

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580414

研究課題名(和文)BDV感染による致死的なBD症状の責任病変を特定する

研究課題名(英文)Identification of lesions responsible for fatal outcome in rats infected with Borna disease virus

研究代表者

斑目 広郎 (HIROO, MADARAME)

麻布大学・大学病院・教授

研究者番号：20173768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ボルナ病ウイルス(BDV)高病原性株(CRNP5)、BDV標準株(CRP3)と遺伝子組み換えBDV(rBDV)9株を新生仔ラット脳内に接種し経過観察した。1.CRNP5の臨床徴候スコアが最も高く、4株のrBDVがCRP3と比較して高値を示した。2.4株のrBDVの体重増加は他のrBDVおよびCRP3と比較して低値を示した。3.全接種個体の脳が抗ウイルス抗体陽性で脳のウイルス力価は致死的なBDV個体が観察期間満了個体と比較して有意に高かった。4.病原性に関与している可能性のあるアミノ酸変異とその組み合わせが示された。5.髄膜脳炎がrBDV接種群のみに認められ、致死性BDV個体で高度だった。

研究成果の概要(英文)：Newborn rats were inoculated intracranially with CRNP5 variant of Borna disease virus (BDV) with severe pathogenesis, CRP3 BDV variant with mild pathogenesis, and nine recombinant BDV (rBDV) variants and examined for 8 weeks. 1. The CRNP5 had the highest score for incidence and severity of Borna disease (BD). Four groups of rBDV variants had a higher score than CRP3. 2. The body weight increase of four rBDV variants was lower than that of other rBDV variants and CRP3 from day 20 after inoculation. 3. All BDV inoculated brains were positive for anti BDV antibodies immunohistochemically. The virus titer for pup fatalities was significantly higher than that of pups on termination. 4. Four rBDV variants including L1(L1417R) mutation had higher scores for the severity of perivascular cuffing of mononuclear cells and L1(L1417R) may play an important role for the pathogenicity of BD. 5. Meningoencephalitis was observed only in rBDV variants. The pup fatalities had higher scores.

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：ボルナ病 ボルナウイルス 中枢神経系

1. 研究開始当初の背景

ボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) は、自然感染によりウマやヒツジに非化膿性脳脊髄炎をおこし、時に致死的な症状をひきおこすボルナ病 (BD) の原因ウイルスである。主として中枢神経系から検出される神経向性ウイルスであり、きわめて幅広い動物に感染可能であり、現在、20種類近い哺乳類や鳥類の自然感染が知られている。

一方、実験感染によるBDVの中枢神経系における病原性に関してはラットでの解析が最も良く行われてきているが、これまで実験に用いられてきたBDV標準株 (ラット順化株) は、新生仔ラットは感染しても免疫寛容により致死的な神経症状を示さずに持続感染が成立することから、BDは免疫応答依存性疾患と捉えられ、さらに、免疫不全状態にあるヌードラットではウイルスが感染しても症状を示さず、病変を形成しないとする過去の報告 (J. Gen. Virol. 66:503, 1985.) もあいまって、BDの発症は主に免疫応答依存的な中枢神経傷害で、BDVは神経細胞やグリア細胞を直接傷害し、発病させることはないと考えられてきた。

我々は、BDV高病原性株 (マウス順化株) が新生仔Lewisラットにも重篤な神経症状を発症することを明らかにし、BDVが免疫応答非依存的に直接中枢神経系を傷害し、BD発症に関与するという新しい概念を提示した (J. Virol., 76: 8650, 2002)。

さらに、その後の研究の進展から Lewis ラット以外の複数の新生仔ラット系統やヌードラットでも BDV 高病原性株は重篤な神経症状を発症させ、共通病変として、ウイルス接種後早期に非炎症性の脳外殻の菲薄化や、

それに伴う水頭症 (hydrocephalus ex vacuo) を引き起こすことを明らかにし、免疫応答非依存性の BDV による直接的な神経系傷害の結果としての、脳外殻の菲薄化による水頭症が、BD 発症の一端を担っている可能性を示唆した (未発表データ)。

しかし、脳外殻の菲薄化および水頭症は、BDV 高病原性株による致死的な発症を説明するための中枢神経系における責任病変としては十分ではない可能性が残る。

これまで BDV 高病原性株に特徴的な重篤な神経症状を発症させる中枢神経系病変に関しては、脳組織におけるウイルス抗原の分布に基づいて「BDV の脳幹部への早期の到達が関与している」とする有力な仮説が提示されている (J. Virol., 76: 8650, 2002) もの、いまだに決定的な証拠がない。

本研究では、BD 症状において両極に位置する、ラットに致死的な症状を発現させる BDV 高病原性株と致死的な症状を起こさない BDV 標準株に加えて、両ウイルス株間で相違のある、病原性に関与していると考えられる 4 個のアミノ酸について、アミノ酸の変異を組み合わせ (1 から 4 カ所) 導入した遺伝子組み換え BDV、9 株、の計 11 株を用いて、BDV の高病原性の変異株は免疫応答非依存的に直接中枢神経系を傷害し致死的な BD を発症させるという新しい概念に基づいて、BDV に感染しても免疫寛容を示す新生仔ラット等の免疫不全状態のラットに感染実験を行い致死的な BD 症状の責任病変を形態学的に特定しようとする先駆的研究である。

2. 研究の目的

病原性に関与していると考えられる 4 個のアミノ酸について、アミノ酸の変異を組み合わせ

せて（1 から 4 ヲ所）導入した遺伝子組み換え BDV、9 株、の計 11 株を用いて、BDV の高病原性の変異株は免疫応答非依存的に直接中枢神経系を傷害し致死的な BD を発症させるという新しい概念に基づいて、BDV に感染しても免疫寛容を示す新生仔ラット等の免疫不全状態のラットに感染実験を行い致死的な BD 症状の責任病変を形態学的に特定しようとする研究である。

3 . 研究の方法

(1) 供試ウイルス

本研究では、BDV2 株(CRNP5 および CRP3) と 4 ヲ所のアミノ酸変異を組み合わせて導入した遺伝子組み換え rBDV9 株（京都産業大学総合生物科学部西野佳以准教授より分与）を感染実験に用いた。本研究で用いたウイルスは以下の 11 株である（図 1）。

CRNP5 (NP5) , rBDV-G_{SH}+L_{RR} (G3+L3) ,
rBDV-G_{SH}+L_{1417R} (G3+L1) ,
rBDV-L_{RR} (L3) , rBDV-L_{1417R} (L1) ,
rBDV-G_{SH} (G3) , rBDV-G_{480S} (G2) ,
rBDV-G_{458S} (G1) , rBDV-L_{1686R} (L2) ,
rBDV-wt (wt) , CRP3 (P3)

G_{458S}:3608 番目のヌクレオチド T が C に変異することで、Ser が Phe にアミノ酸変異。

G_{480S}:3673 番目のヌクレオチド T が C に変異することで、His が Tyr にアミノ酸変異。

L_{1417R} : 7936 番目のヌクレオチド A が G に変異することで、Arg が Lys にアミノ酸変異。

L_{1686R} : 8742 番目のヌクレオチド G が A に変異することで、Arg が Gly にアミノ酸変異。

G_{SH} : G_{458S} および G_{480S} の両変異を有する。

L_{RR} : L_{1417R} および L_{1686R} の両変異を有する。

wt : 4 ヲ所の全てのアミノ酸変異を有さない。

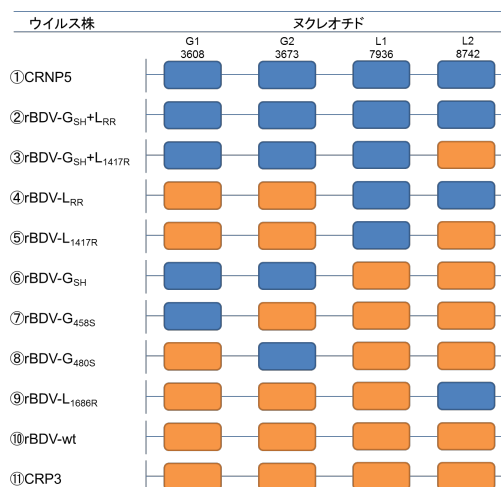


図 1 アミノ酸の変異を組み合わせた遺伝子組み換え BDV

尚、CRP3 株の 8742 番目のヌクレオチドは A と G が混合しており、現在の CRP3 株の A と G の割合は 88.9% : 11.1%である。ヌクレオチドが G の場合、同じ遺伝子を持つ組換えウイルスは rBDV-wt であり、A の場合 rBDV-L_{1686R} である。

(2) 供試動物

本研究には近交系 SPF/VAF ラット{系統 LEW/CrI CrI j(Lewis)}から得られた新生仔ラットを使用した。

(3) ウイルス接種

生後 24 時間以内の新生仔ラットに、前述の BDV あるいは rBDV を 2×10^3 FFU (20 μ l /匹)、脳内接種(左大脳皮質内)した。BDV 接種群の陰性コントロールとしては同量の健常 SJL マウス脳乳剤を、rBDV 接種群の陰性コントロールとしては同量の Vero 細胞を脳内接種した。

(4) ボルナ病の臨床徴候の評価と採材

臨床徴候の評価

観察期間を 8 週間に設定し、ウイルス接種新生仔 Lew ラットは接種後 4 日ごとに観察し、以下の基準に従い 0 から +3 までにランクを付け臨床症状を評価した。

0 : 無症状

+1 : 軽度神経症状(異常行動)

+2 : 明確な神経症状(四肢の運動異常、振顫、不全麻痺など)

+3：重篤な神経症状(四肢の部分麻痺あるいは全麻痺、痙攣の継続、不動など)・重度体重減少(計測期間中、最高体重の 4/5 以下まで減少)

採材

8 週間の観察期間終了時点で体重測定後、ラットを安楽殺し、剖検を実施した。尚、臨床徴候評価でスコア +3 と判定された個体(致死性 BD 発症個体)について判定日翌日に剖検、脳を採材した。

(5) 標本作成、免疫組織化学染色とウイルス力価測定

剖検時に脳を折半し、右脳については常法に従ってブアン固定を行い大脳と小脳を含む縦断切片を作成した。抗 BVD 抗体(抗 p24 抗体マウスモノクローナル抗体(HP062)、抗 p40 抗体マウスモノクローナル抗体(HN123)) (いずれも、大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野生田和良博士より分与)、アストログリア、ミクログリアおよびマクロファージ、T リンパ球、B リンパ球に対する免疫染色を行った。左脳についてはウイルス力価測定を行った。

(6) 計量解析

髄膜脳炎の評価

髄膜脳炎を評価するため血管周囲性単核細胞浸潤を以下に示す 0 から 4+ に分け、脳を 9 部位(1.大脳皮質、2.大脳髄質、3.海馬、4.脳梁、5.小脳、6.間脳、7.中脳、8.橋、9.延髄)に区分して評価した。各部位のスコアを合計し、合計値を各個体のスコアとした。

0：正常

1+：血管周囲に 1~2 層の単核細胞浸潤、限局性。

2+：血管周囲に 1~2 層の単核細胞浸潤、広範囲。

3+：血管周囲に 3 層以上の単核細胞浸潤、限局性。

4+：血管周囲に 3 層以上の単核細胞浸潤、広範囲。

4. 研究成果

(1) 臨床徴候

NP5 の平均臨床症状スコアが各観察日において最も高かった。4 種の rBDV(G3+L3、G3+L1、L3、L1) が P3 に比較して多くの観察日で有意に高い平均スコアを示した。有意差がない場合でも高値傾向を示した。

(2) 体重増加

4 種の rBDV(G3+L3、G3+L1、L3、L1) の体重増加は他の rBDV および CRP3 に比較して、接種 20 日目以降、有意な低値あるいは低値傾向を示した。

(3) 抗ウイルス抗体免疫染色と脳のウイルス力価測定

2 種類の抗ウイルス抗体(抗 p24 抗体と抗 p40 抗体)を用いて免疫染色を行い、全接種個体の脳で陽性所見が得られた。陽性所見の程度については脳の部位間に差異は認められなかった。致死性 BD を発症し観察途中で採材した個体がウイルス力価は観察期間を満了した個体と比較して有意に高かった(図 2)。観察期間満了時点の比較では L1 のウイルス力価が最高値を示し、他のウイルスに対して有意に高かった。また、G3+L1 および L3 の力価は高値を示す傾向があり、G3+L3 の力価は低値傾向を示した。

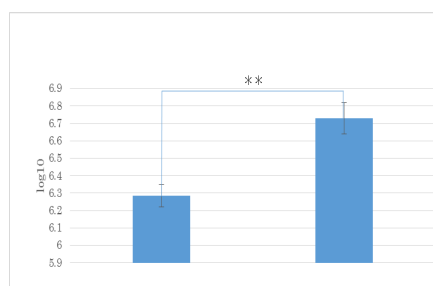


図2 生存個体と致死性 BD 発症個体のウイルス力価 **危険率 1%

(4) 髄膜脳炎の評価

髄膜脳炎スコアは G3+L3、G3+L1、L3 で他の rBDV と比較して有意に高く、L1 は高い傾向を示した(図 3)。致死性 BD を発症した個

体でスコアが高い傾向が示された(図4)。脳の部位間のスコアに有意差はなかった。NP5群とP3群では髄膜脳炎は認められなかった(スコア0)。致死的症状の責任病変部位を特定できなかった。

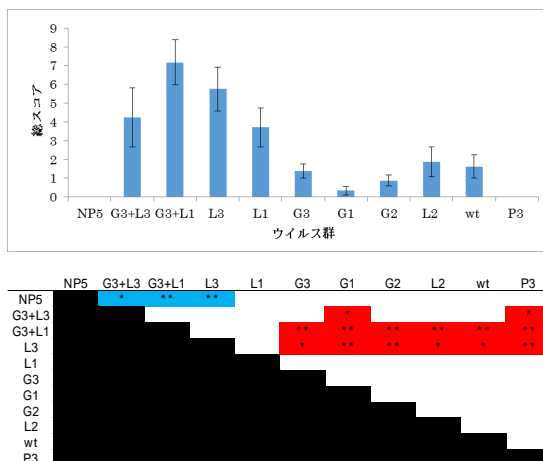


図3 髄膜脳炎スコア

*危険率 5% **危険率 1%

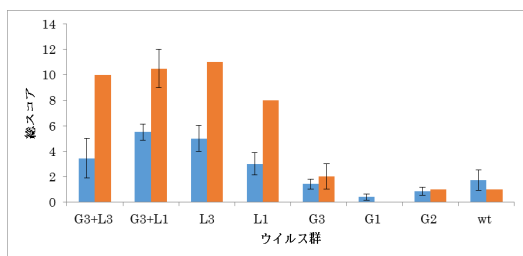


図4 生存個体と致死BD個体の髄膜脳炎スコア

(5) 病原性に関するアミノ酸変異

臨床徴候と病理学的変化はNP5と4種のrBDV(G3+L3、G3+L1、L3、L1)が高度で、NP5の持つ高病原性に関わる遺伝子はL1(L_{1417R})の変異あるいはその組み合わせである可能性が示唆された。しかし、髄膜脳炎はNP5には存在せず、P3と比較して高度なNP5の病原性を4カ所の遺伝子のみでは説明できなかった。

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 1 件)

M. Mwase, C. Mumba, D. Square, S. Kwarai and H. Madarame Cutaneous Squamous Cell Carcinoma presenting as a Wound with Discharging Sinus Tracts in a Wild African Lion (*Panthera leo*). 査読あり 149,

520-523.

[学会発表](計 2 件)

Y. Nishino 他 Neurovirulence of Borna disease virus in infected nude rats International Union of Microbiological Societies Congress (IUMS) 2011, 2011.9.13 Sapporo,

内田裕子他 不活性型 Smad3 発現マウスにおけるボルナ病ウイルス感染病態の解析 第152回日本獣医学会 2011年9月20日 大阪府立大学

[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

斑目広郎 (MADARAME Hiroo)

麻布大学・附属動物病院・教授

研究者番号: 20173768

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

西野佳以 (NISHINO yoshii)

京都産業大学・総合生物科学部・准教授

研究者番号: 00271544