

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780306

研究課題名（和文） 抗ウイルス抗体産生細胞の脳内誘導に関する研究

研究課題名（英文） Experimental study on induction of anti-virus antibody producing cells into the brain

研究代表者

寸田 祐嗣（SUNDEN YUJI）

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：20451403

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、狂犬病や仮性狂犬病などの神経親和性ウイルス感染症に対する予防・治療法を開発することを目的とした基礎研究であり、主に実験動物を用いて、血液中の抗ウイルス抗体産生細胞を中枢神経系へ誘導することを試みた。その結果、抗ウイルス抗体産生細胞の脳内誘導にはケモカイン CXCL12 が関与すること、さらに比較的増殖速度の遅い狂犬病ウイルスの脳内増殖阻止に有効であることをマウスを使った実験により証明した。

研究成果の概要（英文）：The objective of the present study is to establish an effective prophylactic/therapeutic measure against neurotropic virus infections, rabies and/or pseudorabies. By using experimental animals, an induction of anti-virus antibody producing cells from peripheral tissues into central nervous system (CNS) was tested. It is demonstrated that an induction of antibody-secreting cells into the CNS is partly mediated by chemokine CXCL12 expression. Further, the induction of anti-virus antibodies into CNS is effective for inhibition of virus propagation, especially for rabies virus, in mice experiment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：病理学・抗体・ウイルス・中枢神経系・神経細胞・ケモカイン・人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

狂犬病や仮性狂犬病等の神経親和性ウイルス感染症は難治性の疾患であり、特に狂犬病は現在もなお発展途上国を中心に年間5万人以上（WHOの統計による）が犠牲となっている人獣共通感染症である。狂犬病は適切なワクチン接種（予防接種）によって予防できる疾患ではあるものの、品質の良いワクチンを大量生産することは難しく、特に発展途上国内においては十分に供給できない現状がある。さらに、ひとたび神経症状を発症すると治療法がなく、ほぼ100%死亡するという恐ろしい疾患である。狂犬病のように、人や

動物の脳内でウイルスが増殖する感染症の制圧を困難にしている原因のひとつが、血液脳関門の存在である。この特殊なバリアーによって血液中や末梢リンパ装置に存在する抗ウイルス因子や免疫細胞の脳内への誘導が制限されるからである。過去の研究によって、鞘内（脳実質内、髄腔内）に不活化ウイルスを投与することによって、脳脊髄液中の抗体価が上昇すること、抗ウイルス抗体産生細胞が中枢神経系内に誘導されることがマウスとウサギを使った研究によって明らかになっている。しかしながら、その詳細な機序は不明であった。

2. 研究の目的

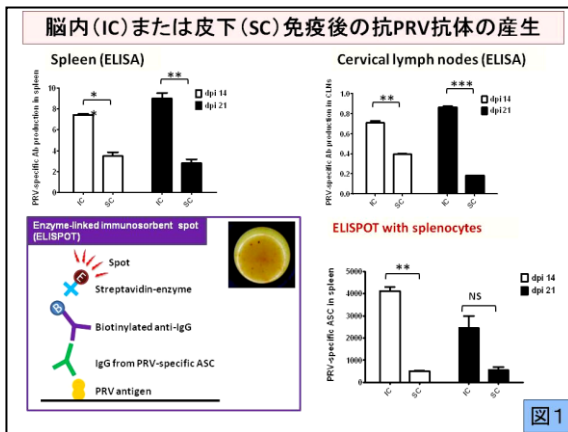
ウイルス排除に有効な免疫細胞、特に抗ウイルス抗体産生細胞を脳内に誘導する機序を明らかにすること、またその有効性（脳内のウイルスを排除する効果）を動物実験によって検証することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの脳内に不活化ウイルスを投与した後の、血液中および各種リンパ節での抗ウイルス抗体の産生を ELISA, ELISPOT 法により調べた。また、脳内でどのようなサイトカインやケモカインが発現しているかについて定量的 RT-PCR 法により検索した。続いて、発現上昇が認められたケモカインに対する抗体産生細胞の走化性について、膜チャンバーを用いた *in vitro* 試験と、免疫マウスの脳内へ接種する実験 (*in vivo* 試験) により評価した。さらに、末梢免疫マウスの脳内に生ウイルスを接種して、ケモカイン投与による発症予防効果を調べた。

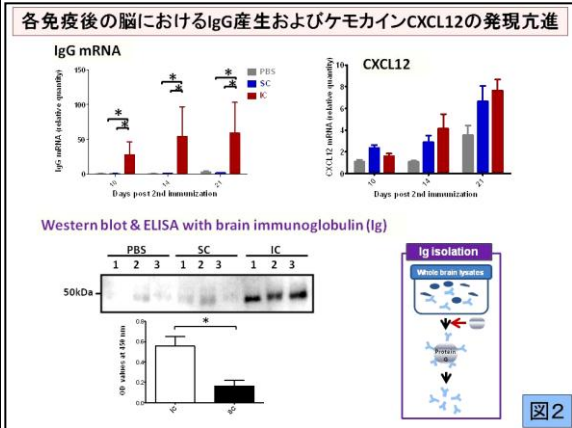
4. 研究成果

マウスに不活化ウイルスを脳内投与 (IC) することによって、脾臓 (spleen) と頸部リンパ節 (cervical lymph nodes) における抗体産生が、皮下投与マウス (SC) に比較して有意に上昇することが明らかとなった (図 1)。不活化ウイルスは PRV (仮性狂犬病ウイルス) を用いた。

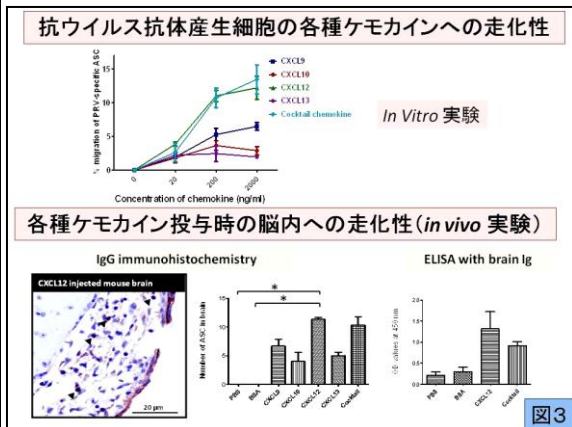


また脳内投与マウスの脳では免疫グロブリン IgG の遺伝子発現が免疫後 10 日目からコントロールマウスに比べて有意に上昇していた。また、脳抽出物から得られた免疫グロブリン中には抗ウイルス抗体が含まれることが判明した。各種ケモカインの遺伝子発現を定量した所、CXCL9, 10, 11, 12, 13, BAFF の発現上昇が観察された (図 2)。

次に、免疫マウスから分離した抗体産生細胞を用いて、各種ケモカインへの走化性を調べたところ、CXCL12 およびカクテル・ケモカ



イン (各種ケモカインの混合物) に対する強い走化性が観察された。さらに、末梢免疫マウスにこれらケモカインを脳内投与することによって、抗体産生細胞の脳内誘導が起こることを免疫染色と脳抽出物を用いた ELISA によって明らかにした。すなわち、*in vitro* の実験結果と同様に、CXCL12 およびカクテル・ケモカインに対して、強い走化性を示すことが判明した (図 3)。



さらに、十分に免疫したマウスを用意して、仮性狂犬病ウイルス (PRV) または狂犬病ウイルス (RV) をそれぞれマウス脳内へ接種した所、CXCL12 またはカクテル・ケモカインの投与によって RV 接種後の生存率が有意に上昇した (図 4)。一方、PRV 接種実験ではその効果が観察されなかった。

以上の成績から、血液中やリンパ装置等の末梢組織に存在する抗ウイルス抗体産生細胞を中枢神経系に誘導するための因子として、CXCL12 が機能することが実験的に示された。免疫染色の結果、抗体産生細胞の多くは脳髄膜に存在しており、これらの細胞から脳脊髄液中へ抗ウイルス抗体が供給されると推察された。

PRV 接種時にケモカイン投与による生存率の変化が認められなかった原因としては、ウイルスの増殖速度に関連があると推察され

た。すなわち、PRV は非常に増殖速度の早いウイルスであり、ウイルス接種後わずか2~4日でマウスを殺すのに対して、RV の増殖は比較的緩やかであり、ウイルス接種後7~10日かけて致死的なウイルス増殖が引き起こされた(図4)。RV 接種マウスではこの期間内に、ケモカインによる抗ウイルス抗体産生細胞の誘導が起り、脳内でのウイルス増殖・拡散が効果的に抑制された結果、マウスが生存したと推察した。

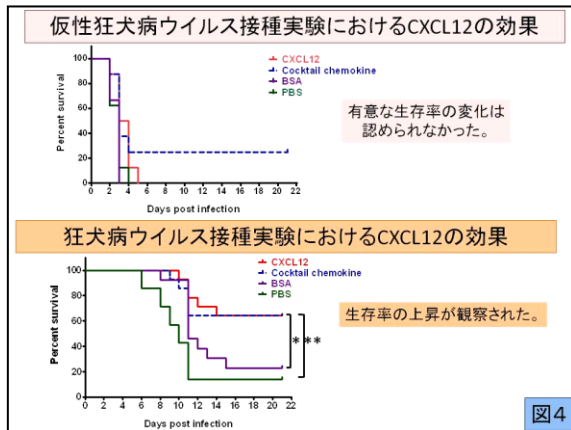


図4

さらに、生残したマウスの脳からはウイルス抗原が検出されなかった。そのため、既にウイルスに感染した神経細胞からもウイルスが排除されることが示唆された。これは、ウイルス感染神経細胞に表出したウイルスの外殻タンパク質に対して抗体が結合し、子孫ウイルスの出芽を抑制した結果、細胞内に蓄積したウイルスが消化されたのではないかと推察された。

本実験で用いた狂犬病ウイルス CVS 株は、固定毒株ではあるものの、狂犬病ウイルスの中では比較的増殖が速く、神経細胞への傷害や免疫細胞への毒性が強いという特徴が報告されている。一方、実際にフィールドに存在する狂犬病ウイルス野外毒株は、固定毒 CVS 株もさらに増殖速度が遅く、神経細胞に対する傷害(形態学的変化の誘導)が軽度である。よって、野外株を用いて同様の実験を行なった場合には、より明確なケモカインの効果が現れる可能性が考えられた。

以上のように、本研究成果は、狂犬病の治療法を確立する上で非常に有意義な基礎的情報を提供したと考えられる。これら研究成果を国際学術誌上で発表し、さらに国内外の学術集会において研究成果とその意義を発信した。

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2件)

- (1) Lee H, Sunden Y, Sakai Y, Ochiai K, Umemura T. CXCL12 improves immune responses to neurotropic virus propagation in the CNS by attracting antibody secreting cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 150: 19-26, 2012. 査読有.
- (2) Lee H, Sunden Y, Ochiai K, Umemura T. Experimental intracerebral vaccination protects mouse from a neurotropic virus by attracting antibody secreting cells to the CNS. *Immunology Letters*, 139: 102-109, 2011. 査読有.

[学会発表] (計7件)

- (1) 中嶋七瀬、抗体による狂犬病ウイルス感染細胞からのウイルス排除効果、第155回日本獣医学会学術集会、2013年3月30日、東京大学駒場キャンパス、東京都目黒区
- (2) 岩木芳美、マウスを用いたウリジン三リン酸(UTP)の抗狂犬病ウイルス抗体産生増強効果、第155回日本獣医学会学術集会、2013年3月30日、東京大学駒場キャンパス、東京都目黒区
- (3) H Lee, Chemokines improve anti-neurotropic virus immune response by attracting antibody secreting cells to the CNS, The 62nd Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and the 46th Annual Meeting of the American Society of Veterinary Clinical Pathology, Dec 4, 2011, Nashville, Tennessee, Nashville Convention Center, USA
- (4) 李賢敬, Chemokine improved anti-neurotropic virus immune response by attracting antibody secreting cells to the CNS, 第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月20日、大阪府立大学、大阪府堺市
- (5) H Lee, Chemokine improved anti-neurotropic virus immune response by attracting antibody secreting cells to the CNS, The 3rd International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sep 17, 2011, Hokkaido University, Sapporo, Japan
- (6) Y Sunden, Possible origin of CSF antibodies induced by intrathecal immunization and apply to rabies control in experimental animals, The 3rd International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sep 17, 2011, Hokkaido University, Sapporo,

Japan

- (7) Y Sunden, Origin of CSF antibodies induced by intrathecal immunization and apply to rabies control in experimental animals, 29th meeting of the European society of veterinary pathology & The European college of veterinary pathologist, Sep 9, 2011, Ultuna campus of Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寸田 祐嗣 (SUNDEN YUJI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：20451403