

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380169

研究課題名（和文） 犬の壊死性髄膜脳炎の原因究明と予防・治療法の確立

研究課題名（英文） An Etiologic and therapeutic study on canine necrotizing meningoencephalitis

研究代表者

松木 直章 (Naoaki MATSUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40251417

研究成果の概要（和文）：小型犬で頻発する壊死性髄膜脳炎(NME)の家系調査、病態解析ならびに治療研究を実施した。家系調査ではNME発症個体を含むパグ犬の3家系ならびにNME発症例のいないパグ犬の1家系について、脳脊髄液中のグリア線維性酸性蛋白質(GFAP)あるいは抗GFAP自己抗体をマーカーとして保因犬を割り出した。その結果、NMEの発症因子は常染色体劣勢遺伝形式で遺伝する可能性が示された。病態解析では、NME症例の脳脊髄液中にGFAP-抗GFAP複合体が特異的に存在すること、抗GFAP抗体にはIgGのみでなくIgAが存在し、健康犬の血液中や糞便中にも抗GFAP-IgAが存在すること、NME症例ではアストロサイトのトランスグルタミナーゼに対する自己抗体が存在することが明らかとなった。治療研究ではNME症例に対して3種類の免疫抑制療法を用いた前向き研究を実施したが、生存期間や神経症状スコアには治療法による有意差が認められなかった。

研究成果の概要（英文）：Genetic, etiologic and therapeutic studies were performed on canine necrotizing meningoencephalitis (NME). The genetic study consisted of the determination of glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluids from Pug dogs in 4 families. As a result, NME was suggested to be an autosomal recessive disorder. By the etiologic studies, GFAP-antibody complexes and anti-transglutaminase autoantibodies were demonstrated in the NME cerebrospinal fluids. In the therapeutic study, three immunosuppressive protocols were examined on dogs with NME. No significant difference was observed in the survival times and neurological scores among the therapeutic protocols.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：臨床病理・病態

1. 研究開始当初の背景

犬の壊死性髄膜脳炎(necrotizing meningoencephalitis: NME)はパグ、マルチーズ、チワワなど限られた小型犬種にのみ発

生する中枢神経疾患である。パグ犬ではとくに罹患率が高いため「パグ脳炎」と呼ばれることもある。研究代表者が所属する東京大学附属動物医療センターでは年間約50頭のNME

症例を経験しており、これは犬の脳疾患のうち8~10%程度を占め、てんかん、全ての脳腫瘍に続いて第3位の症例数である。NMEの有病率は犬種・血統によっては1%に達すると予想されている。獣医学領域では全国的にMRIが普及しつつあり、NMEと診断される症例は爆発的に増加している。世界的にも、2006年の米国獣医内科学会(ACVIM)シンポジウムや2007年のヨーロッパ獣医神経病学会(ESVN)のメインテーマになるなど、NMEに注目が集まっている。

NMEはおもに若い個体で発症し、発生率に性差はないとされている。NMEの初期病変は大脳皮質に発生し、病理組織学的にはT細胞を主体とするリンパ球性炎症と脳実質の軟化・壊死を特徴とする。初期には大脳皮質障害のため発作、運動失調、視力障害などの症状が現れる。病変は比較的急速に大脳基底核、小脳、脳幹へと進行し、旋回運動、斜頸、昏睡、摂食障害、遊泳運動などもみられるようになる。最終的には重積発作などにより死亡するか、それ以前に安楽死が選択される。NMEに対しては経験的に免疫抑制療法が行われているが、治療への反応性は悪いことがしばしばである。現在のところNMEは原因不明であり、発症した犬は不可逆的な脳障害のため早期に死亡するか、生存できても生活の質は著しく低くなる。このためNMEの原因を究明し、予防法を確立することは急務である。

研究代表者は、これまで科学研究費補助金「犬の特異性脳炎の自己抗原同定、病態解析と疾患モデル化(H16~17年度)」を含め、NMEの病態解析を進めてきた。この過程で、NME罹患犬の脳脊髄液(CSF)にはアストロサイトのグリア線維性酸性蛋白質(GFAP)に対する自己抗体が高率に検出されることを証明した[1,2]。また、NME症例のCSF中にはアストロサイトから漏出したGFAPが多量に存在し[3]、さらにNME好発犬種では健康な個体の10~50%でCSF中にGFAPが検出されることを明らかにした(一部を[3]で報告)。つまり、NMEの原因として、1)アストロサイトに犬種特異的あるいは遺伝的な脆弱性が存在すること、2)アストロサイトから漏出したGFAPに対して自己免疫反応が誘導されるとNMEを発症すること、が強く示唆された。そこで、アストロサイトの脆弱性およびGFAPに対する自己反応性を指標として保因犬を同定し、遺伝様式を特定して繁殖レベルでNMEを予防できる可能性が成り立つと考えられた。

一方、このようにNMEが自己免疫疾患としての側面をもつため、NME症例には免疫抑制療法が試行されているが、コンセンサスを得た治療法はなかった。NME症例は重篤な神経症状のために生活の質を保つことが難しく、予後も悲惨である。このため発症例に対する治療法を確立していくことが望まれた。

- 1) Matsuki et al. J. Vet. Med. Sci. 66(3): 295-297, 2004.
- 2) Shibuya et al. J. Vet. Med. Sci. 69: 241-245, 2007.
- 3) Toda et al. Vet. Rec. 161: 261-264, 2007.

2. 研究の目的

本研究の最終的目標は、犬のNME保因犬の遺伝様式を決定し、NME発症の危険因子を見出してNMEを予防することである。さらに既にNMEを発症した犬に対して効果的な治療法を見出すことである。具体的な目標として、本研究では以下の4つのステップを設定した。

- a) NMEの遺伝様式の解明: NME保因犬を反映すると考えられるマーカー、すなわち脳脊髄液中のGFAPならびに抗GFAP抗体をNME好発家系に応用し、NME保因犬を同定してその遺伝様式を明らかにする。
- b) NMEの危険因子の解明: a)で明らかになった保因犬について3年間的前方視的(前向き)研究を実施し、その後の発症の有無ならびに危険因子を検討する。
- c) NMEの発症メカニズムと原因遺伝子の解明: 現在までの病態解析の結果を試験管内モデルとして発展させ、NMEの発症メカニズムと原因遺伝子を解明する。
- d) NMEの治療法の確立: NMEに罹患した犬に対する免疫抑制療法について、3種類のプロトコルを用いた3年間的前方視的研究を実施し、治療法を最適化する。

3. 研究の方法

- a) NMEの遺伝様式の解明: 保因犬を同定し、その遺伝様式を解明することは本研究の核心の一つである。NME好発家系(複数のNME発症例を含む家系)について脳脊髄液中のGFAPならびに抗GFAP抗体をマーカーとして保因犬を同定する。発症犬を含む家系の聞き取り調査を行うことで遺伝様式を解明する。
- b) NMEの危険因子の解明: a)で調査したNME好発家系のうち、研究期間全体にわたって保因犬を追跡し、NMEの発症の有無、発症した場合の危険因子を検討する。
- c) NMEの発症メカニズムと原因遺伝子の解明: 現在までの病態解析の結果を試験管内モデルとして発展させ、NMEの発症メカニズムと原因遺伝子を解明する。
- d) NMEの治療法の確立: 東京大学附属動物医療センターに来院し、臨床的にNMEと診断した症例を無作為に3群に分け、従来NMEの治療法として広く用いられてきた3つのプロトコル、
 - ・プレドニゾン単独療法
 - ・プレドニゾン+シクロスポリンAの併用療法
 - ・プレドニゾン+レフルノミドの併用療法

で治療する。症例の臨床スコア、MRI の異常所見スコア、生存期間を追跡する。現在のところ NME 症例の 70% 程度は診断後 2 年以内に斃死するため、観察期間は 3 年またはそれ未満で充分だと考えられた。

4. 研究成果

a) NME の遺伝様式の解明：NME 発症犬種（主としてパグ）の繁殖家に対し、インターネット上で NME 研究への協力を呼びかけた結果（<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/vcpb/objects/kensa.pdf>）、複数の NME 発症個体（死亡例を含む）を内包する 3 家系、ならびに NME を発症していない 1 家系の計 4 家系について採材の協力が得られた。これらの繁殖家からの聞き取り調査によって家系図を作成するとともに、繁殖家が保有する個体から血液および脳脊髄液を採取した。

図 1 には例として、NME 発症例を 4 頭含むパグの 3 代 22 個体の家系図を示した。四角は雄、丸は雌を示し、黒は発症例（すでに全頭死亡）、白は未発症例を示す。このうち繁殖家で飼育されていた 8 例について脳脊髄液中の GFAP ならびに抗 GFAP 抗体を測定し、陽性であったものを保因犬（図中+記号）、陰性であったものを非保因犬（図中-記号）で示した。図中 N で示した個体は繁殖家から一般家庭に譲渡されたなどの理由で血液や脳脊髄液を採取できなかった個体であるが、調査の時点で NME を発症していないことは確認できた。図中 (+) で示した個体は、いずれも脳脊髄液中の GFAP が陽性であり、抗 GFAP 抗体は陰性であった。

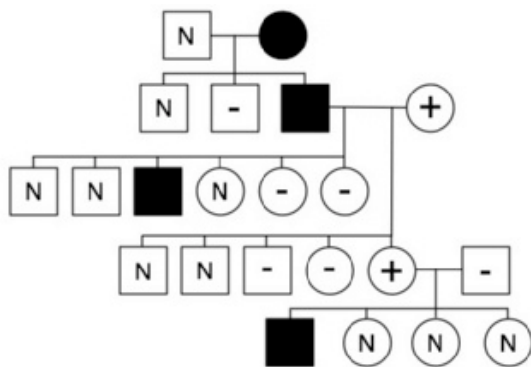


図 1. NME 家系調査の例

一方、過去に NME 発症例の認められなかった家系の 11 個体について検査したところでは、脳脊髄液中に GFAP や抗 GFAP 抗体が陽性の個体は認められなかった。調査した個体数は限られているが、NME の発症因子は常染色体劣勢遺伝すると予想された。この仮説を検証するためには、さらに家系数ならびに同一

家系内の個体数を増やして検討することが求められる。

b) NME の危険因子の解明：本研究では、過去に NME を発症した個体を含み、家系調査を行った 3 家系のうち、4 個体が NME 保因犬と特定された。このうち 3 頭は脳脊髄液中 GFAP が陽性であり、1 頭は抗 GFAP 抗体が陽性であった。家系調査を行ったこれらの個体の他に、研究代表者の呼びかけによって、健康なパグ犬の脳脊髄液が提供され、2 頭で脳脊髄液中 GFAP が陽性であった。これらの計 6 例はいずれも 3 歳未満であり、NME を発症する可能性があると考えられたため、最長 2 年 7 ヶ月、最短 5 ヶ月にわたり追跡調査した。しかしながら、観察期間内に NME を発症した個体は認められなかった。このため、保因犬における NME 発症因子は明らかにならなかった。

c) NME の発症メカニズムと原因遺伝子の解明：この件に関して 3 つの新たな知見が得られた。すなわち、

- NME 症例の脳脊髄液における GFAP-抗 GFAP (抗原抗体) 複合体の証明
 - 抗 GFAP-IgA の証明
 - NME を含む特発性脳炎の犬における抗トランスグルタミナーゼ抗体の証明
- である。

研究代表者らの過去の研究で、NME 発症例では脳脊髄液中に GFAP と抗 GFAP 抗体の両者が観察されるが、保因犬では抗体または抗原のいずれか一方しか観察されないことが示された。そこで、NME の発症には GFAP-抗 GFAP 抗体複合体 (抗原抗体複合体) の形成が必要であるとの仮説を立て、発症例の脳脊髄液についてこの抗原抗体複合体を探索した。つまり、免疫グロブリンを吸着するプロテイン G でコーティングしたビーズを NME 発症犬および非発症犬の脳脊髄液と混和し、その後ビーズを回収し、トラップされた蛋白質を抗 GFAP モノクローナル抗体を用いてイムノプロットしたところ、発症犬の検体では GFAP が検出された。さらに、抗 GFAP 抗体をコートしたビーズを NME 発症犬および非発症犬の脳脊髄液と混和し、ビーズを回収したところ犬 IgG および IgA が検出された。これらの結果から、NME 発症例では脳脊髄液中に GFAP-抗 GFAP 抗体複合体が存在し、しかもその存在は NME 発症例に特異的であることが明らかとなった。この結果は、NME では GFAP-抗 GFAP 抗体複合体が形成されることにより炎症が惹起されることが強く示唆された。これは NME 発症犬の脳脊髄液中抗 GFAP 抗体価が、発症時に最大となっている (後掲雑誌論文で発表) こととも矛盾せず、NME の発症機序の有

力候補であると考えられる(投稿準備中)。

次に、NME 発症例では脳脊髄液中に抗 GFAP-IgA が認められたことから、NME 発症例および非発症例の脳脊髄液、血液ならびに糞便における抗 GFAP-IgA を検索した。その結果、脳脊髄液中 GFAP-IgA は NME 発症例のみで観察された。しかしながら、血液中には、発症例と非発症例を問わず抗 GFAP-IgG ならびに IgA が認められた。さらに、健康犬の糞便中にも抗 GFAP-IgA 陽性のものが認められた。つまり、抗 GFAP 抗体は健康な犬でも食事中的 GFAP または GFAP 類似物質に対して生成されており、NME 発症犬では血液脳関門の破綻によってこの抗 GFAP 抗体が脳脊髄液中にリークする可能性が示された。

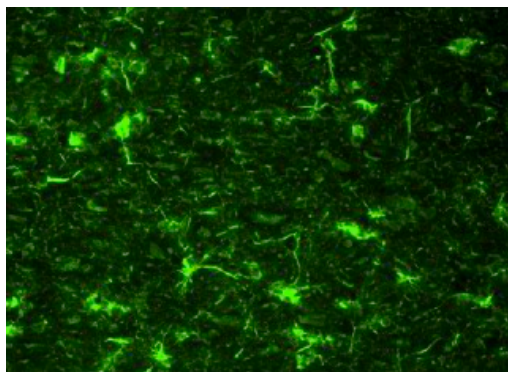


図 2. 間接免疫蛍光法 (IFA) による健康犬の血中抗 GFAP-IgA の検出。

このことは、抗 GFAP 抗体が自己の GFAP 漏出以外、つまり食餌を原因として生成され得ることを示す。さらに、健康犬でもときに抗 GFAP 抗体が陽性となる現象を説明するものである。抗 GFAP 抗体を生成させる食餌性因子を明らかにするため、各種ペットフードに含まれる GFAP を ELISA 法で定量したところ、鶏肉や牛肉などの畜肉を原材料とするペットフードから比較的高濃度の GFAP が検出された。これら食事中的 GFAP が、腸管に抗 GFAP-IgA の生成を刺激する可能性が示された。

最後に、NME を含む特発性脳炎に罹患した犬について、脳脊髄液中の抗トランスグルタミナーゼ抗体を測定したところ、多くの症例でトランスグルタミナーゼ (TG) 抗体が陽性であった。抗 TG 抗体は、ヒトのセリアック病における脳炎の原因として知られている。つまり、小麦グルテンに対して生成された抗体が自己の TG を認識し、自己抗体として炎症を惹起すると考えられている。TG は脳内ではアストロサイトに豊富に分布していることから、犬の特発性脳炎の発症機序に関与する可能性が考えられる。ただし、現在のところ、

犬の脳脊髄液中における抗 TG 抗体が小麦グルテンに対する抗体の交差性によるかどうかは検証できていない。このため、犬の特発性脳炎がヒトのセリアック病と相同か否かも不明である。

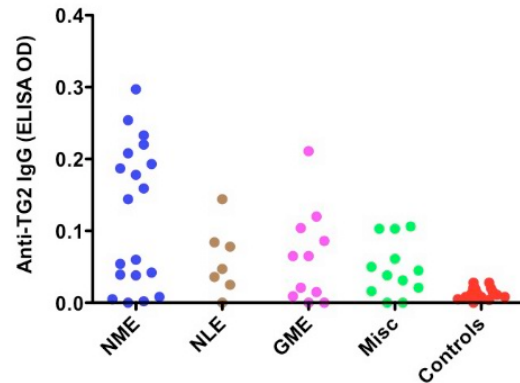


図 3. 犬の壊死性髄膜脳炎 (NME)、壊死性白質脳炎 (NLE)、肉芽腫性髄膜脳脊髄炎 (GME)、他のさまざまな中枢神経疾患 (Misc) ならびに健康対照 (controls) の脳脊髄液中抗トランスグルタミナーゼ抗体価。とくに NME では抗体価の高い個体が認められる。

d) NME の治療法の確立：東京大学附属動物医療センターに来院し、臨床的に NME と診断した 26 症例を無作為に 3 群に分け、従来 NME の治療法として広く用いられてきた 3 つのプロトコル、

- ・プレドニゾロン単独療法
- ・プレドニゾロン+シクロスポリン A の併用療法
- ・プレドニゾロン+レフルノミドの併用療法を用いた前向き研究を行った。最大 2 年 5 ヶ月にわたって症例を観察したが、いずれの治療法を用いても生存期間、神経症状スコアに有意な差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Matsuki, N., Takahashi, S., Yaegashi, M., Tamahara, S., and Ono, k. Serial examinations of anti-GFAP autoantibodies in cerebrospinal fluids in canine necrotizing meningoencephalitis. J. Vet. Med. Sci. 71: 99-100, 2009.

[学会発表] (計 1 件)

1. 松木直章, 「犬猫の非感染性脳炎」動物臨床医学会年次大会 (大阪市) 2010年11月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/vcpb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松木 直章 (Naoaki MATSUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 40251417

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし