

ボルナ病ウイルス感染動物を用いた ヒト内因性精神疾患モデル動物の作出

*Borna disease virus infected rats as an animal model of human
neurological and psychiatric diseases (a pilot study).*

斑目広郎¹, 西野佳以^{1,2}, 井上真紀¹

¹麻布大学大学院獣医学研究科, ²生物科学総合研究所

Hiroo Madarame¹, Yoshii Nishino², Maki Inoue²

¹Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

²Research Institute of Biosciences, Azabu University

Abstract. A pilot study for investigating human neurological and psychiatric diseases based on neonatal rat infection with Borna disease virus (BDV) was described.

The histopathological changes of the central nervous system and clinical disease of rats infected with two related BDV variants, CRP3 (rat-adapted variant) or CRNP5 (mouse-adapted variant) in Fischer 344 rats were investigated for 20 days. Infected rat pups were scored for incidence and severity of BD (the severity of disease in rats ranked on a scale of 0 to 3+) and examined histopathologically. In addition, we selected the protocol design and testing procedures for assessing behavior of BDV infected rat neonates.

Compared to newborn rats inoculated with CRP3, newborn rats inoculated with CRNP5 had more severe histopathological changes in the central nervous system, mainly in the hippocampus. There was no evidence of encephalitis in either CRP3 or CRNP5 infection. In CRNP5 infection, there were severe degeneration of the pyramidal neurons of the hippocampus and extensive hippocampal gliosis. On the contrary, CRP3-inoculated newborn rats had little histopathological changes in the hippocampus by day 20 p. i..

As for the severity of BD, all neonatal rats inoculated with CRNP5 were scored 1+ by day 12 p. i.. On the day 16 p. i., six out of eight rats were scored 2+. By day 20 p. i., all rats were ranked 2+ or 3+, and one infected rat died. On the other hand, CRP3-inoculated newborn rats showed no apparent neurological signs by day 20 p. i..

In addition, we chose a) body lighting, b) negative geotropism, c) grasping response, d) fore limb and hind limb placing and e) bar holding test for the behavioral tests by postnatal days (PND) 20. From rats at PND25-28 onwards, beam walking (bar crossing) tests and open field tests were selected for assessment of the abnormal behavior.

1. 目的

ヒトの内因性精神疾患で原因遺伝子が突き止められているのは十数疾患のみであり、その病変は非特異的である。内因性精神疾患（てんかん、統合失調

症）の原因として、情動の中枢を担う大脳辺縁系の機能異常が重要視されているが、病変と症状との関連は解明されていない。ボルナ病発症動物においては、運動機能障害、日常行動や動作の異常、過敏症や易衝動性の増加といった神経疾患と行動異常が現

れ、ヒトの内因性精神疾患に類似する症状が出現する。本研究では、ボルナ病ウイルス感染ラットにおける脳病変、大脳辺縁系の変化、特に海馬病変に着目し、中枢神経系における病変と神経症状・行動異常との関連を明らかにし、ヒトの内因性精神疾患を解析する上で、有用なモデル動物を作出することを目標とする。本研究ではボルナ病ウイルスが強い指向性を示す大脳辺縁系、海馬領域の神経細胞層において異なる病変を形成するウイルス株（CRNP5株（マウス順化株）とCRP3株（ラット順化株））を使用して比較・解析を実施し、感染動物における海馬組織病変を詳細に検討し、BDV感染ラットの神経症状の目視による観察とスコア化、神経症状、運動機能障害と行動異常を数値化するための試験方法と実験条件の選定を目標とした。

2. 方法

1. 中枢神経系病変の解析

Fischer ラット (F344) 新生仔に 2×10^3 Focus Forming Unit (FFU) のCRP3株とCRNP5株を脳内接種した。陰性コントロールとしては同量のラットまたはマウス脳乳剤を接種した。感染後経時的に海馬領域の病変を中心に中枢神経系病変を解析した。新生仔F344ラットはウイルス脳内接種後4日目から20日目まで材料を4日毎に採取した。

2. ウイルス感染仔ラットの神経症状の目視による観察とスコア化

感染仔ラットの目視による観察で、ボルナ病の特徴の一つである運動機能障害を含む神経症状を以下の3レベルに分け、経時的に接種後4日目から20日目まで4日毎に評価した(1)。

0：正常

1+：軽度神経症状（異常行動）

2+：明確な神経症状（運動障害、軽度麻痺、震顫など）

3+：重度神経症状（震顫の継続、全麻痺、致死）

3. 感染ラットにおける神経症状、運動機能障害と行動異常を数値化するための試験方法と実験条件の検討

神経症状、運動機能障害と行動異常を数値化するた

めの試験法として1) 20日令までの幼ラットに使用する試験方法と2) 25-28日令の幼ラットと長期感染試験の成ラットに使用する試験方法を選定した。

3. 結果と考察

1. 感染仔ラットの海馬領域の病変を中心に中枢神経系病変

CRNP5接種仔ラットではCRP3株接種仔ラットと比較してより重度の組織病変が脳全体に認められたが、特に海馬領域に認められた。海馬錐体細胞の変性と海馬の広範なグリオーシスが顕著であった。両株接種群とも脳炎は観察されなかった。接種後20日目までにはCRP3株接種では脳の組織病変は殆ど認められなかった。

2. 感染仔ラットの神経症状観察とスコア化

CRNP5株接種ラットは重度の神経症状を示したのに対して、CRP3株接種ラットには症状はなかった。CRNP5株接種については接種12日目に全例がレベル1と判断された。16日目には8個体中6個体がレベル2と判定され、残り2個体もレベル1と判定された。接種20日目では全例がレベル2以上と判定され1個体が死亡した。それに対してCRP3株接種群には全実験期間（20日間）を通じて目視による症状は出現しなかった(2)。尚、CRNP5株接種による症状の進行はこれまで報告のあるルイスラットと比較すると緩徐であった。

3. 感染ラットにおける神経症状、運動機能障害と行動異常を数値化するための試験と実験条件の選定

1) 20日令までの幼ラットについては、離乳前行動発達試験として、a) 正向反射テスト、b) 背地走性テスト、c) grasping response、d) fore limb and hind limb placing、e) bar holding testの5個の試験方法を選定した(3)。

2) 25-28日令の幼ラットと長期感染試験の成ラットについてはビームウォーキング試験とオープンフィールド試験を選定した。ビームウォーキング試験では幅2.5cm、長さ30cmの板で連結された高架プラットホーム間を歩行させた。3日間の歩行訓練を実施後、測定項目として1) 板を渡れたラット数、2) 歩行所要時間、3) 歩行中のスリップ（踏みはずし）

回数を数値化することとした。オープンフィールド試験では、1) 歩行：区分線を横切った回数と移動方向（内方と外方）、2) 立ち上がり：後肢だけで立った回数と時間、3) グルーミング：回数と時間、4) 脱糞：糞の個数を測定することとし、明期に2方向から15分間観察することとした。

上記で選定した試験法と実験条件でBDV感染ラットについての運動機能障害の解析と行動異常の解析を実施する。

4. 要約

1. F344ラットの新生仔脳内感染でも、BDV CRNP5株（マウス順化株）とCRP3株（ラット順化株）の間で神経症状と中枢神経系病変に差異が認められた。CRNP5株接種ラットは重度の神経症状を示し、

CRP3株接種仔ラットと比較してより重度の組織病変が脳全体に認められたが、特に海馬領域に病変を認めた。一方、CRP3株接種群には全実験期間（20日間）を通じて目視による症状は出現せず、脳の組織病変も殆ど認められなかった。

2. BDV感染ラットにおける神経症状、運動機能障害と行動異常を数値化するための試験と実験条件を選定した。

文献

- 1) Nishino Y, Kobasa D, Rubin SA, Pletnikov MV and Carbone KM. *J. Virol.* 76: 8650-8658, 2002.
- 2) Pletnikov MV, Rubin SA, Vogel MW, Moran TH and Carbone KM. *Brain Res.* 944: 97-107, 2002.
- 3) Pletnikov MV, Rubin SA, Carbone KM, Moran TH and Schwarz GJ. *Dev. Brain Res.* 126: 1-12, 2001.