

磁気共鳴法を用いたイヌの変性性脊髄症の新規診断 手法に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2022-06-22
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 内藤, 瑛治
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/88155

磁気共鳴法を用いた

イヌの変性性脊髄症の新規診断手法に関する研究

2021年

岐阜大学大学院共同獣医学研究科

(岐阜大学)

内藤 瑛治

磁気共鳴法を用いた

イヌの変性性脊髄症の新規診断手法に関する研究

内藤 瑛治

目次

略語一覧	5
緒言	7

第1章

拡散テンソル画像の解析によるイヌの変性性脊髄症における脊髄病変の検出
背景
材料および方法
結果
3
考察
23
図表
29

第2章

水選択励起画像法を用いたイヌの変性性脊髄症における

背根神経節の変化の解析

背景	36
材料および方法	38
結果	43
考察	47

イヌの変性性脊髄症における傍脊柱筋群の変化の解析

背景	60
材料および方法	63
結果	67
考察	73
図表	78
結論	88
謝辞	92
文献	93

略語一覧

- ADC, apparent diffusion coefficient: 見かけの拡散係数
- ALS, amyotrophic lateral sclerosis: 筋萎縮性側索硬化症
- CIDP, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy:慢性炎症性脱髄
- 性多発神経炎
- CSF, cerebrospinal fluid: 脳脊髄液
- DM, degenerative myelopathy:変性性脊髄症
- DRG, dorsal root ganglion:背根神経節
- DTI, diffusion tensor imaging: 拡散テンソル画像
- FA, fractional anisotropy: 異方性比率
- ICC, intraclass correction coefficients:級内相関係数
- IVDH, intervertebral disc herniation: 椎間板ヘルニア
- LMN, lower motor neuron:下位運動ニューロン
- MRI, magnetic resonance imaging:磁気共鳴画像
- PWC, Pembroke Welsh Corgi:ペンブローク・ウェルシュ・コーギー
- ROI, region of interest: 関心領域

- TE, echo time:エコー時間
- TR, repetition time:繰り返し時間
- UMN, upper motor neuron: 上位運動ニューロン
- WE, water excitation:水選択励起

イヌの変性性脊髄症 (Degenerative myelopathy:DM) は進行性の神経変性疾 患である(3,16)。ジャーマン・シェパード・ドッグ(3,4,29,86)、ボクサー (4.53.86)、ペンブローク・ウェルシュ・コーギー (Pembroke Welsh Corgi: PWC) などの犬種で発症が報告されており(4, 14, 16, 17, 61, 86),本邦では PWC の発症が多い。高齢で発症することが知られており、PWC の平均発症年 齢は 11 歳とされている(16, 17)。DM の臨床症状は特徴的な進行経過を認める ため、以下の4つのステージに分類される(16,17)。ステージ1では後肢の運 動失調から始まり,その後上位運動ニューロン(upper motor neuron:UMN) 性不全麻痺が認められる。ステージ 2 では後肢の下位運動ニューロン (lower motor neuron:LMN) 性麻痺を認め、後肢歩行困難となる。ステージ3では前 肢にも LMN を認め、徐々に起立困難となる。ステージ 4 では四肢全麻痺とな り, 頭頸部の運動の消失や呼吸筋麻痺も認めるようになる。脳幹症状として嚥下 障害や舌の萎縮, 発声障害も認められるようになり, 最終的には呼吸機能障害に より発症から約3年で死亡する(17,63)。

DM 症例の脊髄の病理組織学的検査では、頸髄から腰髄にわたる脊髄全域の白 質において髄鞘と軸索の脱落が認められる(3, 4, 50)。脊髄だけでなく、神経根

の髄鞘と軸索の脱落も認められる(29,56)。また、神経系だけでなく、骨格筋 の萎縮および筋線維の変性も認められる(4,17,41,55)。更に、これまでの報告 から, DM 発症犬ではスーパーオキシドジスムターゼ1 (superoxide dismutase 1:SOD1) 遺伝子における変異が 2 種類 (*c.118G>A. c.52A>T*) 報告されてい る(4,83)。それぞれの遺伝子変異により1アミノ酸置換(E40K, T18S)が起 こることで、DM 発症犬の脊髄神経細胞では変異型 SOD1 タンパク凝集体が形 成されることが報告されている(4,59)。SOD1 タンパクは細胞内の活性酸素を 無毒化する抗酸化酵素の一つだが,変異型 SOD1 タンパクが酵素活性を失わな いことから (18), DM は変異型 SOD1 タンパクが毒性を獲得することで脊髄神 経細胞の変性が起こり,DM を発症するのではないかと予想されている(44)。 ヒトでは SOD1 遺伝子変異が関連する疾患として筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) が知られている (67)。DM は臨床症状 および脊髄病理検査所見が ALS と類似しているため, ALS の自然発症モデルと しても注目されている(17,44,83)。

DM 発症犬は変異型 SOD1 遺伝子をホモ接合体で有していることから, SOD1遺伝子変異の検出は DM の診断に重要な因子であると考えられる。一方, 変異型 SOD1遺伝子のホモ接合体を有していても DM を発症しない個体が存在 するため, SOD1遺伝子変異の検出のみでは DM を診断できない(14,86)。ま た,DM 発症犬では磁気共鳴画像(magnetic resonance imaging:MRI)検査 で中枢神経系に特徴的な病変を認めないことが報告されている(17,62)。した がって現在,DM の臨床診断は,SOD1 遺伝子変異の検出,MRI 検査における 他の脊髄疾患の除外,および DM に特徴的な進行性の臨床症状(高齢発症,徐々 に進行,疼痛のない後肢対麻痺)から行われている。しかし,本邦における DM 発症犬では椎間板ヘルニア(intervertebral disc herniation:IVDH)を併発し ていることが多く,初期の DM と IVDH は臨床症状が似ているため,臨床診断 を惑わせることも多い。したがって,DM をより早期かつ DM 特異的な診断手 法の開発が求められている。

現在,人医療では神経変性疾患に対する MRI 装置を用いた新たな解析法が多 数開発されており,さらに,MRI の原理を応用した様々な特殊検査法が開発さ れている。MRI を用いた特殊検査法は,獣医療への応用が広く研究されており, 神経組織内に存在する水分子の拡散の程度や方向性から神経繊維を可視化する 拡散テンソル画像(diffusion tensor image : DTI)(38,46,49,79),水と脂肪 の位相拡散の差を利用し水の信号を選択的に励起することで空間分解能が向上 し,神経組織の描出能を向上させる水選択励起(water excitation : WE)法(9, 19),造影剤を投与せずに血管の走行や異常の有無を観察できる磁気共鳴血管画 像法(34,35,76),非侵襲的に組織内の代謝物質を測定することができる磁気共 鳴スペクトロスコピー (13, 15) などが報告されている。また, MRI 装置は神 経系だけでなく筋の評価にも有用であり, ヒトの ALS では MRI を用いて傍脊 柱筋を定性的に評価することで他の類似疾患との鑑別が可能であるとの報告も ある (20)。一方, これまでに MRI を用いた特殊検査では, DTI を用いること で DM 発症犬における脊髄の変性を定量できることが報告されている (38) 以 外, DM に関する報告はない。DM の病理組織学的所見は中枢神経系だけでな く, 背根や骨格筋にも認められるため, MRI を利用すれば従来の MRI では検 出できなかった, DM に特徴的な変性を捉えられる可能性が期待できる。

本研究では、第1章で DM に対する DTI データを用いた解析の有用性を評価 した。DM 発症犬の尾側胸髄から頭側腰髄の DTI データを解析し、脊髄疾患を 罹患していないコントロール犬および DM との鑑別が必要である IVDH 発症犬 を疾患対照犬とし、比較検討した。第2章では、WE 法を利用した DRG 体積測 定法の確立および DM に対する WE 法による DRG 体積測定の有用性を評価し た。DM 発症犬の尾側胸髄から頭側腰髄の DRG を、WE 画像を用いて解析し、 コントロール犬および DM との鑑別が必要である IVDH 発症犬を疾患対照犬と し、比較検討した。第3章では、DM 発症早期の犬における傍脊柱筋群の筋信 号強度および筋断面積の変化を、T1 強調画像を用いて定量し、コントロール犬 および DM 発症後期の犬と比較検討した。

第1章

拡散テンソル画像の解析による

イヌの変性性脊髄症における脊髄病変の検出

背景

DM はジャーマン・シェパード・ドッグ (3, 4, 29, 86), ボクサー (4, 53, 86), PWC などの犬種で報告されている (4, 14, 16, 17, 61, 86), 致死的な進行性の 神経変性疾患である (3, 16)。8 歳以上で発症し (83), 臨床症状は両後肢の UMN 性不全麻痺から始まり, 徐々に歩行および起立困難となり, 後期には四肢麻痺, 呼吸障害に陥り, 発症から約3年で死に至る (17, 63)。

DM 発症大では SOD1 遺伝子変異が確認されていることから (4,83),現在, DM の臨床診断は,特徴的な進行性の臨床症状, SOD1 遺伝子変異の特定および DM と鑑別が必要な他の進行性脊髄疾患の除外で行われている。しかし,IVDH を含む後天的な脊髄疾患は DM 発症犬で頻繁に認められるため,現在の診断基 準では DM の臨床診断は困難である。DM の確定診断には病理組織学的検査が 必要であるが(3,39,50),より早期かつ特異的に DM の臨床診断を行うために, 新たな診断手法の開発が求められている。DM 発症犬の脊髄では,脊髄全域にお ける軸索変性および壊死,脱髄,線維性増殖およびアストロサイト増生が認めら れる (4,16,50,53)。これらの病理組織学的変化は従来の MRI 検査では描出で きないため (17,62),脊髄の変性を捉えることができる新たな画像検査手法が 探索されている。

水分子の動きを in vivo で定量できる DTI は脊髄の神経線維束を可視化するこ とができ、さらに取得した DTI データから脊髄組織における傷害の程度を定量 することができる(77)。DTI データから水分子の拡散の程度を示す見かけの拡 散係数(apparent diffusion coefficient:ADC)や,拡散の異方性を示す異方性 比率 (fractional anisotropy: FA) が定量値として算出できるため、これらは神 経変性疾患の診断,重症度および予後の判定に用いられている(51)。人の神経 変性疾患である ALS の研究では, 頸髄の FA 値が ALS の診断に寄与すると報 告されている(64)。さらに、ADC 値や FA 値が生存期間や呼吸機能障害への進 行の予測マーカーとして有用であると報告されている(30, 66)。獣医領域では 近年, 脊髄における FA 値について, DM 発症犬は健常犬よりも低値を示すこと が報告されている(38)。他の脊髄疾患については脊髄損傷や脊髄腫瘍において 研究されているが(46), DM との鑑別が必要な圧迫性脊髄症との比較検討はさ れていない。

そこで,第1章では,DM に対する DTI の有用性を評価した。3.0 テスラ MRI 装置を使用して,DM 発症犬,IVDH 発症犬および脊髄疾患を認めないコントロ ール犬の胸腰髄における DTI データを取得し,ADC 値および FA 値を算出し た。IVDH は後肢麻痺を呈する一般的な原因であり,DM との鑑別が必要である ため,本研究の疾患コントロール群として用いた。仮説は,①「DM 発症犬の脊

髄では軸索の喪失および脱髄による水分子の拡散異方性の減少のため、胸腰髄 における FA 値は IVDH 群および健常群の FA 値よりも低い」,②「DM 発症犬 の脊髄では、線維芽細胞や星状膠細胞の増殖により水分子の動きが制限される ため、胸腰髄における ADC 値は、IVDH 群および健常群の FA 値よりも低い」 とした。

材料および方法

動物福祉

本研究は岐阜大学応用生物科学部動物実験審査委員会および動物臨床試験倫 理専門委員会で審査を受け,承認されたものであり(承認番号:E20005 および 2019-113),組み入れ症例はいずれも飼い主に研究趣旨を説明し,インフォーム ド・コンセントを得た。

供試動物

DM, IVDH およびコントロール犬の DTI データの解析を行うために,2019 年8月から2021年1月までに岐阜大学附属動物病院を来院した DM 発症 PWC (DM 群)8頭, IVDH 発症犬(IVDH 群)13頭およびコントロール犬(対照 群)6頭を組み入れた。DM 発症犬は、1)臨床症状として、後肢から始まる無 痛性の進行性麻痺を呈すること、2) SOD1 遺伝子検査により変異型ホモ接合 体(*c.118G>A*)であること、および3)脊髄の MRI 検査および脳脊髄液 (cerebrospinal fluid:CSF)検査において麻痺の原因となる器質的な病変が 認められないことの3点の診断基準(16,17)を満たし、臨床的に DM と診断 した症例を組み入れた。 但し、MRI 検査によって脊髄圧迫病変を認めた場合、 DM に特徴的な進行性の臨床症状を少なくとも1年以上認めた場合も DM 群に 組み入れた。DM のステージ分類は既報を基に,運動機能よりステージ1:後肢 における歩行可能な運動失調または UMN 性不全麻痺, ステージ 2: 後肢におけ る LMN 性麻痺,ステージ3:前肢の LMN 性麻痺による体重維持の可能な前 肢の虚弱,ステージ4:四肢の完全麻痺の4ステージに分類した(17)。IVDH 群は 3.0 テスラ MRI 装置(Achieva dStream, Philips, Amsterdam, Netherland) で胸腰部 IVDH による脊髄圧迫病変を認めた犬を組み入れた。胸腰部 IVDH の グレード分類は既報を基に、グレード1:胸腰部痛のみ、グレード2:歩行可能 な後肢不全麻痺、グレード3:歩行困難な後肢不全麻痺、グレード4:深部痛覚 を有する後肢完全麻痺, グレード 5: 深部痛覚を喪失した後肢完全麻痺の 5 グレ ードに分類した(1,71)。対照群は、神経症状を認めず、神経学的検査および脊 髄 MRI 検査で異常所見を認めなかった犬を組み入れた。DM または IVDH 群に ついて,各診断基準を満たさない,頭蓋内疾患,脊椎または脊髄腫瘍,髄内また は硬膜内髄外病変を有する犬は除外した。

MRI 検査

全ての MRI 検査は 8 チャンネルコイルを搭載した 3.0 テスラ MRI 装置 (Achieva dStream, Philips, Amsterdam, Netherland)を使用した。MRI 検査 中の全身麻酔はプロポフォール(PROPOFOL injection, Fuji Pharma Co., Ltd., Toyama, Japan)の静脈内注射により麻酔導入後,気管挿管し,人工呼吸器で呼 吸を制御しながらイソフルラン(Isoflurane, Pfizer Inc., New York, U.S.A.)で 維持した。全ての画像は仰臥位で撮像した。T1 強調画像(繰り返し時間 [repetition time : TR] /エコー時間 [echo time : TE] 570/13.8 msec; スライ ス幅 1.5 mm), T2 強調画像(TR/TE 3113/90 msec; スライス幅 1.5 mm), お よび 0.1 mmol/kg のガドジアミド水和物(OMNISCAN, Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan)の静脈注射による造影 T1 強調画像を取得した。DTI の撮像範囲は T8– T9 椎間板レベルから L2–L3 椎間板レベルまでとした。撮像プロトコルは TR/TE 5571/70 msec; スライス幅 2 mm; diffusion gradient encoding in 32 directions; b value 1,000 sec/mm²; field of view 250 x 250 mm; scan time 5 min であった。

画像解析

全ての画像解析は著者が行った。MRI 装置に備え付けのワークステーション により DTI データから ADC map および FA map を作成した。測定する関心領 域 (regions of interest: ROI) は T2 強調画像と重ね合わせることで脊髄の解剖 学的位置を確認しながら設定した。ROI は T8-T9 から L2-L3 の計 8 椎間板レ ベルの横断像から手動で設定した (図 1-1)。すべての ROI は, 脳脊髄液をでき るだけ含まないように注意深く,18 ボクセル以上を含むように設定した。すべ ての DTI データを MRI 装置に備え付けのワークステーションを使用して分析 し,FA 値と ADC 値を取得した。DTI データから,T8–T9 から L2–L3 の胸腰 部脊髄領域(T8–L3 領域)を通過する脊髄の神経線維束を描出し,視覚化され た神経線維全体の ADC 値と FA 値を取得した。

統計解析

統計解析は Easy R ソフトウェア(40)を用いた。ADC 値および FA 値につ いて, DM 群, IVDH 群および対照群の 3 群間を Kruskal-Wallis 検定を用いて 比較した。事後解析は Bonferroni 補正後, Mann-Whitney U検定を行った。 ADC 値および FA 値について, DM の発症期間との相関関係を Spearman の順 位相関係数を用いて解析した。発症期間は飼い主が最初に臨床症状を確認した 日から MRI 撮像した日までとした。全ての解析は P 値 <0.05 で有意差ありと みなした。相関係数 (r_s) は>0.7 で強い相関と定義した。

結果

供試動物

本研究に組み入れた症例を表 1-1 にまとめた。DM 群には 8 頭の PWC を組 み入れた。DM 群のうちステージ1は4頭, ステージ4は4頭であった。ステ ージ1の4頭は組み入れ基準を満たしたためDMと仮診断した。4頭とも胸腰 部 IVDH を併発していたが,DM に特徴的な進行性の臨床症状が 1 年以上認め られたため, DM 群に組み入れた。2 頭は避妊雌, 2 頭は去勢雄であった。ステ ージ4の4頭はすべて死後24時間以内にMRIを実施した後に剖検を行い、病 理組織学的検査により DM と確定診断した。1 頭は未避妊雌,3 頭は去勢雄であ った。DM 群の年齢中央値および体重中央値は 14.1 歳(範囲: 11.0-15.9 歳) お よび 12.1 kg (範囲: 10.1–14.6 kg) であった。DM 群の IVDH 部位は 4 頭が T13-L1, 2 頭が T12-T13, 各 1 頭が L1-L2 および L2-L3 であった。IVDH 群には 13 頭を組み入れた。IVDH 群の年齢中央値および体重中央値は 10.1 歳 (範囲: 3.5-11.9 歳) および 5.6 kg (範囲: 3.4-10.7 kg) であった。2 頭は未 避妊雌,2頭は避妊雌,5頭は未去勢雄,4頭は去勢雄であった。犬種はミニチ ュア・ダックスフントが8頭, 雑種が2頭, トイ・プードルが1頭, パグが1 頭,ミニチュア・ピンシャーが1頭であった。IVDHのグレード1は2頭,グ

レード2は2頭、グレード3は3頭、グレード4は4頭、グレード5は2頭で あった。IVDH 部位は各 6 頭が T13-L1 および L2-L3, 4 頭が T12-T13, 各 2 頭が T11-T12 および L1-L2, 各 1 頭が L3-L4, L4-L5, L5-L6 および L6-L7 であった。IVDH の発生箇所は8頭が1ヵ所,2頭が2ヵ所,1頭が3ヵ所,1 頭が4ヵ所,1頭が5ヵ所であった。IVDH 群の10頭が片側椎弓切除術を受け、 3 頭は内科療法を選択した。13 頭すべてで症状は治療後に改善した。対照群に は6頭を組み入れた。4頭は岐阜大学所有の実習犬を用い、2頭は飼い主所有の 犬を用いた。対照群の年齢中央値および体重中央値は5.0歳(範囲:4.0-10.0歳) および 12.9 kg (範囲: 10.6-16.8 kg) であった。3 頭は避妊雌, 3 頭は去勢雄で あった。犬種はビーグルが4頭, PWCが1頭, 雑種が1頭であった。対照群の うち3頭は神経症状を示さず、MRI 検査において中枢神経系に構造的病変を認 めなかった。2 頭は一過性の四肢運動失調を認めたが、MRI 検査において中枢 神経系に構造的病変を認めなかった。1 頭は過去に特発性てんかんと診断されて おり、MRI 実施時には神経症状を示さず、中枢神経系に構造的病変を認めなか った。

ADC 値の比較

DTI データの結果を表 1-2, 図 1-2 および図 1-3 に示した。DM 群, IVDH 群

および対照群間の比較では T10-T11, T12-T13, L1-L2 および L2-L3 椎間板 レベルにおいて有意差を認めた(P=0.024, 0.007, 0.027, 0.017 および 0.007)。 DM 群の ADC 値は対照群と比較して T10-T11, T12-T13, L1-L2 および L2-L3 椎間板レベルで有意に低かった(P=0.038, 0.004, 0.041, 0.038 および 0.024)。 また, DM 群の ADC 値は IVDH 群と比較して L1-L2 椎間板レベルで有意に 低かった (P=0.038)。T8-L3 領域の ADC 値は, 3 群間で有意差を認めた (P<0.001)。T8-L3 領域の ADC 値は, DM 群が対照群および IVDH 群と比較 して有意に低かった (P=0.002 および P<0.001)。

FA 値の比較

DM 群, IVDH 群および対照群間の比較ではいずれの椎間板レベルにおいて も有意差を認めなかった。一方, T8–L3 領域の FA 値については, DM 群が対 照群および IVDH 群と比較して有意に低かった(*P*=0.024 および 0.006)。

DM 群の DTI データと発症期間の関連

DM ステージ 1 およびステージ 4 における ADC 値と FA 値を表 1-3 に示した。また, DM 発症期間と DTI データとの相関関係も表 1-3 に示した。ADC 値は, T8-T9, T9-T10, T11-T12, T13-L1, L1-L2 および L2-L3 椎間板レベル

で DM の発症期間と強い負の相関を示し,特に T13-L1 椎間板レベルの ADC 値は最も強い負の相関を示した (*rs*=-0.873, *P*=0.011)。T8-L3 領域の ADC 値も 強い負の相関を示した (*rs*=-0.723, *P*=0.043)。FA 値は,T8-T9 椎間板レベルで 強い負の相関を示した (*rs*=-0.819, *P*=0.013)。一方,T8-L3 領域の FA 値は DM の発症期間との相関を認めなかった。

IVDH のグレードと DTI データとの相関

T8-T9 から L2-L3 の各椎間板レベルおよび T8-L3 領域について, ADC 値お よび FA 値はともに IVDH のグレードとの相関性を認めなかった。 本研究結果から,DM 群の T8-L3 領域の ADC 値および FA 値は対照群およ び IVDH 群と比較して有意に低値を示すことが明らかとなった。特に T8-L3 領 域の ADC 値は DM と IVDH の鑑別に有用である可能性が示唆された。さらに, ADC 値は DM の発症期間と強い負の相関を示した。DM 発症犬の脊髄変性は従 来の MRI 検査手法で定量化できなかったため,DTI データ解析は DM の新た な非侵襲的診断手法として有用である可能性がある。

本研究では、DM 群の T8-L3 領域における ADC 値は対照群および IVDH 群 よりも有意に低かった。ADC 値は組織内部にある水分子の拡散の程度を反映し た値である。人医療では、ALS (30,64,66)、頸椎症性脊髄症 (6,22)、圧迫性 脊髄症 (48,80)、多発性硬化症 (5,45)、脊髄損傷 (72) などの脊髄疾患の診断、 治療経過および予後評価に利用されている。犬の脊髄疾患では、胸腰部 IVDH および髄膜腫の病変部における ADC 値は健常な脊髄と比較して有意に低値と なることが報告されている (46)。ADC 値の低下は細胞傷害性浮腫や細胞内の 脂質含有量の変化によって細胞密度が増加することにより、細胞周囲の水分子 の拡散が制限されるためと考えられている (23)。さらに、犬の脳疾患について、 悪性度の高い組織球肉腫は髄膜腫よりも ADC 値が低値を示すと報告された

(79)。組織中の細胞密度が高いほど水分子の動きが制限されるため、細胞密度 が高くなる悪性度の高い腫瘍では ADC 値が低値となると考えられている(79)。 DM 発症犬の脊髄では、胸腰髄の脱髄、線維芽細胞、アストロサイトおよびミク ログリアの増生が認められる(4,16,50,53)。また、軸索の壊死と脱髄によって 生じた空間は、アストロサイトにより産生される均質な好酸性基質に置換され る(50)。これらの病理組織学的特徴から、DM の胸腰髄における脱髄後の脊髄 組織内における細胞密度の増加および脱髄後のスペースを埋める細胞外基質に よって細胞外の水分子は拡散が制限されるため、ADC 値が低下すると考えられ る。今後、脊髄組織内における細胞密度、または、細胞外基質の占有面積を病理 組織学的に定量化し、細胞密度や細胞外スペースと ADC 値との相関関係を評価 する必要がある。

DM 群の L1–L2 椎間板レベルにおける ADC 値は IVDH 群よりも低値を示し たが,他の椎間板レベルについては 2 群間で有意差を認めなかった。対照的に, 過去の報告では IVDH 病変部の ADC 値は正常部と比較して有意に低値を示し た (46)。IVDH に続発する血管原性浮腫および脱髄を伴う脊髄では ADC が増 加するが,血管原性浮腫および脱髄を伴わない脊髄では ADC は増加しない (23)。 したがって, IVDH による脊髄圧迫後の脊髄変性の程度を定量化することは困 難であるため, DTI データの解析には IVDH の影響を受けていない脊髄を含む

複数髄節での評価が必要である。

DM 群の T8-L3 領域における FA 値は IVDH 群と比較して有意に低値を示し た。FA 値は拡散異方性の大きさを数値化しており,FA 値の減少は神経線維束 の不完全性を反映している (65)。犬の慢性脊髄損傷病変では,軸索変性と脱髄 が神経線維束の不完全性をもたらすため FA 値を低下させると考えられている (79)。DM 発症犬の胸腰髄の白質では,顕著な軸索変性および脱髄が認められ ることから (4,16,50,53),DM 発症犬の胸腰髄における神経線維束の変性が FA 値の低下を引き起こしていることが示唆された。一方,DM 発症犬の脊髄に おける FA 値と病理組織学的変化との関連は明らかになっていない。

過去の報告では、犬の慢性脊髄損傷部の FA 値は正常部と比較して低下し、さ らに、臨床スコアと相関することが明らかとなっている(49)。本研究では各椎 間板レベルにおける FA 値はいずれも 3 群間に有意差を認めなかったが、これ は IVDH 群に組み入れた犬の臨床スコアが統一されていなかったためと考えら れる。近年、DM 発症犬の頭側腰部の複数髄節における FA 値は、健常犬と比較 して有意に低値を示すと報告された(38)。本研究でも、T8-L3 領域の FA 値に ついては、DM 群が対照群および IVDH 群と比較して有意に低かったことから、 DM の診断においては、脊髄の広範囲を DTI 解析の対象とすべきであると考え られた。

T8-L3 領域における DTI データと DM 発症期間の相関性について、ADC 値 は強い負の相関を示したが、FA 値は相関を示さなかった。細胞傷害性浮腫や細 胞密度の増加に比例して細胞外の水分子の拡散が制限されるため、ADC 値は減 少する (23)。DM 発症犬の胸腰髄ではグリア細胞による細胞間基質の分泌や細 胞密度の増加が起こることから (4, 16, 50, 53)、水分子の拡散が制限されると 考えられる。一方、胸腰髄においては DM 発症早期から軸索変性および脱髄が 認められることから (17, 50)、胸腰髄では発症早期から水分子は等方性拡散を 示すと考えられる。一方、近年、FA 値が DM の病理組織学的グレードと有意に 相関していると報告された (38)。本研究との相違点は、測定部位の違いによっ て生じたと考えられる。今後、DM の発症期間、病理組織学的検査所見、測定部

本研究結果から,DM の脊髄変性を非侵襲的に評価するためには,T8-L3 領 域からの DTI データの取得が有用であることが示された。9.4 テスラ MRI 装置 を用いた ALS の研究では,脊髄灰白質の axial diffusion 値および radial diffusion 値は ALS 群の方が健常群と比較して有意に低値を示した(27)。さら に,皮質脊髄路から得られた FA 値について,ALS 群の方が健常群と比較して 有意に低値を示した(11)。脊髄の直径が人よりも小さい大では,臨床の現場で 用いられる MRI 装置を用いて,脊髄の特定の領域のみを選択することは不可能 である。一方, ALS の研究で,単一の髄節だけでなく,複数髄節から得られた radial diffusion 値および FA 値について ALS 群の方が健常群と比較して有意に 低値を示した (57,64)。これらのことから,犬の DTI データの取得には複数髄 節を用いた評価が必要であると考えられた。今後は DM に特異的な脊髄病変を 検出するための最も有用な脊髄領域を明らかにする必要がある。

本研究の制限事項として以下の点が挙げられる。1 点目は、本研究では ADC 値および FA 値の測定を著者1人で行っている点についてである。今後, 測定値 について観察者内および観察者間の信頼性を評価する必要がある。2 点目は, DM 群において、DM の早期ステージと後期ステージ間の DTI データを比較す るために,4 頭は死後に DTI データを取得した点についてである。DM 発症後 期の症例では呼吸障害を患うため、全身麻酔を実施することは倫理的に困難で ある。したがって、DM 後期症例として死亡直後の症例を用いた。死後の DTI について、マウスの研究では、死後 10 時間に得られた DTI データは生前と同 様のデータが得られるとの報告がある(43)。本研究では死後の影響を最小限に 抑えるために、死亡直後から飼い主によって保冷剤で冷却され、死後24時間以 内に DTI データが得られた。 死後の変化が病理組織学的変化および DTI データ に影響を及ぼす可能性があるため更なる調査が必要である。3 点目は, DTI デー タと病理組織学的検査所見との相関関係が調査されていないことである。本研 究では DM 群のうち 4 頭は依然生存しているため、病理組織学的検査による確 定診断を得られていない。したがって、DTI データと病理組織学的検査所見と の比較は不可能であった。4 点目は、DTI 撮像および画像解析についてである。 水分子の拡散は、呼吸、心拍、脳脊髄液の脈動、および麻酔によって影響を受け る可能性がある (78)。 また、ROI の解像度が限られているため、CSF および 脊髄周囲組織を完全に除外できていない可能性があるが、ファイバートラクト グラフィーによって視覚化された領域から得られた ADC 値と FA 値を使用する と、CSF および脊髄周囲組織を含まないため、アーティファクトを減らすこと ができる。最後に、本研究における各群の年齢、体重および品種は統一されてい ない。

本研究結果から, DM 群の T8-L3 領域の ADC 値および FA 値は対照群およ び IVDH 群と比較して有意に低値を示すことが明らかとなった。特に T8-L3 領 域の ADC 値は DM と IVDH の鑑別に有用である可能性が示唆された。さらに, ADC 値は DM の発症期間と強い負の相関を認めた。そのため, 従来の DM の診 断方法 である 1) 臨床症状の確認, 2) SOD1 遺伝子検査, 3) 除外診断に 4) DTI の測定を組み合わせることで, DM の生前診断の精度はより高くなる ことが期待できる。

表 1-1 供試動物

症例 No.	診断	犬種	年齢(歳)	体重(kg)	性別	IVDH 発症部位	発症期間
1	DM(ステージ4)	PWC	13.0	10.2	去勢雄	T12-T13, T13-L1, L2-L3	3.0年
2	DM(ステージ4)	PWC	15.2	10.1	去勢雄	L1-L2	3.5年
3	DM(ステージ4)	PWC	14.1	14.6	未避妊雌		3.3年
4	DM(ステージ4)	PWC	15.9	14.6	去勢雄	T13-L1	3.0年
5	DM(ステージ1)	PWC	14.1	11.8	去勢雄	T13-L1	2ヵ月
6	DM(ステージ1)	PWC	12.7	13.6	去勢雄	T12-T13, T13,-L1	3ヵ月
7	DM(ステージ1)	PWC	11.0	12.3	避妊雌		7ヵ月
8	DM(ステージ1)	PWC	10.8	16.8	避妊雌		2ヵ月
9	IVDH	雑種	11.7	3.4	去勢雄	T12-T13	5ヵ月
10	IVDH	パグ	11.6	6.3	避妊雌	T11-T12, T12-T13, L5-L6, L6-L7	3ヵ月
11	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	3.5	5.2	未避妊雌	T13-L1	3日
12	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	5.0	4.2	去勢雄	T13-L1	7日
13	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	10.8	4.5	避妊雌	T13-L1, L2-L3	4日
14	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	10.9	5.8	未避妊雌	L2-L3, L3-L4	1ヵ月
15	IVDH	トイ・プードル	5.1	6.7	未去勢雄	L1-L2	11日
16	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	10.7	8.0	未去勢雄	L2-L3	10日
17	IVDH	雑種	11.9	5.6	未去勢雄	T13-L1	1ヵ月
18	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	9.8	10.7	未去勢雄	T13-L1	5日
19	IVDH	ミニチュア・ピンシャー	4.7	4.8	去勢雄	T11-T12, T12-T13, L2-L3	5日
20	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	8.9	5.3	未去勢雄	L2-L3	3日
21	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	10.1	7.1	去勢雄	T12-T13, T13-L1, L1-L2, L2-L3, L4-L5	1ヵ月
22	対照	ビーグル	4.0	13.5	避妊雌		
23	対照	ビーグル	4.0	18.4	去勢雄		
24	対照	ビーグル	5.0	14.0	去勢雄		
25	対照	ビーグル	5.5	12.3	避妊雌		
26	対照	PWC	10.7	10.7	避妊雌		
27	対照	雑種	2.8	10.6	去勢雄		

DM,変性性脊髄症; IVDH,椎間板ヘルニア; PWC,ペンブローク・ウェルシュ・コーギー

	## 明 七 1 ぶ 11	対照		DM		IVDH		P 値			
	相同板レバル		範囲	中央値	範囲	中央値	範囲	3群間	対照 vs DM	対照 vs IVDH	対照 vs IVDH
	T8-T9	1.096	0.239-1.567	0.575	0.198-2.287	1.065	0.732-2.457	0.123	1.000	1.000	0.091
	T9-T10	1.338	0.617-1.578	0.536	0.194-1.958	1.162	0.615-1.952	0.134	0.540	1.000	0.230
	T10-T11	1.360	0.913-1.787	0.780	0.107-1.348	1.324	0.605-2.023	0.024*	0.038*	1.000	0.060
	T11-T12	1.339	0.982-2.059	0.836	0.579-1.422	1.263	0.542-1.902	0.062	0.060	1.000	0.360
ADC	T12-T13	1.445	1.243-1.763	0.857	0.519-1.280	1.183	0.746-1.946	0.007**	0.004**	0.537	0.091
(×10 ° mm ⁻ /s)	T13-L1	1.285	0.984-1.428	0.748	0.393-1.437	1.305	0.682-1.733	0.027*	0.041*	1.000	0.060
	L1-L2	1.325	0.896-1.473	0.915	0.261-1.171	1.317	0.408-1.603	0.017*	0.038*	1.000	0.038*
	L2-L3	1.360	1.252-1.728	0.892	0.246-1.431	1.116	0.544-2.188	0.007**	0.024*	0.109	0.110
	T8-L3	1.408	1.048-1.627	0.713	0.440-0.840	1.279	0.767-1.767	<0.001 **	0.002**	0.969	<0.001**
	T8-T9	0.574	0.443-0.614	0.547	0.323-0.673	0.548	0.419-0.813	0.901	1.000	1.000	1.000
	T9-T10	0.557	0.427-0.646	0.475	0.352-0.726	0.554	0.388-0.827	0.385	0.820	1.000	0.710
	T10-T11	0.520	0.489-0.612	0.446	0.310-0.750	0.489	0.394-0.843	0.139	0.088	1.000	0.804
	T11-T12	0.520	0.417-0.562	0.460	0.332-0.860	0.552	0.366-0.700	0.145	0.730	1.000	0.230
FA	T12-T13	0.522	0.460-0.602	0.452	0.341-0.686	0.525	0.361-0.677	0.236	0.430	1.000	0.480
	T13-L1	0.587	0.481-0.626	0.457	0.364-0.669	0.471	0.360-0.633	0.109	1.000	0.053	1.000
	L1-L2	0.603	0.476-0.666	0.506	0.340-0.751	0.468	0.421-0.810	0.195	1.000	0.086	1.000
	L2-L3	0.486	0.275-0.593	0.459	0.356-0.783	0.525	0.359-0.769	0.350	1.000	0.550	1.000
	T8-L3	0.544	0.489-0.576	0.449	0.417-0.550	0.575	0.418-0.701	0.004**	0.024*	1.000	0.006**

表 1-2 DM 群, IVDH 群および対照群における ADC 値および FA 値の比較

* P<0.05, ** P<0.01; ADC, 見かけの拡散係数; FA, 異方性比率; DM, 変性性脊髄症; IVDH, 椎間板ヘルニア

		DM ステージ1		DM ス	ペテージ4	DM発症期間とDTIデータの相関関係		
	椎間板レベル	中央値	範囲	中央値	範囲	r _s	P 値	
	T8-T9	1.018	0.426-2.287	0.417	0.198-0.792	-0.711	0.048*	
	T9-T10	1.076	0.482-1.958	0.448	0.194-0.832	-0.711	0.048*	
	T10-T11	0.916	0.627-1.348	0.611	0.107-1.047	-0.470	0.240	
	T11-T12	1.097	0.649-1.422	0.696	0.579-0.867	-0.711	0.048*	
ADC	T12-T13	0.930	0.662-1.280	0.727	0.519-1.046	-0.313	0.450	
	T13-L1	0.916	0.808-1.437	0.594	0.393-0.688	-0.873	0.011*	
	L1-L2	1.016	0.917-1.171	0.683	0.261-0.913	-0.783	0.022*	
	L2-L3	1.016	0.889-1.431	0.818	0.246-0.894	-0.747	0.033*	
	T8-L3	0.781	0.754-0.840	0.541	0.440-0.672	-0.723	0.043*	
	T8-T9	0.488	0.323-0.555	0.618	0.476-0.673	-0.819	0.013*	
	T9-T10	0.522	0.424-0.726	0.464	0.352-0.540	-0.325	0.432	
	T10-T11	0.485	0.398-0.750	0.412	0.310-0.451	-0.518	0.188	
	T11-T12	0.486	0.380-0.860	0.409	0.332-0.496	-0.446	0.268	
FA	T12-T13	0.452	0.433-0.686	0.422	0.341-0.516	-0.036	0.932	
	T13-L1	0.457	0.404-0.669	0.459	0.364-0.645	0.084	0.843	
	L1-L2	0.512	0.386-0.751	0.480	0.340-0.739	-0.133	0.754	
	L2-L3	0.448	0.356-0.572	0.459	0.444-0.783	0.253	0.545	
	T8-L3	0.456	0.420-0.550	0.426	0.417-0.454	-0.446	0.268	

表 1-3 DM 発症期間における ADC 値および FA 値の比較

* P<0.05; ADC, 見かけの拡散係数; FA, 異方性比率; DM, 変性性脊髄症; r_s, 相関係数



図 1-1 胸腰髄の ROI およびファイバートラクトグラフィーの設定

(症例 No. 8)

T8-T9からL2-L3椎間板レベルにおけるROIの設定部位8ヵ所を示した(A)。 T8-L3領域のDTIデータを得るために,ファイバートラクトグラフィーを用い て神経繊維束を水色で描出した(B)。T12-T13椎間板レベルのFAマップにT2 強調画像を重ね合わせ(C),脊髄以外の組織を囲まないようROIを手動で設定 した(D)。

ROI, 関心領域



図 1-2 DM 群, IVDH 群および対照群における ADC 値の比較

DM 群における T10-T11, T12-T13, T13-L1, L1-L2, L2-L3 椎間板レベルお よび T8-L3 領域の ADC 値は対照群と比較すると,いずれも有意に低値を示し た。また, DM 群における L1-L2 椎間板レベルおよび T8-L3 領域の ADC 値は IVDH 群と比較すると,いずれも有意に低値を示した。

* P<0.05, ** P<0.01; ADC, 見かけの拡散係数; DM, 変性性脊髄症; IVDH, 椎間板ヘルニア



図 1-3 DM 群, IVDH 群および対照群における FA 値の比較

DM 群における T8-L3 領域の FA 値は対照群および IVDH 群と比較すると、いずれも有意に低値を示した。

* P<0.05, ** P<0.01; FA, 異方性比率; DM, 変性性脊髄症; IVDH, 椎間板へ ルニア

第2章

水選択励起画像法を用いたイヌの変性性脊髄症における

背根神経節の変化の解析
第1章ではDM発症犬における脊髄変性の定量化によるDTIデータの有用性 を評価した。しかし,DM発症犬はしばしばIVDHを併発していることがあり, IVDHの中には脊髄神経束の完全性を害わせることでADC値およびFA値を低 下させる場合もある(23,65)。このような場合,DMとIVDHの鑑別を行うた めの検査において,脊髄を評価対象とした検査では,問題が生じる可能性がある。 これらのことから,DTIを用いた脊髄の評価のみではDM偽陽性もしくはDM 偽陰性の結果が生じる可能性がある。したがって,DMの診断には脊髄のみの評 価だけでなく,他の組織を対象とした解析手法の開発が必要である。

DM における脊髄の病理組織学的変化については第1章に記したが、脊髄以 外の病理組織学的検査所見として、背根軸索数の減少(29,56)および背根神経 節(dorsal root ganglion: DRG)細胞の変性が知られている(56)。現在、人医 療では脊髄周囲組織や末梢神経組織を明瞭に視覚化する方法として水選択励起 (water excitation: WE)法が注目されている。WE 法は水と脂肪の位相分散 の差を利用して水の信号を選択的に励起する方法であり、T1 強調画像と比較し てより優れた脂肪抑制画像が得られる撮像法として利用されている(32)。さら に、WE 法を利用した末梢神経系の視覚化として磁気共鳴ニューログラフィー が開発されている(74,84)。慢性炎症性脱髄性多発神経炎の研究では、WE 法 を用いた DRG 体積の測定が診断に寄与する可能性が示唆されており(36),WE 法は犬の DRG の描出および定量化を可能とするのではないかと考えた。また、 DRG の定量化が可能であれば、DM 発症犬における WE 法を利用して DRG の 変性の程度を定量化できるのではないかと考えた。

そこで第2章では、WE 法を利用して犬の DRG 体積測定手法を確立した。 DRG 体積を標準化するために、正常犬 DRG 体積と体重、体表面積および椎体 長との相関性を評価した。また、コントロール犬の脊髄断面積と体重、体表面積 および椎体長との相関性を評価した。次に、WE 法を利用した DRG 体積測定の DM に対する有用性を評価した。本研究の仮説は、WE 法は犬の DRG を明瞭に 描出し、広範囲な脊髄変性および背根軸索の喪失のため、DM 発症犬の DRG 体 積は IVDH 罹患犬およびコントロール犬と比較して減少する、であった。

材料および方法

動物福祉

本研究は岐阜大学応用生物科学部動物実験審査委員会および動物臨床試験倫 理専門委員会で審査を受け、承認されたものである(承認番号:E20005および 2020-230)。組み入れ症例はいずれも飼い主に研究趣旨を説明し、インフォーム ド・コンセントを得た。

供試動物

DM, IVDH およびコントロール犬の WE 画像を解析するために,2019 年 8 月から 2021 年 1 月までに岐阜大学附属動物病院を来院した DM 発症 PWC(DM 群) 8 頭, IVDH 発症犬(IVDH 群) 13 頭および対照群 6 頭を組み入れた。ま ず,犬の DRG 体積を標準化するため,対照群として,神経症状を認めず,神経 学的検査および一般的な MRI による脊髄イメージング検査で異常所見を認めな かった犬を組み入れた。次に,DRG 体積を比較するために,DM 群,IVDH 群 および対照群の 3 群に分けて評価した。両解析に用いた対照群は同じ犬を用い た。DM 発症犬は,1) 臨床症状として,後肢から始まる無痛性の進行性麻痺 を呈すること,2) SOD1 遺伝子検査により変異型ホモ接合体 (*c.118G>A*) で

あること、および3)脊髄のMRI検査およびCSF検査において麻痺の原因と なる器質的な病変が認められないことの3点の診断基準を満たし、臨床的にDM と診断した症例を組み入れた(16,17)。脊髄圧迫病変を認めた場合においても, DM に特徴的な進行性の臨床症状を少なくとも1年以上認めた場合は DM 群に 組み入れた。DM のステージ分類は既報を基に、ステージ1:後肢における歩行 可能な運動失調または UMN 性不全麻痺, ステージ 2 : 後肢における LMN 性麻 痺,ステージ3:前肢のLMN 性麻痺による体重維持の可能な前肢の虚弱,ステ ージ 4: 四肢の完全麻痺の 4 ステージに分類した (17)。IVDH 群は MRI 検査 により椎間板ヘルニアによる胸腰部脊髄の圧迫病変を認めた犬を組み入れた。 胸腰部 IVDH のグレード分類は既報を基に,グレード 1:胸腰部痛のみ,グレ ード2:歩行可能な後肢不全麻痺、グレード3:歩行困難な後肢不全麻痺、グレ ード4:深部痛覚を有する後肢全麻痺、グレード5:深部痛覚を喪失した後肢全 麻痺の 5 グレードに分類した(1, 71)。DM または IVDH 群について,各診断 基準を満たさない、頭蓋内疾患、脊椎または脊髄腫瘍、髄内または硬膜内髄外病 変を有する犬は除外した。

MRI 検査

全ての MRI 検査は 8 チャンネルコイルを搭載した 3.0 テスラ MRI 装置

(Achieva dStream, Philips, Amsterdam, Netherland)を使用した(図 2–1)。 MRI 検査中の全身麻酔はプロポフォール(PROPOFOL injection, Fuji Pharma Co., Ltd., Toyama, Japan)の静脈内注射により麻酔導入後,気管挿管し,人工 呼吸器で呼吸を制御しながらイソフルラン(Isoflurane, Pfizer Inc., New York, U.S.A.)で維持した。全ての画像は仰臥位で撮像された。T1 強調画像(TR/TE 570/13.8 msec; スライス幅 1.5 mm), T2 強調画像(TR/TE 3113/90 msec; ス ライス幅 1.5 mm),および 0.1 mmol/kgのガドジアミド水和物(OMNISCAN, Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan)の静脈注射による造影 T1 強調画像を取得した。 WE 画像は,水励起時間;13 msec, TR;10.12–10.24 msec, invention time; 150–170 msec, 横断スライス幅;0.375–0.500 mm,縦断スライス幅;1.1–1.2 mm, flip angle;30°で撮像した。

画像解析

画像データは OsiriX MD version 4.1.2 (OsiriX Pixmeo, Geneva, Switzerland) で解析した。全画像データは共同研究者によって匿名化され,著者によって測定 が行われた。WE 法で得られた画像から DRG の体積を測定した。DRG の体積 測定は過去の報告を基に一部修正して行なった (81) (図 2–2)。WE 画像は, T8 から L2 椎体レベルの脊髄を含み,かつ両側の DRG 全体を含む範囲で撮像され た。DRG 体積は,脊髄から分岐した神経根から椎間孔に侵入するまでの DRG の横断面積から算出された。DRG 断面積は,WE 画像の横断面上で手動により DRG 境界部を選択し,囲まれた範囲から算出された。DRG の体積はカヴァリ エリの原理から,DRG 画像の断面積(ai)とスライスの厚さ(0.375-0.5 mm) (ti)を掛け,各値を合計して算出された。計算式は以下の通りである。

VDRG = ∑aiti

各髄節における DRG 体積は左右の DRG 体積の平均値とした。本研究の計測 はすべて WE 画像を用いて 2 回行なった。DRG 体積を標準化するために,体 重,体表面積および L2 椎体長を測定した。標準化 DRG 体積の有用性を評価す るために,脊髄横断面積を体重,体表面積および L2 椎体長で標準化し,標準化 DRG 体積と比較した。

統計解析

統計解析は Easy R ソフトウェア (40) を用いた。対照群について、T8 から L2 椎体レベルの DRG 体積または脊髄横断面積と体重、体表面積または L2 椎 体長との相関関係を Spearman の順位相関係数を用いて解析した。標準化され た DRG 体積について、DM 群、IVDH 群および対照群の 3 群間を Kruskal-Wallis 検定を用いて比較した。事後解析は Bonferroni 補正後 Mann-Whitney

U検定を行った。また、DRG 体積と DM の発症期間との相関関係を Spearman の順位相関係数を用いて解析した。発症期間は飼い主が最初に臨床症状を確認 した日から MRI 撮像した日までとした。全ての解析は P 値 <0.05 で有意差あ りとみなした。相関係数 (r_s) は>0.7 で強い相関と定義した。

結果

供試動物

本研究に組み入れた症例について表 2-1 にまとめた。対照群には 8 頭を組み 入れた。4 頭は岐阜大学所有の研究用犬,4 頭は飼い主所有の犬であった。5 頭 は避妊雌,3頭は去勢雄であった。犬種はビーグルが4頭,PWCが1頭,雑種 が1頭、ボストンテリアが1頭、フレンチ・ブルドッグが1頭であった。対照 群の年齢中央値,体重中央値,体表面積中央値およびL2椎体長中央値はそれぞ れ 6.0 歳 (範囲: 2.8–10.0 歳), 11.4 kg (範囲: 6.6–14.0 kg), 0.49 m² (範囲: 0.33–0.58 m²) および 1.69 cm (範囲:1.34–1.88 cm) であった。 8 頭全てで MRI 撮像時に神経症状は認めなかった。研究用犬のうち 3 頭は神経症状を示さず、 MRI において中枢神経系に構造的病変を認めなかった。1 頭は過去に特発性て んかんと診断されており、MRI 実施時には神経症状を示さず、中枢神経系に構 造的病変を認めなかった。飼い主所有の犬のうち 2 頭は一過性の四肢運動失調 の既往歴を有するものの中枢神経系に構造的病変を認めなかった。1 頭は頭蓋内 腫瘍, 1 頭は特発性てんかんと診断された。飼い主所有の犬 4 頭全てで MRI 実 施時には神経症状を示さず, 中枢神経系に構造的病変を認めなかった。 DM 群に は8頭の PWC を用いた。DM 群のうちステージ1は4頭, ステージ4は4頭 であった。2 頭は避妊雌,2 頭は去勢雄であった。ステージ4の4 頭はすべて死後 24 時間以内に MRI を実施した後に剖検を行い,病理組織学的検査で DM と確定診断が下された。1 頭は未避妊雌,3 頭は去勢雄であった。DM 群の年齢中央値,体重中央値,体表面積中央値および L2 椎体長中央値はそれぞれ 13.2 歳

(範囲:10.8–15.9 歳), 12.3 kg (範囲:10.1–15.9 kg), 0.52 m² (範囲:0.46– 0.63 m²) および 1.72 cm(範囲:1.63–1.80 cm)であった。IVDH 群には胸腰 部 IVDH と診断された犬 24 頭を組み入れた。6 頭が避妊雌,3 頭が未避妊雌, 6 頭が去勢雄, 9 頭が未去勢雄であった。IVDH 群の年齢中央値, 体重中央値, 体表面積中央値およびL2椎体長中央値はそれぞれ11.7歳(範囲:2.6-15.7歳), 6.7 kg (範囲:3.0–14.1 kg), 0.33 m² (範囲:0.20–0.58 m²) および 1.44 cm (範 囲:1.00–1.69 cm)であった。犬種はミニチュア・ダックスフントが 11 頭,ト イ・プードルが4頭、フレンチ・ブルドッグおよびパグが2頭ずつ、ボーダー コリー, チワワ, ミニチュア・シュナウザー, ペキニーズおよび雑種がそれぞれ 1 頭ずつであった。IVDH の臨床グレードは、グレード1 が 2 頭、グレード 2 は 5頭、グレード3は4頭、グレード4は8頭、グレード5は5頭であった。 IVDH の部位は 12 頭が T12-T13, 9 頭が T13-L1, 6 頭が L1-L2, 4 頭が T11-T12, 4 頭が L2-L3, 2 頭が L4-L5, T9-T10, T10-T11, L3-L4, L5-L6 およ び L6-L7 椎間板レベルが各1頭ずつであった。IVDH の発症個数は1ヵ所が15

頭,2ヵ所が4頭,3ヵ所が1頭,4ヵ所が3頭,5ヵ所が1頭であった。15頭 が外科治療を実施し,9頭が内科療法を実施した。24頭すべてで治療後に症状 が改善した。年齢について,対照群はDM群(P=0.009)およびIVDH群(P=0.012) と比較して有意に若齢であった。体重,体表面積およびL2 椎体長について, IVDH 群は対照群(P=0.003, 0.005, 0.009)およびDM 群(すべて P<0.001) と比較して有意に低値を示した。

DRG 体積の標準化

T8 から L2 までの DRG 体積について,各髄節間で有意差を認めなかったた め, DRG 体積の標準化の検討は T8 から L2 までの DRG 体積すべてを平均化し て用いた。DRG 体積は体表面積と強い相関を示した (*rs*=0.792, *P*=0.024) (表 2–2)。また, DRG 体積は体表面積と中等度の相関を示した (*rs*=0.691, *P*=0.037)。 したがって,3 群間における DRG 体積の比較には DRG 体積を体表面積で除し た標準化 DRG 体積を用いた。

標準化 DRG 体積の比較

DM群の標準化DRG体積は対照群と比較すると, T9(P=0.038), T10(P=0.042) およびL2(P=0.045)で有意に低値を示した(表 2-3,図 2-3)。また,DM群 の標準化 DRG 体積は IVDH 群と比較すると, T8 (*P*=0.009), T9 (*P*=0.003), T10 (*P*=0.003), T11 (*P*=0.010), T12 (*P*=0.035), T13 (*P*=0.031), L1 (*P*=0.041) および L2 (*P*=0.002) で有意に低値を示した。さらに, T8 から L2 までの標準 化 DRG 体積の平均値は, DM 群が対照群 (*P*=0.011)および IVDH 群(*P*=0.002) よりも有意に低値だった (図 2-4)。

DRG 体積と DM 発症期間との関連

T8 から L2 までの標準化 DRG 体積の平均値は, DM ステージ 1 とステージ 4 との間に相関関係を認めなかった。また,各髄節における標準化 DRG 体積に ついても DM ステージ 1 とステージ 4 との間に相関関係を認めなかった。

脊髄横断面積の比較

T8 から L2 までの脊髄横断面積の平均値について,3 群間で有意差を認めな かった。また,各髄節における脊髄横断面積についても,3 群間で有意差を認め なかった。 本研究結果から,WE 画像は犬の DRG の描出に有用であることが明らかとなった。WE 法は脂肪抑制法の一種であり,水と脂肪の位相拡散の差を利用し,水 の信号を選択的に励起する撮像法である。WE 法は高い空間分解能と高い信号 雑音比を有するため,ヒトの DRG を明瞭に描出することができる(73)。獣医 領域でも WE 法は非選択的脂肪抑制法と比較して,より薄いスライス幅で撮像 できるため,空間分解能が向上し,解剖学的視認性が向上することで DRG と神 経根をより明瞭に描出できることが知られている(9,19)。従来の MRI 撮像法 では明瞭に DRG を描出できなかったため,WE 法は DRG の非侵襲的描出手法 として有用である可能性が高い。

DRG 体積は体表面積と強い正の相関を示した。したがって、本研究では DRG 体積を体表面積で除することで、個体ごとの体格差に影響を受けない標準化 DRG 体積を解析に用いた。ヒトの末梢神経疾患である慢性炎症性脱髄性多発神 経炎 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy : CIDP)の研究で は、体表面積で標準化された DRG 体積の解析が CIDP の診断および重症度評 価に有用であることが示された (36)。本研究において、DM 群の標準化 DRG 体積は対照群および IVDH 群と比較して有意に減少していることが示された。 したがって、CIDPと同様、WE 法による DRG 体積の評価が DM の診断に有用 である可能性が示唆された。

過去の DM の研究では、背根のワーラー変性および DRG 内の神経細胞にお ける中心性色質融解が報告されている(29)。より近年の DM の研究では、T8 背根における軸索数の減少と, DM と臨床診断された犬の DRG 内の神経細胞の 変性が報告されている(56)。ヒトの ALS および糖尿病では、軸索変性が生じ ることで、タンパク質および代謝物の軸索内輸送が妨害され、神経細胞死を起こ す(25,70)。したがって,DMでも背根の軸索変性が起こることから,DRG内 の神経細胞死が生じ, DRG 体積の減少が起こると考えられた。一方, DM 発症 犬における T9 から L2 の DRG の病理組織学的検査所見は検討されていないが, DM 罹患症例では尾側胸髄だけでなく脊髄全域における広範な軸索変性、壊死 および脱髄が起こることに鑑みると、T8 だけでなく頸髄や腰髄の DRG でも同 様に神経細胞の変性が生じると推測された(4, 16, 50)。特に,DRG の軸索は脊 髄背索および側索を通過するため、背索および側索の軸索変性が顕著に認めら れる DM では DRG の萎縮が広範に生じている可能性が高い。したがって、広 範な DRG の萎縮が WE 画像により可視化され,定量化できたと考えられた。 この考察を証明するために, 今後, WE 画像と病理組織学的検査所見との関連を 調査する必要がある。

DRG 体積について DM の早期と後期を比較すると,2 群間に有意差を認めな かった。対照的に,過去の報告では C7 の背根軸索数が DM の進行により徐々 に減少すると報告されている(41)。DM の発症早期から膝蓋腱反射の低下を認 めることは,背根軸索のワーラー変性および DRG 内の神経細胞における中心性 色質融解が生じるためと考えられている(29)。したがって,DM 発症早期から DRG 体積の減少が起こっている可能性があることから,WE 法を用いた MRI 検査が DM の早期診断に寄与するかもしれない。一方,DRG 体積は DM 発症 期間と相関性を認めないことから,病態進行に対する長期的なモニタリングに は適さないことに注意しなければならない。

DM 発症早期の臨床症状は他の進行性脊髄傷害と類似しており,特に IVDH は DM 発症犬に最も併発しやすい脊髄傷害である。したがって,本研究では IVDH を疾患対照群として組み入れた。本研究では DRG 体積の評価が DM と IVDH の鑑別に有用であることを明らかにした。各髄節の DRG 体積および T8 から L2 の平均 DRG 体積は DM 群の方が IVDH 群よりも有意に低値を示した。 DM における DRG 体積の減少は,脊髄のびまん性変化に対応した複数の髄節で 発生したが, IVDH における DRG 体積の減少は病変部位付近のみの限局的な減 少であった。ヒトおよび齧歯類の研究では,脊髄損傷部位と同側の DRG が軸索 のワーラー変性および脱髄により萎縮し,感覚神経の変性および細胞死を引き

起こすことが知られている(2,81)。また,脊髄損傷の重症度と DRG 体積の減 衰率は相関し,さらに,萎縮した DRG は時間経過とともにそのサイズが回復す るため,疾患の重症度と期間は DRG の体積変化に大いに影響を及ぼす(52,69, 82)。これらのことから,IVDH 群における DRG 体積変化は疾患の場所,重症 度および受傷期間に影響を受ける可能性がある。

本研究の制限事項として以下の点が挙げられる。1 点目は、本研究では DRG の測定を著者1人で行っている点についてである。観察者内変動を抑えるため, 測定は 2 度行った。今後,測定値について観察者内および観察者間の信頼性を 評価する必要がある。2 点目は,DM 群において,DM の早期ステージと後期ス テージ間の DRG を比較するために,4 頭は死後に WE 画像を取得した点であ る。DM 発症後期の症例では呼吸障害を患うため、全身麻酔を実施することは倫 理的に困難である。 したがって, DM 後期症例として死亡直後の症例を用いた。 ヒトにおける死後 MRI の報告では、死後の中枢神経系の変化について、脳の微 小出血を生前と死後の MRI を比較すると、同等の画像が得られることが報告さ れている(31)。本研究では死後の影響を最小限に抑えるために、死亡直後から 飼い主によって遺体は保冷剤で冷却され, 死後 24 時間以内に WE 画像が得られ た。死後の変化が病理組織学的変化および WE 画像に影響を及ぼす可能性があ るため更なる検討が必要である。3 点目は、WE 画像と病理組織学的検査所見と

の相関関係が調査されていない点である。本研究では DM 群のうち 4 頭は依然 生存しているため,病理組織学的検査による確定診断を得られていない。したが って,WE 画像と病理組織学的検査所見との比較は不可能であった。4 点目は, DM 群はすべて PWC であったことである。本邦における DM 発症犬は PWC が 最も一般的である。その理由として,DM 好発の他犬種の飼育頭数が欧米に比べ 少ないことが原因として考えられる。5 点目は,対照群は DM 群および IVDH 群と比較して有意に若齢であったことである。ヒトの研究では年齢と DRG 体積 との間に有意差を認めなかったが (54),犬の年齢と DRG について更なる研究 が必要である。最後に,本研究における各群の年齢,体重および品種は統一され ていなかった。

本研究結果から,WE 画像は犬の DRG 体積の評価に有用であることが示された。さらに、体表面積によって標準化された DRG 体積は DRG における神経変性を非侵襲的かつ定量的に評価できることから、DM の早期診断の一助となる可能性が示唆された。

汊	表
---	---

表 2-1 供試動物

症例 No.	診断	犬種	年齡(歳)	体重(kg)	体表面積(m ²)	L2椎体長(cm)	性別	発症期間
1	対照	ビーグル	5.0	16.8	0.63	1.88	去勢雄	-
2	対照	ビーグル	5.0	13.5	0.55	1.75	避妊雌	-
3	対照	ビーグル	5.1	14.0	0.58	1.68	去勢雄	-
4	対照	ビーグル	5.5	12.3	0.52	1.73	避妊雌	-
5	対照	雑種	2.8	10.6	0.46	1.49	去勢雄	-
6	対照	フレンチ・ブルドッグ	8.0	11.4	0.49	1.23	避妊雌	-
7	対照	ボストン・テリア	6.6	6.6	0.33	1.00	避妊雌	-
8	対照	PWC	10.7	10.7	0.46	1.70	避妊雌	-
9	DM(ステージ4)	PWC	13.0	13.1	0.54	1.69	去勢雄	3.0年
10	DM(ステージ4)	PWC	15.2	10.2	0.46	1.70	去勢雄	3.5年
11	DM(ステージ4)	PWC	14.1	12.3	0.52	1.75	去勢雄	3.0年
12	DM(ステージ4)	PWC	15.9	14.6	0.59	1.80	未避妊雌	3.3年
13	DM(ステージ1)	PWC	14.1	11.8	0.49	1.76	去勢雄	2ヵ月
14	DM(ステージ1)	PWC	12.7	13.6	0.55	1.75	去勢雄	3ヵ月
15	DM(ステージ1)	PWC	11.0	12.3	0.52	1.63	避妊雌	7ヵ月
16	DM(ステージ1)	PWC	10.8	16.8	0.63	1.69	避妊雌	3ヵ月
17	IVDH	パグ	11.7	6.1	0.33	1.22	去勢雄	3ヵ月
18	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	5.6	3.0	0.20	1.40	避妊雌	1.5ヵ月
19	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	9.8	4.6	0.25	1.54	未去勢雄	1ヵ月
20	IVDH	トイ・プードル	5.0	6.7	0.33	1.48	未去勢雄	11日
21	IVDH	トイ・プードル	15.7	3.1	0.20	1.18	未去勢雄	5ヵ月
22	IVDH	ミニチュア・シュナウザー	12.6	9.6	0.43	1.48	未去勢雄	2ヵ月
23	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	15.4	7.2	0.36	1.54	避妊雌	6日
24	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	7.0	9.7	0.43	1.64	未去勢雄	4日
25	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	3.6	5.2	0.29	1.28	避妊雌	3日
26	IVDH	雑種	11.7	3.4	0.20	1.00	去勢雄	5日
27	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	13.4	6.5	0.33	1.55	去勢雄	11日
28	IVDH	フレンチ・ブルドッグ	9.8	11.6	0.49	1.65	未避妊雌	2ヵ月
29	IVDH	トイ・プードル	12.3	3.4	0.20	1.46	未去勢雄	1ヵ月
30	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	5.0	3.4	0.20	1.25	未避妊雌	7日
31	IVDH	トイ・プードル	5.9	4.2	0.25	1.35	未去勢雄	15日
32	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	4.8	4.5	0.25	1.29	未避妊雌	2日
33	IVDH	フレンチ・ブルドッグ	7.2	12.8	0.52	1.66	去勢雄	1ヵ月
34	IVDH	パグ	9.7	7.7	0.36	1.27	避妊雌	1年
35	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	10.1	7.1	0.36	1.60	去勢雄	21日
36	IVDH	チワワ	6.1	5.1	0.29	1.49	未去勢雄	7日
37	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	10.4	9.5	0.43	1.67	去勢雄	2日
38	IVDH	ペキニーズ	2.6	5.5	0.29	1.13	未去勢雄	9日
39	IVDH	ミニチュア・ダックスフント	10.9	5.8	0.29	1.68	避妊雌	1ヵ月
40	IVDH	ボーダー・コリー	14.1	14.1	0.58	1.69	避妊雌	1年

DM,変性性脊髄症;IVDH,椎間板ヘルニア;PWC,ペンブローク・ウェルシ

ュ・コーギー

		体積(mm ³)または面積(mm ²)		相関関係						
	部位			体重		体表面積		L2椎体長		
		中央値	中央値 範囲		Р	r _s	Р	r _s	Р	
	Т8	15.311	13.837-17.299	0.681	0.060	0.718	0.052	0.312	0.218	
	Т9	15.429	13.439-17.674	0.761	0.037*	0.813	0.014*	0.602	0.083	
	T10	15.864	14.542-17.431	0.675	0.078	0.738	0.038*	0.418	0.332	
	T11	16.462	15.366-19.625	0.628	0.068	0.767	0.046*	0.298	0.524	
DRG体積	T12	16.852	14.670-18.813	0.612	0.221	0.578	0.197	0.332	0.982	
	T13	16.632	14.113-21.612	0.789	0.021*	0.774	0.028*	0.571	0.151	
	L1	16.686	13.491-22.393	0.712	0.064	0.783	0.034*	0.667	0.078	
	L2	16.963	13.213-21.343	0.467	0.243	0.612	0.083	0.588	0.167	
	T8-L2	16.263	14.589-18.635	0.691	0.037*	0.792	0.024*	0.612	0.176	
	T8	29.404	20.765-35.736	-0.132	0.756	-0.048	0.935	0.214	0.619	
脊髄横断面積	Т9	27.018	22.532-40.977	0.035	0.933	0.119	0.793	0.548	0.171	
	T10	29.088	19.169-41.861	-0.216	0.608	-0.143	0.752	0.238	0.582	
	T11	30.307	19.738-43.676	-0.048	0.910	0.024	0.977	0.333	0.428	
	T12	32.417	18.396-38.441	0.263	0.528	0.333	0.428	0.571	0.151	
	T13	32.365	21.924-39.569	-0.228	0.588	-0.167	0.703	0.095	0.840	
	L1	31.393	23.916-43.970	0.467	0.243	0.524	0.197	0.667	0.083	
	L2	31.413	19.162-45.487	-0.263	0.528	-0.124	0.619	-0.095	0.840	
	T8-L2	31.656	21.025-41.215	-0.048	0.911	0.124	0.812	0.571	0.151	

表 2-2 コントロール犬の DRG 体積または脊髄横断面積と体重,体表面積または L2 椎体長との相関関係

* P<0.05; DRG, 背根神経節

	却佔		対照	DM		IVDH		P 値			
	마꼬	中央値	範囲	中央値	範囲	中央値	範囲	3群間	対照 vs DM	対照 vs IVDH	DM vs IVDH
標準化DRG体積 (mm ³ /mm ²)	T8	31.841	23.744-51.879	19.079	15.891-35.434	42.604	20.225-72.484	0.012*	0.155	1	0.009**
	Т9	28.783	23.116-51.924	20.658	15.042-28.717	41.008	21.178-79.567	0.004**	0.038*	0.510	0.003**
	T10	30.808	25.073-50.155	20.943	15.008-26.586	38.804	21.391-81.383	0.003**	0.042*	0.858	0.003**
	T11	31.608	24.592-50.220	21.191	13.516-29.705	38.841	21.257-78.559	0.011*	0.071	1	0.010*
	T12	33.454	23.287-53.799	19.653	15.170-31.544	37.888	14.213-86.772	0.028*	0.071	1	0.035*
	T13	31.539	24.292-49.628	19.297	14.676-26.998	40.683	12.657-84.264	0.028*	0.093	1	0.031*
	L1	30.557	25.384-46.635	20.339	15.889-37.391	35.964	19.987-87.816	0.032*	0.155	1	0.041*
	L2	33.220	24.800-45.706	20.205	16.681-34.739	41.609	22.413-72.602	0.008**	0.045*	1	0.007**
	T8-L2	31.727	24.384-49.993	20.373	15.763-29.882	39.360	19.436-79.480	0.002**	0.011*	0.510	0.002**

表 2–3 DM 群, IVDH 群および対照群における標準化 DRG 体積の比較

* P<0.05, ** P<0.01; DRG, 背根神経節; DM, 変性性脊髄症; IVDH, 椎間板ヘルニア



図 2-1 従来の MRIと WE 法による L1 椎体レベルの DRG の描出(症例 No. 12)

従来の MRI による横断像では, T1 強調画像(A), T2 強調画像(B) および FLAIR 画像(C) から DRG を明瞭に描出できない。一方, WE 法(D) では神 経根および DRG を明瞭に描出できた(矢印)。

MRI, 磁気共鳴画像; WE, 水選択励起; FLAIR, fluid attenuated inversion recovery; DRG, 背根神経節



図 2-2 DRG の連続スライス WE 画像(症例 No. 8)

横断像における DRG 体積の測定法を示した。脊髄から神経根が出て(A),尾 側で DRG を通過し(B),椎間孔へと進入する(C)。DRG は脊髄からの突出 部から椎間孔への進入部までの ROI を手動で設定し(D–F),囲まれた範囲内 の断面積とスライス幅から体積が算出された。

DRG, 背根神経節;WE, 水選択励起;ROI, 関心領域



図 2-3 WE 画像におけるコントロール(症例 No. 8), DM(症例 No. 12)および IVDH 発症犬(症例 No. 38)の冠状断および横断像

WE 法による冠状断像(A–C)からは神経根および DRG が明瞭に描出された。 横断像(D–F)は T10 椎体レベルの DRG を示した。DRG 体積はコントロール 犬で正常であったが(A, D), DM 発症犬では萎縮していた(B, E)。IVDH 発症部位では DRG の萎縮(矢印; C, F)を認めた。

WE,水選択励起;DM,変性性脊髄症;IVDH,椎間板ヘルニア,DRG,背根神経節



図 2-4 DM 群, IVDH 群および対照群における標準化平均 DRG の比較 T8-L2 椎体レベルにおける各 DRG の平均値を標準化し,3 群間で比較した。 DM 群の標準化平均 DRG は対照群 (*P*=0.011) および IVDH 群 (*P*=0.002) と 比較すると,いずれも有意に低値を示した。

DM,変性性脊髄症; IVDH,椎間板ヘルニア, DRG,背根神経節

第3章

イヌの変性性脊髄症における傍脊柱筋群の変化の解析

背景

第1章および第2章では DM 発症犬における脊髄の変性および DRG の萎縮 を, MRI 装置を用いて定量化し, DM との鑑別診断が重要な IVDH 犬との比 較解析を行った。解析の結果, DM 特異的な脊髄の変性および DRG の萎縮を定 量化できることがわかったが, DTI や WE 法を用いた解析を臨床現場に導入す るには,それぞれの MRI 装置に適した新たなプロトコルの構築や撮像時間の延 長による動物への負担などの問題がある。一方,従来の撮像技術では DM 発症 犬の脊髄に診断的な変化は検出できない (17,62)。そこで従来の撮像技術を用 いて DM に診断的な変化を神経以外の組織で検出できれば,広く普及可能な DM の診断手法を確立できると考えた。

DM 発症犬の骨格筋では、筋線維の萎縮および変性が認められる(4,17,41, 55)。DM 発症犬における骨格筋の萎縮は、脊髄の変性に起因する神経原性萎縮 と考えられていた。一方、DM 発症犬の病初期では、肋間筋および橈側手根伸筋 における神経筋接合部の解剖学的な異常はないと報告されている(41,55)。ま た、健常犬では橈側手根伸筋における筋線維のほとんどが II 型筋線維(速筋) であったのに対し、病初期の DM では I 型筋線維(遅筋)の割合が著しく増加 し、さらに、病期が進行するにつれてその割合がさらに増加することが明らかと なった(41)。加えて,病初期では健常犬と比較すると肋間筋および橈側手根伸筋における筋線維の断面積が有意に増加し,さらに,健常犬および病後期と比較して肥大した筋線維数が有意に増加すると報告されいる(41,55)。これらのことから,DM発症早期の肋間筋および橈側手根伸筋における筋線維の変性は,筋原性に生じた可能性が示唆された。

現在、人医療では骨格筋の変性を明瞭に描出するため、 MRI 装置を用いた 研究が広く行われている。MRI は筋のサイズや構造の評価手法として正確性お よび信頼性が高い検査とみなされている(8,68,75)。また、MRI は除神経や末 梢神経傷害に起因する筋の変性を信号強度の変化で捉えることができる(7,10, 42)。DM の類似疾患であるヒトの ALS では、T1 強調画像における傍脊柱筋の 信号強度が廃用性筋萎縮に伴う筋内への脂肪浸潤により増加するため、傍脊柱 筋の T1 強調画像は ALS と他の疾患を鑑別するための定性的評価法として注目 されている(20)。さらに、T1 強調画像における傍脊柱筋群の信号強度は筋間脂 肪で除することにより定量化できると報告されている(37,60) ことから、病初 期から骨格筋の変性を認める DM では傍脊柱筋群の MRI 検査によって筋の信 号強度の変化を捉えることができるのではないかと考えた。

そこで第 3 章では,DM 発症早期,DM 発症後期および対照犬を用いて T1 強調画像における傍脊柱筋の信号強度および筋断面積を比較した。さらに,DM

の発症期間と傍脊柱筋の信号強度および断面積との関連性を解析した。本研究 の仮説は、3.0 テスラ MRI 装置による T1 強調画像は傍脊柱筋群を明瞭に描出 し、傍脊柱筋群は DM 発症早期から廃用性筋萎縮に伴う筋内への脂肪浸潤によ り信号強度が増加し、I 型筋線維への置換および廃用性筋萎縮によって筋断面積 が減少する、であった。

材料および方法

動物福祉

本研究は岐阜大学応用生物科学部動物実験審査委員会および動物臨床試験倫 理専門委員会で審査を受け、承認されたものであり(承認番号:E20005および 2020-230)、組み入れ症例はいずれも飼い主に研究趣旨を説明し、インフォーム ド・コンセントを得た。

供試動物

DM および対照犬の T1 強調画像を解析するために,2019 年 8 月から 2021 年 6 月までに岐阜大学附属動物病院を来院した DM 発症早期 PWC(早期 DM 群), DM 発症後期 PWC(後期 DM 群)およびコントロール犬(対照群)を調査対象 とした。対照群には画像取得時に脊髄疾患の臨床症状および画像検査のよる脊 髄の異常所見が認められない犬を組み入れた。まず,対照群の犬を用いて傍脊柱 筋群(多裂筋,最長筋,腸肋筋)の信号強度および断面積の標準化を行った。次 に,早期 DM 群,後期 DM 群および対照群の 3 群間における傍脊柱筋群の信号 強度および断面積を比較した。両解析に用いた対照群は同じ犬を用いた。DM 発 症犬は,1)臨床症状として,後肢から始まる無痛性の進行性麻痺を呈すること, 2) SOD1 遺伝子検査により変異型ホモ接合体 (*c.118G>A*) であること,およ び 3) 脊髄の MRI 検査および CSF 検査において麻痺の原因となる器質的な 病変が認められないことの 3 点の診断基準を満たし,臨床的に DM と診断した 症例を組み入れた (16, 17)。 脊髄圧迫病変を認めた場合においても,DM に 特徴的な進行性の臨床症状を少なくとも 1 年以上認めた場合は DM 群に組み入 れた。DM のステージ分類は既報を基に,ステージ 1:後肢における歩行可能な 運動失調または UMN 性不全麻痺,ステージ 2:後肢における LMN 性麻痺,ス テージ 3:前肢の LMN 性麻痺による負重維持が可能な前肢の虚弱,ステージ 4: 四肢の完全麻痺の 4 ステージに分類した (17)。早期 DM 群には DM ステージ 1 および 2 を,後期 DM 群には DM ステージ 3 および 4 を組み入れた。DM の 診断基準を満たさない,頭蓋内疾患,脊椎または脊髄腫瘍,髄内または硬膜内髄 外病変を有する犬は除外した。

MRI 検査

全ての MRI 検査は 8 チャンネルコイルを搭載した 3.0 テスラ MRI 装置 (Achieva dStream, Philips, Amsterdam, Netherland)を使用した。MRI 検査 中の全身麻酔はプロポフォール (PROPOFOL injection, Fuji Pharma Co., Ltd., Toyama, Japan)の静脈内注射により麻酔導入後,気管挿管し,人工呼吸器で呼

吸を制御しながらイソフルラン(Isoflurane, Pfizer Inc., New York, U.S.A.)で 維持した。全ての画像は仰臥位で, 横断および矢状断像が撮像された。傍脊柱筋 の信号強度および断面積を評価するために, T9–T10 および L2–L3 椎間板レベ ルにおける横断面の T1 強調画像を取得した。T1 強調画像(TR/TE 570/13.8 msec; スライス幅 1.5 mm), T2 強調画像(TR/TE 3113/90 msec; スライス幅 1.5 mm), および 0.1 mmol/kg のガドジアミド水和物(OMNISCAN, Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan)の静脈注射による造影 T1 強調画像を取得した。

画像解析

画像データは OsiriX MD version 4.1.2 (OsiriX Pixmeo, Geneva, Switzerland) で解析した。全画像データは共同研究者によって匿名化され,著 者および共同研究者によって 2 回測定が行われた。筋信号強度の測定は過去の 報告を基に一部修正して行なった (24)。傍脊柱筋群の解析には,T9 および L3 椎体レベルの多裂筋,最長筋および腸肋筋を用いた。各筋の信号強度および断面 積の測定には画像解析ソフト (ImageJ, ver. 1.48; NIH, Bethesda, MD) を用い た。傍脊柱筋群の信号強度および断面積は,T1 強調画像の横断面で手動により 各筋を選択し,囲まれた範囲から算出された (図 3–1)。本研究の測定はすべて 左右ともに 2 回ずつ行い,それぞれの平均値を解析に用いた。各筋の信号強度 を標準化するために, 多裂筋--最長筋間の筋間脂肪の信号強度を測定した。また, 各筋の断面積を標準化するために, L2の椎体長, 椎体幅および頭側の椎体終板 の断面積(L2 断面積)を測定した。

統計解析

統計解析は Easy R ソフトウェア(40)を用いた。測定値について、観察者 間の信頼性は級内相関係数(intraclass correction coefficients:ICC)を用いて 評価した。対照群について,T9 および L3 椎体レベルの各筋における信号強度 または断面積と筋間脂肪または L2 椎体長, L2 椎体幅および L2 断面積との相 関関係をそれぞれ Spearman の順位相関係数を用いて解析した。標準化された 各筋の信号強度および断面積について、早期 DM 群、後期 DM 群および対照群 の3群間を Kruskal-Wallis 検定を用いて比較した。事後解析は Bonferroni 補 正後 Mann-Whitney U検定を行った。さらに、標準化された各筋の信号強度お よび断面積について、DM 発症期間との相関関係を Spearman の順位相関係数 を用いて解析した。発症期間は飼い主が最初に臨床症状を確認した日から MRI 撮像した日までとした。全ての解析は P 値 <0.05 で有意差ありとみなした。ICC は>0.7 で信頼性が高いと定義した。相関係数(rs)は>0.7 で強い相関, 0.5-0.7 で中等度の相関と定義した。

結果

供試動物

本研究に組み入れた症例を表1にまとめた。対照群には6頭を組み入れた。2 頭は岐阜大学所有の研究用犬, 4 頭は飼い主所有の犬であった。4 頭は避妊雌, 2頭は去勢雄であった。犬種はビーグルが2頭,雑種が2頭,PWCが1頭,フ レンチ・ブルドッグが1頭であった。対照群の年齢中央値,体重中央値,L2 椎 体長中央値,L2 椎体幅中央値およびL2 断面積中央値はそれぞれ 6.6 歳(範囲: 2.9–13.3 歳), 11.4 kg (範囲: 6.6–14.0 kg), 1.55 cm (範囲: 1.43–2.10 cm), 1.47 cm(範囲:1.38–1.99 cm)および 1.05 cm²(範囲:0.64–2.14 cm²)であ った。6 頭全てで MRI 撮像時に神経症状は認めなかった。研究用犬のうち1 頭 は神経症状を示さず、MR 画像において中枢神経系に構造的病変を認めなかっ た。1 頭は過去に特発性てんかんと診断されており、MRI 実施時には神経症状 を示さず、中枢神経系に構造的病変を認めなかった。飼い主所有の犬のうち4頭 全てで一過性の四肢運動失調の既往歴を有するものの, MR 画像において中枢 神経系に構造的病変を認めなかった。DM 群には 13 頭の PWC を組み入れた。 早期 DM 群のうちステージ1は7頭, ステージ2は2頭であった。3頭は避妊 雌,1頭は未避妊雌,4頭は去勢雄,1頭は未去勢雄であった。犬種は9頭全て

PWC であった。早期 DM 群の年齢中央値,体重中央値,L2 椎体長中央値,L2 椎体幅中央値および L2 断面積中央値はそれぞれ 11.2 歳 (範囲: 9.5–14.2 歳), 12.6 kg (範囲: 8.4–16.8 kg), 1.66 cm (範囲: 1.44–1.93 cm), 1.92 cm (範囲: 1.28-2.43 cm) および 1.88 cm² (範囲: 0.62-2.89 cm²) であった。後期 DM 群 の4頭はいずれもステージ4であった。ステージ4の4頭は全て死後24時間 以内に MRI を実施した後に剖検を行い,病理組織学的検査で DM と確定診断が 下された。1 頭は未避妊雌,3 頭は去勢雄であった。犬種は 4 頭全て PWC であ った。後期 DM 群の年齢中央値,体重中央値,L2 椎体長中央値,L2 椎体幅中 央値および L2 断面積中央値はそれぞれ 14.7 歳(範囲:13.0–15.8 歳), 12.4 kg (範囲:10.1–15.6 kg), 1.69 cm (範囲:1.68–1.92 cm), 1.78 cm (範囲:1.46– 2.00 cm) および 1.74 cm² (範囲: 0.86-2.09 cm²) であった。年齢, 体重, L2 椎体長,L2 椎体幅および L2 断面積について,それぞれ 3 群間に有意差を認め なかった。

観察者間の信頼性

各群における T9 および L3 における傍脊柱筋群の T1 強調画像は図 3-2 に示 した。各筋の信号強度,断面積,L2 椎体長,L2 椎体幅および L2 断面積につい て,ICC は全て 0.7 以上であったため,観察者間の信頼性は高いと判断された。 したがって、本研究で用いる測定値は全て 2 観察者による測定値の平均値を使 用した。

筋の信号強度および断面積の標準化

T9 または L3 の各筋の信号強度および断面積について、左右差を認めなかっ たため、以下の解析には左右の平均値を用いた。各部位の筋信号強度と筋間脂肪 との相関関係および筋断面積と L2 椎体長、L2 椎体幅および L2 断面積信号強 度との相関関係について表 3・2 に示した。T9 における筋間脂肪は多裂筋 (*rs*=0.755, *P*=0.049)および最長筋 (*rs*=0.812, *P*=0.019)と強い正の相関を示 した。また、L3 における筋間脂肪は多裂筋 (*rs*=0.928, *P*=0.008)と強い正の相 関を示した。一方、断面積について、T9 における各筋は L2 椎体長、L2 椎体幅 および L2 断面積との間に有意な相関関係は認められなかったものの、L2 椎体 長は L3 における多裂筋 (*rs*=0.812, *P*=0.049)、最長筋 (*rs*=0.928, *P*=0.008)お よび腸肋筋 (*rs*=0.928, *P*=0.008)と強い正の相関を示した。したがって、3 グル ーブ間の比較を行うために、筋の信号強度は筋間脂肪で除して標準化し、筋の断 面積は L2 椎体長で除して標準化した。

標準化筋信号強度の比較

各部位の標準化筋信号強度における3群間の比較についての結果は図3-3に 示した。T9 多裂筋の標準化信号強度について,対照群(中央値, 0.293;範囲, 0.232-0.332)は早期 DM 群(中央値, 0.356;範囲, 0.243-0.518)および後期 DM 群(中央値, 0.568; 範囲, 0.340-0.639)と比較すると、いずれも有意に低 値を示した(P=0.014 および 0.029)。T9 最長筋の標準化信号強度について、後 期 DM 群(中央値, 0.430;範囲, 0.361-0.453) は対照群(中央値, 0.216;範 囲, 0.190-0.253) および早期 DM 群(中央値, 0.244; 範囲, 0.179-0.412) と 比較すると、いずれも有意に高値を示した(P=0.029 および 0.017)。T9 腸肋筋 の標準化信号強度について、後期 DM 群(中央値, 0.494;範囲, 0.482-0.623) は対照群(中央値, 0.300;範囲, 0.268–0.328)および早期 DM 群(中央値, 0.346;範囲, 0.251-0.459)と比較すると、いずれも有意に高値を示した(P=0.029 および 0.008)。また、L3 多裂筋の標準化信号強度について、後期 DM 群(中央 値, 0.4544;範囲, 0.498-0.818) は対照群(中央値, 0.288;範囲, 0.222-0.361) および早期 DM 群(中央値, 0.320; 範囲, 0.218-0.425)と比較すると、いず れも有意に高値を示した(P=0.008 および 0.029)。L3 最長筋の標準化信号強度 について、後期 DM 群(中央値、0.700;範囲、0.589-0.817)は対照群(中央 値, 0.352 ; 範囲, 0.218–0.442) および早期 DM 群 (中央値, 0.418 ; 範囲, 0.264– 0.550)と比較すると、いずれも有意に高値を示した(P=0.008 および 0.029)。

L3 腸肋筋の標準化信号強度について, 後期 DM 群 (中央値, 0.817; 範囲, 0.673– 0.896) は対照群 (中央値, 0.445; 範囲, 0.243–0.541) および早期 DM 群 (中 央値, 0.482; 範囲, 0.249–0.679) と比較すると, いずれも有意に高値を示した (*P*=0.029 および 0.008)。

標準化筋断面積の比較

各部位の標準化筋断面積における 3 群間の比較についての結果は図 3-4 に示 した。T9 多裂筋の標準化断面積について,早期 DM 群 (中央値, 0.432 cm²/cm; 範囲, 0.234-0.693 cm²/cm) は対照群 (中央値, 0.211 cm²/cm; 範囲, 0.165-0.267 cm²/cm) と比較すると有意に高値を示した (*P*=0.002)。T9 最長筋の標 準化断面積について,後期 DM 群 (中央値, 0.403 cm²/cm; 範囲, 0.243-0.572 cm²/cm) は対照群 (中央値, 0.878 cm²/cm; 範囲, 0.260-1.452 cm²/cm) と比 較すると有意に低値を示した (*P*=0.008)。L3 最長筋の標準化断面積について, 後期 DM 群 (中央値, 0.403 cm²/cm; 範囲, 0.243-0.572 cm²/cm) は対照群 (中央値, 0.878 cm²/cm; 範囲, 0.260-1.452 cm²/cm) と比較すると有意に低 値を示した (*P*=0.008)。L3 腸肋筋の標準化断面積について,早期 DM 群 (中 央値, 0.791 cm²/cm; 範囲, 0.534-1.230 cm²/cm) は後期 DM 群 (中央値, 0.365 cm²/cm; 範囲, 0.221-0.477 cm²/cm) と比較すると有意に高値を示した
(P=0.008)。L3 腸肋筋の標準化断面積についても同様に、早期 DM 群(中央値、1.248 cm²/cm;範囲、0.883-1.720 cm²/cm)は後期 DM 群(中央値、0.566 cm²/cm;範囲、0.411-0.588 cm²/cm)と比較すると有意に高値を示した

(P=0.008)。T9 腸肋筋および L3 多裂筋の標準化断面積についてはいずれも 3 群間で有意差を認めなかった。

筋の信号強度および断面積と DM 発症期間との関連

T9 において,DM 発症期間は標準化多裂筋 (*rs*=0.555, *P*=0.049),最長筋 (*rs*=0.639, *P*=0.019) および腸肋筋信号強度 (*rs*=0.619, *P*=0.024) と中等度の 正の相関を示した (表 3–3,図 3–5)。一方,DM 発症期間と標準化多裂筋,最長 筋および腸肋筋断面積との間に有意な相関関係を認めなかった。L3 においては DM 発症期間と各筋の信号強度および断面積との間に有意な相関関係を認めな かった (表 3–3)。

DM 発症犬の病理組織学的特徴として, 骨格筋である腓腹筋, 肋間筋および橈 側手根伸筋の萎縮が報告されている(4, 17, 41, 55)。同じく骨格筋である傍脊 柱筋群については病理組織学的検査所見の報告はないが, DM の病期の進行と ともに外貌上, 筋量の喪失を認める。しかし, 生前に傍脊柱筋群の病理組織学的 検査を実施することは, 侵襲性が高いために困難である。本研究結果から, 非侵 襲的に実施できる 3.0 テスラ MRI 装置で得られる T1 強調画像から, DM 発症 犬の傍脊柱筋群における信号強度および断面積の変化を検出できる可能性が示 された。ALS の研究では, MRI による傍脊柱筋群の評価は, 健常者や類似疾患 罹患患者との鑑別に役立つ可能性があると報告されている(20)。従来の MRI 撮 像技術では DM を診断できなかったが, 傍脊柱筋群における MRI 検査は単一の 筋や深部の筋を非侵襲的に評価できるため, MRI 検査による傍脊柱筋の評価は DM の生前診断法に寄与できる可能性が示された。

T9 椎体レベルの T1 強調画像において早期 DM 群の多裂筋は対照群と比較す ると,高い信号強度を示した。犬の多裂筋は脊髄神経背側枝側枝により神経支配 されており,最長筋および腸肋筋は脊髄神経背側枝外側枝により神経支配され ている(26)。過去の DM の研究では,T8 脊髄背根神経における軸索数の減少

と DRG 神経細胞の変性が報告されている(56)。また、第2章で明らかになっ たように、MRI 上での尾側胸部の DRG は DM 発症早期からの体積減少が考え られる(58)。一方, DM 発症早期の T8 脊髄腹根神経における軸索数や軸索径 は減少しないことが知られている(56)。さらに、骨格筋である橈側手根伸筋に おける神経筋接合部では神経終末と筋組織との接触の喪失を認めなかった(41)。 対照的に,DM 発症早期から橈側手根伸筋における筋の分布は速筋である II 型 筋線維が減少し、遅筋であるI型筋線維が増加していた(41)。これらの結果か ら, DM 発症早期における骨格筋の変性は, 除神経に続発したものではなく, 筋 原性変化が生じていることが示唆された。さらに, I型筋線維の T1 緩和時間は Ⅱ 型筋線維と比較すると,有意に短縮する(47)ことを鑑みると,早期 DM 群 における多裂筋の信号強度の増強は、DM 発症早期からの I 型筋線維の増加を 反映している可能性が高い。この仮説を証明するために、今後、DM 発症犬の筋 の信号強度と病理組織学的検査所見との関連性を明らかにする必要がある。

一方,最長筋と腸肋筋の信号強度では早期 DM 群と対照群との間に有意差を 認めなかった。最長筋と腸肋筋は脊柱起立筋に分類される。齧歯類の研究では, 尾側胸部における多裂筋は頭側腰部の多裂筋および胸腰部の脊柱起立筋と比較 すると,II 型筋線維の含有量が多いことが知られている(33)。また,一般的に 骨格筋における筋線維の分布パターンは,犬を含む四足歩行の哺乳類で同様で

あると考えられている(12,33,85)。これらの結果から,犬の尾側胸部におけ る多裂筋は頭側腰部の多裂筋,さらに胸腰部の最長筋および腸肋筋と比較して II 型筋線維の含有量が多い可能性が推測できる。したがって,DM 発症早期の T9 における多裂筋では I 型筋線維に置き換わった II 型筋線維の割合が,他の筋 と比較して高い可能性が考えられ,早期 DM 群の方が対照群よりも有意に高い 信号強度を認めたのではないかと考えられた。

本研究では,廃用性筋萎縮によって,DM 発症早期から筋断面積の減少を認め ると仮説したが,早期 DM 群における T9 の多裂筋断面積は対照群と比較して 有意に高値を示した。興味深いことに,DM 発症早期の PWC では DM 発症後 期や対照犬と比較して線維径が太い骨格筋線維数が増加することが報告されて いる(41,55)。DM 発症早期の PWC における線維径が太い骨格筋線維数の増 加が,本研究における T9 多裂筋断面積の増加に関連していると予想される。

後期 DM 群の T9 における最長筋および腸肋筋,さらに L3 における多裂筋, 最長筋および腸肋筋の信号強度は早期 DM 群と比較すると,有意に高値を示し た。また,後期 DM 群の T9 における最長筋,L3 における最長筋および腸肋筋 の断面積は早期 DM 群と比較すると,有意に低値を示した。DM ステージ 4 の 臨床症状は LMN 性四肢麻痺および脳幹症状であり,さらに広範囲にわたる重 度の筋肉量の減少を認める(16,17)。過去の報告で,筋肉量の減少は廃用性筋

萎縮が原因と報告されている(3,16,29)。一般的に、ヒトの脊髄損傷患者の場合、廃用性筋萎縮を認めた筋内への脂肪浸潤が生じる(21,28)。したがって、 DM 発症後期における胸腰部傍脊柱筋群の信号強度の増加および断面積の低下 は、筋内脂肪浸潤と廃用性筋萎縮による筋量の喪失により生じたと考えられた。

本研究の制限事項として以下の点が挙げられる。1 点目は, DM 群において, DM の早期ステージと後期ステージを比較するために、4 頭は死後に T1 強調画 像を取得した点である。DM 発症後期の症例では呼吸障害を患うため, 全身麻酔 を実施することは倫理的に不可能である。したがって, DM 後期症例として死亡 直後の症例を用いた。死後 MRI について、ヒトの報告では、死後の中枢神経系 の変化について,脳の微小出血を生前と死後の MRI で比較すると,同等の画像 が得られることが報告されている(31)。本研究では死後の影響を最小限に抑え るために, 死亡直後から飼い主によって遺体は保冷剤で冷却され, 死後24時間 以内に T1 強調画像が得られた。死後の変化が病理組織学的変化および T1 強調 画像に影響を及ぼす可能性があるためさらなる検討が必要である。3 点目は, T1 強調画像と病理組織学的検査所見との相関関係が調査されていない点である。 本研究では早期 DM 群のうち 9 頭全てが依然生存しているため、病理組織学的 検査による確定診断は得られていない。したがって,T1 強調画像と病理組織学 的検査所見との比較は不可能であった。4 点目は、DM 群はすべて PWC であっ

たことである。本邦における DM 発症犬は PWC が最も一般的である。その理 由として, DM 好発の他犬種の飼育頭数が欧米に比べ少ないことが考えられる。 最後に,サンプルサイズについてであり,本研究では後期 DM 群が特に少なか った。

本研究結果から,高磁場 MRI 装置による T1 強調画像の解析は,DM 発症犬 の傍脊柱筋における信号強度および断面積の変化を検出するための有用な検査 手法であることが明らかとなった。特に T9 の多裂筋における信号強度の増加お よび断面積の増加は,DM 発症早期の新たなバイオマーカーとなる可能性が示 された。

図表

表 3-1 供試動物

症例 No.	群	犬種	年齡(歳)	体重(kg)	性別	発症期間
1	対照	ビーグル	5.0	14.0	去勢雄	-
2	対照	ビーグル	5.9	13.5	避妊雌	-
3	対照	雑種	13.2	20.3	避妊雌	-
4	対照	雑種	2.8	10.6	去勢雄	-
5	対照	フレンチ・ブルドッグ	8.0	11.4	避妊雌	-
6	対照	PWC	10.9	10.7	避妊雌	-
7	早期 DM	PWC	11.2	11.0	去勢雄	8ヵ月
8	早期 DM	PWC	10.9	16.8	避妊雌	2ヵ月
9	早期 DM	PWC	13.5	12.9	去勢雄	6ヵ月
10	早期 DM	PWC	11.0	12.3	避妊雌	7ヵ月
11	早期 DM	PWC	14.2	11.8	去勢雄	2ヵ月
12	早期 DM	PWC	12.8	13.6	去勢雄	3ヵ月
13	早期 DM	PWC	9.5	16.0	未去勢雄	2ヵ月
14	早期 DM	PWC	12.7	12.6	未避妊雌	2ヵ月
15	早期 DM	PWC	10.2	8.4	避妊雌	1年
16	後期 DM	PWC	13.0	10.2	未去勢雄	3年
17	後期 DM	PWC	15.8	15.6	去勢雄	3年
18	後期 DM	PWC	15.3	10.1	未去勢雄	3.5年
19	後期 DM	PWC	14.1	14.6	未避妊雌	3.3年

DM,変性性脊髄症;PWC,ペンブローク・ウェルシュ・コーギー

表 3-2 筋信号強度と筋間脂肪信号強度との相関関係および筋断面積と L2 椎体長, L2 椎体幅および L2 断面積との相関関

係

	部位	ſ	信号強度		筋間脂肪との相関		断面積(cm ²)		L2椎体長との相関		L2椎体幅との相関		L2横断面積との相関	
		中央値	範囲	rs	P値	中央値	範囲	rs	P值	rs	P值	rs	P值	
	多裂筋	49.909	45.190-54.744	0.755	0.049*	0.339	0.293-0.471	0.696	0.125	0.086	0.919	0.429	0.419	
Т9	最長筋	51.165	45.305-57.885	0.812	0.019*	1.574	0.372-2.250	0.580	0.228	-0.086	0.919	0.257	0.658	
	腸肋筋	51.291	46.965-57.470	0.619	0.242	0.290	0.212-0.510	0.116	0.827	-0.413	0.803	-0.200	0.714	
	多裂筋	62.544	53.920-76.081	0.928	0.008**	0.610	0.333-1.021	0.812	0.049*	0.600	0.242	0.600	0.242	
L3	最長筋	20.800	12.086-39.554	0.661	0.078	0.990	0.370-2.074	0.928	0.008**	0.600	0.242	0.771	0.103	
	腸肋筋	22.989	15.279-43.935	0.424	0.149	2.324	0.750-4.123	0.928	0.008**	0.486	0.356	0.714	0.136	

* P<0.05, ** P<0.01; DM, 変性性脊髄症

Г			対照		早期DM		末期DM		P值				
		部位											
		비미고	中央値	範囲	中央値	範囲	中央値	範囲	3群間	対照 vs 早期DM	対照 vs 後期DM	早期DM vs 後期DM	
Γ		多裂筋	0.211	0.165-0.267	0.432	0.234-0.693	0.275	0.234-0.319	0.003*	0.002**	0.059	0.114	
	T9	最長筋	0.878	0.260-1.452	1.052	0.749-1.621	0.403	0.243-0.572	0.019*	0.672	0.513	0.008**	
		腸肋筋	0.172	0.148-0.357	0.242	0.170-0.373	0.188	0.159-0.322	0.191	0.260	1	1	
		多裂筋	0.371	0.233-0.514	0.488	0.290-0.668	0.323	0.201-0.450	0.156	0.540	0.320	1	
	L3	最長筋	0.637	0.259-1.178	0.791	0.534-1.230	0.365	0.221-0.477	0.021*	1	0.342	0.008**	
		腸肋筋	1.455	0.525-1.963	1.248	0.883-1.720	0.566	0.4110.588	0.013*	1	0.200	0.008**	

表 3-3 対照群,早期 DM 群および後期 DM 群における標準化傍脊柱筋群断面積の比較

* P<0.05, ** P<0.01; DM, 変性性脊髄症



図 3-2 T9 椎体レベルにおける傍脊柱筋群および筋間脂肪の測定(症例 No. 8)

T1 強調横断画像における傍脊柱筋群の信号強度および断面積の測定は、各筋の ROI を手動で設定し、囲まれた範囲内から

ヒストグラムが作成され,信号強度の平均値および断面積が算出された。黄色の ROI は多裂筋(A),青色の ROI は最長

筋(B),緑色のROIは腸肋筋(C)をそれぞれ示す。筋間脂肪は多裂筋と最長筋に囲まれた脂肪(赤色,D)を選択した。



図 3-1 対照(症例 No. 6),早期 DM(症例 No. 8)および後期 DM 犬(症例 No. 19)における T9 および L3 椎体レベル

の T1 強調画像

T1 強調画像から,対照犬(A,D)および早期 DM 犬(B,E)と比較して後期 DM 犬(C,F)は T9 および L3 椎体レベルにお

ける傍脊柱筋群の信号強度の増強および筋萎縮が認められる。

;DM, 変性性脊髄症



図 3-3 対照群,早期 DM 群および後期 DM 群における標準化傍脊柱筋群信号 強度の比較

早期 DM 群の T9 多裂筋信号強度は,対照群と比較すると有意に高値を示した (A)。また,後期 DM 群の T9 多裂筋信号強度は,対照群と比較すると有意に 高値を示した(A)。さらに,後期 DM 群の T9 最長筋(B),T9 腸肋筋(C), L3 多裂筋(D),L3 最長筋(E)および L3 腸肋筋(F)は,いずれも対照群 および早期 DM 群と比較すると,有意に高値を示した。

*P<0.05, **P<0.01; DM, 変性性脊髄症



図 3-4 対照群,早期 DM 群および後期 DM 群における標準化傍脊柱筋群断面 積の比較

早期 DM 群の T9 多裂筋断面積は, 対照群と比較すると有意に高値を示した(A)。 また,後期 DM 群の T9 最長筋(B),L3 最長筋(E),L3 腸肋筋(F)は,早 期 DM 群と比較すると,いずれも有意に高値を示した。T9 腸肋筋(C)および L3 多裂筋は 3 群間で有意差を認めなかった。

**P<0.01; DM, 変性性脊髄症



図 3-5 筋の信号強度と DM 発症期間との相関関係

各筋の信号強度について, T9 多裂筋(A), T9 最長筋(B) および T9 腸肋筋 (C) においてはいずれも DM 発症期間と中等度の相関関係を示した。一方, L3 多裂筋(A), L3 最長筋(B) および L3 腸肋筋(C) においてはいずれも有意 な相関関係を認めなかった。

DM, 変性性脊髄症

結論

イヌの DM は脊髄に発生する致死性かつ慢性進行性の神経変性疾患である。 DM 症例には SOD1 遺伝子のミスセンス変異が認められ, 脊髄神経細胞に SOD1 タンパクの凝集体が蓄積し, このことが脊髄の変性に関与していると考えられ ている。また, SOD1 遺伝子が変異型ホモ接合体であっても DM を発症しない 個体がいることが知られており, DM の確定診断は死後の病理組織学的検査に よってのみ行われる。さらに, DM の好発犬種である PWC は DM 発症早期と 臨床症状が類似する IVDH の併発が多いため, DM の仮診断を下すことさえ困 難となる場合がある。したがって, 本博士論文では DM の生前診断法を確立す ることを目的とした。

本博士論文の第1章では,DM 発症犬の胸腰髄におけるDTIを用いた定量的 画像検査法を開発することを目的とした。DM 発症犬,IVDH 罹患犬および健常 犬の胸腰髄からDTI データを集積し,ADC 値および FA 値を用いて定量的に解 析した。DM 発症犬のT8-L2 領域における ADC 値および FA 値は他の2群よ り低値を示し,特にT8-L3 領域の ADC 値は DM と IVDH の鑑別に有用である 可能性が示唆された。さらに,ADC 値は DM の発症期間と強い負の相関を示し た。本研究では IVDH を併発した DM 発症犬も含んでおり,DTI によって DM と IVDH とを生前に鑑別できる可能性が示唆された。近年,高磁場 MRI 装置が 獣医領域で徐々に普及しており,DTI は新たな DM の診断手法として,その有 用性が期待される。一方,IVDH による脊髄の DTI データへの影響が十分に検 証できていないため,DTI が広く利用されるためには IVDH の発症部位や発症 個数などとの関連性を調査しなければならない。

そこで第2章および第3章では、IVDHによる影響を避けるため、脊髄以外 の組織における変化に着目した。第2章では、DM発症犬における DRG の変化 に着目し、WE 法を用いた DRG の定量的解析法を開発することを目的に研究を 行なった。DM 発症犬,IVDH 罹患犬および健常犬の DRG を含んだ WE 画像 を撮像し,DRG 体積測定手法の確立および各群における DRG 体積の比較を行 なった。DRG 体積は体表面積と強い正の相関を示したため、DRG 体積は体表 面積で除することで標準化できることが明らかとなった。DM 発症犬における T8 から L2 までの標準化 DRG 体積の平均値は、他の 2 群より低値を示したも のの、DM 発症期間との相関関係は認められなかった。WE 法を用いることで DM 発症早期からの胸腰部 DRG の萎縮を定量的に描出できることが示され、 DM の生前診断に寄与する可能性が示された。一方, DRG 体積は DM 発症早期 と発症後期との相関を認めないことから,WE 法では DM における病期の進行 を推し測ることができなかった。

第3章では、DM の発症時期における傍脊柱筋群の変化を比較することを目 的とした。DM 発症早期、発症後期、健常犬の3群を用いて、T1強調画像から T9 および L3 の傍脊柱筋群における信号強度および断面積を比較した。DM 発 症早期における T9 の多裂筋は健常犬と比較して高信号を示し、さらに、断面積 の増加を認めた。DM 発症早期における骨格筋の II 型筋線維から I 型筋線維へ の変性に鑑みると、T9 の多裂筋における筋の変性が T1 強調画像上で描出でき た可能性がある。また、DM 発症早期から後期にかけての信号強度の増加と断面 積の減少は筋内への脂肪浸潤による高信号および廃用性筋萎縮による筋体積の 喪失による影響と考えられた。T1 強調画像における傍脊椎筋群の信号強度およ び断面積を解析することで、DM の生前診断および病期の進行度の把握を可能 にし、かつ、DM の早期診断に役立つ可能性が示唆された。

本研究では,DM 発症犬における病理組織学的特徴を非侵襲的に検出する方法として,高磁場 MRI 装置を用いた解析に着目した。胸腰髄の DTI において, DM 発症犬では ADC 値の低下が IVDH との鑑別に有用である可能性が明らか となった。また,WE 画像において,胸腰部の DRG 体積の減少が IVDH との 鑑別に有用である可能性を示すことができた。さらに,T1 強調画像において, DM 発症早期では T9 多裂筋の信号強度の増加および断面積の増加を認め,DM 発症後期では T9 および L3 の最長筋と L3 腸肋筋において信号強度の増加およ

び断面積の減少を認めたことから, T1 強調画像による傍脊柱筋群の評価は DM の生前診断および病期の進行度の把握を可能にし, DM の早期診断に役立つ可 能性が示唆された。以上のことから, 高磁場 MRI 装置を用いたこれらの解析は, 生前診断が確立していない DM において診断精度の向上に寄与できる可能性が 期待できる。

謝辞

本論文の作成にあたり,終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました岐阜大学 応用生物科学部准教授 神志那弘明先生,教授 前田貞俊先生に深く感謝を申し 上げます。

本論文の草稿をご校閲くださいました岐阜大学応用生物科学部教授 森崇先生, 鳥取大学農学部教授 森田剛仁先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたりご指導を賜りました,岩手大学農学部助教 中田浩平先生, 岐阜大学応用生物科学部教授 酒井洋樹先生,鹿児島大学共同獣医学部教授 大 和修先生,株式会社フィリップス・ジャパン 栃本剛様,岐阜大学応用生物科学 部助教 小畠結先生,岐阜大学応用生物科学部助教 岩田宗峻先生に深く感謝い たします。

DM 症例の MRI 撮像および献体にご協力いただいた飼い主の皆様,臨床獣医師の皆様,そして DM 発症犬および健常犬に深謝致します。

最後になりましたが,日頃より研究に際して多大なご協力をくださいました岐 阜大学獣医臨床放射線学研究室の学生の皆様および技術補佐員の皆様に心より 御礼申し上げます。

参考文献

 Aikawa, T., Fujita, H., Kanazono, S., Shibata, M. and Yoshigae, Y.
 (2012). Long-term neurologic outcome of hemilaminectomy and disk fenestration for treatment of dogs with thoracolumbar intervertebral disk herniation: 831 cases (2000-2007). J Am Vet Med Assoc. 241(12), 1617-26.

2) Atlasi, M. A., Mehdizadeh, M., Bahadori, M. H. and Joghataei, M. T. (2009). Morphological identification of cell death in dorsal root ganglion neurons following peripheral nerve injury and repair in adult rat. Iran Biomed J. 13(2), 65-72.

 Averill, D. R. (1973). Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. J Am Vet Med Assoc. 162(12), 1045-51.

Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C.,
 Taylor, J. F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P. A.,

Olby, N. J., Shelton, G. D., Khan, S., O'Brien, D. P., Lindblad-Toh, K. and Coates, J. R. (2009). Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(8), 2794-9.

5) Banaszek, A., Bladowska, J., Pokryszko-Dragan, A., Podemski, R. and Sąsiadek, M. J. (2015). Evaluation of the Degradation of the Selected Projectile, Commissural and Association White Matter Tracts Within Normal Appearing White Matter in Patients with Multiple Sclerosis Using Diffusion Tensor MR Imaging - a Preliminary Study. Pol J Radiol. 80, 457-63.

Banaszek, A., Bladowska, J., Szewczyk, P., Podgórski, P. and Sąsiadek,
M. (2014). Usefulness of diffusion tensor MR imaging in the assessment of
intramedullary changes of the cervical spinal cord in different stages of
degenerative spine disease. Eur Spine J. 23(7), 1523-30.

Bendszus, M., Koltzenburg, M., Wessig, C. and Solymosi, L. (2002).
 Sequential MR imaging of denervated muscle: experimental study. AJNR Am

J Neuroradiol. 23(8), 1427-31.

8) Beneke, R., Neuerburg, J. and Bohndorf, K. (1991). Muscle crosssection measurement by magnetic resonance imaging. Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 63(6), 424-9.

9) Bergamino, C., Hoey, S. E., de Swarte, M. and Skelly, C. (2019). Improved visualization of the lumbar spine nerve roots in dogs using water excitation (ProSet) as opposed to short tau inversion recovery: A retrospective study of two fat suppression MRI sequences. Vet Radiol Ultrasound. 60(3), 323-329.

10) Bredella, M. A., Tirman, P. F., Fritz, R. C., Wischer, T. K., Stork, A. and Genant, H. K. (1999). Denervation syndromes of the shoulder girdle: MR imaging with electrophysiologic correlation. Skeletal Radiol. 28(10), 567-72.

Budrewicz, S., Szewczyk, P., Bladowska, J., Podemski, R.,
 Koziorowska-Gawron, E., Ejma, M., Słotwiński, K. and Koszewicz, M. (2016).

The possible meaning of fractional anisotropy measurement of the cervical spinal cord in correct diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Neurol Sci. 37(3), 417-21.

12) Carlson, H. (1978). Histochemical fiber composition of lumbar backmuscles in the cat. Acta Physiol Scand. 103(2), 198-209.

13) Carrera, I., Richter, H., Meier, D., Kircher, P. R. and Dennler, M. (2015). Regional metabolite concentrations in the brain of healthy dogs measured by use of short echo time, single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3.0 Tesla. Am J Vet Res. 76(2), 129-41.

14) Chang, H. S., Kamishina, H., Mizukami, K., Momoi, Y., Katayama, M., Rahman, M. M., Uddin, M. M., Yabuki, A., Kohyama, M. and Yamato, O. (2013). Genotyping assays for the canine degenerative myelopathy-associated c.118G>A (p.E40K) mutation of the SOD1 gene using conventional and realtime PCR methods: a high prevalence in the Pembroke Welsh Corgi breed in Japan. J Vet Med Sci. 75(6), 795-8. 15) Choi, S., Song, Y., Lee, K., Lee, Y. and Choi, H. (2016). Multi-voxel magnetic resonance spectroscopy of cerebral metabolites in healthy dogs at 1.5 Tesla. J Vet Sci. 17(2), 217-24.

Coates, J. R., March, P. A., Oglesbee, M., Ruaux, C. G., Olby, N. J.,
Berghaus, R. D., O'Brien, D. P., Keating, J. H., Johnson, G. S. and Williams,
D. A. (2007). Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy
in Pembroke Welsh Corgi dogs. J Vet Intern Med. 21(6), 1323-31.

17) Coates, J. R. and Wininger, F. A. (2010). Canine degenerative myelopathy. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 40(5), 929-50.

18) Crisp, M. J., Beckett, J., Coates, J. R. and Miller, T. M. (2013). Canine degenerative myelopathy: biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. Exp Neurol. 248, 1-9. 19) D'Anjou, M.A. (2018). Principles of computed tomography and magnetic resonance imaging. Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology. St Louis, MI, Elsevier. 71.

20) Diamanti, L., Paoletti, M., Vita, U. D., Muzic, S. I., Cereda, C., Ballante, E. and Pichiecchio, A. (2020). MRI study of paraspinal muscles in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). J Clin Med. 9(4).

21) Elder, C. P., Apple, D. F., Bickel, C. S., Meyer, R. A. and Dudley, G. A. (2004). Intramuscular fat and glucose tolerance after spinal cord injury--a cross-sectional study. Spinal Cord. 42(12), 711-6.

22) Ellingson, B. M., Salamon, N., Grinstead, J. W. and Holly, L. T. (2014). Diffusion tensor imaging predicts functional impairment in mild-to-moderate cervical spondylotic myelopathy. Spine J. 14(11), 2589-97.

23) Ellingson, B. M., Salamon, N. and Holly, L. T. (2015). Advances in MR imaging for cervical spondylotic myelopathy. Eur Spine J. 24 Suppl 2, 197-

208.

24) Elliott, J. M., Galloway, G. J., Jull, G. A., Noteboom, J. T., Centeno, C. J. and Gibbon, W. W. (2005). Magnetic resonance imaging analysis of the upper cervical spine extensor musculature in an asymptomatic cohort: an index of fat within muscle. Clin Radiol. 60(3), 355-63.

Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W.,
Wright, D. E., Bennett, D. L., Bril, V., Russell, J. W. and Viswanathan, V.
(2019). Diabetic neuropathy. Nat Rev Dis Primers. 5(1), 41.

26) Forsythe, W. B. and Ghoshal, N. G. (1984). Innervation of the canine thoracolumbar vertebral column. Anat Rec. 208(1), 57-63.

27) Gatto, R. G., Li, W. and Magin, R. L. (2018). Diffusion tensor imaging identifies presymptomatic axonal degeneration in the spinal cord of ALS mice. Brain Res. 1679, 45-52. 28) Gorgey, A. S. and Dudley, G. A. (2007). Skeletal muscle atrophy and increased intramuscular fat after incomplete spinal cord injury. Spinal Cord. 45(4), 304-9.

29) Griffiths, I. R. and Duncan, I. D. (1975). Chronic degenerative radiculomyelopathy in the dog. J Small Anim Pract. 16(8), 461-71.

Grolez, G., Kyheng, M., Lopes, R., Moreau, C., Timmerman, K., Auger,
F., Kuchcinski, G., Duhamel, A., Jissendi-Tchofo, P., Besson, P., Laloux, C.,
Petrault, M., Devedjian, J. C., Pérez, T., Pradat, P. F., Defebvre, L., Bordet, R.,
Danel-Brunaud, V. and Devos, D. (2018). MRI of the cervical spinal cord
predicts respiratory dysfunction in ALS. Sci Rep. 8(1), 1828.

31) Haller, S., Montandon, M. L., Lazeyras, F., Scheffler, M., Meckel, S., Herrmann, F. R., Giannakopoulos, P. and Kövari, E. (2016). Radiologic-Histopathologic Correlation of Cerebral Microbleeds Using Pre-Mortem and Post-Mortem MRI. PLoS One. 11(12), e0167743. Hauger, O., Dumont, E., Chateil, J. F., Moinard, M. and Diard, F.
(2002). Water excitation as an alternative to fat saturation in MR imaging:
preliminary results in musculoskeletal imaging. Radiology. 224(3), 657-63.

33) Hesse, B., Fischer, M. S. and Schilling, N. (2010). Distribution pattern of muscle fiber types in the perivertebral musculature of two different sized species of mice. Anat Rec (Hoboken). 293(3), 446-63.

34) Ishikawa, C., Ito, D., Kitagawa, M. and Watari, T. (2016). Comparison of conventional magnetic resonance imaging and nonenhanced three dimensional time-of-flight magnetic resonance angiography findings between dogs with meningioma and dogs with intracranial histiocytic sarcoma: 19 cases (2010-2014). J Am Vet Med Assoc. 248(10), 1139-47.

35) Ishikawa, C., Ito, D., Tanaka, N. and Kitagawa, M. (2019). Use of three-dimensional time-of-flight magnetic resonance angiography at 1.5 Tesla to evaluate the intracranial arteries of 39 dogs with idiopathic epilepsy. Am J Vet Res. 80(5), 480-9. 36) Ishikawa, T., Asakura, K., Mizutani, Y., Ueda, A., Murate, K. I.,
Hikichi, C., Shima, S., Kizawa, M., Komori, M., Murayama, K., Toyama, H.,
Ito, S. and Mutoh, T. (2017). MR neurography for the evaluation of CIDP.
Muscle Nerve. 55(4), 483-9.

Jenkins, T. M., Alix, J. J. P., David, C., Pearson, E., Rao, D. G.,
Hoggard, N., O'Brien, E., Baster, K., Bradburn, M., Bigley, J., McDermott, C.
J., Wilkinson, I. D. and Shaw, P. J. (2018). Imaging muscle as a potential
biomarker of denervation in motor neuron disease. J Neurol Neurosurg
Psychiatry. 89(3), 248-55.

38) Johnson, P. J., Miller, A. D., Cheetham, J., Demeter, E. A., Luh, W. M., Loftus, J. P., Stephan, S. L., Dewey, C. W. and Barry, E. F. (2021). In vivo detection of microstructural spinal cord lesions in dogs with degenerative myelopathy using diffusion tensor imaging. J Vet Intern Med. 35(1), 352-62.

39) Johnston, P. E., Barrie, J. A., McCulloch, M. C., Anderson, T. J. and

Griffiths, I. R. (2000). Central nervous system pathology in 25 dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. Vet Rec. 146(22), 629-33.

40) Kanda, Y. (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant. 48(3), 452-8.

Katz, M. L., Jensen, C. A., Student, J. T., Johnson, G. C. and Coates,
J. R. (2017). Cervical spinal cord and motor unit pathology in a canine model
of SOD1-associated amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci. 378, 193-203.

Kikuchi, Y., Nakamura, T., Takayama, S., Horiuchi, Y. and Toyama, Y.
(2003). MR imaging in the diagnosis of denervated and reinnervated skeletal muscles: experimental study in rats. Radiology. 229(3), 861-7.

Kim, J. H., Trinkaus, K., Ozcan, A., Budde, M. D. and Song, S. K.
(2007). Postmortem delay does not change regional diffusion anisotropy characteristics in mouse spinal cord white matter. NMR Biomed. 20(3), 352-9.

44) Kobatake, Y., Sakai, H., Tsukui, T., Yamato, O., Kohyama, M., Sasaki, J., Kato, S., Urushitani, M., Maeda, S. and Kamishina, H. (2017). Localization of a mutant SOD1 protein in E40K-heterozygous dogs: Implications for noncell-autonomous pathogenesis of degenerative myelopathy. J Neurol Sci. 372, 369-78.

45) Kolasa, M., Hakulinen, U., Brander, A., Hagman, S., Dastidar, P., Elovaara, I. and Sumelahti, M. L. (2019). Diffusion tensor imaging and disability progression in multiple sclerosis: A 4-year follow-up study. Brain Behav. 9(1), e01194.

Konishi, Y., Satoh, H., Kuroiwa, Y., Kusaka, M., Yamashita, A., Asada,
Y. and Asanuma, T. (2017). Application of fiber tractography and diffusion tensor imaging to evaluate spinal cord diseases in dogs. J Vet Med Sci. 79(2), 418-24.

47) Kuno, S., Katsuta, S., Inouye, T., Anno, I., Matsumoto, K. and Akisada,

M. (1988). Relationship between MR relaxation time and muscle fiber composition. Radiology. 169(2), 567-8.

48) Lee, J. W., Kim, J. H., Park, J. B., Park, K. W., Yeom, J. S., Lee, G. Y. and Kang, H. S. (2011). Diffusion tensor imaging and fiber tractography in cervical compressive myelopathy: preliminary results. Skeletal Radiol. 40(12), 1543-51.

49) Lewis, M. J., Yap, P. T., McCullough, S. and Olby, N. J. (2018). The Relationship between Lesion Severity Characterized by Diffusion Tensor Imaging and Motor Function in Chronic Canine Spinal Cord Injury. J Neurotrauma. 35(3), 500-7.

March, P. A., Coates, J. R., Abyad, R. J., Williams, D. A., O'Brien, D.
P., Olby, N. J., Keating, J. H. and Oglesbee, M. (2009). Degenerative myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi dogs. Vet Pathol. 46(2), 241-50.

51) Martin, A. R., Aleksanderek, I., Cohen-Adad, J., Tarmohamed, Z.,

Tetreault, L., Smith, N., Cadotte, D. W., Crawley, A., Ginsberg, H., Mikulis, D. J. and Fehlings, M. G. (2016). Translating state-of-the-art spinal cord MRI techniques to clinical use: A systematic review of clinical studies utilizing DTI, MT, MWF, MRS, and fMRI. Neuroimage Clin. 10, 192-238.

52) McKay Hart, A., Brannstrom, T., Wiberg, M. and Terenghi, G. (2002). Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. Exp Brain Res. 142(3), 308-18.

Miller, A. D., Barber, R., Porter, B. F., Peters, R. M., Kent, M., Platt,
S. R. and Schatzberg, S. J. (2009). Degenerative myelopathy in two Boxer
dogs. Vet Pathol. 46(4), 684-7.

Moon, H. S., Kim, Y. D., Song, B. H., Cha, Y. D., Song, J. H. and Lee,
M. H. (2010). Position of dorsal root ganglia in the lumbosacral region in patients with radiculopathy. Korean J Anesthesiol. 59(6), 398-402.

Morgan, B. R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Bujnak, A. C. and Katz,
M. L. (2013). Characterization of intercostal muscle pathology in canine degenerative myelopathy: a disease model for amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res. 91(12), 1639-50.

Morgan, B. R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Shelton, G. D. and Katz,
M. L. (2014). Characterization of thoracic motor and sensory neurons and spinal nerve roots in canine degenerative myelopathy, a potential disease model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res. 92(4), 531-41.

57) Nair, G., Carew, J. D., Usher, S., Lu, D., Hu, X. P. and Benatar, M. (2010). Diffusion tensor imaging reveals regional differences in the cervical spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. Neuroimage. 53(2), 576-83.

58) Naito, E., Nakata, K., Nakano, Y., Nozue, Y., Kimura, S., Sakai, H., Yamato, O., Islam, M. S., Maeda, S. and Kamishina, H. (2021). Changes of Dorsal Root Ganglion Volume in Dogs with Clinical Signs of Degenerative Myelopathy Detected by Water-Excitation Magnetic Resonance Imaging.
Animals (Basel) 11(6).

59) Nakamae, S., Kobatake, Y., Suzuki, R., Tsukui, T., Kato, S., Yamato,
O., Sakai, H., Urushitani, M., Maeda, S. and Kamishina, H. (2015).
Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in
canine degenerative myelopathy. Neuroscience. 303, 229-40.

60) Ogawa, M., Lester, R., Akima, H. and Gorgey, A. S. (2017).

Quantification of intermuscular and intramuscular adipose tissue using magnetic resonance imaging after neurodegenerative disorders. Neural Regen Res. 12(12), 2100-5.

Ogawa, M., Uchida, K., Park, E. S., Kamishina, H., Sasaki, J., Chang,
H. S., Yamato, O. and Nakayama, H. (2011). Immunohistochemical observation of canine degenerative myelopathy in two Pembroke Welsh Corgi dogs. J Vet Med Sci. 73(10), 1275-9.

62) Okada, M., Kitagawa, M., Kanayama, K., Yamamura, H. and Sakai,

T. (2009). Negative MRI findings in a case of degenerative myelopathy in a dog. J S Afr Vet Assoc. 80(4), 254-6.

Oyake, K., Kobatake, Y., Shibata, S., Sakai, H., Saito, M., Yamato, O.,
Kushida, K., Maeda, S. and Kamishina, H. (2016). Changes in respiratory
function in Pembroke Welsh Corgi dogs with degenerative myelopathy. J Vet
Med Sci. 78(8), 1323-7.

64) Patzig, M., Bochmann, K., Lutz, J., Stahl, R., Küpper, C., Liebig, T., Reilich, P. and Dieterich, M. (2019). Measurement of structural integrity of the spinal cord in patients with amyotrophic lateral sclerosis using diffusion tensor magnetic resonance imaging. PLoS One. 14(10), e0224078.

65) Pierpaoli, C. and Basser, P. J. (1996). Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy. Magn Reson Med. 36(6), 893-906.

66) Querin, G., El Mendili, M. M., Lenglet, T., Delphine, S., Marchand-Pauvert, V., Benali, H. and Pradat, P. F. (2017). Spinal cord multi-parametric magnetic resonance imaging for survival prediction in amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurol. 24(8), 1040-6.

67) Rosen, D. R. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature. 364(6435), 362.

Samagh, S. P., Kramer, E. J., Melkus, G., Laron, D., Bodendorfer, B.
M., Natsuhara, K., Kim, H. T., Liu, X. and Feeley, B. T. (2013). MRI quantification of fatty infiltration and muscle atrophy in a mouse model of rotator cuff tears. J Orthop Res. 31(3), 421-6.

69) Schenker, M., Kraftsik, R., Glauser, L., Kuntzer, T., Bogousslavsky, J. and Barakat-Walter, I. (2003). Thyroid hormone reduces the loss of axotomized sensory neurons in dorsal root ganglia after sciatic nerve transection in adult rat. Exp Neurol. 184(1), 225-36.

70) Schäfer, M. K., Bellouze, S., Jacquier, A., Schaller, S., Richard, L.,

Mathis, S., Vallat, J. M. and Haase, G. (2017). Sensory neuropathy in progressive motor neuronopathy (pmn) mice is associated with defects in microtubule polymerization and axonal transport. Brain Pathol. 27(4), 459-71.

71) Scott, H. W. and McKee, W. M. (1999). Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. J Small Anim Pract. 40(9), 417-22.

Shanmuganathan, K., Gullapalli, R. P., Zhuo, J. and Mirvis, S. E.
(2008). Diffusion tensor MR imaging in cervical spine trauma. AJNR Am J
Neuroradiol. 29(4), 655-9.

Shen, J., Wang, H. Y., Chen, J. Y. and Liang, B. L. (2006). Morphologic
analysis of normal human lumbar dorsal root ganglion by 3D MR imaging.
AJNR Am J Neuroradiol. 27(10), 2098-103.

74) Takahara, T., Hendrikse, J., Yamashita, T., Mali, W. P., Kwee, T. C.,

Imai, Y. and Luijten, P. R. (2008). Diffusion-weighted MR neurography of the brachial plexus: feasibility study. Radiology. 249(2), 653-60.

75) Takayama, K., Kita, T., Nakamura, H., Kanematsu, F., Yasunami, T., Sakanaka, H. and Yamano, Y. (2016). New Predictive Index for Lumbar Paraspinal Muscle Degeneration Associated With Aging. Spine (Phila Pa 1976). 41(2), E84-90.

76) Tidwell, A. S. and Robertson, I. D. (2011). Magnetic resonance imaging of normal and abnormal brain perfusion. Vet Radiol Ultrasound. 52(1 Suppl 1), S62-71.

77) Underwood, C. K., Kurniawan, N. D., Butler, T. J., Cowin, G. J. and Wallace, R. H. (2011). Non-invasive diffusion tensor imaging detects white matter degeneration in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neuroimage. 55(2), 455-61.

78) Urger, E., Debellis, M. D., Hooper, S. R., Woolley, D. P., Chen, S. and

Provenzale, J. M. (2013). Influence of analysis technique on measurement of diffusion tensor imaging parameters. AJR Am J Roentgenol. 200(5), W510-7.

79) Wada, M., Hasegawa, D., Hamamoto, Y., Yu, Y., Fujiwara-Igarashi, A. and Fujita, M. (2017). Comparisons among MRI signs, apparent diffusion coefficient, and fractional anisotropy in dogs with a solitary intracranial meningioma or histiocytic sarcoma. Vet Radiol Ultrasound. 58(4), 422-32.

80) Wang, W., Qin, W., Hao, N., Wang, Y. and Zong, G. (2012). Diffusion tensor imaging in spinal cord compression. Acta Radiol. 53(8), 921-8.

81) West, C. A., Davies, K. A., Hart, A. M., Wiberg, M., Williams, S. R. and Terenghi, G. (2007). Volumetric magnetic resonance imaging of dorsal root ganglia for the objective quantitative assessment of neuron death after peripheral nerve injury. Exp Neurol. 203(1), 22-33.

Wilson, A. D., Hart, A., Brannstrom, T., Wiberg, M. and Terenghi, G.(2003). Primary sensory neuronal rescue with systemic acetyl-L-carnitine

following peripheral axotomy. A dose-response analysis. Br J Plast Surg. 56(8), 732-9.

Wininger, F. A., Zeng, R., Johnson, G. S., Katz, M. L., Johnson, G. C.,
Bush, W. W., Jarboe, J. M. and Coates, J. R. (2011). Degenerative myelopathy
in a Bernese Mountain Dog with a novel SOD1 missense mutation. J Vet
Intern Med. 25(5), 1166-70.

84) Yamashita, T., Kwee, T. C. and Takahara, T. (2009). Whole-body magnetic resonance neurography. N Engl J Med. 361(5), 538-9.

85) Yokoyama, Y. (1982) Analyses on the fiber compositions of the lumbar back muscles in mammals. Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi. 56(7), 579-94.

86) Zeng, R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Hansen, L., Awano, T., Kolicheski, A., Ivansson, E., Perloski, M., Lindblad-Toh, K., O'Brien, D. P., Guo, J., Katz, M. L. and Johnson, G. S. (2014). Breed distribution of SOD1 alleles previously associated with canine degenerative myelopathy. J Vet Intern Med. 28(2), 515-21.