

ザーネン種山羊の脳脊髄糸状虫症の1例

中本悠香^{1),2)} 志和 希¹⁾ 島津太一¹⁾ 君付和範¹⁾ 富岡美千子¹⁾
 片山芳也³⁾ 筏井宏実¹⁾ 朴 天鎬^{1)†}

1) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東二十三番町 35-1)

2) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 江別市文京台緑町 582)

3) 日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所 (〒329-0412 下野市紫 1400-4)

(2015年5月29日受付・2015年8月3日受理)

要 約

3歳齢のザーネン種山羊が四肢の運動失調を呈し、予後不良のため病理解剖に供された。病理検索の結果、左腕神経叢と頸髄に異物肉芽腫が認められた。下行性運動路の神経細胞は中心性色質融解を呈した。左腕神経叢のパラフィン切片を用いた分子生物学的検索では、*Setaria digitata* (*S. digitata*) の遺伝子が同定された。以上より、*S. digitata* 幼虫が血流を介して左腕神経叢と頸髄に到達し、下行性運動路の神経障害が運動失調に直接関与していたことが推察された。——キーワード：脳脊髄糸状虫症、病理組織学、ザーネン山羊。

-----日獣会誌 69, 36~40 (2016)

反芻獣における糸状虫症の原因として、指状糸状虫 *Setaria digitata* (*S. digitata*) がよく知られている [1, 2]。指状糸状虫は、一般的に固有宿主の牛では病原性を示さないが、非固有宿主の羊、山羊、馬などに第3期幼虫が蚊の吸血によって侵入すると重篤な傷害を引き起こす。特に、幼虫が中枢神経系 (CNS) に迷入した場合は脳脊髄糸状虫症 (腰麻痺症) [3-5]、前眼房に迷入した場合は溷睛虫症 [6] を引き起こす。本症の病理学的所見は、幼虫の穿孔に伴う機械的損傷と二次的な生体反応であるが、病変部から虫体が検出されることはまれである。そのため、いまだ本疾患の病理発生機序については不明な点が多い。

今回、原因不明の四肢の運動失調のため病理解剖に供された3歳齢の山羊について、病理組織学的、免疫組織化学的検索並びに分子生物学的検索を実施し、本症例が *S. digitata* に感染していたことが判明した。本論文は、*S. digitata* 感染による病理学的所見の詳細を記述したものである。

材料及び方法

供試動物：山羊、ザーネン種、雌、3歳5カ月齢。2013年9月より軽度の歩様異常が認められ、次第に前

肢の跛行と後肢のふらつきが進行したため、原因究明のため病理解剖に供された。食欲、排便及び排尿は正常であった。血液生化学検査及び頭部 (大脳、小脳、脳幹) のMRI (AIRIS-II comfort, 日立アロカメディカル(株), 東京) 検査においても異常所見は認められなかった。

病理組織学：病理解剖時、脳、脊髄、腕神経叢、坐骨神経及び一般諸臓器を採材し、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定後、定法に従ってパラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作製した。また、中脳、脊髄及び腕神経叢についてはニッスル染色及びルクソール・ファスト・ブルー (LFB) 染色を実施した。

免疫組織化学：中脳、頸髄及び腕神経叢のパラフィンブロックを用いて免疫染色を実施した。抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP, (株)ニチレイ, 東京), Vimentin ((株)ニチレイ, 東京), Ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1, 和光純薬工業(株), 大阪), Neurofilament (NF, ダコ・ジャパン(株), 東京), Cytokeratin AE1/AE3 (CK AE1/AE3, ダコ・ジャパン(株), 東京), CD3 (ダコ・ジャパン(株), 東京), CD20 (Spring Bioscience, U.S.A.), CD204 ((株)トランスジェニック, 福岡) 抗体による免疫染色を実施した。薄切切片を脱パラフィン後、Micro Wave 処理 (Vimentin,

† 連絡責任者：朴 天鎬 (北里大学獣医学部獣医学科獣医病理学研究室)

〒034-8628 十和田市東二十三番町 35-1 ☎0176-24-9433 FAX 0176-23-8160
E-mail: baku@vmas.kitasato-u.ac.jp

CD3, CD204) またはプロテイナーゼK処理 (NF) により抗原賦活化を行った。その後、3%過酸化水素加メタノールにより内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。また、GFAP, Iba-1, Vimentin, CD3, CD20 及び CD204 には10%山羊血清 (株ニチレイ, 東京) を用いてブロッキング処理を行った。*S. digitata* の主要抗原である intermediate filament protein (ifp) に対する抗マウス血清 (北里大学獣医寄生虫学研究室, 笹井宏実博士作製) には10%ウサギ血清 (株ニチレイ, 東京) でブロッキング処理を行った。次に、おのおのの一次抗体と二次抗体に反応させ、DAB 溶液 (株ニチレイ, 東京) で可視化させた後、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

分子生物学的検査: 供試山羊の左腕神経叢及び第七頸髄のパラフィン包埋切片を3枚薄切し、それぞれ1.5mlのマイクロチューブに移した。チューブにDNA抽出剤 (TaKaRa DEXPAT™, タカラバイオ(株), 滋賀) を0.5ml ずつ添加した後、100℃で10分間の熱処理後に12,000rpm, 4℃で10分間遠心分離を行った。*S. digitata* ifp 遺伝子を基にイントロンを含む525bpのプライマー (F:AGGA AATAGATTTCA, R:ACGCCAAGAGGAAGTGAA) を設計し、各組織切片から得たDNAを用いて94℃ (5分), 94℃ (1分), 55℃ (30秒), 72℃ (1分), 30サイクルのDNA増幅を行った。PCR反応液にはPCR酵素 (PrimeSTAR™ HS, タカラバイオ(株), 滋賀) を使用した。その後、1.5% Agarose TAE gels で電気泳動を行った。また、PCR産物はDNA精製キット (DNA Clean & Concentrator™ -5, Zymo Research, U.S.A.) を用いて精製後、ダイレクトシーケンスにより種の同定を行った。なお、脊髄病変が存在しない成山羊 (2歳齢, 雄) の頸膨大のパラフィン包埋ブロックを陰性対照として用いた。

成 績

病理解剖所見: CNS 及び一般諸臓器に特記すべき肉眼所見は観察されなかった。

病理組織学: 脊髄病変は左第一, 第二, 第五, 第六, 第七頸髄の白質に主座 (図1) し, 神経軸索の膨化, 断裂及び消失による大小の空胞 (図2) が観察された。同部位及び血管周囲にはリンパ球, 形質細胞及び好酸球が多数浸潤し, 時折集簇巣を形成していた。また, 脂質や軸索断片を貪食した脂肪顆粒細胞が多数観察された。左腹角から中間質では, 中心性色質融解細胞や肥大型アストログリアが多数観察された。第一頸髄の灰白質では, 左中間質の背部から背角にかけて寄生虫様の異物 (図3) がみられ, 異物を取り囲むように大食細胞, 多核巨細胞 (異物巨細胞), リンパ球及び好酸球による異物肉芽腫が形成されていた。第六頸髄の灰白交連, 第七頸髄の灰白

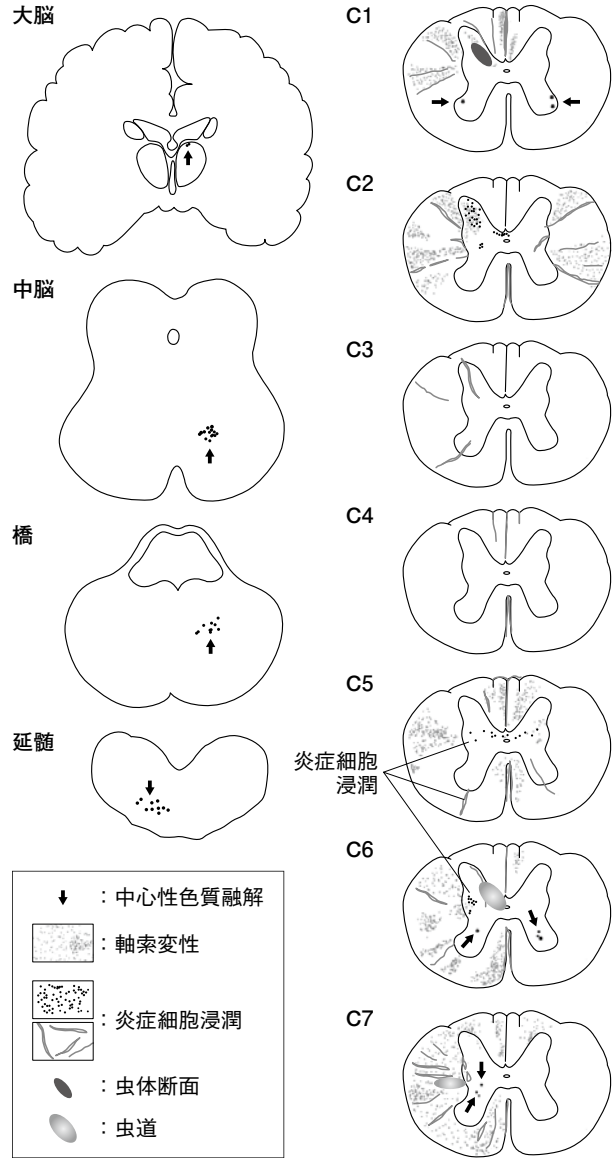


図1 *S. digitata* 感染に起因する脳脊髄病変の模式図

交連から左の側索では, 虫道と思われる大型の空洞が観察された。

その他, 中脳の右赤核, 橋の右網様体, 延髄の左網様体において, 神経細胞の中心性色質融解が認められた。また, 頸髄全域の髄膜に軽度のリンパ球, 形質細胞及び好酸球浸潤が観察された。

左腕神経叢では, 第一頸髄同様の寄生虫様の異物とこれを取り囲んだ異物肉芽腫が観察された (図4, 5)。異物肉芽腫は神経周膜の間に存在し, 第一頸髄に比較して大型で周囲の神経束を圧排していた。同部位では神経線維の軸索の膨化, 断裂, 消失及び空胞化がみられた。

第二腰髄から第六腰髄の左側索では, 一部の軸索が腫大していた。なお, 一般諸臓器において特記すべき病理変化は認められなかった。

特殊染色: ニッスル染色では, 右中脳の赤核に存在する神経細胞において明瞭な中心性色質融解が観察され

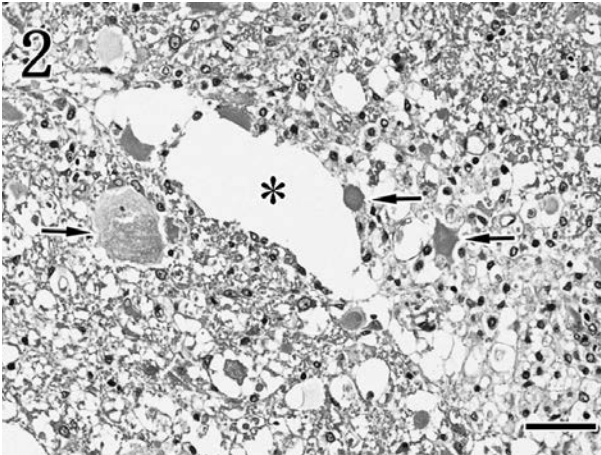


図2 左第一頸髄
背側白質に空洞(*)がみられる。空洞周囲には炎症細胞浸潤と軸索の腫大(矢印)が認められる(HE染色 Bar=25 μ m)。

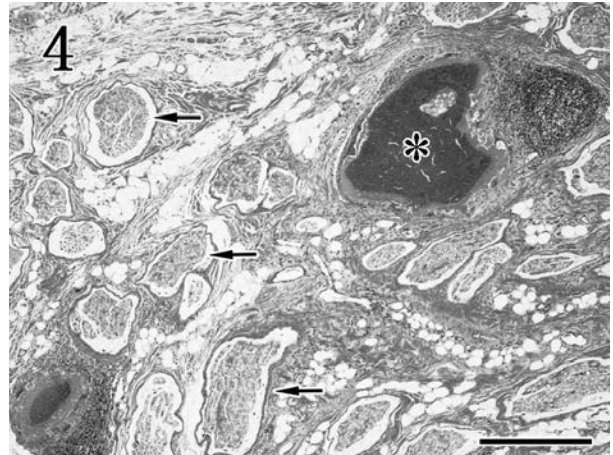


図4 左腕神経叢(低倍像)
神経束(矢印)の間に異物肉芽腫(*)とリンパ球の集簇巣が観察される(HE染色 Bar=500 μ m)。

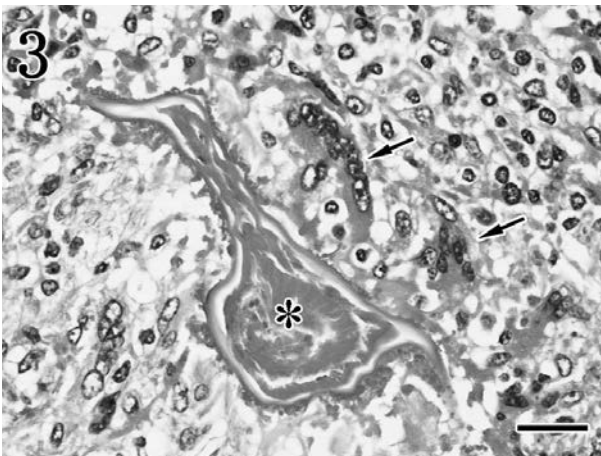


図3 左第一頸髄
背側灰白質に寄生虫様の異物(*)を取り囲んで異物巨細胞(矢印)が観察される(HE染色 Bar=25 μ m)。

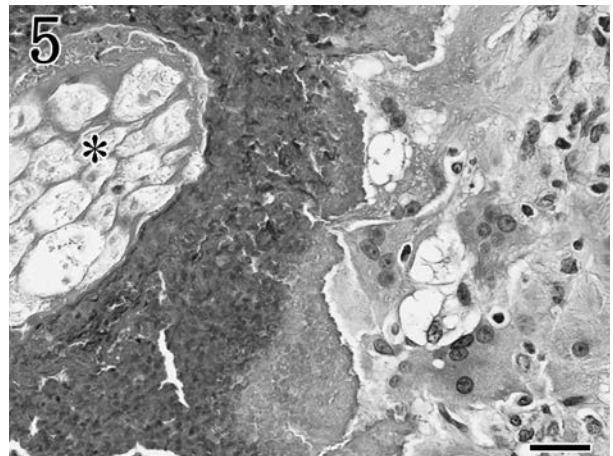


図5 左腕神経叢(高倍像)
寄生虫様の異物(*)を取り囲んで異物巨細胞が多数観察される(HE染色 Bar=25 μ m)。

た。LFB染色では、肉芽腫によって圧排されていた左腕神経叢の神経線維において、軸索の腫大、断裂及び消失が認められた。また、神経周膜及び間質において結合組織の増生が顕著であった。

免疫組織化学：頸髄では、空洞を伴う病変部と中心性色質融解細胞の周囲に抗NF抗体の染色性の低下が認められた。また、左錐体路において神経線維の消失が認められた。抗GFAP抗体を用いた検索では、頸髄の左背角及び左白質においてアストログリアの増数が認められた。抗Vimentin抗体を用いた検索では、左白質のおおむね全域が強陽性(図6)を示し、左中間質のアストログリア及び脂肪顆粒細胞が陽性であった。抗Iba-1抗体を用いた検索では、左白質の背索と腹索、左灰白質の背角から中間質が強陽性を示した。

左腕神経叢では、変性した軸索の間にIba-1抗体陽性細胞が多数観察された。また、神経周膜が肥厚していた部位ではCK AE1/AE3抗体が強陽性を示した。

頸髄と左腕神経叢に浸潤していたリンパ球はCD3とCD20に陽性であったが、CD3陽性細胞が優位であった。CD204陽性細胞は、虫体様の異物周囲において強陽性を示した。抗*S. digitata* ifp (Sd ifp) 血清を用いた検索では、虫体様の異物及び異物巨細胞が陽性であった(図7)。

分子生物学的検索：左腕神経叢と第七頸髄のパラフィンブロックを用いたPCR検索の結果、左腕神経叢から予想サイズのバンドが検出された(図8)。次に、PCR産物の塩基配列を調べたところ、既報の*S. digitata* 遺伝子と100%相同性を示した(GenBank Accession

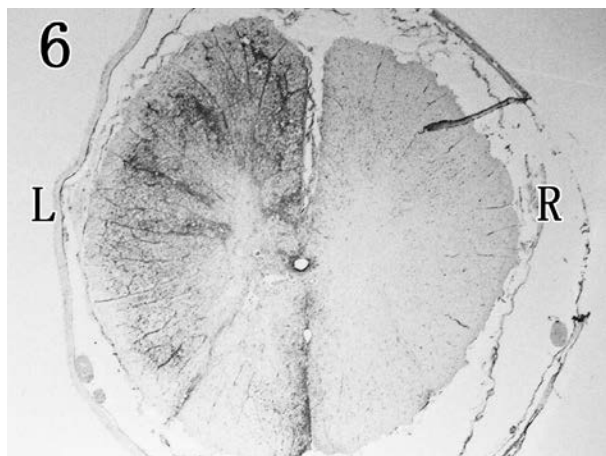


図6 第六頸髄
左頸髄の白質が抗 Vimentin 抗体にび慢性強陽性を示す (免疫染色).

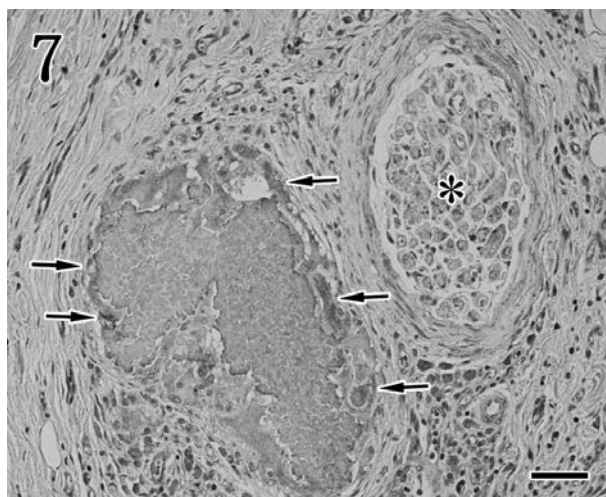


図7 左腕神経叢
虫体様の異物を取り囲む異物巨細胞 (矢印) が *S. digitata*ifp 血清に強陽性を示す。
* : 末梢神経束 (免疫染色 Bar=50 μm)

No. : LC064806).

考 察

脳脊髄糸状虫症の罹患動物にみられる病理組織学的所見は、線虫の CNS への迷入による神経組織の機械的破綻と炎症細胞の浸潤である [3, 7, 8]. 本症例では、頸髄に幼虫の迷入に伴う機械的破綻像 (虫道様空洞) が多数観察されたほか、虫体様の異物を取り囲んだ異物肉芽腫が頸髄と左腕神経叢に観察された。左腕神経叢にみられた肉芽腫は頸髄に比較し大型であり、神経周膜間と間質に明らかな結合組織の増生を伴っていた。このことから、幼虫が頸髄に先行して左腕神経叢へ侵入し、陳旧性の病変を誘起していた可能性が示唆された。さらに、左腕神経叢について組織学的並びに免疫組織化学的検索を

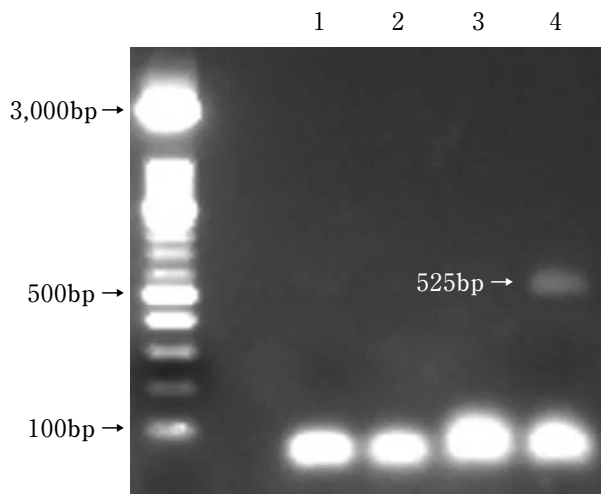


図8 電気泳動像
左腕神経叢のレーン4のみに525bpの陽性バンドが観察される。1: 蒸留水, 2: 陰性コントロール, 3: 第七頸髄, 4: 左腕神経叢. PCR法.

実施した結果、異物肉芽腫が神経周膜間のみ存在し、神経内膜や神経線維間では観察されないことが判明した。この理由については、幼虫が神経周膜のような厚い結合組織を直接貫通することができないこと、並びに神経内膜や神経線維間には幼虫の移動路としての血管が分布しないことが考えられた。本症例の脊髄病変は、左第一、第二、第五、第六、第七頸髄に主座し、時折、虫道様の空洞がみられた。これらの病変形成機序については明らかにできなかったが、左腕神経叢に侵入した *S. digitata* 幼虫が間質を利用して左第七頸髄に移動した後、脊髄実質を破壊しながら頭側方向に移動した可能性が考えられた。

中脳、橋及び延髄では、炎症性反応が認められず、神経細胞体の膨化と中心性色質融解が多数観察された。赤核と網様核は運動伝導路 (赤核脊髄路と網様核脊髄路) の起始部である [9]. 通常、神経細胞体の中心性色質融解は、軸索に何らかの障害を受けた神経細胞が再構築に向けて細胞体の代謝を亢進させている状態である [10]. したがって、本症例の右赤核及び左網様核にみられた中心性色質融解は脊髄の左腹角における軸索障害を反映しており、右網様核における中心性色質融解は脊髄の右腹索の軸索が障害されていたことを意味する。これらの運動伝導路における神経細胞の障害が本症例の運動失調に深く関与していた可能性が示唆される。

本研究では、パラフィンブロックから *S. digitata* の遺伝子が検出され、遺伝子検査が本症の確定診断に有用であることが示された。しかし、今回実施した検査では、虫体様の異物がみられた腕神経叢では陽性であったが、病変部のみの第七頸髄は陰性であった。このことから、パラフィンブロックからの遺伝子検査を行う際は、組織

学的に虫体の存在が確認される症例に限って応用可能と判断される。

今回の研究によって、3歳齢の山羊にみられた神経症状の原因が *S. digitata* 幼虫の腕神経叢及び頸髄への迷入と、その後の組織破壊と下行性運動ニューロンの傷害が深く関与していたことが判明した。

本研究の一部は日本中央競馬会の研究助成によって実施された。

引用文献

- [1] 大越 伸：緬山羊の腰麻痺とその予防治療，畜産の研究，5，805-808，養賢堂，東京（1951）
- [2] Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A : Parasitic encephalomyelitis, In: Veterinary Neuropathology, 159-162, Mosby-Year Book, St. Louis, Missouri (1995)
- [3] Bazargani T, Eslami A, Gholami GR, Molai A, Ghafari-Charati J, Dawoodi J, Ashrafi J : Cerebrospinal nematodiasis of cattle, sheep and goats in Iran, Iranian J Parasitol, 3, 16-20 (2008)
- [4] Kopcha M, Marteniuk JV, Sills R, Steficek B, Schillhorn van Veen TW : Cerebrospinal nematodiasis in a goat herd, J Am Vet Med Assoc, 194, 1439-1442 (1989)
- [5] Tung KC, Lai CH, Ooi HK, Yang CH, Wang JS : Cerebrospinal setariosis with *Setaria marshalli* and *Setaria digitata* infection in cattle, J Vet Med Sci, 65, 977-983 (2003)
- [6] Shin SS, Cho KO, Wee SH : Ocular infection of cattle with *Setaria digitata*, J Vet Med Sci, 64, 7-10 (2002)
- [7] Innes JR, Shoho C : Nematodes, nervous disease, and neurotropic virus infection; observations in animal pathology of probable significance in medical neurology, Br Med J, 2, 366-368 (1952)
- [8] Mohanty MC, Sahoo PK, Satapathy AK, Ravindran B : *Setaria digitata* infections in cattle: parasite load, microfilaraemia status and relationship to immune response, J Helminthol, 74, 343-347 (2000)
- [9] 寺島俊雄：神経回路（1）運動路，神経解剖学講義ノート，152-161，金芳堂，京都（2011）
- [10] Adams JH, Graham DI, Harriman DGF : The central nervous system and its reaction to disease, In: Introduction to neuropathology, 35-38, Churchill Livingstone (1988)

Pathological Studies of Cerebrospinal Setariosis in a Saanen Goat

Yuka NAKAMOTO^{1),2)}, Nozomi SHIWA¹⁾, Taichi SHIMATSU¹⁾, Kazunori KIMITSUKI¹⁾,
Michiko TOMIOKA¹⁾, Yoshinari KATAYAMA³⁾, Hiromi IKADAI¹⁾
and Chun-Ho PARK^{1)†}

1) School of Veterinary Medicine, Kitasato University, 23-35-1 Higashi, Towada, 034-8628, Japan

2) School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Midori-machi, Bunkyo-dai, Ebetsu, 069-8501, Japan

3) Equine Research Institute, Japan Racing Association, 1400-4 Shimotsuke, 329-0412, Japan

SUMMARY

A three-year-old Saanen goat showed limb ataxia and was necropsied because of the poor prognosis. Histopathologically, foreign body granulomas were observed in the left brachial plexus and cervical spinal cord. Central chromatolysis in the neurons of the descending motor tract was observed. The *Setaria digitata* (*S. digitata*) gene was identified by molecular biological examination using the paraffin blocks of the left brachial plexus. These results suggested that *S. digitata* had reached the left brachial plexus and cervical spinal cord via the bloodstream, and that neuropathy in the descending motor tract might be directly responsible for the limb ataxia. — Key words : Cerebrospinal setariosis, Histopathology, Saanen goat.

† Correspondence to : Chun-Ho PARK (Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, Kitasato University)

23-35-1 Higashi, Towada, 034-8628, Japan

TEL 0176-24-9433 FAX 0176-23-8160 E-mail : baku@vmas.kitasato-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 36 ~ 40 (2016)