

論文の内容の要旨

氏名：大島 綾華

博士の専門分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：犬の起源不明髄膜脳脊髄炎の疫学、遺伝的および免疫学的要因に関する研究

犬の起源不明髄膜脳脊髄炎（MUO）は、特発性非感染性髄膜脳脊髄炎（NIME）に含まれる肉芽腫性髄膜脳脊髄炎（GME）、壊死性髄膜脳炎（NME）、壊死性白質脳炎（NLE）の総称である。各疾患の確定診断には病理組織学的検査が必須であり、脳・脊髄の組織生検は侵襲性の問題から現実的でなく生前診断が困難であるために、シグナルメント、神経学的検査、MRI 検査、脳脊髄液（CSF）検査等に基づいて MUO と診断される。MUO は若齢～中齢の小型犬に好発し、発生した領域に関連した様々な神経症状を呈する。これらの症状は進行性の挙動をとり無治療では死に至るリスクがある。発症要因としては、感染の関与は否定的であり、遺伝的素因と免疫抑制療法への良好な治療反応性から過剰な免疫応答の関与が重要とされ、免疫介在性疾患の 1 つと考えられている。本研究では日本における MUO の疫学調査をはじめとし、過去に報告されている様々な病態研究に基づいて遺伝的および免疫学的要因に関する更なる検討を行った。

1. 日本大学動物病院神経科における犬の MUO の疫学に関する研究

日本では MUO の好発犬種である小型犬の飼育数が多いものの国内におけるまとまった疫学情報に関する報告はない。発症犬種や診断時の年齢といったシグナルメントに関する情報は MUO の診断時に有用な情報となり、また治療法や予後に関する情報は治療プロトコルの検討をする上で有用となる。したがって、本研究では日本大学動物病院神経科における MUO の疫学調査を行った。

調査期間は 2014 年 1 月から 2022 年 7 月とし、MUO の発生状況は頭蓋内疾患を疑い頭部 MRI 検査を実施し獣医神経専門医が脳疾患を診断した犬を対象とし、脳疾患全体に対する MUO の割合で示した。シグナルメントについては犬種、診断時年齢、診断時体重を調査し、予後については治療法毎に Kaplan-Meier 生存曲線を作成し、一般化ウィルコクソン検定、ログランク検定を用いて比較した。

脳疾患全 876 例のうち 116 例（13.2%）を MUO が占め、脳疾患全体における MUO の発生率は 3 番目に高かった。シグナルメントについては、発症犬種はチワワ（37.2%）、ヨークシャーテリア（11.5%）、雑種（10.6%）、トイ・プードル（8.8%）が上位を占め、診断時年齢の中央値は 5 歳 7 ヶ月（四分位範囲 IQR：3 歳 2.75 ヶ月-8 歳 3 ヶ月）、診断時体重の中央値は 3.1kg（IQR：2.45-4.76）であった。治療法は、プレドニゾロン（PRD）単独を使用した症例（PRD 群）もしくは PRD に加えて免疫抑制剤の 1 つであるシクロスポリン（CYA）を併用した症例（CYA 併用群）が約 9 割を占め、その他の治療を実施した症例は少なかったため、PRD 群、CYA 併用群における Kaplan-Meier 生存曲線のみ作成した。統計的な有意差は認められなかったが、生存期間中央値は PRD 群で 1022 日（IQR：47-1039）、CYA 併用群で 2337 日（IQR：123.75-991）と CYA 併用群において延長傾向が認められた。

本研究では、日本における MUO の高い発生率と発症犬種をはじめとしたシグナルメント情報が明らかとなった。治療法については PRD と CYA 併用による生存期間の延長傾向より CYA の有用性が示唆され、MUO の免疫学的な病態が支持された。

2. MUO 罹患および非罹患のチワワ、トイ・プードルにおけるイヌ白血球抗原 (DLA) クラス II 遺伝子型解析

MUO の病態は未だ解明されないが、遺伝的および免疫学的側面から様々な病態研究が行われ、その 1 つとして DLA 遺伝子型解析が挙げられる。DLA 分子は細胞膜表面に発現する極めて多型に富む糖蛋白質であり、T 細胞へ抗原ペプチドを提示することで自己・非自己を識別させる役割を担っている。本研究で着目した DLA クラス II 分子は主に抗原提示細胞に発現し、DLA クラス II をコードする遺伝子座は 4 つ存在する。特に多型に富む DRB1、DQA1 および DQB1 の 3 つについては、抗原特異的免疫応答や自己免疫寛容への重要な役割が証明され、これまで様々な免疫介在性疾患における解析が行われている。MUO についても、パグの NME、グレイハウンドの NIME における解析が行われ、前者では繁殖プログラムへの実用化もされているが、日本で飼育数の多い小型犬に関する解析は行われていない。したがって本研究では、日本における飼育数上位であり研究 1 にて MUO 発症率の高さが示されたチワワ、トイ・プードルの MUO における DLA クラス II 遺伝子型を解析し、関連因子の特定による繁殖プログラムへの応用を検討した。

血液サンプルは 2 施設から集められ、MUO 群はチワワ 22 例、トイ・プードル 8 例、コントロール群はチワワ 46 例、トイ・プードル 23 例が対象となった。各群の組み入れ基準は、研究 1 の疫学情報と諸外国の MUO 診断基準に基づき設定した。サンガーシーケンス法を用いて DRB1、DQA1 および DQB1 の 3 つの遺伝子型の対立遺伝子 (アレル) のシーケンス配列を決定し、既存のデータベースと比較することで 3 種のアレルの組み合わせである DLA ハプロタイプの推定を行った。統計処理にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。

MUO 群、コントロール群を合わせてチワワでは 23 種、トイ・プードルでは 22 種の DLA ハプロタイプが検出された。チワワではハプロタイプ 5 (Hp.5:DLA-DRB1*015:01--DQA1*006:01--DQB1*023:01) が MUO 群にて有意に高頻度で検出 (オッズ比 7.11、 $p = 0.0141$) され、いずれもヘテロ接合を呈した。トイ・プードルでは有意な DLA ハプロタイプは検出されなかったが、DLA-DQ ハプロタイプである DLA-DQA1*001:01--DQB1*008:02 が MUO 群にて有意に高頻度で検出 (オッズ比 10.38、 $p = 0.0494$) され、いずれもヘテロ接合を呈した。

MUO 群で有意に検出されたハプロタイプは各犬種における MUO リスク因子であると考えられ、犬種毎に様々であることが明らかとなったが、リスク因子の相違と病態の関連性は不明である。パグの NME ではリスク因子のホモ接合にてリスクが増加するため、ホモ接合を回避することで繁殖プログラムへ応用している。本研究で検出された MUO リスク因子はいずれもヘテロ接合であり、特定のハプロタイプの排除は遺伝的多様性の大きな損失を及ぼす可能性があるため、現時点での繁殖プログラムへの応用は困難と考えられた。本研究ではチワワ、トイ・プードルの MUO における DLA クラス II 遺伝子型のリスク因子が検出され、MUO の遺伝的および免疫学的な病態が支持された。

3. MUO 罹患犬におけるインターロイキン 17 (IL-17)、インターフェロン γ (IFN- γ) の解析

抗原提示細胞はリンパ組織にてナイーブ T 細胞に抗原を提示する際に各種サイトカインを分泌し、そのサイトカインの種類に応じてヘルパー T1 (Th1)、T2 (Th2)、T17 (Th17) 細胞への分化を促す。分化したヘルパー T 細胞もまた各種サイトカインを分泌し、Th1 細胞は細胞性免疫、Th2 細胞は液性免疫の活性化、Th17 細胞は自己免疫疾患へ関与する。IFN- γ は主に Th1 細胞、IL-17 は主に Th17 細胞より産生される。これまで犬の MUO に関して、GME の脳組織

における IL-17、NME の脳組織における IFN- γ のメッセンジャーRNA、蛋白の有意な発現や MUO 罹患犬の末梢血フローサイトメトリーにおける IL-17 産生 Th 細胞増加、IFN- γ 産生 Th 細胞減少が報告されており、IL-17、IFN- γ の MUO の病態への関与が示唆されている。過去の研究に基づくと GME では CSF 中の IL-17 濃度が上昇、NME では CSF 中の IFN- γ 濃度が上昇し両者の鑑別診断の補助となる可能性や、MUO で治療前に血清中の IL-17 濃度が上昇、IFN-濃度が減少、治療後に正常化し MUO の診断補助や治療効果の判定に有用となる可能性が予測される。したがって本研究では、MUO 罹患犬の血清、CSF における IL-17、IFN- γ 濃度を評価し前述の仮説の検証を行った。

MUO群の比較対象として特発性てんかん群、椎間板ヘルニア (IVDD) 群を設定し、サンプル数 (IL-17/IFN- γ) はMUO群 (11例/7例)、特発性てんかん群 (5例/3例)、IVDD群 (各3例)であった。MUO群の4例 (症例A~D) については、治療前、治療後1ヵ月、3ヵ月における推移を治療法、各時点での神経症状と併せてモニタリングした。方法は製造元のプロトコルに従ってサンドイッチELISA法による定量試験を行い、疾患毎の比較はクラスカル・ウォリス検定、MUO群の治療経過の比較はフリードマン検定にて行った。

全群のCSFサンプルにおいて、IL-17、IFN- γ 濃度は検出限界以下であった。血清中のIL-17濃度はMUO群で高い傾向が認められたが、検出限界以下の症例が多く含まれた。血清中のIFN- γ 濃度はMUO群にて低い傾向が認められたが、全群中で最も高値を呈した2例もMUO群に含まれた。MUO群の症例A~Dについて、症例BはPRDとシトシンアラビノシド、その他はPRDとCYAによる治療が行われ、症例Aでは治療後に神経症状は悪化、症例B~Dでは神経症状は横ばいから改善を示した。症例Aで治療前の血清中IL-17、IFN- γ 濃度はいずれも他群より高い傾向で治療後に低下した。症例B~Dで血清中IL-17濃度は検出限界以下で、IFN- γ 濃度は治療前に他群より低い傾向で治療後に上昇した。

CSF中のIL-17、IFN- γ 濃度および血清中のIL-17濃度については、サンプル濃縮による検出率向上や超高感度測定法の利用を検討する必要があると考えられた。血清中のIFN- γ 濃度は比較群よりも低い傾向を認めたが、MUO群内での濃度差が顕著であったため、MUOの診断補助としての有用性は多くの症例での追加検討が必要と考えられた。血清中IFN- γ 濃度の治療経過における推移は、一部の症例で治療反応と関連する可能性が示唆されたが、IFN- γ の機能は炎症性メディエーターとしての役割を中心として多岐にわたり、グルココルチコイドによる影響を受けることが示されているため、PRDとの相関性を含めて症例数を増やした更なる検討が必要と考えられた。

総括

本研究では、小型犬飼育数の多い日本において重要な神経疾患の1つである犬のMUOに着目した。研究1では日本におけるMUOの疫学情報が明らかとなり、PRDとCYAの併用による生存期間の延長傾向よりその免疫学的な病態が支持された。研究2ではチワワ、トイ・プードルにおけるDLAクラスII遺伝子型のリスク因子が明らかとなり、その遺伝的および免疫学的な病態が支持された。研究3ではMUO罹患犬の治療前の血清中IFN- γ 濃度が治療反応と関連する可能性が示唆されたが、PRDとの相関性を含めて症例数を増やしたさらなる検討が必要と考えられた。