

牛の遺伝性横隔膜筋症の病理発生機序に関する  
免疫化学的・蛋白化学的検索

研究課題番号 11660307

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 古岡秀文  
(帯広畜産大学畜産学部助教授)

## はしがき

ホルスタイン牛の遺伝性横隔膜筋症は、慢性鼓脹症を主な臨床症状とする致死性難治性疾患で、病理学的には胸郭筋、特に横隔膜の筋線維に大小不同や変性・壊死がみられ、Z帯の構造変化によるコア様構造を特徴とする。遺伝学的には常染色体性劣性に形質が保持されている。過去に同様の疾患がオランダのMeuse-Rhine-Yssel牛に報告されているが、世界的に飼育されているホルスタイン牛での報告は我々の報告以外にみられない。

最近、我々はその免疫組織化学や生化学的所見から、本疾患が人の「myofibrillar myopathy」に総括される疾患であることを明らかにした。しかしながら、人の疾患を含め本症の原因は未だ明らかでなく、原因蛋白あるいは原因遺伝子の同定が急がれている。その一方で、我々が現在進めている研究により本疾患が、ヘテロの状態（保因牛として）でホルスタイン牛に広く浸透していることが明らかとなっている。従って、本疾患の発生は今後も増加することが予想され、早急に本疾患の原因蛋白・遺伝子を同定し、遺伝子診断法を確立すること（保因牛同士の交配を避けることにより疾患をコントロールできる）が望まれる。

本研究では、以下の3点について明らかにすることを目的とした。

- 1) . 本症の初期の変化を反映すると考えられる保因牛の病態を明らかにし、その診断基準を作成、保因牛の侵淫状況について明らかにする。
- 2) . 本疾患の解明の糸口を得るために、免疫化学的並びに蛋白化学的手法を用い原因蛋白を含む異常蛋白の検出・同定を行ない、本疾患の発症の機序について明らかにする。
- 3) . さらに、本疾患の本態解明の一助として同じホルスタイン牛に発生している遺伝性心筋症についてその病態をあきらかにするとともに、遺伝性心筋症と遺伝性横隔膜筋症の家系についてその関連性を明らかにする。

1) に関しては、ホルスタイン牛213頭を検索した。このうち49頭に本疾患に特徴的なコア様構造が観察された。49頭はいずれも本疾患の家系に含まれ、保因牛の特徴であるコア様構造は病理学的に横隔膜筋症でみられるそれに一致したことから、横隔膜や心筋にコア様構造を有する症例は横隔膜筋症の保因牛であることが示唆され、広く北海道十勝に侵淫していることが明らかとなった。

2) に関しては、発症牛と対照牛の横隔膜筋組織全量に対する抗体をそれぞれ作製・検索を行った。発症牛筋組織に対する抗体での免疫プロット法では、横隔膜筋症例で約55 kD、65 kDに特異的に蛋白の増量がみられた。対照牛筋組織に対する抗体では横隔膜筋症例で約85 kDに蛋白の欠損がみられた。これら蛋白を免疫沈降法および二次元電気泳動法により回収し、アミノ酸配列解析をエドマン分解法により行った。現在までのところこの解析は完了しておらず、蛋白の同定はできていない。

3) に関しては病理学的に遺伝性心筋症例で心筋は心筋繊維の肥大と空胞変性を特徴とし、肥大した心筋繊維では筋繊維の枝分かれ像（fiber splitting）がみられた。遺伝学的に心筋症例の両親はいずれも、横隔膜筋症発症牛の共通祖先である一頭の種牛に遡れることが明らかとなった。このことから両疾患は遺伝的に重なり合う、表現型の異なる疾患である可能性が示唆された。

なお、これら研究の一部は最終的な結論を得るまでに至っていないことから、公表には至っていない。そこで、これまでに得られた結果を、「研究成果」とした。

#### 研究組織

研究代表者：古岡 秀文（帯広畜産大学・畜産学部・助教授）  
研究分担者：小俣 吉孝（帯広畜産大学・畜産学部・助教授）  
研究分担者：古林 与志安（帯広畜産大学・畜産学部・助手）  
研究分担者：松井 高峯（帯広畜産大学・畜産学部・教授）  
研究分担者：品川 森一（帯広畜産大学・畜産学部・教授）

#### 研究経費

平成11年度	1, 7 0 0千円
平成12年度	1, 9 0 0千円
計	3, 6 0 0千円

牛の遺伝性横隔膜筋症の病理学的研究：  
保因牛の病態および免疫化学的検索

## 緒 言

ホルスタイン牛の遺伝性横隔膜筋症は、臨床的には、慢性あるいは再発性の鼓脹症を示し、常染色体劣性の遺伝形式をとる[8]。病理学的には横隔膜を主とした胸郭筋に病変を有し、これらの骨格筋は肉眼的に褪色し、乾燥感を呈する。病理組織学的には筋線維の大小不同、空胞化、硝子様変性、中心核の出現、肥大線維の分割(fiber splitting)、筋内膜及び筋周膜結合組織の増加が認められ、筋線維中央もしくは辺縁部にコア様構造の形成を特徴とする。また、肋間筋、心筋にも横隔膜筋と同様のコア様構造が認められる。電子顕微鏡学的にはZ帯、あるいは介在板の乱れ、肥厚が認められ、コア様構造は高電子密度の筋フィラメント様物質の凝集からなる。コア様構造周囲は筋フィラメントやミトコンドリア、T細管由来と考えられる管状物などの物質で占められている[5, 12]。

本研究では、様々な疾患の病理学的検索のために当教室に搬入されたホルスタイン牛の横隔膜、心筋、肋間筋を検索したところ、慢性鼓脹などの臨床症状を示さないものの、横隔膜筋症に特徴的なコア様構造が観察された症例を見いだした。そこで、これらの症例を病理学的に検索し、遺伝性横隔膜筋症との関連性について検討を行った。

さらに、これまでホルスタイン牛の横隔膜筋症の遺伝的背景や、臨床像あるいは病理形態像についての検討がなされてきたものの、未だに本疾患における筋線維の変性の機序は明らかになっていない。そこで、原因蛋白の検索を目的として、遺伝性横隔膜筋症および対照牛の筋組織それぞれについて抗体を作製し、ウェスタンブロット法にて検索を行ったので報告する。

## 材料および方法

検索を行った材料は、過去2年半にわたって様々な疾患によって当教室にて病理解剖に付された8ヶ月以上のホルスタイン雌牛213例を、横隔膜および肋間筋に病変の認められない症例、筋線維に大小不平等の変性変化を欠き、コア様構造のみを有する症例、臨床的に慢性鼓脹症を呈し、病理組織学的に横隔膜筋症と診断された症例に分類し、これらの横隔膜腰椎部、肋骨部、肋間筋、心筋を用いた。

### 1) 組織学的、組織化学ならびに免疫組織化学的検索

横隔膜腰椎部、横隔膜肋骨部、肋間筋を新鮮材料として7mm角四方に分断し、液体窒素で凍結後、常法によりクリオスタットで10 $\mu$ mの連続凍結切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色、Gomori's trichrom, NADH - tetrazolium reductase (NADH-TR)染色、リタングステン酸ヘマトキシリン染色 (PTAH) 染色を行った。また抗desmin, vimentin, actin,  $\alpha$ -actinin, ubiquitin抗体を一次抗体としてavidin-biotin peroxidase complex method (ABC法) (Vectastain ABC Kit, Vector社) を行い、光学顕微鏡下にて観察した(Table 1)。心筋は、肉眼的観察を行った後、10%ホルマリン水溶液にて固定し、常法により作成したパラフィン切片を作成し、Hematoxylin - Eosin (H-E) 染色、リタングステン酸ヘマトキシリン (PTAH) 染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

### 2) 電子顕微鏡学的方法

横隔膜腰椎部、横隔膜肋骨部のリン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド水溶液固定材料の一部を細断し、リン酸緩衝1%オスミウム酸水溶液(pH 7.3)にて後固定を行った後、アルコール脱水し、エポキシ樹脂包埋を行った。作成した1 $\mu$ mの厚切り切片に、toluidine blue 染色を施し、光学顕微鏡的観察を行った後、常法にしたがって超薄切

片を作成し酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重電子染色をし、電子顕微鏡（日立、H-7500）にて観察を行った。

### 3) 年齢分布、筋線維直径の測定および家系（系統）調査

材料を採取したホルスタイン牛213頭のうち遺伝性横隔膜筋症以外の症例について年齢分布表を作成し、ヒストグラムを作製した。また、今回横隔膜筋症と診断された3例に、過去に横隔膜筋症と診断された16頭を加えて、年齢のヒストグラムを作製した。

横隔膜筋に組織学的に異常所見が認められなかった対照牛3例、コア様構造のみが認められた症例2例、横隔膜筋症と診断された症例2例についてそれぞれ、横隔膜筋組織のH-E染色標本を撮影し、それぞれノギスによって200本ずつ筋線維の直径を測定した。筋線維直径を測定後それぞれのヒストグラムを作製した。また、コア様構造を有する症例については血統登録証明書にもとづき、系統を調べた。

### 4) 抗体作製

横隔膜筋症、ならびに異常所見の認められなかった対照牛それぞれの横隔膜筋腰椎部の凍結材料を用いた。横隔膜腰椎部の凍結筋500mgを測り細切したものを、Lysis buffer (0.1M Tris-HCl pH.7.4/1.5M NaCl/0.5M EDTA/0.5M Leupeptin/0.1M Benzamidin/1% NP40/1% Thioglucoside/1% S.Metavanadate/0.1M PMSF) 2 mlで懸濁した。2,100×g, 20sec. 5°Cで遠心し、その上清を接種サンプルとした。接種サンプルを等量のFreund's Complete Adjuvantと混合し、エマルジョン化した後、各群3匹ずつのマウスの腹腔内、左右後肢筋内に500 $\mu$ l/匹投与した。その後2週間間隔で3回、生理食塩水で約10倍に希釈した接種サンプル100 $\mu$ lをブースターとしてマウスの腹腔内に投与した。2回目のブースター投与後7日目に抗体価測定のため、各群マウスの眼窩静脈叢穿刺により採血を行い、得られた血清を用いてドットプロットを行った。最後のブースターの後、4日間隔で3回血清を採取した。採取した

血清の特異反応性を検討するために、以下の吸収操作を行った。吸収に使用する沈渣は、横隔膜腰椎部の筋肉500mgをLysis buffer 2 mlに溶かし、190×g、5分で遠心し、上清をすてたのち、2～3度PBSで洗浄を行った。接種サンプルの沈渣で吸収を行った。横隔膜筋症のサンプルで免疫したマウスの血清は対照牛の筋肉材料のサンプルの沈渣で吸収し、対照牛のサンプルで免疫したマウスの血清は、横隔膜筋症のサンプルの沈渣で吸収をした。沈渣を血清に加えて、4℃24時間攪拌を行った後、8,400×g 10分で遠心し上清を血清として使用した(Table 3)。

#### 5) 作製した抗体による免疫組織化学およびウエスタンブロット法

横隔膜筋症、コア様構造のみの認められる症例、対照牛の新鮮横隔膜筋を液体窒素で凍結させ、クリオスタットで10 μmの凍結切片を作製し、作製した抗横隔膜筋症抗体、抗対照牛抗体を一次抗体としてavidin-biotin peroxidase complex method (ABC法) (Vectastain ABC Kit, Vector 社) を行い、光学顕微鏡で観察した(Table 3)。

対照牛、コア様構造の見られる牛、横隔膜筋症牛の横隔膜腰椎部の凍結材料それぞれ2例ずつ用いて、Laemmliの方法[12]に基づいて一次元の12.5%ポリアクリクアミドゲル電気泳動を行った。凍結材料250mgを0.1 M Tris-HCl pH.7.4/1.5M NaCl/0.5M EDTA/0.5M Leupeptin/0.1M Benzamidine/ 1% NP40/1%Thiogluco-side/1% S.Metavanadate/0.1M PMSF を含むLysis buffer 1ml 中で細切し、その上澄みを10% SDS/ 20% Glycerol /0.5M Tris-HCl /1% Triton x-100を含むsample buffer で希釈する。またその上澄みを試料として総タンパク量を色素結合法で測定した。試料濃度は各レーン15mg/mlになるようにし、電気泳動後、ゲルのクマシーブルー染色と、ニトロセルロース膜への転写の両方を行った。免疫ブロットの一次抗体として、作製した抗横隔膜筋症、抗対照牛の抗体を2,000倍希釈で使用し、二次以降はavidin-biotin peroxidase complex method (ABC法) (Vectastain ABC Kit, Vector社)を行った。また、マーカートンパク質の移動距離



を測定して検量線を作製し、出現したバンドの分子量を推定した.

## 結 果

### 1) 組織学的および組織化学的所見

検索213頭中、3頭(1.4%)が臨床的に慢性鼓張症を示し、病理組織学的に横隔膜筋症と診断された。また、49頭(23%)に横隔膜筋症に特徴的なコア様構造のみを有する症例を認めた。これら49頭の症例では横隔膜筋、筋線維にコア様構造を有するものの、大小不同、線維化、空胞、硝子様変性などの所見は認められなかった。コア様構造は筋線維の中央部もしくは辺縁部に均質に染色される好酸性の構造で、大小様々な形態が観察された。また、コア様構造のみを有する症例に分類されたものにはコア様構造がほとんどの筋線維に認められるものから、散発性に認められるものまで疾患の程度に差があった。

横隔膜腰椎部、肋間筋に認められたコア様構造は、H-E染色では好酸性(Fig. 1)、Gomori's trichrome染色で濃緑色、NADH-TR染色で陰性を示した(Fig. 2, 3)。また、同様のコア様構造は、心筋線維にも認められた(Fig. 4a)、PTAH染色で赤褐色を示した(Fig. 4b)。肋間筋では、横隔膜筋症では筋線維の大小不同、線維化、中心核の出現、コア構造が認められるのに対して、コア様構造のみが見られる症例では、コア様構造とともに、若干の中心核線維の出現が観察された(Fig. 5)。

### 2) 免疫組織学的所見

横隔膜筋症、コア様構造のみを有する症例のコア様構造は、いずれも抗actin, ubiquitin, vimentin抗体での免疫染色では、コア様構造は強～弱陽性、抗desmin,  $\alpha$ -actininではコア様構造周囲が陽性を示したものの、コア様構造自体は陰性を示した。加えてdesmin,  $\alpha$ -actininでは筋内膜直下が陽性を示した(Fig. 6, 7)。以上の免疫組織化学的所見をTable 2にまとめた。

### 3) 電子顕微鏡学的所見

横隔膜筋症では、コア様構造の多くはフィラメント様物質の凝集像として細胞中央部に認められた。コア構造周囲では不規則に走行する筋フィラメントや、ミトコンドリアなどが認められ[5,12]。コア様構造のみを有する症例でも、コア様構造は細胞中央部にみられ、比較的電子密度の高いフィラメント様物質の凝集よりなっていた。コア様構造周囲には、横隔膜筋症にみられるような筋フィラメントの走行異常や、細胞内小器官の集積はみられない (Fig. 8)。

### 4) 年齢分布、筋線維直径および家系調査について

全症例の年齢分布を調べたところ、当教室でこれまでに剖検された遺伝性横隔膜筋症の症例が、3から6歳で好発するのに対して、コア様構造を有する症例は全年齢(8ヶ月~11歳)に平均して認められた (Fig. 9)。筋線維直径のヒストグラムは、遺伝性横隔膜筋症では筋線維の大小不同により25  $\mu\text{m}$ と、90  $\mu\text{m}$ にピークを有する二峰性を示した。コア様構造を有する症例と対照牛は、共に55  $\mu\text{m}$ 付近にピークを示し、両者にほとんど差異はみられなかった (Fig. 10)。

家系的に、コア様構造を有する症例の血統登録証明書を検索した結果、その両親の祖先に同一の種牛に由来する常染色体劣性の遺伝様式が示唆された。また、祖先である種牛と、横隔膜筋症の祖先である種牛とは同一であった。

### 5) 免疫組織化学およびウエスタンブロット法所見

凍結切片の免疫染色の結果、抗横隔膜筋症抗体、抗対照牛抗体ともにコア様構造に陰性であったが、非特異的反応が強く明確な差異は認められなかった。

作製した抗体、抗対照牛、抗横隔膜筋症抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、横隔膜筋症抗体に対し、横隔膜筋症例1,2ではおよそ55kDa、65kDa付近に強く染まった特異的なバンドが認められた (Fig. 11a)。また、抗対照牛抗体に対し、横隔膜筋症1,2ではおよそ85kDa付近に、薄く染まっているバンドが

認められた (Fig.11b).

## 考 察

1983年に、オランダ東部のMeuse-Rhine-Yssel(MRY)種で横隔膜に病変が主座する遺伝性の筋ジストロフィー症の発生が報告されている[9]。ホルスタイン牛では1994年に中村らによりMRY種の疾患に類似した筋疾患が報告された[18]のを皮切りに遺伝学的背景、詳細な臨床病理像あるいは病理形態像が明らかにされている[8, 10, 16]。

今回検索した213頭の症例の中に、臨床症状を示さないものの筋線維に横隔膜筋症で特徴的なコア様構造のみの認められる症例が49頭存在した。これら49例では横隔膜筋と、肋間筋、心筋にコア様構造を有し、筋線維にコア様構造以外の病変は認められなかった。そのコア様構造の組織化学的、免疫化学的、電子顕微鏡学的検索を行ったところ、遺伝性横隔膜筋症にみられたコア様構造に極めて類似していた。すなわち、H-E染色で好酸性、Gomori's trichrome染色で濃緑色、NADH-TR反応では陰性、抗actin, ubiquitin抗体には強陽性、抗 $\alpha$ -actinin, desmin抗体に対してはコア様構造周囲は陽性であったが、コア様構造自体は陰性をしめした。電子顕微鏡学的検索で、コア様構造は高電子密度のフィラメント様の物質の凝集からなり、Z帯の乱れあるいは肥厚が見られた。また、コア様構造のみを有した症例では、いずれも、鼓脹症などの臨床症状はしめさず、全年齢に平均的に認められた。コア様構造のみを有する症例の家系検索の結果は、そのいずれもが1頭の種牛を源とする同一家系であり、その種牛は横隔膜筋症の祖先である種牛と共通であった[8]。以上の結果より、これらのコア様構造をもつ症例が遺伝性横隔膜筋症の保因牛である可能性が示唆された。しかしながら、コア様構造の出現頻度はコア様構造がほとんどの筋線維に認められるものから、散発性に見られるものまで各個体によって差があった。この事実はコア様構造を有する症例で若齢牛の中には、将来的に横隔膜筋症を発症する可能性があることを示唆する。今回、確実な保因牛である横隔膜筋症牛の母牛や、その直子の検索には至ら

なかったが、今後はこれらの症例が保因牛であることの確認のために、横隔膜筋症牛の母牛、直子の検索が必要であると思われる。

一方、今回のコア様構造のみを有する症例が保因牛であるならば横隔膜筋症に特徴的なコア様構造の形成が、病理学的には筋線維変性過程の一次的な障害である可能性がある。横隔膜筋症、コア様構造のみを有する症例のコア様構造は共に抗actin抗体に陽性を示し、またコア様構造は、電子顕微鏡学的検索よりフィラメント様物質の凝集であることが分かった。このことは、コア様構造が主にアクチンフィラメントの凝集により構成されていることを示している。従来ubiquitinは細胞内異常蛋白の分解に重要な役割を果たし、神経系の組織に特異的に分布しているとされてきたが、近年さまざまな筋疾患でも認められることが報告されている[1, 2, 3, 6, 12, 14, 15, 17]。今回の検索においても、保因牛および横隔膜筋症に見られるコア様構造は抗ubiquitin抗体に対して陽性を示した。変性蛋白に対する分解過程を示唆する所見と考えられた。これらのことより、コア様構造の形成起序として、筋形質膜とZ帯、あるいはZ帯同士の間での結合の機能を担っている蛋白の欠損、もしくは障害により筋線維の崩壊が生じ、アクチンフィラメントの凝集が起こった可能性が示唆された。

一方、人の筋原性筋疾患には、骨格筋細胞膜に存在し、細胞膜細胞骨格の役割をになっているジストロフィンの欠損や減少が原因となる、デュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)やベッカー型筋ジストロフィー(BMD) [7, 22]、リン酸化デスミンの増量が認められる Desmin storage myopathy が報告されている [4, 5, 19]。またプロテインキナーゼの障害が明らかな、あるいは示唆されている筋緊張性ジストロフィー(MyD)や、ミオチューブラーミオパチーの存在が知られている [13, 20, 21, 23]。今回著者が検索したホルスタイン牛の遺伝性横隔膜筋症でもこのようなタンパクの異常の関与が示唆されたことから、筋線維変性の機序の一端を明らかにするため、横隔膜筋症および対照牛の筋組織全量に対する抗体を作製し検索を試みた。横隔膜筋症の筋組織サンプルを接種したマウスから採取した血清を、対照牛の筋組織の沈渣で吸収した抗横隔膜筋症抗体と、対照牛の筋組織サンプルを接種したマウスから採取した血清を、横隔

膜筋症牛の筋組織の沈渣で吸収した抗対照牛抗体の両方を作製した。理論的には抗横隔膜筋症抗体が横隔膜筋症に出現する異常蛋白と反応し、抗対照牛抗体は対照牛では横隔膜筋症牛で欠損している蛋白と反応することを想定した。横隔膜筋症筋を用いて作製した抗体を用いたウェスタンブロット法では横隔膜筋症サンプルの55kDa, 65kDa付近に特異的なタンパク質の増量が、また、対照牛を用いて作製した抗体では横隔膜筋症サンプルの85kDa付近のタンパク質の減少が認められた。しかしながら、保因牛については対照牛と明確な差異は認められなかった。また、作製した抗体を用いて免疫染色を行ったが、非特異反応が強く横隔膜筋症、保因牛、対照牛ともに抗体による明確な差が認められなかった。

今回は異常蛋白の同定には至らなかったが、これらの量に差のあるバンドが見られたので、今後これら蛋白の同定を行い、原因究明に更なる検討を行う必要があると思われる。

## 要 約

様々な疾患で病理学的検索のために剖検された8ヶ月齢から15歳齢のホルスタイン牛213頭全ての横隔膜、肋間筋、心筋を検索したところ、従来遺伝性横隔膜筋症に特徴的とされるコア様構造を有する症例が見いだされた。これら症例は年齢に関係なく49頭にみられた。病理組織学的にこのコア様構造は好酸性均質で、筋線維の中央、あるいは散在性にみられ、これら症例には筋線維の大小不同、中央核線維、壊死等の変性変化は観察されなかった。組織化学的並びに免疫組織化学的に、これら症例に観察されたコア様構造は、遺伝性横隔膜筋症に観察されるそれと同様であった。すなわち、HE染色で好酸性、NADH-TR染色では陰性で、抗actinおよびubiquitin抗体に陽性を示した。電子顕微鏡的にはフィラメントの凝集からなり、また、系統的調査の結果も遺伝性横隔膜筋症の系統図に一致した。以上の所見から、横隔膜筋をはじめとする筋組織筋線維にコア様構造のみを有する症例は、横隔膜筋症の保因牛であり、同時にこれらコア様構造の形成は病理学的に、横隔膜筋症の一次的な変性である可能性が示唆された。

さらに、遺伝性横隔膜筋症の原因蛋白の探索の目的で、横隔膜筋症及び対照牛の横隔膜筋組織全量に対する抗体をそれぞれ作製し、免疫ブロット法にて検索を行なった。横隔膜筋症筋組織に対する抗体では、横隔膜筋症症例で約55kDa及び65kDa部位に特異的にみられるタンパク質の増量が観察された。また、対照牛筋組織に対する抗体では、横隔膜筋症症例で約85kDa部位のタンパク質の量が減少もしくは欠損していることが観察された。本研究ではこれらタンパクの同定は出来なかったが、これらのタンパクが横隔膜筋症の発症になんらかの関与をしている可能性が示唆された。



## 参考文献

- 1) Askanas V, Serdaroglu P, Engel WL, Alvarez RB:  
Immunolocalization of ubiquitin in muscle biopsies of patients with inclusion body myositis and oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurosci lett* 130: 73-76, 1991.
- 2) Askanas V, Serdaroglu P, Engel WL, Alvarez RB:  
Immunocytochemical localization of ubiquitin in inclusion body myositis allows its lightmicroscopic distinction from polymyositis. *Neurology* 42 : 460-461, 1992.
- 3) Askanas V, Engel WK, Bilk M, Alvarez RB, Selkoe DJ: Twisted tubulofilaments of inclusion body myositis muscle resemble paired helical filaments of Aozheimer brain and contain hyperphosphorylated tau. *Am J Pathol* 144 : 177-187, 1994.
- 4) Bertini E, Bosman C, Ricci E, Servedei S Boldrini R, Sabatelli M, Salviati G: Neuromyopathy and restrictive cardiomyopathy with accumulation of intermediat filaments: a clinical, morphological and biochemical study. *Acta Neuropatho* 81 : 632-640, 1991.
- 5) Bertini E, Salviati G, Apollo F, Ricci E, Servidei S, Broccolini A, Papacci M, Tonali P: Reducing body myopathy and desmin strage in skeletal muscle: morphological and biochemical

findings. Acta Neuropathol 87 : 106-112, 1994.

6) Bilak M, Askanas V, Engel WK: Strong immunoreactivity of  $\alpha$ 1-antichymotripsin co-localizes with-myloid protein and ubiquitin in vacuolated muscle fibers of inclusion body myositis. Acta Neuropathol 85 : 378-382, 1993.

7) Ervasti JM, Campbell KP: Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. Cell 1991; 66: 1120-0031.

8) Furuoka H, Doi T, Nakamura N, Inada I, Osame S, Matsui T: Hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. Acta Neuropathol 90: 339-346, 1995.

9) Goedegebuure SA, Hartman W, Hoebe HP: Dystrophy of the diaphragmatic muscles in adult Meuse-Rhine-Yssel cattle : Electromyographical and histological findings. Vet Pathol 20 : 32-48, 1983.

10) 稲田一郎, 納敏, 古岡秀文, 松井高峯, 井口弘之, 高橋裕之 : 横隔膜筋ジストロフィー症ホルスタイン種乳牛の臨床病理学的所見 ; 日本獣医師会雑誌 49 : 762-795, 1996

11) 加藤嘉太郎 : 家畜比較解剖図説 上巻 pp.124-125, 1991.

12) Laemmli UK: Cleavage of structural protein during the

assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685, 1970.

13) Lehesjoki AE, Sankila EM, Mial J et al.: X linked neonatal myotubular myopathy: one recombination detected with four polymorphic DNA markers from Xq28. J Med Genet 1990; 27: 288-291.

14) Lowe F, Blanchard A, Morrell K, Fennox G, Reynold L, Billett M, Landon M, Mayer RJ: Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibers in cerebellar astrocytomas, Cytoplasmic bodies in muscle, and Mallory bodies in Alcoholic liver disease. J Pathol 155 : 9-15, 1988.

15) Lubke U, Six J, Villanova M, Boons J, Vandermeeren M, Ceuterick C, Cras P, Martin JJ: Microtubule-associated protein tau epitopes are present in fiber lesions in diverse muscle disorders. Am J Pathol 145 : 175-188, 1994.

16) 村上愛子 : ホルスタイン種の牛における遺伝性横隔膜筋症-横隔膜筋ならびに心筋病変の免疫組織化学的, 免疫ブロット法及び電子顕微鏡学的検索-1996年度卒業論文

17) 森永正二郎, 中島孝, 下里幸夫 : 中間径フィラメント・病理と臨床5 : 385-394, 1987.

- 18) Nakamura N, Doi T, Furuoka H, Kato M, Inada I, Iguchi H, Osame S, Matsui T: Muscular dystrophy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cows. J Vet Med Sci 56 : 993-994, 1994.
- 19) Nakano S, Engel AG, Waclawik AJ, Emslie-Smith AM, Busis NA: Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. Light and electron microscopy analysis of 10 cases. J Neuropathol Exp Neurol 55 : 549-562, 1996.
- 20) Spiro AJ, Shy GM, Gonatas NK: Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy. Arch Neurol 1966; 14:1-14.
- 21) 杉田秀男ら : 筋緊張性症候群 pp559-580;新 筋肉病学 1995.
- 22) Tanaka H, Ishiguro T, Eguchi C et al.: Expression of a dystrophin-related protein associated with the skeletal muscle cell membrane. Histochemistry 1991; 96: 1-5.
- 23) Thomas NST, Sarfarazi M, Roberts K et al.: X-linked myotubular myopathy(XLMTM): evidence for linkage to Xq28 DNA markers. HGM9. Cytogenet Cell Genet 1987; 46: 704.

Table 1. Primary antibody used

Antibody	Clone	Source	Dilution
Anti-Human Desmin Mouse (MAB)	D33	DAKO	1 : 2500
Anti- Vimentin Mouse (MAB)	V9	DAKO	1 : 300
Anti-Rabbit Sarcometric Actin Mouse (MAB)	$\alpha$ -Sr-1	DAKO	1 : 10
Anti- $\alpha$ actinin Mouse (MAB)	EA-53	SIGMA	1 : 6000
Anti-Ubiquitin Rabbit (PAB)		DAKO	1 : 200

MAB : monoclonal antibody PAB : polyclonal antibody

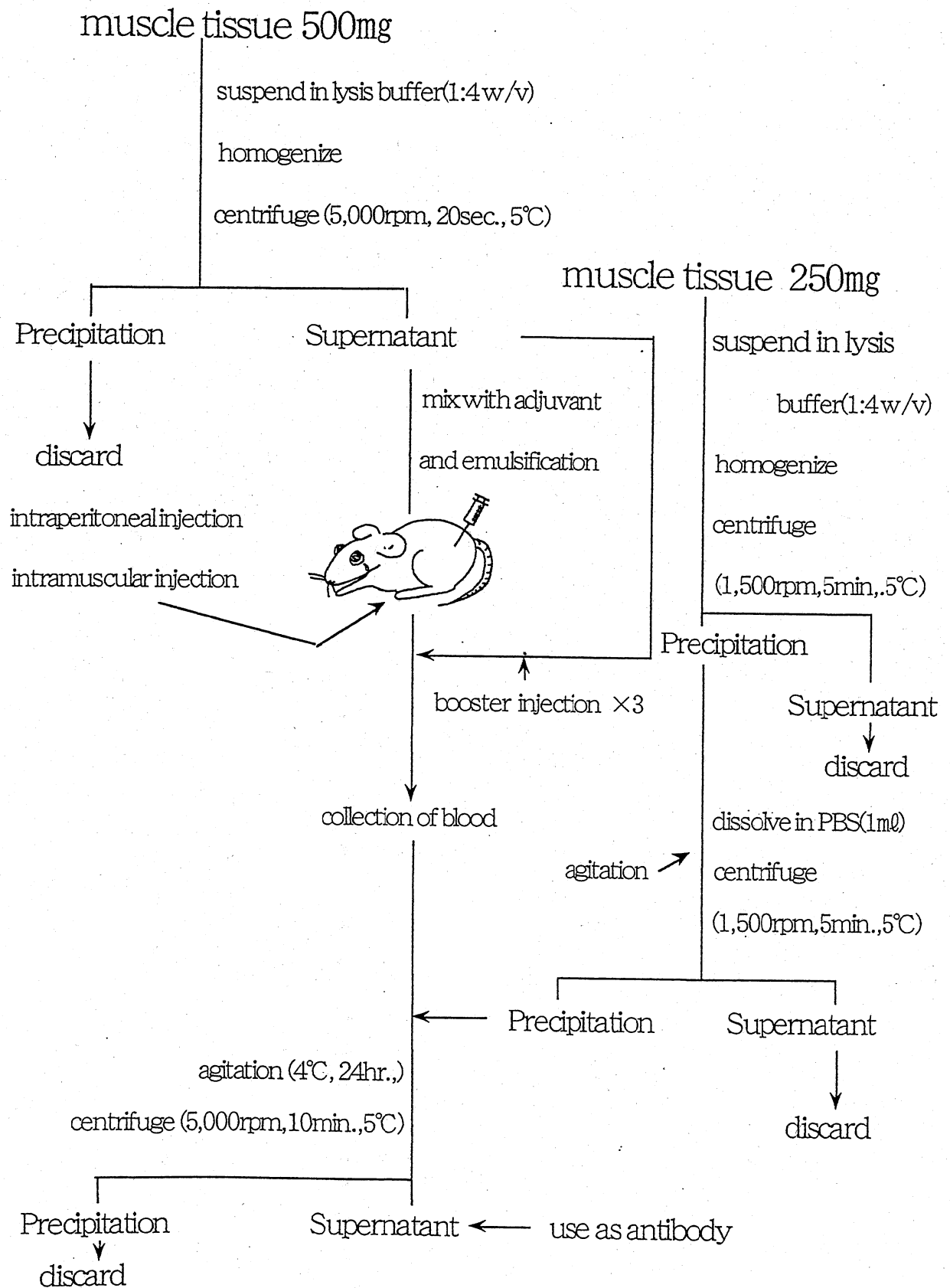
Table 2. Results of immunohistochemical studies

antibody	Carrier Cases			Myopathy Cases		
	Core structure	Peri-Core	Subsarcolemma	Core structure	Peri-Core	Subsarcolemma
Desmin	-~+	+	++	-~+	+	++
Vimentin	-~+	+	++	-~+	+	++
Actin	++	+	-~+	++	+	-~+
$\alpha$ -actinin	-	++	++	-	++	++
Ubiquitin	+	-	-	+	-	-

Peri-core: periphery of the core-structures, -: no expression,

+signs: grades of increased expression, ~: or up to

# Table 3. 抗体作製方法の概要



# Plate 1

## Fig. 1 横隔膜筋凍結切片

1a) 対照牛横隔膜腰椎部筋、異常所見は認められない。

H-E染色

1b) 保因牛横隔膜腰椎部、筋線維中央にコア様構造が認めらる。

H-E染色

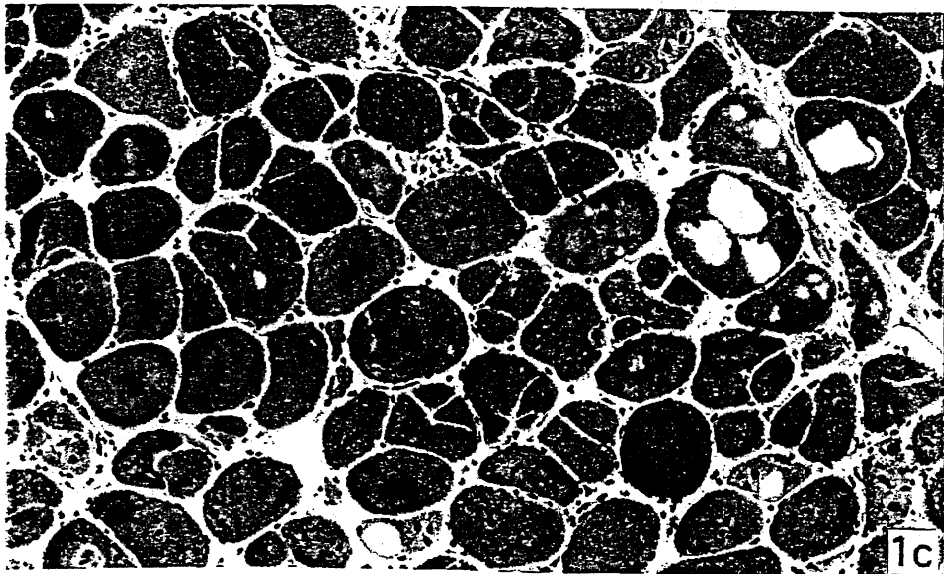
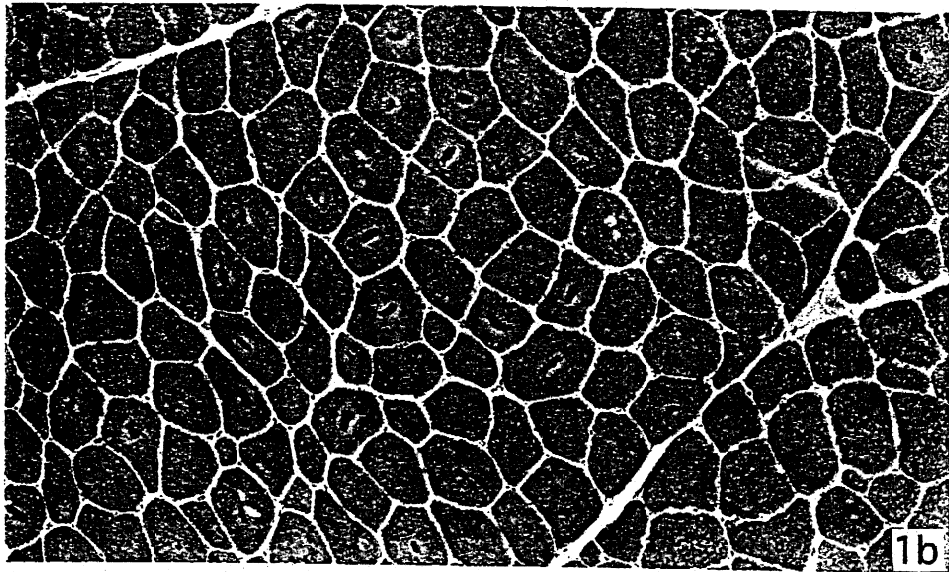
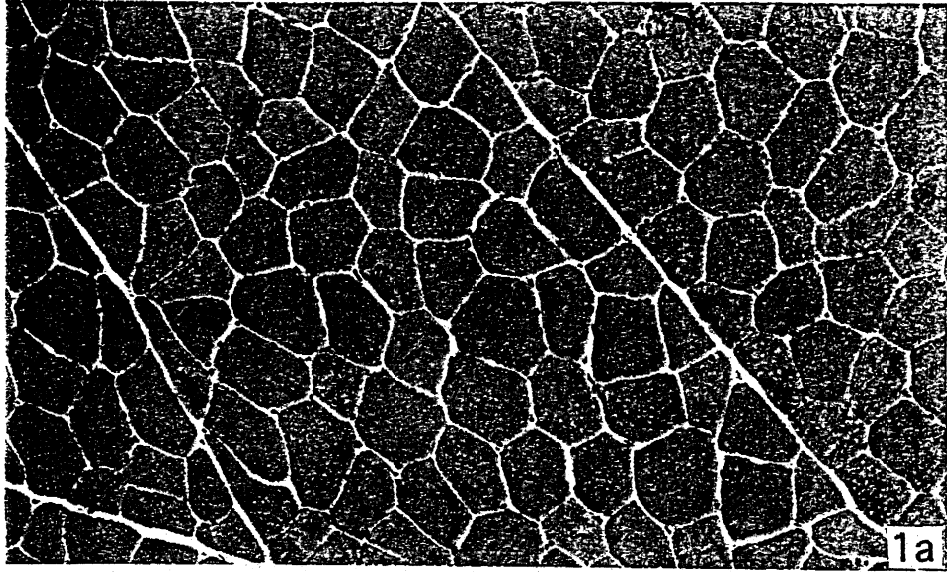
1c) 横隔膜筋症、横隔膜腰椎部、筋線維の変性変化と中心核、コア様構造が認められる。

H-E染色

a)~c) 120倍



# Plate 1



## Plate 2

### Fig. 2 保因牛横隔膜筋凍結切片

2a) 筋線維中央部に好酸性のコア様構造がみとめられる。

H-E染色

2b) コア様構造は濃緑色を示す。

ゴモリトリクローム染色

2c) コア様構造は陰性を示し、筋形質膜下では強陽性を示す。

NADH-TR染色

2a)~2c) 230倍

### Fig. 3 横隔膜筋症牛横隔膜凍結切片

3a) 筋線維の変性性変化と好酸性のコア構造が認められる

H-E染色

3b) コア構造は濃緑色を示す。

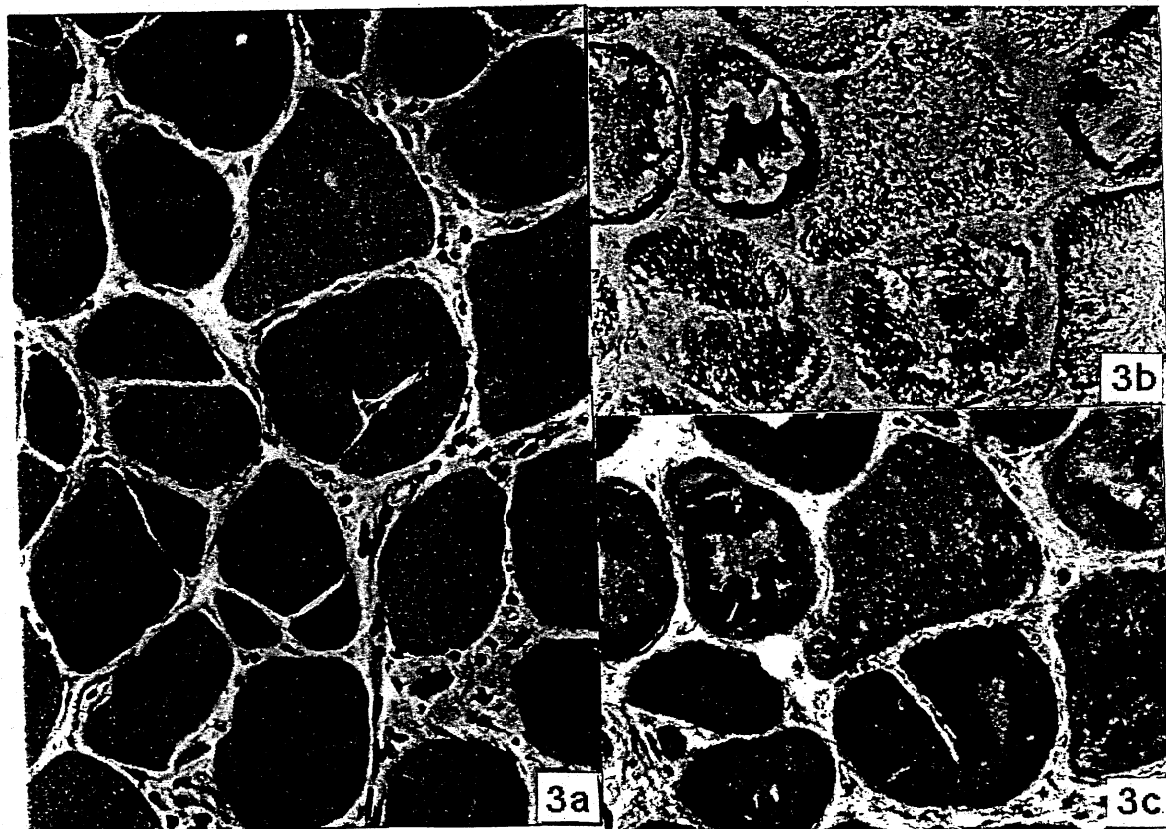
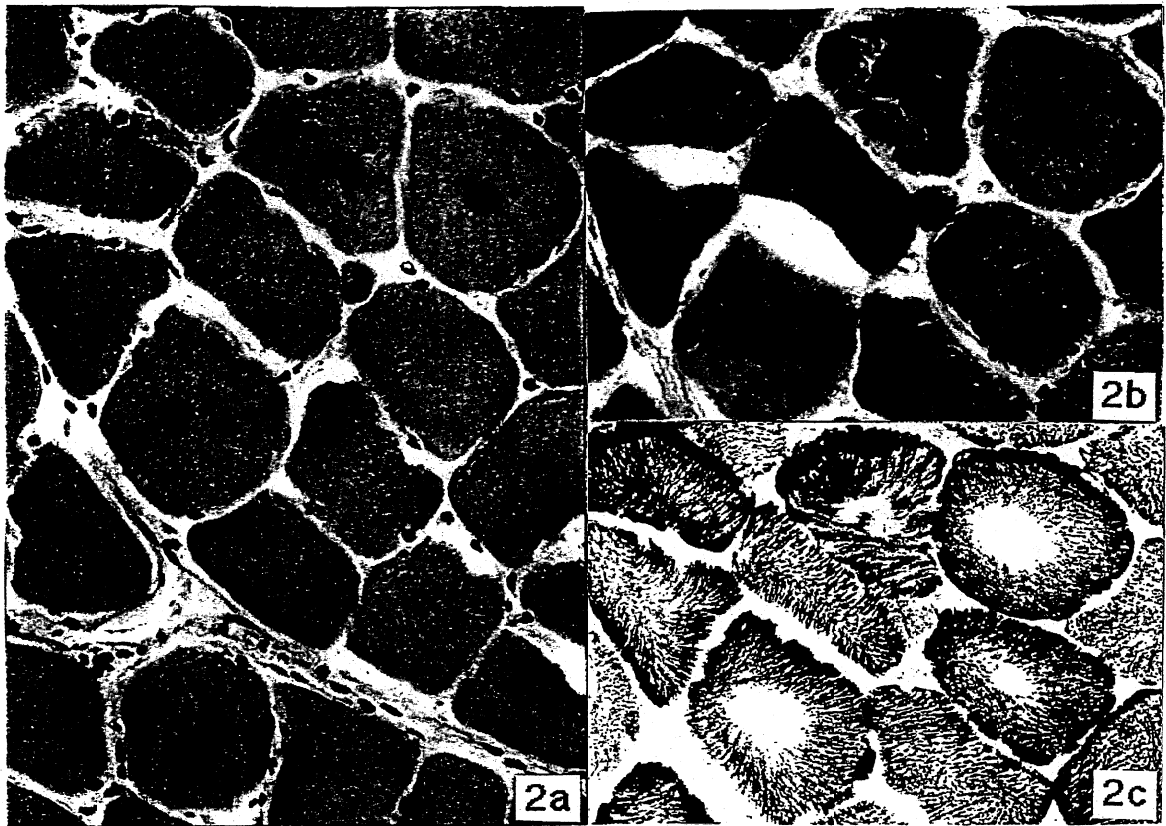
ゴモリトリクローム染色

3c) コア構造は陰性を示し、筋形質膜下は強陽性を示す。

NADH-TR染色

3a)~3c) 230倍

# Plate 2



## Plate 3

### Fig. 4 保因牛心筋パラフィン切片

4a) 心筋線維中央部に好酸性のコア様構造が認められる。

H-E染色

4b) コア様構造は赤褐色を示す。

PTAH染色

4a)、4b) 460倍

### Fig. 5 肋間筋凍結切片、H-E染色

5a) コントロール牛、肋間筋凍結切片

異常所見は認められない。

5b) 保因牛、肋間筋凍結切片

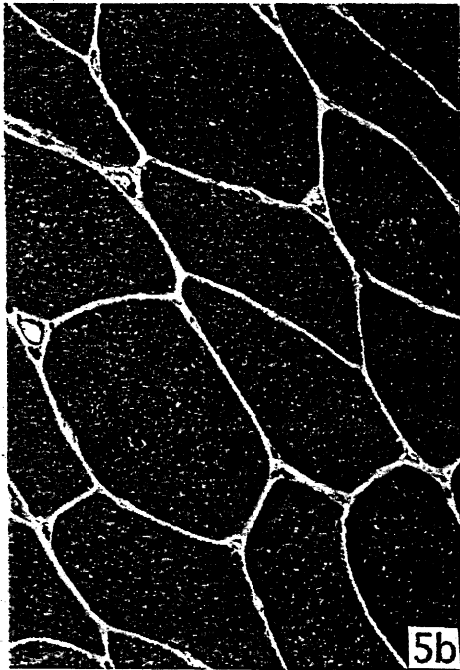
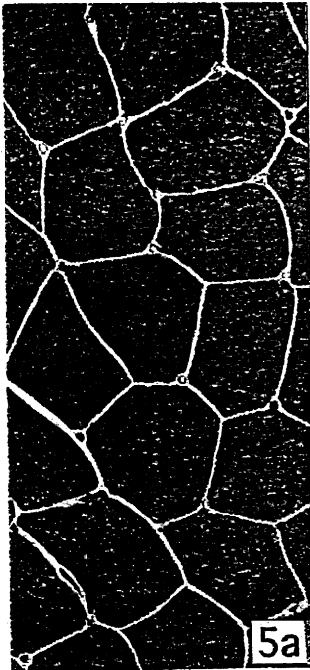
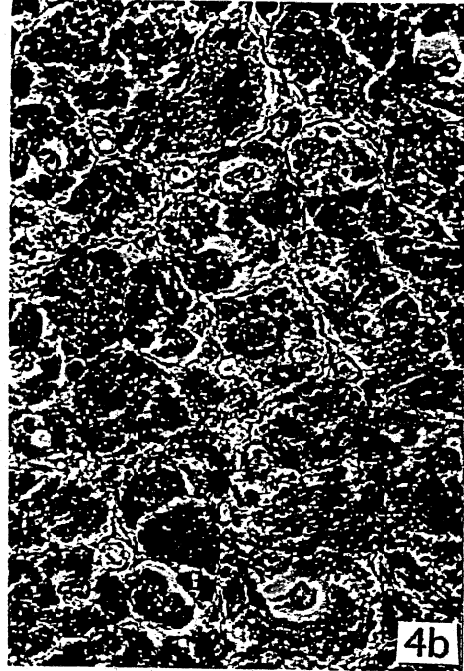
中心核とコア様構造が認められる。

5c) 横隔膜筋症牛、肋間筋凍結切片

筋線維の線維化、中心核とコア様構造が認められる。

5a)~5c) 230倍

# Plate 3



# Plate 4

## Fig. 6 保因牛横隔膜筋凍結切片、免疫染色

6a) 筋線維中央部に好酸性のコア様構造がみとめられる。

H-E染色

6b) 抗デスミン抗体に対し、コア様構造周囲と、コアを持つ筋線維の膜下が陽性を示す。

ABC法

6c) 抗ピメンチン抗体に対し、コア様構造は弱陽性を示す。

ABC法

6d) 抗アクチン抗体に対し、コア様構造は陽性を示す。

ABC法

6e) 抗 $\alpha$ -アクチニンに対し、コア周囲が強陽性を示す。

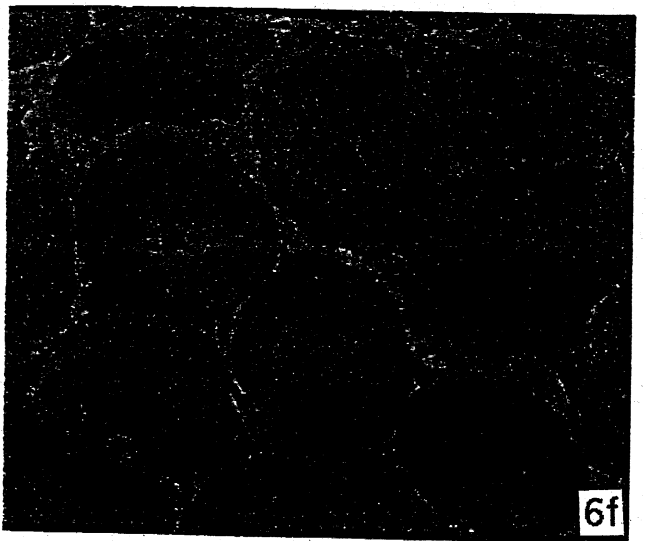
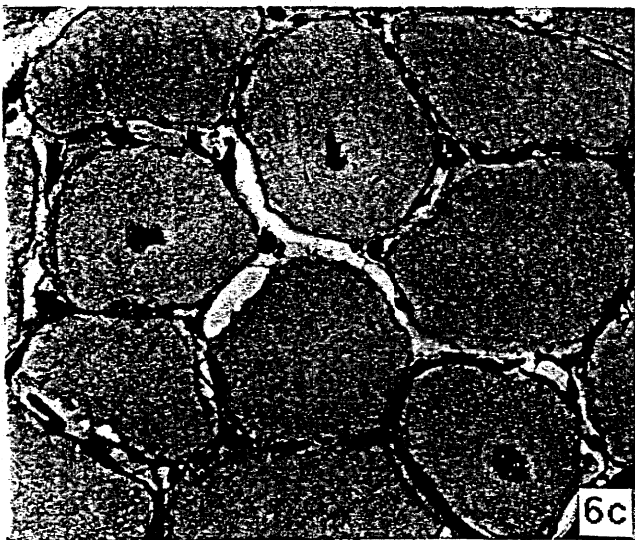
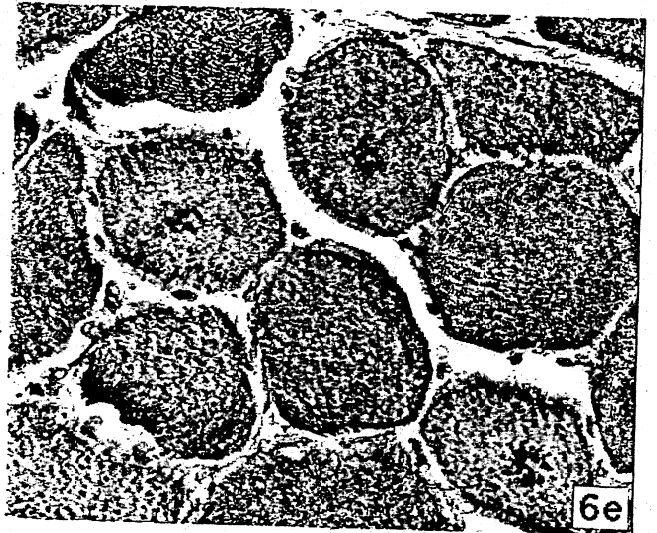
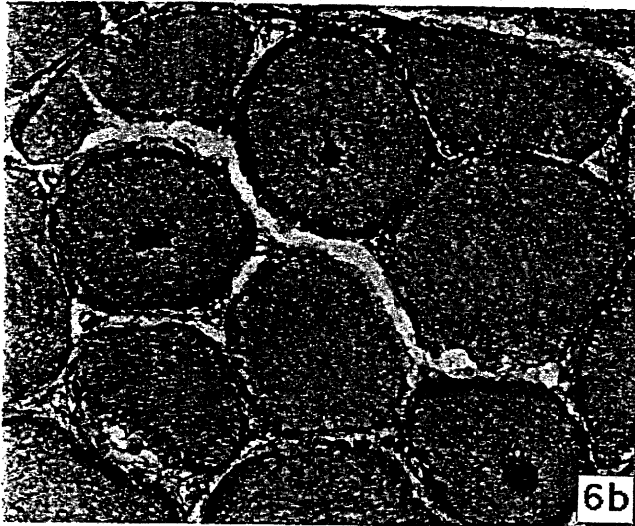
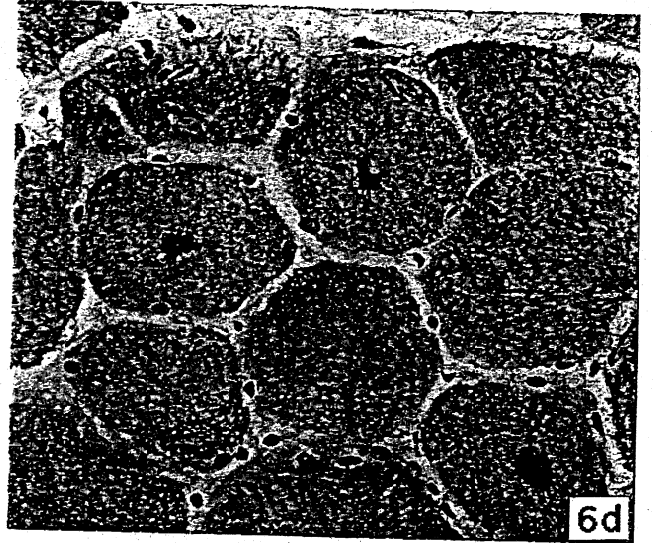
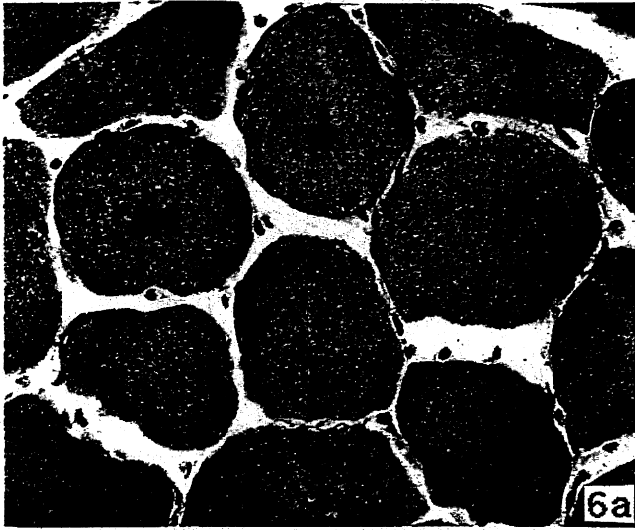
ABC法

6f) 抗コビキチン抗体に対し、コア様構造が陽性を示す。

ABC法

6a)~6f) 231倍

# Plate 4



## Plate 5

### Fig. 7 保因牛横隔膜筋凍結切片、免疫染色

7a) 筋変性が著しく、筋線維の辺縁部および、中心にコア様構造が  
みとめられる。 H-E染色

7b) 抗デスミン抗体に対し、コア様構造周囲と、コアを持つ筋線維の  
膜下が陽性を示す。 ABC法

7c) 抗ビメンチン抗体に対し、コア様構造は弱陽性を示す。  
ABC法

7d) 抗アクチン抗体に対し、コア様構造は陽性を示す。  
ABC法

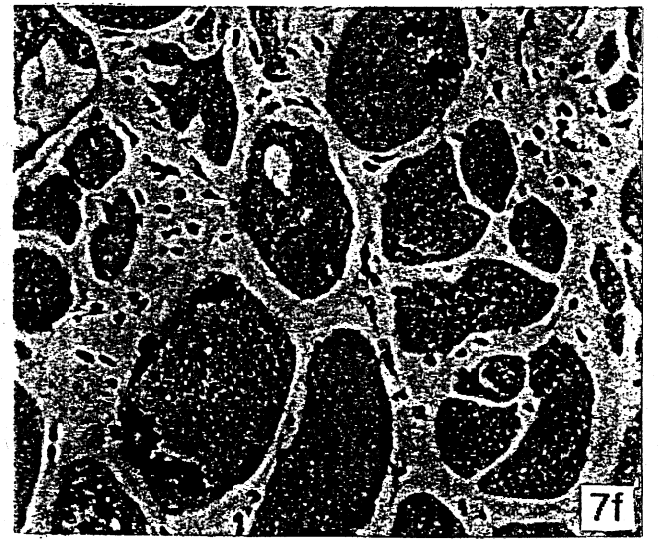
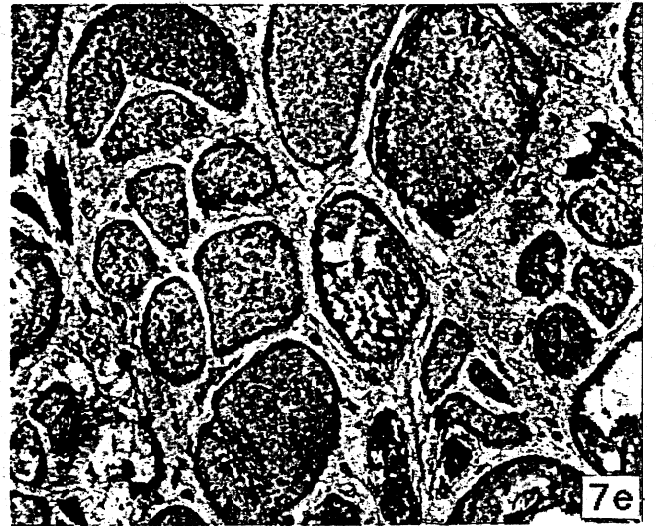
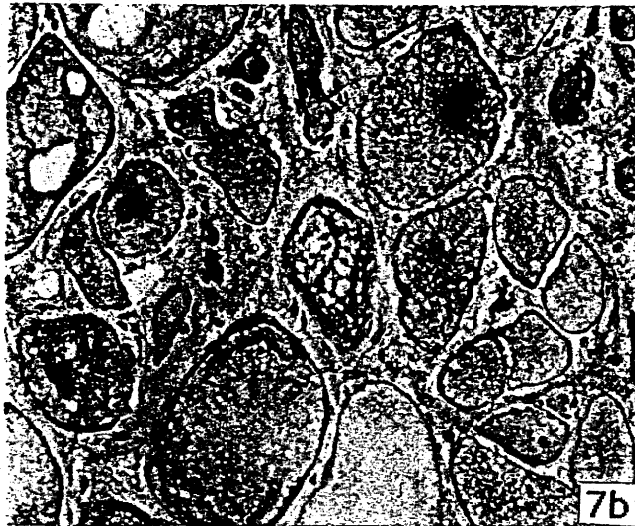
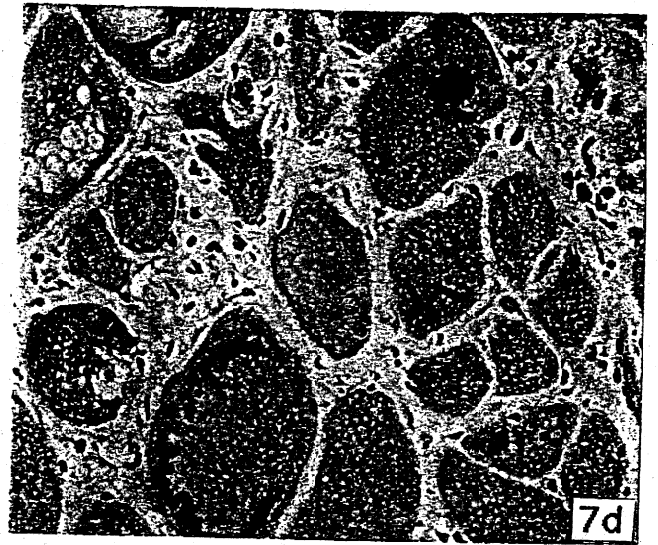
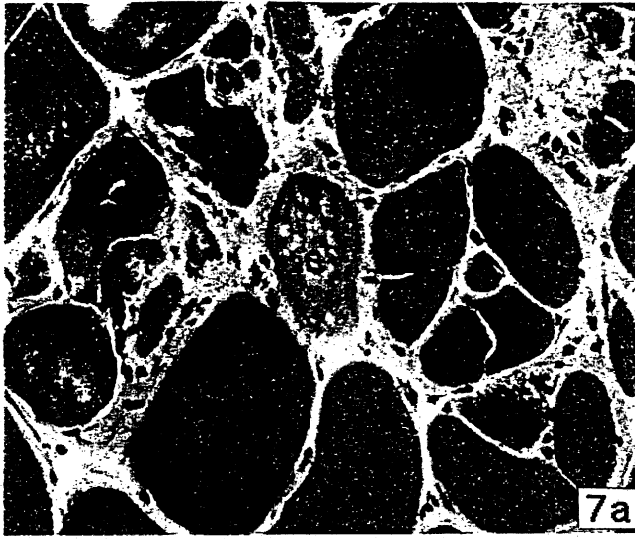
7e) 抗 $\alpha$ -アクチニンに対し、コア周囲が強陽性を示す。  
ABC法

7f) 抗コビキチン抗体に対し、コア様構造が陽性を示す。  
ABC法

6a)~6f) 230倍



# Plate 5



## Plate 6

### Fig. 8 保因牛横隔膜筋電子顕微鏡写真

8a) 横隔膜筋腰椎部、横断像

筋線維中央に高電子密度のコア様構造が認められる。

8b) 横隔膜筋腰椎部、横断拡大像

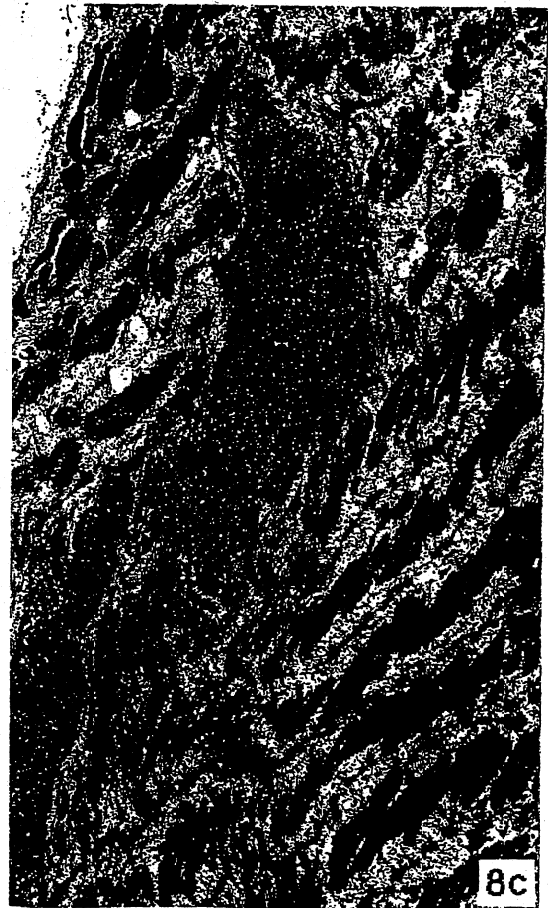
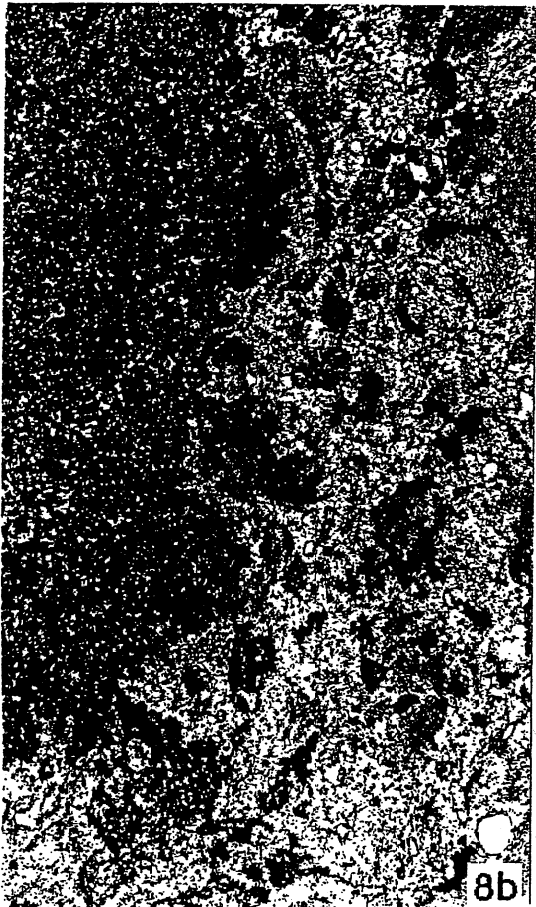
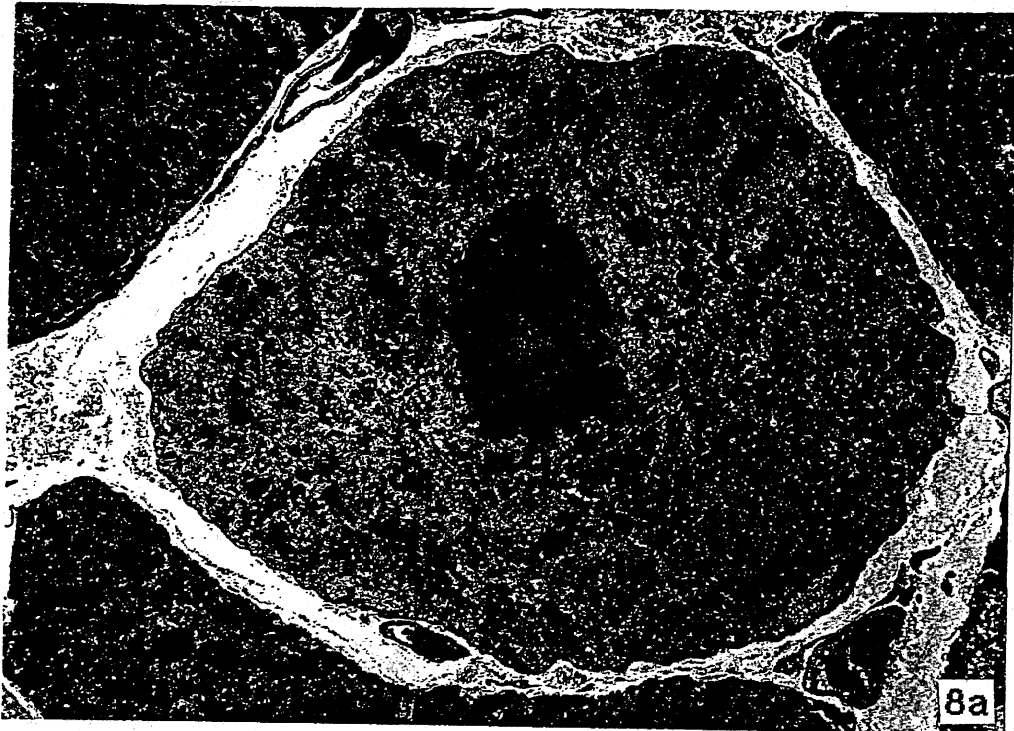
コア様構造はフィラメント様物質の凝集像として認められる。

8c) 横隔膜筋腰椎部、縦断像

Z帯の蛇行や肥厚が認められる。また、Z帯がそのままコア様構造に連続しているように見える部位が認められる。

8a) 2,300 倍 8b) 12,000 倍 8c) 3,500 倍

# Plate 6



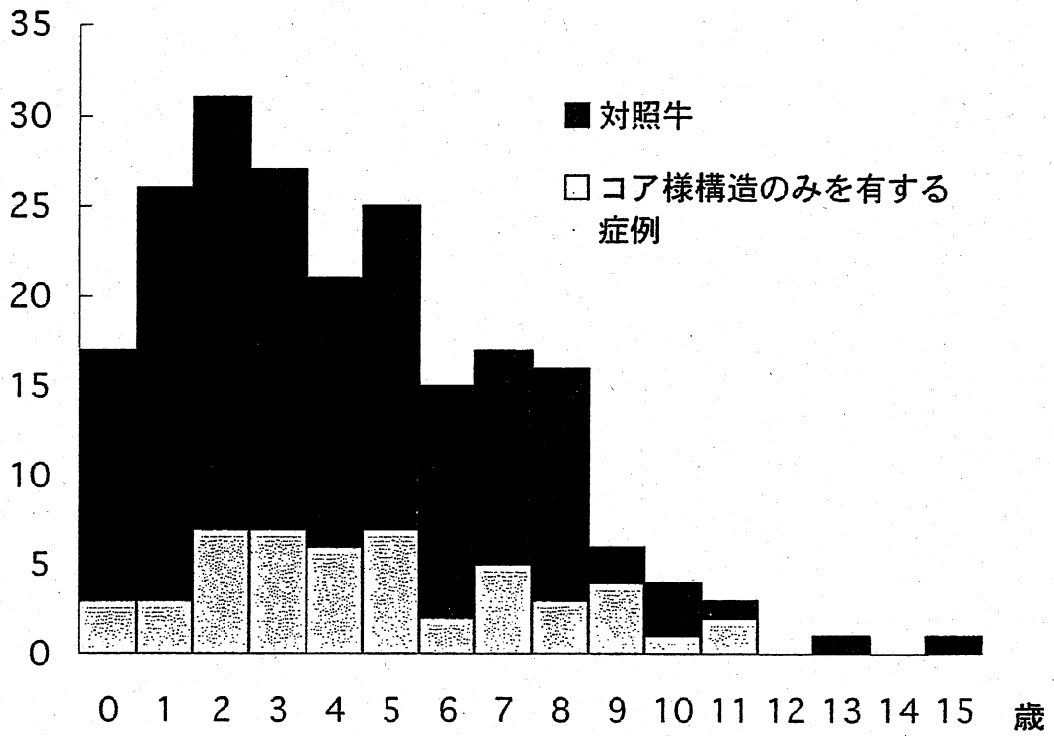
# Plate 7

## Fig. 9 年齢分布表

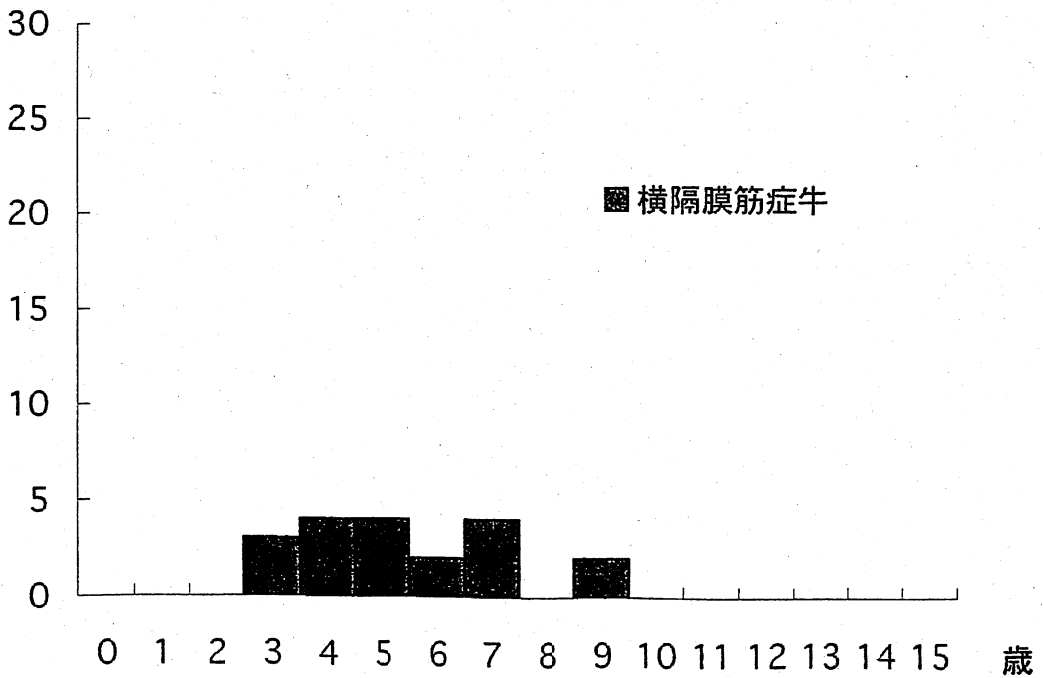
- 上) 横隔膜筋に異常所見の認められなかった対照牛と、  
コア様構造をゆうする症例の年齢分布
- 下) 遺伝性横隔膜筋症と診断された牛の年齢分布

# Plate 7

例数



例数

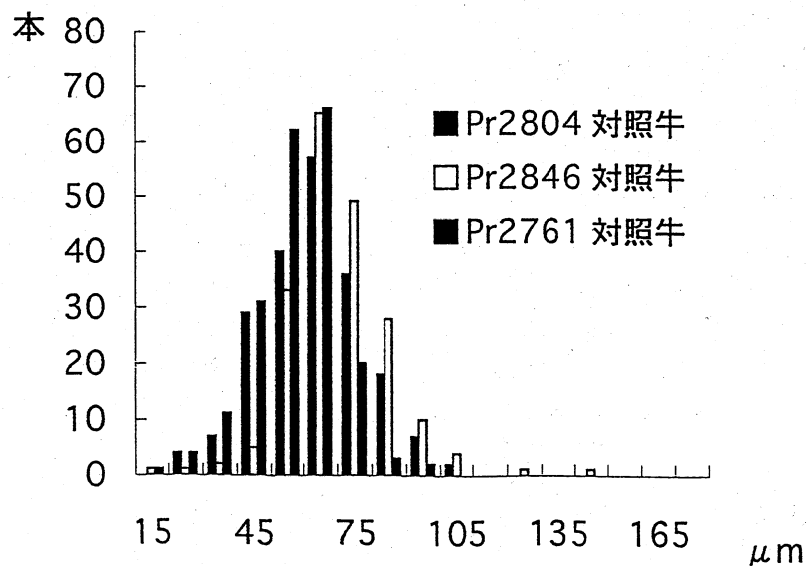
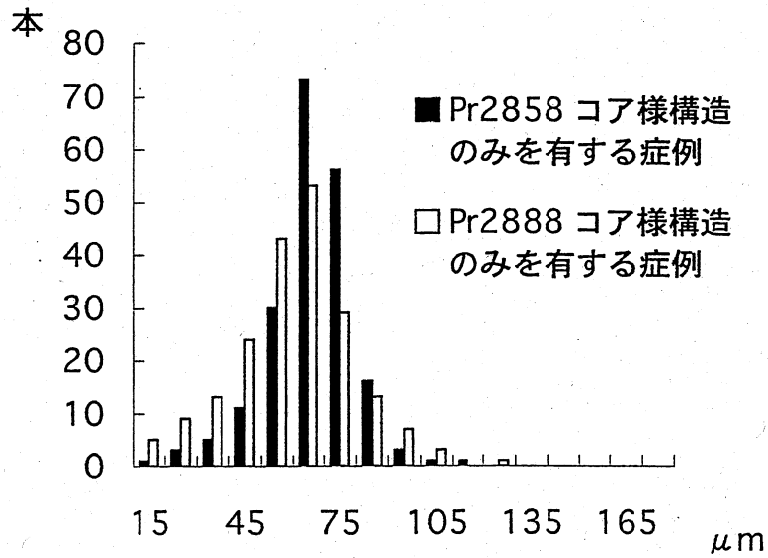
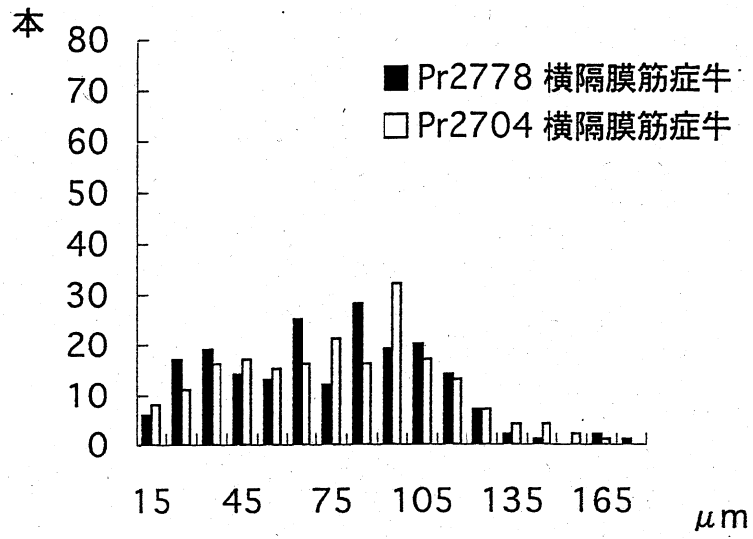


## Plate 8

### Fig. 10 筋線維直径

- 上) 横隔膜筋症牛の筋線維の直径。二峰性のグラフになっている。
- 中) コア様構造を有する症例の筋線維直径。対照牛と差は見られない。
- 下) 対照牛の筋線維の直径。

# Plate 8



# Plate 9

## Fig. 11 免疫ブロット法の結果

11a) ウエスタンブロット、作製した抗横隔膜筋症抗体の各筋材料に対する反応像

横隔膜筋症患者の横隔膜筋試料 1, 2では、55 kda, 65 kda付近に濃く染色

される特異的なバンドが認められた (←)

抗体希釈 2,000 倍

11b) ウエスタンブロット、作製した抗対照牛抗体の各筋材料に対する反応像

横隔膜筋症患者の横隔膜筋試料 1, 2では、85 kda 付近に薄く染色されるバ

ンドが認められた (←)。

抗体希釈 2,000 倍

1. 対照牛 1 (Pr2780)、 2. 対照牛 2 (Pr2873)、

3. 保因牛 1 (Pr2765)、 4. 保因牛 2 (Pr2944)

5. 横隔膜筋症 1 (Pr2516)、 6. 横隔膜筋症 2 (K6833)

ゲル濃度 10.0 %



# Plate 9

kDa

200 -

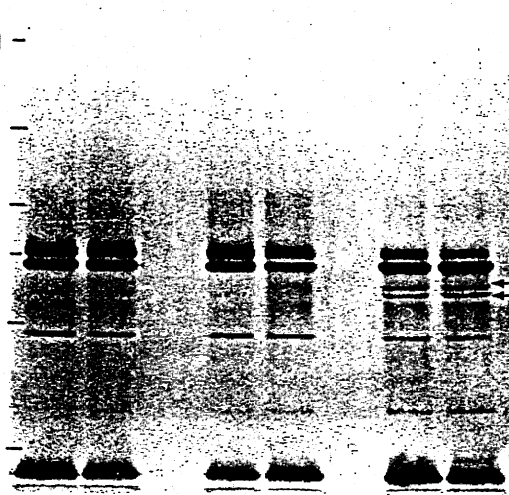
130 -

100 -

75 -

45 -

30 -



1

2

3

4

5

6

11a

kDa

200 -

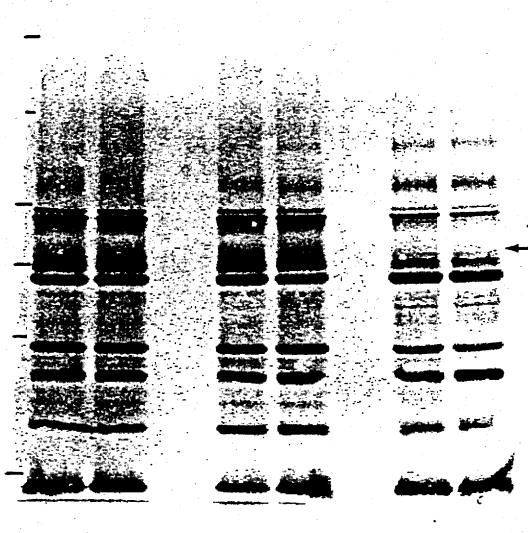
130 -

100 -

75 -

45 -

30 -



1

2

3

4

5

6

11b

**Hereditary Dilated Cardiomyopathy in Holstein-Friesian Cattle  
in Japan: Association with Hereditary Myopathy of the  
Diaphragmatic Muscles**

### Summary

This report deals with the pathology and the genetic basis of ten Holstein-Friesian cows (3-6 years old) diagnosed as the dilated cardiomyopathy. Since the late 1990s, we encountered a considerable number of cases of the dilated cardiomyopathy, which showed systemic circulatory failure as a result of the cardiac insufficiency as a main clinical symptom. This disorder thought to be consistent with bovine dilated cardiomyopathy reported in Simmental-Red Holstein and Holstein-Friesian cattle in several countries. Macroscopically, the affected cows showed a prominent cardiomegaly, severe congestion and fibrosis of liver, and systemic cardiac edema. By histology, the myocardium revealed hypertrophy and vacuolation of the cardiac muscle fibers and severe fibrosis. Electron microscopically, sarcoplasm of the hypertrophic fibers was filled with the fine structures showing low density, together with thin filamentous materials, suggesting myofibrillar lysis. The mitochondria showed increased size, abnormal cristae pattern and vacuolation due to partial loss of cristae. Pedigree analysis of affected cattle indicated an autosomal recessive mode of inheritance. In addition to these findings, we noticed that the family line of this cardiomyopathy overlapped with the one of the hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle (the pathological aspects and the inheritance mode have been previously reported), although those disorders exhibit a varying pathology. With providing detailed electron microscopical findings of the cardiomyopathy, the present study

documents and discusses the genetic basis which supports those different phenotypes appearing from one family tree.

### Introduction

In cattle, dilated cardiomyopathy showing systemic circulatory failure related to the cardiac insufficiency as the main clinical symptom has been reported in Red-Red Holstein and Holstein-Friesian cattle in Switzerland (Martig and Tschudi, 1985, Martig *et al.*, 1982, Tontis *et al.*, 1990), and Holstein-Friesian cattle in Canada (Baird *et al.*, 1986), Australia (Baird, 1988, McLennan and Kelly, 1990), Britain (Bradley *et al.*, 1991), Netherlands (Baird, 1988) and Japan (Ishikawa *et al.*, 1984, Ishikawa *et al.*, 1985, Sonoda *et al.*, 1982). The presence of this disorder has been known since the beginning of the 1980s, and recent studies have been made from the standpoint of an animal model for human dilated cardiomyopathy (Eschenhagen *et al.*, 1995, Weekes *et al.*, 1999, Weil *et al.*, 1997). Bovine dilated cardiomyopathy has been described the clinical aspects and the light microscopic features. However, pathological description of the cases is limited and is still incompletely characterized in its electron microscopic features (Bradley *et al.*, 1991, Van Vleet and Ferrans, 1986). Recently, an autosomal recessive mode of inheritance has been reported on bovine dilated cardiomyopathy in Switzerland (Dorf *et al.*, 1998). However, the causative gene or gene product is not entirely clear, although several attempts at concerning its cause have been made (Weekes *et al.*, 1999, Weil *et al.*, 1997). Since the late 1990s, we encountered a considerable number of

case of cardiomyopathy, and examined the pathological conditions on our cases. Additional study might help fully understanding of this disease.

On the other hand, we have previously reported the hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle (Furuoka *et al.*, 1995, Furuoka *et al.*, 1999a and 1999b). The histopathology and clinical symptoms in this myopathy showed the same characteristic features as those found in dystrophy of the diaphragmatic muscles in Meuse-Rhine-Yssel cattle in the Netherlands (Goedegebuure *et al.*, 1983). The myopathy in Holstein-Friesian cattle may have an autosomal recessive mode of inheritance (Furuoka *et al.*, 1995). The main lesions of this myopathy, which are histopathologically characterized by caliber variation, splitting and core-like structures in muscle fibers, are present in the diaphragmatic and intercostal muscles (Furuoka *et al.*, 1995, Furuoka *et al.*, 1999a and 1999b, Goedegebuure *et al.*, 1983). In addition, the largest number of acidophilic inclusions is found in the myocardium. When we analyzed the genetic background of cardiomyopathy cases, we noticed that the family line of this cardiomyopathy overlapped with the one of the hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles. The present study provides detailed documentation on the morphological changes in dilated cardiomyopathy in Holstein-Friesian cattle in Japan and discusses the genetic basis which supports those different disorders appearing from one family tree.

## Materials and Methods

Ten Holstein-Friesian cows (case Nos.C1-C10), 3-6 years old, which pedigree registration were available, were used in this study. Animals were autopsied after euthanasia. The routine blood examination, ultrasound and electrocardiograph studies were performed. Pedigree information from the Holstein Cattle Association of Japan was used to determine the genealogy of the affected cattle. Two cows (3 and 4 years of age) which were clinically free from the cardiac disease were used as controls for clinical and pathological studies.

Tissues samples from the various organs including the diaphragmatic muscles and the skeletal muscles were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections were stained with H&E, PAS and AZAN. For electron microscopy, samples from several portions of the myocardium were immersed in 2.4% phosphate-buffered glutaraldehyde (pH 7.4), post-fixed in 1% phosphate-buffered osmium tetroxide (pH 7.4), dehydrated in ethanol, and embedded routinely in resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with an electron microscope (Hitachi H-7500).

## Results

### *Clinical manifestations*

All cases showed extensive thoracic edema extending ventral portion and the jugular pulse. Although there were no abnormal findings to indicate inflammation in blood and serum examinations, a significant increase in the serum level for  $\gamma$ -GTP probably

caused by liver failure, low serum protein due to hypogammaglobulinemia and anemia were observed throughout all cases. The heart rate in affected animals was 100-103 beats/min at rest (controls 60-80 beats/min), indicating tachycardia. An ultrasound examination of the heart was obtained which revealed a considerably enlargement of both sides of the ventricle and auricle, suggesting cardiomegaly. The electrocardiogram (ECG) using the A-B lead showed the low voltage (0.4-0.5 mV) for the QRS complex (controls 1.0-1.3 mV), and a slight prolongation of the P waves interval.

#### *Genetic Features*

This study has added the pedigree of cattle with cardiomyopathy to the one of cattle with myopathy of the diaphragmatic muscles previously reported (Furuoka *et al.*, 1995) (Fig. 1). The former pedigree could be inserted to the later one, and those pedigrees were compatible with same family line. The pedigree also shows the degree of inbreeding present in the kindred. However, no sire directly produces both animals with cardiomyopathy and with myopathy.

Bull E was a maternal grandfather for each cattle affected cardiomyopathy (C8 and 9) and myopathy (M5 and 6). Bull D, which was a father for bull E, was a common ancestor to many cardiomyopathy cases (C6-10) and myopathy cases (M1, 5, 6 and 10). Bull C, which was a grandfather and father of bull E and D, respectively, was a common ancestor to most cardiomyopathy cases (C6-10) and all myopathy cases (M1-10). Bull B was a common ancestor of most cardiomyopathy cases (C1-3, 5, 7 and 8), which

was also an ancestor to myopathy case (M5). The parents of all affected cows showed clinically normal, and were descended from Bull A, which is a common male ancestor for bull B, C, D and E. In addition, we also encountered two cardiomyopathy cases (14- and 16-month-old) of an affected Holstein-Friesian male beef cattle, but they were excluded from this study because we could not determine the pedigree of these bulls. In this disorder, both female and male are probably affected. This pedigree analysis suggested that both disorders have an autosomal recessive mode of transmission and exist in same family line.

#### *Necropsy Findings*

The heart of all affected cattle showed enlargement, and was pale and flaccid (Fig. 2). In the cross sections, all chambers were massively dilated. The walls were hypertrophic and stiff on palpation.

The other common necropsy findings were the subcutaneous edema in thoracic and ventral portions, severe congestion and fibrosis of liver, hydroperitoneum, edema of the serous membranes and submucosa in the alimentary tract.

#### *Microscopical Findings*

Microscopical alterations were observed in the myocardium in all cases. The most characteristic features were the edematous hypertrophy and vacuolation of the cardiac muscle fibers (Fig. 3). These vacuoles were single or multiple, and usually occupied the center of the fiber. Other prominent feature was endomysial or perimysial fibrosis. Some fibers showed partial splitting, because the basement membrane was invaginated into the



sarcoplasma. Hyalinized fibers showing acidophilic and angular-shape were rarely found. Also seen was nuclear deformation which revealed bizarre- or star-shaped, lobulated or binucleated appearance. Some arteries showed medial hypertrophy and intimal thickening. In some cases, multifocal fibrosis was also observed.

The other main histopathological findings were severe chronic centrilobular congestion in the liver, showing the centrilobular zone disappearance of the hepatocytes and fibrosis. A few alveolar macrophages, some containing haemosiderin, were observed in the lung. Also, some arteries, as seen in the myocardium, showed medial hypertrophy and intimal thickening. In some cases, focal interstitial nephritis with mononuclear cells infiltration and mild fibrosis was also observed. The diaphragmatic muscles and the skeletal muscles from various portions revealed no pathological alterations.

#### *Electron Microscopical Findings*

In the transverse sections, myofibrils revealed various size, and were irregularly distributed in myocardial fibers. In general, the diameter of the myofibrils in the hypertrophic fibers was relatively smaller than in the fibers seen to be normal (Fig. 4). Sarcoplasm of the hypertrophic fibers was filled with the fine structures showing low density, together with thin filamentous materials, suggesting myofibrillar lysis (Fig. 5). Also, sarcoplasm in the perinuclear area was severely affected. Degenerative changes with prominent central loss of myofilaments, including myelin figures, increased lipid droplets, and

autophagic vacuoles, were also observed. The most characteristic features were abnormalities of the mitochondria which showed no significant increase in number (Fig. 6). The mitochondria showed increased size, abnormal cristae pattern and vacuolation due to partial loss of cristae, which finally seemed undergo complete disintegration. In some myocardial fibers, the myofibrils and sarcoplasm revealed almost normal, but the mitochondria abnormalities were noted. Increased endomysial collagen was evident in all cases, and the basement membrane invagination into the sarcoplasm was frequently observed (Fig. 7). Longitudinal sections revealed the splitting of myofibrils, and the streaming or disintegration of the Z disks. This alteration of Z disks extended into the adjacent I and A bands, and became continuous with following Z disks (Fig. 8).

### **Discussion**

The disease under this study is thought to be inherited as an autosomal recessive trait and is characterized by the myocardial alterations associated with circulatory failure. Systemic edema thought to be the cardiac edema resulting from the elevation of the central venous pressure. Also, the liver and lung lesions were regarded as the reflection of cardiac failure. The pathological alterations and clinical symptoms in the present cases are similar to those of cardiomyopathies reported in Switzerland (Martig and Tschudi, 1985, Martig et al., 1982, Tontis et al., 1990), Canada (Baird et al., 1986), Australia (Baird, 1988, McLennan and Kelly, 1990), Britain (Bradley et al., 1991),

Netherlands (Baird, 1988) and Japan (Ishikawa *et al.*, 1984, Ishikawa *et al.*, 1985, Sonoda *et al.*, 1982). The light microscopic features of this disorder are well characterized (Bradley *et al.*, 1991, Ishikawa *et al.*, 1984, Ishikawa *et al.*, 1985, Tontis *et al.*, 1990). The common features are hypertrophic and nonspecific degenerative changes together with diffuse interstitial fibrosis involving both ventricles. In addition, the nuclear abnormalities were also reported (Ishikawa *et al.*, 1984). In contrast to the many light microscopic studies, there are only a few reports of ultrastructural lesions in this disorder (Bradley *et al.*, 1991, Van Vleet and Ferrans, 1986).

Ultrastructural studies showed splitting of myofibrils, mitochondrial swelling, intracellular edema, increase in Z-band material, and increased numbers of mitochondria (Van Vleet and Ferrans, 1986). These features were also noted in the human dilated cardiomyopathy (Scholz *et al.*, 1994, Schaper *et al.*, 1991). In addition, these authors noted myofibrillar lysis and the decrease of myofilaments, ranging from rarefaction to complete absence of sarcomeres in cells filled with unspecified cytoplasm. In our cattle, various abnormalities of mitochondria without significant increase in number were the most common ultrastructural findings. Myofibrillar lysis or splitting of myofibrils, increased endomysial collagen and the basement membrane invagination into the sarcoplasm were also noted. Recent proteomic analysis using two-dimensional electrophoresis has identified significant reductions in many mitochondrial proteins in bovine dilated cardiomyopathy (Weekes *et al.*, 1999).

This proteomic alteration is consistent with our ultrastructural findings which represented various mitochondrial abnormalities. These things suggested that the myocardium is unable to provide enough energy to cope with the increased mechanical stresses (Weekes *et al.*, 1999). Although hypertrophy of cardiac fibers is generally accepted to be induced by the compensation for the functional failure in the individual fiber, we could not demonstrate the increased numbers of cell organelle, especially mitochondria, suggesting increased protein synthesis or myocardial hyperfunction. Our electron microscopy suggested that hypertrophy of the fibers consisted of small sized myofibrils might reflect the degenerative processes represented by myofibrillar lysis. Subsequently, the basement membrane invagination into the sarcoplasm of the hypertrophic or degenerative fibers, with resulting the fiber splitting seemed to be induced, which are observed in various myopathic disorders as nonspecific reactions. However, it is not clear whether such degenerative changes including disintegration of the Z disks are the primary event in the pathogenesis of this cardiomyopathy, since these ultrastructural alterations were not the specific or characteristic features only in this disorder.

In some of papers dealing with bovine dilated cardiomyopathy, pedigree analyses of affected animals revealed Holstein bull "ABC Reflection Sovereign" as the common ancestor (Martig *et al.*, 1982). The gene pool in Japanese Holstein-Friesian cattle is large because the several hundred sires and a large number of the semen for the artificial insemination imported from U.S.A. and Canada

have been introduced every year. Nevertheless our pedigree ascends a common ancestor "bull A", which is also "ABC Reflection Sovereign". On the one hand, the evidence for autosomal recessive inheritance was strongly indicated by the segregation analyses of the experimental bovine dilated cardiomyopathy herd (Dorf *et al.*, 1998). These findings suggested that the dilated cardiomyopathy described here is apparently identical with the disorder seen in various countries.

On the other hand, cardiac involvement has been reported in various myopathies including dystrophinopathies, X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy, myotonic dystrophy, distal myopathies and congenital myopathies (Engel and Franzini-Armstrong, 1994). Recently, missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene have been identified as a genetic cause for autosomal dominant dilated cardiomyopathy (Fatkin *et al.*, 1999). Also, this lamin A/C gene causes autosomal dominant form of Emery-Dreifuss muscular dystrophy (Bonne *et al.*, 1999). In the hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles, the largest number of acidophilus intracytoplasmic inclusions was found in the myocardium, which was as the hallmark of the disease (Furuoka *et al.*, 1999, Goedegebuure *et al.*, 1983). This inclusions, and the core-like structure seen in the diaphragmatic muscles thought to be the pathognomonic and principle alteration in this myopathy. These facts gave rather support to the consequence of our pedigree analysis that both dilated cardiomyopathy and myopathy of the diaphragmatic muscles originate from the same family line, although these disorders are pathologically classified to

distinct phenotypes. At present we could not yet demonstrate direct or indirect evidence in genes or gene products, however, it was not possible to deny that both disorders might have a common pathophysiological background or genotype. Further genetic studies are needed to ascertain the link between these two conditions.

#### **Acknowledgement**

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (no.11660307) from Japan Society for the Promotion of Science.

#### **References**

Baird, J. D. (1988). Dilated cardiomyopathy in Holstein cattle. In: *Proceedings of the Sixth Annual Veterinary Medical Forum, Washington DC, 1988*. American College of Veterinary Internal Medicine, 175-177.

Baird, J. D., Maxie, M. G., Kennedy, B. W. and Harris, D. J. (1986). Dilated (congestive) cardiomyopathy in Holstein cattle in Canada: genetic analysis of 25 cases. In: *Proceedings of the 14th World Congress on Diseases of Cattle, Dublin, 1986*. Irish Veterinary Association, Dublin, Ireland, 89-94.

Bonne, G., Barletta, M. R., Varnous, S., Becane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C. R., Gary, F., Urtizberea, J. A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D. and Schwartz, K. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy.

*Nature Genetics*, 21, 285-288.

Bradley, R., Jefferies, A. R., Jackson, P. G. G. and Wijeratne, W. V. S. (1991). Cardiomyopathy in adult Holstein Friesian cattle in Britain. *Journal of Comparative Pathology*, 104, 101-112.

Dorf, G., Stricker, C., Tontis, A., Martig, J. and Gaillard, C. (1998). Evidence for autosomal recessive inheritance of a major gene for bovine dilated cardiomyopathy. *Journal of Animal Science*, 76, 1824-1829.

Engel, A. G. and Franzini-Armstrong, C. (1994). In: *Myology*, 2nd edn., Vol. 2, McGraw-Hill, New York, pp.1130-1289.

Eschenhagen, T., Deiderich, M., Kluge, S. H., Magnussen, O., Mene, U., Müller, F., Schmitz, W., Scholz, H., Weil, J., Sent, U., Schaad, A., Scholatysik, G., Wuthrich, A. and Gaillard, C. (1995).

Bovine hereditary cardiomyopathy : an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 27, 357-370.

Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H. J. Jr., Spudich, S., De Girolami, U., Seideman, J. G., Muntoni, F., Muehle, G., Johnson, W. and McDonough, B. (1999). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *New England Journal of Medicine*, 341, 1715-1724.

Furuoka, H., Doi, T., Nakamura, N., Inada, I., Osame, S. and Matsui, T. (1995). Hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. *Acta Neuropathologica*, 90, 339-346.

Furuoka, H., Murakami, A., Tsuchihashi, M., Yokota, H., Doi, T.,

Kobayashi, Y., Matsui, T., Horiuchi, M. and Taniyama, H. (1999a). Immunohistochemical study of some cytoskeletal proteins in hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. *Acta Neuropathologica*, 97, 177-184.

Furuoka, H., Murakami, A., Doi, T., Kobayashi, Y., Matsui, T. and Nakamura, N. (1999b). Immunohistochemical and electron microscopical studies of myocardial inclusions in hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. *Acta Neuropathologica*, 97, 185-191.

Goedegebuure, S. A., Hartman, W. and Hoebe, H. P. (1983). Dystrophy of the diaphragmatic muscles in adult Meuse-Rhine-Yssel cattle: electromyographical and histological findings. *Veterinary Pathology*, 20, 32-48.

Ishikawa, S., Kamimura, U., Yamamoto, Y., Une, Y., Shiota, K., Nomura, Y. and Saito, Y. (1984). Pathological observation on so-called idiopathic congestive cardiomyopathy in cattle. *Bulletin of Azabu University, Veterinary Medicine*, 5, 39-48 (Japanese with English summary).

Ishikawa, S., Kamimura, U., Yamamoto, Y., Une, Y., Shiota, K., Nomura, Y. and Saito, Y. (1985). Pathological observation on dilated cardiomyopathy in Holstein -Friesian cattle. A report of a milch cow suffered in nonlactational period and two steer cases. *Bulletin of Azabu University, Veterinary Medicine*, 6, 37-45 (Japanese with English summary).

Martig, V. J. and Tschudi, P. (1985). Further cases of cardiomyopathy in cattle. *Dtsch Tierärztl Wschr*, 92, 345-348.

Martig, J., Tschudi, P., Perritaz, C., Tontis, A. and Luginbühl,



- H. (1982). Incidence of cardiac insufficiency in cattle: preliminary report. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 124, 69-82.
- McLennan, M. W. and Kelly, W. R. (1990). Dilated (congestive) cardiomyopathy in a Friesian heifer. *Australian Veterinary Journal*, 67, 75-76.
- Scholz, D., Diener, W. and Schaper, J. (1994). Altered nucleus/cytoplasm relationship and degenerative structural changes in human dilated cardiomyopathy. *Cardioscience*, 5, 127-138.
- Schaper, J., Froede, R., Hein, S., Buck, A., Hashizumi, H., Speiser, B., Friedl, A. and Bleese, N. (1991). Impairment of the myocardial ultrastructure and change of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 83, 504-514.
- Sonoda, M., Takahashi, K., Kurosawa, T., Matsukawa, K. and Chihaya, Y. (1982). Clinical and clinico-pathological studies on idiopathic congestive cardiomyopathy in cattle. In: *Proceedings of the 12th World Congress on Diseases of Cattle, Amsterdam, 1982*. Dutch Association for Buiatrics, Utrecht, Netherlands, 1187-1191.
- Tontis, A., Zwahlen, R., Lobsiger, C. and Luginbühl, H. (1990). Pathology of bovine cardiomyopathy. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 132, 105-116.
- Van Vleet, J. F. and Ferrans, V. J. (1986). Myocardial disease of animals. *American Journal of Pathology*, 124, 98-178.
- Weekes, J., Wheeler, C. H., Yan, J. X., Weil, J., Eschenhagen, T., Scholtysik, G. and Dunn, M. J. (1999). Bovine dilated

cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis*, 20, 898-906.

Weil, J., Eschenhagen, T., Magnussen, O., Mittmann, C., Orthey, E., Scholz, H., Schafer, H. and Scholtysic, G. (1997). Reduction of myocardial myoglobin in bovine dilated cardiomyopathy.

*Journal of Molecular Cell Cardiology*, 29, 743-751.

### Figure Legends

**Fig. 1.** Pedigree of cattle with cardiomyopathy and myopathy of diaphragmatic muscles. Male A is common ancestor to all cattle. Male B is a common ancestor of most of the cattle displaying cardiomyopathy (C1-3, 5, 7 and 8), and is also an ancestor of one animal displaying myopathy (M5). Male C, which is the grandfather of male E and the father of male D, is a common ancestor of most of the cattle displaying cardiomyopathy (C6-10) and all of the cattle displaying myopathy (M1-10).

**Fig. 2.** Cross section of heart with cardiomyopathy. Both ventricular chamber are massively dilated with hypertrophy of left ventricular wall.

**Fig. 3.** Paraffin sections of left ventricular myocardium from affected cattle. **a** Most cardiac fibers show hypertrophy. Some fibers have single or multiple vacuoles, H&E staining. **b** Endomysial or perimysial fibrosis is apparent. Hypertrophic fibers show partial splitting resulting from the basement membrane invagination, AZAN staining. **a**  $\times 190$ ; **b**  $\times 480$

**Fig. 4.** Electron micrographs of left ventricular myocardium from affected cattle. **a** Myofibrils of various sizes are evident, and these are irregularly distributed in myocardial fibers. **b** The sarcoplasm of the hypertrophic fibers is filled with fine structures and with thin filamentous materials. Invagination of the basement membrane into the sarcoplasm is observed (arrowhead). The mitochondria show increased size, an abnormal cristae pattern, and vacuolation or complete disintegration due to partial loss of cristae. **c** The nuclear membrane show irregularly

indentation, and the sarcoplasm in the perinuclear area is severely affected. **d** Z disk streaming is observed, which is widened and occasionally extends into the adjacent I and A bands or the following Z disk. Bars **a** =  $2\mu\text{m}$ , **b** =  $1\mu\text{m}$ , **c** =  $1.5\mu\text{m}$ , **d** =  $0.8\mu\text{m}$

Fig. 1

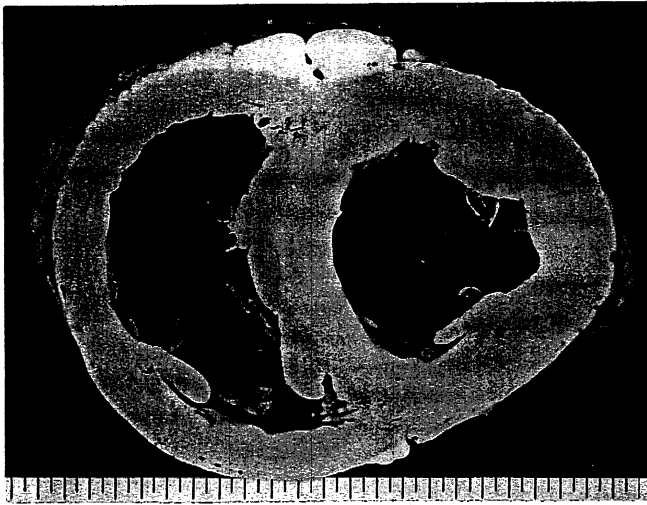
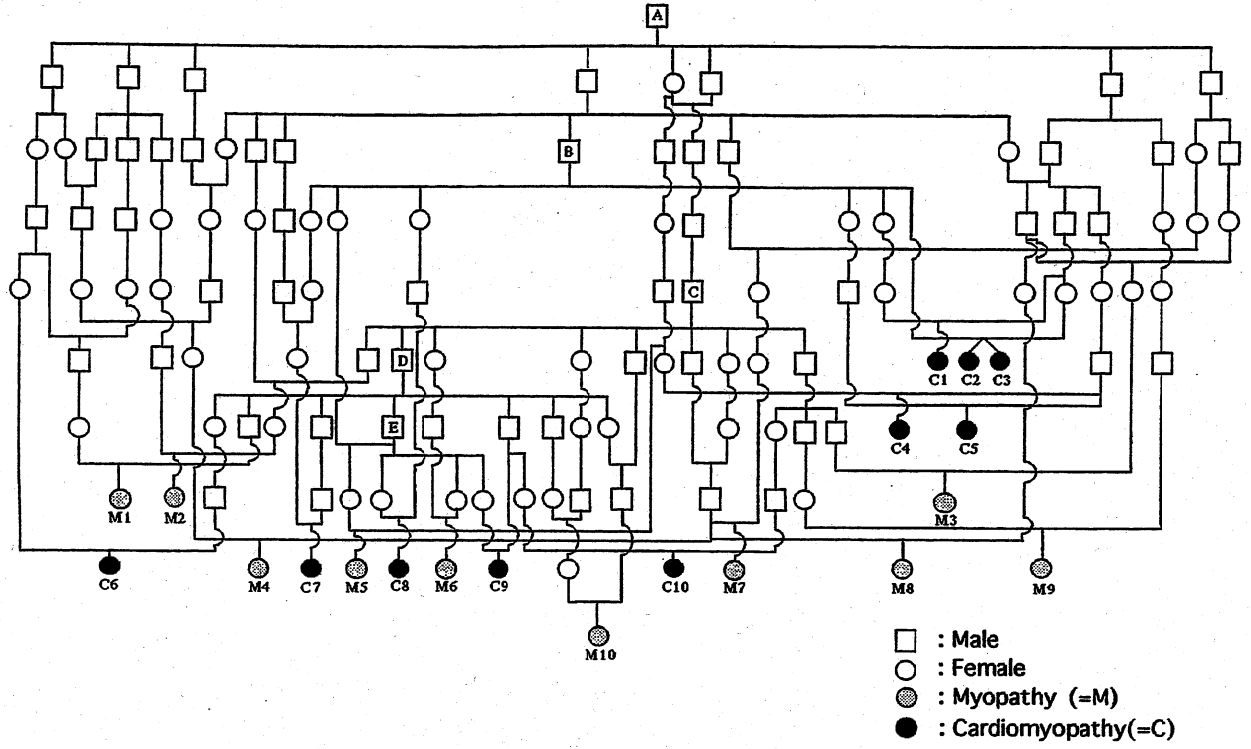
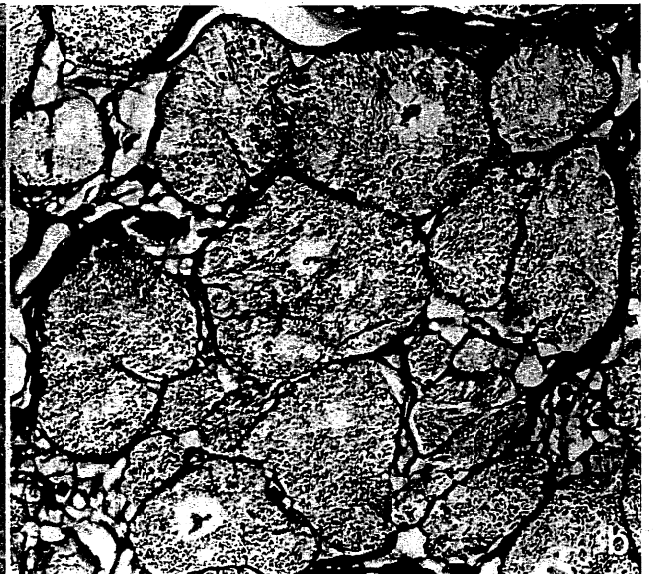
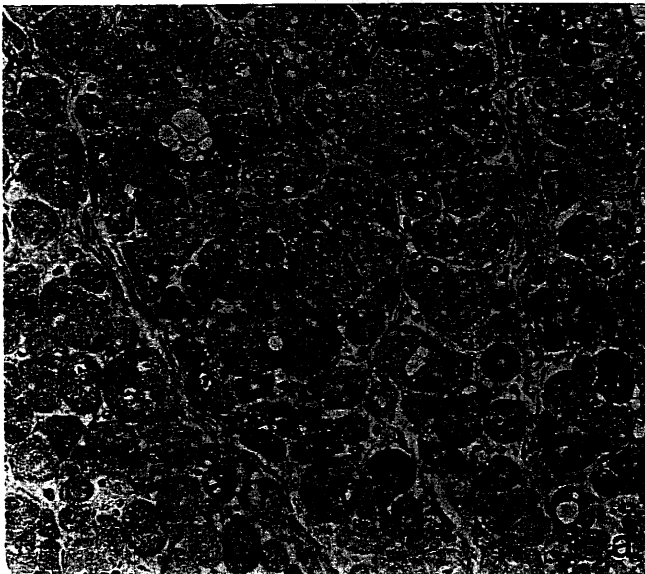


Fig. 2

Fig. 3a 3b



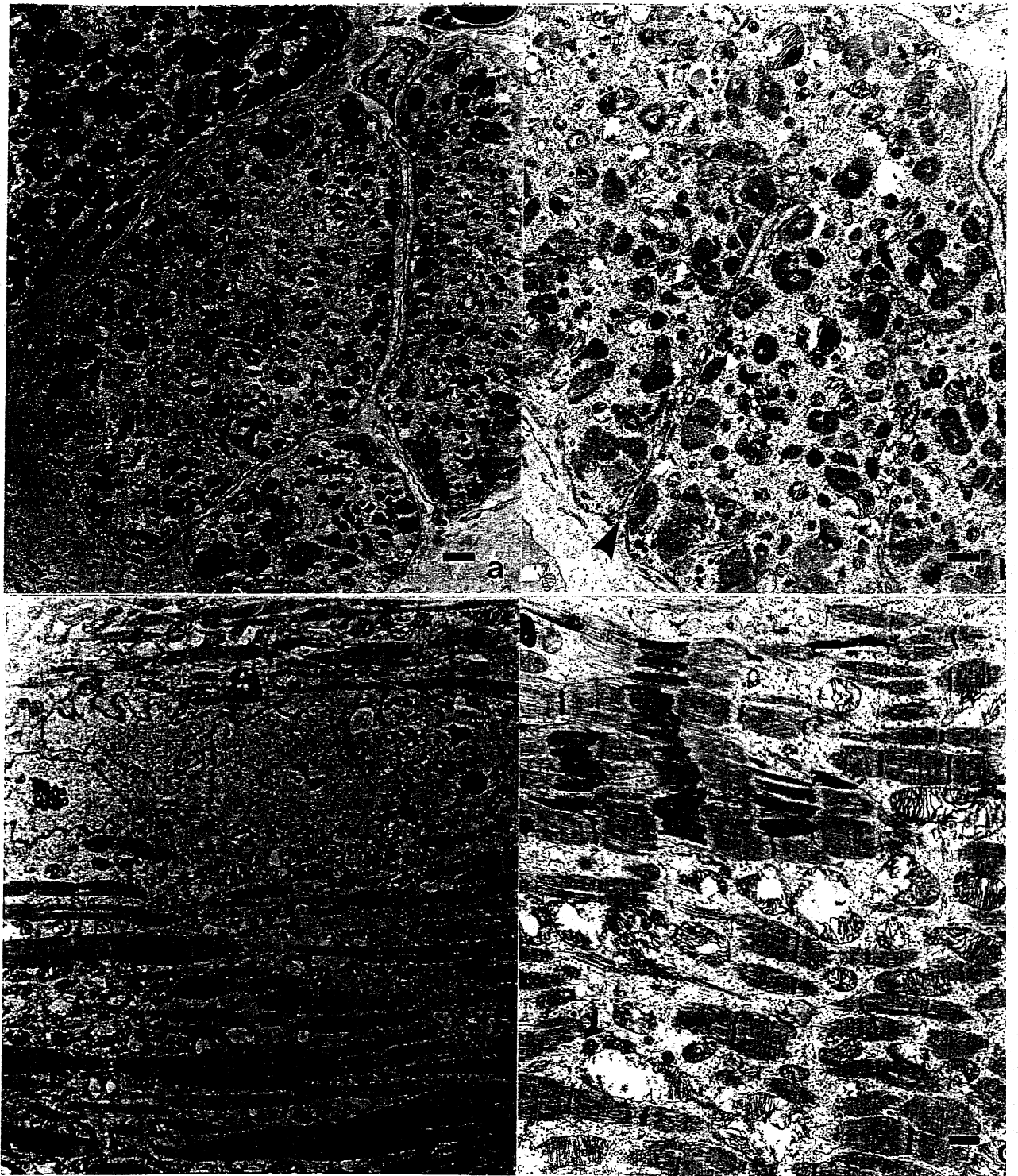


Fig. 4

