

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780308

研究課題名(和文)ネオスポラ感染症の犬の髄膜腫発症への関与に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the involvement in meningioma development of Neospora infection in dogs

研究代表者

板本 和仁(itamoto, kazuhito)

山口大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50379921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イヌの神経症状が疑われた症例のN.caninum抗体保有状況の調査を実施した。神経症状を示した症例の抗体保有率は有意に高く、MRI上の特徴として、130頭中、21頭においてDural tail signが認められ、N.caninumの抗体陽性率と髄膜腫との間に関連性がある事が示唆された。手術症例20症例において病理学的検索において髄膜腫の症例は17症例であり、うち15例で抗体陽性と判定された。いずれの組織においても虫体は検出されなかった。髄膜腫症例で脳脊髄液の採取可能なものは5症例、および組織サンプルをreal time PCRで検索したが、いずれも陽性症例は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted a survey of N.caninum antibody prevalence of patients with neurological symptoms in dogs. Antibody prevalence rate of cases showed neurological symptoms were significantly higher. As a feature on MRI, Dural tail sign was observed in 21/130 cases. Between the meningioma and antibody positive rate of N.caninum that there is a relationship has been suggested. Cases of meningioma is 17 cases in pathology in Search Contact 20 surgery cases. There are the antibody positive in 15 cases. Parasite was not detected in any tissue. Those harvestable of cerebrospinal fluid retrieved in real time PCR and tissue samples five cases, in meningioma cases, but all was not obtained positive cases.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：ネオスポラ MRI 髄膜腫 イヌ

### 1. 研究開始当初の背景

ネオスポラ感染症は孢子虫綱に属する *Neospora caninum* による感染症で、1988年に米国でイヌの脳神経組織内で確認された疾病で、特にウシで異常産の原因となることが問題となっており、世界各地で発生が認められている。1998年、Dubeyらにより、中間宿主はウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジなどで、終宿主はイヌであることが明らかにされた。本原虫はイヌの糞便中に排出されるオーシストによって伝播され、一度感染したウシはネオスポラの持続感染牛になり、流産をくり返すことや、抗体陽性個体は年間乳量が大幅に減少することも知られており、畜産上、重要な問題となっている。現在、国内ではウシと水牛を対象動物とした届出伝染病に指定されており、毎年数十例の被害発生報告がなされている。またアカゲザルへの実験感染も報告、や HIV 感染患者における抗体陽性例の報告などが相次いでおり、人獣共通感染症としての重要性も近年報告されている。国内における我々の調査では、終宿主であるイヌでは、抗体陽性率が 10.4%であり、広く国内に蔓延している事が予想されている。

我々はこれまでに本疾患に関する画像診断に関する研究(平成17年度科学研究費若手B17780237および学内支援研究経費)で、中枢神経症状を示した検体における陽性率は、有意に高い事が示唆され、症候性てんかんでは13.3%、特発性てんかんでは3.2%が陽性を示し、症候性てんかんは特発性てんかん罹患犬に対して、有意に抗体陽性率が高かったことから、犬の神経疾患への本原虫の強い関与が明らかとなった。またヒトにおいても神経学的異常を呈した患者の抗体陽性率が同様に高いことが報告されており(Lobato J, et al., 2006)、幅広い動物種の神経疾患発症への本原虫の関与を裏付けるものと考えられる。

また抗体調査の中で、特に興味深いのは、犬の頭蓋内腫瘍の中で、最も発生率が高い腫瘍である髄膜腫について、画像診断上の特徴から髄膜腫が疑われた犬においてELISAによる抗体陽性率は約62%であり、他の中枢神経疾患に比べて著しく高い値を示した。犬の髄膜腫の発生率は他の動物種に比べて、高いことが示唆されており犬の髄膜腫の発症に本原虫が関与している可能性が示唆された。一般的に臨床材料から得た病理組織学的検体からの本原虫虫体の発見は困難である事が知られており、公衆衛生上の新たな感染症の脅威を問題提起をする為にも、小動物に対する本原虫性疾患の病態をより詳細に検討する必要性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では *N. caninum* のイヌの髄膜腫発症関与を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 神経症状を主訴として山口大学動物医療センターに来院し、MRI検査によって脳実質に病変の確認された犬130頭と、神経症状を示さない犬70頭の保存血清または血漿を使用した。性別は雄69頭、雌61頭であった。年齢は4ヵ月齢から15歳齢までで、平均年齢は  $6.9 \pm 3.9$  歳(平均±標準偏差)であった。神経症状を示さない犬の性別は雄30頭、雌40頭であった。年齢は2ヵ月齢から14歳11ヵ月齢までで、平均年齢は  $6.6 \pm 3.9$  歳(平均±標準偏差)であった。

#### (2) 画像診断(MRI)

APERTO Inspire(0.4T:日立メディコ Japan)を用い、矢状断、横断、水平断の3方向についてT1強調画像(TR:360mSec, TE:13mSec)、T2強調画像(TR:5000mSec, TE:100mSec)、FLAIR画像(TR:8500mSec, TE:100mSec)、造影T1強調画像の4種類、計12種類の画像を検討した。

#### (3) 血清学的評価

##### ① ELISA

抗原には Chahan らの報告(2003)に従って、蛋白抗原 GST-NcSAG(surface antigen 1 of *N. caninum*)および GST を用い、ELISA リーダーを用いて波長 405nm にて各ウェルの吸光度(OD)を測定した。*N. caninum* 陰性の実験ビュグルについても同様に ELISA を行い、(GST-NcSAG OD - GST OD)の標準偏差(SD)を算出、2SD 以上の値を示した検体を ELISA 陽性検体とした。

##### ② IFAT

検査には *N. caninum* を感染させた Vero 細胞を個層化した12穴 *N. caninum* FA substrate slide (VMRD, USA)を使用し、蛍光顕微鏡を用いて判定を行った。各プレートは陽性および陰性コントロールを毎回使用し、蛍光顕微鏡下で陽性コントロールより明らかな蛍光を示すものを IFAT 陽性検体とした。

##### ③ Western blotting

検査には ELISA あるいは IFAT 陽性で、病理組織学的に診断が可能であった13検体、ELISA、IFAT 共に陽性であった検体からランダムに選ばれた2検体の計15検体を用いた。特異抗体のバンドの有無を確認した。

#### (4) 組織のサンプリング

外科手術、あるいは剖検により病変部の摘出が可能であった検体については、PCR 検査および病理組織学的検査を実施した。

#### (5) 病理組織学的検索

摘出された組織を10%中性緩衝ホルマリン(pH7.4)で24時間固定、パラフィンブロックで包埋した。厚さ  $4\mu\text{m}$  の切片を作成し、光学顕微鏡下で検鏡、診断を行った。

また採取可能な検体については、OCT コンパウンドに包埋後、 $-80^\circ\text{C}$ で保存し、凍結切片を作成した。

#### (6) 遺伝子学的検索

摘出した組織の一部またはCSFをDNA抽出まで $-20^\circ\text{C}$ で保存した。

サンプルはプロテイナーゼ K 含有溶解緩衝液中でインキュベート、溶解産物から DNA をエタノール沈殿させた。遠心分離後、DNA ペレットを $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。各検体は TaqMan プローブ法を用いた Real time PCR 法により目的遺伝子の検索をおこなった。Ghalmi らの報告に基づき、プライマーは NC5-550:GGGTGAACCGAGGGAGTTG、NC5-596:ACGTGAGGAATGACTAACCACAA、NC5 プローブ: FAM- AGCGGTGAG AGGTGGGATACGTGG. を用いた。PCR サイクルは  $50^{\circ}\text{C}/2\text{ min}$ ,  $95^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$ , 50 回 ( $95^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}$ ,  $58^{\circ}\text{C}\ \text{for}\ 1\text{ min}$ ) とした。

#### 4. 研究成果

##### 結果

##### (1) 血清学的検査

ELISA, IFAT を合わせた血清学的陽性検体数は神経症状を示したもので 38 頭 (29.2%)、神経症状を示さないもので 6 頭であり、神経症状を示すもので有意に陽性率が高かった ( $p=0.0081$ )。

##### ①ELISA

神経症状を示したもの 130 頭中 21 頭 (16.15%) で陽性を示した。また神経症状を示さないものでは 54 頭中 2 頭 (3.7%) で陽性を示し、神経症状を示すもので有意に陽性率が高かった ( $p=0.0254$ )。

ELISA で陽性症例の犬種特異性は認められなかった。性別は雄 9 頭 (9/69:13.0%)、雌 12 頭 (12/61:19.7%) であり、性差は認められなかった ( $p=0.2406$ )。また ELISA 陽性検体の平均年齢は  $7.9 \pm 4.5$  歳であった。

##### ②IFAT

神経症状を示したもの 130 頭中 32 頭 (24.6%) で陽性を示した。このうち 15 頭は ELISA 陽性を示した。また神経症状を示さないものでは 54 頭中 5 頭 (9.3%) で陽性を示し、このうち 1 頭は ELISA 陽性を示した。IFAT においても神経症状を示すもので有意に陽性率が高かった ( $p=0.0250$ )。

IFAT においても犬種特異性は認められなかった。性別は雄 14 頭 (14/69:20.3%)、雌 18 頭 (18/61:29.5%) であり、性差は認められなかった ( $p=0.2290$ )。また IFAT 陽性検体の平均年齢は  $8.2 \pm 3.6$  歳であった。

IFAT または ELISA のいずれかで陽性を示したものは IFA/ELISA 検査による抗体保有状況の調査を実施した。神経症状を示した症例の血清学的陽性検体数は 38/130 頭 (28.7%)、対照群の血清学的陽性率は 8/70 (11.1%) であり、有意に陽性率が高かった ( $p=0.0081$ )。

##### ③ Western blotting

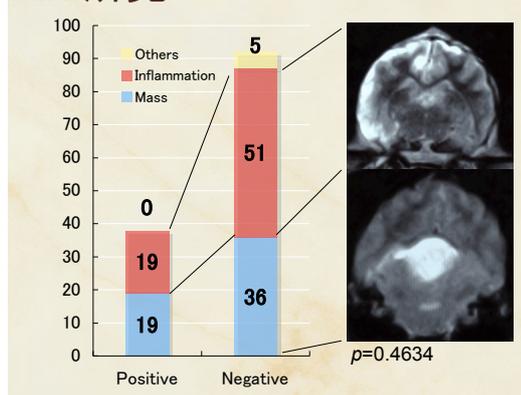
検査を行った 15 頭中 14 頭 (93.3%) で陽性を示した。

##### (2) MRI 所見

血清学的陽性検体の多くは、T1 強調画像で低信号、T2 強調画像で腫瘍性または瀰漫性の高信号な病変を示した。FLAIR 画像の撮影

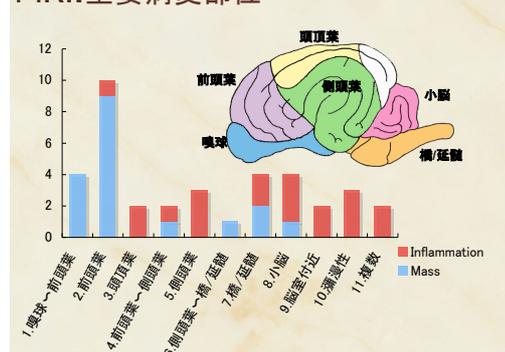
を行った 13 頭においては 12 頭 (92.3%) で高信号な病変を示した。この 12 頭については T2 強調画像においても同部位で高信号を示した。造影効果は 20 頭 (52.6%) で認められた。このうち mass effect が認められたのは 18 頭であった。造影効果の認められた 2 頭、および造影効果が認められなかった 18 頭では mass effect は認められず、炎症性の病変であると考えられた ( $n=20$ )。陰性検体 ( $n=92$ ) では腫瘍病変が 36 頭、炎症性病変が 51 頭、そ

### MRI 所見



れ以外の所見を示したものが 5 頭であり、いずれの所見においても有意差は得られなかった。血清学的陽性検体の主要病変部位を MRI 所見に基づいて 1. 嗅球から前頭葉に至るもの、2. 前頭葉、3. 頭頂葉、4. 前頭葉から側頭葉に至るもの、5. 側頭葉、6. 側頭葉から橋/延髄に至るもの、7. 橋/延髄、8. 小脳、9. 脳室付近、10. 瀰漫性の病変を示すもの、11. 複数の病変部位をもつものの 11

### MRI: 主要病変部位

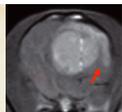


箇所分類した ( $n=37$ )。各部位に病変が存在したのは、順に 1) 4 頭 (10.5%)、2) 10 頭 (26.3%)、3) 2 頭 (5.3%)、4) 2 頭 (5.3%)、5) 3 頭 (7.9%)、6) 1 頭 (2.6%)、7) 4 頭 (10.5%)、8) 4 頭 (10.5%)、9) 2 頭 (5.3%)、10) 3 頭 (7.9%)、11) (5.3%) であった。腫瘍病変を示した 18 頭の病変部位は、1) 4 頭 (22.2%)、2) 9 頭 (50.0%)、4) 1 頭 (5.6%)、6) 1 頭 (5.6%)、7) 2 頭 (11.1%)、8) 1 頭 (5.6%) であった。炎症性病変を示した 20

頭の病変部位は2)1頭(5.0%)、3)2頭(10.0%)、4)1頭(5.0%)、5)3頭(15.0%)、7)2頭(10.0%)、8)3頭(15.0%)、9)2頭(10.0%)、10)3頭(15.0%)、11)2頭(10.0%)であった。

造影 T1 強調画像を用いて Dural tail sign(硬膜尾兆候)の有無についての検討を行った。今回調査に供した 130 頭中 26 症例で Dural tail sign が認められた。血清学的検査における陽性検体 38 頭中 13 頭(34.2%)、陰性検体 98 頭中 8 頭(8.2%)において Dural tail sign が認められ、陽性検体において Dural tail sign の出現が有意に高い事が示唆された( $p=0.0010$ )。また、Dural tail sign が認められた 21 頭中の血清学的陽性検体は 13 頭(61.9%)であり、認められなかった 109 頭中の血清学的陽性検体は 25 頭(22.9%)であった。

### MRI:Dural tail sign



	Dural tail sign(+)			Dural tail sign (-)		
	ELISA	IFAT	Total	ELISA	IFAT	Total
Positive	12 (57.1%)	12 (57.1%)	13 (61.9%)	9 (8.3%)	20 (18.3%)	25 (22.9%)
Negative	9 (42.9%)	9 (42.9%)	8 (38.1%)	100 (91.7%)	89 (81.7%)	84 (77.1%)
Total		21			109	

$p=0.0010$

### (3) 病理組織学的検査

陽性検体中 13 検体、陰性検体中 3 検体において、手術による病変部の摘出あるいは剖検が行われ、また 5 検体外部の協力施設から検体を得る事ができ、病理学的評価を行うことが可能であった。陽性検体中 15 検体は髄膜腫であると診断され、1 検体が非化膿性壊死性髄膜炎、1 検体が無菌性髄膜炎、1 検体が神経膠腫と診断され、陰性検体については 2 検体が髄膜腫、1 検体が非化膿性髄膜炎と診断された。いずれの組織においてもタキゾイトやシストは確認されなかった。残りの検体については手術や剖検等の処置を行ってならず、病理学的診断を行う事は不可

症例	病理組織学的		診断	組織型
	ELISA+IFAT	Western blotting		
症例1	+	+	髄膜腫	meningothelial
症例2	+	+	髄膜腫	fibroblastic
症例3	+	+	髄膜腫	anaplastic
症例4	+	+	髄膜腫	anaplastic
症例5	+	+	髄膜腫	angiomatous
症例6	+	+	無菌性髄膜炎	
症例7	+	+	髄膜腫	fibroblastic
症例8	+	+	髄膜腫	psammomatous
症例9	+	+	非化膿性壊死性髄膜炎	
症例10	+	+	髄膜腫	meningothelial
症例11	+	+	髄膜腫	transitional
症例12	+	++	髄膜腫	angiomatous
症例13	+	ND	神経膠腫	
症例14	+	+	髄膜腫	angiomatous
症例15	+	ND	髄膜腫	transitional
症例16	+	ND	髄膜腫	fibroblastic
症例17	+	ND	髄膜腫	angiomatous
症例18	+	+	髄膜腫	meningothelial
症例19	-	±	髄膜腫	angiomatous
症例20	-	ND	髄膜腫	Anaplastic

能であった。また免疫染色においても、陽性検体は認められなかった。

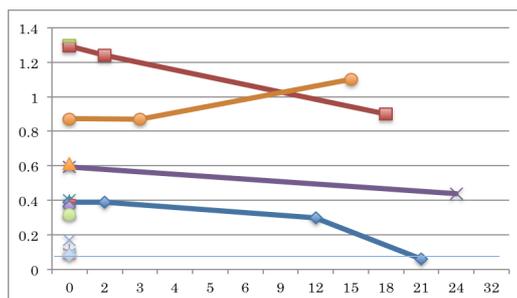
### (4) 遺伝子学的検索

また組織の採取が可能であった検体のうち、8 検体において組織 PCR、5 検体において 脳脊髄液の realtime PCR を用いた遺伝子学的検索を実施したが、いずれも陰性であった。

症例	病理組織学的		PCR	
	診断	組織型	CSF	組織
症例4	髄膜腫	anaplastic	-	-
症例8	髄膜腫	psammomatous	ND	-
症例11	髄膜腫	us	-	-
症例12	髄膜腫	transitional	-	-
症例15	髄膜腫	angiomatous	-	-
症例17	髄膜腫	transitional	ND	-
症例19	髄膜腫	angiomatous	ND	-
症例20	髄膜腫	angiomatous	-	-
症例20	髄膜腫	anaplastic	-	-

### (5) 血液中の抗体価の長期的推移

外科的手術を実施した 5 症例について、長期的な抗体の追跡調査を実施した。最長 23 ヶ月にわたって、抗体価が高い状態で維持され、1 症例でのみ抗体の低下が認められた。



### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

VETi 抗菌薬の使いどころ(中枢神経) (6) 18-22, 2013

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

板本 和仁 (ITAMOTO KAZUHITO)

山口大学共同獣医学部准教授

研究者番号: 50379921

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし