

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08072

研究課題名(和文) 子牛の未解明神経疾患に関する病理発生機序解析

研究課題名(英文) Pathogenesis study of neurological diseases in calves

研究代表者

古林 与志安 (Kobayashi, Yoshiyasu)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：20301971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウシにおいても、脳室周囲白質軟化、大脳皮質層状壊死および両側対称性脳軟化(基底核壊死)が周産期脳障害としてみられることを示した。また、これら病変の描出に神経傷害マーカーの Fluoro Jade C や軸索変性マーカーである Alzheimer precursor protein A4 や低酸素マーカーである Hypoxia inducible factor-1a および血管内皮細胞増殖因子が有用であることを明らかにした。明瞭な形態変化を伴わない神経疾患の一部の症例では、これらマーカーを用いて病変が描出可能であることを示した。また、ウシの小脳皮質変性症の病理組織学的特徴像を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで良く知られていなかった周産期脳障害がウシにも存在することが明らかになった。また、神経傷害マーカーや低酸素マーカーがウシでも適用できることを示すと同時に、ウシの小脳皮質変性症の特徴所見を明らかにすることができた。これらの知見は、今後の症例診断に有用な情報を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that periventricular leukomalacia, cerebral cortical necrosis, and bilateral focal symmetrical encephalomalacia (necrosis of basal ganglia) were seen also in cattle as perinatal brain damages. Fluoro Jade C, a nerve injury marker, Alzheimer precursor protein A4, an axonal degeneration marker, and Hypoxia inducible factor-1a and vascular endothelial growth factor, both a hypoxic marker, were useful for detecting these lesions. These markers were useful to visualize the lesions of an encephalopathy without obvious histopathological changes in some cases. Histopathological features of bovine cerebellar cortical degeneration were also clarified in the present research.

研究分野：獣医病理学

キーワード：周産期脳障害 神経傷害マーカー 低酸素マーカー 小脳皮質変性症 ウシ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子牛の神経疾患には、感染症、中毒、遺伝等によるものが知られているが、未だ不明な点が多い。医学領域では、周産期脳障害という概念が存在し、患児の生命予後に関わるために、活発な研究が展開されている。医学領域での周産期脳障害とは、出生前、出生中および出生後に循環障害、代謝障害、感染或いは外傷などによって生じる胎児の脳疾患を総称する概念であるが、中でも低酸素性虚血性脳障害が問題となる。胎児仮死や新生児仮死に続いて生じる低酸素性虚血性脳障害の病変は、負荷の程度、持続時間や組織の成熟度(胎齢)などの組合せなどにより様々であり、脳室周囲白質軟化(Periventricular leukomalacia: PVL)、皮質下白質軟化、びまん性白質軟化、大脳皮質層状壊死、基底核壊死、脳幹壊死、橋鉤状回壊死などが、単独または複合して認められるとされている。一方、獣医学領域では、ウマでヒトの低酸素性虚血性脳障害と類似する病態が存在することが知られているが、様々な病態を一纏めにして低酸素性/虚血性脳症として扱われており、病理像について詳細に検討した報告はない。その他の動物では、低酸素性虚血性脳障害に関する体系的な研究はほとんどなされておらず、ヒツジやネコで少数の症例報告がなされているに過ぎない。

近年になって、ウシでも新生児仮死がクローズアップされ、蘇生方法を含めた臨床的な研究が実施され始めている。しかしながら、致死的な経過をたどった症例の中枢神経病変について体系的な研究は実施されていない。帯広畜産大学では、神経疾患が疑われる子牛を積極的に収集し、生前検査を含めた詳細な病態解析を実施している。そのような活動の中で、申請者らはPVLを含めた人の低酸素性虚血性脳障害と類似する病変を有する症例を少数例ではあるが確認し、PVL症例については、論文として公刊した。従って、ウシの低酸素性虚血性脳障害は、正確に認知されていないだけで、重要な病態であると推察され、早急な調査・解明が必要であると考え、本研究を企画した。

また、子牛の神経疾患の中には、症例間で概ね同一の病理像を示し、一連の疾患であることが疑われるものの、未解明の病態が複数存在する。その1つに、小脳皮質変性症がある。小脳皮質変性症は、遺伝性疾患としても発生するが、ウシでは中毒や牛ウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)に関連する病態の存在も知られている。本病態が集団発生した場合は、これら原因による発生が疑われるものの、実際には稀有症例としての孤発例が大半を占めており、孤発症例を対象とした原因検索や病理発生機序に関する体系的な研究は実施されていない。申請者らは、複数の孤発例を経験しており、本病態の病理発生機序解析を着想した。

また、子牛では、BVDVの先天性感染を示唆するような運動失調が生時よりみられる子牛を病理検査し、通常の病理検索では明らかな責任病変が見出せない症例(明瞭な形態変化を伴わない神経疾患)が存在することが知られており、このことは動物神経病理学の成書にも記載されている。しかしながら、本病態について、通常の病理検索手技以外の方法を用いた詳細な検討はなされていない。申請者の研究室においても、同様の病態を複数例で経験している。

2. 研究の目的

上述のような病態に焦点を当て、1) 子牛の周産期脳障害の病理像をその病理発生機序とともに明らかにすること、および2) 小脳皮質変性症や明瞭な形態変化を伴わない神経疾患のような同様の病理像を呈する未解明疾患の病理発生機序を解明することを目的とした体系的な研究を行うため、本研究を企画した。また、本研究では、研究期間内に収集した神経症状を呈する症例を病理学的に詳細に検索することにより、3) 新規病態の探索にも取り組む。

3. 研究の方法

(1) 子牛の周産期脳障害に関する病態・病理発生機序解明

①新生子牛の大脳皮質層状壊死の病態・病理発生機序の解明

2例について、詳細な病理組織学的並びに免疫組織化学的検索を行うとともに、原因学的な検索として、BVDV感染、チアミン欠乏などの低酸素性虚血性脳障害以外の原因関与の有無の検討を実施した。

②新生子牛の両側対称性脳軟化(基底核壊死)の病態・病理発生機序の解明

2例について、詳細な病理組織学的並びに免疫組織化学的検索を行うとともに、原因学的な検索として、BVDV感染、エンテロトキセミアなどの低酸素性虚血性脳障害以外の原因関与の有無の検討を実施した。

(2) 周産期脳障害症例を用いた各種マーカーの有用性の検討

「明瞭な形態変化を伴わない神経疾患」の病態・病理発生機序解明を行うための前準備として、上述の周産期脳障害症例を用いて、低酸素下で発現が誘導されるマーカーである低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor-1 α : HIF-1 α)および血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)、神経細胞傷害マーカーであるFluoro Jade C (FJC)、並びに軸索変性マーカーであるAlzheimer precursor protein A4 (APP)の子牛の神経疾患に対する有用性を検討した。

(3) 未解明神経疾患に関する病態・病理発生機序解明

①子牛の小脳皮質変性症に関する病態・病理発生機序解明

4例について、詳細な病理組織学的並びに免疫組織化学的検索を行うとともに、パラフィン切片を用いて実施した DNA マイクロアレイ解析を実施した。

②新生子牛の「明瞭な形態変化を伴わない神経疾患」の病態・病理発生機序の解明

「明瞭な形態変化を伴わない神経疾患」症例10例に対して、神経組織傷害時に変化がみられる各種マーカーを用いて、病変の描出を試みた。また、保管凍結材料（症例2例と対照例2例）を用いた DNA マイクロアレイ解析を実施した。

(4) 新規病態の探索

日々実施している病理診断の中から子牛の既知・未知の神経疾患についての病理検索を行い、その病態・病理発生機序について検討した。

4. 研究成果

(1) 子牛の周産期脳障害に関する病態・病理発生機序解明

①新生子牛の大脳皮質層状壊死の病態・病理発生機序の解明

いずれの症例においても、大脳皮質壊死症を子牛で起こし得るチアミン欠乏を示唆する所見は得られなかった。また、BVDV 遺伝子も検出できなかった。以上の結果から、ウシにおいてもヒトやその他の動物と同様、周産期脳障害の表現型として、大脳皮質層状壊死が存在することを明らかにした。

②新生子牛の両側対称性脳軟化（基底核壊死）の病態・病理発生機序の解明

いずれの症例においても、両側対称性脳軟化を子牛で起こし得るエンテロトキセミアやエンドトキシンの関与を示唆する所見は得られなかった。また、BVDV 遺伝子も検出できなかった。以上の結果から、ウシにおいてもヒトと同様、周産期脳障害の表現型として、両側対称性脳軟化（基底核壊死）が起こる可能性があることを示した。

(2) 周産期脳障害症例を用いた各種マーカーの有用性の検討

子牛の周産期脳障害において、HIF-1α および VEGF がマーカーとして適用可能である可能性を示した。また、神経細胞傷害マーカーである FJC と変性軸索マーカーである APP についても、その有用性が確認された（図1）。

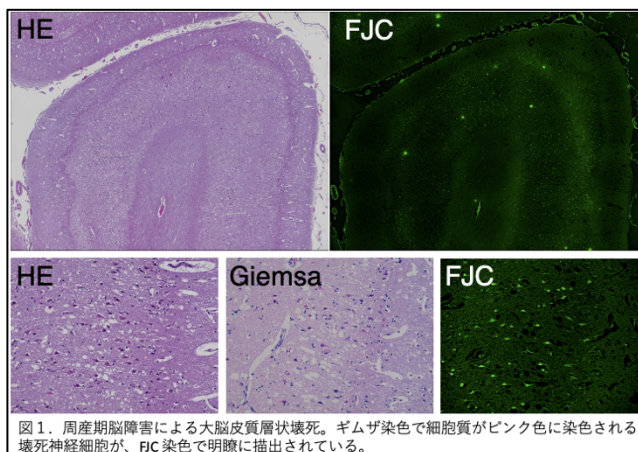


図1. 周産期脳障害による大脳皮質層状壊死。ギムザ染色で細胞質がピンク色に染色される壊死神経細胞が、FJC染色で明瞭に描出されている。

(3) 未解明神経疾患に関する病態・病理発生機序解明

①子牛の小脳皮質変性症に関する病態・病理発生機序解明

4例全例で、プルキンエ細胞の脱落、torpedo 形成、empty basket 出現、および分子層の菲薄化と空胞形成が認められた。また、Calbindin D 免疫染色ではプルキンエ細胞の減少が、Iba1 免疫染色ではプルキンエ細胞脱落部および非脱落部でのミクログリアの多結節状集簇が共通して観察された。また、カスパーゼ3抗体を用いた免疫染色では、いずれの症例においても陽性プルキンエ細胞は認められなかった（図2）。以上の所見から、検索4例は一連の疾患であると考えられた。パラフィン切片を用いて実施した DNA マイクロアレイ解析では、4倍以上の up-regulation がみられた遺伝子が1つ、down-regulation がみられた遺伝子が4つ得られた。

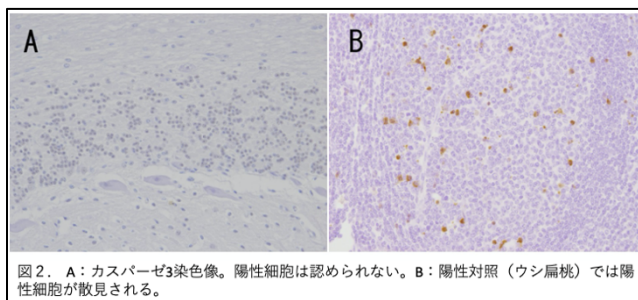


図2. A: カスパーゼ3染色像。陽性細胞は認められない。B: 陽性対照（ウシ扁桃）では陽性細胞が散見される。

②新生子牛の「明瞭な形態変化を伴わない神経疾患」の病態・病理発生機序の解明

10例中4例で、FJC に陽性を示す神経細胞が観察された。また、2例では大脳皮質における星状膠細胞の glial fibrillary acidic protein (GFAP) の免疫反応性の増強が観察され、「明瞭な形態変化を伴わない神経疾患」に分類される一部の症例においても、病理学的な変化が存在することがわかった。DNA マイクロアレイ解析では、2倍以上の up-regulation がみられた遺伝子が11、down-regulation がみられた遺伝子が10つ得られた。

(4) 新規病態の探索

日々実施している病理診断の中から子牛の既知・未知の神経疾患についての病理検索を行い、

子牛でこれまでに報告のないが、ヒトでは一般的な鼻脳型（鼻腔内病変が中枢神経に波及）の接合菌感染症がウシでも起こることを明らかにした。その他にも、複数の既知・未知の疾患症例についての検索を行い、症例報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 KOYAMA Kenji, KANGAWA Akihisa, FUKUMOTO Natsuko, WATANABE Ken-ichi, HORIUCHI Noriyuki, OZAWA Tomomi, INOKUMA Hisashi, KOBAYASHI Yoshiyasu	4. 巻 80
2. 論文標題 Histopathological study of encephalomalacia in neonatal calves and application of neuronal and axonal degeneration marker	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1116 ~ 1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yusuke, Toyotome Takahito, Inokuma Hisashi, Watanabe Ken-ichi, Kobayashi Yoshiyasu, Horiuchi Noriyuki	4. 巻 184
2. 論文標題 Rhinoencephalitis Due to a Lichtheimia ramosa Infection in a Calf: Neural Spread Through the Olfactory Nerves	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mycopathologia	6. 最初と最後の頁 141 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11046-018-0296-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uesaka K., Koyama K., Horiuchi N., Kobayashi Y., Inokuma H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Elevated neuron-specific enolase in the cerebrospinal fluid in a Japanese black calf with hindlimb paresis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Large Animal Clinics	6. 最初と最後の頁 12 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4190/jllac.9.12	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 ANRAKU Mizuki, UESAKA Karin, FUJII Sakiko, KOYAMA Kenji, KOBAYASHI Yoshiyasu, INOKUMA Hisashi	4. 巻 72
2. 論文標題 Cerebellar Cortical Degeneration in a Cross-Breed Calf	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Veterinary Medical Association	6. 最初と最後の頁 154 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12935/jvma.72.154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 安樂みずき, 入江遥, 下夕村圭一, 小山憲司, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古林与志安, 山田一孝, 猪熊壽.	4. 巻 70(6)
2. 論文標題 重複脊髄症により後肢麻痺を呈したホルスタイン種子牛の1症例.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 獣医畜産新報	6. 最初と最後の頁 441-444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uesaka, K., Koyama, K., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Nishikawa, Y. and Inokuma H.	4. 巻 80(8)
2. 論文標題 A clinical case of neosporosis in a 4-week-old holstein friesian calf which developed hindlimb paresis postnatally.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 280-283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1292/jvms.17-0205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小山憲司, 寒川彰久, 福本奈津子, 渡邊謙一, 堀内雅之, 猪熊壽, 古林与志安
2. 発表標題 新生子仮死の病歴を有する子牛の脳病変とその同定方法に関する検討
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井沙希子, 小山憲司, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古岡秀文, 猪熊壽, 古林与志安
2. 発表標題 子牛の小脳皮質変性症に関する免疫組織学的検討
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----