

ヒト内因性精神疾患モデル動物 (ボルナ病ウイルス感染動物) の行動解析

*Behavioral analysis of Borna disease virus (BDV) infected rats
(an animal model of human neurological and psychiatric diseases).*

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. In the present study, the relationship between brain damage and resultant behavioral defects were assessed. Histopathological and behavioral changes were analyzed for Lewis rats infected with two related (but having different pathogenicity) Borna disease virus (BDV) variants, the rat-adapted CRP3 variant or the mouse-adapted CRNP5 variant.

The experiment was divided into three phases (phase 1: postnatal days (PND) 4-20; phase 2: PND 24-28; phase 3: PND 45-70) and behavioral alterations were assessed for 70 days.

Phase 1: No significant differences between CRP3 infected rats and control rats were found for a) body lighting, b) negative geotropism, c) grasping response, d) fore limb and hind limb placing and e) bar holding test. On the other hand, CRNP5 infected rats showed significantly different responses in some tests mentioned above by PND14. CRP3 infected rats had few brain lesions, including developmental damage to the cerebellum, while rats inoculated with CRNP5 had severe histopathological changes in some brain regions, including the hippocampus and all infected rats showed fatal neurological signs by PND20. The development of the brain lesions may be synchronized with the significantly different behavioral changes. In addition, the developmental damage to the cerebellum may be responsible for the behavioral defects during PND 4-20.

Phase 2: No significant differences between CRP3 infected rats and control rats were found for beam walking (bar crossing) tests and open field tests. The most prominent brain lesions of this phase were the neuronal alteration of the granular layer and thinning of the dentate gyrus. Cerebellar hypoplasia was not observed, as previously described for the primary brain lesions in the neonatal BDV infection.

Phase 3: The open field test revealed at least "hyperactivity" in CRP3 infected rats. The severe destruction of the dentate gyrus may relate to the behavioral deficits, including hyperactivity. The prominent behavioral defects may depend on the deterioration of the hippocampal changes.

1. 目 的

ボルナ病ウイルス (BDV) 感染動物の行動解析を目的としてルイス (Lewis) 新生仔ラットに異なる病原性を持つ2つのBDV-CRP3株とCRNP5株を脳内接

種し、運動機能障害と行動異常を評価するとともに中枢神経系病変を検索し、両者の関連性について検討を加えた。

2. 方 法

1. ウイルス接種

ルイスラット新生仔に 2×10^3 Focus Forming Unit (FFU) のBDV-CRP3株(ラット脳順化株), CRNP5株(マウス脳順化株)とコントロールとしてマウス脳乳剤を生後24時間以内に脳内接種した。

2. 運動機能障害と行動異常の評価

運動機能障害と行動異常の評価は生後日数(ウイルス接種後日数)に従って、以下のような異なる試験を用いて評価した。

1) 幼ラット(接種4日から20日目まで): 離乳前行動発達試験(1) 正向反射テスト, 2) 背地走性テスト(傾斜板テスト), 3) 握り反応(grasping response), 4) 前肢・後肢の反応(fore limb and hind limb placing)(背面と側面), 5) 棒つかみ試験(bar holding test))を接種後4日目から20日目まで毎日実施した。尚, CRNP5株感染ラットについては目視による運動機能障害を含む神経症状の評価が14日目以降悪化(18日目でscore + 3(重度神経症状(震顫の継続, 全麻痺, 致死)))し, 20日目まで試験を続行できなかった。従って, それ以降の運動機能障害と行動異常の評価はCRP3株感染ラットとマウス脳乳剤を接種したコントロールラットについてのみ実施した。

2) 幼ラット(接種24-28日目): 板渡り試験(接種後24, 26, 27日目)とオープンフィールド試験(移動距離, 移動区間数, 区間滞在時間, 後肢立ち反応数, 排便数等)(接種後25, 28日目)を実施した。

3) 成ラット(接種70日目まで): BDV接種後45日目と70日目にオープンフィールド試験を実施し, 移動距離, 移動区間数, 区間滞在時間, 後肢立ち反応数, 排便数等について測定した。

3. 中枢神経系病変の検索

1) 幼ラット(接種20日目まで): 脳内接種(BDV-CRP3株, BDV-CRNP5株とマウス脳乳剤)後4日毎(4, 8, 12, 16, 20日目)に中枢神経系材料をサンプリングした。尚, CRNP5株脳内接種ラットについては症状の悪化により接種後, 18, 19日目にも採材した。

2) 幼ラット(接種24-28日目まで) 脳内接種後24

と28日目に中枢神経系材料を採取した。

3) 成ラット(接種71日目まで): BDV-CRP3株接種後46, 71日目(行動実験の翌日)に中枢神経系をサンプリングした。マウス脳乳剤を接種したコントロールラットについても同様にサンプリングした。中枢神経系病変解析のために各脳から6横断面を切り出して病理組織学的に検索した。

3. 結果と考察

1. 運動機能障害と行動異常

1) 幼ラット(接種4-20日目まで): 離乳前行動発達試験(背地走性試験, 正向反射試験, 前肢と後肢の反応試験, 握り試験, 棒つかみ試験)の全ての項目においてCRP3株感染ラットとコントロール群の間には有意差がなかったが, これは従来のBDV-CRP3株感染ラットで観察されていた結果とは異なる。尚, この相違に関しては, これまでの報告例と比較して今回の感染実験では, 小脳病変がほとんど認められなかったことに起因する可能性がある。一方, CRNP5株接種群では接種後14日目に運動機能試験(背地走性試験, 棒つかみ試験, 握り試験)にコントロールと比較して有意な差が認められた。尚, これは中枢神経系病変が高度となる時期(病変は接種後12日目では軽度であり, 接種後16日目は高度)にはほぼ一致していた。また, CRNP5株接種群における離乳前運動機能試験では, 目視による臨床症状評価に有意差が現れたのと同時期にコントロール群との間に有意差が認められた。

2) 幼ラット(接種24-28日目): ビームウォーキング試験(橋を渡る潜時, 所要時間, スリップ回数を測定: 運動技能とバランスを評価)とオープンフィールド試験(オープンフィールド装置内における15分間の行動解析)を実施したが, CRP3株接種ラットとコントロールラットでは有意な差異は指摘できなかった。今回のBDV感染ラットでは板渡り試験においては, 感染ラットではスリップ回数が増加するという過去の報告とは異なっていた。また, 成熟後の脳の主要病変とされていた小脳低形成は明らかではなかった。

3) 成ラット(接種70日目まで): オープンフィールド試験では移動距離等の項目に有意差があり, 少なくともCRP3株接種ラットの多動(hyperactivity)が

示された（図1）。海馬歯状回の萎縮が多動等の行動異常と関連し、病変の程度が悪化することが、行動異常の顕在化に関連している可能性が示唆された。

2. 中枢神経系病変

1) 幼ラット（接種20日目まで）：CRP3株接種群においては固定後脳重量，大脳外套幅ではコントロール群との間に有意差は認められず，免疫染色により抗BDVウイルス抗原の存在は確認されるものの中枢神経系病変は殆ど認められなかった。対照的にCRNP5株接種群では体重，固定後脳重量，大脳外套幅についてコントロール群と比較して有意な差が認められ，臨床症状評価では，接種後14日目より運動失調，震顫，前後肢の麻痺などを含む神経症状が認められ，接種後20日目までには全個体が重篤で致死的な神経症状を呈した。脳病変は16日目以降，高度な大脳皮質（重篤な神経症状を呈した個体においては空隙形成，出血），海馬（特に海馬錐体細胞を中心に神経細胞の変化（核断片化等）とグリオシス）（図2），小脳病変（プルキンエ細胞の核断片化，重篤な神経症状を呈した個体においては小脳出血）が指摘された。

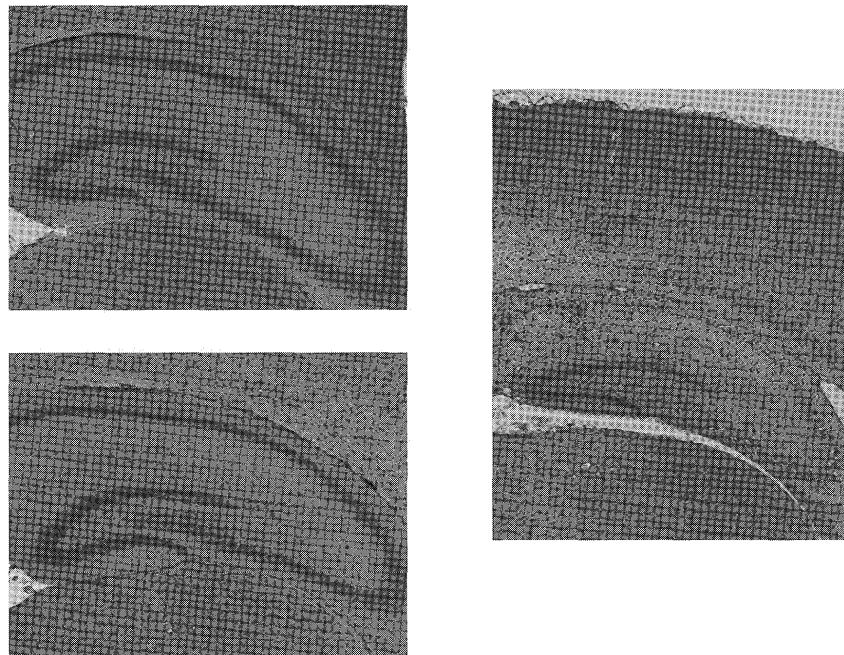


Figure 2. The hippocampus. PND 16. The BDV-CRNP5 induced severe loss of pyramidal neurons and atrophy of the hippocampus, and thinning of the cerebral cortex. Sham-inoculated (Upper left), BDV-CRP3 infected (Lower left), and BDV-CRNP5 infected Lewis rat (Right). H.E.

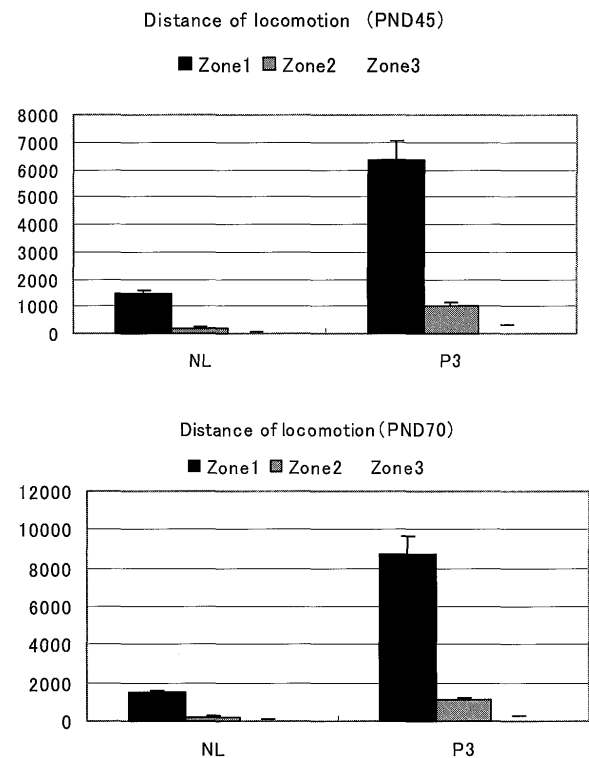


Figure 1. The distance of locomotion. The floor of the open field (60 x 60 cm) is divided into 3 zones. Zone 1 is the outermost zone, zone 2 is the intermediate zone, and the zone 3 is the innermost square zone. NL (sham-inoculated) and P3 (BDV-CRP3 infected) Lewis rats. Bars and vertical lines represent the mean and SEM.

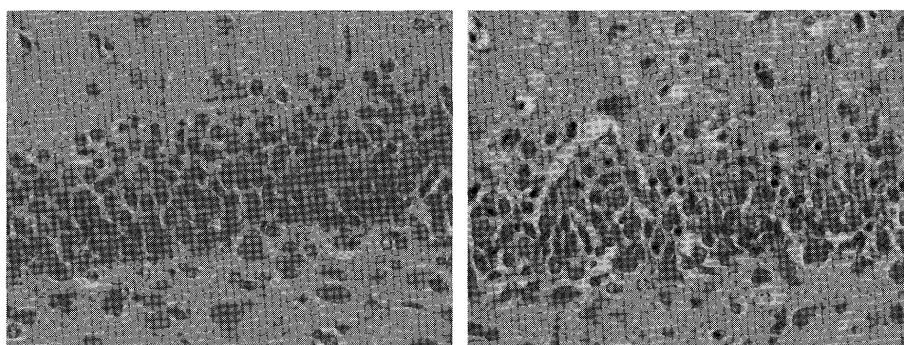


Figure 3. The dentate gyrus. BDV-CRP3 infected Lewis Rat. Neuronal alterations with pyknosis of the granular layer. PND 24 (Left) and PND 28 (Right). H.E.

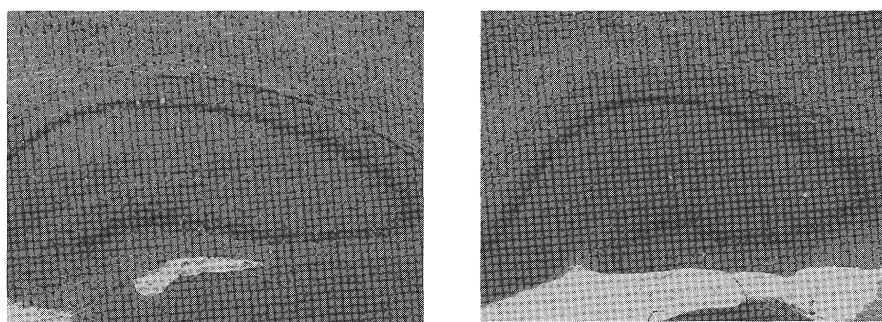


Figure 4. The dentate gyrus. BDV-CRP3 infected Lewis Rat. Severe destruction and atrophy of the dentate gyrus. PND 46 (Left) and PND 71. H.E.

2) 幼ラット（接種24-28日目）：CRP3株接種後24, 28日目において海馬歯状回顆粒細胞の散在性核断片化等が指摘され、28日目より高度でそれに起因する顆粒細胞層の菲薄化が指摘された（図3）。脳における抗BDV抗体陽性所見と脳全域における瀰漫性の星状膠細胞活性化と増加が認められた。

3) 成ラット（接種71日目まで）：BDV-CRP3株接種後46, 71日目では海馬歯状回の顆粒細胞数の減少が高度かつ瀰漫性に指摘され、海馬歯状回の重度萎縮が認められた（図4）。脳における抗BDV抗体陽性所見と脳全域における観察期間を通じて進行する瀰漫性の星状膠細胞活性化と増加が認められた。

尚、脳炎はどの個体においても観察されなかった。

4. 要 約

ルイスラット新生仔脳内に異なる病原性を持つ2つのBDV-CRP3株とCRNP5株を接種し、運動機能障害と行動異常を評価するとともに中枢神経系病変を検索し、両者の関連性について検討を加えた。

運動機能障害と行動異常の評価は生後日数（ウイ

ルス接種後日数）に従って3期に分け、異なる行動試験を実施し、試験終了後に中枢神経系を組織学的に検索した。

1) 幼ラット（接種20日目まで）：従来、CRP3株感染ラットで観察されていた離乳前行動発達試験の結果とは異なり、感染ラットとコントロール群の間には有意差がなかった。これは今回の感染実験では、小脳病変も含めCRP3株接種群には脳の組織病変がほとんど認められなかったことに起因する可能性がある。一方、CRNP5株接種群では14日目にコントロールと比較して有意な差が認められた。尚、これは中枢神経系病変が高度（病変は接種後12日目では軽度であり、接種後16日目は高度）となる時期にはほぼ一致していた。CRNP5株接種群では20日目までには高度の脳病変を有し重篤で致死的な神経症状を呈した。

2) 幼ラット（接種24-28日目）：ビームウォーキング試験とオープンフィールド試験ではCRP3株接種ラットとコントロールラットの間では有意な差は指摘できなかった。この時期の主要な脳病変としては

海馬歯状回顆粒細胞の散在性核断片化に起因する顆粒細胞層の菲薄化が指摘されたが、これまで成熟後の脳の主要病変とされていた小脳低形成は明らかではなかった。

3) 成ラット（接種70日目まで）：オープンフィールド試験では少なくともCRP3株接種ラットの多動（hyperactivity）が示された。海馬歯状回の障害が多動等の行動異常と関連し、病変の程度が悪化することが、行動異常の顕在化に関連している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Dietz DM, Vogel MW, Rubin SA, Moran TH, Carbone KM. and Pletnikov MV. *J. NeuroVirol.* 10: 267-277, 2004.
- 2) Dietz DM, Pletnikov MV. *Physiol. Behav.* 80: 359-366, 2003.
- 3) Nishino Y, Kobasa D, Rubin SA, Pletnikov MV and Carbone KM. *J. Virol.* 76: 8650-8658, 2002.
- 4) Pletnikov MV, Rubin SA, Vogel MW, Moran TH and Carbone KM. *Brain Res.* 944: 97-107, 2002.
- 5) Pletnikov MV, Rubin SA, Carbone KM, Moran TH and Schwarz GJ. *Dev. Brain Res.* 126: 1-12, 2001.