

ウイルス性神経障害における発症関連因子の研究

*Study of factors associated with development of neurological disease
on virus-induced central nervous system damage*

西野佳以¹, 斑目広郎³, 舟場正幸²

麻布大学獣医学部獣医学科¹ 獣医免疫学研究室, ²栄養学研究室, ³附属動物病院教員研究室

Yoshii Nishino¹, Hiroo Madarame³, Masayuki Funaba²

Laboratories of ¹ Veterinary Immunology, ² Nutrition, ³ Veterinary Teaching Hospital, Azabu University School of Veterinary Medicine

Abstract. Borna disease virus (BDV) causes classical Borna disease (BD), a fatal mononuclear inflammatory encephalomyelitis with severe signs of neurological disease in horses and sheep. Classical BD in adult rats is in large part due to immunopathogenic damage to the nervous system by blood-borne inflammatory cells. However, newborn rats inoculated with mouse-adapted BDV variant (CRNP5) develop severe neurological disease without encephalitis. Thus, it is suggested that rats infected with CRNP5 develop BD without immune response, and CRNP5 is directly and/or indirectly due to damage to the central nervous system. In order to gain a better understanding of immune responses contributions to BD outcomes, we studied the neuropathogenesis of BDV in athymic nude rats (rnu/rnu), naturally deficient in the T-lymphocyte system. Four-week old female nude rats were either inoculated intracranially with 2×10^3 FFU of rat-adapted prototype variant (CRP3) (n = 7) or CRNP5 (n = 7) or an equal volume of uninfected mouse brain material (n = 7). All CRNP5-infected nude rats developed fatal neurological disease although all CRP3-infected rats survived to 7 week post inoculation without obvious neurological signs of disease. No evidence of inflammatory cell infiltration was observed in rats infected with CRP3 or CRNP5, but an intensive gliosis was present. The brains of CRNP5-infected rats showed severe neuronal degeneration in pyramidal neurons in hippocampus. These results suggest that the cellular immune response to virus infection contributes to BD outcome in CRP3-infected rats but CRNP5-infected rats.

1. 目的

ボルナ病ウイルス (*borna disease virus*; BDV) は、馬や羊に髄膜炎あるいは脳脊髄炎をおこし、神経疾患や時に致死的な経過を引き起こすボルナ病の原因ウイルスである (1)。近年の疫学調査により、広範囲の温血動物 (鳥類を含む) がBDVに対する特異抗体を持っており、さらに、以前は中央ヨーロッパの地方病と考えられていたが、日本を含めた世界各地で自然感染例が報告されている (2)。しかしながら、

ヨーロッパ以外の地域では、まだ流行は起きていない。

ボルナ病の発症形態は運動機能障害を主徴とする神経疾患と行動学的異常とに大別される (1)。BDVは宿主の中枢神経系に持続的に感染し、髄膜炎あるいは脳脊髄炎を引き起こす。発症の機序は免疫応答依存性と考えられており、宿主側の要因 (動物種、系統、年齢、免疫応答の成熟度など) が重要な発症要因と考えられている (3-6)。一方、ウイルス遺伝子は各分離株間で高度に保存されており、遺伝子配列が異なるウイルス株であっても、病原性の違いは

ほとんど認められない (7-10)。従って、ウイルスのどの蛋白質が病原性に関与するのかは明らかではない。近年、マウス脳で継代したBDV (11) (BDV-M-P₅をCRNP5株に改変)はラット脳継代ウイルス (CRP3株)と比べて、ラットにおける病原性が著しく高くなることが報告された (12)。すなわち、CRNP5株は、成ラットのみならず免疫応答が未熟な新生仔ラットにおいても重篤なボルナ病を発症させる。遺伝子解析の結果、上記2株の間には4箇所の核酸の相違のみが認められ、いずれもアミノ酸変異を伴っている可能性が示されている (12)。

本研究では、BDV感染における神経障害機構の解明を目的とし、病原性が異なる2株のBDVをT細胞免疫不全ラットであるヌードラットに感染させることにより、発症関連因子と予測されている宿主側因子の一つである免疫応答性がどの程度関連するのかについて解析を行った。

2. 方法

1) ウイルス

BDV He80株持続感染MDCK細胞 (Giessen大学 R.Rott博士より分与)の乳剤を新生仔Lewisラットの脳内に接種することにより作製したラット馴化株 (CRP3株) (13)、およびCRP3株作製の途中段階のウイルス株を成SJLマウスの脳内接種し5代継代したマウス馴化株 (11)を用いた (US-FDA, K.M. Carbone博士より分与)。CRP3株とCRNP5株は20%脳乳剤として本実験に用いた。

2) 感染実験と症状の評価

成ヌードラット [F344/N Jcl-rnu (rnu/rnu), 4週齢, メス, 日本クレア]に、2×10³ Focus Forming Unit (FFU)のCRP3株 (N=7)、CRNP5株 (N=7)、陰性コントロールとして同量の非感染マウス脳乳剤 (NL群, N=7)を左脳大脳皮質内に接種した。感染後、4日毎に経過の観察を行い、ボルナ病の臨床症状を0から3までのスコアで評価した (12)。成ラットの評価基準は以下の通りである：(0) 正常、(1) 初期症状 (毛づくろいをしない、活動性の上昇、多動)、(2) 中期 (中程度) 神経症状 (過敏反応、運動障害、軽度麻痺)、(3) 後期 (重度) 神経症状 (全あるいはほぼ全麻痺、重度脱水、不動、致死)。これらの動物は、感染7週間後まで観察された。それまで

にスコア3と評価されるボルナ病を発症した動物は随時、観察期間終了時まで生存した動物は観察終了後に安楽殺しウイルス学的・組織学的採材を行った。全ての実験は、麻布大学動物実験指針に従って行われた。

3) ウイルス力価、及び抗体力価の測定

1匹の動物の脳を正中で2分割し、左脳はウイルス力価を測定するために20%脳乳剤とした。ウイルス力価の測定はC6細胞 (ラットグリオーマ株化細胞, US-FDA, K.M. Carbone博士より分与)を用いてFFUアッセイにより測定した (12)。抗体価の測定は、BDV He80株持続感染細胞株であるC6BV細胞 (US-FDA, K.M. Carbone博士より分与)を抗原とした間接蛍光抗体法により測定した (12)。

4) 組織学的解析

2分割した右脳は、4%パラフォルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋し、組織学的解析 (ヘマトキシリン/エオジン染色及び免疫組織染色)に用いた (13)。免疫組織染色では、BDV核蛋白質に対するモノクローナル抗体 (14)を用いた。

3. 結果と考察

1) 臨床症状

CRNP5株感染ヌードラットは、7頭中6頭において、感染27日目からふらつき歩行、同じ場所を同一方向に回る、などの明らかな運動障害を示し始め、後肢の部分麻痺が認められた。7頭中2匹は、食欲が低下傾向にあった。うち1頭は自発運動の低下が認められた。症状は進行し、感染32日目には7頭中1頭がボルナ病のスコア3と評価され、33日目に死亡した。残りのラットについては、スコア3までボルナ病が進行した場合には耐過しないと判断して、感染35日目にスコア3になった3頭、及び感染36日目にスコア3になった3頭はそれぞれ安楽殺して採材した。感染35日目と36日目には陰性対照としてNL群のラットも一部安楽殺し採材した。

CRP3株感染ヌードラットおよびNL群のラットは全頭全てが7週間の観察期間中に明確な神経症状を示さなかった。

2) 脳における病変と、ウイルス抗原の分布

発症したCRNP5株感染ラット、及び7週間の観察期間終了後に採材されたCRP3株感染ラットはいず

れもグリオシスは認められたが、末梢血からのリンパ球浸潤を主体とする脳炎は認められなかった。脳における病変は、現在解析中なのでその途中経過の報告になるが、少なくとも海馬領域では顕著であった。すなわち、CRNP5感染ラットでは、錐体細胞層において神経細胞の核濃縮や崩壊などの重度の神経細胞変性が認められ、特にCA3領域の錐体細胞層はほぼ消失していた。また、顆粒細胞層においても軽度の神経細胞変性が認められた。それに対し、CRP3株感染ラットでは、海馬の錐体細胞層はNLラット群と明らかな差はみとめられず、顆粒細胞層における重度の神経細胞変性が認められた。ウイルス抗原(BDVの核蛋白質N)は神経細胞の主に核にみとめられたが、細胞質にも一部認められた。グリア系の細胞においてウイルス抗原が検出されるのはまれであった。ウイルス抗原は脳内いたるところで検出されたが、少なくとも病変が認められた領域には認められた。

3) 脳内のウイルス量と抗BDV抗体

今回採材した全ての感染ラットの脳においてBDVが検出された。特異抗体については、現在解析中である。

4) 考察

本研究では、T細胞免疫不全動物である成ヌードラットにBDV-CRNP5株とCRP3株をそれぞれ脳内接種し、感染後7週間、その感染病態について観察及び解析した。その結果、CRP3株感染ラットはNL群と明らかな相違が認められないまま7週間耐過したが、CRNP5株感染ラットは全頭が感染33から36日目の間にボルナ病の臨床症状スコア3に達し、重篤な神経症状を発症した。

ボルナ病は免疫応答介在性に発症すると考えられており、過去の成ヌードラットにおける感染実験では発症は認められなかった(15)。今回、標準的な病原性を示すCRP3株は7週間の観察期間中発症しなかったことから、過去の報告を支持する結果をしめた。CRP3株はヌードラットのバックグラウンド系統である成F344ラットにおける感染では、軽度から中程度のボルナ病を発症したことから(unpublished data)、免疫応答介在性に発症することが示唆された。一方、CRNP5株感染ではヌードラットにおいて全頭がボルナ病の発症をしたことから、

Nishinoらの報告(2002年)によって示唆されたように発症には宿主のT細胞性免疫応答は必要としないことが強く示唆された。従って、発症における宿主免疫応答の必要性は、ウイルス株により異なること、さらにCRNP5株には感染動物に致死的な症状を引き起こす直接的/間接的な中枢神経病原性があることが示唆される。

Herzogらの報告(1985年)では、BDVに感染したヌードラットは発症せず、脳炎及び他の脳病変は認められなかったが、脳および網膜でウイルスは検出された。今回の研究では、標準的な病原性を示すCRP3株感染ヌードラットは、同様に発症せず、脳炎も認められなかったが、異なる点としてF344やLewisなどの系統の新生仔ラットが感染した場合と同様の脳症、特に海馬領域の顆粒細胞層における神経細胞変性が認められた。従って、これらの病変は、脳炎によって起こるのではなく、BDV感染そのものにより引き起こされる可能性が高い。また、同海馬領域に変性が起こることは、ボルナ病における致死的症状あるいは運動機能障害には直接関わっていないことが示唆される。今後、BDV感染ヌードラットにおける詳細な病理学的、ウイルス学的、及び行動学的な解析が必要と考えられる。

4. 要約

ボルナ病ウイルス(*borna disease virus*; BDV)は、馬や羊に髄膜炎あるいは脳脊髄炎をおこし、神経疾患や時に致死的な経過を引き起こすボルナ病の原因ウイルスである。ところが、ラットにおいて高病原性であるCRNP5株は、免疫応答の未熟な新生仔ラットに感染させると脳炎は認められないものの重篤なボルナ病を発症する。従って、CRNP5株は免疫応答非依存的に感染ラットを発症させること、すなわち直接的/間接的な中枢神経障害がある可能性が示唆されていた。そこで、本研究では、ボルナ病発症における宿主の免疫応答の必要性について調べるために、T細胞機能欠如ラット(ヌードラット)における病原性を解析した。4週令のヌードラットにCRNP5株とCRP3株を感染したところ、CRNP5株感染群は全頭重篤なボルナ病を発症したが、CRP3株感染ラットは7週間の観察期間中に発症は認められなかった。CRNP5株感染ラットでは、海馬の神経細胞層が消失

し、特に錐体細胞層における神経細胞変性が顕著だった。以上の結果から、CRP3株はT細胞性免疫応答介在性にボルナ病を発症すること、一方、CRNP5株は発症には宿主のT細胞性免疫は必要としないことが強く示唆された。

文 献

- 1) Stitz, L., Dietzschold, B. and Carbone, K. M. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190: 75-92. 1995.
- 2) Rott, R. and Becht, H., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190: 17-30. 1995.
- 3) Anzil, A. P., Blinzinger, K. and Mayr, A. *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 40: 52-57. 1972.
- 4) Hirano, N., Kao, M. and Ludwig, H. J. *Gen. Virol.* 64: 1521-1530. 1983.
- 5) Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H. and Rott, R. *J. Infect. Dis.* 148: 305-315. 1983.
- 6) Sprankel, H., Richarz, K., Ludwig, H. and Rott, R. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl).* 165: 1-18, 1978.
- 7) Binz, T., Lebelt, J., Niemann, H. and Hagenau, K. *Virus Res.* 34: 281-289, 1994.
- 8) Briese, T., Schneemann, A. Lewis, A. J., Park, Y. S., Kim, S., Ludwig, H. and Lipkin, W. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4362-4366, 1994.
- 9) Schneider, P. A., Briese, T., Zimmermann, W., Ludwig, H. and Lipkin, W. I. *J. Virol.* 68: 63-68, 1994.
- 10) Nowotny, N., Kolodziejek, J., Jehle, C. O., Suchy, A., Staeheli, P. and Schwemmler, M. *J. Virol.* 74: 5655-5658, 2000.
- 11) Rubin, S. A., Waltrip, R. W., Bautista, J. R. and Carbone, K. M. *J. Virol.* 67: 548-552, 1993.
- 12) Nishino, Y., Kobasa, D., Rubin, S. A., Pletnikov, M. V., and Carbone, K. M. *J. Virol.* 76: 8650-8658, 2002.
- 13) Carbone, K. M., Duchala, C. S., Griffin, J. W., Kincaid, A. L. and Narayan, O. *J. Virol.* 61: 3431-3440, 1987.
- 14) Bahmani, M. K., Nowrouzian, I., Nakaya, T., Nakamura, Y., Hagiwara, K., Takahashi, H., Rad, M. A., and Ikuta, K. *Virus Res.* 45, 1-13, 1996.
- 15) Herzog, S., Wonigeit, K., Frese, K., Hedrich, H. J., and Rott, R. *J. Gen. Virol.* 66, 503-508, 1985.