

# ボルナ病ウイルス感染ラットにおける母子伝播

*Borna disease virus transmission: From the virus-inoculated rat pups to the nursing mother*

斑目広郎, 西野佳以, 井上真紀

麻布大学大学院獣医学研究科

Hiroo Madarame, Yoshii Nishino, Maki Inoue

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

**Abstract.** Thirteen mother rats nursing BDV- inoculated pups were used. Within 24 hours after birth, the pups were inoculated with CRNP5 or CRP3 intracranially. Mother rats nursed their pups until the pups developed severe BD or weaned at postnatal day 28. Subsequently the mother rats were observed for about 8 weeks after giving a birth or showing clinical symptoms and developing severe BD. After observation, the mother rats were killed and histological studies and virus titration of the brain samples and antibody titration of the sera were performed. The expression of the antigens of BDV was also examined immunohistochemically.

One mother rat developed neurological signs, suspected of indicating BD. This rat nursed pups infected with CRNP5 which died with neurological signs. Subsequently the mother rat developed neurological signs after the pups had died. The general condition of the mother deteriorated and the rat was killed and autopsied. Histopathologically, the rat had nonsuppurative meningoencephalitis. The lesions were distributed throughout the brain, but were more severe in the frontal part of the cerebral hemisphere, the rhinencephalon, and the hippocampus. In the hippocampus there were perivascular cuffings and neuronal degenerations with diffuse gliosis, especially in the hippocampal CA3 region. The regular cell layer arrangements had been lost in places. The neurons of the granular layers of the dentate gyrus had also degenerated and the neuronal cell arrangements were loosened. The positive reaction against BDV protein antibodies was distributed throughout the central nervous system, but was more intense in the rhinencephalon and the hippocampus. Cytologically, the positive reaction was observed mainly in the nucleus of the neurons. In the brain sample, the virus titer was  $1.2 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/g. On the other hand, twelve mother rats without clinical symptoms had no histopathological changes and no positive reactions against BDV antibodies immunohistochemically in the brain, and BDV was not recovered from the brain. However, the anti-BDV antibody assay revealed 3 rats out of twelve had positive titers for BDV.

## 1. 目的

ボルナ病 (BD) は 18 世紀後半に中欧の馬や羊に散発的に発生する疾患として発見され, それ以降の研究によってボルナ病ウイルス (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た。BDV は非化膿性髄膜脳炎を引き起こし, 時

に致死的な症状を現すこともある。BDV は広範囲の動物種に実験的に感染可能であるが, その中でも Lewis (Lewis) および F344 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である。

今回, BDV の 2 株 (CRP3 株と CRNP5 株) の新生仔ラット脳内に接種後, 13 匹 (No.1 ~ 13) の保育母ラットについて 8 週間経過観察を行ったところ,

CRNP5 株を接種された仔ラットを保育した母リスラットの 1 匹に、ボルナ病が疑われる臨床症状が認められたため、病理組織学的、ウイルス学的検索を行った。残りの BDV 感染仔ラットを保育した 12 匹の母ラットについても検索（抗 BDV 抗体測定、脳材料からのウイルス分離、病理組織学的検査）を行なった。加えて 7 匹の母ラットについては観察期間を延長し 12 週間経過を観察し、BDV 感染新生仔ラットから保育母ラットへの二次感染の可能性について検討した。

## 2. 方法

### 接種ウイルス

実験に用いたボルナ病ウイルス（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（参考文献 3 参照）。

### 新生仔ラットへのウイルス接種および保育母ラットの観察

妊娠リスラット（日本チャールズリバー）および F344 ラット（日本クレア）を購入し実験に使用した。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、 $2 \times 10^3$  FFU を左側大脳皮質内に接種（ $20 \mu\text{l}/\text{匹}$ ）した。新生仔ラット脳内に BDV 接種後、13 匹（No.1～13）の保育母ラットについて 8 週間経過観察を行った。さらにリスラット 7 匹については 12 週間経過を観察した。

尚、本実験は麻布大学動物実験指針に従って遂行された。

### 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。

### 抗 BDV 抗体測定

母ラット血清について抗 BDV 抗体を測定した。IFA 抗体価の検出限界は 40 倍とし、WB における血清希釈は 50 倍とした。

### 病理組織学的検査

脳をパラホ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）  
（参考文献 2 参照）

## 3. 結果と考察

### 症状

CRNP5 ウイルスを脳内接種された仔ラットが死亡した 1 ヶ月後に、感染仔ラットを保育していた母ラット 1 匹が発症した。第 1 病日には SOD スコア 1、第 2 病日には SOD スコア 2 と判定され、第 3 病日には SOD スコア 3 と判定された。尚、感染仔ラットは、2 匹が後弓反張、全麻痺を示し、1 匹が全身痙攣と不全麻痺を示し、ウイルス接種 19 日目に死亡している。他の 12 匹は実験終了時（8 週間）まで発症しなかった。12 週間にわたって経過を観察したラット 7 匹についても発症する個体はなかった。

### 病変

発症母ラットの脳病変は灰白質でより重度な非化膿性髄膜脳炎であった（Fig. 1）。病変は嗅索を含む前頭葉、海馬（特に CA3 領域）でより顕著であり、脳幹部（橋、延髄）においても囲管性細胞浸潤が認められた。免疫組織化学染色により中枢神経系全体にわたって神経細胞の核を主体として、細胞体、細胞突起、神経網中に BDV 陽性所見が認められた。BDV 陽性細胞の分布は嗅索を含む前頭葉、海馬（特に CA3 領域）に強く（Fig. 2）、間脳、脳幹部、小脳、三叉神経節からも陽性所見が得られた。尚、未発症母ラット脳についての抗 BDV 抗体免疫染色は全て陰

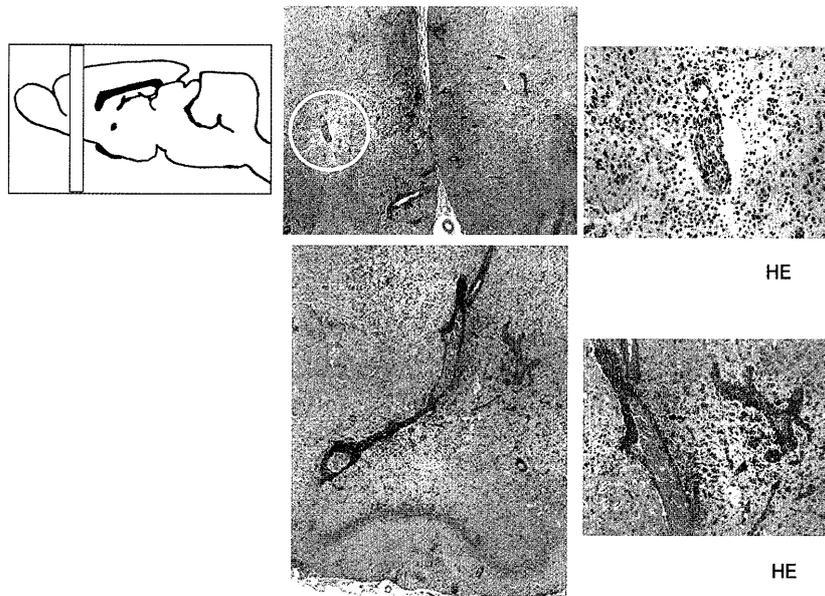


Figure 1. Brain sections of the level of the olfactory bundle. Nonsuppurative meningoencephalitis. The inflammatory lesions were more severe in the frontal part of the cerebral hemisphere, the rhinencephalon, and the hippocampus. The nursing mother rat (No. 1.). H.E.

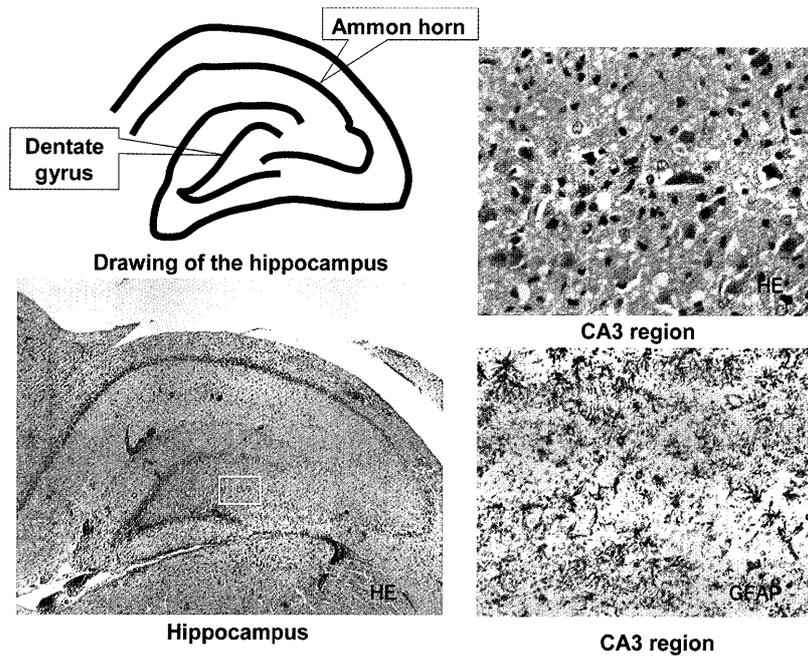


Figure 2. The hippocampus. The nursing mother rat (No. 1.). The BDV-CRNP5 induced severe lesions. Schematic drawing (Upper left), Low power view of the hippocampus (Lower left), and high power view of the CA3 region (Right).

性であった。

#### ウイルス分離

発症母ラット脳材料からは  $1.2 \times 10^7$  FFU/g のウイルスが分離された。他の 12 匹の未発症母ラット (8

週間経過観察) からはウイルスは分離されなかった (検出限界は 500 FFU/g)。

#### 抗BDV抗体

未発症母ラット 12 匹 (8 週間経過観察) 中, 3 匹

Table 1. Virus titration of the brain samples and anti BDV antibody titration of the sera of nursing mother rats

Rat strain/inoculated virus	IFA <sup>1</sup>		WBA	Virus titer (FFU/g) <sup>2</sup>
	C6BV	MDCK/He80	OL/BDV	
No.1 (LMom/CRNP5)	NT <sup>3</sup>	NT	NT	1.2×10 <sup>7</sup>
No. 2 (LMom/CRNP5)	320	ND	ND	ND <sup>4</sup>
No. 3 (LMom/CRNP5)	ND	ND	ND	ND
No. 4 (LMom/CRP3)	40	ND	ND	ND
No. 5 (LMom/CRP3)	320	ND	+	ND
No. 6 (LMom/CRP3)	ND	ND	ND	ND
No. 7 (LMom/CRP3)	320	160	+	ND
No. 8 (FMom/CRNP5)	80	ND	ND	ND
No. 9 (FMom/CRNP5)	320	40	ND	ND
No. 10 (FMom/CRNP5)	ND	ND	ND	ND
No. 11 (FMom/CRNP5)	ND	ND	ND	ND
No. 12 (FMom/CRNP5)	640	320	+	ND
No. 13 (FMom/CRNP5)	ND	ND	ND	ND

<sup>1</sup>Measurable limits of IFA titers were 1:40. Test sera for WBA were diluted 1:50.

<sup>2</sup> Measurable limits of virus titers are 500 FFU/g.

<sup>3</sup>NT: not tested.

<sup>4</sup>ND: not detected.

は抗BDV抗体が陽性と判定された (Table 1)。

BDV感染仔ラットの保育によって母ラット1匹にBDV感染が成立し、脳炎を伴った重篤な神経症状が出現したが、8週間経過観察を行った12匹と12週間経過観察を行った7匹は発症せず、母子伝播による感染頻度が低いことが示された。しかし、未発症母ラット12匹 (8週間経過観察) 中、3匹が抗BDV抗体が陽性と判定され、感染があったことが示唆された。病変は従来のラット継代BDVを直接脳内接種された成ラットにおける報告に類似していたが、海馬CA3領域で病変が顕著で脳幹部にも炎症が認められ、多くの抗ウイルス抗体陽性神経細胞が出現した。感染経路としてウイルスが経鼻感染もしくは三叉神経を介して侵入し広がった可能性が示唆された。

#### 4. 要約

1. ボルナ病ウイルス (BDV) のCRNP5株を脳内接種された仔ルイスラットを保育していた母ルイスラット1例が新生仔ラットへの脳内ウイルス接種から8週間後にボルナ病と考えられる重篤な神経症状が発症した。

2. 感染ラットの脳病変は非化膿性髄膜脳炎であった。中枢神経系では神経細胞を主体とするBDV陽性所見が認められた。

3. BDV陽性細胞の分布の程度は嗅索を含む前頭葉、海馬 (特にCA3領域) に強く、間脳、脳幹部、小脳、三叉神経節からも陽性所見が得られた。

4. 大脳皮質からは1.2×10<sup>7</sup>FFU/gのウイルスが検出された。

5. 他のBDV感染仔ラットを保育した12匹の母ラット (ルイスラットおよびF344ラット) (8週間経過観察) については、神経症状ならびに脳病変は認められず、抗BDV抗体を用いた脳の免疫染色は全て陰性で、脳材料からもウイルスは回収されなかったが、抗BDV抗体測定結果では、3匹が陽性と判定された。

6. 12週間経過を観察した母ルイスラット7匹は発症しなかった。

本研究は、Kathryn. M. Carbone (CBER, FDA, USA), 朝長啓造, 林洋平 (大阪大学), 春田みち子, 酒井大史 (麻布大学) との共同研究である。

## 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) Morales, J. A., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. and Rott, R. Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med. Microbiol. Immunol (Berl)*. 1988, 177: 51-68.
- 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, 96: 8650-8658.
- 4) Sauder, C. and Staeheli, P. Rat model of Borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J. Virol.* 2003, 23: 12886-12890.