

氏名（本（国）籍）	佐藤 順子（静岡県）
推薦教員氏名	帯広畜産大学 教授 古林 与志安
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博乙第138号
学位授与年月日	平成27年9月24日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	ウサギの小脳皮質アビオトロフィーに関する病理学的研究
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 古林 与志安 副査 帯広畜産大学 教授 古岡 秀文 副査 岩手大学 教授 御領 政信 副査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 岐阜大学 教授 柳井 徳磨

学位論文の内容の要旨

獣医領域では、胎子期の小脳発達は正常であるにも関わらず、生後まもなく発症し、徐々に進行する遺伝性の変性疾患をアビオトロフィーと総称している。小脳皮質アビオトロフィーもしくは類似の小脳皮質変性症はイヌで最も報告が多く、ネコや家畜など様々な動物で報告されているが、ウサギでの発生報告はない。また、罹患動物での経時的な病変を詳細に検討し、その発生機序について言及した報告は少ない。申請者らは、特定のウサギ（Wbl:JW, SPF）を交配すると、生後まもなく重篤な運動失調症状を発症するF1ウサギが生まれることを見出した。それらのF1ウサギは生後10日頃より起立不能がみられ、生後25日頃より運動失調症状および痙攣が激しくなり、哺乳や摂餌が困難となるために生後42日が生存限界であった。本研究は本疾患の病理像を明らかにするとともに、その病理発生機序を解明するために実施した。

第1章では、本疾患の遺伝様式を確認するために交配により検定した結果、本疾患が常染色体劣性遺伝する可能性を示した。さらに、生後15日、30・31日、および42日齢の罹患ウサギおよび対照ウサギの小脳について組織学的ならびに免疫組織学的に病変の特徴および進行について検索した。生後15日では移動中および移動後の顆粒細胞のアポトーシスが分子層および内顆粒層で観察された。分子層では、プルキンエ細胞樹状突起幹の幅の減少がみられた。生後30・31日では内顆粒層における散在性のアポトーシス細胞と顆粒細胞密度の減少、プルキンエ細胞樹状突起の密度の減少および髄質の空胞化や軸索変性がみられた。生後42日では内顆粒層のアポトーシス細胞数は減少していたが、顆粒細胞密度の減少や髄質の軸索変性の程度は生後30・31日とほぼ同様であった。本疾患は臨床症状の重篤さに比べ、病変の程度および進行は比較的緩徐であった。以上の結果から、本疾患を早発性の常染色体劣性遺伝による進行性の小脳皮質変性症、いわゆる小脳皮質アビオトロフィーと診断した。

第2章では、本疾患の発生機序を調べるために生後15日および25日齢の罹患ウサギおよび対照ウサギの小脳について、電子顕微鏡学的検査を行った。発症早期の生後15日より平行線維とプルキンエ細胞スパイン間のシナプス（平行線維シナプス）の減少、後シナプス神経が前シナプス末端内に陥入する異常なシナプス接合形態および平行線維末端の膨化が認められた。生後25日では、平行線維の減少と平行線維シナプスの減少が観察された。加えて、シナプス形成不全による神経細胞への二次的影響、すなわちプルキンエ細胞の中心性色質融解、軸索変性も観察された。以上の結果から、本疾患の病理発生機序は、発症早期より確認された平行線維シナプスの形成不全によるものと判断した。

第3章では、生後15日と42日齢の罹患ウサギと対照ウサギの小脳虫部矢状断面を使用して、画像解析装置を用いた小脳の全体と各層の面積、顆粒細胞数とアポトーシス数、およびシナプス数の形態計測を行い、病変の推移を定量的に解析した。全体と各層の形態計測によって、罹患ウサギでも生後15日までは全体と各層の大きさは正常に发育していること、生後15日から42日の間も組織学的に異常が認められない髄質は対照ウサギ同様に发育していることが確認された。一方、罹患ウサギの生後15日から42日までの分子層と顆粒層の发育は抑制されていた。顆粒細胞の数は生後15日では対照ウサギと差はなかったが、対照ウサギでは15日から42日の間に顆粒細胞数は160%に増加したのに対し、罹患ウサギでは87%に減少していた。内顆粒層におけるアポトーシス細胞は、対照ウサギでは生後15日と42日とも少数であったのに対し、罹患ウサギのアポトーシス数はシナプス形成時期の生後15日で顕著に多く、対照ウサギの62倍であり、シナプス形成終了時期の生後42日では8倍に激減した。罹患ウサギの平行線維シナプス数は、生後15日ですでに対照ウサギの36%であり、生後42日でも29%であった。この形態計測結果が表す罹患ウサギにおける分子層の低い成長率は、光顕および電顕観察でみられたプルキンエ細胞樹状突起枝の減少や平行線維の減少を裏付けるものであり、アポトーシス数の生後15日から42日の推移も、顆粒細胞のアポトーシスの原因が、平行線維シナプスの形成不全に起因していることを裏付けた。このように発達と萎縮が混在する早発性の神経疾患に対する複数時期での形態計測は、組織学的所見に客観性を持たせるのみならず、病理発生機序を明らかにするための手法として有用であることを示した。

以上のように、ウサギでみられた小脳皮質アビオトロフィーの病理像を明らかにするとともに、本疾患が生後間もないシナプス形成時期における平行線維シナプスの形成不全に起因することを明らかにした。また、発達と萎縮が混在する早発性の神経疾患に対する複数時期での形態計測は、病理発生機序を明らかにするための手法として有用であることを示した。

審 査 結 果 の 要 旨

小脳皮質アビオトロフィーは、胎子期の小脳発達に正常であるにも関わらず、生後まもなく発症し、徐々に進行する遺伝性の変性疾患である。様々な動物で報告されているが、ウサギでの発生報告はない。また、罹患動物での経時的な病変を詳細に検討し、その発生機序について言及した報告は少ない。本研究は、特定のウサギ（Wbl:JW, SPF）を交配すると、生後まもなく重篤な運動失調症状を発症するF1ウサギが生まれることを見出したことに端を発し、本疾患での病理像を明らかにし、その病理発生機序を解明するために実施した。

第1章では、交配により検定した結果、本疾患が常染色体劣性遺伝する可能性を示した。さらに、生後15、30・31、42日の異なる日齢の罹患および対照ウサギの小脳について組織学的ならびに免疫組織学的に病変を精査した結果、本疾患が小脳の顆粒細胞のア

ポトーシスに始まり、プルキンエ細胞樹状突起の密度の減少および髄質の軸索変性へと続く進行性の病変であることを明らかにした。また、重篤な臨床症状に相関しない、軽度な組織学的変化と緩徐な進行が本疾患の特徴であることを示した。以上の結果から、本疾患を小脳皮質アビオトロフィーと診断した。

第2章では、本疾患の発生機序を明らかにするために生後15日および25日齢の罹患および対照ウサギの小脳について、電子顕微鏡学的検査を行った。その結果、発症早期の生後15日より平行線維とプルキンエ細胞スパイン間のシナプス（平行線維シナプス）の減少およびシナプス接合形態異常を認めた。従って、本疾患は発症早期より確認された平行線維シナプスの形成不全に起因するものと判断した。

第3章では、本疾患での病変の進行を客観的に評価するために、生後15日および42日齢の罹患および対照ウサギの小脳虫部矢状断面を使用して、画像解析装置を用いた小脳の全体と各層の面積、顆粒細胞数とアポトーシス数、およびシナプス数の形態計測を行った。その結果は、プルキンエ細胞や平行線維の変化を客観的に裏付けた。また、顆粒細胞のアポトーシス数の推移をみることによって、この疾患が平行線維シナプスの形成不全に起因していることを確認した。このように発達と萎縮が混在する早発性の神経疾患に対する複数時期での形態計測は、組織学的所見に客観性を持たせるのみならず、病理発生機序を明らかにするための手法として有用であることを示した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Hereditary cerebellar degenerative disease (cerebellar cortical abiotrophy) in rabbits
著 者 名 : Sato, J., Sasaki, S., Yamada, N. and Tsuchitani, M.
学術雑誌名 : Veterinary Pathology
巻・号・頁・発行年 : 49 (4) : 621-628, 2012
- 2) 題 目 : Early morphological changes of hereditary cerebellar cortical abiotrophy in rabbits
著 者 名 : Sato, J., Sasaki, S., Yamada, N. and Tsuchitani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 75 (4) : 445-450, 2013
- 3) 題 目 : Morphometric analysis of progressive changes in hereditary cerebellar cortical degenerative disease (abiotrophy) in rabbits caused by abnormal synaptogenesis
著 者 名 : Sato, J., Yamada, N., Kobayashi, R., Tsuchitani, M. and Kobayashi, Y.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 28 (2) : 73-78, 2015

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Spontaneous granular cell tumor of tongue in an F344 rat
著 者 名 : Matsumoto, J., Katsuta, O. and Tsuchitani, M.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 5 (2) : 243-247, 1992

- 2) 題 目 : Ovariectomy enhances cadmium-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats
著 者 名 : Katsuta, O., Hiratsuka, H., Matsumoto, J., Tsuchitani, M., Umemura, T. and Marumo, F.
学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology
卷・号・頁・発行年 : 119 (2): 267-274, 1993
- 3) 題 目 : Intranuclear inclusions in the stratified squamous epithelium of the tongue in dogs and cats with parvovirus infection
著 者 名 : Matsui, T., Matsumoto, J., Kanno, T., Awakura, T., Taniyama, H., Furuoka, H. and Ishikawa, H.
学術雑誌名 : Veterinary Pathology
卷・号・頁・発行年 : 30 (3): 303-305, 1993
- 4) 題 目 : Acute toxicity of cadmium in rats with or without cadmium pretreatment
著 者 名 : Hiratsuka, H., Katsuta, O., Iwata, H., Matsumoto, J. and Umemura, T.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 18 (3): 197-201, 1993
- 5) 題 目 : Cadmium-induced osteomalacic and osteopetrotic lesions in ovariectomized rats
著 者 名 : Katsuta, O., Hiratsuka, H., Matsumoto, J., Iwata, H., Toyota, N., Tsuchitani, M., Umemura, T. and Marumo, F.
学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology
卷・号・頁・発行年 : 126 (1): 58-68, 1994
- 6) 題 目 : Dilated cardiomyopathy in a Wistar rat
著 者 名 : Okazaki, Y., Matsumoto, J., Katsuta, O. and Tsuchitani, M.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 8 (2): 155-159, 1995
- 7) 題 目 : Cadmium-induced dental lesions in ovariectomized rats
著 者 名 : Katsuta, O., Hiratsuka, H., Matsumoto, J., Tsuchitani, M. and Umemura, T.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 24 (4): 451-457, 1996
- 8) 題 目 : Spontaneous granular cell tumor of cecum in a laboratory beagle
著 者 名 : Sato, J., Tsurukame, M., Edamoto, H., Kusuoka, O. and Tamura, K.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 16 (4): 275-278, 2003
- 9) 題 目 : Changes in the reproductive organs depending on phases of reproductive cycle and aging in female cynomolgus monkeys
著 者 名 : Watanabe, D., Hoshiya, T., Sato, J., Yamaguchi, Y., Horiguchi, K., Nagashima, Y., Okaniwa, A. and Yoshikawa, H.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology

- 卷・号・頁・発行年： 19(4)： 169-177, 2006
- 10) 題 目： Morphological characteristics of bone in dwarf rats derived from Wistar Hannover GALAS rats
著 者 名： Kokoshima, H., Doi, T., Kurotaki, T., Sato, J., Kotani, Y. and Tsuchitani, M.
学術雑誌名： Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年： 20(3)： 155-160, 2007
- 11) 題 目： Ovarian mucinous cystadenoma with smooth muscle proliferation in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)
著 者 名： Sato, J., Kokoshima, H. and Tsuchitani, M.
学術雑誌名： Veterinary Pathology
卷・号・頁・発行年： 45(3)： 379-382, 2008
- 12) 題 目： New findings concerning eosinophilic substance deposition in mouse nasal septum: sex difference and no increase in seniles
著 者 名： Doi, T., Kokoshima, H., Kanno, T., Sato, J., Wako, Y., Tsuchitani, M. and Matsui, T.
学術雑誌名： Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年： 38(4)： 631-636, 2010
- 13) 題 目： Mixed thymoma in a young cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)
著 者 名： Kotani, Y., Sato, J., Wako, Y. and Tsuchitani, M.
学術雑誌名： Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年： 23(3)： 141-145, 2010
- 14) 題 目： Histopathology of incidental findings in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) used in toxicity studies
著 者 名： Sato, J., Doi, T., Kanno, T., Wako, Y., Tsuchitani, M. and Narama, I.
学術雑誌名： Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年： 25(1)： 63-101, 2012
- 15) 題 目： Histopathology of incidental findings in beagles used in toxicity studies
著 者 名： Sato, J., Doi, T., Wako, Y., Hamamura, M., Kanno, T., Tsuchitani, M. and Narama, I.
学術雑誌名： Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年： 25(1)： 103-134, 2012
- 16) 題 目： Dark cell change of the cerebellar Purkinje cells induced by terbutaline under transient disruption of the blood-brain barrier in adult rats: morphological evaluation
著 者 名： Yamada, N., Sasaki, S., Ishii, H., Sato, J., Kanno, T., Wako, Y. and Tsuchitani, M.
学術雑誌名： Journal of Applied Toxicology
卷・号・頁・発行年： 32(10)： 790-795, 2012
- 17) 題 目： Age-related histological findings in the pineal gland of

Cr1:CD(SD) rats

著者名: Tomonari, Y., Sato, J., Wako, Y. and Tsuchitani, M.

学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年: 25(4): 287-291, 2012

- 18) 題目: Corneal mineralization in Wistar Hannover rats

著者名: Hashimoto, S., Doi, T., Wako, Y., Sato, J., Wada, S. and Tsuchitani, M.

学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年: 26(3): 275-281, 2013

- 19) 題目: Bacterial pleuritis with thickened mesothelial hyperplasia in a young beagle dog

著者名: Yamada, N., Hashimoto, S., Tomonari, Y., Kokoshima, H., Doi, T., Sato, J., Wako, Y. and Tsuchitani, M.

学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年: 26(3): 313-317, 2013

- 20) 題目: Morphological study of progressive glomerulonephropathy in common marmosets (*Callithrix jacchus*)

著者名: Yamada, N., Sato, J., Kanno, T., Wako, Y. and Tsuchitani, M.

学術雑誌名: Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年: 41(8): 1106-1115, 2013

- 21) 題目: Histological characteristics of the regression of corpora lutea in Wistar Hannover rats: the comparisons with Sprague-Dawley rats

著者名: Sato, J., Hashimoto, S., Doi, T., Yamada, N. and Tsuchitani, M.

学術雑誌名: Journal of Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年: 27(2): 107-113, 2014

- 22) 題目: Follicular thyroid carcinoma characterized by abundant stromal components with chondroid and osseous metaplasia in a dog

著者名: Kobayashi, R., Yamada, N., Kitamori, T., Kitamori, F., Sato, K., Doi, T., Wako, Y., Sato, J. and Tsuchitani, M.

学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年: 76(8): 1161-1164, 2014