}$) を用いて、以下のように算出した; $CE = SNR_{post-contrast} / SNR_{pre-contrast}$ 。それぞれ算出された 3 点の ROI の T2 値、CE ratio、および CHESS-T2WI の SNR ($SNR_{CHESS-T2WI}$) の平均を求めた。

MRI 撮像後、3 ヶ月齢の正常犬と筋ジス犬の右側前脛骨

筋および長趾伸筋, 7歳齢の正常犬と筋ジス犬の右側前脛骨筋の筋生検を施行した。採取した筋サンプルを凍結処理し, H&E 染色, 筋壊死のマーカーである抗 IgG 抗体を用いた免疫組織化学, およびオイルレッド O 染色を実施した。

結果と考察

3ヶ月齢(病初期)の筋ジス犬において病理組織学的に, 右側長趾伸筋は広範かつ重度の壊死・炎症性病変が認められた一方で, 右側前脛骨筋では限局的で中等度の壊死・炎症性変化が認められた。また筋ジス犬の右側長趾伸筋における T2 値, CE ratio, および $SNR_{CHESS-T2WI}$ は, 筋ジス犬の右側前脛骨筋と比較して有意に上昇していたことから, T2 値, CE ratio, および $SNR_{CHESS-T2WI}$ と病理組織学的な壊死・炎症性変化の程度との間に関連があると考えられた。以上から, CHESS-T2WI は造影剤を用いずに筋ジストロフィー病変の同定に有用であることが示された(図 2-3)。

一方, 7歳齢(病末期)の筋ジス犬の右側前脛骨筋において病理組織学的には, 壊死や炎症性変化がほとんど認めら

れず, 再生線維, 脂肪浸潤や線維化が認められた。筋ジス犬の右側前脛骨筋における $SNR_{CHESS-T2WI}$ は, 同年齢の正常犬の $SNR_{CHESS-T2WI}$ と同程度であったことから, CHESS-T2WI は脂肪浸潤が混在する領域でも正確に壊死や炎症性病変を捉えることが可能であると考えられた。一方, T2 値や CE ratio では, 壊死や炎症性病変がほとんど存在しないにもかかわらず, 筋ジス犬の方が正常犬よりも増加していた。T2 値の延長および造影剤増強効果の増大は, 脂肪浸潤, 線維組織の増生や微小血管の血流に起因する可能性があり, 病末期の壊死・炎症性病変を過大評価してしまう可能性が考えられた(図 4-5)。

結 論

CHESS-T2WI は筋ジス犬や DMD の全病期を通じて, 壊死および炎症性病変の存在および程度を, 正確かつ鋭敏に描出することが可能であり, 今後行われうる病態研究および治療研究に有用と考えられた。

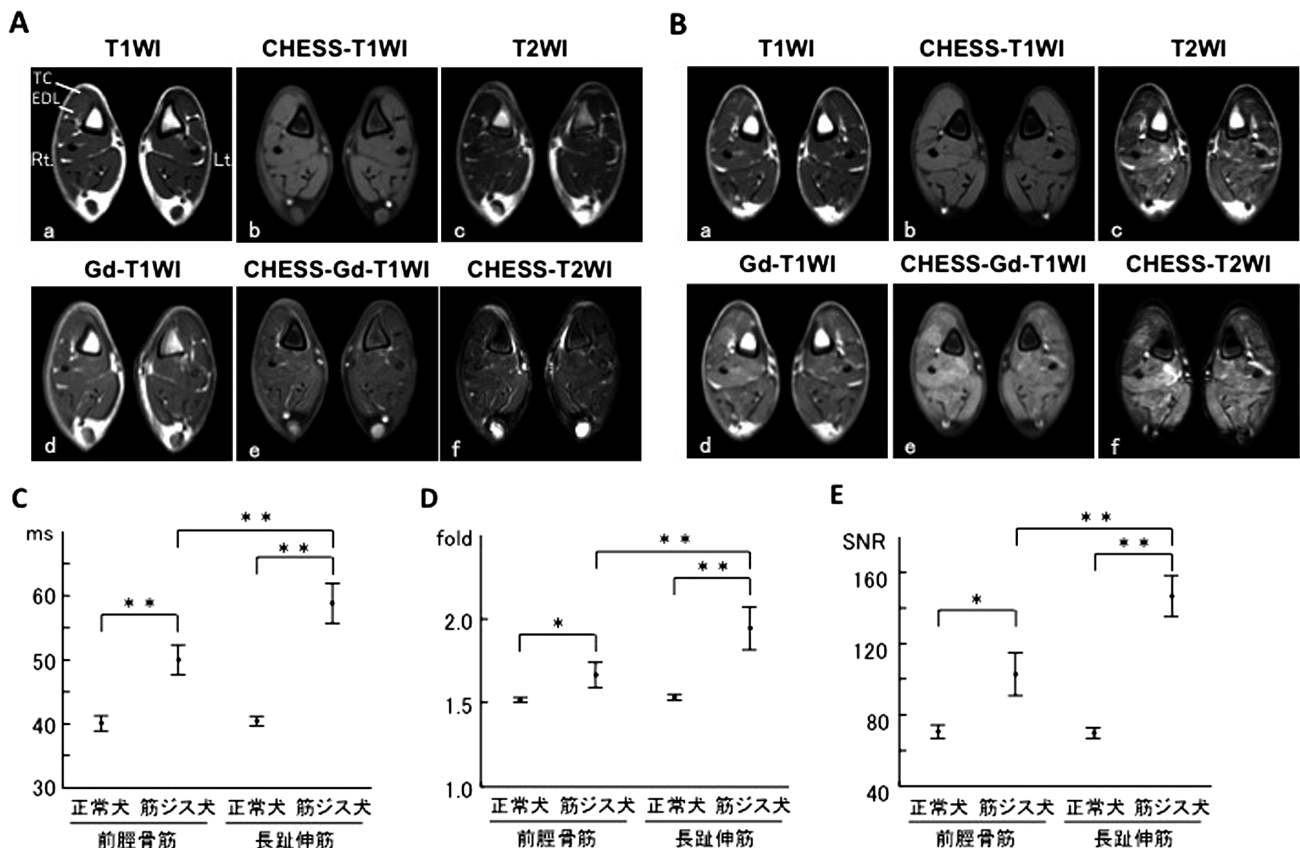


図 2. 3ヶ月齢(病初期)の正常犬および筋ジス犬の MR 画像, MR 信号の定量的評価。3ヶ月齢の正常犬 (A) および筋ジス犬 (B) の T1 強調画像 (a), 脂肪抑制 T1 強調画像 (b), T2 強調画像 (c), 造影 T1 強調画像 (d), 脂肪抑制造影 T1 強調画像 (e), および脂肪抑制 T2 強調画像。Rt.: 右側, Lt.: 左側。TC: 前脛骨筋, EDL: 長趾伸筋。正常犬および筋ジス犬の前脛骨筋および長趾伸筋の (C) T2 値, (D) CE ratio, (E) $SNR_{CHESS-T2WI}$ 。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Error bar: 標準誤差。

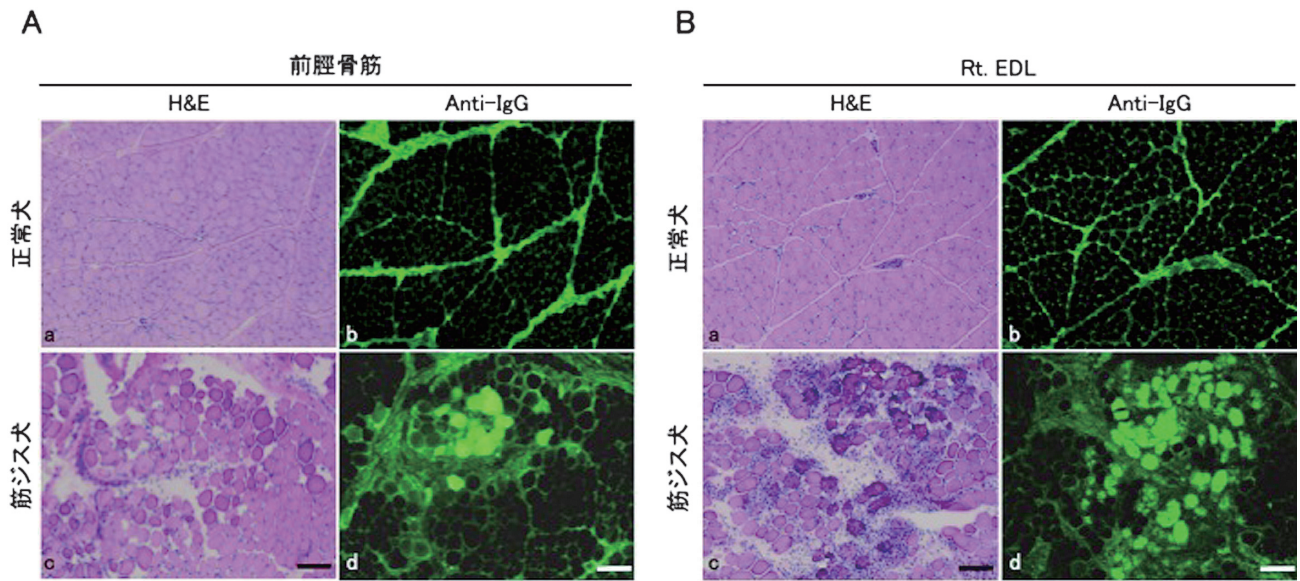


図 3. 3 ヶ月齢（病初期）の正常犬および筋ジス犬の病理組織学的所見。(A) 正常犬 (a, b) および筋ジス犬 (c, d) の前脛骨筋の H&E 染色 (a, c) および抗 IgG 免疫染色像 (b, d)。(B) 正常犬 (a, b) および筋ジス犬 (c, d) の長趾伸筋の H&E 染色 (a, c) および抗 IgG 免疫染色像 (b, d)。Bar : 100 μ m。

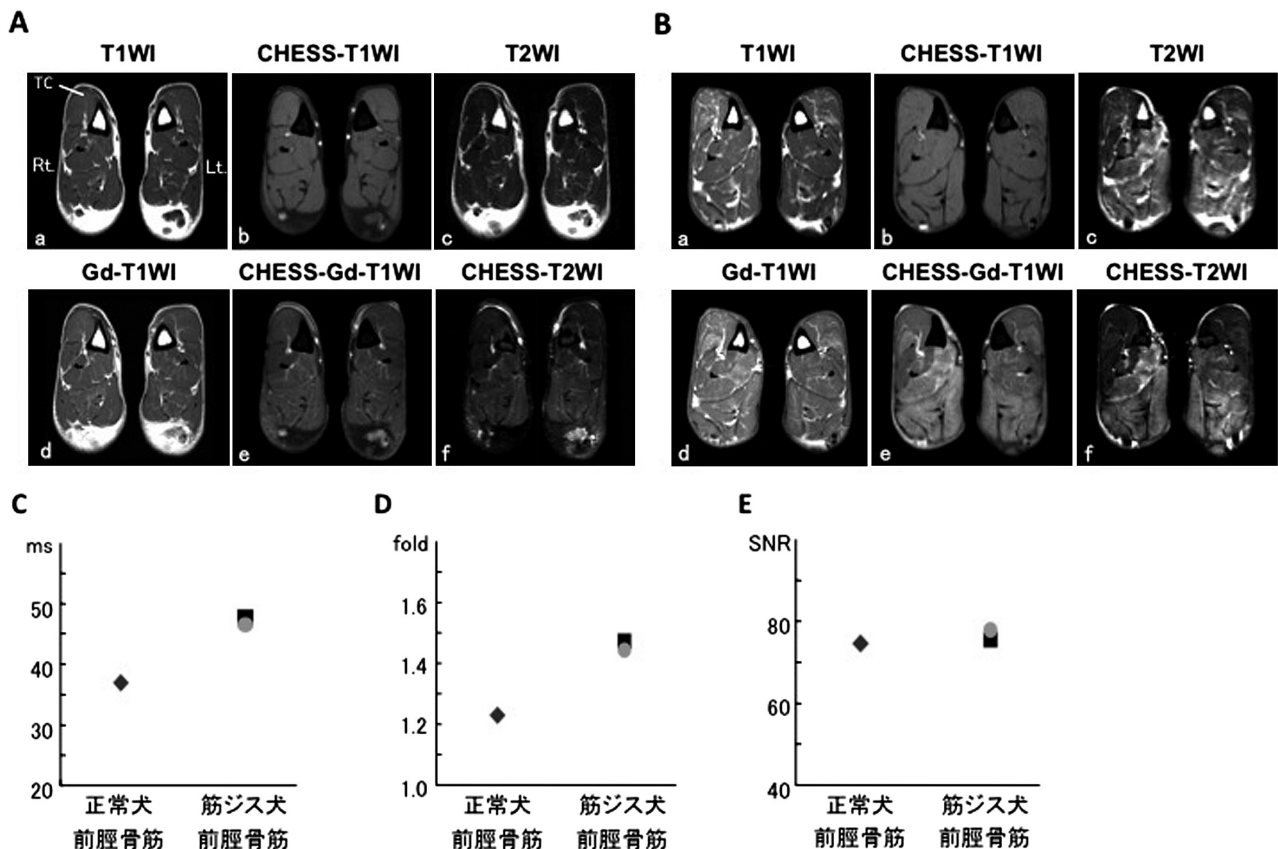


図 4. 7 歳齢（病末期）の正常犬および筋ジス犬の MR 画像, MR 信号の定量的評価。7 歳齢の正常犬 (A) および筋ジス犬 (B) の T1 強調画像 (a), 脂肪抑制 T1 強調画像 (b), T2 強調画像 (c), 造影 T1 強調画像 (d), 脂肪抑制造影 T1 強調画像 (e), および脂肪抑制 T2 強調画像。Rt.: 右側, Lt.: 左側。TC: 前脛骨筋。正常犬および筋ジス犬の前脛骨筋における (C) T2 値, (D) CE ratio, (E) SNR_{CHES-T2WI}。

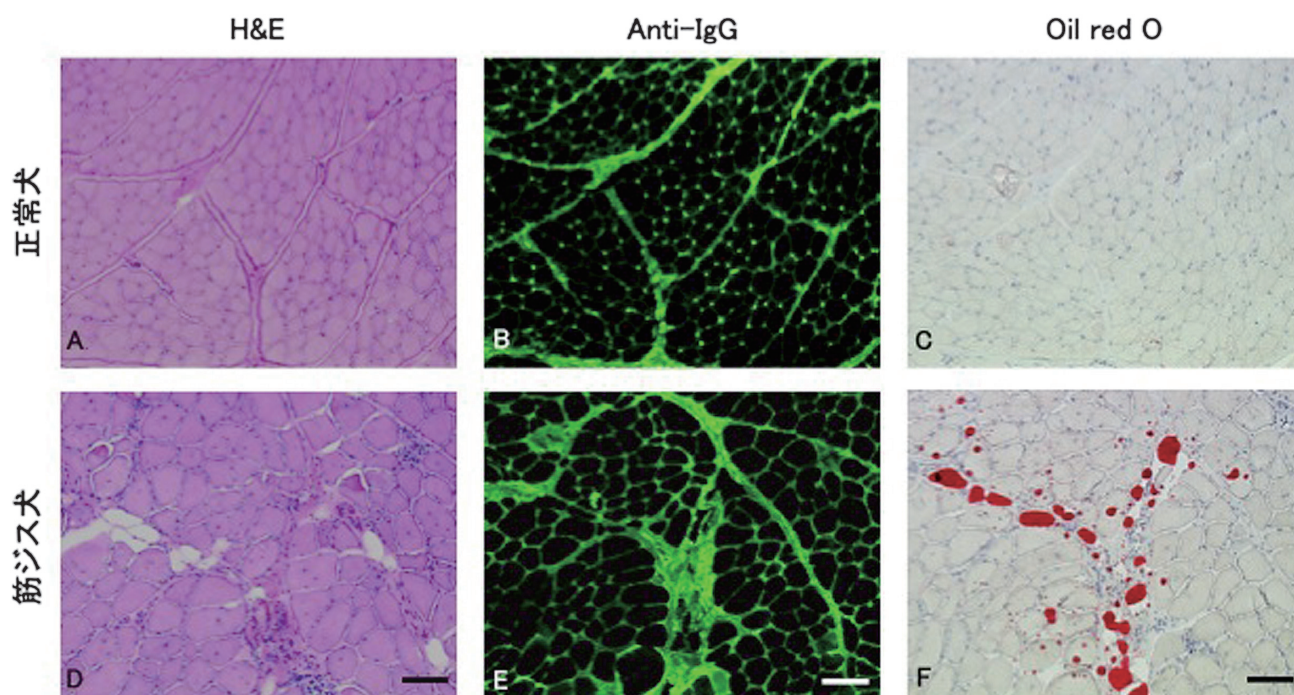


図 5. 7 歳齢（病末期）の正常犬および筋ジストロフィー犬の病理組織学的所見。正常犬（A-C）および筋ジストロフィー犬（D-F）の前脛骨筋の H&E 染色（A,D），抗 IgG 免疫染色（B, E），および Oil red O 染色像（C,F）。Bar : 100 μ m。

参 考 文 献

- 筋ジストロフィー研究連絡協議会：筋ジストロフィーはここまでわかった PART2
- 水野美邦, 栗原照幸：標準神経病学
- SHELTON, G.D. and ENGVALL, E. (2005). Canine and feline models of human inherited muscle disease. *Neuromuscul Disord.*, **15**, 127-38.
- MOSER, H. (1984). Duchenne muscular dystrophy : pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet.*, **66**, 17-40.
- KOENIG, M., HOFFMAN, E.P., BERTELSON, C.J. *et al.* (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, **50**, 509-17.
- CAMPBELL, K.P. (1995). Three muscular dystrophies : loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*, **80**, 675-9.
- ERVASTI, J.M., OHLENDIECK, K., KAHL, S.D. *et al.* (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, **345**, 315-9.
- AMTHOR, H., EGELHOF, T., MCKINNELL, I. *et al.* (2004). Albumin targeting of damaged muscle fibres in the mdx mouse can be monitored by MRI. *Neuromuscul Disord*, **14**, 791-6.
- STRAUB, V., DONAHUE, K.M., ALLAMAND, V. *et al.* (2000). Contrast agent-enhanced magnetic resonance imaging of skeletal muscle damage in animal models of muscular dystrophy. *Magn Reson Med.*, **44**, 655-9.
- DUNN, J.F., TRACEY, I. and RADDA, G.K. (1992). A ³¹P-NMR study of muscle exercise metabolism in mdx mice : evidence for abnormal pH regulation. *J. Neurol. Sci.*, **113**, 108-13.
- DUNN, J.F., TRACEY, I. and RADDA, G.K. (1993). Exercise metabolism in Duchenne muscular dystrophy : a biochemical and [³¹P]-nuclear magnetic resonance study of mdx mice. *Proc. Biol. Sci.*, **251**, 201-6.
- Le RUMEUR, E., Le TALLEC, N., LEWA, C.J. *et al.* (1995). In vivo evidence of abnormal mechanical and oxidative functions in the exercised muscle of dystrophic hamsters by ³¹P-NMR. *J. Neurol. Sci.*, **133**, 16-23.
- KORNEGY, J.N., TULER, S.M., MILLER, D.M. *et al.* (1988). Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve.*, **11**, 1056-64.
- VALENTINE, B.A., COOPER, B.J., de LAHUNTA, A., *et al.* (1988). Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy : Clinical studies. *J. Neurol. Sci.*, **88**, 69-81.
- SHIMATSU, Y., KATAGIRI, K., FURUTA, T. *et al.* (2003). Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). *Exp. Anim.*, **52**, 93-7.
- SHIMATSU, Y., YOSHIMURA, M., YUASA, K. *et al.* (2005). Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ. *Acta. Myol.*, **24**, 145-54.

-
- 17) HUANG, Y., MAJUMDAR, S., GENANT, H.K. *et al.* (1994). Quantitative MR relaxometry study of muscle composition and function in Duchenne muscular dystrophy. *J. MagnReson Imaging*, **4**, 59-64.
- 18) SCHREIBER, A., SMITH, W.L., IONASESCU, V. *et al.* (1987). Magnetic resonance imaging of children with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Radiol*, **17**, 495-7.
- 19) MCINTOSH, L.M., BAKER, R.E. and ANDERSON, J.E. (1998). Magnetic resonance imaging of regenerating and dystrophic mouse muscle. *Biochem. Cell. Biol.*, **76**, 532-41.
- 20) MATSUMURA, K., NAKANO, I., FUKUDA, N. *et al.* (1988). Proton spin-lattice relaxation time of Duchenne dystrophy skeletal muscle by magnetic resonance imaging. *Muscle Nerve*, **11**, 97-102.
- 21) AMTHOR, H., EGELHOF, T., MCKINNELL, I. *et al.* (2004). Albumin targeting of damaged muscle fibres in the mdx mouse can be monitored by MRI. *Neuromuscul Disord*, **14**, 791-6.
- 22) STRAUB, V., DONAHUE, K.M., ALLAMAND, V. *et al.* (2000). Contrast agent-enhanced magnetic resonance imaging of skeletal muscle damage in animal models of muscular dystrophy. *Magn Reson Med.*, **44**, 655-9.
- 23) WALTER, G., CORDIER, L., BLOY, D. *et al.* (2005). Noninvasive monitoring of gene correction in dystrophic muscle. *Magn Reson Med.*, **54**, 1369-76.
- 24) BURSTEIN, D., TARATUTA, E. and MANNING, W.J. (1991). Factors in myocardial "perfusion" imaging with ultrafast MRI and Gd-DTPA administration. *Magn Reson Med.*, **20**, 299-305.
- 25) BAXTER, A.B., LAZARUS, S.C. and BRASCH, R.C. (1993). In vitro histamine release induced by magnetic resonance imaging and iodinated contrast media. *Invest. Radiol.*, **28**, 308-12.
- 26) NOMURA, M., TAKESHITA, G., KATADA, K. *et al.* (1993). A case of anaphylactic shock following the administration of Gd-DTPA [in Japanese]. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi*, **53**, 1387-91.
-