成犬に発生した *Neospora caninum* 感染症の1例小山田敏文^{1)†} 光本恭子¹⁾ 筏井宏実¹⁾ 朴 天鎬¹⁾ 小山田隆¹⁾大志田守²⁾ 太田亟慈³⁾ 吉川博康¹⁾

1) 北里大学獣医畜産学部 (〒034-8628 十和田市東23番町35-1)

2) 岩手県 開業 (〒020-0834 盛岡市永井25-1)

3) 愛知県 開業 (〒484-0894 犬山市羽黒大見下29)

(2006年2月28日受付・2006年6月27日受理)

要 約

進行性の両側性後肢麻痺を呈し3カ月間の経過で死亡した7歳、雄のゴールデン・レトリバーを病理学的ならびに遺伝子学的に検索し、*N. caninum* 感染症と診断した。中枢神経系全域に原虫性のcystないしpseudocystの形成を伴った非化膿性髄膜脳脊髄炎が多発していた。病巣は特に小脳および脳幹に主座していた。一部筋組織にもpseudocystの形成を伴った非化膿性筋炎巣が存在していた。pseudocyst内の虫体は免疫組織化学的に*N. caninum* 強陽性で、電顕的には*N. caninum* に特徴的な微細構造が観察された。Nested PCRにより得られた原虫のDNA塩基配列は、既知の*N. caninum* の配列と98.2%の相同性を示しており、*N. caninum* 感染と同定された。以上、本症例は成犬に発生した*N. caninum* 感染症のわが国初報告例である。——キーワード：成犬、髄膜脳脊髄炎、*Neospora caninum*。

日獣会誌 59, 837～842 (2006)

ネオスポラ症は、1988年に命名された*Neospora caninum* (以下*N. caninum*) の感染によって起こる比較的新しい疾病である [5]。犬を終宿主とし、牛、山羊、羊などに感染し流死産および脳脊髄炎に起因した神経症状を発現する [3, 7]。畜産現場では特に牛の流死産や子牛の神経疾患への関与が問題となっており、日本 [13-15, 17] を含め、フランス、イギリス、カナダ、オーストラリアなど世界各地でその発生が報告されている [2, 3, 7]。

犬の場合は、妊娠犬から垂直感染した幼若齢犬に強い病原性を示し、脳脊髄炎、多発性筋炎、多発性神経根炎などを生じて死亡するケースが多いが [1, 5, 6, 7, 11]、諸外国では成犬での自然発生例も報告されている [4, 9, 10, 12]。いっぽう、日本では1992年に岡山県で5カ月齢の子犬が [20]、その後、2001年に宮崎県で90日齢の子犬が発症しているが [11]、成犬での発生はいまだ報告がない。

今回、進行性の両側性後肢麻痺を呈して死亡した成犬を病理学的に検索する機会を得、最終的に*N. caninum* 感染症と診断した。これはわが国における初報告である。以下に本症例に関する病理学的ならびに遺伝子学的

検査成績について述べる。

材料および方法

岩手県内の団地で飼育されていた7歳、雄のゴールデン・レトリバーが、平成16年9月に両側性後肢麻痺を示し、診療を受けた。脊椎造影検査やCT検査では脊髄圧迫性の病変は認められず、髄内病変が疑われた。その後麻痺症状は進行性に悪化し、同年11月14日よりまったく食餌を取らず起立不能に陥り、15日未明に死亡した。本症例は5年前に膀胱炎、4年前に膿疱疹を発症しているが、いずれも治癒している。

病理形態学的検査：死亡当日に病理解剖を行い、採取した全身諸臓器材料を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従いパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し観察した。一部の組織についてはGiemsa染色、PTAH染色を施した。また、ホルマリン固定後の小脳および脳幹部組織を戻し電顕包埋し、透過型電子顕微鏡によりシスト様構造物の微細構造を観察した。

免疫組織化学的検査：病理組織学的観察を通して、シスト様構造物を多数認めた脳橋部組織に対しStrepta-

† 連絡責任者：小山田敏文 (北里大学獣医畜産学部獣医学科獣医病理学研究室)

〒034-8628 十和田市東23-35-1 ☎0176-24-9433 FAX 0176-23-8160

図1 脳橋背側，クモ膜下腔から皮質にかけ円形細胞の浸潤とグリオシスが認められる。(HE染色)

図3 大脳，厚さ2.2μmの明瞭な壁を持つcystを示す。(HE染色)

図2 脳橋背側，図1の一部拡大像，囲管性細胞浸潤（左下）と散在するpseudocyst（矢印）を示す。(HE染色)

vidin-biotinylated peroxidase complex法（sABC法）を用いた免疫組織化学染色を実施した。一次抗体としてヤギ抗 *N. caninum* ポリクローナル抗体（以下 *N. caninum* Ab）（1000倍希釈，VMRD Inc.），抗 *N. caninum* (gp65) モノクローナル抗体（以下 *N. caninum* gp65 MoAb）5B6（1000倍希釈，VMRD Inc.），抗 *Toxoplasma gondii* ポリクローナル抗体（以下 *T. gondii* Ab）（1000倍希釈，VMRD Inc.），を用いた。なお，対照として，実験的 *T. gondii* 感染マウスの脳組織を用い，同様に観察比較した。

遺伝子学的検査：pseudocyst内虫体を遺伝子学的に確定するために，ホルマリン固定された脳幹部組織からDNAを抽出し試料として^{a)}，Nested polymerase chain reaction（以下 nested PCR）を行った。プライマーには *N. caninum* に特異的な pNC-5 遺伝子を対象としたものを合成した〔GenBank through the accession number X84238 [2, 21]〕（表1）。目的とする増幅サイズは Np7/Np4 のプライマー組が275bp，Np7/Np6 が227bpである。

表1 PCRに使用したプライマー

プライマー	塩基配列	DNA内の位置
Np7	5'-GGGTG AACCGAGGGAGTTG-3'	551-568
Np6	5'-CAGTCAACCTACGT CTTCT-3'	758-776
Np4	5'-CCTCCCAATGCGAACG AAA-3'	806-824

表2 シークエンシングに使用したプライマー

プライマー	塩基配列
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

さらに，得られたDNA増幅サンプルをpCR2.1-TOPOベクターに組み込み^{b)}，M13 forwardおよびreverseプライマー（表2）を用いてクローニングし^{c)}，シークエンスを行った。相同性検索はDDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcom-j.html>) により行った。

成 績

病理組織学的所見：剖検時には頸部脊髄に軽度の白色調変状を認めるのみであったが，組織学的には大脳から脳幹，脊髄全長にわたって顕著な非化膿性髄膜脳脊髄炎が認められた。特に小脳皮質域および脳幹において重度であった（図1）。クモ膜下腔および血管周囲腔にリンパ球，形質細胞およびマクロファージが高度に浸潤し，一部では炎症細胞浸潤は深部の実質にまで波及していた（図2）。実質病巣では肥大星状膠細胞や線維性星状膠細胞が顕著に増殖していた。反応性に集簇した小膠細胞からなるグリア結節も多数存在していた。また，神経細胞

a) DNA Isolator PS Kit, 和光純薬株, 大阪。

b) Big Dye terminator cycle sequencing kit, Applied Biosystems Japan, 大阪。

c) TOPO TA cloning kit, Invitrogen, U.S.A.

図4 第4頸髄。壁が不明で少数の虫体が集合した小型のpseudocystを示す。(HE染色)

図6 延髄。pseudocyst内の原虫は*N. caninum* Abに陽性を示す。(免疫組織化学)

図5 眼球後引筋。内側と外側で筋原線維の走行が異なる輪状筋線維(矢印)を示す(PTAH染色)。

の変性濃縮や脱髄による実質の空胞化も顕著であった。頸～腰髄においても、白質の脱髄は連続性に存在し、非化膿性炎症巣が散在していた。

これら炎症巣内外の諸所に好塩基性小粒子を多数数れた大小円形のシスト様構造物が存在していた(図2, 3)。それらの大きさは最大で50 μm, 13～28 μm(平均16.9 μm)であった。シスト構造物は明らかに神経細胞や神経膠細胞の細胞質内に存在し、多くはシスト壁の不明瞭なpseudocystであった(図4)。cystないしpseudocystは脳の皮質域から脊髄に至るまで広く分布していたが、炎症反応の顕著な脳橋背側に多く存在し、延髄から頸髄、胸髄、腰髄においては白質域に散在していた。また、脊髄に存在するpseudocystの大きさは9～11 μmであった。

眼球後引筋にリンパ球や形質細胞の浸潤よりなる限局性の非化膿性炎症巣が散在していた。炎症巣近隣の横紋筋細胞の細胞質内に長径37 μmのpseudocystが出現していた。また、炎症巣周辺の横紋筋線維には輪状筋線維

(ring fiber)が多数形成されており、筋原線維の異常走行はPTAH染色において明瞭に観察された(図5)。舌においても眼球後引筋同様の炎症巣が散在していたが、pseudocystは観察されなかった。また、口唇の毛包周囲やアボクリン腺、皮脂腺周囲にマクロファージ、形質細胞の浸潤を、皮下結合組織内に好酸球主体の炎症細胞の浸潤を認めた。深部の筋組織では、変性萎縮と再生形態を混在する筋線維束が存在していた。なお、他部位の全身骨格筋は観察していない。

その他の臓器では、肝臓に非化膿性微小壊死巣の形成と肝細胞、クッパー細胞へのヘモジデリン沈着が、脾臓に白脾髄濾胞の萎縮、赤脾髄に軽度のヘモジデリンの沈着と脾索の線維増生、一カ所の脾臓毛胞にpseudocystが認められた。

免疫組織化学的所見：シスト様構造物内の原虫は抗*N. caninum* Ab、抗*N. caninum* gp65 MoAb 5B6を用いた免疫染色によりともに陽性を示した(図6)。また、抗*T. gondii* Abに対しても弱陽性を示していた。なお、実験的*T. gondii*感染マウス脳のcystは、抗*T. gondii* Abには陽性を示したが、抗*N. caninum* gp65 MoAb 5B6に対しては陰性だった。組織学的にはシスト様構造物外に遊在する虫体を観察し得なかったが、免疫組織化学的には炎症巣内に三日月状ないし楕円形状の陽性構造物が観察された(図7)。以上の免疫組織化学的結果から、虫体は*N. caninum*と同定された。

シスト様構造物および虫体の超微形態：脳橋部組織に存在していた*N. caninum*のシスト様構造物は厚く明瞭な壁(厚さ2.2 μm)を有し大きさが平均16.9 μmと小さめのcystか、あるいは壁の不明瞭なpseudocystであり、内部には隔壁がなくsarcocystのそれとは明らかに異なっていた(図8)。pseudocyst内部の虫体は大きさにはばらつきはあったが、約4.6 × 1.8 μm, 最大のものでも5.8 × 1.8 μmのtachyzoiteであった。

図7 延髄. 非化膿性炎症巣内に *N. caninum* Abに陽性の虫体 (矢印) が散在している. (免疫組織化学)

図9 脳橋. pseudocyst内のtachyzoiteは細胞質内に電子密度の高いrhoptryやmicronemeを含んでいる. (酢酸ウラン・鉛染色)

図8 脳橋. アストログリア細胞にみられたtachyzoiteを含むpseudocystの微細構造 (酢酸ウラン・鉛染色).

以下にそれぞれ観察された虫体内構造物について、既知の構造学的名称 [7, 18, 19] を参考にして説明する. 細胞前端部には polar ring, conoid, rhoptry, microneme, subpellicular microtubule からなる apical complex が存在していた. 電子密度の高い管状の rhoptry は頸部から後方へ向かって分布し, microneme は核の前方および後方に多数存在していた. 前方に分布する microneme の一部は虫体細胞膜に垂直に配列していた (図9). 核は細胞体の後方に位置していた. Pseudocyst 内の tachyzoite の中には, 2 個の虫体が細胞膜を共有して連続する分裂期の虫体も観察された.

虫体の遺伝子学的検索結果: nested PCR において 1st PCR の段階では特異的なバンドは検出されなかったが, 2nd PCR では 227bp 領域に *N. caninum* に特異的なバンドが検出された (図10). この DNA 産物をシーケンスした結果, 表3に示すような塩基配列が得られた. この配列の相同性を検索したところ, *N. caninum* species-specific DNA probe (GenBank through the

図10 Nested PCR. 2nd PCRにより 227bp 付近に Np7/Np6 プライマーにより増幅されたバンドが出現している.

accession number X84238) と 98.2 % の相同性を示していた. GenBank には 100 % 一致するものはなく, 今回得られた *N. caninum* を accession number AB233409 として登録した.

考 察

犬に炎症性神経疾患を起こすおもな原虫症としてエンセファリトゾーン症, トキソプラズマ症, ネオスポラ症が知られているが, 特にネオスポラ症が重要視されている [3, 7]. *N. caninum* は Apicomplexa 門 Eimeria 類 Sarcocystidae (サルコシスティス科) に属する原虫であり, その形態がトキソプラズマのそれに酷似し, かつては誤認されていたが [5], 現在では両者は電顕的な微細構造および免疫学的性状によって鑑別されている [5, 7, 8, 19].

これより, 本症の臨床学的ならびに病理学的特徴と病

表3 シークエンスにより得られた塩基配列

CAGTCAACCT	ACGTCTTCTG	CCCCTTCCCT	CGTCCGCTTG	40
CTCCCTATGC	ATAATCTCCC	CCGTCATCAG	TGCCGCCGGT	80
GTTGCCTCAA	CAACAGAACAC	TGAACTCTGG	ATAAGTATCA	120
TTGACACACT	GTCCACACCC	TGACGCAGGC	TGATTTCAAC	160
GTGACGAATG	ACTAACCGCA	AACCACGTAT	TGATTTCAAC	200
ACCGCTACCA	ACTCCCTCGG	TTCACCC		227

原体の微細構造について考察する。

臨床学的特徴：臨床的に、ネオスポラ症の多くは先天的に感染した幼若齢の犬に発生し、後肢の不全麻痺を伴う急性進行性の筋炎を発症し、重度の上行性麻痺に進展する。病変は中枢神経系のみならず末梢の神経や筋、他の臓器で観察され、寄生虫の分布と臨床所見との間に明確な関連性はないとも報告されている [7]。いっぽう成犬での発症はまれであり、一貫した臨床経過を示さないともいわれているが [10]、発症した場合、中枢神経系の多発性病巣形成、多発性筋炎や複数の臓器器官への感染と病巣形成が認められ [4, 10, 12]、また、肺炎や皮膚炎のみを発症した例も報告されている [7, 9]。今回の症例は臨床的には急性進行性の両側性後肢麻痺を示しネオスポラ症を疑う上で重要な所見ではあったが、わが国では成犬での発生がまったく確認されていないことから診療した獣医師は本感染症を疑ってはいなかった。成犬の *N. caninum* 感染症が成齢時に感染したものなのか、それとも胎盤感染後に長期間潜伏していたものが免疫力の低下などにより発症したのかを確定することは困難である [1, 6, 7, 12]。本症例は5年前に膀胱炎、4年前に膿痂疹を発症しているが、今回の *N. caninum* 感染症との関連性はないと考えられる。また、親や同腹仔の健康状態に関する情報も得られていない。さらに、犬における本感染症の水平感染の経路について牛との関連が示唆されているが [9, 17]、本症例の場合は飼育環境が団地であるという情報のみであり、感染経路についても不明である。

病原体の微細構造：電顕的に観察した tachyzoite の大きさはおよそ $4.6 \times 1.8 \mu\text{m}$ であった。Speer ら [18, 19] によると、*N. caninum* は $7.5 \times 2 \mu\text{m}$ ($n = 20$)、*T. gondii* は $6.8 \times 1.5 \sim 3 \mu\text{m}$ ($n = 20$) とされている。これと比較して、観察した虫体はやや小型であった。tachyzoite は母細胞内二細胞発育により宿主細胞内で急速に増殖する増殖型虫体であり、それ故、さまざまな発育段階の tachyzoite が存在するので大きさにばらつきが生ずるものと考えられる。分裂途中の tachyzoite が観察されたことは、tachyzoite の活発な増殖を反映したものであろう。

N. caninum と *T. gondii* の tachyzoite の最も大きな形態学的違いは rhoptry にあり、*N. caninum* の rhoptry は電子密度が高く色も濃い、*T. gondii* のそれは海

綿状、蜂の巣状で、色は薄いとされている [8, 18, 19]。また、microneme についても、*T. gondii* のそれは無秩序に配列しているが、*N. caninum* のそれは虫体細胞膜に垂直に配列しているものが見られるのが特徴的とされている [18, 19]。今回観察した虫体は電子密度の高い rhoptry を有し、虫体細胞膜に垂直に配列する microneme が多数確認されており、*N. caninum* の形態と一致していた。これらの特徴は両虫体を形態学的に鑑別する上での参考データになり得るものと考えられる。

髄膜脳炎について：*Neospora* 感染症は中枢神経系の病変、すなわち、非化膿性髄膜脳脊髄炎を主体とする。本症例においても大脳から脳幹、そして脊髄の全長にわたる左右多発性の慢性炎症と病巣内外に播種性に存在する pseudocyst が観察された。このことは原因が脈管を介して中枢神経系に蔓延したことを物語っている。円形細胞（リンパ球、形質細胞）およびマクロファージの血管性浸潤や実質内浸潤、星状グリア細胞の著しい反応性増殖は、炎症のステージ、すなわち組織損傷と後続する修復反応過程が相当に早い時期に発現し、かつ持続していたことを示している。

tachyzoite が宿主細胞へ侵入すると、PV 膜を形成し [3] 急速に増殖して宿主細胞を破壊する。炎症巣内に観察された抗 *N. caninum* Ab 陽性の三日月状や楕円形状の構造物は pseudocyst が崩壊して遊離した tachyzoite である。いっぽう、炎症巣内外に散在する cyst は壁の厚さにばらつきがみられた。静止期の cyst は PV 膜と顆粒層から構成される厚い壁を有し、その最外層が宿主細胞の細胞膜であることから [19]、cyst に対する生体反応が抑制され、宿主からの免疫による攻撃を受けることなく長期間潜伏していた可能性がある [1, 3]。換言すれば、何らかの原因で宿主の免疫力が低下して cyst が崩壊した場合に、生体反応として非化膿性炎症が発現するのである。過去に免疫抑制剤による治療を受けていた犬での発症が報告されているが [7, 10, 16]、本症例ではそのような情報は得られていない。

筋炎について：*N. caninum* 感染症の特徴的な症状として、神経麻痺とともに後肢の脱力、筋障害が知られている。中枢神経障害に後続する症状でもあるが、tachyzoite や pseudocyst を伴った多発性筋炎に起因するものであることも確認されている [1, 10, 11, 12, 20]。今

回, 眼球後引筋, 舌および口唇の筋のみを観察したが, リンパ球や形質細胞の浸潤を伴った小壊死巣が散在性に見られ, 眼球後引筋の一カ所には tachyzoite を含んだ pseudocyst が存在していた。全身の骨格筋組織を観察してはいないものの, 中枢神経系と同様, 体幹筋の処々に *Neospora* による病巣が播種性に存在していた可能性がある。いっぽう, 炎症巣周辺の横紋筋細胞には輪状筋線維 (ring fiber) が多数形成されていた。この変化は, 古くに筋細胞の変性が発現し, その後長期にわたる緩慢なかつ不完全な再生反応が生じていたことを示すものである。これまでに, *Neospora* 感染症の筋病巣に輪状筋線維を観察したとする報告はなされていないが, 特に成犬における本症と密接に関連した変化として注目される。

最後に, 両側性の進行性後肢麻痺を発現した本症例は原因が不明なまま死亡し, 病理学的観察により初めて *Neospora* 症と診断された。成犬においても *Neospora* 症が発生することを認識し, 生前に筋バイオプシーや *Neospora* の血清抗体価の測定が行われていれば, 本症を診断できた可能性がある [12, 16]。

稿を終えるにあたり, 貴重な抗血清を分与いただいた北海道大学比較病理学研究室 梅村孝司教授に深く感謝する。

引用文献

- [1] Barber JS, Payne-Johnson CE, Trees AJ : J Small Anim Pract, 37, 568-574 (1996)
- [2] Baszler TV, Gay LJ, Long MT, Mathison BA : J Clin Microbiol, 37, 4059-4064 (1999)
- [3] Buxton D, McAllister MM, Dubey JP : Trends Parasitol, 18, 546-552 (2002)
- [4] Cantile C, Arispici M : J Vet Med A, 49, 47-50 (2002)
- [5] Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A : J Am Vet Med Assoc, 192, 1269-1285 (1988)
- [6] Dubey JP, Higgins RJ, Smith JH, O'Toole TD : Vet Rec, 126, 193-194 (1990)
- [7] Dubey JP, Lindsay DS : Vet Parasitol, 67, 1-59 (1996)
- [8] Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA : Clin Microbiol Rev, 11, 267-299 (1998)
- [9] Greig B, Rossow KD, Collins JE, Dubey JP : J Am Vet Med Assoc, 206, 1000-1001 (1995)
- [10] Hoskins JD, Bunge MM, Dubey JP, Dunkan DE : Cornell Vet, 81, 329-334 (1991)
- [11] 伊藤輝夫, 内田和幸 : 日獣会誌, 54, 565-567 (2001)
- [12] Lorenzo V, Pumarola M, Siso S : J Small Anim Pract, 43, 76-79 (2002)
- [13] 奥田宏健, 福富豊子, 大内紀章, 山川まり子, 藤原三男, 島田章則, 梅村孝司 : 日獣会誌, 47, 91-94 (1994)
- [14] 奥田宏健, 平田祐介, 福富豊子, 藤原三男, 島田章則, 梅村孝司 : 日獣会誌, 48, 544-546 (1995)
- [15] 奥田宏健, 大内紀章, 福富豊子, 多田幸四郎, 萱原佳美 : 日獣会誌, 53, 383-386 (2000)
- [16] Ruehlmann D, Podell M, Oglesbee M, Dubey JP : J Am Anim Hosp Assoc, 31, 174-183 (1995)
- [17] Sawada M, Park CH, Kondo H, Morita T, Shimada A, Yamane I : J Vet Med Sci, 60, 853-854 (1998)
- [18] Speer CA, Dubey JP : J Protozool, 36, 458-463 (1989)
- [19] Speer CA, Dubey JP, McAllister MM, Blixt JA : Int J Parasitol, 29, 1509-1519 (1999)
- [20] Umemura T, Shiraki K, Morita T, Shimada A, Hiritani M, Kobayashi M, Yamagata S : J Vet Med Sci, 54, 157-159 (1992)
- [21] Yamage M, Flechtner O, Gottstein B : J Parasitol, 82, 272-279 (1996)

A Case of *Neospora Caninum* Infection in an Adult Dog

Toshifumi OYAMADA^{*†}, Kyoko MITSUMOTO, Hiromi IKADAI, Chun-Ho PARK, Takashi OYAMADA, Mamoru OHSHIDA, Joji OHTA and Hiroyasu YOSHIKAWA

^{*} Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, 35-1 Higashi 23, Towada city, 034-8628, Japan

SUMMARY

A seven-year-old, male golden retriever suddenly developed bilateral hind limb paralysis. The paralytic condition progressed for almost three months until the dog ultimately died. Pathologically, multiple foci of chronic non-purulent meningoencephalomyelitis with protozoan cysts and/or pseudocysts were widely formed in the CNS, especially in the cerebellum and brainstem. Non-purulent myositis with cysts was also formed in some muscles. The parasites in the cysts were clearly positive for *N. caninum* immunohistochemically, and characteristic ultrastructures of *N. caninum* were observed by electron microscopy. The specific band that relates to *N. caninum* was detected by nested PCR. The base composition of the DNA products resulted in 98.2% homology with that of *N. caninum*. From these results, the dog was confirmed to be the first case of *N. caninum* infection seen in an adult dog in Japan. — Key words : adult dog, meningoencephalomyelitis, *Neospora caninum*.

[†] Correspondence to : Toshifumi OYAMADA (Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University)

35-1 Higashi 23, Towada city, 034-8628, Japan TEL 0176-24-9433 FAX 0176-23-8160

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 59, 837 ~ 842 (2006)