

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

大島 綾華

2022

目次

	頁
第 1 章 諸論.....	1
第 2 章 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	14
1. 緒言	15
2. 材料および方法	16
(1)頭蓋内疾患罹患犬	
(2)MUO 罹患犬	
(3)統計解析	
3. 結果	16
(1)頭蓋内疾患の疾患内訳	
(2)MUO 罹患犬の詳細な情報	
4. 考察	18
第 3 章 MUO 罹患および非罹患のチワワ、トイ・プードルにおける犬白血球 抗原 (DLA) クラス II 遺伝子型解析	19
1. 緒言	20

2. 材料および方法	21
(1)対象犬と血液サンプル	
(2)MUO の診断基準とコントロールの組入基準	
(3)RNA 分離と complementary DNA (cDNA) 合成	
(4)逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse-transcription polymerase chain reaction : RT-PCR)	
(5)サンガーシーケンスとサブクローニング	
(6)各 DLA クラスIIアレル配列の決定とハプロタイプ推定	
(7)統計解析	
3. 結果	25
(1)チワワ	
(2)トイ・プードル	
4. 考察	28
5. 小括	34
 第 4 章 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	50
1. 緒言	51
2. 材料および方法	53

(1)CSF と血清サンプル	
(2)ELISA を用いた IL-17、IFN- γ 濃度の測定	
(3)統計解析	
3. 結果	56
4. 考察	57
5. 小括	59
第 5 章 総括.....	67
謝辞	75
参考文献	76

略語集

A (anomalous diseases) : 奇形性疾患

cDNA (complementary DNA) : 相補的 DNA

CI (confidence interval) : 信頼区間

CSF (cerebrospinal fluid) : 脳脊髄液

CYA (cyclosporin) シクロスポリン

D (degenerative diseases) : 変性性疾患

DLA (dog leukocyte antigen) : イヌ白血球抗原

EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) : 実験的自己免疫性脳炎

ELISA (enzyme linked immune sorbent assay) : サンドウィッチ酵素結合免疫吸着アッセイ

GFAP (glial fibrillary acidic protein) : グリア線維性酸性蛋白質

GME (granulomatous meningoencephalomyelitis) : 肉芽腫性髄膜脳脊髄炎

Hp.20 (haplotype 20) : ハプロタイプ 20

Hp.5 (haplotype 5) : ハプロタイプ 5

HVR (hyper variable region) : 超可変領域

I (inflammatory diseases) : 炎症性疾患

Id (idiopathic diseases) : 特発性疾患

IFN- γ (interferon gamma) : インターフェロン γ

IL (interleukin) : インターロイキン

IQR (interquartile range) : 四分位範囲

M (metabolic / nutritional diseases) : 代謝性・栄養性疾患

MD (median age at diagnosis) : 診断年齢中央値

MHC (major histocompatibility complex) : 主要組織適合性複合体

MUO (meningoencephalomyelitis of unknown origin) : 起源不明髄膜脳脊髄炎

N (neoplastic diseases) : 腫瘍性疾患

NA (not applicable) : 適応外

NE (necrotizing encephalitis) : 壊死性脳炎

NIME (idiopathic non-infectious meningoencephalomyelitis) : 特発性非感染性髄膜脳脊髄炎

NLE (necrotizing leucoencephalitis) : 壊死性白質脳炎

NME (necrotizing meningoencephalitis) : 壊死性髄膜脳炎

NS (not significant) : 有意差なし

OR (odds ratio) : オッズ比

PRD (prednisolone) : プレドニゾロン

RPE (the relative predispositional effect) : 相対素因効果

RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction) : 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

SNP (single nucleotide polymorphism) : 一塩基多型

T (traumatic / toxic diseases) : 外傷性・中毒性疾患

TG (transglutaminase) : トランスグルタミナーゼ

Th (helper T) : ヘルパーT

Th1 (helper T1) : ヘルパーT1

Th2 (helper T2) : ヘルパーT2

Th17 (helper T17) : ヘルパーT17

V (vascular diseases) : 血管障害性疾患

第 1 章

諸論

犬の起源不明髄膜脳脊髄炎 (meningoencephalomyelitis of unknown origin : MUO) は、特発性非感染性髄膜脳脊髄炎 (idiopathic non-infectious meningoencephalomyelitis : NIME) のグループに含まれる肉芽腫性髄膜脳脊髄炎 (granulomatous meningoencephalomyelitis : GME)、壊死性脳炎 [necrotizing encephalitis : NE、壊死性髄膜脳炎 (necrotizing meningoencephalitis : NME) と壊死性白質脳炎 (necrotizing leucoencephalitis : NLE) を含む] の総称である (Cornelis et al., 2019)。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はなく、生前診断が困難であるため、シグナルメント (犬種、発症年齢)、神経学的検査、MRI 検査、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid : CSF) 検査に基づいて MUO と診断される (Talarico et al., 2010; Coates et al., 2014)。諸外国の報告に基づくと、犬の MUO は一般的に若齢から中齢で好発 (とくに NE は若齢で好発) であり、あらゆる犬種で発症しうるがトイ犬種やテリア犬種といった小型犬種 (パグ、マルチーズ、チワワ、ヨークシャー・テリアなど) に好発である (Granger et al., 2010; Charalambous et al., 2013)。犬の MUO は発生した脳・脊髄領域に関連した様々な神経症状を呈し、てんかん発作、旋回、視覚喪失、捻転斜頸など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 (Adamo et al., 2007; Coates et al., 2014)。犬の MUO の発症要因としては、一般的に免疫抑制療法への良好な治療反応性が認められることから、遺伝的素因に加え過剰な免疫応答の関与が最も重要とされ、免疫介在性疾患の 1 つと考えられている (Toda et al., 2007; Cornelis et al., 2016)。

日本国内において、前述の MUO 好発である小型犬種の飼育率は高く (Japan-Kennel-Club, 2020)、日本国内において犬の MUO は重要な疾患と考えられる。その一方で、日本

国内の犬の MUO に関する臨床症状、各種検査所見、治療法、予後のまとまった報告は認められない。その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診断時に有用となり、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ため、日本国内の犬の MUO に関する詳細な疫学情報の把握は日本の小動物臨床分野において重要である。

現時点で犬の MUO の詳細な病態は解明されていないが、各種感染性因子の関与は否定されており (Nessler et al., 2021; Barber et al., 2022)、遺伝的、免疫学的な側面から様々な病態解析が進められている。イヌ白血球抗原 (dog leukocyte antigen : DLA) 分子、すなわち犬の主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex : MHC) 分子は細胞膜表面に存在する糖蛋白質であり、抗原ペプチドの提示を介して T 細胞へ自己・非自己を識別させる役割を担っている。DLA 分子は、機能的に異なるクラス I 分子とクラス II 分子に大別され、前者はすべての有核細胞、血小板に、後者は抗原提示細胞 (樹状細胞、マクロファージ、B 細胞) に存在する (Sarmiento et al., 1990; Wagner et al., 1999)。DLA クラス I をコードする遺伝子座は DLA-12、64、79、88 の 4 つ、DLA クラス II をコードする遺伝子座は DLA-DRA1、DRB1、DQA1、DQB1 の 4 つ存在する。本研究で注目した DLA クラス II をコードする遺伝子座は第 12 染色体上に存在 (Dutra et al., 1996) し、その多型性は抗原提示によるヘルパー T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞) の誘導を介して、抗原特異的免疫応答や自己免疫寛容といった免疫反応に重要な役割を持つことが証明される (Jurewicz et al., 2019)。中でも特に多型に富む 3 種の遺伝子型 (DLA-DRB1、DQA1、DQB1) については、これまでに免疫介在性溶血性貧血 (Kennedy et al., 2006) や炎症性腸疾患 (Nakazawa et al., 2021) を

はじめとした、様々な犬の免疫介在性疾患における解析が行われている。MUO に関する報告としては、パグの NME (Barber et al., 2011)、グレイハウンドの NIME (Shiel et al., 2014) における上記の各遺伝子型の解析が行われ、各疾患に関連する因子が明らかとなっている。疾患関連因子を特定することは、繁殖レベルでの発症リスクを下げることに寄与するため、MUO 好発犬種の飼育率が高い日本において、小型犬種に焦点を合わせた DLA クラス II 遺伝子解析を行うことが重要と考えられる。

グリア線維性酸性蛋白質 (glial fibrillary acidic protein : GFAP) は、中枢神経系に存在する星状膠細胞に特異的に発現する中間径フィラメント蛋白質である。NME罹患犬のCSF中における抗GFAP抗体の検出 (診断感度91%、特異度73%) は、NMEの免疫学的な病態を支持している (Shibuya et al, 2006; Toda et al., 2007)。

トランスグルタミナーゼ (transglutaminase : TG) は、無脊椎動物から高等動物にわたって広く存在し、蛋白質の架橋結合を通じて生体に様々な生理的意義(血液凝固、皮膚の角質化、表皮細胞の分化など)をもたらす酵素群である。哺乳類では、TG1-7、血液凝固第XIII因子、触媒活性を持たない赤血球バンド4.2がアイソザイムとして存在する (Iismaa et al., 2009)。このうちTG2は、中枢神経系を含む生体内に広く分布し、アポトーシス過程における蛋白架橋形成、血管新生・骨のリモデリング・創傷治癒への関与、炎症調節作用といった複数の機能を通じて、線維化、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病などの神経変性疾患、免疫性介在性疾患、腫瘍発現などの病態への関与が示されている (Johnson et al., 1997; Pearse et al., 2022; Chen et al., 2022)。近年、NMEを中心としたMUO罹患犬におけるCSF中のTG2 IgG抗体濃度の上昇が報告される (Tanaka et al., 2012)。同研究において田中ら

は、犬の中樞神経系に存在する星状膠細胞の多くが細胞質内にTG2を有し、血中から中樞神経系に侵入した抗TG2 IgG抗体が星状膠細胞表面に反応し、そのGFAP発現増強、細胞配列の変化、還元型グルタチオン・グルタミン酸低下を介した抗酸化能低下を及ぼし、修飾因子としてMUOの病態進行を助長する可能性を示している (Tanaka et al., 2014)。

ヘルパーT17 (Th17) 細胞は、近年新たに発見されたヘルパーT細胞の一種であり、インターロイキン (interleukin : IL) -17産生を介した免疫介在性疾患 (ヒトのリウマチ性関節炎、クローン病など)、炎症性疾患の病態への関与が認められる (McGeachy et al., 2008)。具体的な例を挙げると、ヒトのセリアック病は小麦などに含まれるグルテンにより惹起される自己免疫疾患であり、消化管を中心とした慢性炎症により消化器症状、神経症状、皮膚症状などをきたす。セリアック病において、食事から摂取したグルテンの分解産物であるグリアジンがヘルパーT1 (Th1) 細胞、Th17細胞免疫系を介してIL-1 β 、IL-18等の炎症性サイトカインを活性化し、その修飾産物である修飾グリアジンの刺激によりIL-17をはじめとする種々の炎症性サイトカインが産生され、病態が形成されることが明らかとなっている {Kumar, 2017 #48}。また、Th17細胞はIL-27による分化抑制を受けており、IL-27欠損マウスモデルではTh17細胞が増加し、実験的自己免疫性脳炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を発症することが報告される (Yoshida et al., 2009)。獣医学分野では、犬の免疫介在性疾患の1つであるステロイド反応性髄膜脳脊髄炎罹患犬のCSF中において、IL-17の有意な上昇が認められる (Freundt-Revilla et al, 2017) 他、GME罹患犬の脳組織にて、IL-17を分泌するC-Cケモカインレセプタータイプ2発現マクロファージ・小膠細胞・ヘルパーT (Th) 細胞とIL-17のメッセンジャーRNAおよび蛋白の有意な発現が報告さ

れ (Park et al, 2013)、いずれの疾患においてもその病態へのIL-17の関与が示されている。

インターフェロン γ (interferon gamma : IFN- γ) は、Th1細胞、細胞障害性T細胞、NK細胞によって分泌されるサイトカインの一種であり、炎症性メディエーターとしてマクロファージを活性化する機能に加え、種々のヒトの免疫介在性疾患との関連が明らかとされる。ヒトの多発性硬化症は中枢神経系の髄鞘への炎症を惹起し、視力障害、麻痺、感覚障害などの症状をきたす免疫介在性疾患の1つである。多発性硬化症は過去にパグのNMEとその遺伝的背景、病態の類似性が示されており (Greer et al., 2010)、その病変部の血管周囲におけるIFN- γ の有意な上昇が認められ、病態へのIFN- γ の関与が示唆されている (van Langelaar et al., 2020)。獣医学分野では、NME罹患犬の脳組織において、INF- γ を分泌するC-X-Cケモカインレセプター3発現Th細胞とIFN- γ のメッセンジャーRNAおよび蛋白の有意な発現が報告され (Park et al., 2013)、その病態への関与が示されている。MUOの病態へのIL-17、IFN- γ の関与を示唆するこれまでの報告に基づき、MUO罹患犬のCSF、血清中のIL-17、IFN- γ 濃度を実際に測定することで、MUOの診断的補助としての有用性、治療反応性の評価への有用性が期待できる。

本研究では、第2章で日本大学動物病院神経科におけるMUOの疫学に関する調査を行った。第3章では、第2章にてMUOが高率に認められた犬種に関して、過去にパグのNMEで報告されるのと同様のDLAクラスII遺伝子座の解析を行った。第4章では、既存のELISAキットを用いてMUO罹患犬のCSF、血清中のIL-17、IFN- γ の解析を行った。

第 2 章

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

第 2 章は、学術雑誌論文として出版する計画があり公表できないため、要約を記載する。

1. 緒言

日本国内における犬の脳領域の疾患については、過去の関西の二次施設の報告において、特発性てんかん、非感染性脳炎、頭蓋内腫瘍が上位を占め、非感染性脳炎に分類される MUO の発生率の高さが示されている。日本国内での地域差や施設毎の偏りを考慮すると、他施設における更なる調査の余地がある。

諸外国の報告において、犬の MUO は若齢から中齢の小型犬種で好発であり、性差は認められない。MUO では、病変部位によりてんかん発作、旋回、視覚障害等の様々な神経症状が認められる。MUO の MRI 画像所見は、脳・脊髄領域に T2 強調画像における高信号領域を認めるのが一般的であり、CSF 検査については、単核球主体の細胞増多が認めるのが一般的である。MUO の治療法としては、プレドニゾロン (PRD)、各種免疫抑制剤、抗がん剤を用いた免疫抑制療法を中心として、これまでに様々な治療法が検討されている。日本国内では、過去に非感染性脳炎の発症犬種、診断時の年齢が示されているが、諸外国における犬の MUO の疫学情報に相当する報告は認められない。発症犬種や診断時の年齢といったシグナルメント、各種検査に関する情報は、MUO の診断時に有用となり、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ことから、第 2 章では、日本大学動物病院神経科にて頭蓋内疾患を疑い MRI 検査を実施した犬における各神経疾患の診断件数と発症犬種の後向き調査を実施し、さらに MUO と診断された犬の各種検査所見、治療法、予後の調査を通じて日本国内における MUO の疫学情報の解明を試みた。

2. 材料および方法

(1)頭蓋内疾患の内訳

2014年1月から2022年7月までの期間に日本大学動物病院神経科を受診し、病歴、神経学的検査から頭蓋内疾患を疑い頭部MRI検査を実施した犬を調査対象とし、診断内容、発症犬種、診断時の年齢に関する後ろ向き調査を行った。病変は脳領域と頭部に関わる末梢神経領域の2群に分類し、疾患はDAMNIT-V分類法を用いてまとめた。

(2)MUO罹患犬の詳細な疫学情報

(1)にてMUOと診断された犬を対象とし、①シグナルメント、②臨床症状、③血液検査、④MRI検査、⑤CSF検査、⑥治療法、予後に関する後ろ向き調査を行った。

(3)統計解析

診断時の年齢、診断時の体重などの連続変数は、中央値と四分位範囲(IQR)を示した。犬種、性別、臨床症状、MRI検査、CSF検査、治療法などについては、カテゴリ変数として調査対象内での比率を示した。生存期間については、治療法ごとに Kaplan-Meier 生存曲線を作成し、ログランク検定、一般化ウィルコクソン検定により比較した。

3. 結果

(1)頭蓋内疾患の内訳

944例が調査の対象となり、脳領域の疾患のみ診断された症例は864例、頭部に関わる

末梢神経疾患のみ診断された症例は 68 例、両領域の疾患が診断された症例は 12 例であった。

a. 脳領域の疾患分類：

876 例のうち、変性性疾患（degenerative diseases : D）が 2.1%、奇形性疾患（anomalous diseases : A）が 16.3%、代謝性・栄養性疾患（metabolic / nutritional diseases : M）が 1.5%、腫瘍性疾患（neoplastic diseases : N）が 30.1%、特発性疾患（idiopathic diseases : Id）が 34.1%、炎症性疾患（inflammatory diseases : I）が 15.2%、外傷性・中毒性疾患（traumatic / toxic diseases : T）が 0.8%、血管障害性疾患（vascular diseases : V）が 3.5%であった。疾患内容としては、特発性てんかん、脳腫瘍、MUO が上位を占めた。

b. 頭部に関わる末梢神経領域の疾患分類：

80 例のうち、M が 6.3%、N が 2.5%、Id が 67.5%、I が 23.8%であった。疾患内容としては、特発性前庭症候群、中内耳炎による脳神経障害、特発性顔面神経麻痺、多発性脳神経障害が上位を占めた。

(2)MUO 罹患犬の疾患情報

犬種は、チワワ、ヨークシャーテリア、雑種、トイ・プードルが上位を占めた。神経症状は、てんかん発作、視覚喪失、不全麻痺・麻痺が最も一般的であった。血液検査に関しては、肝酵素上昇、WBC 上昇、HCT 低下等が認められた。MRI 画像所見に関しては、病変の分布は多発性、単一、播種性の順に多く、病変の局在は前脳、脳幹、脊髄、視神経、小脳の順に多かった。CSF 検査は約半数の症例で基準値（5 個以下/ μ L）を上回り、細胞

増多が認められる症例における細胞内訳は、単核球主体が大半であった。治療法としては、PRD 単独、PRD とシクロスポリン (CYA) 併用が約 9 割を占めた。PRD 単独群と CYA 併用群以外は症例が少数であったため、PRD 単独群と CYA 併用群のみ Kaplan-Meier 生存曲線を作成した。PRD 群の生存期間中央値は 1022 日、CYA 併用群の生存期間中央値は 2337 日であったが、有意差は認められなかった。PRD 群において、PRD の初期投与量が抗炎症量 ($< 2\text{mg/kg/day}$) の症例の生存期間中央値は 1022 日であり、免疫抑制量 ($\geq 2\text{mg/kg/day}$) の症例の生存期間中央値は 1697 日であったが有意差は認められなかった。

4. 考察

本研究では、日本大学動物病院神経科にて頭蓋内疾患を疑い、頭部 MRI 検査を実施した犬の診断内容を後ろ向きに調査することで、日本国内における頭部の神経疾患として、特発性てんかん、脳腫瘍、MUO の発生が多いことが明らかとなり、過去の報告との類似性が確認された。また犬の MUO は、チワワ、ヨークシャーテリア、トイ・プードルといった日本国内の人気犬種において発症率が高いことが示され、こちらに関しても過去の報告との類似性が確認された。本研究では、日本国内において発生する犬の MUO の詳細な疫学情報が得られ、同時に治療法、予後の調査を通じて PRD と免疫抑制剤の 1 つである CYA の併用、および免疫抑制量の PRD を用いた治療の有用性が示され、MUO の免疫学的な背景が支持された。

第3章

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

1. 緒言

DLA クラス II をコードする各遺伝子座には、複数の対立遺伝子（アレル）が存在し、1 個体につき父と母に由来する 2 つのハプロタイプ（同一染色体上に位置する遺伝子のセット）を有することから、個体レベルの DLA 遺伝子型は非常に多様性に富んでいる。これまでに、Kennedy らによる約 180 犬種、2000 頭を用いた大規模な DLA クラス II 遺伝子型の多型解析が行われており（Kennedy et al., 2007）、動物 MHC のデータベースである IPD/MHC データベースでは、現時点で DLA-DRB1 は 181 種、DQA1 は 30 種、DQB1 は 86 種のアレルが公開されている（<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>）。さらに複数犬種における免疫介在性溶血性貧血、糖尿病、甲状腺機能低下症、アジソン病（Kennedy, 2006a; Kennedy et al., 2006b; Kennedy et al., 2006c; Massey et al., 2013）、ジャーマンシェパードの炎症性腸疾患（Peiravan et al., 2016）、フレンチブルドッグの慢性腸症（Nakazawa et al., 2021）、ミニチュア・ダックスフンドの突発性後天性網膜変性症候群（Stromberg et al., 2019）など、多くの犬の免疫介在性疾患に関連する DLA クラス II 遺伝子型の報告が存在し、各疾患において疾患の罹患率を上げるリスク因子、罹患率を下げる保護因子が解明されている。MUO に関連したものとしては、バグの NME、グレイハウンドの NIME において、同様の解析が行われており（Barber et al., 2011; Shiel et al., 2014）、前者については繁殖プログラムへの応用に至っている。またチワワの NME については、DLA クラス II 遺伝子領域内に疾患に関連した一塩基多型（ある生物種集団のゲノム配列中の一塩基が多様性に変異し、その変異頻度が集団内で 1%以上認められるもの、single nucleotide polymorphism : SNP）の存在が報告されるが（Schrauwen et al., 2014）、その詳細な遺伝子型の調査は行われていない。SNP

の解析のみでは重要な関連遺伝子を見落とす可能性があるため、DLA クラス II 遺伝子型の解析が重要となる。

本研究では、パグの NME で実用化されているような遺伝子解析技術の繁殖プログラムへの応用を目指し、第 2 章にて MUO の罹患頭数が多く、JAPAN KENNEL CLUB データベースにて日本国内での飼育頭数が上位のチワワ、トイ・プードル (<https://www.jkc.or.jp/archives/enrollment/14222>) に着目し、血液サンプルを用いた DLA-DRB1、DQA1、DQB1 のアレル解析、ハプロタイプ推定を介した MUO 関連因子の特定を試みた。

2. 材料および方法

(1)対象犬と血液サンプル

採血は研究使用に関する飼い主の同意を得て、各施設の動物実験および動物福祉に関するガイドラインに沿って行われ、血液サンプルは採取直後に EDTA 処理を行い実験に供した。この研究デザインは、日本大学動物病院の倫理委員会にて承認を受けた。

チワワについては、MUO と診断されたチワワ 22 頭（15 頭は日本大学動物病院にて 2015 年 4 月から 2020 年 12 月の期間内、7 頭はどうぶつの総合病院にて 2019 年 12 月から 2020 年 12 月の期間内に採取）、コントロール犬 46 頭（2015 年 4 月から 2020 年 12 月の期間内に日本大学動物病院にて採取）が対象となった。

トイ・プードルについては、MUO と診断されたトイ・プードル 8 頭（6 頭は日本大学動物病院にて 2015 年 4 月から 2020 年 12 月の期間内、2 頭はどうぶつの総合病院にて 2019 年

12月から2020年12月の期間内に採取)、コントロール犬23頭(2015年4月から2020年12月の期間内に日本大学動物病院にて採取)が対象となった。

(2)MUOの診断基準とコントロールの組み入れ・除外基準

MUOの診断は、発症年齢、病歴、MRI検査、CSF検査等に基づき各施設の獣医神経科医によって行われた。脳圧亢進等の理由によりCSFの採取が不可能だった症例は、治療反応を考慮して総合的に診断した。MUO群の組み入れ基準は、犬のMUOに関する過去の報告{Granger, 2010 #69}に基づいて設定し、(1)6ヶ月齢を超える、(2)MRI検査のT2強調画像において、限局性、多発性、びまん性に高信号を呈する領域を認める、(3)CSF検査が実施された症例に関しては、細胞組成が単核球主体である(MUO罹患例であってもCSF中の細胞数増加を伴わない症例が10-22%存在するため(Munana et al., 1998; Granger et al., 2010)、本研究では細胞数像増多の有無は規定しない)、(4)疑わしい場合に本邦にて一般的に発生する感染症(犬ジステンパーウイルス感染症、ネオスポラ感染症、トキソプラズマ感染症)の除外、(5)脊髄に病変が限局する症例、視神経に病変が限局する症例の除外とした。

コントロールの組み入れ基準は、(1)MUO発症前の遺伝的素因のある症例を除外するために7歳齢を超える、(2)神経症状、免疫介在性疾患の既往がないチワワ、トイ・プードルとした。

(3)RNA分離と complementary DNA (cDNA) 合成

TRIzol LS Reagent (Thermo Fisher Scientific) を製造元のプロトコルに従って使用し、血

液サンプル中の末梢白血球より全 RNA を抽出した。抽出された全 RNA を、DNaseI (Thermo Fisher Scientific) を用いて処理し、Omniscript RT kit (Qiagen) を製造元のプロトコルに従って使用し、オリゴ dT プライマーを用いて cDNA 合成を行った。

(4)逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse-transcription polymerase chain reaction : RT-PCR)

DLA-DRB1、DQA1、DQB1 の各アレルの配列決定のためのプライマーペアは、宮前らの報告 (Miyamae et al., 2019) に基づき設計し、詳細なプライマー情報は補足表 2-1 に示した。サーマルサイクラー GeneAmp 9700 PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を使用し、30 ng の cDNA テンプレート、0.4 U の KOD FX ポリメラーゼ (TOYOBO)、1×PCR バッファ、2 mM の各 dNTP、および 0.4mM の各プライマーを含む計 20μL のサンプルより RT-PCR を行った。サイクル条件は、94°Cで 2 分間の熱変性、続いて 98°Cで 10 秒間、DLA-DRB1、DQB1 は 60°C、DLA-DQA1 は 57°Cで 30 秒間、68°Cで 1 分間の 3 工程を 1 サイクルとして、35 サイクル繰り返した。

(5)サンガーシーケンスとサブクローニング

ABI3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて、BigDye Terminator (Ver.3.1) (Thermo Fisher Scientific) のプロトコルに従い、RT-PCR 産物より直接シーケンスを行った。アレルの決定が困難な場合や、新規アレルの存在が考えられる場合には、TA クローニングキット (TOYOBO) を製造元のプロトコルに従って使用し、RT-PCR 産物

を pMD20 クローニングベクター (Takara Bio) にクローニングし、サブクローニングとサンガーシーケンスにより各アレル配列を得た。

(6)各 DLA クラスIIアレルの決定とハプロタイプ推定

各 DLA クラスIIアレルは、Sequencher ver.5.4.6 DNA sequence assembly software (Gene Codes Corporation) を用いて、サンガーシーケンスにより得られた各アレル配列を、IPD-MHC canine database (IPD-MHC., 2021) および GenBank (NIBC., 2021) より公開されている既知の DLA-DRB1、DQA1、DQB1 アレル配列と比較して決定した。3つの遺伝子座すべてを含む DLA ハプロタイプ (DLA-DRB1--DQA1--DQB1)、DLA-DQA1、DQB1 の遺伝子座を含む DLA-DQ ハプロタイプ (DLA-DQA1--DQB1) は、宮前ら (Miyamae et al., 2019) と中澤ら (Nakazawa et al., 2021) の報告と同様の方法で、過去の複数の論文において同定されたハプロタイプの情報を参考として手動で推定した。DLA ハプロタイプ番号に関しては、チワワ、トイ・プードルの犬種毎に、MUO 群とコントロール群を併せて頻度の多いものから順に設定した。両者の区別のため、チワワの DLA ハプロタイプは下線なし、トイ・プードルの DLA ハプロタイプ番号は下線付きとした。

(7)統計解析

MUO 群とコントロール群のアレル、ハプロタイプ頻度について、分割表 (2×2) と両側 Fisher の正確確率検定を使用して、P 値と 95%信頼区間 (CI) を伴うオッズ比 (OR) を算出した。類似の研究 (Perneger et al., 1998; Stromberg et al., 2019) での推奨に従い、ボンフ

エラーニ補正は行わなかった。また、The relative predispositional effect (RPE) 法を用いて、MUO 群およびコントロール群のハプロタイプ頻度における相互の素因効果を確認した。MUO 群とコントロール群におけるハプロタイプの全体的な分布をカイ二乗検定にて比較し、最大の素因効果をもつハプロタイプを全体的な分布への寄与率より決定した。最大の素因効果を持つハプロタイプが存在した場合には、それを除外して残りのハプロタイプのみで再度解析を行った。この手順を、MUO 群とコントロール群の間で有意差が無くなるまで繰り返した (Payami et al., 1989)。統計解析には GraphPad Prism5 (MDF) を使用し、統計的有意性は $P < 0.05$ とした。

3. 結果

(1)チワワ：

MUO 群の年齢中央値は 41 ヲ月齡 (範圍：7-146 ヲ月齡) であり、雄 10 頭 (うち 7 頭が去勢済)、雌 12 頭 (うち 11 頭が避妊済) の計 22 頭であった。コントロール群の年齢中央値は 133 ヲ月齡 (範圍：85-204 ヲ月齡) であり、雄 28 頭 (うち 18 頭が去勢済)、雌 18 頭 (うち 12 頭が避妊済) の計 46 頭であった。

22 頭の MUO 群と 46 頭のコントロール群の計 68 頭より、15 種の DLA-DRB1 アレル (表 2-1)、7 種の DLA-DQA1 アレル (表 2-2)、17 種の DLA-DQB1 アレル (表 2-3) が同定された。各遺伝子座におけるホモ接合率は、DLA-DRB1 で 22.1%、DLA-DQA1 で 30.9%、DLA-DQB1 で 10.3%であった。遺伝子座毎に最もアレル頻度が高かったものは、DLA-DRB1*015:01 (38.97%)、DLA-DQA1*006:01 (36.03%)、DLA-DQB1*008:01:1 (23.53%) で

あった。

22頭のMUO群と46頭のコントロール群の計68頭より、23種のDLAハプロタイプが推定された(表2-4)。4種のDLAハプロタイプが、単一のチワワより推定されたため、“その他の単一ハプロタイプ群”のグループにまとめた。さらに、2つの推定できないDLAハプロタイプが存在したため、それらを“未確認のハプロタイプ群”のグループにまとめた。DLAハプロタイプ頻度は、0.74%から23.53%と様々であった。また、22頭のMUO群と46頭のコントロール群の計68頭より、20種のDLA-DQハプロタイプが推定された(表2-5)。

MUO群において、DLA-DQB1*023:01のアレル頻度はコントロール群と比較して、OR 8.51 (95%CI 1.69-42.93) と有意に高かった ($P = 0.0053$)。ハプロタイプ5 (Hp.5 : DLA-DRB1*015:01--DQA1*006:01--DQB1*023:01) と “その他の単一ハプロタイプ群”に属するハプロタイプ20 (Hp.20 : DLA-DRB1*015:02--DQA1*006:01---DQB1*023:01) はいずれもDLA-DQB1*023:01を含んでおり、2つのハプロタイプの違いはDLA-DRB1のアレルに限局しており、当該アレルであるDLA-DRB1*015:01とDLA-DRB1*015:02は、エクソン2の超可変領域 (hyper variable region : HVR) 外の単一のアミノ酸 (T90A) のみ異なる (図2-1)。その他にMUO群とコントロール群の間に有意な関連を認めるアレルは存在しなかった。

MUO群において、Hp.5はコントロール群と比較して、OR 7.11 (95%CI 1.37-36.81) と有意に高かった ($P = 0.0141$) (表2-4)。MUO群では22頭中6頭 (27.27%) がHp.5を含んでいたことに対し、コントロール群では46頭中2頭がHp.5を含んでおり、いずれの群でもヘテロ接合で認められた。その他にMUO群とコントロール群の間に有意な関連を認める

DLA ハプロタイプは存在しなかった。また MUO 群において、DLA-DQ ハプロタイプである DLA-DQA1*006:01--DQB1*023:01 がコントロール群と比較して、OR 8.51 (95%CI 1.69-42.93) と有意に高かった (P=0.0053)。

(2) トイ・プードル :

MUO 群の年齢中央値は 69.5 ヲ月齡 (範圍 : 21-89 ヲ月齡) であり、雄 4 頭 (うち 3 頭が去勢済)、雌 4 頭 (うち 3 頭が避妊済) の計 8 頭であった。コントロール群の年齢中央値は 126 ヲ月齡 (範圍 : 86-171 ヲ月齡) であり、雄 11 頭 (うち 10 頭が去勢済)、雌 12 頭 (うち 11 頭が避妊済) の計 23 頭であった。

8 頭の MUO 群と 23 頭のコントロール群の計 31 頭より、11 種の DLA-DRB1 アレル (表 2-6)、5 種の DLA-DQA1 アレル (表 2-7)、13 種の DLA-DQB1 アレル (表 2-8) が同定された。各遺伝子座におけるホモ接合率は、DLA-DRB1 で 35.5%、DLA-DQA1 で 48.4%、DLA-DQB1 で 25.8%であった。遺伝子座毎に最もアレル頻度が高かったものは、DLA-DRB1*015:01 (37.10%)、DLA-DQA1*006:01 (43.55%)、DLA-DQB1*023:01 (22.58%) であった。

8 頭の MUO 群と 23 頭のコントロール群の計 31 頭より、22 種の DLA ハプロタイプが推定された (表 2-9)。14 種の DLA ハプロタイプが、単一のトイ・プードルより推定されたため、“その他の単一ハプロタイプ群”のグループにまとめた。さらに、2 つの推定できない DLA ハプロタイプが存在したため、それらを“未確認のハプロタイプ群”のグループにまとめた。DLA ハプロタイプ頻度は、3.23%から 22.58%と様々であった。また 8 頭の

MUO 群と 23 頭のコントロール群の計 31 頭より、15 種の DLA-DQ ハプロタイプが推定された (表 2-10)。

MUO 群において、DLA-DQB1*008:02 のアレル頻度はコントロール群と比較して、OR 15.00 (95%CI 1.53-147.00) と有意に高く (P = 0.0136)、いずれもヘテロ接合で認められた。MUO 群において、コントロール群と比較して有意な 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 群にてコントロール群と比較して OR 10.38 (95%CI 0.99-108.50) と有意に高く (P = 0.0494)、いずれもヘテロ接合性を呈した。

4. 考察

本研究では、MUO 群のチワワにおいて DLA-DQB1*023:01、Hp.5 (DLA-DRB1*015:01--DQA1*006:01--DQB1*023:01)、DLA-DQA1*006:01--DQB1*023:01 が、コントロール群と比較して有意に高い頻度で認められた。この結果より DLA-DQB1*023:01、Hp.5、DLA-DQA1*006:01--DQB1*023:01 は、チワワの MUO 発症のリスク因子である可能性が示唆された。Hp.5 以外に DLA-DQB1*023:01 を含んでいた DLA ハプロタイプは Hp.20 のみであり、本研究において MUO 群のチワワ 1 頭で検出された。Hp.5 と Hp.20 は、ハプロタイプの構成要素である DLA-DRB1 アレルが異なるが、DLA-DRB1*015:01 と DLA-DRB1*015:02 の違いは、免疫学的に重要とされる HVR (Salvat et al., 1994) 外の単一のアミノ酸が異なるのみである。医学において MHC 分子の抗原提示に関連する構造的・機能的変化は、その HVR の配列のわずかな違いによって引き起こされる可能性が示されている (Gardiner et al.,

2007)。獣医学においても同様の報告が認められる (Kennedy et al., 2006a) ことから、チワワの MUO において Hp.20 は Hp.5 に類似した免疫学的効果を有する可能性が推測される。

トイ・プードルにおいては、MUO 群にて DLA-DQB1*008:02、DLA-DQA1*001:01--DQB1*008:02 がコントロール群と比較して有意に高い頻度で認められたが、有意な DLA ハプロタイプは認められなかった。この結果より、DLA-DQB1*008:02、DLA-DQA1*001:01--DQB1*008:02 は、トイ・プードルの MUO 発症のリスク因子である可能性が示唆された。トイ・プードルにおいて MUO に有意な DLA ハプロタイプが検出されなかったことに関しては、14 種もの DLA ハプロタイプが単一のトイ・プードルより推定され、DLA ハプロタイプのバリエーションに対してサンプル数が少ないことが影響している可能性が高く、サンプル数を増やして再検討する必要がある。

チワワの Hp.5 は、これまでコッカー・スパニエル、スプリンガー・スパニエル、雄のスタンダード・プードルにおけるアジソン病のリスク因子 (Treeful et al., 2019)、複数犬種における糖尿病のリスク因子 (Kennedy et al., 2006b) として報告される。一方で、トイ・プードルの DLA-DQA1*001:01--DQB1*008:02 は、これまでビアーダコリーにおけるアジソン病、ループス状爪異栄養症のリスク因子として報告 (Gershony et al., 2019) される。機序は不明であるが、チワワの Hp.5、トイ・プードルの DLA-DQA1*001:01--DQB1*008:02 は犬種を超えて免疫介在性疾患に共通する遺伝子型である可能性があり、両犬種の MUO の免疫学的な病態を支持する根拠となった。しかし、チワワの MUO 群で有意な頻度で認められた Hp.5 は、トイ・プードルで検出されたが有意ではなく、トイ・プードルの MUO 群で有意な頻度で認められた DLA-DQA1*001:01--DQB1*008:02 もチワワで検出されたが有意

ではなく、両犬種で MUO のリスク因子に相違が認められた。

パグとチワワ、トイ・プードルの MUO 関連ハプロタイプには、明らかな違いが認められた。以前のパグの NME に関する DLA クラス II 遺伝子の多型解析を行った研究は、NME 発症のリスクハプロタイプ (DLA-DRB1*010:01:1--DQA1*002:01--DQB1*015:01)、保護ハプロタイプ A (DLA-DRB1*015:02--DQA1*006:01--DQB1*023:01)、保護ハプロタイプ B (DLA-DRB1*015:01--DQA1*006:01--DQB1*023:01) の存在を明らかにした (Barber et al., 2011)。本研究のチワワ、トイ・プードルにおいてパグの NME リスクハプロタイプは検出されず、トイ・プードルのリスク因子である DLA-DQA1*001:01--DQB1*008:02 はパグでは検出されていないが、チワワの Hp.20 と Hp.5 はパグの NME の保護ハプロタイプ A と B に一致するものであった。過去に犬種による DLA クラス II アレルの多型性に偏りが報告されており (Kennedy et al., 2007b)、パグの NME リスクハプロタイプは、パグに優勢なハプロタイプである可能性がある。リスクハプロタイプの違いは、チワワとパグで MUO の病態が異なる可能性を示している。リスクハプロタイプと保護ハプロタイプの交差は、ジャーマン・シェパードの炎症性腸疾患におけるリスクハプロタイプ (DLA-DRB1*015:01--DQA1*006:01--DQB1*003:01) (Peiravan et al., 2016) とフレンチブルドックの慢性腸症における保護ハプロタイプ (Nakazawa et al., 2021) でも報告され、これは犬の第 12 染色体上に存在する DLA 遺伝子に近接したその他の因子に関連した連鎖不平衡に起因すると考えられる (Yuhki et al., 2007; Barnes et al., 2009)。例えば、犬の第 12 染色体上に存在する *IL17A* 遺伝子は、Th17 により産生されるサイトカインの 1 つであり、マウスの自己免疫性脳炎の発症に関連することがわかっている (Ishigame et al., 2009)。GME 罹患犬の脳組織において

も、*IL17R* mRNA の有意な発現が認められる (Park et al., 2013) ことから、IL-17A は MUO 発症に関連する免疫介在性因子の 1 つである可能性がある。また、パグの NME の研究では RPE 法を用いていない (Greer et al., 2010) ため、強いリスクハプロタイプの影響を受け、保護ハプロタイプ A、B が見かけ上有意となった可能性もある。そしてその機能的な要素よりも、パグという犬種における DLA 多型の偏り (6 種類のハプロタイプのみ報告) により、保護ハプロタイプ A、B が有意となった可能性も否定できない (Greer et al., 2010; Kennedy et al., 2007b)。

グレイハウンドの NIME では、リスクハプロタイプ C (DLA-DRB1*018:02--DQA1*001:01--DQBI*008:02)、リスクハプロタイプ D (DLA-DRB1*015:01--DQA1*006:01--DQBI*022:01) が検出されている (Shiel et al., 2014)。本研究のチワワにおいて、リスクハプロタイプ C は検出されず、リスクハプロタイプ D は検出されたが MUO 発症との関連は認められなかった。本研究のトイ・プードルにおいて、リスクハプロタイプ C は MUO のリスク因子である DLA-DQA1*001:01--DQBI*008:02 と一部一致しており、リスクハプロタイプ D は検出されるも MUO 発症との関連は認められなかった。以上より、本研究と過去その他犬種の MUO に関連する研究を比較することで、MUO に関連するリスク因子は犬種毎に一部共通するも様々であることが明らかとなったが、リスク因子の違いと病態との関連性は現時点では不明である。

過去のパグの NME の報告では、リスクハプロタイプのホモ接合性個体 (OR 12.75) がヘテロ接合性個体 (OR 1.13) より強い NME 発症への関連を示した (Greer et al., 2010)。リスクハプロタイプのホモ接合性の回避により NME の発症リスクを下げる事が可能で

あることから、パグの NME 関連遺伝子の解析は、主に繁殖プログラムを補助するために商業的に利用されている (Pedersen et al., 2011)。本研究においてチワワ、トイ・プードルの MUO のリスクハプロタイプは、いずれの個体でもヘテロ接合性を呈している。特定のハプロタイプを繁殖プログラムから完全に排除することは、ゲノム全体の遺伝的多様性の大きな喪失と、その他の悪影響を及ぼす可能性があるため、チワワ、トイ・プードルの MUO においてはリスクハプロタイプを繁殖プログラムから排除することは難しい (Greer et al., 2009)。よって、パグの NME に類似した商業レベルでの遺伝子検査をチワワ、トイ・プードルの MUO で確立するには、DLA クラス II ではないその他の遺伝子解析が必要と考えられる。例としては、医学領域において、脳神経系に炎症を惹起する免疫介在性疾患である神経ベーチェット病、神経スイート病において MHC クラス I 遺伝子の関連が示されている (Tsunemi et al., 2006) ため、チワワ、トイ・プードルの MUO でも同様の解析を行うことが理想的と考えられる。

これまでに様々な犬の DLA クラス II 遺伝子解析に関連する報告が存在する (Kennedy et al., 2007a; Kennedy et al., 2007b; Kennedy et al., 2007c) が、我々が知る限りチワワ、トイ・プードルにおける DLA-DRB1、DQA1、DQB1 アレルと各遺伝子座のハプロタイプに関するまとまった報告は存在しない。本研究は、日本国内のチワワ、トイ・プードルにおける DLA-DRB1、DQA1、DQB1 アレルと各遺伝子座のハプロタイプを初めて明らかにした。本研究内で同定されたチワワ、トイ・プードルの DLA ハプロタイプはそれぞれ 23 種、22 種であり、これまでに報告される他犬種の DLA ハプロタイプと比較して多型に富んでいること明らかとなった (ラブラドル・レトリバー : 13 種、ビーグル : 9 種、ニュー・フ

アンドラント：8種、ドーベルマン：7種、イングリッシュ・セッター：6種、ボクサー：5種）(Kennedy et al., 2007b)。チワワ、トイ・プードルが、多くのハプロタイプを有する原因については明らかでない。さらに、各遺伝子型における全体のホモ接合性に関して、チワワ（DLA-DRB1：22.1%、DLA-DQA1：30.9%、DLA-DQB1：10.3%）では他の犬種と比較して低い傾向が認められた[アメリカン・アキタ（DLA-DRB1:29.7%、DLA-DQA1：37.2%、DLA-DQB1：26.6%）、ジャーマン・シェパード（DLA-DRB1:46.7%、DLA-DQA1：46.7%、DLA-DQB1：26.7%）、ワイマラナー（DLA-DRB1:39.3%、DLA-DQA1：50.5%、DLA-DQB1：21.4%）]（Angles et al., 2005）。チワワの各遺伝子座のホモ接合性の低さに関しては、チワワがメキシコからアメリカへ輸入され、他の小型犬種との交配が成されてきたという歴史に起因する可能性がある（van Asch et al., 2013; CANADIAN-KENNEL-CLUB, 2022）。チワワ、トイ・プードルの DLA の多様性とその免疫応答を解明するためには、DLA クラス I 遺伝子を含む詳細な遺伝子解析を、より多くの頭数で解析する必要がある。

本研究のリミテーションとしては、まず病理組織学的検査に基づく MUO の細分化がされていない点である。次にチワワ、トイ・プードルの両犬種においてハプロタイプのバリエーションの多さに対してサンプル数が少ない点であり、本研究は MUO に関連したチワワ、トイ・プードルの DLA クラス II 遺伝子型のアレル、ハプロタイプの解析を行ったパイロットスタディを目指した。最後に研究費の問題から、本研究では SBTengine (Gendx) などの適切な解析プログラムを使用しておらず、わずかなハプロタイプの推定ミスが含まれる可能性がある点である。

5. 小括

本研究では、血液サンプルを用いた DLA クラス II 遺伝子型の多型解析により、チワワの MUO において Hp.5 (DLA-DRB1*015:01--DQA1*006:01--DQB1*023:01) と DLA-DQA1*006:01--DQB1*023:01 のハプロタイプが、トイ・プードルの MUO において DLA-DQA1*001:01--DQB1*008:02 のハプロタイプがリスク因子である可能性が示され、チワワ、トイ・プードルの MUO における遺伝的背景を裏付けることができた。いずれのリスク因子もヘテロ接合性を呈するものが大半であり、特定のハプロタイプを繁殖プログラムから完全に排除することは、ゲノム全体の遺伝的多様性の大きな喪失と、その他の悪影響を及ぼす可能性があるため、現時点でチワワ、トイ・プードルの MUO においてはパグの NME で実用化されている DLA クラス II 遺伝子型の繁殖プログラムへの応用は困難である。

表 2-1. MUO 罹患のチワワ 22 頭とコントロール 46 頭の DLA 遺伝子型のアレル頻度 : DRB1

DLA-DRB1	アレル総数		アレル数				ホモ接合性を呈する犬の頭数					
	2n = 136	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO群 n = 4	コントロール群 n = 11	P値	OR (95%CI)
			2n = 44	%	2n = 92	%						
001:01	4	2.94	3	6.82	1	1.09	NS	6.66 (0.67-65.99)	0	0		
002:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
006:01	8	5.88	4	9.09	4	4.35	NS	2.20 (0.52-9.25)	0	0		
009:01	33	24.26	8	18.18	25	27.17	NS	0.60 (0.24-1.46)	0	3	NS	0.27 (0.01-6.47)
012:01	11	8.09	5	11.36	6	6.52	NS	1.84 (0.53-6.39)	1	0	NS	9.86 (0.32-300.70)
013:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
015:01	53	38.97	17	38.64	36	39.13	NS	0.98 (0.47-2.05)	3	8	NS	1.13 (0.08-15.52)
015:02	1	0.74	1	2.27	0	0.00	NS	6.38 (0.25-159.90)	0	0		
017:02	4	2.94	1	2.27	3	3.26	NS	0.69 (0.07-6.83)	0	0		
018:01	4	2.94	2	4.55	2	2.17	NS	2.14 (0.29-15.75)	0	0		
020:01	7	5.15	1	2.27	6	6.52	NS	0.33 (0.04-2.86)	0	0		
035:01	1	0.74	1	2.27	0	0.00	NS	6.38 (0.25-159.90)	0	0		
046:01	1	0.74	0	0.00	1	1.09	NS	0.69 (0.03-17.18)	0	0		
073:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
113:01	3	2.21	1	2.27	2	2.17	NS	1.05 (0.09-11.87)	0	0		

いずれのアレル頻度においても、両群の有意差は認められなかった。

(DLA : 犬白血球抗原 dog leukocyte antigen、MUO : 起源不明髄膜脳脊髄炎 meningoencephalomyelitis of unknown origin、

NS : 有意差なし not significant、CI : 信頼区間 confidence interval、OR : オッズ比 odds ratio、統計学的有意差 : $P < 0.05$)

表 2-2. MUO 罹患のチワワ 22 頭とコントロール 46 頭の DLA 遺伝子型のアレル頻度 : *DQA1*

DLA-DQA1	アレル総数		アレル数				ホモ接合性を呈する犬の頭数					
	2n = 136	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO群 n = 7	コントロール群 n = 14	P値	OR (95%CI)
			2n = 44	%	2n = 92	%						
001:01	50	30.76	14	31.82	36	39.13	NS	0.73 (0.34-1.55)	2	7	NS	0.40 (0.06-2.80)
002:01	8	5.88	3	6.82	5	5.43	NS	1.27 (0.29-5.59)	0	0		
003:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
004:01	17	12.50	5	11.36	12	13.04	NS	0.85 (0.28-2.60)	1	0	NS	6.69 (0.24-187.40)
005:01:1	8	5.88	4	9.09	4	4.35	NS	2.20 (0.52-9.25)	0	0		
006:01	49	36.03	18	40.91	31	33.70	NS	1.36 (0.65-2.86)	4	7	NS	1.33 (0.21-8.29)
009:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		

いずれのアレル頻度においても、両群の有意差は認められなかった。

表 2-3. MUO 罹患のチワワ 22 頭とコントロール 46 頭の DLA 遺伝子型のアレル頻度 : *DQB1*

DLA-DQB1	アレル総数		アレル数				ホモ接合性を呈する犬の頭数					
	2n = 136	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO群 n = 2	コントロール群 n = 5	P値	OR (95%CI)
			2n = 44	%	2n = 92	%						
001:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
002:01	7	5.15	4	9.09	3	3.26	NS	2.97 (0.63-13.88)	0	0		
005:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
007:01	5	3.68	3	6.82	2	2.17	NS	3.30 (0.53-20.47)	0	0		
008:01:1	32	23.53	8	18.18	24	26.09	NS	0.63 (0.26-1.54)	0	3	NS	0.14 (0.00-4.47)
008:02	10	7.35	2	4.55	8	8.70	NS	0.50 (0.10-2.46)	0	0		
013:02	1	0.74	1	2.27	0	0.00	NS	6.38 (0.25-159.90)	0	0		
013:03	10	7.35	2	4.55	8	8.70	NS	0.50 (0.10-2.46)	0	0		
013:03 + 017:01	9	6.62	4	9.09	5	5.43	NS	1.74 (0.44-6.83)	1	0	NS	11.00 (0.28-434.20)
013:04	4	2.94	1	2.27	3	3.26	NS	0.69 (0.07-6.83)	0	0		
020:01	6	4.41	1	2.27	5	5.43	NS	0.40 (0.05-3.57)	0	0		
020:02	9	6.62	4	9.09	5	5.43	NS	1.74 (0.44-6.83)	0	1	NS	0.60 (0.02-21.00)
022:01	17	12.50	2	4.55	15	16.30	NS	0.24 (0.05-1.12)	0	1	NS	0.60 (0.02-21.00)
023:01	9	6.62	7	15.91	2	2.17	0.0053	8.51 (1.69-42.93)	1	0	NS	11.00 (0.28-434.20)
026:01	7	5.15	3	6.82	4	4.35	NS	1.61 (0.34-7.53)	0	0		
028:01	4	2.94	1	2.27	3	3.26	NS	0.69 (0.07-6.83)	0	0		
057:01	2	1.47	1	2.27	1	1.09	NS	2.12 (0.13-34.67)	0	0		

17 種の DLA-DQB1 アレルが検出され、DLA-DQB1*023:01 が MUO 群にて有意に高い頻度で認められた (太字)。DLA-DQB1*008:01 がいずれの群においても最も高い頻度で検出された。

表 2-4. MUO 罹患のチワワ 22 頭とコントロール 46 頭の DLA-DRB1--DQA1--DQB1 ハプロタイプ頻度

ハプロタイプ 番号	ハプロタイプ DLA-DRB1--DQA1--DQB1	ハプロタイプ総数		ハプロタイプ数				ホモ接合性を呈する犬の頭数					
		2n = 136	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO群 n = 1	コントロール群 n = 5	P値	OR (95%CI)
				2n = 44	%	2n = 92	%						
Hp.1	009:01--001:01--008:01:1	32	23.53	8	18.18	24	26.09	NS	0.63 (0.26-1.54)	0	3	NS	0.24 (0.01-8.62)
Hp.2	015:01--006:01--022:01	16	11.76	2	4.55	14	15.22	NS	0.27 (0.06-1.22)	0	1	NS	1.00 (0.02-40.31)
Hp.3	012:01--004:01--013:03 + 017:01	9	6.62	4	9.09	5	5.43	NS	1.74 (0.44-6.83)	1	0	NS	33.00 (0.44-2473.00)
Hp.4	015:01--006:01--020:02	9	6.62	4	9.09	5	5.43	NS	1.74 (0.44-6.83)	0	1	NS	1.00 (0.02-40.31)
Hp.5	015:01--006:01--023:01	8	5.88	6	13.64	2	2.17	0.0141	7.11 (1.37-36.81)	0	0		
Hp.6	020:01--004:01--013:03	7	5.15	1	2.27	6	6.52	NS	0.33 (0.04-2.86)	0	0		
Hp.7	015:01--006:01--026:01	7	5.15	3	6.82	4	4.35	NS	1.61 (0.34-7.53)	0	0		
Hp.8	015:01--006:01--020:01	6	4.41	1	2.27	5	5.43	NS	0.40 (0.05-3.57)	0	0		
Hp.9	015:01--001:01--008:02	5	3.68	0	0.00	5	5.43	NS	0.18 (0.01-3.31)	0	0		
Hp.10	018:01--001:01--008:02	4	2.94	2	4.55	2	2.17	NS	2.14 (0.29-15.75)	0	0		
Hp.11	006:01--005:01:1--028:01	4	2.94	1	2.27	3	3.26	NS	0.69 (0.07-6.83)	0	0		
Hp.12	017:02--002:01--013:04	4	2.94	1	2.27	3	3.26	NS	0.69 (0.07-6.83)	0	0		
Hp.13	001:01--001:01--002:01	4	2.94	3	6.82	1	1.09	NS	6.66 (0.67-65.99)	0	0		
Hp.14	006:01--005:01:1--007:01	4	2.94	3	6.82	1	1.09	NS	6.66 (0.67-65.99)	0	0		
Hp.15	113:01--002:01--013:03	3	2.21	1	2.27	2	2.17	NS	1.05 (0.09-11.87)	0	0		
Hp.16	015:01--006:01--057:01	2	1.47	1	2.27	1	1.09	NS	2.12 (0.13-34.67)	0	0		
Hp.17	002:01--009:01--001:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
Hp.18	013:01--003:01--005:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
Hp.19	073:01--001:01--002:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
	その他の単一ハプロタイプ群	4	2.94	3	6.82	1	1.09	NA	NA	0	0		
	未確認のハプロタイプ群	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NA	NA	0	0		

23 種のハプロタイプが検出され、Hp.5 (DLA-DRB1*015:01--DQA1*006:01--DQB1*023:01) が MUO 群にて有意に高い頻度で認められた

(太字)。Hp.1 (DLA-DRB1*009:01--DQA1*001:01--DQB1*008:01:1) がいずれの群においても最も高い頻度で検出された。

(NA : 適応外 not applicable)

表 2-5. MUO 罹患のチワワ 22 頭とコントロール 46 頭の DLA-DQ ハプロタイプ頻度

ハプロタイプ DLA-DQA1--DQB1	ハプロタイプ総数		ハプロタイプ数						ホモ接合性を呈する犬の頭数			
	2n = 136	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO群 n = 2	コントロール群 n = 5	P値	OR (95%CI)
			2n = 44	%	2n = 92	%						
001:01--008:01:1	32	23.53	8	18.18	24	26.09	NS	0.63 (0.26-1.54)	0	3	NE	0.14 (0.00-4.47)
006:01--022:01	16	11.76	2	4.55	14	15.22	NS	0.27 (0.06-1.22)	0	1	NS	0.60 (0.02-21.00)
001:01--008:02	10	7.35	2	4.55	8	8.70	NS	0.50 (0.10-2.46)	0	0		
006:01--023:01	9	6.62	7	15.91	2	2.17	0.0053	8.51 (1.69-42.93)	1	0	NS	11.00 (0.28-434.20)
004:01--013:03 + 017:01	9	6.62	4	9.09	5	5.43	NS	1.74 (0.44-6.83)	1	0	NS	11.00 (0.28-434.20)
006:01--020:02	9	6.62	4	9.09	5	5.43	NS	1.74 (0.44-6.83)	0	1	NS	0.60 (0.02-21.00)
006:01--026:01	7	5.15	3	6.82	4	4.35	NS	1.61 (0.34-7.53)	0	0		
004:01--013:03	7	5.15	1	2.27	6	6.52	NS	0.33 (0.04-2.86)	0	0		
006:01--020:01	6	4.41	1	2.27	5	5.43	NS	0.40 (0.05-3.57)	0	0		
001:01--002:01	6	4.41	3	6.82	3	3.26	NS	2.17 (0.42-11.22)	0	0		
005:01:1--028:01	4	2.94	1	2.27	3	3.26	NS	0.69 (0.07-6.83)	0	0		
002:01--013:04	4	2.94	1	2.27	3	3.26	NS	0.69 (0.07-6.83)	0	0		
005:01:1--007:01	4	2.94	3	6.82	1	1.09	NS	6.66 (0.67-65.99)	0	0		
002:01--013:03	3	2.21	1	2.27	2	2.17	NS	1.05 (0.09-11.87)	0	0		
006:01--057:01	2	1.47	1	2.27	1	1.09	NS	2.12 (0.13-34.67)	0	0		
009:01--001:01	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NS	0.41 (0.02-8.66)	0	0		
その他の単一ハプロタイプ群	4	2.94	2	4.55	2	2.17	NA	NA	0	0		
未確認のハプロタイプ群	2	1.47	0	0.00	2	2.17	NA	NA	0	0		

20 種のハプロタイプが検出され、DLA-DQA1*006:01--DQB1*023:01 が MUO 群にて有意に高い頻度で認められた (太字)。

表 2-6. MUO 罹患のトイ・プードル 8 頭とコントロール 23 頭の DLA 遺伝子型のアレル頻度 : *DRB1*

DLA-DRB1	アレル総数		アレル数				ホモ接合性を呈する犬の頭数					
	2n = 62	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO群 n = 1	コントロール群 n = 10	P値	OR (95%CI)
			2n = 16	%	2n = 46	%						
001:01	2	11.92	0	0.00	2	4.35	NS	0.54 (0.02-11.85)	0	0		
001:06	5	8.06	1	6.25	4	8.70	NS	0.70 (0.07-6.77)	0	1	NS	2.11 (0.06-80.04)
002:01	1	1.61	1	6.25	0	0.00	NS	8.46 (0.33-218.10)	0	0		
003:02	4	6.45	2	12.50	2	4.35	NS	3.14 (0.40-24.43)	0	0		
005:01	1	1.61	0	0.00	1	2.17	NS	0.92 (0.04-23.72)	0	0		
006:01	1	1.61	1	6.25	0	0.00	NS	8.46 (0.33-218.10)	0	0		
009:01	12	19.35	2	12.50	10	21.74	NS	0.51 (0.10-2.65)	1	3	NS	6.43 (0.21-201.20)
013:01	4	6.45	1	6.25	3	6.52	NS	0.96 (0.09-9.91)	0	0		
015:01	23	37.10	3	18.75	20	43.48	NS	0.30 (0.08-1.20)	0	6	NS	0.23 (0.01-7.05)
015:03	5	8.06	3	18.75	2	4.35	NS	5.08 (0.76-33.73)	0	0		
novF	2	11.92	0	0.00	2	4.35	NS	0.54 (0.02-11.85)	0	0		

いずれのアレル頻度においても、両群の有意差は認められなかった。

表 2-7. MUO 罹患のトイ・プードル 8 頭とコントロール 23 頭の DLA 遺伝子型のアレル頻度 : *DQA1*

DLA-DQA1	アレル総数		アレル数				ホモ接合性を呈する犬の頭数					
	2n = 62	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO群 n = 3	コントロール群 n = 12	P値	OR (95%CI)
			2n = 16	%	2n = 46	%						
001:01	16	25.81	7	43.75	19	41.30	NS	1.11 (0.35-3.49)	2	5	NS	2.80 (0.20-40.08)
003:01	3	4.84	0	0.00	3	6.52	NS	0.38 (0.02-7.70)	0	0		
005:01:1	2	3.23	2	12.50	0	0.00	NS	16.03 (0.73-353.70)	0	0		
006:01	27	43.55	5	31.25	22	47.83	NS	0.50 (0.15-1.66)	0	7	NS	0.10 (0.00-2.47)
009:01	4	6.45	2	12.50	2	4.35	NS	3.14 (0.40-24.43)	1	0	NS	75.00 (1.05-5371.00)

いずれのアレル頻度においても、両群の有意差は認められなかった。

表 2-8. MUO 罹患のトイ・プードル 8 頭とコントロール 23 頭の DLA 遺伝子型のアレル頻度 : *DQB1*

DLA-DQB1	アレル総数		アレル数						ホモ接合性を呈する犬の頭数			
	2n = 62	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO群 n = 1	コントロール群 n = 7	P値	OR (95%CI)
			2n = 16	%	2n = 46	%						
001:01	4	6.45	2	12.50	2	4.35	NS	3.14 (0.40-24.43)	1	0	NS	45.00 (0.61-3300.00)
002:01	6	9.68	1	6.25	5	10.87	NS	0.55 (0.06-5.07)	0	1	NS	1.44 (0.04-56.19)
005:01	2	3.23	0	0.00	2	4.35	NS	0.54 (0.02-11.85)	0	0		
007:01	1	1.61	1	6.25	0	0	NS	9.00 (0.35-232.70)	0	0		
008:01:1	11	17.74	1	6.25	10	21.74	NS	0.24 (0.03-2.05)	0	3	NS	0.38 (0.02-7.70)
008:02	5	8.06	4	25.00	1	2.17	0.0136	15.00 (1.53-147.00)	0	0		
022:01	1	1.61	0	0.00	1	2.17	NS	0.92 (0.04-23.72)	0	0		
023:01	14	22.58	4	25.00	10	21.74	NS	1.20 (0.32-4.54)	0	1	NS	0.13 (0.00-3.66)
026:01	11	17.74	1	6.25	10	21.74	NS	0.24 (0.03-2.05)	0	2	NS	0.73 (0.02-25.11)
036:01	1	1.61	0	0.00	1	2.17	NS	0.92 (0.04-23.72)	0	0		
046:01	1	1.61	0	0.00	1	2.17	NS	0.92 (0.04-23.72)	0	0		
nov1	2	3.23	0	0.00	2	4.35	NS	0.54 (0.02-11.85)	0	0		
nov4	1	1.61	0	0.00	1	2.17	NS	0.92 (0.04-23.72)	0	0		

13 種の DLA-DQB1 アレルが検出され、DLA-DQB1*008:02 が MUO 群にて有意に高い頻度で認められた (太字)。

表 2-9. MUO 罹患のトイ・プードル 8 頭とコントロール 23 頭の DLA-DRB1--DQA1--DQB1 ハプロタイプ頻度

ハプロタイプ 番号	ハプロタイプ DLA-DRB1--DQA1--DQB1	ハプロタイプ総数		ハプロタイプ数				ホモ接合を呈する犬の数			
		2n = 62	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO n = 0	Control n = 7
				2n = 16	%	2n = 46	%				
<u>Hp.1</u>	015:01--006:01--026:01	11	17.74	1	6.25	10	21.74	NS	0.24 (0.03-2.05)	0	2
<u>Hp.2</u>	009:01--001:01--008:01:1	10	16.13	1	6.25	9	19.57	NS	0.27 (0.03-2.36)	0	3
<u>Hp.3</u>	015:01--006:01--023:01	9	14.52	1	6.25	8	17.39	NS	0.32 (0.04-2.76)	0	1
<u>Hp.4</u>	015:03--006:01--023:01	5	8.06	3	18.75	2	4.35	NS	5.08 (0.76-33.73)	0	0
<u>Hp.5</u>	001:06--001:01--002:01	5	8.06	1	6.25	4	8.70	NS	0.70 (0.07-6.77)	0	1
<u>Hp.6</u>	013:01--003:01--nov1	2	3.23	0	0.00	2	4.35	NS	0.54 (0.02-11.85)	0	0
<u>Hp.7</u>	003:01--001:01--008:02	2	3.23	1	6.25	1	2.17	NS	3.00 (0.18-51.01)	0	0
<u>Hp.8</u>	novF--009:01--001:01	2	3.23	0	0.00	2	4.35	NS	0.54 (0.02-11.85)	0	0
	その他の単一ハプロタイプ群	14	22.58	6	37.50	8	17.39	NA	NA	0	0
	未確認のハプロタイプ群	2	3.23	2	12.50	0	0.00	NA	NA	0	0

いずれのハプロタイプ頻度においても、両群の有意差は認められなかった。

表 2-10. MUO 罹患のトイ・プードル 8 頭とコントロール 23 頭の DLA-DQ ハプロタイプ頻度

ハプロタイプ DLA-DQA1--DQB1	ハプロタイプ総数		ハプロタイプ数						ホモ接合を呈する犬の数				
	2n = 62	%	MUO群		コントロール群		P値	OR (95%CI)	MUO群 n = 1	コントロール 群 n = 7		P値	OR (95%CI)
			2n = 16	%	2n = 46	%				群	群		
006:01--023:01	14	22.58	4	25.00	10	21.74	NS	1.20 (0.32-4.54)	0	1	NS	1.44 (0.04-56.19)	
006:01--026:01	11	17.74	1	6.25	10	21.74	NS	0.24 (0.03-2.05)	0	2	NS	0.73 (0.02-25.11)	
001:01--008:01:1	11	17.74	1	6.25	10	21.74	NS	0.24 (0.03-2.05)	0	3	NS	0.43 (0.01-14.09)	
001:01--002:01	6	9.68	1	6.25	5	10.87	NS	0.55 (0.06-5.07)	0	1	NS	1.44 (0.04-56.19)	
001:01--008:02	4	6.45	3	18.75	1	2.17	0.0494	10.38 (0.99-108.50)	0	0			
009:01--001:01	4	6.45	2	12.50	2	4.35	NS	3.14 (0.40-24.43)	1	0	NS	45.00 (0.61-3300.00)	
003:01--nov1	2	3.23	0	0.00	2	4.35	NS	16.03 (0.73-353.70)	0	0			
その他の単一ハプロタイプ群	8	12.90	2	12.50	6	13.04	NA	NA	0	0			
未確認のハプロタイプ群	2	3.23	2	12.50	0	0.00	NA	NA	0	0			

15 種のハプロタイプが検出され、DLA-DQA1*001:01--DQB1*008:02 が MUO 群にて有意に高い頻度で認められた (太字)。

補足表 2-1. cDNA テンプレートを用いた DLA クラス II アレルのタイピングに用いたプライマー

DLAクラスII遺伝子座	プライマー名	プライマー配列 (5' to 3')	位置	参照
DLA-DRB1	DRB1-F1	GCACCCTGTCCTTTCTG	14 - 30	<i>Miyamae et al. (2019)</i>
	DRB1-R1	TCACCATCTCCACTTCAG	837 - 854	
DLA-DQA1	DQA1-F1	AGTTCTGATTCTGGGGAC	22 - 39	<i>Miyamae et al. (2019)</i>
	DQA1-R1	TCTGGGAGGTGGGCAT	803 - 818	
DLA-DQB1	DQB1-F1	CAGGTAGGAGCTGTGTTGAC	32 - 51	<i>Miyamae et al. (2019)</i>
	DQB1-R1	CGGTATCCTCAGGCATC	887 - 903	

補足表 2-2. MUO 罹患のチワワ 22 頭とコントロール 46 頭における各 DLA-DRB1--DQA1--DQB1 ハプロタイプの RPE 解析

ハプロタイプ 番号	ハプロタイプ DLA-DRB1--DQA1--DQB1	Round 1		X ²	P値
		ハプロタイプ数			
		MUO群	コントロール群		
Hp.1	009:01--001:01--008:01:1	8	24	1.03	0.309
Hp.2	015:01--006:01--022:01	2	14	3.27	0.071
Hp.3	012:01--004:01--013:03 + 017:01	4	5	0.64	0.422
Hp.4	015:01--006:01--020:02	4	5	0.64	0.422
Hp.5	015:01--006:01--023:01	6	2	7.06	0.008 *
Hp.6	020:01--004:01--013:03	1	6	1.10	0.294
Hp.7	015:01--006:01--026:01	3	4	0.37	0.542
Hp.8	015:01--006:01--020:01	1	5	0.71	0.401
Hp.9	015:01--001:01--008:02	0	5	2.48	0.115
Hp.10	018:01--001:01--008:02	2	2	0.59	0.444
Hp.11	006:01--005:01:1--028:01	1	3	0.10	0.750
Hp.12	017:02--002:01--013:04	1	3	0.10	0.750
Hp.13	001:01--001:01--002:01	3	1	3.43	0.064
Hp.14	006:01--005:01:1--007:01	3	1	3.43	0.064
Hp.15	113:01--002:01--013:03	1	2	0.00	0.971
Hp.16	015:01--006:01--057:01	1	1	0.29	0.591
Hp.17	002:01--009:01--001:01	0	2	0.97	0.325
Hp.18	013:01--003:01--005:01	0	2	0.97	0.325
Hp.19	073:01--001:01--002:01	0	2	0.97	0.325
	その他の単一ハプロタイプ群	3	1	NA	NA
	未確認のハプロタイプ群	0	2	NA	NA
	全体	44	92	30.84	0.057

Round 1 にて、MUO 群とコントロール群の全体の有意差が認められなかったため、Round 2 には進まなかった。よって、Hp.5 (太字) 以外に両群間で有意なハプロタイプは存在しなかった。(* : P < 0.05)

補足表 2-3. MUO 罹患のチワワ 22 頭とコントロール 46 頭における各 DLA-DQ ハプロタイプの RPE 解析

ハプロタイプ DLA-DQA1--DQB1	Round 1		X ²	P 値	
	ハプロタイプ数				
	MUO 群	コントロール群			
001:01--008:01:1	8	24	1.03	0.309	
006:01--022:01	2	14	3.27	0.071	
001:01--008:02	2	8	0.75	0.386	
006:01--023:01	7	2	9.09	0.003	*
004:01--013:03 + 017:01	4	5	0.64	0.422	
006:01--020:02	4	5	0.64	0.422	
006:01--026:01	3	4	0.37	0.542	
004:01--013:03	1	6	1.10	0.294	
006:01--020:01	1	5	0.71	0.401	
001:01--002:01	3	3	0.89	0.345	
005:01:1--028:01	1	3	0.10	0.750	
002:01--013:04	1	3	0.10	0.750	
005:01:1--007:01	3	1	3.43	0.064	
002:01--013:03	1	2	0.00	0.971	
006:01--057:01	1	1	0.29	0.591	
009:01--001:01	0	2	0.97	0.325	
その他の単一ハプロタイプ群	2	2	NA	NA	
未確認のハプロタイプ群	0	2	NA	NA	
全体	44	92	21.76	0.114	

Round 1 にて、MUO 群とコントロール群の全体の有意差が認められなかったため、Round 2 には進まなかった。よって、DLA-

DQA1*00601--DQB1*023:01 (太字) 以外に両群間で有意なハプロタイプは存在しなかった。(* : P < 0.05)

補足表 2-4. MUO 罹患のトイ・プードル 8 頭とコントロール 23 頭における各 DLA-DQ ハプロタイプの RPE 解析

Round 1				
ハプロタイプ DLA-DQA1--DQB1	ハプロタイプ数		X ²	P値
	MUO群	コントロール群		
006:01--023:01	4	10	0.07	0.788
006:01--026:01	1	10	1.95	0.162
001:01--008:01:1	1	10	1.95	0.162
001:01--002:01	1	5	0.29	0.590
001:01--008:02	3	1	5.40	0.020 *
009:01--001:01	2	2	1.31	0.253
003:01--nov1	0	2	0.72	0.397
その他の単一ハプロタイプ群	2	6	NA	NA
未確認のハプロタイプ群	2	0	NA	NA
全体	16	46	11.11	0.085

Round 1 にて、MUO 群とコントロール群の全体の有意差が認められなかったため、Round 2 には進まなかった。よって、DLA-

DQA1*00101--DQB1*008:02 (太字) 以外に両群間で有意なハプロタイプは存在しなかった。(* : P < 0.05)

	I - - - HVR 1 - - - I		I - - - - HVR 2 - - - - I				I - - - - - HVR 3 - - - - - I				
	10	20	30	40	50	60	70	80	90		
DRB1*015:01	H F L E M	V K F E C H F T N G	T E R V R L L V R D	I Y N R E E H V R F	D S D V G E Y R A V	T E L G R P D A E Y	W N G Q K E L L E Q	R R A E V D T V C R	H N Y G V I E S F T	V Q R R	
DRB1*015:02	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - A	- - - - -

図 2-1. DLA-DRB1*015:01、DRB1*015:02 アレルのアミノ酸配列

2 種の DLA-DRB1 アレルのアミノ酸配列の違いは、エクソン 2 の HVR 外である 90 番目の単一のアミノ酸が異なるのみである。

[DLA : イヌ白血球抗原 dog leukocyte antigen、HVR : 超可変領域 hyper variable region (図のグレー部分)]

第4章

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

1. 緒言

抗原提示細胞は、リンパ節、胸腺といったリンパ組織にて、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た Th 細胞の分化を誘導する。具体的には、サイトカインの一種である IL-12 はナイーブ T 細胞から Th1 細胞へ{Hsieh, 1993 #379}、IL-4 はナイーブ T 細胞からヘルパーT2 (Th2) 細胞 (Min et al., 2004)、腫瘍壊死因子 β 1 と IL-6 はナイーブ T 細胞から Th17 細胞への分化を誘導する (Weaver et al., 2006)。そして Th1 細胞は、IFN- γ 、IL-3、腫瘍壊死因子 α を分泌し、キラー T 細胞の活性化を介して細胞性免疫の活性化を行う。Th2 細胞は、IL-4、5、10 を分泌し、肥満細胞の活性化と好酸球の遊走を介して液性免疫の活性化を行う。Th17 細胞は、IL-17、IL-22 を分泌し、自己免疫疾患や好中球性の炎症に関与することがわかっている (Yoshimura et al., 2010)。中枢神経系に関連する免疫機構としては、血液と中枢神経系の境界に毛細血管内皮細胞、周皮細胞、星状膠細胞から成る血液脳関門が存在し、血液中の免疫系細胞、ウイルス、大きな蛋白質等が中枢神経系に侵入するのを防いでいる (Ohmi et al., 2013)。また、中枢神経系には抗原提示細胞の 1 つである小膠細胞が存在し、IFN- γ 、IL-1 β などの炎症性サイトカイン、活性酸素、グルタミン酸などの分子の産生を介した神経細胞障害作用や、死細胞の貪食、抗炎症サイトカイン、抗酸化酵素、神経栄養因子などの産生による神経保護作用を有している (Mizuuno et al., 2014)。

犬の MUO と病態の類似性が疑われるヒトの多発性硬化症は、中枢神経系の慢性炎症性脱髄を特徴とする自己免疫疾患の 1 つである。多発性硬化症では、病理組織学的検査にて病変部に CD4⁺、CD8⁺の IL-17 陽性細胞が存在することが示され (Tzartos et al., 2008)、ま

た一般的な病型である再発寛解型（発症後に再発と寛解を繰り返す）の再発期において末梢血中と比較して CSF 中の Th17、Th1 細胞数の上昇が示されており、その病態への Th1、Th17 細胞の関与が示されている（Brucklacher-Waldert et al., 2009; Sato et al., 2014）。

犬の MUO の病態は未だ解明されていないが、病態の類似性が想定されるマウスの EAE の病態は近年明らかとなった。マウスの EAE では、まず末梢で活性化した Th1、Th17 細胞が血液を介して血管内皮を通過して血管周囲腔へ侵入し、抗原提示細胞が提示する髄鞘抗原に反応する Th1、Th17 細胞のみが再活性化する。再活性化した Th1、Th17 細胞は IL-17 や IFN- γ を産生し、蛋白分解酵素の 1 つであるマトリックスメタロプロテアーゼ-2/9 の作用でグリア境界膜を破壊し、Th1、Th17 細胞が中枢神経実質内へ侵入する。実質内へ侵入した Th1、Th17 細胞は、小膠細胞や樹状細胞などの抗原提示細胞によって抗原提示を受けてさらに活性化し、炎症性サイトカインやケモカインを産生し、小膠細胞やマクロファージなどの炎症細胞を動員して炎症性脱髄病巣が形成される（Yoshida et al., 2009）。

犬の MUO については、脳組織を用いてリアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法、二重標識免疫蛍光法を行った研究により、GME 罹患犬の脳組織における IL-17 のメッセンジャーRNA と蛋白の有意な発現、IL-17 を産生する小膠細胞、マクロファージ、T 細胞の存在と、NME 罹患犬の脳組織における IFN- γ のメッセンジャーRNA と蛋白の有意な発現が示されている（Park et al., 2013）。また、MUO 罹患犬の末梢血のフローサイトメトリーにおける IL-17 産生 Th 細胞の増加、IFN- γ 産生 Th 細胞の減少が報告されており（Barber et al., 2022）、両報告より犬の MUO の病態への IL-17、IFN- γ の関与が示唆されている。過去の報告に基づくと、CSF と血清中の IL-17、IFN- γ 濃度測定による犬の GME と NME の鑑別

診断への有用性（GME 罹患犬の CSF 中の IL-17 濃度が上昇し、NME 罹患犬の CSF 中の IFN- γ 濃度が上昇する可能性）、MUO の診断補助や治療反応評価への有用性（MUO 罹患犬の血清中の IL-17 濃度が上昇、IFN- γ 濃度が低下し、治療により正常化する可能性）が期待される。本研究では、MUO 罹患犬の CSF、血清中の IL-17、IFN- γ 濃度を評価し、前述の仮説の検証を行った。

2. 材料および方法

(1)CSF と血清サンプル

2019 年 3 月から 2022 年 9 月の期間内に日本大学動物病院を受診した 17 例の犬 [MUO 9 例、特発性てんかん 5 例、椎間板ヘルニア (IVDD) 3 例] から CSF および 19 例の犬 (MUO 11 例、特発性てんかん 5 例、IVDD 3 例) から血清を採取し、サンプルは採取後に速やかに上清を分離し、サンドウィッチ酵素結合免疫吸着アッセイ (enzyme linked immune sorbent assay : ELISA) による IL-17 濃度の測定を行うまで-80°Cで保存した。また、同期間内に同施設にて 12 例の犬 (MUO 6 例、特発性てんかん 3 例、IVDD 3 例) から CSF および 13 例の犬 (MUO 7 例、特発性てんかん 3 例、IVDD 3 例) から血清を採取し、サンプルは採取後に速やかに上清を分離し ELISA による IFN- γ 濃度の測定を行うまで-80°Cで保存した。サンプルの採取は研究使用に関する飼い主の同意を得て、日本大学動物病院の動物実験および動物福祉に関するガイドラインに沿って行われた。CSF は、全身麻酔下で大槽穿刺 (MUO または特発性てんかん罹患犬) もしくは腰椎穿刺 (IVDD 罹患犬) により採取され、重度の血液汚染を伴う CSF サンプルは除外された。MUO 罹患犬の 4 例 (症例 A~D)

については、治療前 (pre)、治療後 1 ヶ月 (1m)、3 ヶ月 (3m) 時点における CSF、血清サンプルの採取を実施し、併せて治療法と各時点における神経症状の推移の調査を行った。

MUO の診断は、発症年齢、病歴、MRI 検査、CSF 検査に基づき各施設の獣医神経科医によって行われ、脳圧亢進等の理由により CSF の採取が不可能だった症例は、治療反応性を考慮して総合的に診断された。MUO 群の組み入れ基準は、犬の MUO に関する過去の報告 {Granger, 2010 #69} に基づき設定し、(1)6 ヶ月齢を超える、(2)MRI 検査の T2 強調画像において、限局性、多発性、びまん性に高信号を呈する領域を認める、(3)CSF 検査が実施された症例に関しては、細胞組成が単核球主体である [MUO 罹患例であっても、CSF 中の細胞数増加を伴わない症例が 10-22%存在するため (Munana et al., 1998; Granger et al., 2010)、本研究では細胞数像増多の有無は規定しない]、(4)疑わしい場合に本邦にて一般的に発生する感染症 (犬ジステンパーウイルス感染症、ネオスポラ感染症、トキソプラズマ感染症) の除外、(5)脊髄に病変が限局する症例、視神経に病変が限局する症例の除外とした。

特発性てんかんと IVDD の診断は、発症年齢、病歴、MRI 検査、CSF 検査に基づき獣医神経専門医によって行われ、MUO の対象群としての組入基準は、(1)MRI 検査にて T2 強調画像、FLAIR 画像、造影画像において炎症を疑う所見を認めない、(2)CSF 検査にて CSF 中の細胞数が 0-5 個/ μ L 以下で細胞数増加を認めず、異常所見が存在しないこととした。

(2)ELISA を用いた IL-17、IFN- γ 濃度の測定

ELISA の市販キットをメーカーのプロトコルに従って使用し、CSF および血清中のイヌ IL-17 濃度 (SEA063Ca、Cloud-Clone Corp) およびイヌ IFN- γ 濃度 (SEA049Ca、Cloud-

Clone Corp) の定量を行った。血清の希釈率はメーカーの推奨希釈率に従って 1:16 とし、CSF の希釈率は過去の報告 (Freundt-Revilla et al., 2017; Taylor et al., 2014) に基づいて予測される濃度と各症例のサンプル量より決定し、IL-17 濃度測定では 1:8-1:2、IFN- γ 濃度測定では 1:4 とした。いずれのサンプルも 0.01mol/L、pH 7.0-7.2 の PBS を用いて目的の希釈度に希釈した。手順としては、市販キットに付属の標準液と各サンプルをプレートに 2 ウェルずつ (1 ウェルあたり 100 μ l) 添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。続いて各ウェルの液体を除去した後、検出試薬 A (イヌ IL-17、イヌ IFN- γ に特異的なビオチン結合抗体) を 1 ウェルあたり 100 μ l 添加して、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。各ウェルの液体を除去して 3 回洗浄し、検出試薬 B (ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合したアビジン) を 1 ウェルあたり 100 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。再び各ウェルの液体を除去して 5 回洗浄し、1 ウェルあたり 90 μ l の TMB 発色基質 (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートし、硫酸を含む 50 μ l の停止液を加えた後に、プレートをマイクロプレートリーダー (MULTISKAN GO、Thermo scientific) を用いて波長 450nm \pm 10nm における解析を行った。全てのサンプルは 2 ウェルずつ測定を行い、平均値を計算した。IL-17 の最低検出濃度は 6.3pg/mL で、IFN- γ の最低検出濃度は 5.7pg/mL であり、それより低い値は検出限界以下とみなされた。

(3)統計解析

MUO 群、特発性てんかん群、IVDD 群の疾患毎の IL-17、IFN- γ 濃度の比較は、Kruskal-Wallis 検定にて行い、3 群間での有意差が認められた場合は、Mann-Whitney の U 検定とボ

ンフェロー二調整による群間比較を行った。また、MUO 群の 4 例の治療経過 (pre、1m、3m) における IL-17、IFN- γ 濃度の比較は、Friedman 検定にて行った。いずれの検定も GraphPad Prism5 (MDF) を用いて実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

CSF 中の IL-17、IFN- γ 濃度は、MUO 群、特発性てんかん群、IVDD 群の全例において検出限界以下であった (図 3-1)。血清中の IL-17 濃度は、MUO 群において 11 例中 7 例で検出限界以下であり、検出された症例では中央値 1056.45pg/mL (IQR : 454.22-1658.67) であった。特発性てんかん群においては 5 例中 3 例で検出限界以下であり、検出された症例では中央値 643.12pg/mL (IQR : 575.34-710.89) であった (表 3-1)。IVDD 群においては全例で検出限界以下であった。3 群間で統計的な有意差は認められなかったが、MUO 群で中央値が高い傾向が認められた (図 3-1)。血清中の IFN- γ 濃度は、MUO 群において 7 例中 1 例で検出限界以下であり、検出された症例では中央値 291.57pg/mL (IQR : 174.83-767.65) であった (表 3-2)。特発性てんかん群においては全例で検出され、中央値 542.00pg/mL (IQR : 420.48-632.00) であり、IVDD 群においても全例で検出され、中央値 521.13pg/mL (IQR : 380.92-693.09) であった。3 群間で統計的な有意差は認められなかったが、MUO 群にて中央値が低い傾向が認められた (図 3-1)。

治療法と治療後の臨床症状のモニタリングを行った MUO 群の 4 例に関して、症例 A、C、D では PRD と CYA の併用による治療、症例 B では PRD とシトシンアラビノシドの併用による治療が行われ、症例 A では治療後も神経症状が悪化傾向を示し、症例 B~D では治療

後に神経症状は横ばいから改善傾向を示した（表 3-3）。症例 A では診断前に PRD の投与は開始されておらず、症例 B～D では診断前に PRD の投与が開始されていた。CSF 中の IL-17、IFN- γ 濃度は、全例においていずれの時点も検出限界以下であった。血清中の IL-17 濃度については、症例 A において pre で特発性てんかん群・IVDD 群と比較して高い傾向を認め、治療後に pre と比較して低下した（図 3-2）。症例 B～D ではいずれの時点も検出限界以下であった。血清中の IFN- γ 濃度については、症例 A において pre で特発性てんかん群・IVDD 群と比較して高い傾向を認め、治療後に pre と比較して低下した。症例 B～D においては pre で他群と比較して低い傾向を認め、統計的に有意ではなかったが治療後に pre と比較して上昇傾向を認めた（図 3-3）。

4. 考察

本研究において、CSF 中の IL-17、IFN- γ 濃度は MUO 群、特発性てんかん群、IVDD 群の全例で検出限界以下であり、有意な結果を得られなかった。その検出率の向上のために、サンプルの濃縮や外部委託による超高感度測定法の利用を検討する必要がある。血清中の IL-17 濃度については、統計学的に有意ではなかったが MUO 群にて他群と比較して高い傾向を認め、MUO 罹患犬の末梢血中の IL-17 産生 Th 細胞の増加を示した過去の報告（Barber et al., 2022）との相関を認めたが、本研究では検出限界以下のサンプルが多く含まれたため、前述の CSF サンプルと同様、測定法を検討した上での再評価が必要である。血清中の IFN- γ 濃度については、MUO 群にて他群と比較して低い傾向であり、MUO 罹患犬の末梢血中の IFN- γ 産生 Th 細胞の減少を示した過去の報告（Barber et al., 2022）との相関

を認めたが、MUO 群内において IFN- γ 濃度の高値を呈するサンプルも含まれたため、MUO の診断補助としての有用性は現時点では不明である。MUO 罹患犬について、血清中の IFN- γ 濃度と犬種、MRI 検査所見、CSF 検査所見の間に明らかな傾向は認められず、多くの症例を用いた再評価が必要と考えられる。過去に *in vivo* における揮発性麻酔薬による胸腺、脾臓、末梢血のリンパ球のアポトーシス誘導が報告されるため (Kato et al., 2006)、リンパ球のアポトーシスによるサイトカイン産生への影響を考慮し血清サンプルの採取タイミング (麻酔前・麻酔中・麻酔後) も検討する必要がある。

IFN- γ は、炎症性メディエーターとして急性期の組織障害や (Kim et al., 2018)、マクロファージを介した慢性期の炎症性免疫反応制御へ関与する (Hartung et al., 1992; Shiga et al., 2021)。ラットの脳室内への局所的な IFN- γ の投与は EAE の発症を予防し、EAE の発症直前の時点で抗 IFN- γ 抗体の腹腔内投与は臨床経過の増悪をきたすことが報告されており (Voorthuis et al., 1990)、免疫介在性疾患の病態にも IFN- γ は関与する。また、グルココルチコイドは、遺伝子レベルで炎症誘発性転写因子を不活化、I カッパ B などのサイトカイン阻害蛋白質の発現をアップレギュレート、サイトカインのメッセンジャー RNA の半減期と有用性を低下させることで、IFN- γ をはじめとする炎症性サイトカインの産生を抑制することが示されている (Brattsand et al., 1996)。上記を踏まえると、治療経過をモニタリングした MUO 群の 4 例について、治療反応が良好であった症例 B~D においては pre で低値を示した血清中 IFN- γ 濃度が治療後に上昇しており、MUO の発症に関連して枯渇していた IFN- γ が治療により正常化した可能性、IFN- γ の慢性期の炎症性免疫反応制御機能を反映して治療後に上昇した可能性が考えられた。治療反応が不良であった症例 A においては、

pre で高値を示した血清中 IFN- γ 濃度が治療後に低下しており、pre の時点での強い炎症の存在に対して炎症性メディエーターとしての IFN- γ が反映され pre で上昇していた可能性、また症例 A では診断前に PRD の投与が開始されていなかったために、グルココルチコイドを介したサイトカインの産生が生じず、pre の IFN- γ 濃度が高値を呈した可能性が考えられた。症例 A において、血清中の IL-17 濃度は治療前に高値を呈して治療後に低下を認めた。これは MUO の病態形成に重要な役割を担う IL-17 の産生が治療により低下にしたことを反映した可能性があるが、症例 B~D にて血清中の IL-17 濃度は検出限界以下であったため、測定法の確立を行った上での再検討が必要である。以上より、犬の MUO の治療に関連して血清中 IFN- γ 濃度が変動することが示されたが、前述のように IFN- γ の機能は多岐にわたっており様々な因子の影響を受けやすいことから、PRD 投与状況との関連性を含めて多くの症例における追加の検討が必要である。また、CSF、血清中の IL-17、IFN- γ 濃度の測定に加えて、その上流の機構である Th1、Th17、小膠細胞、マクロファージ等のサイトカイン分泌細胞を、末梢血と CSF を用いたフローサイトメトリーにより併せて評価することが MUO の病態を解明する上では必要と考えられる。

5. 小括

犬の CSF 中の IL-17、IFN- γ 濃度、血清中 IL-17 濃度は低く、本研究で用いた測定法では検出が困難であった。サンプルの濃縮や超高感度測定法による検出率の向上、測定系の確立が今後の課題である。MUO 罹患犬にて、血清中の IFN- γ 濃度は他疾患と比較して低い傾

向を呈し、治療により変動することが示されたが、治療反応との関連性の評価については PRD との相関を含めた更なる検討が必要と考えられる。

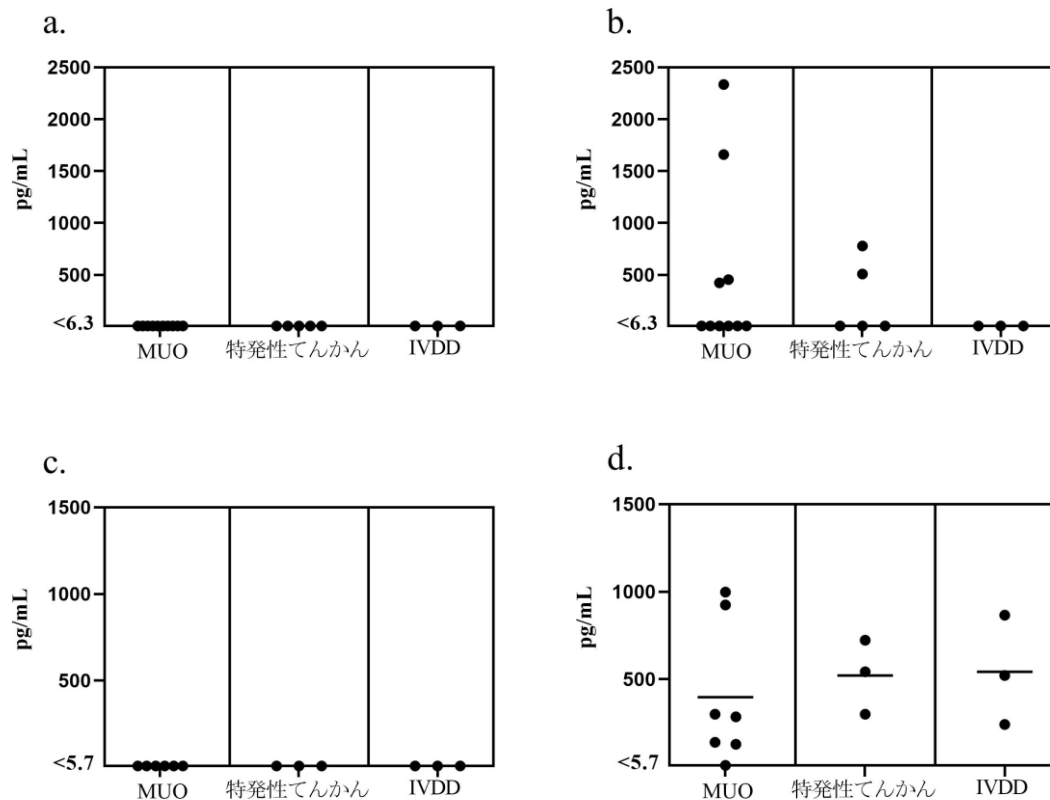


図 3-1. MUO 群、特発性てんかん群、IVDD 群の CSF、血清中の IL-17、IFN- γ 濃度の比較

(a. CSF 中の IL-17 濃度、b. 血清中の IL-17 濃度、c. CSF 中の IFN- γ 濃度、d. 血清中の IFN- γ 濃度)

CSF 中の IL-17、IFN- γ 濃度は全例で検出限界以下であった (a, c)。血清中の IL-17 濃度は、MUO 群にて高い傾向が認められたが検出限界以下のサンプルも多く含まれ、他群と比較して有意差は認められなかった (b)。血清中の IFN- γ 濃度は、MUO 群にて他群と比較して低い傾向が認められたが、有意差は認められなかった (d)。

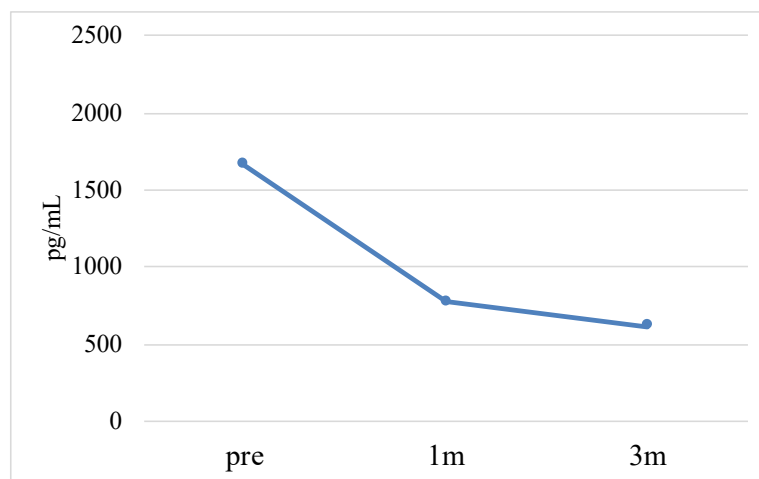


図 3-2. 症例 A の血清中 IL-17 濃度の推移

pre で特発性てんかん群、IVDD 群と比較して高い傾向を呈し、
治療後に低下を認めた。

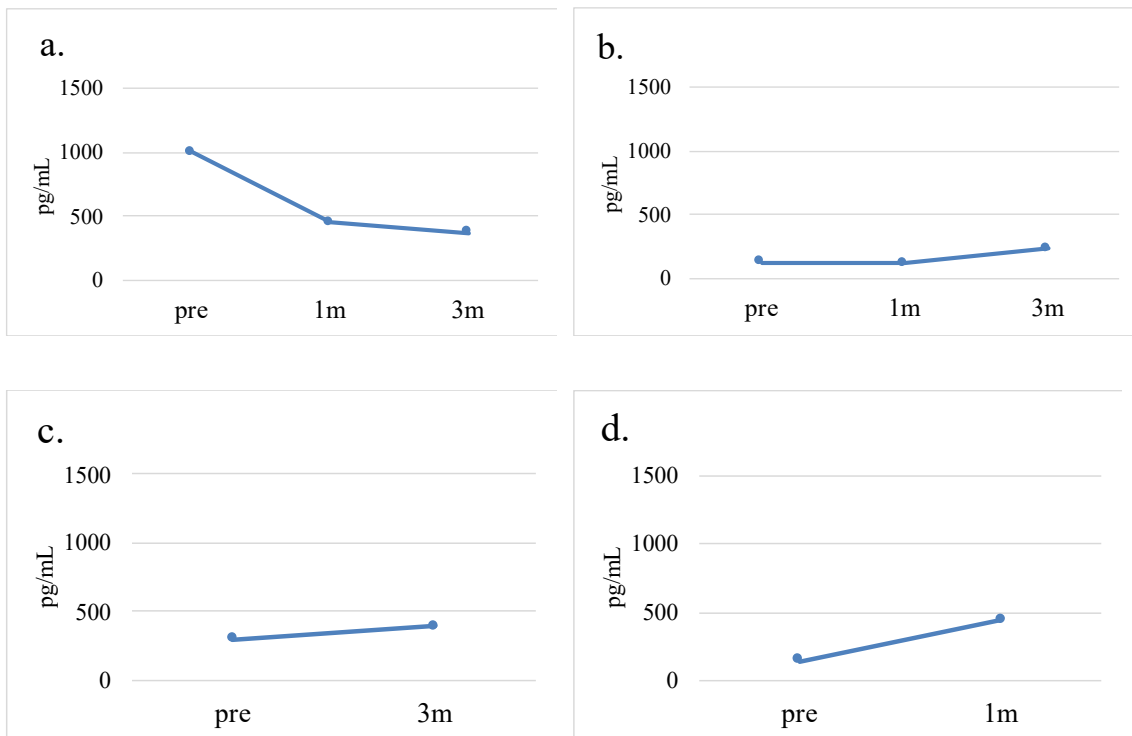


図 3-3. 症例 A~D の血清中 IFN- γ 濃度の推移

(a. 症例 A、b. 症例 B、c. 症例 C、d. 症例 D)

症例 A において、pre で特発性てんかん群、IVDD 群と比較して高い傾向を呈し、治療後に低下を認めた。症例 B~D において、pre で他群と比較して低い傾向を呈し、治療後に上昇を認めた。

表 3-1. MUO 群の症例情報と血清中 IL-17 濃度

症例	犬種	MRI検査	CSF検査	血清中IL-17濃度 (pg/mL)
1	ミニチュア・ピンシャー	単一：前脳 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	2334.22
2	トイ・プードル	単一：前脳 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	1658.67
3	チワワ	多発性：前脳・脳幹 / 造影-、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体+	423.11
4	チワワ	多発性：前脳・小脳・脊髄 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	454.22
5	チワワ	多発性：前脳・脊髄 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	< 6.3
6	チワワ	多発性：前脳・脳幹・脊髄 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	< 6.3
7	チワワ	単一：前脳 / 造影+、壊死+	細胞増多+ / 抗GFAP抗体+	< 6.3
8	トイ・プードル	播種性：前脳 / 造影-、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	< 6.3
9	フレンチ・ブルドック	播種性：前脳 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体+	< 6.3
10	雑種	播種性：前脳 / 造影-、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	< 6.3
11	チワワ	単一：脳幹 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体+	< 6.3

表 3-2. MUO 群の症例情報と血清中 IFN- γ 濃度

症例	犬種	MRI検査	CSF検査	血清中IFN- γ 濃度 (pg/mL)
2	トイ・プードル	単一：前脳 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	998.09
10	雑種	播種性：前脳 / 造影-、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	923.74
5	チワワ	多発性：前脳・脊髄 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	299.39
9	フレンチ・ブルドック	播種性：前脳 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体+	283.74
7	チワワ	単一：前脳 / 造影+、壊死+	細胞増多+ / 抗GFAP抗体+	138.52
6	チワワ	多発性：前脳・脳幹・脊髄 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	123.74
8	トイ・プードル	播種性：前脳 / 造影-、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	< 5.7
11	チワワ	単一：脳幹 / 造影+、壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体+	< 5.7

表 3-3. MUO 群の症例 A~D の症例情報

症例	犬種	MRI検査	CSF検査	治療法	preの神経症状	1mの神経症状	3mの神経症状
A	トイ・プードル	単一：前脳 / 造影+, 壊死-	細胞増多- / 抗GFAP抗体-	(診断前PRD-) PRD + CYA	左前後肢不全麻痺	不全麻痺悪化	不全麻痺悪化
B	チワワ	多発性：前脳・脳幹・脊髄 / 造影+, 壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	(診断前PRD+) PRD + シトシンアラビノシド	左右後肢完全麻痺 OS対光反射消失	深部痛覚改善	不変
C	チワワ	多発性：前脳・脊髄 / 造影+, 壊死-	細胞増多+ / 抗GFAP抗体-	(診断前PRD+) PRD + CYA	左前後肢不全麻痺	—	不変
D	チワワ	単一：前脳 / 造影+, 壊死+	細胞増多+ / 抗GFAP抗体+	(診断前PRD+) PRD + CYA	右前後肢不全麻痺 OD視覚喪失	不全麻痺改善	—

(PRD : プレドニゾロン、CYA : シクロスポリン、OD : 右眼、OS : 左眼)

第 5 章

総括

犬の MUO は、NIME に分類される GME、NME、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、病歴、シグナルメント、神経学的検査、MRI 検査、CSF 検査等に基づいて MUO と診断される。犬の MUO は若齢から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犬の 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。

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

本章は、学術雑誌論文として出版する計画があり公表できないため、要約を記載する。

日本では、諸外国の報告にて MUO が好発とされるチワワ、トイ・プードルをはじめとした小型犬種の飼育数が多いが、日本国内における犬の MUO のまとまった疫学情報は存在しない。発症犬種や診断時の年齢といったシグナルメント情報は MUO の診断時に有用な情報となり、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。本研究では、日本大学動物病院神経科における頭部の神経疾患の診断内容、発症犬種、診断時の年齢、および MUO 罹患犬の治療法、予後等に関する調査を行った。

2014 年 1 月から 2022 年 7 月の期間内に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た。病変は脳領域と頭部に関わる末梢神経領域の2群に分類し、疾患分類については DAMNIT-V 分類法を用いてまとめた。MUO 罹患犬の予後については、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とログランク検定を用いて比較した。

脳領域の疾患分類としては、特発性疾患 (Id)、腫瘍性疾患 (N)、奇形性疾患 (A)、炎症性疾患 (I) が上位を占めた。頭部に関わる末梢神経領域の疾患分類としては、特発性疾患 (Id)、炎症性疾患 (I) が上位を占めた。脳疾患全体における MUO の発生率は、特発性てんかん、脳腫瘍に次いで3番目に高かった。発症犬種は、チワワ、ヨークシャーテリア、雑種、トイ・プードルが上位を占めた。治療法は、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 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、CYA 併用群で 2337 日と CYA 併用群において延長傾向が認められた。また、PRD 群の中でも PRD の初期投与量が免疫抑制量 ($\geq 2\text{mg/kg/day}$) であった症例群の方が、抗炎症量 ($< 2\text{mg/kg/day}$) であった症例群と比較して、統計的に有意ではなかったが生存期間中央値が長い傾向が認められた。

本研究では、日本大学動物病院における頭蓋内の神経疾患の発生状況が明らかとなった。犬の MUO については、脳疾患全体における高い発生率とチワワ、ヨークシャーテリア、トイ・プードルといった小型犬種における発生率の高さが示され、過去の報告との類似性が認められた。また犬の MUO で選択される治療法は PRD 単独と PRD と CYA の併用によ

るものが大半を占めることが明らかとなり、PRD と CYA の併用および免疫抑制量の PRD の初期投与による生存期間の延長傾向から、犬の MUO に対する免疫抑制療法の有用性が示唆され、その免疫学的な病態が支持された。

MUO 罹患および非罹患のチワワ、トイ・プードルにおける犬白血球抗原(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。犬の 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種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第 2 章にて MUO 発症率の高さが示されたチワワ、トイ・プードルの MUO 罹患犬、非罹患犬における DLA クラス II 遺伝子型を解析し、MUO 関連因子の特定を通じた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、第 2 章の疫学情報と諸外国の犬の MUO の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、犬の MUO の遺伝的および免疫学的な病態が支持された。

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 (IFN- γ) の解析

抗原提示細胞は、リンパ節、胸腺などの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 Th1、Th2、Th17 細胞への分化を促す。分化した Th 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 の犬の 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 罹患犬では CSF 中の IL-17 濃度が上昇、NME 罹患犬では 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 罹患犬では治療前に血清中の 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、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、pre、1m、3m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4例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。MUO群において血清中のIFN- γ 濃度は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っており、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。

結後

本研究では、犬のMUOに着目し、日本における犬のMUOの疫学情報を明らかとし、その治療法、予後の調査を通じてPRDとCYAの併用および免疫抑制量のPRDの初期投与による生存期間の延長傾向から犬のMUOの免疫学的な病態を示した。次に日本においてMUOが好発であるチワワ、トイ・プードルにおけるMUO罹患犬、非罹患犬のDLAクラスII遺伝子型の解析を通じてMUOのリスク因子を明らかとし、その遺伝的および免疫学的な病態を示した。最後にMUO罹患犬の血清、CSFサンプルを用いたIL-17、IFN- γ 濃度の解析では、一部の症例で血清中IFN- γ 濃度と治療反応の関連が疑われたが、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。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究室への受け入れを許可して頂き、直接のご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科 獣医神経病学研究室の北川 勝人 教授、伊藤 大介 教授、および比較免疫学研究室の森友 忠昭 教授、片倉 文彦 専任講師には心より厚く御礼申し上げます。

共同研究をさせて頂き、研究材料を提供して頂いたどうぶつの総合病院の金園 晨一 院長、御助言を頂いた岡山理科大学獣医学部 宮前 二郎 助教授、日本大学歯学部 岡野 雅春 助教授には心より御礼申し上げます。

また、研究材料の提供にご協力頂いた、日本大学生物資源科学部獣医学科の亘 敏広 教授、中山 智宏 教授、枝村 一弥 教授、坂井 学 教授、関 真美子 専任講師に深く感謝いたします。加えて、日本大学動物病院にて研究材料の収集にご協力いただいた富士フィルム VET システムズ株式会社 日本大学動物病院検査しつの井澤 治彦 技師および同検査室の諸氏に深く感謝いたします。さらには実験の補助をしてくださった比較免疫学研究室、獣医神経病学研究室の諸氏ならびに日本大学動物医科学研究センターの大学院生の皆様には深く感謝いたします。

最後に、大学院博士課程への進学を応援いただき、終始温かく見守り、支え続けてくれた家族に心から感謝致します。

参考文献

- Adamo, P. F., Rylander, H. and Adams, W. M. 2007. Ciclosporin use in multi-drug therapy for meningoencephalomyelitis of unknown aetiology in dogs. *J. Small Anim. Pract.* **48**: 486-496.
- Adamo, P. F., Adams, W. M. and Steinberg, H. 2007. Granulomatous meningoencephalomyelitis in dogs. *Compend Contin. Edu. Vet.* **29**: 678-690.
- Angles, J. M., Kennedy, L. J. and Pedersen, N. C. 2005. Frequency and distribution of alleles of canine MHC-II DLA-DQB1, DLA-DQA1 and DLA-DRB1 in 25 representative American Kennel Club breeds. *Tissue Antigens* **66**: 173-184.
- Barber, R. and Barber, J. 2022. Differential T-cell responses in dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin compared to healthy controls. *Front Vet Sci* **9**: 925770.
- Barber, R. M., Li, Q., Levine, J. M., Ruone, S. J., Levine, G. J., Kenny, P., Tong, S. and Schatzberg, S. J. 2022. Screening for Viral Nucleic Acids in the Cerebrospinal Fluid of Dogs With Central Nervous System Inflammation. *Front. Vet. Sci.* **9**: 850510.
- Barber, R. M., Schatzberg, S. J., Corneveaux, J. J., Allen, A. N., Porter, B. F., Pruzin, J. J., Platt, S. R., Kent, M. and Huentelman, M. J. 2011. Identification of risk loci for necrotizing meningoencephalitis in Pug dogs. *J. Hered.* **102 Suppl 1**: S40-S46.

Barnes, A., O'Neill, T., Kennedy, L. J., Short, A. D., Catchpole, B., House, A., Binns, M., Fretwell, N., Day, M. J. and Ollier, W. E. 2009. Association of canine anal furunculosis with TNFA is secondary to linkage disequilibrium with DLA-DRB1*. *Tissue Antigens* **73**: 218-224.

Barnoon, I., Shamir, M. H., Aroch, I., Bdolah-Abram, T., Srugo, I., Konstantin, L. and Chai, O. 2016. Retrospective evaluation of combined mycophenolate mofetil and prednisone treatment for meningoencephalomyelitis of unknown etiology in dogs: 25 cases (2005-2011). *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* **26**: 116-124.

Brady, S. L., Woodward, A. P. and le Chevoir, M. 2020. Survival time and relapse in dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin treated with prednisolone and ciclosporin: a retrospective study. *Aust. Vet. J.* **98**: 491-498.

Brattsand, R. and Linden, M. 1996. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther* **10 Suppl 2**: 81-90.

Brucklacher-Waldert, V., Stuermer, K., Kolster, M., Wolthausen, J. and Tolosa, E. 2009. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* **132**: 3329-3341.

CANADIAN-KENNEL-CLUB. 2022. Chihuahua (Long Coat).
<https://www.ckc.ca/en/Choosing-a-Dog/Choosing-a-Breed/Toy-Dogs/Chihuahua-Long-Coat>
[accessed on July 24, 2022].

Charalambous, M., Danourdis, T., Hatzis, A. and Polizopoulou, Z. 2013. An update on meningoencephalomyelitis of unknown aetiology in dogs. *J. Hell. Vet. Medical Soc.* **64**: 131-144.

Chen, X., Adhikary, G., Newland, J. J., Xu, W., Ma, E., Naselsky, W. and Eckert, R. L. 2022. The transglutaminase 2 cancer cell survival factor maintains mTOR activity to drive an aggressive cancer phenotype. *Mol Carcinog.*

Coates, J. R. and Jeffery, N. D. 2014. Perspectives on meningoencephalomyelitis of unknown origin. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **44**: 1157-1185.

Coates, J. R., Barone, G., Dewey, C. W., Vitale, C. L., Holloway-Azene, N. M. and Sessions, J. K. 2007. Procarbazine as Adjunctive Therapy for Treatment of Dogs with Presumptive Antemortem Diagnosis of Granulomatous Meningoencephalomyelitis: 21 Cases (1998-2004). *J. Vet. Intern. Med.* **21**: 100-106.

Cornelis, I., Volk, H. A. and De Decker, S. 2016. Clinical presentation, diagnostic findings and long-term survival in large breed dogs with meningoencephalitis of unknown aetiology. *Vet Rec* **179**: 147.

Cornelis, I., Volk, H. A., Ham, L. V. and Decker, S. D. 2016. Prognostic factors for 1-week survival in dogs diagnosed with meningoencephalitis of unknown aetiology. *Vet. J.* **214**: 91-95.

Cornelis, I., Volk, H. A., Van Ham, L. and De Decker, S. 2017. Clinical presentation, diagnostic findings and outcome in dogs diagnosed with presumptive spinal-only meningoencephalomyelitis of unknown origin. *J Small Anim Pract* **58**: 174-182.

Cornelis, I., Ham, L. V., Gielen, I., Decker, S. D. and Bhatti, S. F. M. 2019. Clinical presentation, diagnostic findings, prognostic factors, treatment and outcome in dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin: A review. *Vet. J.* **244**: 37-44.

Dutra, A. S., Mignot, E. and Puck, J. M. 1996. Gene localization and syntenic mapping by FISH in the dog. *Cytogenet. Genome Res.* **74**: 113-117.

Fluehmann, G., Doherr, M. G. and Jaggy, A. 2006. Canine neurological diseases in a referral hospital population between 1989 and 2000 in Switzerland. *J. Small Anim. Pract.* **47**: 582-587.

Freundt-Revilla, J., Maiolini, A., Carlson, R., Beyerbach, M., Rentmeister, K., Flegel, T., Fischer, A. and Tipold, A. 2017. Th17-skewed immune response and cluster of differentiation 40 ligand expression in canine steroid-responsive meningitis-arteritis, a large animal model for neutrophilic meningitis. *J Neuroinflammation* **14**: 20.

Gardiner, A., Richards, K. A., Sant, A. J. and Arneson, L. S. 2007. Conformation of MHC class II I-A(g7) is sensitive to the P9 anchor amino acid in bound peptide. *Int. Immunol.* **19**: 1103-1113.

Gershony, L. C., Belanger, J. M., Short, A. D., Le, M., Hytonen, M. K., Lohi, H., Famula, T. R., Kennedy, L. J. and Oberbauer, A. M. 2019. DLA class II risk haplotypes for autoimmune diseases in the bearded collie offer insight to autoimmunity signatures across dog breeds. *Canine Genet. Epidemiol.* **6**: 1-13.

Gómez-Flores, A. I., Chávez-López, J. J. and Villatoro-Chacón, D. M. 2021. Characterization of neurological diseases in canines: University of San Carlos of Guatemala, year 2017. *Rev. MVZ Cordoba* **26**.

Granger, N., Smith, P. M. and Jeffery, N. D. 2010. Clinical findings and treatment of non-infectious meningoencephalomyelitis in dogs: a systematic review of 457 published cases from 1962 to 2008. *Vet. J.* **184**: 290-297.

Greer, K. A., Schatzberg, S. J., Porter, B. F., Jones, K. A., Famula, T. R. and Murphy, K. E. 2009. Heritability and transmission analysis of necrotizing meningoencephalitis in the Pug. *Res. Vet. Sci.* **86**: 438-442.

Greer, K. A., Wong, A. K., Liu, H., Famula, T. R., Pedersen, N. C., Ruhe, A., Wallace, M. and Neff, M. W. 2010. Necrotizing meningoencephalitis of Pug dogs associates with dog leukocyte antigen class II and resembles acute variant forms of multiple sclerosis. *Tissue Antigens* **76**: 110-118.

Hartung, H. P., Jung, S., Stoll, G., Zielasek, J., Schmidt, B., Archelos, J. J. and Toyka, K. V.

1992. Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS. *J.*

Neuroimmunol. **40**: 197-210.

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A. and Murphy, K. M. 1993.

Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.

Science **260**: 547-549.

Ismaa, S. E., Mearns, B. M., Lorand, L. and Graham, R. M. 2009. Transglutaminases and

disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev*

89: 991-1023.

IPD-MHC. 2021. canine database. <https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/DLA/> [accessed on January 28, 2022].

Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N.,

Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., Sudo, K., Nakae, S., Sasakawa, C. and Iwakura, Y. 2009.

Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucosal bacterial

infection and allergic responses. *Immunity* **30**: 108-119.

Japan-Kennel-Club. 2020. Research for the number of household dogs in Japan.

<https://www.jkc.or.jp/archives/enrollment/14222> [accessed on January 28, 2022].

Johnson, G. V. W., Cox, T. M., Lockhart, J. P., Zimmerman, M. D., Miller, M. L. and Powers, R. E. 1997. Transglutaminase activity is increased in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* **751**: 323-329.

Jung, D. I., Lee, H. C., Ha, J., Jung, H. W., Jeon, J. H., Moon, J. H., Lee, J. H., Kim, N. H., Sur, J. H., Kang, B. T. and Cho, K. W. 2013. Unsuccessful cyclosporine plus prednisolone therapy for autoimmune meningoencephalitis in three dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **75**: 1661-1665.

Jurewicz, M. M. and Stern, L. J. 2019. Class II MHC antigen processing in immune tolerance and inflammation. *Immunogenetics* **71**: 171-187.

Kato, M. and Kurosawa, S. 2006. Anesthesia on Surgical Insult, Perioperative Inflammation and Immune Responses. *J. Jpn. Soc. Clin. Anesth.* **26**: 1-7.

Kennedy, L. J., Barnes, A., Ollier, W. E. and Day, M. J. 2006a. Association of a common dog leucocyte antigen class II haplotype with canine primary immune-mediated haemolytic anaemia. *Tissue Antigens* **68**: 502-508.

Kennedy, L. J., Barnes, A., Short, A., Brown, J. J., Lester, S., Seddon, J., Happ, G. M. and Ollier, W. E. 2007b. Canine DLA diversity: 2. Family studies. *Tissue Antigens* **69 Suppl 1**: 289-291.

Kennedy, L. J., Davison, L. J., Barnes, A., Short, A. D., Fretwell, N., Jones, C. A., Lee, A. C., Ollier, W. E. and Catchpole, B. 2006b. Identification of susceptibility and protective major histocompatibility complex haplotypes in canine diabetes mellitus. *Tissue Antigens* **68**: 467-476.

Kennedy, L. J., Barnes, A., Short, A., Brown, J. J., Seddon, J., Fleeman, L., Brkljacic, M., Happ, G. M., Catchpole, B. and Ollier, W. E. 2007c. Canine DLA diversity: 3. Disease studies. *Tissue Antigens* **69 Suppl 1**: 292-296.

Kennedy, L. J., Barnes, A., Short, A., Brown, J. J., Lester, S., Seddon, J., Fleeman, L., Francino, O., Brkljacic, M., Knyazev, S., Happ, G. M. and Ollier, W. E. 2007a. Canine DLA diversity: 1. New alleles and haplotypes. *Tissue Antigens* **69 Suppl 1**: 272-288.

Kennedy, L. J., Quarmby, S., Happ, G. M., Barnes, A., Ramsey, I. K., Dixon, R. M., Catchpole, B., Rusbridge, C., Graham, P. A., Hillbertz, N. S., Roethel, C., Dodds, W. J., Carmichael, N. G. and Ollier, W. E. 2006c. Association of canine hypothyroidism with a common major histocompatibility complex DLA class II allele. *Tissue Antigens* **68**: 82-86.

Kim, D. S., Jang, I. K., Lee, M. W., Ko, Y. J., Lee, D. H., Lee, J. W., Sung, K. W., Koo, H. H. and Yoo, K. H. 2018. Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon-gamma. *EBioMedicine* **28**: 261-273.

Kumar, J., Kumar, M., Pandey, R. and Chauhan, N. S. 2017. Physiopathology and Management of Gluten-Induced Celiac Disease. *J. Food Sci.* **82**: 270-277.

Lowrie, M., Smith, P. M. and Garosi, L. 2013. Meningoencephalitis of unknown origin: investigation of prognostic factors and outcome using a standard treatment protocol. *Vet. Rec.* **172**: 527.

Massey, J., Boag, A., Short, A. D., Scholey, R. A., Henthorn, P. S., Littman, M. P., Husebye, E., Catchpole, B., Pedersen, N., Mellersh, C. S., Ollier, W. E. and Kennedy, L. J. 2013. MHC class II association study in eight breeds of dog with hypoadrenocorticism. *Immunogenetics* **65**: 291-297.

Matsuki, N., Fujiwara, K., Tamahara, S., Uchida, K., Matsunaga, S., Nakayama, H., Doi, K., Ogawa, H. and Ono, K. 2004. Prevalence of autoantibody in cerebrospinal fluids from dogs with various CNS diseases. *J. Vet. Med. Sci.*: 295-297.

McGeachy, M. J. and Cua, D. J. 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* **28**: 445-453.

Menaut, P., Landart, J., Behr, S., Lanore, D. and Trumel, C. 2008. Treatment of 11 dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin with a combination of prednisolone and cytosine arabinoside. *Vet. Rec.* **162**: 241-245.

Min, B., Prout, M., Hu-Li, J., Zhu, J., Jankovic, D., Morgan, E. S., Urban, J. F., Jr., Dvorak, A. M., Finkelman, F. D., LeGros, G. and Paul, W. E. 2004. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J. Exp. Med.* **200**: 507-517.

- Miyamae, J., Yagi, H., Sato, K., Okano, M., Nishiya, K., Katakura, F., Sakai, M., Nakayama, T., Moritomo, T. and Shiina, T. 2019. Evaluation of alloreactive T cells based on the degree of MHC incompatibility using flow cytometric mixed lymphocyte reaction assay in dogs. *Immunogenetics* **71**: 635-645.
- Mizuuno, T. 2014. Neuronal dysfunction in multiple sclerosis. *Clin. Neurol*, **54**: 1066-1068.
- Munana, K. R. and Luttgen, P. J. 1998. Prognostic factors for dogs with granulomatous meningoencephalomyelitis: 42 cases (1982-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **48**: 1902-1906.
- Nakamoto, Y., Nakamoto, M. and Ozawa, T. 2018. Survey of the Incidence of Neurological Diseases in Dogs at the Secondary Veterinary Neurology Facility. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* **71**: 41-49.
- Nakazawa, M., Miyamae, J., Okano, M., Kanemoto, H., Katakura, F., Shiina, T., Ohno, K., Tsujimoto, H., Moritomo, T. and Watari, T. 2021. Dog leukocyte antigen (DLA) class II genotypes associated with chronic enteropathy in French bulldogs and miniature dachshunds. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **237**: 110271.
- Nessler, J. N., Jo, W. K., Osterhaus, A., Ludlow, M. and Tipold, A. 2021. Canine Meningoencephalitis of Unknown Origin-The Search for Infectious Agents in the Cerebrospinal Fluid via Deep Sequencing. *Front. Vet. Sci.* **8**: 645517.
- NIBC. 2021. GenBank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [accessed on January 28, 2022].

Ohmi, K. 2013. Recent findings in blood brain barrier. *Organ Biology* **20**: 36-44.

Oliphant, B. J., Barnes Heller, H. L. and White, J. M. 2017. Retrospective Study Evaluating Associations between Midline Brain Shift on Magnetic Resonance Imaging and Survival in Dogs Diagnosed with Meningoencephalitis of Unknown Etiology. *Vet. Radiol. Ultrasound* **58**: 38-43.

Park, E. S., Uchida, K. and Nakayama, H. 2013. Th1-, Th2-, and Th17-related cytokine and chemokine receptor mRNA and protein expression in the brain tissues, T cells, and macrophages of dogs with necrotizing and granulomatous meningoencephalitis. *Vet. Pathol.* **50**: 1127-1134.

Pausova, T. K., Tomek, A., Srenk, P. and Belaskova, S. 2021. Clinical Presentation, Diagnostic Findings, and Long-term Survival Time in 182 Dogs With Meningoencephalitis of Unknown Origin From Central Europe That Were Administered Glucocorticosteroid Monotherapy. *Top Companion Anim. Med.* **44**: 100539.

Payami, H., Joe, S., Farid, N. R., Stenszky, V., Chan, S. H., Yeo, P. P. B., Cheah, J. S. and

Thomson, G. 1989. Relative Predispositional Effects (RPEs) of Marker Alleles with Disease: HLA-DR Alleles and Graves Disease. *Am. J. Hum. Genet.* **45**: 541-546.

Pearse, D. D., Hefley, A. B., Morales, A. A. and Ghosh, M. 2022. Comparative Profiling of TG2 and Its Effectors in Human Relapsing Remitting and Progressive Multiple Sclerosis.

Biomedicines **10**.

Pedersen, N., Liu, H., Millon, L. and Greer, K. 2011. Dog leukocyte antigen class II-associated genetic risk testing for immune disorders of dogs: simplified approaches using Pug dog necrotizing meningoencephalitis as a model. *J. Vet. Diagn. Invest.* **23**: 68-76.

Peiravan, A., Allenspach, K., Boag, A. M., Soutter, F., Holder, A., Catchpole, B., Kennedy, L. J.,

Werling, D. and Procoli, F. 2016. Single nucleotide polymorphisms in major histocompatibility class II haplotypes are associated with potential resistance to inflammatory bowel disease in German shepherd dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **182**: 101-105.

Perneger, T. V. 1998. What's wrong with Bonferroni adjustments. *Br. Med. J.* **316**: 1236-1238.

Salvat, S., Auger, I., Rochelle, L., Begovich, A., Ceburher, L., Sette, A. and Roudier, J. 1994.

Tolerance to a self-peptide from the third hypervariable region of HLA

DRB1*0401 in rheumatoid arthritis patients and normal subjects. *J. Immunol.* **153**: 5321-5329.

Sarmiento, U. M., Sarmiento, J. I. and Storb, R. 1990. Allelic variation in the DR subregion of the canine major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **32**: 13-19.

Sato, W. 2014. Chemokine receptor expression of T cells in the cerebrospinal fluid of relapsing multiple sclerosis. *Jpn. J. Clin. Immunol.* **37**: 83-89.

Schrauwen, I., Barber, R. M., Schatzberg, S. J., Siniard, A. L., Corneveaux, J. J., Porter, B. F., Vernau, K. M., Keesler, R. I., Matiasek, K., Flegel, T., Miller, A. D., Southard, T., Mariani, C. L., Johnson, G. C. and Huentelman, M. J. 2014. Identification of novel genetic risk loci in Maltese dogs with necrotizing meningoencephalitis and evidence of a shared genetic risk across toy dog breeds. *PLoS One* **9**:0112755.

Shibuya, M., Matsuki, N., Fujiwara, K., Imajoh-ohmi, S., Fukuda, H., Pham, N., T., Tamahara, S. and Ono, K. 2006. Autoantibodies against Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Cerebrospinal Fluids from Pug Dogs with Necrotizing Meningoencephalitis. *J. Vet. Med. Sci.* : 241-245.

Shiel, R. E., Kennedy, L. J., Nolan, C. M., Mooney, C. T. and Callanan, J. J. 2014. Major histocompatibility complex class II alleles and haplotypes associated with non-suppurative meningoencephalitis in greyhounds. *Tissue Antigens* **84**: 271-276.

Shiga, S., Endo, T., Mizuno, N., Matsuda, S. and Yanagawa, Y. 2021. Cooperative action of IL-4 and IFN- γ in RAW264.7 macrophage functions. In: Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society.

Stee, K., Broeckx, B. J. G., Targett, M., Gomes, S. A. and Lowrie, M. 2020. Cytosine arabinoside constant rate infusion without subsequent subcutaneous injections for the treatment of dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin. *Vet Rec* **187**: e98.

Stromberg, S. J., Thomasy, S. M., Marangakis, A. D., Kim, S., Cooper, A. E., Brown, E. A., Maggs, D. J. and Bannasch, D. L. 2019. Evaluation of the major histocompatibility complex (MHC) class II as a candidate for sudden acquired retinal degeneration syndrome (SARDS) in Dachshunds. *Vet. Ophthalmol.* **22**: 751-759.

Talarico, L. R. and Schatzberg, S. J. 2010. Idiopathic granulomatous and necrotising inflammatory disorders of the canine central nervous system: a review and future perspectives. *J. Small Anim. Pract.* **51**: 138-149.

Tanaka, M. and Matsuki, N. 2014. 犬の特発性脳炎における抗トランスグルタミナーゼ自己抗体に関する研究. *Dissertation in Tokyo University*: 1-82.

Tanaka, M., Inoue, A., Yamamoto, K., Tamahara, S. and Matsuki, N. 2012. Transglutaminase 2: a novel autoantigen in canine idiopathic central nervous system inflammatory diseases. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 733-737.

Taylor, A. R., Welsh, C. J., Young, C., Spoor, E., Kerwin, S. C., Griffin, J. F., Levine, G. J., Cohen, N. D. and Levine, J. M. 2014. Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and chemokines in naturally occurring canine spinal cord injury. *J Neurotrauma* **31**: 1561-1569.

Toda, Y., Matsuki, N., Shibuya, M., Fujioka, I., Tamahara, S. and Ono, K. 2007. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP autoantibody in canine necrotising meningoencephalitis. *Vet. Rec.* **161**: 261-264.

Treeful, A. E., Rendahl, A. K. and Friedenberg, S. G. 2019. DLA class II haplotypes show sex-specific associations with primary hypoadrenocorticism in Standard Poodle dogs.

Immunogenetics **71**: 373-382.

Tsunemi, T., Sakai, Y., Tsunoda, K., Irie, Y. and Wada, Y. 2006. Neuro-Behcets/neuro-Sweets disease presents simultaneously with severe tonsillitis, and features mimicking bacterial meningitis with skin lesions. *Intern. Med.* **45**: 1315-1317.

Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M. and Fugger, L. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* **172**: 146-155.

van Asch, B., Zhang, A. B., Oskarsson, M. C. R., Klutsch, C. F. C., Amorim, A. and Savolainen, P. 2013. Pre-Columbian origins of Native American dog breeds, with only limited replacement by European dogs, confirmed by mtDNA analysis. *Proc. Royal Soc. B* **280**: 20131142.

van Langelaar, J., Rijvers, L., Smolders, J. and van Luijn, M. M. 2020. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front Immunol* **11**: 760.

Voorthuis, J. A., Uitdehaag, B. M., De Groot, C. J., Goede, P. H., van der Meide, P. H. and Dijkstra, C. D. 1990. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clin. Exp. Immunol.* **81**: 183-188.

- Wagner, J. L., Burnett, R. C. and Storb, R. 1999. Organization of the canine major histocompatibility complex: Current Perspectives. *J. Hered.* **90**:35-38.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. and Murphy, K. M. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**:677-688.
- Woolcock, A. D., Wang, A., Haley, A., Kent, M., Creevy, K. E. and Platt, S. R. 2016. Treatment of canine meningoencephalomyelitis of unknown aetiology with mycophenolate mofetil and corticosteroids: 25 cases (2007-2012). *J. Vet. Med. Sci.* **2**:125-135.
- Yoshida, H. 2009. Immune regulation by IL-27 for therapeutic usage. *Jpn. J. Clin. Immunol.* **32** (4): 202-213.
- Yoshimura, A., Hasegawa, E. and Muto, G. 2010. Inflammation and cytokines. *実験医学***28**: 20-28.
- Yuhki, N., Beck, T., Stephens, R., Neelam, B. and O'Brien, S. J. 2007. Comparative genomic structure of human, dog, and cat MHC: HLA, DLA, and FLA. *J. Hered.* **98**:390-399.
- Zarfoss, M., Schatzberg, S., Venator, K., Cutter-Schatzberg, K., Cuddon, P., Pintar, J., Weinkle, T., Scarlett, J. and Delahunta, A. 2006. Combined cytosine arabinoside and prednisone therapy for meningoencephalitis of unknown aetiology in 10 dogs. *J. Small Anim. Pract.* **47**:588-595.