

平成22年5月1日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380171

研究課題名（和文）経神経伝播人畜共通感染症の新しい予防・治療法の確立と伝播メカニズムの解明

研究課題名（英文）Establishment of novel preventive/therapeutic measures and demonstration of a mechanism of neural spread of pathogens in neurotropic zoonotic diseases

研究代表者

梅村 孝司（UMEMURA TAKASHI）

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：00151936

研究成果の概要（和文）：鞘内免疫（脳脊髄液に抗原を接種し、脳脊髄液に特異抗体を誘導する免疫法）によって脳脊髄液に誘導された特異抗体は脳で産生されていること、鞘内免疫は狂犬病およびオーエスキー病に対し完全なワクチン効果を発揮すること、鞘内免疫は狂犬病の治療にも応用可能であることを示した。また、インフルエンザ脳症の原因は IFV 感染が引き金となって起こった高サイトカイン血症/IFV 感染と菌体内毒素血症の重複である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Specific antibodies detected in cerebrospinal fluid by intrathecal vaccination (vaccination by an inoculating antigen into subarachnoidal space) were produced de novo in the brain. Intrathecal vaccination completely prevented clinical signs and death of mice inoculated with rabies or pseudorabies viruses. Eighty percent of the mice intrathecally vaccinated and inoculated rabies virus directly into the brain survived, and this result suggested that the intrathecal vaccination was applicable for the treatment of rabid animals and humans. Our novel murine model of influenzal encephalopathy of childhood suggested hypercytokinemia triggered by influenza virus infection and/or a duplication of influenza virus infection and endotoxemia might be the cause(s) of the disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用獣医学

キーワード：狂犬病、鞘内免疫、インフルエンザウイルス、小児脳症、オーエスキー病、血球凝集性脳脊髄炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

微生物が動物の中枢神経組織に侵入する経路は血行性と末梢神経性（経神経伝播）に大別される。中枢神経は免疫学的特権組織 immunological privileged site であり、血液-脳関門によって血液中の抗体は健全な脳組織へ移行しない。さらに、正常な神経細胞とグリア細胞は主要組織適合複合体 MHC 分子を欠き、Tリンパ球への抗原提示能がない。したがって、中枢神経組織は免疫学的に他の組織から隔離されており、経神経伝播微生物がいったん侵入したら、経神経伝播とその後の脳脊髄炎の発生を止めることは現代医療においても困難である。たとえば、世界保健機構 WHO によれば全世界で毎年約 5.5 万人が狂犬病で死亡しており、凶暴化した発症者をベッドに縛りつけ、医師および近親者が遠巻きに見守るしかないという悲惨な状況が繰り返されている。狂犬病に対する予防的ワクチン接種と暴露後ワクチン接種が広く行われているにもかかわらず発症者が減少しない主な理由は、現在行われている皮下免疫法が完全ではなく、かつ狂犬病発症後の治療法がないからである。狂犬病ウイルスは脳内侵入後も強い脳炎を惹起しないため、ワクチンによって誘導された血中抗体は血液-脳関門を通過できず、脳内ウイルスに対する免疫応答が起こらないまま末期に至る。ワクチン免疫が有効なのは、狂犬病ウイルスが感染局所の末梢神経へ侵入する迄である。ヒトと動物の経神経伝播感染症には狂犬病のほか、仮性狂犬病（オーエスキュー病）、急性灰白脳脊髄炎（ポリオ）、ボルナ病、子豚の血球凝集性脳脊髄炎、単純ヘルペスウイルス感染症（ヒトの水疱性口内炎や帯状疱疹）、高病原性鳥インフルエンザウイルス、反芻獣のリステリア症、海綿状脳症（感染性プリオン病）など多数あり、いずれの疾患においても、病原体の神経組織侵入・発症後の治療は困難である。

微生物の経神経伝播経路としては神経軸索（軸索）内移動、シュワン細胞伝播および神経内膜伝播（末梢神経の脳脊髄液中を拡散）の3経路を想定し得るが、これまでに証明されたのは狂犬病ウイルス (Raux *et al.*, 2000)、単純ヘルペスウイルス (Sodiek *et al.*, 1997) およびリステリア菌 (Antal *et al.*, 2001) が軸索内移動（キネシンやダイニンなどの運動蛋白と結合し、微小管のレール上を早い軸索流として移動）すること、および単純ヘルペスウイルス (Shimeld *et al.*, 2001) がシュワン細胞伝播することのみである。また、経神経伝播微生物が上記3経路をどのような比率で伝播するのかが定量的に検討されたことはない。

2. 研究の目的

(1) 経神経伝播感染症の新しい予防・治療法の開発

① 鞘内免疫による脳脊髄液への抗体誘導機序の解明

② 鞘内免疫による経神経伝播感染症の予防効果の検討

③ 鞘内免疫による狂犬病治療に向けての基礎的検討

(2) 小児インフルエンザ脳症の実験的再現と発生機序の解明

わが国では毎年 100 名前後の小児インフルエンザ脳症が発生しているが、その発生機序、治療・予防法は不明である。本研究計画では乳のみマウスを用いてインフルエンザ脳症の動物モデルを作成し、本症の発生メカニズムを明らかにする。

(3) 経神経伝播ウイルスの経神経伝播機序の解明

申請者らは H5 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスが経神経伝播することを *in vitro* と *in vivo* で証明し、インフルエンザウイルスは狂犬病ウイルスやオーエスキューウイルスとは異なり、微小管を破壊しても軸索内移動することを報告してきた。本研究では、経神経伝播微生物の代表として狂犬病ウイルス、オーエスキューウイルスおよび血球凝集性脳脊髄炎ウイルスの経神経伝播様式を比較検討する。

3. 研究の方法

(1) ①マウスに不活化オーエスキューウイルスを用いた鞘内免疫あるいは皮下免疫を施し、末梢血と脳脊髄液中の中和抗体価、脳内における IgG mRNA、抗体誘導に関与するサイトカインおよびそれらの mRNA を ELISA, RT-PCR によって定量するとともに、脳の組織学的および免疫組織学的検索を行い、抗体産生細胞の局在部位を検索した。

(1) ②鞘内、皮下あるいは筋肉内免疫したマウスの後肢筋肉に致死量のオーエスキューウイルスまたは狂犬病ウイルス (CVS 株) を接種し、それぞれの免疫法の予防効果を検討した。

(1) ③狂犬病発症個体では脳内でおびただしい数のウイルスが増殖している。鞘内免疫を狂犬病治療に用いるためには、鞘内免疫は脳内でのウイルス増殖を阻止するか否かを確認する必要がある。そこで、鞘内あるいは皮下免疫したマウスの脳に致死量の狂犬病ウイルスを接種し、狂犬病発症予防効果を比較した。

(2) 7 日齢乳のみマウスにヒトから分離された H3N2 亜型インフルエンザウイルス (IFV) を経鼻接種し、その 3 日後に大腸菌由来リポ多糖体 (LPS) を腹腔内に 2 回接種し、脳の組織学的変化、血液脳関門 (BBB) の透過性、末梢血中のサイトカイン濃度、BBB 透過性亢進

の原因について検索した。

(3) 新生マウスの脊髄神経節より分離した培養細胞(DRG細胞)に豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルス(HEV)、オーエスキューウイルス(PRV)あるいは狂犬病ウイルス(RV)を感染させ、ウイルスの感染増殖能を検討した。また、細胞骨格阻害剤処理されたDRG細胞における感染増殖能を比較し、各ウイルスの感染増殖様式および神経細胞特異性を比較検討した。

4. 研究成果

(1) ①鞘内免疫と皮下免疫によって末梢血に特異抗体が誘導されたが、鞘内免疫によってのみ脳脊髄液にも特異抗体が誘導された。組織学的には鞘内免疫動物の脳室周囲および髄膜でリンパ球、形質細胞が増殖し、形質細胞の遊走・分化を促すサイトカインのmRNAおよびIgG mRNAの産生亢進が脳で認められたことから、鞘内免疫によって脳脊髄液に誘導された特異抗体は脳で産生されていることが分かった。

(1) ②ホルマリン不活化オーエスキューウイルスあるいは市販の狂犬病ワクチンを用いた鞘内、皮下あるいは筋肉内免疫を施したマウスの後肢筋に致死量のオーエスキューウイルスあるいは狂犬病ウイルスを接種したところ、すべての鞘内免疫マウスは無症状で耐過したが、狂犬病ウイルス接種ではすべての非免疫マウス、70%の皮下免疫マウス、30%の筋肉内免疫マウスが、オーエスキューウイルス接種ではすべての非免疫マウス、80%の皮下免疫マウスが死亡した。この実験結果は、鞘内免疫は経神経伝播ウイルス感染症に対し、従来のワクチン接種法に較べ格段に高い予防効果を発揮することを示した。

(1) ③(2) すべての非免疫マウスと80%の皮下免疫マウスが狂犬病ウイルスの脳内接種により狂犬病を発症し、死亡した。一方、20%の鞘内免疫マウスは狂犬病を発症して死亡したが、残りの80%は無症状で耐過した。以上の結果から、鞘内免疫は狂犬病の予防のみならず、治療にも応用可能であることが示された。

(2) IFVとLPSを接種されたマウス(IFV+LPSマウス)ではBBBの透過性が亢進しており、脳浮腫が著明であったが、脳からIFVは分離されず、免疫組織学的にも脳にウイルス抗原は証明されなかった。また、IFV+LPSマウスでは末梢血中の炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)が他群に比べ顕著に増加していた。さらに、IFV+LPSマウスの脳ではBBBの構成要素である血管内皮細胞とアストロサイトのアポトーシスが亢進していた。以上の所見はIFV+LPSマウスの病態がヒト小児インフルエンザ脳症のそれに極めて類似しており、ヒトの本症の原因はIFV感染が引き金となって起

こった高サイトカイン血症および/またはIFV感染と菌体内毒素血症の重複である可能性を示していた。

(3) HEVの神経細胞における感染および増殖と細胞骨格との関連について、微小管依存性に細胞内輸送をされることが証明されているPRVと比較検討した。その結果、PRVと比較してHEVの感染はより強い神経細胞特異性を有すること、および神経細胞での感染はPRVと同様に微小管と中間径フィラメントに依存することが明らかとなった。つぎに、非常に強い神経親和性を有するRVに関して、nucleoprotein(N蛋白)に対するモノクローナル抗体を抗原検出に用いて同様の実験を行った。その結果、RV抗原は神経細胞と非神経細胞のいずれにおいても検出されたが、神経細胞の抗原陽性細胞数はHEVやPRVと比較して低値を示し、細胞骨格の選択的阻害においてはRV抗原陽性細胞数に有意な変化は認められなかった。これらの成績から、RV抗原陽性細胞数の低値は神経細胞内での増殖速度もしくは伝達速度の遅さによるものと推察され、これが動物およびヒトの狂犬病における潜伏期間の長さに関連している可能性が考えられた。また、ウイルス粒子の輸送およびパッケージングには細胞骨格が関与するが、ウイルスN蛋白はこれらとは独立した機構により合成される可能性が推察された。非神経細胞への感染が認められたことから、これらの細胞がRVの神経細胞内での感染および増殖の支持細胞として関与する可能性と、シュワン細胞における感染がRVの神経伝播に関与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

1. Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H, Ochiai K, Umemura T: Influenza A virus infection enhances lipopolysaccharide-induced encephalopathy in neonatal mice. J Neurovirol (in press) 2010 [Epub ahead of print] 査読有
2. Kojima D, Park CH, Tsujikawa S, Kohara K, Hatai H, Oyamada T, Noguchi A, Inoue S: Lesions of the central nervous system induced by intracerebral inoculation of BALB/c mice with rabies virus (CVS-11). J Vet Med Sci (in press) 2010 [Epub ahead of print] 査読有
3. Murata R, Eshita Y, Maeda A, Maeda J, Akita S, Yanaka T, Yoshii K, Kariwa H, Umemura T, Takashima I: Glycosylation of the West Nile virus envelope protein increases in vivo and in vitro viral

multiplication in birds. Am J Trop Med Hyg 82: 2010, 696-704. 査読有

4. 野兎病菌に自然感染したトウホクノウサギ (*Lepus brachyurus angustidens*) の症例—野生動物の病理解剖の意義と感染リスク—朴天鎬, 中西中, 畑井仁, 小山田敏文, 佐藤久聡, 進藤順治, 藤田修, 堀田明豊, 井上智, 棚林清. 獣医畜産新報, 63(3): 2010, 197-200. 査読有

5. Shin JH, Sakoda Y, Yano S, Ochiai K, Kida H, Umemura T: Effective prevention against rabies by intracerebral immunization in mice. J Vet Med Sci 71: 2009, 1331-1336.

6. Kojima D, Park CH, Sato Y, Inoue S, Noguchi A, Oyamada T: Pathology of the Spinal Cord of C57BL/6J Mice Infected with Rabies Virus (CVS-11 Strain). J Vet Med Sci 71(3): 2009, 319-324. 査読有

7. Park CH, Nakanishi A, Hatai H, Kojima D, Oyamada T, Sato H, Kudo N, Shindo J, Fujita O, Hotta A, Inoue S, Tanabayashi K: Pathological and microbiological studies of Japanese hare (*Lepus brachyurus angustidens*) naturally infected with *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. J Vet Med Sci 71: 2009, 1629-1635. 査読有

8. Hasebe R, Sasaki M, Sawa H, Wada R, Umemura T, Kimura T: Infectious entry of equine herpesvirus-1 into host cells through different endocytic pathways. Virology 393: 2009, 198-209.

9. Hara Y, Hasebe R, Sunden Y, Ochiai K, Honda E, Sakoda Y, Umemura T: Propagation of swine hemagglutinating encephalomyelitis virus and pseudorabies virus in dorsal root ganglia cells. J Vet Med Sci 71: 2009, 595-601. 査読有

10. Hara Y, Sunden Y, Ochiai K, Umemura T: In vitro propagation of rabies virus in mouse dorsal root ganglion cells. Jpn J Vet Res 56: 2009, 181-188. 査読有

11. Shin JH, Sakoda Y, Kida H, Kim JH, Ochiai K, Umemura T: Comparison of antibody titers in rabbits following immunization with inactivated influenza virus via subarachnoidal or subcutaneous route. J Vet Med Sci 69: 2007, 1167-1169. 査読有

12. Sunden Y, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Nagashima K, Umemura T, Sawa H: Identification of DDX1 as a JC virus transcriptional control region-binding protein. Microbiol Immunol 51: 2007, 327-337. 査読有

13. Sunden Y, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Nagashima K, Umemura T, Sawa H:

DDX1 promotes proliferation of JC virus through transactivation of its promoter. Microbiol Immunol 51: 2007, 339-347.

[学会発表] (計7件)

1. 田中智久, 秋田沙希, 寸田祐嗣, 落合謙爾, 梅村孝司: インフルエンザウイルス感染 COX-2 欠損乳のみマウスの実験病理学的研究。第149回日本獣医学会、2010年3月26-28日、日本獣医科学大学、東京。査読無

2 Umemura T: Suppression of rabies virus propagation in mice brain by intracerebral immunization of inactivated virus. 4th Meeting of Asian Society of Veterinary Pathologists, Nov. 19-20, 2009, Bangkok, Thailand (invited speaker). 査読無

3. Tanaka T, Sunden Y, Tanoue G, Ochiai K, Sakoda Y, Kida H, Umemura T: Mouse model of influenza virus-associated encephalopathy of childhood. 27th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and of the European College of Veterinary Pathologists, Sept. 9-12, 2009, Krakow, Poland. 査読有

4. Lee HK, Sunden Y, Ochiai K, Umemura T: The immune response in mice following intra-cerebral vaccination against pseudorabies virus. 27th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and of the European College of Veterinary Pathologists, Sept. 9-12, 2009, Krakow, Poland. 査読有

5. 田中智久, 寸田祐嗣, 田上銀平, 迫田義博, 落合謙爾, 喜田宏, 梅村孝司: マウスを用いた小児インフルエンザ脳症の再現実験: LPS 投与の影響。第56回日本ウイルス学会、2008年10月26-28日、岡山コンベンションセンター。査読無

6. 田中智久, 寸田祐嗣, 岡松正敏, 迫田義博, 落合謙爾, 梅村孝司: H5N1型インフルエンザウイルスに感染した野生オオハクチョウの病理学的検索。第146回日本獣医学会、2008年9月24-26日、シーガイア、宮崎。査読無

7. 寸田祐嗣, 矢野志織, 落合謙爾, 梅村孝司: 鞘内免疫法による狂犬病治療効果の基礎研究。第145回日本獣医学会、2008年3月28-30日、麻布大学、東京。査読無

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅村 孝司 (UMEMURA TAKASHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号: 00151936

(2)研究分担者

朴 天鎬 (PARK CHON-HO)

北里大学・獣医畜産学部・准教授

研究者番号：50383550

喜田 宏 (KIDA HIROSHI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：10109506