

ヌードラットにおけるボルナ病ウイルス感染

Borna disease virus infection in nude rats

斑目広郎¹, 西野佳以², 井上真紀³

¹麻布大学附属動物病院小動物臨床研究室,

²麻布大学大学院獣医学研究科獣医免疫学研究室,

³麻布大学大学院獣医学研究科生理学第二研究室

Hiroo Madarame¹, Yoshii Nishino², Maki Inoue³

¹ Veterinary Teaching Hospital, Azabu University

^{2,3} Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

Abstract: Fifty-three immunodeficient nude rats (four weeks old) were used in this experiment. The rats were inoculated with either CRNP5 strain or CRP3 strain of Borna disease virus (BDV) intracranially and were observed for seven weeks (experiment 1) or eight weeks (experiment 2). In experiment 1, if the inoculated rats showed clinical symptoms and developed severe Borna disease (BD) (score 3), the rats were killed and histological studies and virus titration of the brain samples were performed. If the rats did not show severe clinical symptoms, the rats were killed and histological studies and virus titration of the brain samples were performed at the end of the experiment. In experiment 2, the inoculated rats were killed chronologically in the second, fourth or eighth week after inoculation or when the inoculated rats showed clinical symptoms and developed severe BD (score 3).

All CRNP5 inoculated rats developed neurological signs, suspected of indicating BD between 24 and 36 days after virus inoculation. Conversely, CRP3 inoculated rats did not develop any neurological signs during the course of either experiment.

Histopathologically and immunohistochemically there were three common findings in both strains of BDV inoculated rats: 1) degeneration, necrosis and apoptosis of nerve cells and focal calcifications without inflammation, 2) gliosis, 3) BDV antigen positive reactions in the nerve cells and astrocytes. In CRP3 inoculated rats, atrophy of the dentate gyrus associated with degeneration, necrosis and apoptosis of the neurons of the granular layers of the dentate gyrus was the significant finding. In CRNP5 inoculated rats, there were three major changes: 1) hydrocephalus ex vacuo, 2) disarrangements of the nerve cells in the hippocampal CA3 region and degeneration, necrosis and apoptosis of the nerve cells of the granular layers of the dentate gyrus. In the brain samples of all inoculated nude rats, the virus was recovered and the titer of the virus was higher than other parts of the brain.

In the previous athymic rats infections of BDV, the virus-specific nucleic acid and infectious virus were found in the inoculated rats, but there were no signs of BD and histopathological lesions.

1. 目 的

ボルナ病ウイルス (BDV) 感染した動物は髄膜脳

脊髄炎を起こし、運動障害や行動学的異常などを呈し、時に致死的な神経疾患 (ボルナ病 (BD)) に至る疾患として18世紀後半から中欧の馬や羊に散発的

に発生が報告されてきた。現在ではBDVが多くの脊椎動物に中枢神経系障害を引き起こすことが分かってきており、BDVは広範囲の動物種に感染可能であるが、その中でもラットはBDV感染についての研究において優れたモデル動物とされている。

ボルナ病の発症要因には、宿主要因（宿主動物の種類・系統・年齢および免疫応答性）とウイルス要因（ウイルス株）がある。本研究では、BDV感染ラットの発症における宿主免疫応答性の関与を検証するために、T細胞機能欠如ラット（ヌードラット）におけるボルナ病ウイルス実験感染について検討した。

今回、BDVの2株（CRP3株とCRNP5株）のヌードラット脳内に接種後、実験1では、感染ラットが重篤な臨床症状を示した時点あるいは生存したラットについては観察期間終了時で安楽殺して脳を採取し、実験2では、感染2、4、8週間後あるいは重篤な発症を示した時点で前述と同様の方法で脳を採取した。

2. 材料と方法

接種ウイルス

実験に用いたBDV株は、BDV He80株持続感染MDCK細胞超音波破碎産物の遠心上清を新生仔リスラットの脳内に3代接種・継代することにより作製したラット順化株（CRP3株）と、ラット脳で2代継代した株であるCRP2をSJLマウスの脳内で5代継代することにより作製したマウス順化株（CRNP5株）である（3）。

ヌードラットへのウイルス接種およびラットの採材と観察

4週齢のヌードラット（日本クレア）を購入し感染実験に使用した。新生仔ラットには生後24時間以内に、BDV CRP3株あるいはCRNP5株、 2×10^3 FFUを左側大脳皮質内に接種（20 μ l/匹）した。

実験1では、感染ラットが重篤な臨床症状を示した時点あるいは生存したラットについては観察期間終了時で安楽殺して脳を採取し、実験2では、感染2、4、8週間後あるいは重篤な発症を示した時点で前述と同様の方法で脳を採取した。

尚、本実験は麻布大学動物実験指針に従って遂行

された。

病理組織学的検査

脳をパラフォルムアルデヒド固定し、6横断面を切り出し組織学的に検索した。

免疫組織化学染色

抗p40マウスモノクローナル抗体（HN123）

抗p24マウスモノクローナル抗体（HP062）

（大阪大学微生物病研究所、生田和良博士より恵与）

（1）

神経症状判定基準

SOD score（severity of disease score）

0：無症状

1：初期症状（例：毛づくろい行動欠如または活動増加）

2：神経疾患兆候（例：過活動、運動失調または不全麻痺）

3：重篤神経疾患（例：全麻痺、高度脱水、重度体重減少（最高体重の時の2/3以下）および瀕死状態）

ウイルス力価測定

右大脳皮質の一部を採材後、乳剤とし、C6ラットグリオーマ培養細胞株を用いたフォーカス形成試験によりfluorescent focus-forming unit（FFU）を算出した。脳は大脳皮質、脳幹部及び小脳に分割してウイルス力価を測定した。

3. 結果と考察

症状（表1、表2）

CRNP5ウイルスを脳内接種されたヌードラット群においては、実験1では感染後33～36日目までに死亡または重篤な症状（スコア3）を示し、実験2では感染後24～31日目までに死亡または重篤な症状（スコア3）を示した。一方、感染後7週間または8週間にわたって経過を観察したCRP3ウイルス接種群と偽接種群（マウス脳乳剤接種）については発症する個体はなかった。

病変

CRNP5とCRP3株に共通する脳病変として1、炎症を伴わない神経細胞変性、壊死、アポトーシスと

表1 BDV 感染ヌードラットの経過の概要 (実験.1)

接種BDV株	神経症状	脳炎	脳症
CRNP5	7 / 7 ^a	0 / 7	7 / 7
CRP3	0 / 7 ^b	0 / 7	7 / 7
NL ^c	0 / 7 ^b	0 / 7	0 / 7

表2 BDV 感染ヌードラットの経過の概要 (実験.2)

接種BDV株	神経症状	脳炎	脳症
CRNP5	16 / 16 ^a	0 / 16	16 / 16
CRP3	0 / 8 ^b	0 / 8	8 / 8
NL ^c	0 / 8 ^b	0 / 8	0 / 8

a 感染33～36日齢で死亡または致死性病態(スコア3)となった
b 感染7週間まで経過観察
c 偽接種のために正常マウス脳乳剤を脳内接種

a 感染24～31日齢で死亡または致死性病態となった
b 感染8週間まで経過観察
c 偽接種のために正常マウス脳乳剤を脳内接種

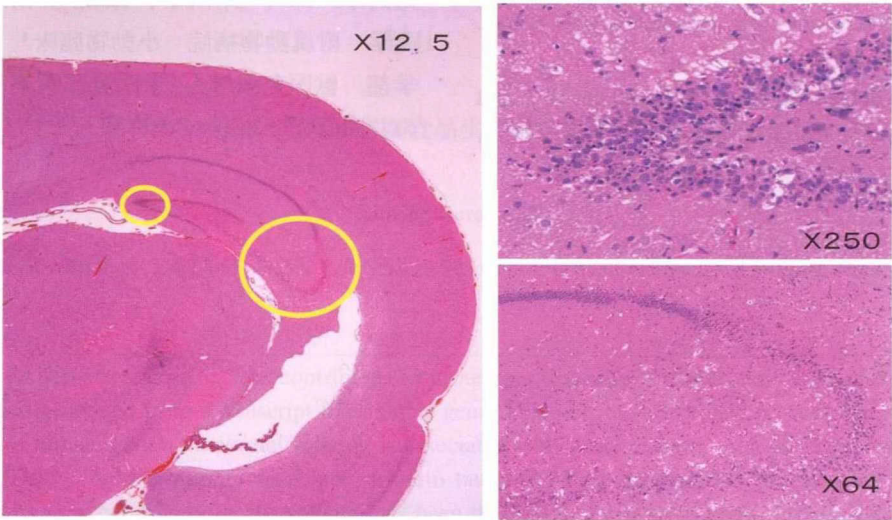


図1 CRNP5 株感染ラットでは大脳皮質菲薄化を伴う脳室拡張 (hydrocephalus ex vacuo)。海馬 CA3 領域の錐体細胞の変性・脱落による配列の乱れ、海馬歯状回顆粒層に海馬顆粒細胞層の変性、壊死とアポトーシス。

石灰化巣，2．星状膠細胞の活性化と増加，3．神経細胞と星状膠細胞におけるウイルス抗原の分布が観察された。CRP3 株接種個体では海馬歯状回の萎縮と海馬顆粒細胞層の変性，壊死とアポトーシスが主要な病変として認められた。CRNP5 株接種個体では1．脳室拡張（海馬萎縮と大脳外套幅の減少）(図1)，2．海馬 CA3 領域の錐体細胞の変性・脱落による配列の乱れ，海馬歯状回顆粒層に海馬顆粒細胞層の変性，壊死とアポトーシスが観察された（図1）。尚，これまでの報告ではヌードラットに対する BDV 感染では病変は指摘されていない（2）。

ウイルス分離

CRNP5 と CRP3 株感染ラットからウイルスが回収され，大脳皮質，脳幹部及び小脳に分割してウイルス力価を測定したところ，BDV-CRP3 株感染群に比べ BDV-CRNP5 株感染群では脳幹部のウイルス力価が高かった。

4. 要 約

- 1. 実験1および2においてCRP3株感染ラットは発症せず，CRNP5株は全例発症し，観察期間中に全例が死亡または重篤な症状（スコア3）となった。
- 2. CRP3株およびCRNP5株感染ラットの脳では全例で，海馬病変を主体とする非炎症性の脳病変（脳症）が認められた。
- 3. CRNP5株感染ラットでは大脳皮質菲薄化を伴う脳室拡張（hydrocephalus ex vacuo）が認められた。
- 4. CRP3株とCRNP5株感染ラットの脳では神経細胞を主体とするBDV陽性所見が存在していた。
- 5. 偽接種群のヌードラットは実験1及び2において臨床症状が認められず組織学的に正常であった。
- 6. 脳を大脳皮質，脳幹部及び小脳に分割してウイルス力価を測定したところ，BDV-CRP3株感染群に比べBDV-CRNP5株感染群では脳幹部のウイルス力価が高かった。

7. ポルナ病ウイルス感染ではT細胞性免疫応答を介さない発症機序があり，発症程度及び病変はウイルス株により異なることが示唆された。

文 献

- 1) Bahmani, M. K., Nowrouzian, I., Nakaya, T., Nakamura, Y., Hagiwara, K., Takahashi, H., Rad, M. A. and Ikuta, K. Varied prevalence of Borna disease virus infection in Arabic thoroughbred and their cross-bred horses in Iran. *Virus Res.* 1996, 45: 1-13.
- 2) Herzog, S., Wonigeit, K., Frese, K., Hedrich, H. J. and Rott, R. Effect of Borna disease virus infection on

athymic rats. *J. Gen. Virol.* 1985, 66: 503-508.

- 3) Nishino, Y., Kobasa, D., Rubin, S. A., Pletnikov, M. V. and Carbone, K. M. Enhanced neurovirulence of Borna disease virus variants associated with nucleotide changes in the glycoprotein and L polymerase genes. *J. Virol.* 2002, 76: 8650-8658.

本研究は酒井大史¹，小島さや²，藤野寛²，福原裕司¹，
亀岡章一郎¹，鍋木誠²，Kathryn M. Carbone³（麻布
大学 附属動物病院 小動物臨床¹，麻布大学 獣医
学部 獣医免疫学²，米国食品医薬品局 CBER³）と
の共同研究である