

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380171

研究課題名(和文) 鞘内免疫メカニズム解明と狂犬病治療の試み

研究課題名(英文) Treatment of rabies using intrathecal immunization and the mechanisms of the treatment

研究代表者

梅村 孝司 (Umemura, Takashi)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任教授

研究者番号：00151936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：狂犬病は致死的な人獣共通感染症で、現在もなお有効な治療法はない。本研究では、これまでの脳免疫に関する自家所見に基づき、鞘内免疫(脳脊髄液へのワクチン投与)によって狂犬病発症動物を治療する事を目指した。その結果、暴露前あるいは暴露後ワクチン接種を受けた個体では、発症後早期に鞘内免疫を行えば、脳炎に起因する症状は残るものの、100%延命可能であることを明らかにした。狂犬病発症例では心筋壊死を併発するが、その発生メカニズムは不明であった。心筋壊死は神経原性心筋症であり、狂犬病発症個体の治療に当たっては心筋症の併発に留意する必要がある事を本研究で明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Rabies is a fatal zoonotic disease for which no effective treatment measures are currently available. I purposed treatment of rabid animals using intrathecal immunization which means direct inoculation of vaccine into cerebrospinal fluid, based on our previous research results on brain immunity. As a result, the treatment using intrathecal immunization on rabid patients who ever received pre- or post-exposure vaccination resulted 100% survival of the patients. However, their recovery was incomplete and persisted were nervous signs due to brain damages before the treatment. Rabid patients usually show myocardial necrosis of unknown pathogenesis. The present research disclosed that the myocardial lesion was neurogenic cardiomyopathy and complication of myocardial lesion should be kept in mind at the treatment of rabid patients.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：狂犬病 治療実験 鞘内免疫 脳免疫 心筋壊死 神経原性心筋症 ワクチン投与 ウサギ

### 1. 研究開始当初の背景

狂犬病は致死的な人獣共通感染症で、現在もなお有効な治療法はない。2005年に米国で2名の狂犬病罹患患者が抗ウイルス薬と麻酔薬を用いた昏睡療法の併用により救命できたと報告され、この治療法はMilwaukee Protocolと命名された。しかし、その後の追試は全て不成功に終わり、かつ本治療法のメカニズムも不明なことから、本治療法は忘れ去られつつある。

狂犬病ウイルスは少なくとも5種類の蛋白をコードする遺伝子を有しており、感染細胞の壊死やアポトーシスおよび宿主の感染防御反応(炎症)を最小限に抑える感染症式を誘導させている。例えば、感染神経細胞のアポトーシスとT細胞浸潤を誘導するG蛋白の産生が少ないほか、P蛋白はインターフェロン産生に始まる一連の宿主免疫反応を抑制する。一方、中枢神経組織は免疫学的特権組織と呼ばれ、リンパ管と樹状細胞を欠き、炎症がなければMHC抗原も提示されていない。さらに、正常な中枢神経組織の血液脳関門は炎症性細胞の浸潤と末梢血抗体の流入を遮断している。従って、細胞壊死に始まる炎症反応が中枢神経組織で起きない限り、血液中の中和抗体は中枢神経組織に侵入した狂犬病ウイルスに作用せず、このことが狂犬病の治療を困難にしている。

### 2. 研究の目的

狂犬病例の組織切片を見ると、生前の神経症状の激しさに比べ、脳の神経細胞壊死や炎症性変化が乏しいことに驚く。特徴的な好酸性細胞質封入体を持つ神経細胞や大量の狂犬病ウイルス抗原・ゲノムを含む神経細胞においても、核と細胞質の形態が良く保持されている。感染細胞を生かしておいた方がウイルスにとって都合がよいのだろうが、逆に、ウイルスを神経組織から駆逐できれば狂犬病は完治するかもしれない。これまでに報告のある7名の狂犬病発症後生存例では、脳脊髄液中の中和抗体価が共通して高かったという記録がある。それならば、脳脊髄液中の中和抗体を誘導できれば狂犬病は治療できるはずである。

鞘内免疫とは抗原を脳硬膜(鞘)内に接種するという、いささか乱暴な免疫法で、臨床応用はされていない。この免疫法に関する実験的研究は1990年代から活発に始められた。現在の脳免疫(中枢神経組織と末梢免疫システムの連携)に関する概念によれば、鞘内免疫の機序は以下のように考えられる。脳脊髄液中に投与された抗原はCD11b/MAC-1<sup>+</sup>抗原提示細胞(ミクログリア)あるいは血管周囲樹状細胞に捕捉され、脳では免疫担当細胞の遊走と分化を促進するケモカインおよびサイトカインが産生される。脳脊髄液の一部は頸部リンパ節に流入するため、抗原情報は頸部リンパ節から脾臓、さらには骨髄に達して全身性の免疫反応を喚起する。増殖したTリンパ

球(特にCD4, CD8およびCD17陽性細胞)とBリンパ球の一部は血液脳関門あるいは脈絡膜の血管を通過して脳組織へ浸潤する。その結果、強い抗体応答と細胞性免疫が脳内と末梢血の両方で起こる。

研究代表者はこれまでに、(1)脳脊髄液の抗体価は鞘内免疫によってのみ顕著に上昇すること、(2)鞘内免疫した脳では抗体産生細胞である形質細胞が脳髄膜、血管周囲および脳室脈絡叢に浸潤すること、(3)鞘内免疫した脳ではIgGのmRNAのみならず、形質細胞の遊走能に関与するケモカインおよびサイトカイン(CXCL9, 10, 13およびBAFF)のmRNAが脳で高発現していることから、鞘内免疫によって脳内で特異抗体産生が起こること、(4)鞘内免疫は血液脳関門の透過性を亢進させ、鞘内免疫によって脳脊髄液に誘導された抗体は末梢血抗体と脳内で産生された抗体の2つの起源を持つことを報告してきた。そこで、鞘内免疫を施したマウスの後肢筋肉内に大量の狂犬病ウイルスを接種し、皮下免疫および筋肉内免疫と発症予防効果を比較したところ、すべての鞘内免疫マウスは狂犬病ウイルス接種に無症状で耐過した。これらの結果は、鞘内免疫を予防的(暴露前)あるいは暴露後免疫として使用すれば完全な狂犬病発症予防効果を発揮することを示していた。

つぎに、鞘内免疫は脳内に侵入した狂犬病ウイルスの増殖を阻止できるか否かを検証するため、鞘内免疫したマウスの脳に狂犬病ウイルスを直接接種し、生残率、脳病変、ウイルス分離および脳脊髄液中の抗体レベルを検索した。その結果、鞘内免疫群の狂犬病発症および死亡率は20%に留まり、鞘内免疫によって脳内でのウイルス増殖を抑制できることが分かった。

以上の結果を踏まえ、本研究課題では、固定毒および街上市毒狂犬病ウイルス接種によって神経症状を表したウサギに鞘内免疫を施し、狂犬病の治療法確立を目指した。

### 3. 研究の方法

攻撃用固定毒狂犬病ウイルスとしてCVS株を、街上市毒狂犬病ウイルスとして1088株を用い、実験動物としては市販SPFウサギを用いた。CVS株接種実験を北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターP2動物実験室において、1088株接種実験を大分大学医学部P3動物実験施設において、それぞれの大学の動物実験委員会の承認を得て行った。

**固定毒ウイルス接種実験:**市販狂犬病ワクチンで皮下免疫後3日目のウサギの後肢に狂犬病ウイルスを接種し、狂犬病発症1, 2および4日後に4羽のウサギに鞘内免疫を行った(SC/IT群)。対照として、ワクチンを投与しないでウイルス接種した群(陽性対照群)3羽、皮下免疫後ウイルス接種し、発症後はワクチン投与しなかった群(SC群)3羽、皮下免疫後ウイルス接種し、狂犬病発症確認後

皮下免疫を3回行った群(SC/SC群)3羽の3群、合計4群を設定した。

**街上毒ウイルス接種実験**: 1088株をウサギの咬筋(4羽)あるいは鼻腔内(4羽)に接種した。

上記の2つの実験ではウイルス接種後の症状観察と体重測定を毎日行ったほか、血液および脳脊髄液を定期的に採取して抗体価を測定した。死亡例および実験終了時に安楽死させたウサギ全例を剖検し、全身諸臓器を組織学的に検索した他、免疫染色とPCR法により、ウイルス抗原あるいはウイルス遺伝子の検索を行った。

#### 4. 研究成果

**固定毒ウイルス接種実験**: ウイルス接種ウサギの初期狂犬病症状は後肢麻痺で、次いで摂餌・摂水量の減少、流涙および流涎亢進、全身性麻痺/けいれん発作を経てウイルス接種後8~12日後に死亡した。しかし、SC/SC群の3羽中1羽とSC/IT群4羽中4羽は全身性けいれんなどの狂犬病極期の神経症状を示したのち快方に向かい、生残した。生残ウサギは摂餌・飲水が可能となり、外部刺激にも反応するようになったが、最長35日間の経過観察中、1羽も起立歩行するには至らなかった。

病理組織学的に死亡例では神経細胞壊死が脳脊髄と背根神経節で広範に認められ、免疫染色切片では大量の狂犬病ウイルス抗原が神経細胞に沈着していた。特に、大脳皮質、視床、視床下部、脳幹の上行性神経核および網様体、小脳虫部、脊髄背核および中間質、腰部および仙骨部の脊髄神経節でこれらの病変が重度で、海馬では軽度ではあった。また、Iba1陽性ミクログリアの増殖/肥大とリンパ球のびまん性、囲管性および髄膜浸潤が顕著で、リンパ球の多くをCD3陽性Tリンパ球が占めていた。一方、生存例では上記脳部位における神経細胞消失が目立ち、マクローファージ浸潤を伴った軟化巣形成が脊髄灰白質および脳幹に散発していた。リンパ球浸潤は生存例に比べ強く認められたが、CD3陽性Tリンパ球の比率は死亡例に比べ低かった。狂犬病ウイルス抗原がごく稀に、神経細胞内に認められたが、RT-PCR検索では生存例の脳組織には狂犬病ウイルスのゲノムは検出されなかった。

狂犬病発症後生残したヒト症例の全てで脳脊髄液に高力価の中和抗体が検出されたことから、脳脊髄液の中和抗体の重要性が強調されてきた。しかし、本実験で臨床症状の極期(生死を分けた時期)に採取した血清および脳脊髄液の中和抗体価を死亡例と生残例で比較したところ有意な差はなく、死亡例の脳に浸潤したリンパ球の多くがTリンパ球であった。これらの結果から、中枢神経組織に侵入した狂犬病ウイルスの排除において、血清および脳脊髄液の中和抗体だけが重要ではなく、詳細は今後解明しなければなら

ないが、細胞性および液性免疫の両方がウイルス排除に参与していることが示唆された。

**街上毒ウイルス接種実験**: 接種ルートに関わらず、ウイルス接種後9~12日に一過性に摂餌・摂水量が減少したが、その4~5日後までには正常に復帰し、1羽も神経症状を表さなかった。組織学的には大脳に軽度の囲管性細胞浸潤が認められ、全例で末梢血および脳脊髄液の中和抗体価が顕著に上昇していた。街上毒狂犬病ウイルスは末梢神経を経由して中枢神経組織に到達するのが固定毒に比べて遅いことが知られているが、本実験では、街上毒ウイルスが脳に到達して脳炎を起こす前に強い免疫反応が起こり、ウイルスが中枢神経系から排除された結果、狂犬病発症に至らなかったと理解された。

**狂犬病ウイルス接種ウサギに発生した心筋壊死の発生メカニズム**: 固定毒ウイルスを接種した総計14羽中13羽のウサギに心筋壊死が認められた。心筋病変は左右心室壁に出現し、しばしば収縮帯壊死を伴っていた。心筋壊死の程度は脳病変の程度と比例し、麻酔薬の投与回数あるいは投与量と無関係であった。また、心筋にウイルス抗原は認められなかった。以上の所見から、この心筋病変は神経原性心筋症と診断された。

**結論**: 本研究により、暴露前あるいは暴露後ワクチン接種を受けた個体では、狂犬病発症早期に鞘内免疫を行えば、脳炎に起因する症状は残るものの、100%延命可能であることを示した。本研究成果は、狂犬病に罹患した人および動物を完治できる治療法開発に道を拓くものである。また、狂犬病発症例では心筋壊死を併発する事が報告されてきているが、その発生メカニズムは不明であった。心筋壊死は神経原性心筋症であり、狂犬病発症個体の治療に当たっては心筋症の併発に留意する必要があることが明らかになった。

#### 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5件)

1. Kesdangsakonwut S, Sunden Y, Aoshima K, Iwaki Y, Okumura M, Sawa H, Umemura T: Survival of rabid rabbits after intrathecal immunization. **Neuropathology**, 2014(in press) doi:10.1111/neup.12094 (査読有り)
2. Iwaki Y, Sakai Y, Ochiai K, Umemura T, Sunden Y: Enhancement of antibody production against rabies virus by uridine 5'-triphosphate in mice. **Microbes Infect** 2013 Dec. 2. Doi:pil: S1286-4579(13)00254-2. 10.1016/j.michinf. 2013.11.012 [Epub ahead of print](査読有り)
3. 梅村孝司: 鞘内免疫による狂犬病の治療。 **病理と臨床** 31: 319-325, 2013.(査読なし)
4. Lee HK, Sunden Y, Sakai Y, Ochiai K,

- Umemura T: CXCL12 improves immune responses to neurotropic virus propagation in the CNS by attracting antibody secreting cells. **Vet Immunol Microbiol**, 150: 19-26, 2012.(査読有り)
5. Aoshima K, Sunden Y, Ishida S, Ochiai K, Umemura T: Origin of CSF antibodies by intrathecal immunization and prophylactic effects against intracerebral rabies virus infection. **J Vet Med Sci**, 73: 1303-1308, 2011.(査読有り)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

梅村 孝司 (Umemura Takashi)  
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任教授  
研究者番号：00151936

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：