黒毛和種子牛に発生した遺伝性内水頭症の 染色体領域の解明

鈴木暁之¹⁾ 佐藤洋一¹⁾ 吉川恵郷^{1)†} 野口龍生¹⁾ 塩谷康生²⁾
竹之内直樹³⁾ 杉本喜憲⁴⁾ 渡邊敏夫⁴⁾

- 1) 岩手県農業研究センター畜産研究所 (〒020-0173 岩手郡滝沢村滝沢字砂込737-1)
- 2) 独農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所 (〒305-0901 つくば市池の台2)
- 3) 独農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター (〒020-0198 盛岡市下厨川字赤平4)
- 4) 社畜産技術協会附属動物遺伝研究所 (〒961-8061 西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原1)

(2006年5月17日受付・2006年8月21日受理)

要 約

特定系統の黒毛和種雄牛を共通の父とする内水頭症を分娩した母牛と父牛はきょうだい関係にあった。原因究明のためその母牛に過剰排卵処理を施し、同一の父牛の精液を交配して胚を回収した。胚移植により得られた10例の産子のうち、雌雄各2例は出生直後から起立不能、吸乳不能等の症状を示し、雌1例は29日齢で痙攣、運動失調等の異常を示した。共通の剖検所見は、脳脊髄液の増量による側脳室の拡張と大脳実質の萎縮を伴った内水頭症であった。病原検索から細菌やウイルスの関与は否定された。これら全きょうだいおよび過去に発生した半きょうだい材料を用いてDNA連鎖解析を行い、3番染色体のセントロメア近傍にホモ化した共通領域をみいだし、マーカーMB101とDIK069を用いることで診断が可能となった。遺伝様式の解析により、本症は単一常染色体劣性遺伝様式と判定された。
——キーワード：常染色体劣性遺伝、DNA解析、全きょうだい、内水頭症、黒毛和種。

日獣会誌 60, 196～200 (2007)

子牛に発生する先天性内水頭症は、中枢神経系、感覚器系、骨格と筋肉に複合した病変を形成する [1-10]。このうち発生形態が家族性や特定種雄牛の産子に観察されるものは常染色体劣性遺伝が疑われている [1, 3, 6]。近年、このような遺伝様式を示す主要な疾患は、DNAマーカーを用いた連鎖解析による原因遺伝子のマッピングと遺伝子が特定され [11, 12]、保因牛の排除、または非保因牛への交配に活用され、発生防止に貢献している。

1988年以降に岩手県内の黒毛和種繁殖農家において、特定系統種雄牛の産子に出生時より起立不能や神経症状を示す疾病が集団的に発生し、病性鑑定の結果、先天性内水頭症と診断された。疾病の発生機序と原因は解明されなかったが、遺伝的要因の関与が示唆された。

今回、原因究明のために作出された全きょうだい家系と過去に発生した半きょうだい家系のパラフィン包埋材料を用いて、DNAマイクロサテライトマーカー解析を実施した。その結果、本症は単一常染色体劣性遺伝によ

り発生することが明らかとなった。

材料および方法

材料：過去に起立不能と吸乳不能を示し、岩手県中央家畜保健衛生所において脳脊髄液の増量による側脳室拡張を伴った内水頭症と診断された異常子牛雌1例を分娩した黒毛和種雌牛（供胚牛）をもちいた。再現試験のために本雌牛に過剰排卵誘起処置を行い、同一の種雄牛Bの精液で人工授精をした。その後採取された胚を黒毛和種、交雑種（黒毛和種×ホルスタイン種）の雌牛にそれぞれ1～2胚ずつ移植し、10例の産子（No. 1～10）を得た。これらの子牛は出生直後から虚弱のため予後不良となった雌雄各2例（No. 1, 2, 3, 5）と生後29日齢に痙攣、運動失調を示した雌1例（No. 4）、および臨床的に正常な産子5例（No. 6～10）に分けられた。異常子牛の所見を表1に示したが、いずれも生後1日齢から51日齢の間に剖検された。No. 1, 2, 3, 5は放血殺、

† 連絡責任者：吉川恵郷（岩手県農業研究センター畜産研究所）

〒020-0173 岩手郡滝沢村滝沢字砂込737-1 ☎019-688-7315 FAX 019-688-4327 E-mail: y-yoshikawa@pref.iwate.jp

表1 異常子牛の臨床所見

No	性	出生月	発症日齢	所見
1	雌	12月	1日	頭部膨隆, 起立不能, 吸乳不能
2	雄	7月	1日	頭部膨隆, 早産, 虚弱, 起立不能, 吸乳不能
3	雄	7月	1日	頭部膨隆, 虚弱, 起立不能, 吸乳不能, 斜視
4	雌	7月	29日	歩様不安定, 痙攣
5	雌	5月	1日	頭部膨隆, 虚弱, 起立不能, 吸乳不能, 斜視

No. 4は死後材料である。

近交係数：Wrightの近交係数式 [13] により算出した。

病理検査：剖検時に採取された5例の材料は常法に従って10%中性緩衝ホルマリン液固定, パラフィン包埋, 薄切後にヘマトキシリン・エオジン染色を施し鏡検した。

細菌検査：主要臓器, 大脳, 体表リンパ節を材料として5%羊血液寒天培地, GAM寒天培地に直接塗抹し, 37℃48時間好気性培養およびジャー法による嫌気性培養を実施した。

ウイルス抗体検査：異常産に関連するアカバネ病, チェウザン病, イバラキ病, アイノウイルス感染症と牛ウイルス性下痢・粘膜病 (BVD-MD) の各ウイルスについて, 剖検時の血清を材料として中和反応により測定した。また, BVD-MDウイルスの分離は脳脊髄液材料をBFM細胞に接種した。

DNA解析：DNAは異常子牛の母牛, 母牛の父 (種雄牛A), 父牛 (種雄牛B), 種雄牛Aを父とする息牛 (種雄牛C) および全きょうだい10例の血液または精液から定法により抽出した。マイクロサテライト多型はPCR増幅と自動シーケンサー (ABI377XL, Applied Biosystems, U.S.A.) でゲル電気泳動を行い, 遺伝子型判定は, シーケンサーに付属するソフトウェア (GenescanおよびGenotyper, Applied Biosystems, U.S.A) で断片長を解析した。連鎖解析はGenehunter [14] により評価した。使用したマーカーは, 米国農務省で公開している3,000のマイクロサテライトマーカーから常染色体を10cMでカバーする264個を用いた。

また, 過去に種雄牛AまたはB, Cを父とし, 内水頭症を示した発症子牛18例の10%中性緩衝ホルマリン固定, パラフィン包埋により保存されていた脾臓サンプルを定法に従い薄切し, DNA抽出キット (Dexpat, タカラバイオ㈱, 滋賀) を用いてDNAを抽出した。これらDNAについて前述の手法で解析した。

遺伝様式の検討：発生地域内で母牛の父が種雄牛AまたはBとCであって, 同一系統間で交配された産子60例を調査対象とした。表現型が正常または異常の分離比検定は, Pearsonが示した方法 [15] で χ^2 検定により

図1 胚移植産子10例の家系とDNA解析の結果。○は雌, □は雄, 全黒はホモで発症, 半黒はヘテロ, ?は解析なしを示す。

図2 ホルマリン固定後の大脳の横断写真 (No. 3)。両側脳室の中程度の拡張を示す。

実施した。

成 績

疫学所見：異常子牛の父Bと母牛は, 種雄牛Aの子で異母きょうだい関係にあり, 産子の近交係数は15.7%であった (図1)。

臨床所見：全きょうだい10例中の, 異常子牛5例 (No. 1～5) の性, 生年月, 日齢, 発症日齢, 所見を表1に示した。出生時に異常を認めた4例 (No.1, 2, 3, 5) は起立不能, 吸乳不能がみられ, 頭部の膨隆が4例, 斜視が2例に観察された。No.4は生後29日齢に痙攣, 運動失調を示した後, 下痢症で死亡した。残りの5例 (No. 6～10) は臨床的に異常を認めなかった。

剖検所見：5例 (No. 1～5) は脳脊髄液が著しく増量し, 後頭窩切開時に透明な同液の大量の流出があった。側脳室は左右対称性に軽度から中程度に拡張し (図2), 大脳実質の菲薄化が認められた。前頭部の膨隆した3例 (No. 1～3) の中脳水道は拡張していた。

組織所見：5例の中樞神経系に顕著な組織学的変化はみられなかったが, No. 1の橋部小動脈内膜の肥厚による内腔狭窄およびNo. 2の中脳水道にフォーキング形成が観察された。また, No. 2, 3, 4は胃腸炎, No. 2, 4

図3 全きょうだい牛10例の連鎖解析によるBTA3のロッドスコア。BMS871とBL41間のロッドスコアの上昇を示す。MB101とDIK069間の矢印は18頭の発症子牛が種雄牛Aから受け継いだ領域を示す。

の肝に壊死巣形成，小葉性肺炎，No. 1 に内臓付着リンパ節炎が混在してみられた。

細菌検査：細菌はいずれの臓器からも分離されなかった。

ウイルス抗体検査と BVD-MD ウイルス分離：各ウイルス抗体検査成績は、いずれも 2 倍以下であった。また、牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルスに対する抗体価は、No. 4 の 128 倍を除き、2 倍以下であった。BVD-MD ウイルスはいずれも分離されなかった。

DNA解析: 常染色体に配置したDNAマーカーを用いて全きょうだい10例を連鎖解析したところ、3番染色体(BTA3) セントロメア近傍のBMS871 (0cM) とBL41 (43.3cM) の間に発症との関連度合いを示す高いロッドスコアの領域が検出された(図3). パラフィン包埋材料18例を加えてBTA3を精査したところ、MB101 (17.0cM) とDIK069 (27.4cM) の間に共通のハプロタイプを受け継いでいた。祖父由来のこの領域が両親に受け継がれ、発症牛がホモ型になり、正常牛ではホモ型になっていなかった。

遺伝様式の検討：産子60例のうち内水頭症と診断されたのは11例であった。遺伝様式を劣性遺伝と仮定す

ると60例の表現型正常と異常の観測値は49対11, χ^2 値は1.422であり, 5%水準の χ^2 値3.841より小さいため理論値に適合した.

考 察

岩手県内の特定系統黒毛和種種雄牛の産子に発生した内水頭症について類似疾病との比較，病原検索，および遺伝子解析から原因究明を試みた。

子牛に発生する先天性内水頭症は、多くの品種に発生し、中枢神経病変に限定することなく他の器官を巻き込み多彩な病理所見を示すことが多い。

Greene ら [4] は多数の野外例を病理学的に観察し、病変の状態と分布から 11 病型に分類した。このうちヘレフォード症候群 2 型は、側脳室の拡張を基本とするものの一部に小眼球症、網膜異形成と中脳水道のフォーキング形成の混在を報告している。本研究の症例は側脳室の軽度から中程度の拡張を共通所見とし、1 例に中脳水道のフォーキングがあり、病型の類似性が認められた。

内水頭症の発生は、脳脊髄液の流路系の閉塞により起こる閉塞性内水頭症と局所的な閉塞が明らかでない非閉塞性内水頭症に分類される [16]。前者に属する疾病と

して、アーノルド・キアリ奇形 [8], ダンディ・ウォーカー症候群 [5, 7], 中脳水道壁に形成された瘤状物や中脳水道のフォーキング形成による狭窄 [4, 9] が報告されている。これらと病理所見を異にするため、本例は後者に属するものと推察されるが、脳脊髄液の生成部位である脈絡叢、吸収排泄機構を司るくも膜顆粒および静脈洞の検索を実施していないため、脳脊髄液貯留の原因を明らかにできなかった。

Greene ら [3] は、発症牛の父と母系の父とが兄弟関係にあることから、疫学的に内水頭症の原因として遺伝的要因を示唆している。

本例も同様の家族歴のため、異常子牛を分娩した母牛に胚移植を用いて全きょうだい家系を作出したところ、高率に疾病の再現ができた。胚移植によって、少数の供胚牛から遺伝性疾患を再現できることを明らかにした本研究は、今後類似の遺伝性疾患の解析に有益な手法を提供するであろう。

全きょうだい材料について、Ihara ら [11], Kobayashi ら [12] の解析手法と同様に常染色体を約 10cM 間隔で配置した DNA マーカーによる連鎖解析の結果、原因となる遺伝子座は、BTA3 のセントロメア近傍の BMS871 (0cM) ~ BL41 (43.3cM) にマップされた。このことは祖父由来の共通ハプロタイプが両親に受け継がれ、その子牛がホモ接合体となり、発病に至ったものと考えられる。全きょうだい家系材料では、これ以上の染色体領域を縮減できなかったことから、パラフィン包埋により保存されていた 18 例の脾臓組織を供試した結果、マイクロサテライトマーカー MB101 (17.0cM), DIK069 (27.4cM) の間まで縮小できた。

本研究の結果から今回の内水頭症は、父系の近交係数の上昇により不良遺伝子座がホモ化して発病したものと考えられた。発生地域内の調査では、同一系統間交配による産子 60 例中 11 例が発症していた。劣性遺伝様式を仮定すると雑種第 2 代に現れた分離比の χ^2 値 (1.422) は、5%水準で 3.841 より小さく、理論値に適合するため、これらの例は単一常染色体劣性遺伝による内水頭症と判定された。

今回の遺伝性内水頭症の DNA マーカー診断法は、特定種雄牛に限った手法であるため他品種、他系統や原因領域の組み換え牛についての応用は、今後十分な検証が必要である。

岩手県の黒毛和種基礎牛群は特定の系統間交配が進み、母集団の近交係数の上昇から、時として不良形質の集団的発生が危惧される。遺伝的不良形質の発生による経済的損耗防止をはかるには、原因究明が重要となるため、今後は関係者の広域連携による情報交換、材料の提

供および詳細な疫学調査が必要である。

稿を終えるにあたり、病性鑑定を実施していただいた岩手県中央家畜保健衛生所病性鑑定課の諸先生の方々に感謝する。

引用文献

- [1] Axthelm MK, Leipold HW, Phillips RM : Congenital internal hydrocephalus in polled Hereford cattle, *Vet Med Small Anim Clin*, 76, 567-570 (1981)
- [2] Belling TH, Holland LA : Variation of internal hydrocephalus. *Vet Med*, 57, 405-408 (1962)
- [3] Greene HJ, Leipold HW : Hereditary internal hydrocephalus and retinal dysplasia in Shorthorn calves, *Cornell Vet*, 64, 367-375 (1974)
- [4] Greene HJ, Leipold HW, Hibbs CM : Bovine congenital defects; variations of internal hydrocephalus, *Cornell Vet*, 64, 596-616 (1974)
- [5] Jeffrey M, Preece BE, Holliman A : Dandy-Walker malformation in two calves, *Vet Rec*, 126, 499-501 (1990)
- [6] Leipold HW, Gelatt KN, Huston K : Multiple ocular anomalies and hydrocephalus in Grade Beef Shorthorn cattle, *Am J Vet Res*, 32, 1019-1026 (1971)
- [7] Madarame H, Azuma K, Nozaki H, Numata K, Konno S : Dandy-Walker malformation in a Japanese calf, *Vet Pathol*, 27, 296-298 (1990)
- [8] 岡田光司, 日笠喜朗, 佐藤耕太, 籠田勝基, 森田剛仁, 島田章則, 竹内 崇, 前田豊之 : 黒毛和種子牛における後頭骨形成異常を伴う先天性内水頭症の 1 例, *日獣会誌*, 54, 767-771 (2001)
- [9] 附田彰二, 小笠原 明, 池田澄雄, 紺野 悟 : 水頭症と低形成性筋症を呈する先天性異常, *日獣会誌*, 37, 584-589 (1984)
- [10] Urman HK, Grace OD : Hereditary encephalomyopathy. A hydrocephalus syndrome in newborn calves, *Cornell Vet*, 54, 229-249 (1964)
- [11] Ihara N, Fujita T, Shiga K, Itoh M, Watanabe T, Sugimoto Y : Linkage analysis reveals two independent loci for ocular disorders in a local Japanese Black cattle population, *Animal Genetics*, 36, 132-134 (2005)
- [12] Kobayashi N, Hirano T, Maruyama S : Genetic mapping of a locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1, *Animal Genetics*, 31, 91-95 (2000)
- [13] 水間 豊, 猪 貴義, 岡田育穂 : 家畜育種学, 132-139, 朝倉書店, 東京 (1992)
- [14] Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES : Parametric and nonparametric linkage analysis; A unified multipoint approach, *Am J Hum Genet*, 58, 1347-1363 (1996)
- [15] 片岡勝美 : 理論値と実測値の適合度, *生物統計*, 12-17, 理工図書, 東京 (1998)
- [16] 平野朝雄 : 神経病理を学ぶ人のために, 第 3 版, 440-448, 医学書院, 東京 (1992)

A Determination of the Chromosomal Region of Hereditary Internal Hydrocephalus
in Japanese Black Calves

Toshiyuki SUZUKI*, Yoichi SATO, Yoshisato YOSHIKAWA[†], Tatsuo NOGUCHI,
Yasuo SHIOYA, Naoki TAKENOUCHI, Yoshikazu SUGIMOTO and
Toshio WATANABE

* *Animal Industry Research Institute, Iwate Agricultural Research Center, 737-1 Sunagome,
Takizawa-mura, Iwate-gun, 020-0173, Japan*

SUMMARY

Congenital internal hydrocephalus (CIHY), characterized by cranial doming, paresis and ataxia at birth, has been occurring in Japanese Black calves in Tohoku area since 1988. The sires of the affected calves were of the same pedigrees. Embryo transfer was used to investigate the causative genes by producing several calves from a cow that delivered a calf with CIHY. The cow was superovulated by FSH and inseminated with the frozen semen of the suspected bull. Ultimately, ten calves were birthed from the recipient cows, with five showing symptoms of hydrocephalus. Clinically, four of the affected calves showed paresis, cranial doming and strabismus. One calf showed a chronic convulsion and ataxia at 29 days and died. The pathological finding noted bilateral enlarged ventricles with an increase in cerebrospinal fluid. Gene scanning was performed with microsatellite markers using tissues and blood from five of the affected calves and five full-sib calves and the splenic tissues of eighteen half-sib calves that were embedded in paraffine for pathological study. The suspected gene was found near the centromere of chromosome 3 (BTA3). Using DNA markers, the common region of CIHY was found to be between MB101 and DIK069. The epidemiological findings clarified this CIHY as a single autosomal recessive disease.

— Key words : autosomal recessive disease, DNA analysis, full-sib calves, internal hydrocephalus, Japanese Black calf.

[†] *Correspondence to : Yoshisato YOSHIKAWA (Animal Industry Research Institute, Iwate Agricultural Research Center)
737-1 Sunagome, Takizawa-mura, Iwate-gun, 020-0173, Japan
TEL 019-688-7315 FAX 019-688-4327 E-mail : y-yoshikawa@pref.iwate.jp*

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 60, 196 ~ 200 (2007)