

## 論文の内容の要旨

氏名：安川 慎二

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目：犬の膝蓋骨内方脱臼において生じる骨変形と病態の解析

犬の膝蓋骨内方脱臼（Medial patellar luxation ; MPL）は、膝蓋骨が大腿骨の滑車溝から内方へと変位する疾患と定義されており、犬において最も遭遇する機会の多い整形外科疾患のひとつである。本疾患は、ポメラニアン、ヨークシャー・テリア、トイ・プードル、チワワ、パピヨン、マルチーズといった特定の小型犬種に好発し、外傷を伴わず両側性に発生することが多いことから、遺伝性疾患の可能性が指摘されている。MPLによる臨床症状は、後肢の間欠的跛行から急性の非負重性の跛行まで様々であり、重症例では大腿骨や脛骨に変形が生じ、重度な機能障害を引き起こす。本疾患の原因として、内反股や骨頸部の前捻といった大腿骨の形態異常が関与しているとの報告が散見されるが、他方で膝関節を構成する周辺筋肉の異常が膝蓋骨の脱臼を引き起こし、それに伴って骨変形が生じるという理論も存在し、現在のところMPLの真の原因は明らかとなっていない。

本疾患は、大腿骨、脛骨、膝蓋骨に複合的な骨変形を生じることが知られているが、過去にMPLの骨変形を評価した研究は単一の骨のみに焦点を当てたものが多く、同一個体で複数の骨の変形を同時に評価した報告はほとんど存在しない。また、MPLの症例において大腿四頭筋を含む軟部組織の異常に着目した報告も存在しない。そこで、本研究では、わが国におけるMPLの発生状況を調査し、病態解析に適切な犬種の特定を行った。次いで、MPLによって生じる骨変形について、大腿骨、脛骨、膝蓋骨を包括的に評価し、それらの骨変形と重症度および脱臼機序との関係について検討を行った。さらに、未だ明らかにされていないMPLにおける周辺筋肉の変化について、病理学的および分子生物学的に解析を行いMPLの病因を追求した。

### 第一章 わが国における犬のMPLについての疫学的調査

犬のMPLに関する大規模な疫学的調査は、これまでに米国や英国を含め様々な国で実施されている。しかし、これらの報告はいずれも大学病院などの二次診療施設での調査が中心であるため、犬の飼育頭数に対するMPLの正確な罹患率を把握できていない可能性が高い。さらに、わが国においては、最近の犬の飼育状況を反映したMPLの大規模な疫学的調査は行われていない。そこで、本章では、わが国で飼育されている犬のMPLの発生状況を把握するために、一次診療施設を受診した犬を対象に大規模な疫学的調査を実施した。

本検討は、2004年8月から2015年7月までに一次診療施設に来院した犬を対象に実施した。膝蓋骨脱臼の診断は、立位姿勢での触診により実施し、膝蓋骨脱臼が認められた症例においてはSingletonのグレード分類に基づいてグレード1から4に分類した。診療記録より、犬種、性別、診断時の年齢および体重、罹患側について回顧的に調査を行った。本検討で得られた結果は、平均±標準偏差(SD)で算出し、GraphPad Prism version 6.0を使用して統計学的に解析を行った。犬種、性別、罹患側については $\chi^2$  独立検定、年齢と体重についてはMann-Whitney  $U$  検定を行い、 $P < 0.05$  をもって統計学的に有意差ありと判定した。

本検討は、2770頭の犬（5540肢）についての疫学的調査を行った。今回調査を行った犬の533頭（19.2%）において、MPLを認めた。MPLの症例は、成長期に多く、小型犬種に多い傾向がみられた。MPLと診断した犬種は、トイ・プードルが130頭（24.4%、オッズ比：1.9）と最も多く、それ以外は、チワワが96頭（18.0%、オッズ比：1.9）、ヨークシャー・テリアが40頭（7.5%、オッズ比：3.2）、ポメラニアンが39頭（7.3%、オッズ比：2.2）、ミニチュア・ダックスフンドが45頭（8.4%、オッズ比：0.6）、パピヨンが25頭（4.7%、オッズ比：1.7）、マルチー

ズが 20 頭 (3.8%、オッズ比 : 1.8) と多い傾向を認めた。MPL 罹患犬の性別は、雄が 256 頭 (未去勢 126 頭・去勢済 130 頭)、雌が 277 頭 (未不妊 152 頭・不妊済 125 頭) と、雌の方が有意に罹患率が高かった。両側性の MPL が 342 頭 (12.3%) で認められ、MPL 罹患犬の 64.2% が両側性であった。一方で、片側性の MPL は 191 頭 (6.9%) と両側性に比べて有意に少なかった。全体に対する MPL の各グレードの罹患率は、グレード 1 が 10.9%、グレード 2 が 7.8%、グレード 3 が 3.1%、グレード 4 が 0.3% であった。MPL 罹患犬内での割合は、グレード 1 が 51.0% と最も多く、次いでグレード 2 が 35.1% と、両グレードで 80% 以上を占めていた。さらに、グレード 3 が 12.9%、グレード 4 が 1.0% と、グレードが高くなるにつれて罹患率が低くなる傾向が認められた。

本検討の結果から、わが国で飼育されている犬の 5 頭に 1 頭が MPL に罹患している可能性が指摘された。これは、わが国の犬が罹患している最も多い疾患といっても過言ではなく、その重要性が再認識された。また、MPL の好発犬種は、トイ・プードル、チワワ、ヨークシャー・テリア、ポメラニアンであることが明らかになり、他国の疫学的情報とほとんど一致していた。特に、トイ・プードルにおいて MPL の罹患例が顕著に多かったことから、骨形態や病態の解析に最も臨床的価値の高い犬種であることが示された。

## 第二章 コンピューター断層撮影 (CT) を用いた MPL における骨変形の評価

犬の MPL では、重症度に応じて、大腿骨、脛骨、膝蓋骨に様々な骨変形が生じることが明らかになっている。犬種により骨の形態に解剖学的な差異があるため、膝蓋骨の脱臼が各々の骨の形態に与える影響を正確に評価するためには、同一犬種で検討するのが望ましい。これらの骨変形は、膝関節を構成する複数の骨で同時に生じることが多いため、病態を正確に把握するためには同一個体で同時に複数の骨を三次元で評価することが要求される。しかし、現在までに、MPL の症例の骨変形を包括的にかつ三次元で解析した報告は存在しない。そこで、本章では、第一章の結果にもとづき、わが国で最も MPL の罹患数が多いトイ・プードルを対象に、本疾患によって生じる大腿骨、脛骨、膝蓋骨の骨変形について CT を用いて三次元で評価し、それらの骨変形と重症度との関係について検討を行った。

2012 年 4 月から 2014 年 10 月に日本大学動物病院整形外科を受診したトイ・プードルを対象に検討を行った。MPL が認められた場合には、Singleton のグレード分類によってグレード 1 から 4 に分類した。本検討では、MPL が認められなかった肢を正常群とした。CT 撮影には、16 列 CT 撮影装置 (Aquilion : 東芝) を使用した。得られたデータは、AZE Virtual Place Advance (AZE) を用いて三次元再構築し、OsiriX<sup>®</sup> (OsiriX) を用いて測定を行った。大腿骨では、大腿骨近位の変形を評価する目的で、正面像にて anatomic lateral proximal femoral angle (aLPFA)、mechanical lateral proximal femoral angle (mLPFA)、頸体角を、大腿骨遠位の内反変形を評価する目的で anatomic lateral distal femoral angle (aLDFA)、mechanical lateral distal femoral angle (mLDFA)、内反角を測定した。また、大腿骨の前屈を評価するために、側面像にて anatomic caudal proximal femoral angle (aCdPFA)、mechanical caudal proximal femoral angle (mCdPFA)、anatomic caudal distal femoral angle (aCdDFA)、mechanical caudal distal femoral angle (mCdDFA)、前屈角を測定した。さらに、大腿骨の回旋を評価する目的で軸方向像にて前捻角を測定し、さらに骨頸部の傾きを評価するために新たに骨頭傾角の測定を行った。滑車溝の形態を評価するために、滑車溝の始点から終点を 20 等分し、各横断面にて顆間溝角 (sulcus angle; SA)、後顆軸に対する滑車溝内側関節面のなす角 (medial trochlear inclination; MTI) と外側関節面のなす角 (lateral trochlear inclination; LTI)、滑車角 (trochlear angle; TA) を測定した。大腿骨顆の形態は、各断面像において、大腿骨遠位部を cranial、middle、caudal の 3 つの compartment に分けて評価した。さらに、caudal compartment における内側顆および外側顆の大きさを比較するために、内側顆の骨幅 (MCW; medial condylar width) と外側顆の骨幅 (LCW; lateral condylar width) を測定した。脛骨では、脛骨の外反変形を評価する目的で、正面像にて mechanical medial proximal tibial angle (mMPTA)、mechanical medial distal tibial angle (mMDTA) を測定し、脛骨の前屈を評価するために mechanical cranial proximal tibial angle (mCrPTA)、mechanical cranial distal tibial angle

(mCrDTA) を測定した。また、脛骨近位の形態を評価するために脛骨高平部角 (tibial plateau angle; TPA)、Z 角、relative tibial tuberosity width (rTTW) を測定し、脛骨稜の内方変位を評価するために新たに medial distance of tibial tuberosity/proximal tibial width (MDTT/PTW) を設定し算出した。さらに、脛骨の回旋変形を評価するために tibial torsion angle (TTA) を測定した。膝蓋骨では、長径、短径、厚み、容積、L:P 比を測定した。本検討で得られた結果は、GraphPad Prism version 6.0 を使用して統計学的に解析を行った。群間比較には多重比較解析を用い、 $P < 0.05$  をもって統計学的に有意差ありと判定した。

大腿骨では、グレード 4 においてのみ、aLDFA と mLDFFA、内反角の有意な高値が認められた。また、グレード 4 においては前捻角の有意な低値が認められた。大腿骨遠位部においては、グレード 4 においてのみ、SA の有意な高値と MTI および滑車溝近位側の TA の有意な低値が認められた。さらに、グレード 4 においては、cranial および middle compartment の低形成が生じていた。MCW/LCW は、各群間に有意差は認められなかった。脛骨においては、グレード 4 においてのみ TTA の有意な高値が認められ、MDTT/PTW は有意に低い値を示した。膝蓋骨においては、グレード 4 においてのみ、膝蓋骨の厚みと容積の有意な低値が認められた。一方で、グレード 4 以外のグレードにおいては、正常群と比較し有意な異常は認められなかった。

これらの結果より、MPL のトイ・プードルにおいては、グレード 3 までには有意な骨変形を生じていなかったが、グレード 4 においては、大腿骨、脛骨、膝蓋骨の全てに様々な骨変形が生じていた。グレード 4 の MPL に罹患している症例においては、大腿骨の内反変形と滑車溝の低形成が生じており、大腿骨遠位部では cranial および middle compartment の低形成が生じていた。また、グレード 4 においては、脛骨稜が内方に変位し、脛骨近位の内旋変形が顕著であった。さらに、重度の MPL においては、明らかな膝蓋骨の低形成が生じていた。大腿骨の内反変形と滑車溝の低形成、脛骨稜の内方変位、脛骨近位の内旋変形に関しては、これまでの報告と一致していた。過去に X 線画像をもとに二次元で骨の形態を評価した報告から、重度な MPL の症例における大腿骨内側顆の低形成は caudal compartment の低形成が主体であると考えられてきたが、本検討において三次元で詳細に検討したところ caudal compartment の低形成は生じておらず、新たに cranial および middle compartment の低形成が主体であることが明らかになった。このように、CT を用いて複数の骨を同時に三次元で評価することにより、MPL によって生じる骨変形をより正確に把握することができた。これらの骨変形は、大腿四頭筋群の起始部と終止部を結ぶ直線に沿って生じており、大腿四頭筋群による持続的な牽引が関与している可能性が示唆された。

### 第三章 病理学および分子生物学的手法を用いた MPL の病態メカニズムの解析

重度な MPL の犬で生じる骨変形は、大腿四頭筋群の持続的な牽引に起因する可能性が第二章にて示されたが、これらの関連について検討した報告は未だ存在しない。実際、MPL の整復術中に大腿四頭筋群のひとつである内側広筋のみに過度な緊張が生じていたり、肉眼上の異常を認めたりすることは少なくない。内側広筋は、膝関節安定化機構のひとつであり、その異常は膝蓋骨の内方への変位を引き起こす可能性がある。したがって、大腿四頭筋群の中でも内側広筋の異常が MPL の病態の鍵を握っていると考えている。そこで、本章では、MPL 罹患犬の膝関節周囲の筋肉において超音波検査を実施し、異常の有無と異常な筋肉の同定を行った。さらに、同一症例において術中に内側広筋を採材し、病理学および分子生物学的手法を用いて MPL の病態メカニズムを解析した。

2012 年 4 月から 2015 年 10 月に日本大学動物病院整形外科にて MPL の外科的整復術を実施した犬を対象に検討を行った。まずは、全例で手術前日に膝関節周囲の筋肉において超音波検査を実施した。超音波検査には、高周波リニアプローブを用い、B モードにて筋肉の評価を行い、正常、高輝度、低輝度に 3 つに分類した。超音波検査を実施した全例において、翌日手術を実施し、術中に離断した内側広筋の一部を採取した。その一部を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後にパラフィン包埋し、横断面にて 5 $\mu$ m で薄切した後に、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色および Masson trichrome (MT) 染色を行った。さらに、同じ内側広筋の一部から TRIZOL® (invitrogen) を用いて

mRNA を抽出した。一部の症例において、抽出した mRNA を使用してマイクロアレイを行い、網羅的に mRNA の発現を解析した。マイクロアレイ解析には、43,803 種類の遺伝子および転写産物を搭載した Canine (V2) Gene Expression Microarray (Agilent technologies) を使用した。測定したデータから発現変動遺伝子を抽出し、DAVID (NIAID) にて、機能解析、パスウェイ解析、ヒートマップの作成を行い、mRNA の発現傾向を確認した。これらのマイクロアレイの結果をもとに、内側広筋の異常に関連する遺伝子を推測し、Real time PCR にて候補遺伝子の発現量を定量的に評価した。本検討では、*RPS18* を内部標準遺伝子とし、比較 Ct 法 ( $\Delta\Delta CT$  法) を用いて各遺伝子の相対発現比を算出した。本検討で得られた結果は、GraphPad Prism version 6.0 を使用して統計学的に解析を行った。群間比較には多重比較解析を行い、 $P < 0.05$  をもって統計学的に有意差ありと判定した。

MPL 罹患犬において、膝関節周囲の筋肉の超音波検査を行ったところ、ほとんどの症例で、縫工筋、大腿直筋、内側広筋、外側広筋、中間広筋をそれぞれ描出することができた。MPL 罹患犬では、内側広筋に集中して超音波検査にて異常が認められ、特にグレード 4 では全症例で高輝度を呈した。MPL の手術中に得られた内側広筋の病理組織学的検査を行ったところ、重症度が増すにつれて筋線維の大小不同が認められた。一方で、群萎縮や小角化線維といった神経原性筋萎縮の所見は認められなかった。また、間質の変化はグレード 4 で顕著であり、脂肪置換と膠原線維の浸潤により、筋線維がほとんど認められない症例も存在した。このような内側広筋の異常に対する超音波検査の診断精度は、感度 72.7%、特異度 50.0%であった。MPL 重症例の内側広筋から抽出した mRNA を用いてマイクロアレイによる解析を行ったところ、共通して、解糖系、アディポサイトカインシグナル伝達経路、FOXO シグナル伝達経路において、複数の遺伝子の発現強度の変動が認められた。これらの中で、発現変動遺伝子が多く含まれる経路および過去に筋萎縮の原因として報告のある遺伝子に着目し、解糖系に関与する *PGMI*、*PFKM*、*GAPDH*、*PGAM2* および FOXO シグナル伝達経路に関与する *IGF1*、*AKT3*、*FOXO1*、*PPARGC1A*、*FBXO32* に対しての Real time PCR を行った。グレード 4 の症例においては、今回検討した全ての解糖系に関する mRNA の発現量が低い傾向がみられた。これらの中で、*PGAM2* の発現量はグレード 4 で有意な低値を示した。FOXO シグナル伝達経路においては、グレード 4 において *PPARGC1A* が正常群に比較し有意な低値を示した。

本検討では、MPL の症例で術前に超音波検査を行うことにより、内側広筋の異常をある程度把握することが可能であった。MPL の症例において、病理組織学的検討を行ったところ、内側広筋に明らかな異常が認められ、これらの筋萎縮は神経原性筋萎縮でないことが初めて明らかになった。しかし、内側広筋の異常が筋原性筋萎縮と廃用性筋萎縮のいずれによって生じているかについては半明しなかった。さらに、MPL の重症例では、骨格筋の糖代謝および筋萎縮に関与する mRNA の発現に有意な低下が認められ、分子生物学的にも内側広筋に変化が生じていることが示唆された。本検討は、MPL における内側広筋の状態を病理組織学および分子生物学的手法を用いて解析した初めての研究であり、MPL の病態メカニズムを理解する上で貴重な結果を得ることができた。

## 総括

本研究では、犬の MPL において生じる骨変形を検証し、その病態メカニズムを病理学および分子生物学的手法を用いて解析を行った。MPL は、トイ・プードル、チワワ、ヨークシャー・テリア、ポメラニアンといった人気犬種での発生が多く、また罹患率も高かったことから、MPL はわが国における最重要疾患のひとつであることが確認された。また、本研究では、MPL 罹患犬に生じる骨変形について、同一個体内で膝関節を構成する複数の骨を同時に三次元で解析することにより、従来の研究では得られなかった新たな知見を得ることができた。今回の研究で明らかになった大腿骨顆に生じる形態異常は、外科手術の術式を決定する上で重要な判断基準となり、その臨床的価値は高い。さらに、これまで MPL への関与が疑われていた内側広筋において、病理組織学的な異常と分子生物学的な変化を捉えることができた。MPL の病態メカニズムを明らかにすることはきわめて重要であり、本研究で得られた結果は、獣医療における MPL の治療に大きく貢献することが期待される。