

街上毒狂犬病ウイルス(1088株)に感染したマウスの  
中枢神経系に関する病理組織学的研究

君付 和範

平成 29 年度

Histopathological Study on Central Nervous System in Mice  
Infected with Street Rabies Virus (1088 Strain)

Kazunori KIMITSUKI

2017





## 目次

|  |        |
|--|--------|
| 序論 .....   | - 1 -  |
| 参考文献 .....   | - 5 -  |
| 第 I 章 街上毒（1088 株）を末梢感染させたマウスの<br>中枢神経系に関する病理組織学的研究 ..... | - 13 - |
| 緒言 .....   | - 13 - |
| 材料方法 .....   | - 15 - |
| 1. ウイルス、動物、接種経路 .....                                    | - 15 - |
| 2. 解剖および病理組織学的検索 .....                                   | - 15 - |
| 3. 免疫組織化学的検索 .....                                       | - 16 - |
| 4. TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の検出 .....                          | - 19 - |
| 5. 超微形態学的検索 .....  | - 20 - |
| 6. 血中中和抗体価（VNA） .....                                    | - 20 - |
| 結果 .....   | - 21 - |
| 1. 臨床症状およびウイルス中和抗体値（VNA） .....                           | - 21 - |
| 2. 病理組織学的検索（Figs.1-10） .....                             | - 21 - |
| 3. 免疫組織化学的検索（Figs.11-33） .....                           | - 22 - |
| 4. TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出 .....                           | - 24 - |
| 5. 超微形態学的検索（Fig.34） .....                                | - 24 - |
| 考察 .....   | - 25 - |
| 小括 .....   | - 28 - |
| 参考文献 .....   | - 29 - |
| 付図および付図説明 .....  | - 35 - |

|                                      |                               |        |
|--------------------------------------|-------------------------------|--------|
| 第Ⅱ章                                  | 街上毒（1088株）および継代株（1088-N30株）感染 |        |
|                                      | マウスにおける中枢神経系病変に関する比較病理学的研究    | - 40 - |
| 緒言                                   |                               | - 40 - |
| 材料方法                                 |                               | - 42 - |
| 1. ウイルス、動物、接種経路                      |                               | - 42 - |
| 2. 解剖および病理組織学的検索                     |                               | - 42 - |
| 3. 免疫組織化学的検索                         |                               | - 43 - |
| 4. TUNEL法を用いたアポトーシス細胞の検出             |                               | - 46 - |
| 5. 血中中和抗体価（VNA）                      |                               | - 47 - |
| 結果                                   |                               | - 48 - |
| 1. 臨床症状およびウイルス中和抗体値（VNA）             |                               | - 48 - |
| 2. 病理組織学的検索（Figs.1-10）               |                               | - 48 - |
| 3. 免疫組織化学的検索（Figs.11-34）             |                               | - 49 - |
| 4. TUNEL法を用いたアポトーシス細胞の検出（Figs.35-38） |                               | - 52 - |
| 考察                                   |                               | - 53 - |
| 小括                                   |                               | - 55 - |
| 参考文献                                 |                               | - 57 - |
| 付図および付図説明                            |                               | - 60 - |

|      |                            |        |
|------|----------------------------|--------|
| 第Ⅲ章  | 街上毒（1088株）感染 BALB/c マウスおよび |        |
|      | スードマウスの中枢神経系に関する比較病理組織学的研究 | - 64 - |
| 緒言   |                            | - 64 - |
| 材料方法 |                            | - 66 - |

|   |      |
|---|------|
| 1. ウイルス、動物、接種経路 .....                         | 66 - |
| 2. 解剖および病理組織学的検索 .....                        | 66 - |
| 3. 免疫組織化学的検索 .....                            | 67 - |
| 4. TUNEL法を用いたアポトーシス細胞の検出 .....                | 69 - |
| 5. 血中中和抗体価（VNA） .....                         | 70 - |
| 結果 .....                                      | 72 - |
| 1. 臨床症状およびウイルス中和抗体価（VNA） .....                | 72 - |
| 2. 病理組織学的検索（Figs.1-11） .....                  | 72 - |
| 3. 免疫組織化学的検索（Figs.12-32） .....                | 73 - |
| 4. TUNEL法を用いたアポトーシス細胞の検出（Figs.33,34）<br>..... | 76 - |
| 考察 .....                                      | 77 - |
| 小括 .....                                      | 79 - |
| 参考文献 .....                                    | 80 - |
| 付図および付図説明 .....                               | 83 - |

|  |      |
|--|------|
| 第IV章 1088-N4#14株感染後に耐過したマウスの麻痺症状に<br>関する組織病理学的研究 ..... | 88 - |
| 緒言 .....   | 88 - |
| 材料方法 .....   | 90 - |
| 1. ウイルス、動物、接種経路 .....                                  | 90 - |
| 2. 解剖および病理組織学的検索 .....                                 | 90 - |
| 3. 免疫組織化学的検索 .....                                     | 91 - |
| 4. 血中中和抗体価（VNA） .....                                  | 96 - |
| 結果 .....   | 98 - |

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| 1. 臨床症状およびウイルス中和抗体値 (VNA) ..... | - 98 -  |
| 2. 病理組織学的検索 (Figs.1-18) .....   | - 98 -  |
| 3. 免疫組織化学的検索 (Figs.19-34) ..... | - 99 -  |
| 考察 .....                        | - 103 - |
| 小括 .....                        | - 106 - |
| 参考文献 .....                      | - 107 - |
| 付図および付図説明 .....                 | - 111 - |
| 総括 .....                        | - 115 - |
| 謝辞 .....                        | - 119 - |

## 序 論

狂犬病は狂犬病ウイルスに起因する人獣共通感染症である[9,23]。未だ治療法はなく、ひとたび発症すると全ての哺乳類が麻痺型あるいは狂躁型の神経症状を示し、ほぼ 100%の確率で死亡する[9]。World Health Organization (WHO)によると、狂犬病による死者は毎年約 55,000 人であり、このうち 95%がアジアとアフリカの人々であると報告されている[16]。日本では 1956 年以降、イヌや家畜、人の感染例はないが、1970 年と 2006 年に、ネパール[37]とフィリピン[33]で感染し、帰国後に発症し死亡した例が報告されている。また、2013 年 7 月、これまで狂犬病の清浄国であった台湾において、野生イタチアナグマから狂犬病ウイルス感染が報告されている[11]。日本においても、狂犬病の再流行は脅威であり、狂犬病の予防対策と発生時を想定した対応策の強化が重要と思われる。

原因となる病原体は、ラブドウイルス科リッサウイルス属に属する狂犬病ウイルスである。ゲノム RNA はマイナス 1 本鎖から成る非分節 RNA である。これらのゲノム上には 5 つの構造蛋白質がコードされており、エンベロープは表面上の Glycoprotein (G 蛋白)、内側にある Matrixprotein(M 蛋白)により構成され、らせん状を呈したヌクレオカプシド (NC) は約 12,000 塩基からなるゲノム RNA を包み込む Nucleoprotein (N 蛋白)、Phosphoprotein (P 蛋白) および Largeprotein (L 蛋白) により構成される[15,30]。中でも G 蛋白は、ウイルス中和抗体の誘導やウイルスが細胞内に侵入、膜融合、出芽の際に重要な役割を果たす[5]。

感染は主に感染犬の咬傷により成立し、ウイルスが感染部の末梢神経を上行し中枢神経系(Central Nervous System、以下 CNS)に到達し、感染動物に致死的な脳脊髄炎を引き起こす[13]。しかしながら、その組織変化は概して乏しく、これら狂犬病患者にみられる臨床症状や死を規定する要因については未だ解明されていない。これらについては実験感染より得られた結果から様々な憶測がされてきたが、狂犬病ウイルスが感染動物の体内においてもたらす病原性は明らかにされていない。その理由の一つに、狂犬病ウイルスは感染動物あるいはウイルス株などにより病原性が異なることが挙げられる。

狂犬病ウイルスは大きく街上毒と固定毒に大別される。前者は自然感染動物から分離されたウイルスで、後者は街上株をウサギやマウスなどの CNS で長期連続継代することで潜伏期間の短縮と一定化、末梢組織への親和性の低下およびネグリ小体の出現頻度の低下など、その性状が変化したウイルスである[13]。固定毒は街上毒に比べヒトに対する感染リスクが低く、街上毒に類似した神経病原性を示す。そのため、これまでに多くの研究で用いられており、狂犬病の病原性について様々な知見が得られている[17,18,27,29,32]。しかし、固定毒の病原性は街上毒の病原性を直接的に反映するものではない。一般的に末梢組織への親和性が弱く、炎症反応を強く誘起するなど、自然発生例とは病原性が大きく異なる。そのため、狂犬病の病理発生機序を解明するためには街上毒を用いた実験病理学的アプローチが必須である。

狂犬病はウイルス株、感染動物、接種部位によって異なる病理変化を示すため[25,34]、自然感染を想定した場合、末梢組織感染

モデルを用いた病原性の解析が必要である。ウイルスは咬傷部位から体内に侵入し、その後軸索を利用して逆行性に CNS に到達するとされているが、ウイルスの CNS への移動経路については、骨格筋で複製されたウイルスが末梢の知覚神経または神経筋接合部の運動軸索末を介して求心性に侵入するか[6,19,26]、または、骨格筋を利用せず直接神経線維の軸索を介して侵入するか[4,20,31]については明らかにされていない。

狂犬病ウイルスは CNS に到達後、神経細胞の細胞質で爆発的に増殖する。ウイルスの著しい増殖が組織傷害や、神経組織の機能不全を誘起すると考えられている[13]。ウイルス性脳炎から生還するためには免疫反応によるウイルスの排除が重要である[7]。狂犬病ウイルス感染においてもウイルス感染に対する免疫反応がウイルスの排除に重要である示唆されている。実験的に、固定毒や弱毒株では感染動物に著しい免疫反応と神経細胞の変性を強く誘導するため、自然感染や街上毒では、炎症反応や神経細胞の破壊はほとんど認められない[24]。また、CNS に浸潤したリンパ球はアポトーシスによって死滅することが報告されている[14]。このように狂犬病の発現には、免疫反応が深く関与していることが示唆される。

近年、狂犬病患者の中に発病後に四肢不全麻痺を主体とした後遺症を残して生残する事例が報告されている[1-3,8,12,21,22,28,35]。そのうちの一人は狂犬病の暴露後免疫を受けずに生還している[35]。何故、生き残ることが可能であったかについてはこれまで明らかにされていない。ウイルス株、暴露量、咬傷部位、そして免疫療法などの関連性が指摘されているが、耐



過した全ての患者の脳脊髄液中には高いウイルス中和抗体が認められる。このことから免疫反応によるウイルス排除が生還と後遺症に關与している可能性が示唆される。

今回著者は 1970 年代に北米のウッドチャック由来の街上毒 (1088 株) とその継代株を用いて感染実験を実施した。1088 株は、アメリカの疾病予防管理センター (Centers for Disease Control and Prevention、CDC) で分離されたウイルスである。このウイルス株はマウスへの神経親和性が強く、死亡率も高いが、本ウイルスの病理発生機序については十分に検討されていない [10,36]。そこで本研究では、1088 株の病理発生機序を明らかにすることを研究目的とした。本論文は全 4 章で構成されている。第 I 章では、1088 株の末梢組織から脳への感染経路とその後の CNS における組織病変を明らかにした。第 II 章では、強毒株 1088 (N0) と弱毒株 1088-N30 (N30) の病理発生機序の違いについて比較検討した。第 III 章では、T リンパ球欠損がウイルスの増殖と組織病変に及ぼす影響を明らかにするため、免疫正常マウスと免疫不全マウスにおける組織病変について比較検討した。第 IV 章では、狂犬病発病後の生残例にみられる後遺症の原因を解明する目的で、マウスの実験モデルを作製し、耐過マウスの組織病変を精査した。

以下に各章の実験成績について記述する。本研究により得られた新たな知見は街上毒狂犬病の病理発生機序の解明に直結するものと考ええる。

## 序論 参考文献

1. Alvarez, L., Fajardo, R., Lopez, E., Pedroza, R., Hemachudha, T., Kamolvarin, N., Cortes, G. and Baer, G. M. 1994. Partial recovery from rabies in a nine-year-old boy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **13**: 1154–1155.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2012. Recovery of a patient from clinical rabies - California, 2011. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **61**: 61–65.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2010. Presumptive abortive human rabies - Texas, 2009. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **59**: 185–190.
4. Coulon, P., Derbin, C., Kucera, P., Lafay, F., Prehaud, C. and Flamand, A. 1989. Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. *J. Virol.* **63**: 3550–3554.
5. Dietzschold, B., Li, J., Faber, M. and Schnell, M. 2008. Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol.* **3**: 481–490.
6. Dietzschold, B., Wiktor, T. J., Trojanowski, J. Q., Macfarlan, R. I., Wunner, W. H., Torres-Anjel, M. J. and Koprowski, H.

1985. Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. *J. Virol.* **56**: 12–18.
7. Griffin, D. E. 2010. Recovery from viral encephalomyelitis: immune-mediated noncytolytic virus clearance from neurons. *Immunol. Res.* **47**: 123–133.
  8. Hattwick, M. A., Weis, T. T., Stechschulte, C. J., Baer, G. M. and Gregg, M. B. 1972. Recovery from rabies. A case report. *Ann. Intern. Med.* **76**: 931–942.
  9. Hemachudha, T., Ugolini, G., Wacharapluesadee, S., Sungkarat, W., Shuangshoti, S. and Laothamatas, J. 2013. Human rabies: Neuropathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Neurol.* **12**: 498–513.
  10. Hirai, K., Kawano, H., Mifune, K., Fujii, H., Nishizono, A., Shichijo, A. and Mannen, K. 1992. Suppression of cell-mediated immunity by street rabies virus infection. *Microbiol. Immunol.* **36**: 1277–1290.
  11. Huang, A. S., Chen, W. C., Huang, W. T., Huang, S. T., Lo, Y. C., Wei, S. H., Kuo, H. W., Chan, P. C., Hung, M. N., Liu, Y. L., Mu, J. J., Yang, J. Y., Liu, D. P., Chou, J. H., Chuang,

- J. H. and Chang, F. Y. 2015. Public health responses to reemergence of animal rabies, Taiwan, July 16–December 28, 2013. *PLOS ONE* **10**: e0132160.
12. Jackson, A. C. 2014. Recovery from rabies: a call to arms. *J. Neurol. Sci.* **339**: 5–7.
13. Jackson, A. C. 2013. Pathogenesis. pp. 299–349. *In*: Rabies. 3rd ed. (Jackson, A. C. and Fu, Z. F. eds.), Academic Press, Oxford.
14. Jackson, A. C. 2011. Evasive strategies in rabies. pp. 33–53. *In*: Advances in virus research. (Lafon, M. ed.), Academic Press, Burlington.
15. Jackson, A. C. 2013. Rabies virus. pp. 17–60. *In*: Rabies. 3rd ed. (Wunner, W. H. and Conzelmann, K. K. eds.), Academic Press, Oxford.
16. Knobel, D. L., Cleaveland, S., Coleman, P. G., Fèvre, E. M., Meltzer, M. I., Miranda, M. E. G., Shaw, A., Zinsstag, J. and Meslin, F. X. 2005. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull. World Health Organ.* **83**: 360–368.
17. Kojima, D., Park, C. H., Satoh, Y., Inoue, S., Noguchi, A.

- and Oyamada, T. 2009. Pathology of the spinal cord of C57BL/6J mice infected with rabies virus (CVS-11 strain). *J. Vet. Med. Sci.* **71**: 319–324.
18. Kojima, D., Park, C. H., Tsujikawa, S., Kohara, K., Hatai, H., Oyamada, T., Noguchi, A. and Inoue, S. 2010. Lesions of the central nervous system induced by intracerebral inoculation of BALB/c mice with rabies virus (CVS-11). *J. Vet. Med. Sci.* **72**: 1011–1016.
19. Lewis, P., Fu, Y. and Lentz, T. L. 2000. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. *Muscle Nerve* **23**: 720–730.
20. Lycke, E. and Tsiang, H. 1987. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. *J. Virol.* **61**: 2733–2741.
21. Madhusudana, S. N., Nagaraj, D., Uday, M., Ratnavalli, E. and Kumar, M. V. 2002. Partial recovery from rabies in a six-year-old girl. *Int. J. Infect. Dis.* **6**: 85–86.
22. Manoj, S., Mukherjee, A., Johri, S. and Kumar, K. V. 2016. Recovery from rabies, a universally fatal disease. *Mil. Med. Res.* **3**: 21.

23. Mitrabhakdi, E., Shuangshoti, S., Wannakrairot, P., Lewis, R. A., Susuki, K., Laothamatas, J. and Hemachudha, T. 2005. Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. *J. Neurol. Sci.* **238**: 3–10.
24. Miyamoto, K. and Matsumoto, S. 1967. Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J. Exp. Med.* **125**: 447–456.
25. Morimoto, K., Hooper, D. C., Spitsin, S., Koprowski, H. and Dietzschold, B. 1999. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J. Virol.* **73**: 510–518.
26. Murphy, F. A., Harrison, A. K., Winn, W. C. and Bauer, S. P. 1973. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses: infection of the central nervous system and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. *Lab. Invest.* **29**: 1–16.
27. Park, C. H., Kondo, M., Inoue, S., Noguchi, A., Oyamada, T., Yoshikawa, H. and Yamada, A. 2006. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old

- C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. *J. Vet. Med. Sci.* **68**: 589–595.
28. Porras, C., Barboza, J. J., Fuenzalida, E., Adaros, H. L., Oviedo, A. M. and Furst, J. 1976. Recovery from rabies in man. *Ann. Intern. Med.* **85**: 44–48.
29. Rossiter, J. P., Hsu, L. and Jackson, A. C. 2009. Selective vulnerability of dorsal root ganglia neurons in experimental rabies after peripheral inoculation of CVS-11 in adult mice. *Acta Neuropathol.* **118**: 249–259.
30. Schnell, M. J., McGettigan, J. P., Wirblich, C. and Papaneri, A. 2009. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 51–61.
31. Shankar, V., Dietzschold, B. and Koprowski, H. 1991. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. *J. Virol.* **65**: 2736–2738.
32. Theerasurakarn, S. and Ubol, S. 1998. Apoptosis induction in brain during the fixed strain of rabies virus infection correlates with onset and severity of illness. *J. Neurovirol.* **4**: 407–414.

33. Tobiume, M., Sato, Y., Katano, H., Nakajima, N., Tanaka, K., Noguchi, A., Inoue, S., Hasegawa, H., Iwasa, Y., Tanaka, J., Hayashi, H., Yoshida, S., Kurane, I. and Sata, T. 2009. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: Immunohistochemistry: *Pathol. Int.* **59**: 555–566.
34. Wang, Z. W., Sarmiento, L., Wang, Y., Li, X., Dhingra, V., Tseggai, T., Jiang, B. and Fu, Z. F. 2005. Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system. *J. Virol.* **79**: 12554–12565.
35. Willoughby, R. E., Tieves, K. S., Hoffman, G. M., Ghanayem, N. S., Amlie-Lefond, C. M., Schwabe, M. J., Chusid, M. J. and Rupprecht, C. E. 2005. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* **352**: 2508–2514.
36. Yamada, K., Park, C. H., Noguchi, K., Kojima, D., Kubo, T., Komiya, N., Matsumoto, T., Mitui, M. T., Ahmed, K., Morimoto, K., Inoue, S. and Nishizono, A. 2012. Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma



cells resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res.* **165**: 34–45.

37. Yamamoto, S., Iwasaki, C., Oono, H., Ninomiya, K. and Matsumura, T. 2008. The first imported case of rabies into Japan in 36 years: a forgotten life-threatening disease. *J. Travel Med.* **15**: 372–374.

## 第 I 章 街上毒（1088 株）を末梢感染させたマウスの

### 中枢神経系に関する病理組織学的研究

#### 緒言

狂犬病ウイルスは咬傷により体内に侵入し、末梢神経を介して中枢神経系（CNS）に達する。しかし、骨格筋で複製されたウイルスが末梢の知覚神経または神経筋接合部の運動軸索を介して求心性に CNS に侵入するか[6,13,17]、または、骨格筋を利用せず直接神経線維の軸索を介して CNS に侵入するか[5,14,22]については未だ明らかにされていない。

狂犬病ウイルスの病原性は、ウイルス株、接種経路、供試動物など、実験条件によって様々である。街上毒ウイルスの実験感染では、CNS における神経細胞のネクロシスと非化膿性脳脊髄炎が特徴的である。また、ネグリ小体のほか、ウイルス感染時の特徴的な病理所見、すなわち、神経食現象、グリオシスおよび囲管性細胞浸潤も観察される[2,3]。しかしながら、これらの特徴は全ての街上毒ウイルスにおいて発現するわけではない。神経親和性の強い *silver-haired bat rabies virus* を感染させたマウスモデルでは、脳炎が認められない[21,27]。また、人の自然感染例では、CNS における炎症反応がほとんど認められないが、臨床経過が長い場合はミクログリアの活性化などが観察される[7]。街上毒におけるこれらの病原性の違いは神経機能障害、ウイルス伝播様式並びに炎症反応の誘導などが関与していると考えられる。

街上毒 1088 株は、アメリカの疾病予防管理センター（Centers for Disease Control and Prevention、CDC）が北米のウッドチャックから分離した株である。この株をマウスの筋肉に接種すると

致死に至る[8,26]。しかしながら、本ウイルスの病理発生機序については不明である。そこで、本研究では 1088 株の病理発生機序を明らかにするために、1088 株をマウスの筋肉内に接種し、末梢組織から CNS に至るまでの感染経路とその後の組織変化について精査した。

## 材料方法

### 1. ウイルス、動物、接種経路

1088 株は 1970 年代に北米ウッドチャックから分離された街上毒であり、進化系統樹の解析では北米スカンクに由来することが分かっている [15,26]。このウイルス液を 6 週齢、雌の *ddY* マウス (Kyudo, Saga, Japan) の右大腿部に 10 の 6 乗 FFU ずつ筋肉内接種した。全ての実験は大分大学の実験動物ガイドラインに従って P3 施設で行われた。

### 2. 解剖および病理組織学的検索

1088 株接種群および陰性コントロール群をそれぞれ接種 3、5、8、11 日後 (1088 株接種群は接種 3 日後に 10 匹、接種 5、8 日後に各 15 匹、接種 11 日後に 5 匹、陰性コントロール群は各 3 匹ずつ) に病理解剖した。また、接種後の臨床症状や体重変化について毎日記録した。

病理解剖はイソフルランを用いた深麻酔によりマウスを安楽死させた後、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて浸漬固定した。解剖時に採材した血液は、ウイルス中和抗体値 (VNA) の測定に用いた。脊髄を含む脊椎は脱灰液 K-CX (Fujisawa, Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) を 2 倍希釈して室温 12 時間脱灰し、その後 24 時間水洗した。脳は前頭葉、頭頂葉、小脳を含む脳幹で前額断し、脊髄は頸髄 (以下 C) 3~4、胸髄 (以下 T) 1~3、腰髄 (以下 L) 1~2、仙髄 (以下 S)、で切り出した。接種 3、5、8 日後の 10 匹については、脊髄におけるウイルス抗原の分布を詳細に調べるため、さらに細かく切り出した。

組織片は、上昇アルコール系列で脱水、クリアプラスで透徹後、パラフィン包埋した。包埋ブロックより  $3\mu\text{m}$  の厚さで切片を作製し、定法によるヘマトキシリン・エオジン染色(以下 HE 染色)、特殊染色および免疫組織化学的検索に供した。

### 3. 免疫組織化学的検索

#### a) 抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

ウイルス抗原陽性細胞を同定するため、ウサギ抗狂犬病ウイルス P 蛋白質 (Rabies Phosphoprotein、anti-P) 抗体 [23] を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、**0.25%**トリプシンで抗原を賦活化し、**0.3%**過酸化水素加メタノール (室温、**60** 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応を抑制するため **10%**正常ヤギ血清でブロッキングを行った。一次抗体として **1,200** 倍した anti-P 抗体を、**4**°C で一晚反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) を室温で **30** 分反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、接種 **5** 日群の C1 から Co2 におけるウイルス抗原の分布をプロットした。

#### b) 抗 Iba1 抗体を用いたミクログリアの検出

CNS 内のミクログリアを同定するため、Rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 polyclonal (Iba1) 抗体

(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、3%過酸化水素加メタノール（室温、30分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。10%正常ヤギ血清（室温、1時間）で非特異反応をブロックした。一次抗体として 500 倍希釈した抗 Iba1 抗体を、4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences) を室温で 30 分反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性細胞数/mm<sup>2</sup>を計測した。

c) 抗 GFAP 抗体を用いたアストログリアの検出

CNS 内のアストログリアを同定するため Rabbit anti-Glial Fibrillary Acidic Protein polyclonal (GFAP) 抗体 (Nichirei Biosciences) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、3%過酸化水素加メタノール（室温、15分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、抗 GFAP 抗体を室温で 60 分反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences) を 30 分間反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化し、対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性面積 (%) を計測した。

d) 抗 CD3 抗体を用いた T リンパ球の検出

T リンパ球を同定するため Rabbit anti CD3 polyclonal (以下

CD3) 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase-K (DAKO) で抗原を賦活化し、3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼを除去した。その後、10%正常ヤギ血清 (室温、60 分) で非特異反応をブロックした。一次抗体は 4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit (DAKO) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性細胞数/mm<sup>2</sup>を計測した。

e) 抗 CD20 抗体を用いた B リンパ球の検出

B リンパ球を同定する目的で Rabbit anti CD20 polyclonal (CD20) 抗体 (Thermo Scientific, MA, U.S.A.) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、マイクロウェーブ (750W、5 分) により抗原性を賦活化した。3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応をブロックするため 10%正常ヤギ血清 (室温、30 分) を反応させた。一次抗体は 4℃で一晩反応させた。二次抗体は Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit (DAKO) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

f) 抗 Neurofilament 抗体を用いた神経軸索の検出

神経軸索を同定する目的で Mouse anti Neurofilament Protein (NF) 抗体 (DAKO) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase-K (DAKO) により抗原性を賦活化した。0.3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応をブロックするため 10% 正常ウサギ血清 (室温、30 分) を反応させた。一次抗体は室温で 60 分反応させた。二次抗体は Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (DAKO) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化後、対比染色を施した。

免疫組織化学染色に用いた一次抗体と反応条件は表 1 に示した。

#### 4. TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の検出

アポトーシス細胞を検出する目的で、市販のキット (Apop Tag® Plug peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore Corp., Billerica, MA, U.S.A.) を用いて TUNEL 法を行った。脱パラフィン後、下降アルコールによる水和、水洗をした。前処理として Proteinase-K (DAKO) により透過処理を行った。その後、3%過酸化水素加メタノール (室温、15 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。さらに、Equilibration Buffer を室温で 30 分反応させ、TdT enzyme digoxigenin を 37℃ で 1 時間反応させた。その後 37℃ に温めた Stop buffer に 10 分間反応させた。そして Anti-Digoxigenin-Peroxidase 液を室温で 30 分間反応させた後、DAB 基質で可視化させた。その後ヘマトキシリンで核染色



を施した。

## 5. 超微形態学的検索

10%中性緩衝ホルマリンで固定した脊髄を切り出し、さらに0.5%グルタルアルデヒドで再固定した。固定材料を1mm角に細切し、1%オスミウム酸で抗固定した。定法に従い脱水、透徹、エポン樹脂法増し、厚さ70nmの超薄切切片を作製した。超薄切片を酢酸ウラニル・佐藤の鉛で重染色した後、透過型電子顕微鏡(H-7650, Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan)で観察した。

## 6. 血中中和抗体価 (VNA)

2%FCS含有MEMで二倍希釈した血清を96ウェルプレート(Nunc, Roskilde, Denmark)に加えた。CVS-11(100TCID<sub>50</sub>)を各ウェルに加え、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃、90分培養し、さらにBHK-21細胞を加え24時間培養した。細胞を90%アセトンで固定し、抗狂犬病N蛋白質モノクローナル抗体(Fujirebio Diagnostics, Inc., PA, U.S.A.)を37℃、45分反応させた後に蛍光顕微鏡下で観察した。2列の平均を算出し、WHO国際基準[Anti-rabies Immunoglobulin, human National Institute for Biological Standards & Control (NIBSC)]と比較してVNAを算出した[26]。0.5IU/ml以上のVNAは狂犬病に対する防御に適切であると定められている。

## 結果

### 1. 臨床症状およびウイルス中和抗体値（VNA）

接種 7 日後から軽微な神経症状が認められた（図 1A）。体重も減少し始めた（図 1B）。接種 11 日後には全ての検体が瀕死状態に陥った（図 1A）。血中中和抗体値（VNA）は、接種 5 日後に 2 検体、接種 8 日後に 8 検体が上昇した（図 1C）。VNA の上昇有無の判断は WHO が定める狂犬病予防基準値 0.5IU/ml を参照した。

### 2. 病理組織学的検索（Figs.1-10）

ウイルス接種 3 日から 8 日後まで、接種部位の筋肉に炎症細胞の浸潤と筋線維の変性像が認められた（Figs.1-3）。脊髓および背根神経節では、接種 5 日後より、脊髓の軟膜および背根神経節硬膜にリンパ球を主体とした炎症細胞が軽度に浸潤していた。また、背根神経節では核濃縮と細胞質が腫大した神経節細胞が散見された（Fig.4）。接種 8 日後では、脊髓、背根神経節および脳においてリンパ球を主体とした炎症細胞の浸潤が増加し、脊髓と脳ではグリア細胞の増生と軽度な囲管性細胞浸潤が観察された。また、背根神経節細胞の変性・壊死像は感染日数の経過とともに増加した（Fig.5）。脊髓実質にも同様の変化と空胞化が散見された。脊髓背根神経束では、軸索の膨化と変性、脱落が観察された。接種 11 日後では、接種側の骨格筋において筋紡錘の核と筋線維の変性・崩壊が認められた（Fig.6）。脊髓背根神経束では、軸索の膨化と変性が顕著であり、炎症細胞の浸潤も著しく増加した（Fig.7）。脊髓、背根神経節および脳においてリンパ球を主体とした炎症細胞の浸潤が顕著となった。また、脊髓ではグリア細胞が増加し、

空胞が観察された (Fig.8)。脊髓および脳の軟膜と背根神経節硬膜には形質細胞が散見された。脳実質には泡沫状のグリア細胞と囲管性細胞浸潤が観察された (Figs.9,10)。

### 3. 免疫組織化学的検索 (Figs.11-33)

#### a) 抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出 (Figs.11-26)

接種 3 日後に接種部位の筋線維にウイルス抗原陽性像が観察された (Fig.11)。接種 5 日後から接種側の後肢筋肉 (Fig.12)、胸髄、腰髄、仙髄の主に右側背根神経節細胞にウイルス抗原が観察された (Figs.15,16)。背角の神経細胞においても少数観察された。脳では延髄 (両側) 視床の神経核 (左側)、大脳皮質錐体細胞 (左側) にウイルス抗原が検出された (Figs.21-24) (表 2)。接種 5 日後のウイルス抗原を第一頸髄から第一尾髄までプロットしたところ、第 9、10 胸髄と第 13 胸髄で最も多く認められた (図 2A)。脊髓の横断面におけるウイルス抗原の分布を調べたところ、頸髄の右側背索、胸髄の右側背索と右側背角、腰髄の右側背角において最も多く観察された (図 2B)。接種 8 日後の脊髓では、左側背根神経節細胞においてウイルス抗原が認められ、脊髓全域にかけてウイルス抗原が増加していた (Figs.17,18)。脳では全域にウイルス抗原が認められた (Figs.25,26)。陽性像は神経細胞体、樹状突起および軸索においてドット状に認められた。接種 11 日後では、右後肢筋肉内において、筋線維間の末梢神経と筋紡錘に陽性細胞が認められた (Figs.13,14)。頸髄で増加したが、胸髄と腰髄では減少した (Figs.19,20)。脳では、大脳と海馬において軽度 to 増加

していた。

**b) 抗 Iba1 抗体を用いたミクログリアの検出 (Figs.27,28)**

接種 5 日後から脳、脊髄、背根神経節の全域において小型桿状ミクログリアが観察された。背根神経節では変性壊死した神経節細胞を取り囲む形で陽性細胞が観察された。接種 8 日後では、陽性細胞の数は全体として増加し、細胞形態は樹枝状を呈していた。また、腰髄に泡沫状の細胞質を有するミクログリアの集簇巣が認められた。接種 11 日後では陽性細胞はさらに増数し、ほとんどのミクログリアが樹枝状の細胞突起を伸ばしていた。(Figs.27,28、図 3 A)。

**c) 抗 GFAP 抗体を用いたアストログリアの検出 (Figs.29,30)**

接種 5 日後では、CNS の軟膜、灰白質および脊髄中心管周囲において線維状の陽性像が観察された。接種 8、11 日後では増加していた。脊髄灰白質と脳全域においては形質性アストログリアが増加していた (図 3 B, Figs.29,30)。接種日数の経過とともに陽性細胞が増加していたが、特に、延髄、視床、海馬において顕著であった。また、いずれの時期においても背根神経節では陰性であった。

**d) 抗 CD3 抗体を用いた T リンパ球の検出 (Figs.31,32)**

接種 5 日後では脊髄の軟膜、背根神経節に陽性細胞が散見された。脳では軟膜にごくわずかの陽性細胞が認められた。感染日数の経過とともに増数し、脳、脊髄の実質内においても陽性細胞が

多数認められた。脳、脊髄実質ともに血管周囲への集簇が顕著であった（図 3 C, Figs.31, 32）。

e) 抗 CD20 抗体を用いた B リンパ球の検出

いずれの感染時期においても脳、脊髄における陽性細胞は少数であった。

f) 抗 Neurofilament 抗体を用いた神経軸索の検出（Fig. 33）

接種 8 日後に左右の腰髄の脊髄神経束の軸索が脱落していた。また、腹根神経束と比較し、左右の背根神経束の軸索は大小不同であり、数が減少していた。感染日数の経過とともに、軸索の変性壊死が顕著となり、その数も減少した（Fig.33）。

4. TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出

接種 8 日後以降から脳、脊髄において陽性細胞が認められた。陽性細胞の大半は単核細胞であり、軟膜や血管周囲において多く認められた。変性壊死した神経節細胞は TUNEL 陰性であった。

5. 超微形態学的検索（Fig.34）

背根神経節の神経節細胞の細胞質にウイルス粒子が観察された（Fig.34）。ウイルス粒子は粗面小胞体と細胞膜に沿って多数観察された。ウイルスに感染した背根神経節細胞の核は濃縮、または消失し、粗面小胞体の凝集像、ミトコンドリアの腫大および空胞変性が認められた。軸索は著しく腫大し、ミトコンドリア様の小胞様構造が多数観察された。

## 考 察

狂犬病ウイルスは咬傷により末梢組織に侵入し、CNSに達するまで様々な病原性を発現する。今回著者は、街上毒の病理発生機序を明らかにするため、1088株をマウスの筋肉内に接種し、経日の組織変化とウイルス抗原の局在を調べた。

ウイルス接種側の骨格筋では、接種3日後に炎症細胞浸潤が観察され、接種8日後まで持続していた。また、ウイルス接種3日後に同部位からウイルス抗原陽性像が散見されたが、同時期のCNSからは検出されなかった。狂犬病の病理発生において、骨格筋は重要な役割を果たす。しかしながら、骨格筋線維におけるウイルス増殖がその後のCNSへの感染拡大に必須条件かどうかについては不明である。スカンクの感染実験例では、臨床症状が出現する前に骨格筋からウイルス抗原とゲノムRNAが検出される[4]。いっぽう、Coulonら[5]とShankarら[22]は骨格筋を利用せず直接末梢神経を經由してCNSに侵入すると報告している。今回の成績は前者の感染実験結果に類似すると考えられる。

感染初期のCNSにおけるウイルス抗原の分布を調べたところ、接種5日後の右腰仙髄の背根神経節細胞、右腰仙髄、左赤核および左大脳皮質の運動野(M1)において抗原陽性像が観察された。これらの結果から、1088株は接種部位から知覚神経線維と運動神経線維を上行して背根神経節細胞と脊髓腹角の運動神経に移動し、その後運動神経路を利用して赤核と大脳皮質のM1領域に到達する可能性が示唆された。また、接種8日以降では右側脊髓背角や背根神経節細胞において組織変化が顕著であり、知覚神経路において抗原陽性細胞が多数観察されたことから、知覚神経系に

強い病原性を惹起する可能性が疑われた（図 4）。

一般的に、街上毒は固定毒に比べて細胞傷害が少ないとされている[11]。今回の研究では、右側背根神経節の神経節細胞とその神経束において変性壊死が強く、これらの細胞変性は感染初期の接種 5 日後から観察された。また、変性した背根神経節細胞の形態学的な特徴はアポトーシス像とは異なっており、TUNEL も陰性を示した。これらのことから、背根神経節細胞と脊髄背根神経束にみられた変性壊死はウイルス感染により生じた直接的な神経傷害であることが示唆される。これらの病理所見は、人[16,25]や感染実験の報告[18,20]と一致する。先行研究において、Jackson[12]らは背根神経節細胞の培養細胞に CVS を感染させると、酸化ストレスを伴った脂質の過酸化が生じることを報告している。今回の研究において、右側背根神経節細胞の変性領域において多数の炎症細胞が浸潤しており、また、電子顕微鏡観察では神経軸索の膨化や空胞変性が観察された。今回の研究では、酸化ストレスがこれらの細胞変性に関与していたかどうかについては検討していないが、この点については今後詳細に検討する必要があると思われる。

接種 8 日以降では、右側背根神経節からウイルス抗原陽性細胞数が徐々に減少し、最終的には消失していた。一方で、CD3 陽性細胞は右側背根神経節細胞において増加していた。T リンパ球はウイルスの感染拡大を妨げ、細胞性免疫により CNS からウイルスを排除する役割が知られている[1,9]。したがって、今回の実験においても、T リンパ球が介在した免疫反応が背根神経節からウイルスを排除していた可能性が推察される。

ミクログリアは CNS の傷害後にラミファイド型（休止）からアメボイド型（活性化）にその形態を変える[19,24]。活性化したミクログリアは炎症性サイトカインやケモカインを産生し[19]、Nitric oxide とフリーラジカルを介して間接的あるいは直接的に神経細胞死を誘導する[10]。本実験では、ウイルス感染後に変性壊死した神経細胞の周囲にアメボイド型のミクログリアが多数認められた。このことから、活性化したミクログリアから産生される炎症性サイトカインが神経細胞の細胞死や炎症性細胞浸潤に深く関与していた可能性が考えられる。

以上、本研究によって街上毒 1088 株を接種されたマウスでは感染初期に運動神経路を利用して脳に到達し、その後、知覚神経路に主座する組織病変が強く誘発されることが判明した。



## 小 括

感染マウスに麻痺症状が観察され、脊髄と背根神経節においてリンパ球を中心とする炎症性浸潤が認められた。また、グリア増生と神経節細胞の変性壊死が認められた。麻痺と上記の組織変化が同時期に観察されることから、罹患マウスにみられた麻痺症状はこれらの組織変化に起因するものと解釈される。

変性壊死した神経節細胞は TUNEL 陰性であり、その形態はアポトーシス像とは異なっていた。このことから、ウイルス感染によって生じたネクローシスによる細胞死の可能性が示唆された。背根神経節は偽単極神経細胞の集まりであり、シナプスの連結部が存在しない。そのため、細胞外に露出したウイルスやウイルス抗原は免疫細胞に容易に認識される。今回の実験では、変性壊死した神経節細胞の周囲に多くの炎症細胞が浸潤しており、これらの炎症細胞が神経節細胞のネクローシス関与していた可能性も否定できない。

狂犬病ウイルスは主に運動神経を利用して CNS に到達すると考えられている。今回の結果、1088 株では感染初期に運動神経路を利用して大脳に到達するが、その後は知覚神経路に沿って強い組織傷害が生じ、これらの組織傷害が神経症状に深く関与していることが初めて判明した。

## 第 I 章 参考文献

1. Baloul, L. and Lafon, M. 2003. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie* **85**: 777-788.
2. Charlton, K. M. 1984. Rabies: Spongiform lesions in the brain. *Acta Neuropathol.* **63**: 198-202.
3. Charlton, K. M., Casey, G. A. and Campbell, J. B. 1987. Experimental rabies in skunks: immune response and salivary gland infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **10**: 227-235.
4. Charlton, K. M., Nadin-Davis, S., Casey, G. A. and Wandeler, A. I. 1997. The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. *Acta Neuropathol.* **94**: 73-77.
5. Coulon, P., Derbin, C., Kucera, P., Lafay, F., Prehaud, C. and Flamand, A. 1989. Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. *J. Virol.* **63**: 3550-3554.
6. Dietzschold, B., Wiktor, T. J., Trojanowski, J. Q., Macfarlan, R. I., Wunner, W. H., Torres-Anjel, M. J. and Koprowski, H. 1985. Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and

- apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. *J. Virol.* **56**: 12–18.
7. Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Laothamatas, J. and Wilde, H. 2006. Rabies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **6**: 460–468.
8. Hirai, K., Kawano, H., Mifune, K., Fujii, H., Nishizono, A., Shichijo, A. and Mannen, K. 1992. Suppression of cell-mediated immunity by street rabies virus infection. *Microbiol. Immunol.* **36**: 1277–1290.
9. Hooper, D. C., Morimoto, K., Bette, M., Weihe, E., Koprowski, H. and Dietzschold, B. 1998. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J. Virol.* **72**: 3711–3719.
10. Hu, S., Peterson, P. K. and Chao, C. C. 1997. Cytokine-mediated neuronal apoptosis. *Neurochem. Int.* **30**: 427–431.
11. Jackson, A. C. 2013. Pathology, pp. 351–386. *In*: Rabies, 3rd ed. (Rossiter, J. P. and Jackson, A. C. eds.), Academic Press, Oxford.
12. Jackson, A. C., Kammouni, W., Zherebitskaya, E. and

- Fernyhough, P. 2010. Role of oxidative stress in rabies virus infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons. *J. Virol.* **84**: 4697–4705.
13. Lewis, P., Fu, Y. and Lentz, T. L. 2000. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. *Muscle Nerve* **23**: 720–730.
14. Lycke, E. and Tsiang, H. 1987. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. *J. Virol.* **61**: 2733–2741.
15. Mifune, K., Makino, Y. and Mannen, K. 1979. Susceptibility of various cell lines to rabies virus. *Japan. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 201–208.
16. Mitrabhakdi, E., Shuangshoti, S., Wannakrairot, P., Lewis, R. A., Susuki, K., Laothamatas, J. and Hemachudha, T. 2005. Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. *J. Neurol. Sci.* **238**: 3–10.
17. Murphy, F. A., Harrison, A. K., Winn, W. C. and Bauer, S. P. 1973. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses: infection of the central nervous system and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. *Lab.*

*Invest.* **29**: 1–16.

18. Park, C. H., Kondo, M., Inoue, S., Noguchi, A., Oyamada, T., Yoshikawa, H. and Yamada, A. 2006. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. *J. Vet. Med. Sci.* **68**: 589–595.
19. Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R. and Peterson, P. K. 2004. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 942–964.
20. Rossiter, J. P., Hsu, L. and Jackson, A. C. 2009. Selective vulnerability of dorsal root ganglia neurons in experimental rabies after peripheral inoculation of CVS-11 in adult mice. *Acta Neuropathol.* **118**: 249–259.
21. Roy, A. and Hooper, D. C. 2007. Lethal silver-haired bat rabies virus infection can be prevented by opening the blood-brain barrier. *J. Virol.* **81**: 7993–7998.
22. Shankar, V., Dietzschold, B. and Koprowski, H. 1991. Direct entry of rabies virus into the central nervous system

- without prior local replication. *J. Virol.* **65**: 2736–2738.
23. Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T. and Morimoto, K. 2004. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology* **318**: 295–305.
24. Streit, W. J. 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* **40**: 133–139.
25. Tangchai, P. and Vejjajiva, A. 1971. Pathology of the peripheral nervous system in human rabies. A study of nine autopsy cases. *Brain* **94**: 299–306.
26. Yamada, K., Park, C. H., Noguchi, K., Kojima, D., Kubo, T., Komiya, N., Matsumoto, T., Mitui, M. T., Ahmed, K., Morimoto, K., Inoue, S. and Nishizono, A. 2012. Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res.* **165**: 34–45.
27. Yan, X., Prosniak, M., Curtis, M. T., Weiss, M. L., Faber, M., Dietzschold, B. and Fu, Z. F. 2001. Silver-haired bat rabies virus variant does not induce apoptosis in the brain

of experimentally infected mice. *J. Neurovirol.* 7: 518-527.

表 1. 使用した抗体と反応条件

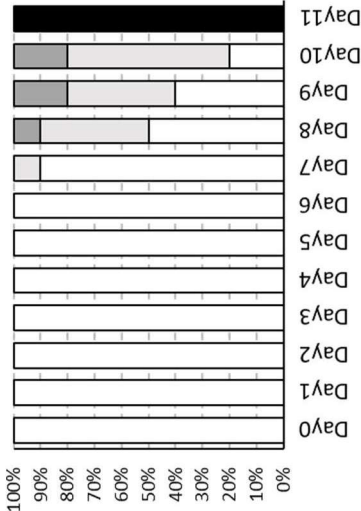
| 抗体名  | 会社名      | 性状         | 希釈倍率              | 温度/反応時間 | 抗原賦活化  | 二次抗体   |
|------|----------|------------|-------------------|---------|--|--|
| P    | 感染研      | polyclonal | 1:1200            | 4°C/一晚  | 0.25%トリプシン(室温/30分)                               | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                      |
| Iba1 | Wako     | polyclonal | 1:500             | 4°C/一晚  | Waterbath(20分),<br>10mMクエン酸ナトリウムバッファー<br>(pH6.0) | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                      |
| GFAP | NICHIREI | polyclonal | RTU <sup>1)</sup> | 室温/60分  | -  | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                      |
| CD3  | DAKO     | polyclonal | RTU               | 4°C/一晚  | Proteinase-K(室温/10分)                             | Envision+® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Rabbit |
| CD20 | DAKO     | polyclonal | 1:400             | 4°C/一晚  | Autoclave(121°C/10分),<br>抗原賦活化液(pH9.0)           | Envision+® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Rabbit |
| NF   | DAKO     | monoclonal | RTU               | 室温/60分  | Proteinase-K(室温/10分)                             | Envision+® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Mouse  |

1) RTU: Ready to use

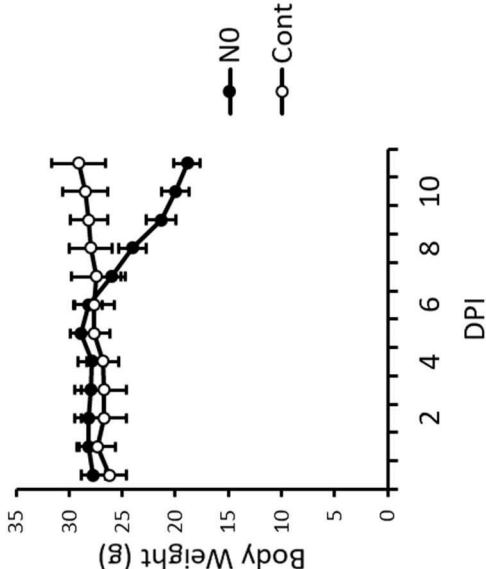


図 1. 臨床症状と体重変化

A



B



C

| 3day  | 抗体価 (IU/ml) | 5day  | 抗体価 (IU/ml) | 8day  | 抗体価 (IU/ml) |
|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|
| 3d-1  | 0.07        | 5d-1  | 0.65        | 8d-1  | 4.36        |
| 3d-2  | 0.1         | 5d-2  | 0.52        | 8d-2  | 0.42        |
| 3d-3  | 0.07        | 5d-3  | 0.32        | 8d-3  | 0.68        |
| 3d-4  | 0.07        | 5d-4  | 0.19        | 8d-4  | 4.75        |
| 3d-5  | 0.07        | 5d-5  | 0.22        | 8d-5  | 0.46        |
| 3d-6  | 0.07        | 5d-6  | 0.15        | 8d-6  | 2.95        |
| 3d-7  | 0.08        | 5d-7  | 0.44        | 8d-7  | 1.3         |
| 3d-8  | 0.08        | 5d-8  | 0.14        | 8d-8  | 4.96        |
| 3d-9  | 0.08        | 5d-9  | 0.09        | 8d-9  | 3.09        |
| 3d-10 | 0.07        | 5d-10 | 0.19        | 8d-10 | 2.71        |

0.5 IU/ml is a level considered by WHO as a correlate for adequate vaccination or protection.

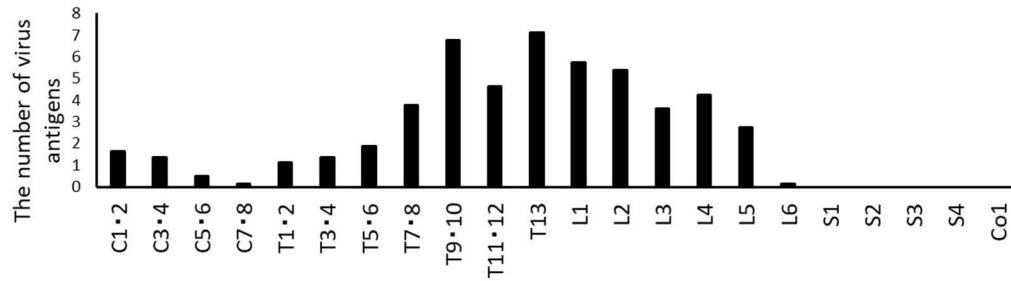
表 2. ウイルス抗原陽性細胞の分布

| Days | Muscle | Lumbosacral |     |     | Lumbosacral spinal cord |     |     | Brain |     |  |  |
|------|--------|-------------|-----|-----|-------------------------|-----|-----|-------|-----|--|--|
|      |        | DRG         | DH  | LH  | VH                      | RN  | M1  | S1    | VPL |  |  |
| 3d   | 0/5 *  | 0/0         | 0/0 | 0/0 | 0/0                     | 0/0 | 0/0 | 0/0   | 0/0 |  |  |
| 5d   | NT     | 0/5         | 0/5 | 1/4 | 0/2                     | 2/0 | 2/0 | 0/0   | 0/0 |  |  |
| 8d   | NT     | 5/4         | 3/3 | 4/4 | 3/3                     | 5/5 | 5/5 | 5/5   | 5/5 |  |  |
| 11d  | NT     | 3/1         | 3/3 | 3/3 | 0/0                     | 5/5 | 5/5 | 5/5   | 5/5 |  |  |

Results expressed as the number of mice with positive staining for rabies virus antigen among each 5 mice used in experiment at the time point. \*: left side/right side, DRG: dorsal root ganglion, DH: dorsal horn, LH: lateral horn, VH: ventral horn of spinal cord, RN: red nucleus, M1: cerebral cortex motor area, S1: cerebral cortex sensory area, VPL: ventral posterolateral thalamic nucleus, NT: no tested.

図 2. 接種 5 日後の脊髄におけるウイルス抗原の分布 (n=10)

A



B

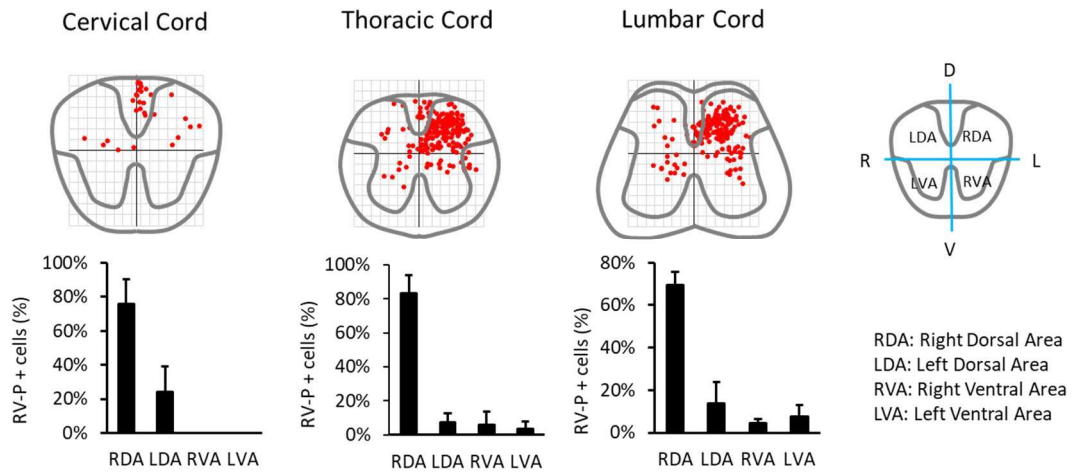
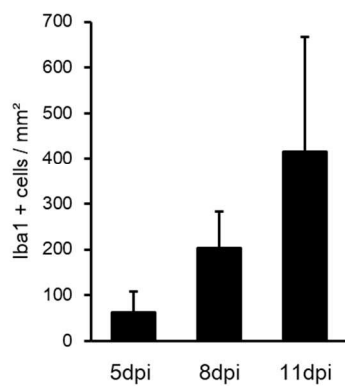
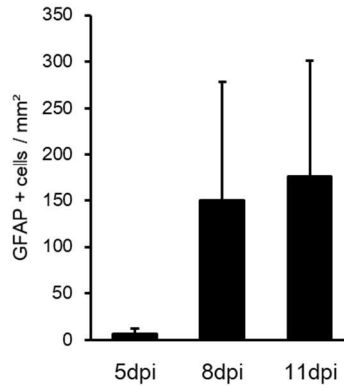


図 3. Iba1、GFAP、CD3 陽性細胞の経日的な変動

A



B



C

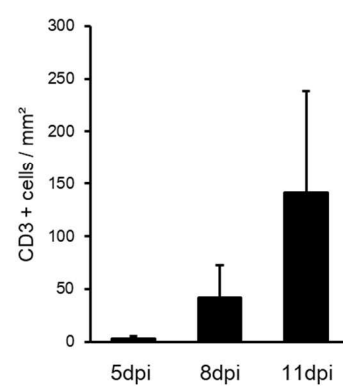
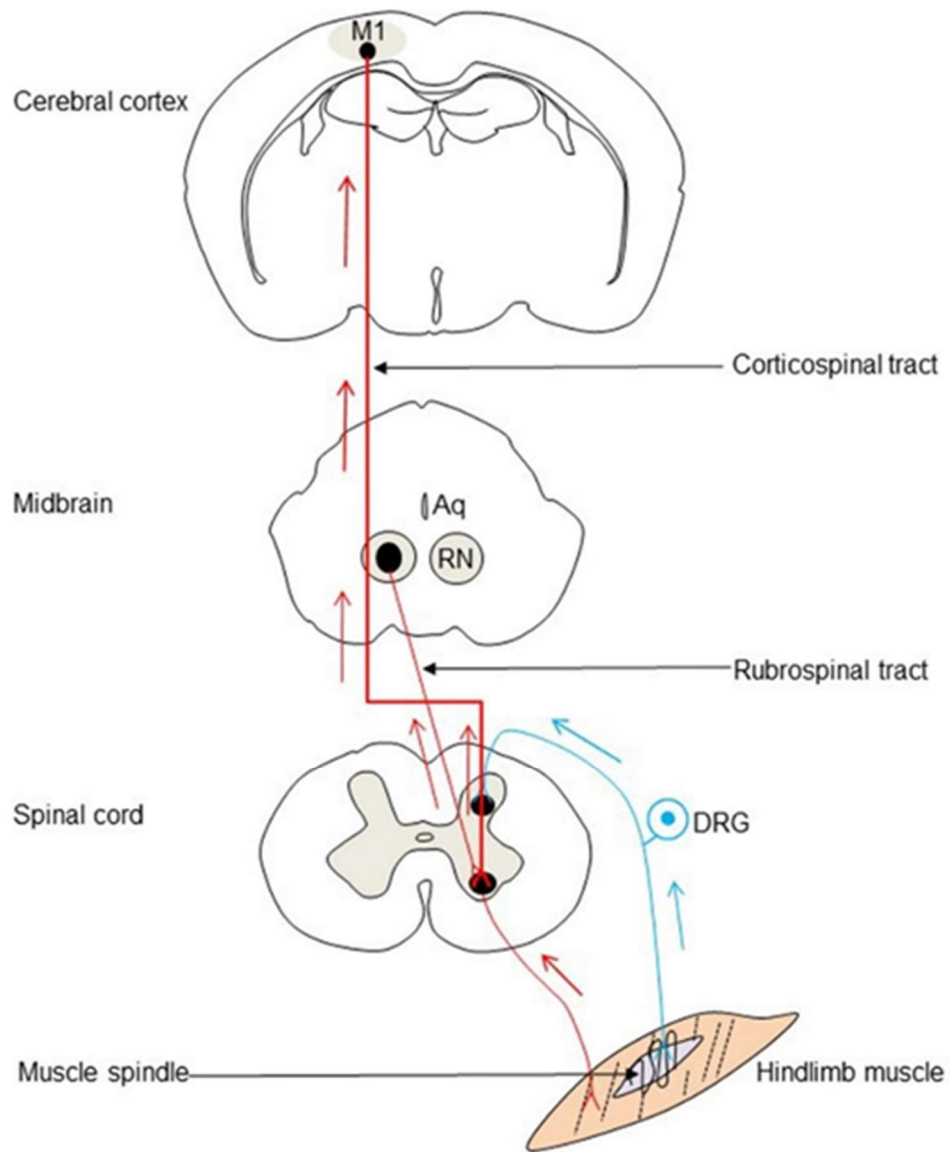


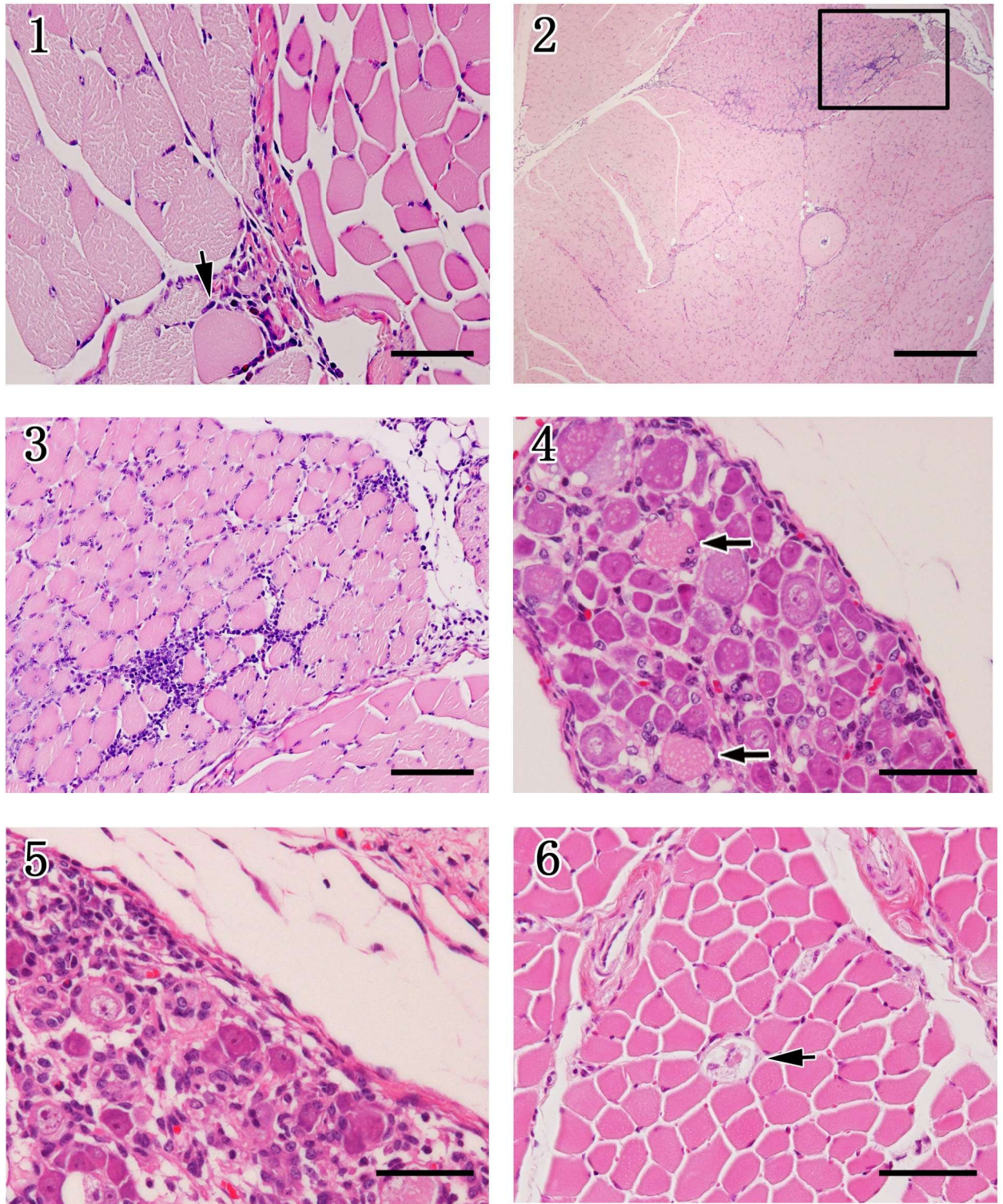
図 4. 1088 株の脳に到達するまでの感染経路



Aq: 中脳水道, DRG: 脊髄背根神経節, M1: 第一次運動野, RN: 赤核



Figs. 1-6. 筋肉および背根神経節における病理組織学的変化



**Fig. 1.** 右後肢. 3DPI. 接種側の後肢筋肉に炎症細胞の浸潤、筋線維の硝子様変性 (矢印) が認められる。HE. Bar=50 $\mu$ m.

**Figs. 2, 3.** 右後肢. 5DPI. 経過と共に炎症細胞が増加している。Fig. 3はFig. 2枠内の拡大像である。構成する細胞は主にリンパ球であることがわかる。HE. Bar=100 $\mu$ m (Fig. 2), Bar=50 $\mu$ m (Fig. 3).

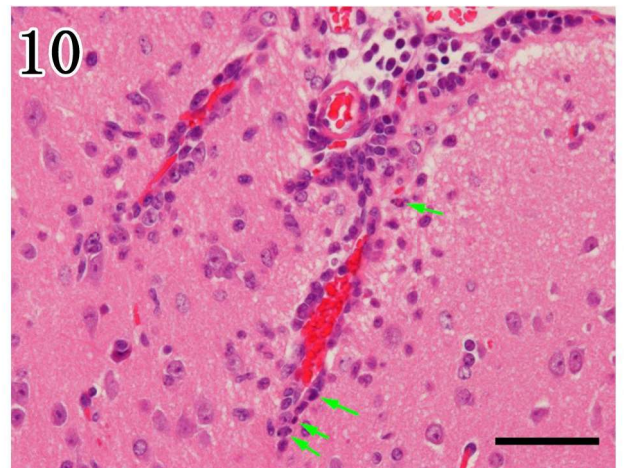
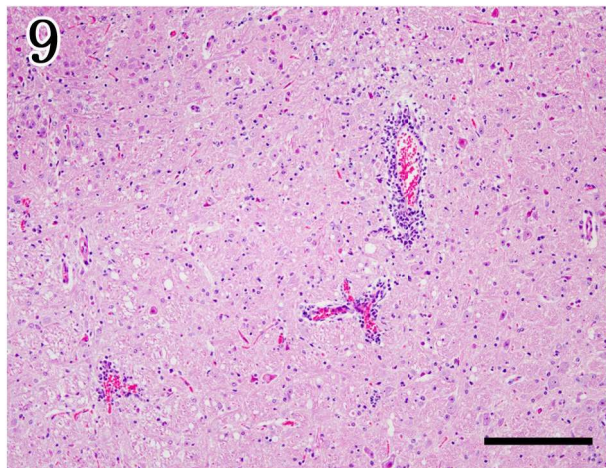
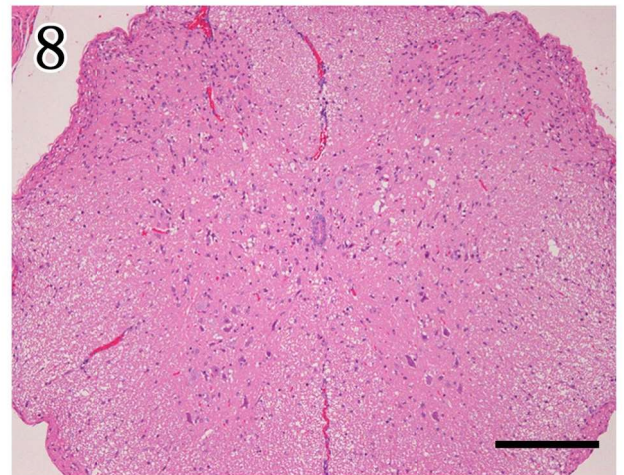
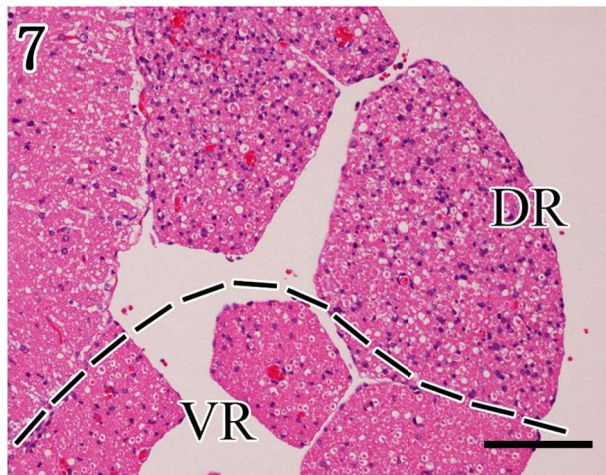
**Fig. 4.** 腰髄背根神経節. 5DPI. 濃縮あるいは融解した核と膨化した弱好酸性均一な細胞体を有する変性壊死細胞が散見される (矢印)。HE. Bar=50 $\mu$ m.

**Fig. 5.** 腰髄背根神経節. 8DPI. 神経節細胞の変性壊死および炎症細胞が増加している。HE. Bar=50 $\mu$ m.

**Fig. 6.** 右後肢. 11DPI. 筋紡錘の変性・崩壊が認められる (矢印)。HE. Bar=50 $\mu$ m.



## Figs. 7-10. 脊髄における病理組織学的変化



**Fig. 7.** 腰髄背根神経束. 11DPI. 背根神経束 (DR) において軸索の膨化と変性が顕著である。また、一部には空胞化が観察される。VR: 腹根神経束. HE. Bar=50 $\mu$ m.

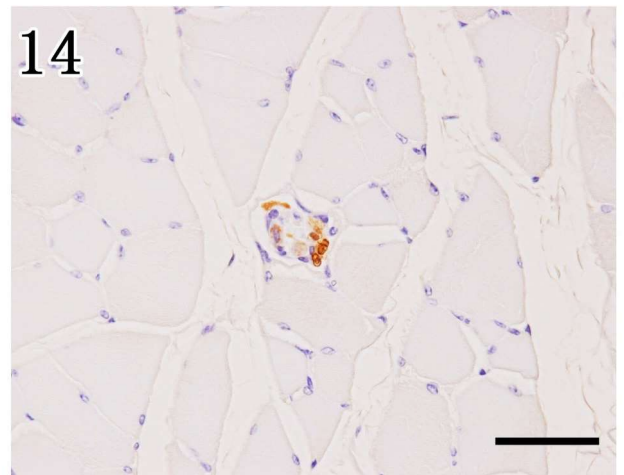
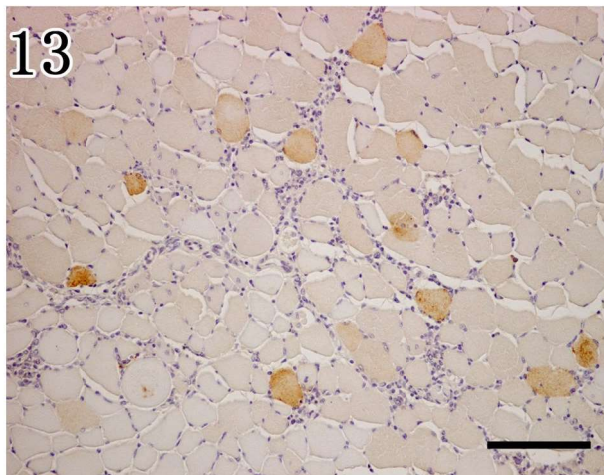
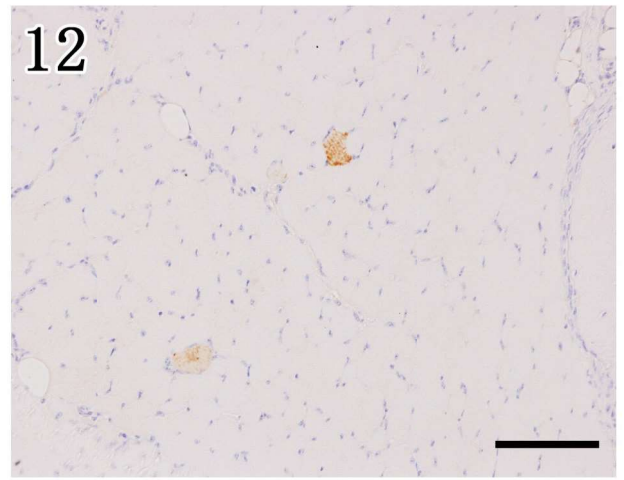
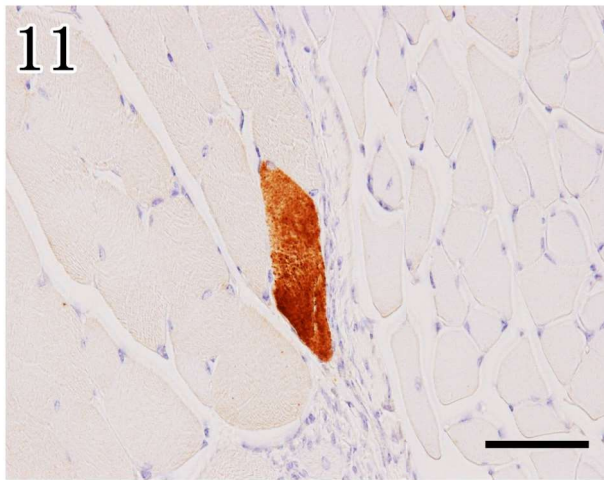
**Fig. 8.** 胸髄. 11DPI. 実質に小空胞が観察される。HE. Bar=100 $\mu$ m.

**Fig. 9.** 延髄. 11DPI. 実質に顕著な囲管性細胞浸潤が観察される。HE. Bar=100 $\mu$ m.

**Fig. 10.** 延髄. 11DPI. 脳全域および血管周囲に濃縮核を有する単核細胞が観察される (緑矢印)。HE. Bar=50 $\mu$ m.



Figs. 11-14. 右後肢におけるウイルス抗原の分布

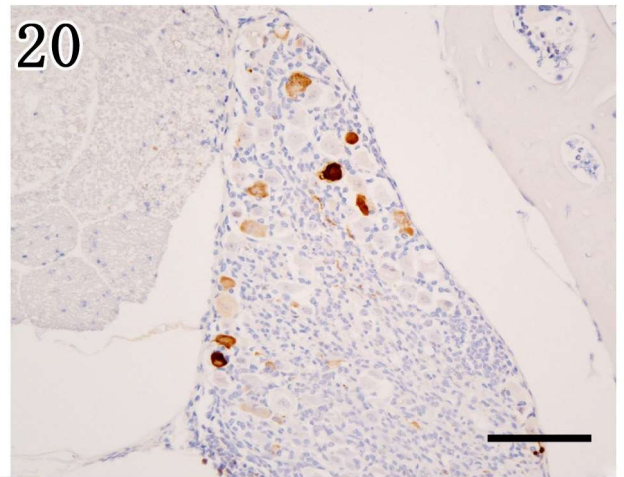
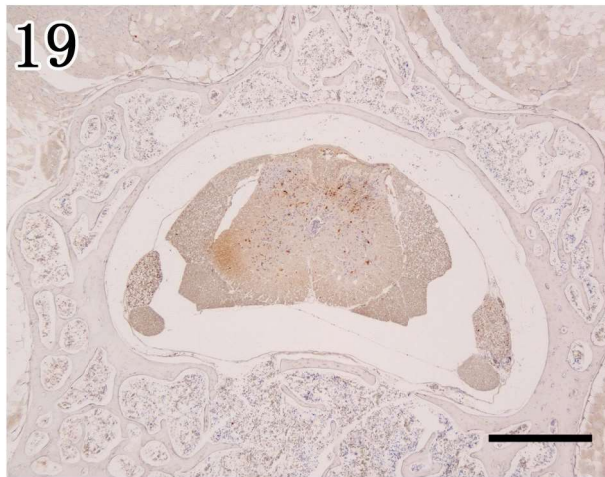
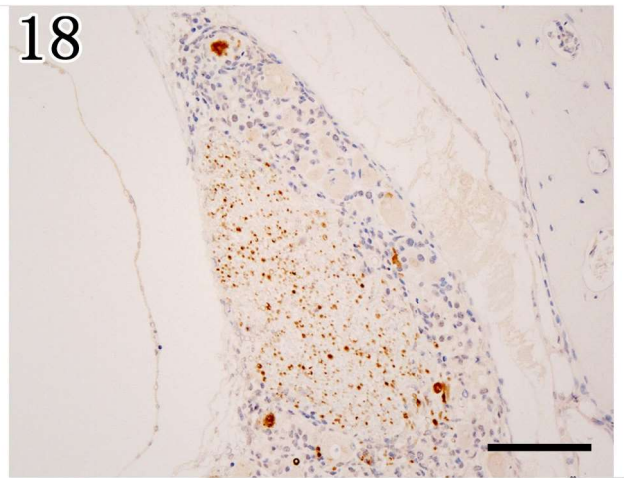
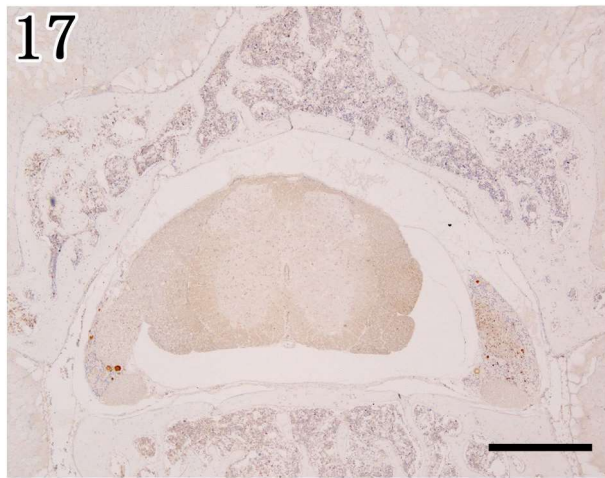
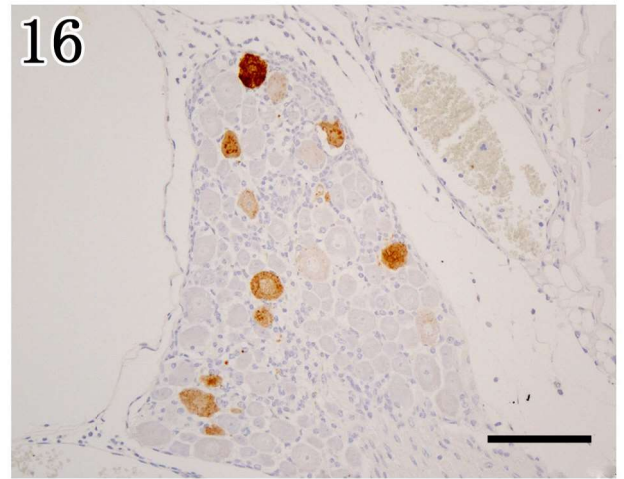
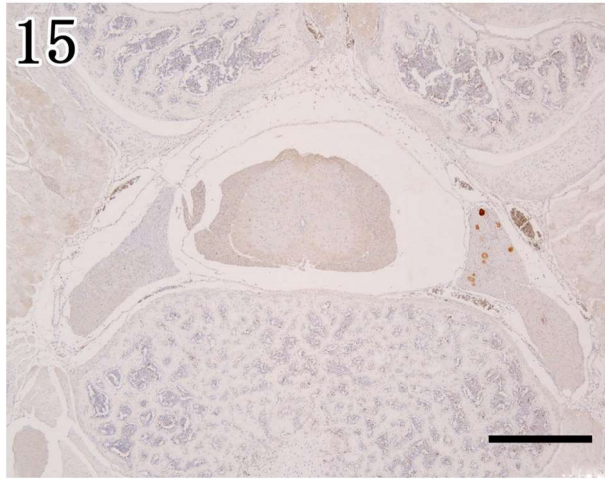


**Fig. 11.** 右後肢. 3DPI. 接種部位の筋線維に明瞭なウイルス抗原が認められる。  
IHC (anti-P). Bar=50 $\mu$ m.

**Fig. 12.** 右後肢. 5DPI. 接種部位の筋線維にウイルス抗原が多数認められる。  
IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 13, 14.** 右後肢. 8DPI. ウイルス抗原陽性を示す筋線維が増加している (Fig. 13)。  
一部末梢神経や筋紡錘内 (Fig. 14) にも陽性像が認められる。IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m  
(Fig. 13), 50 $\mu$ m (Fig. 14).

Figs. 15-20. 脊髄および背根神経節におけるウイルス抗原



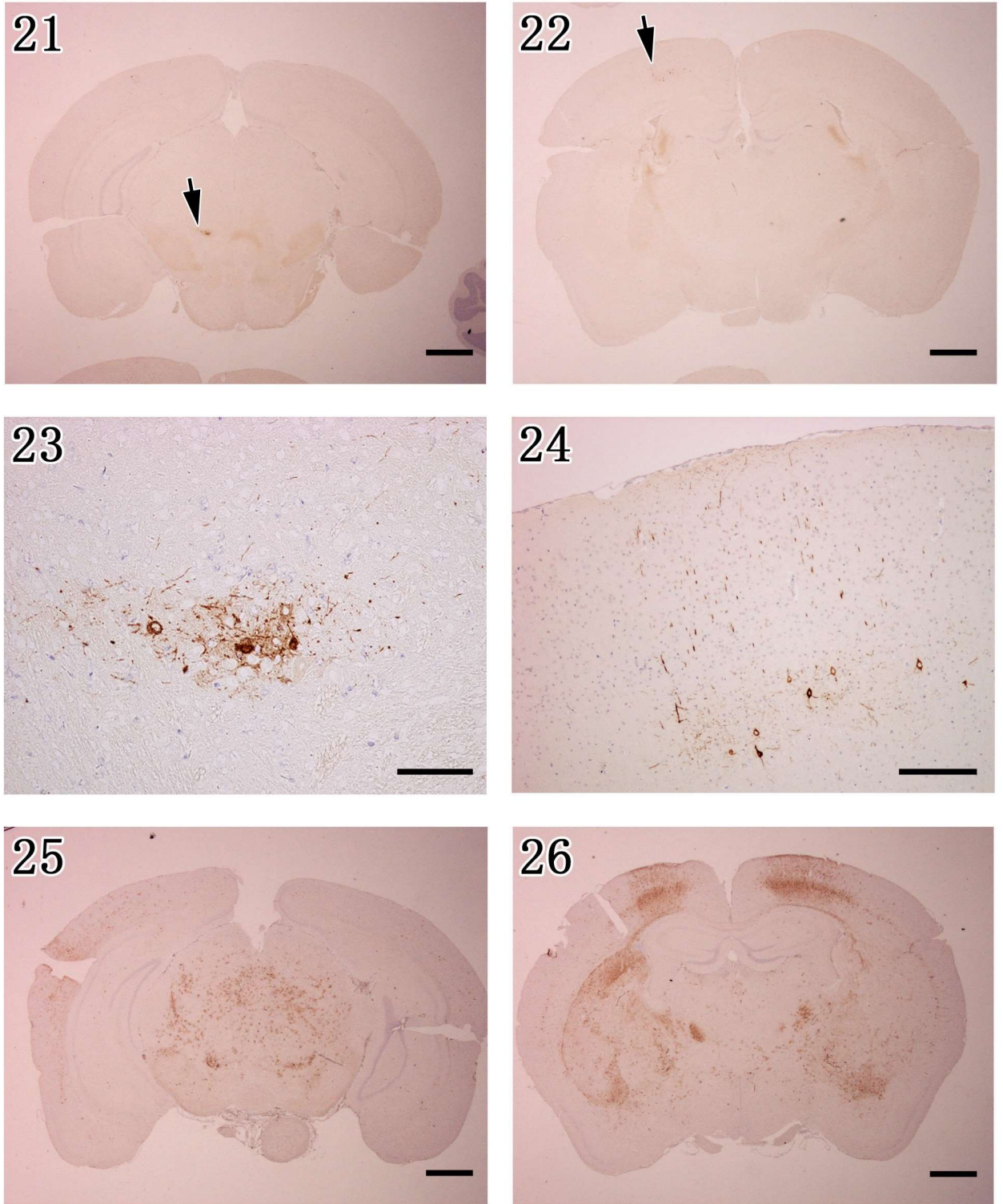
**Figs. 15, 16.** 腰髄および背根神経節. 5DPI. 胸髄、腰髄、仙髄の主に右側脊髄神経節細胞にウイルス抗原が観察される。脊髄神経節 (Fig. 16) では、神経節細胞の細胞質内にウイルス抗原が認められる。IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m (Fig. 15), 50 $\mu$ m (Fig. 16).

**Figs. 17, 18.** 腰髄および背根神経節. 8DPI. 左側脊髄神経節細胞でもウイルス抗原が認められる (Fig. 17)。神経節では、神経節細胞と軸索が陽性を示す (Fig. 18)。IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m (Fig. 17), 50 $\mu$ m (Fig. 18).

**Figs. 19, 20.** 腰髄および背根神経節. 11DPI. 脊髄および脊髄神経節の陽性細胞は軽度に減少する。IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m (Fig. 19), 50 $\mu$ m (Fig. 20).



Figs. 21-26. 脳におけるウイルス抗原の分布

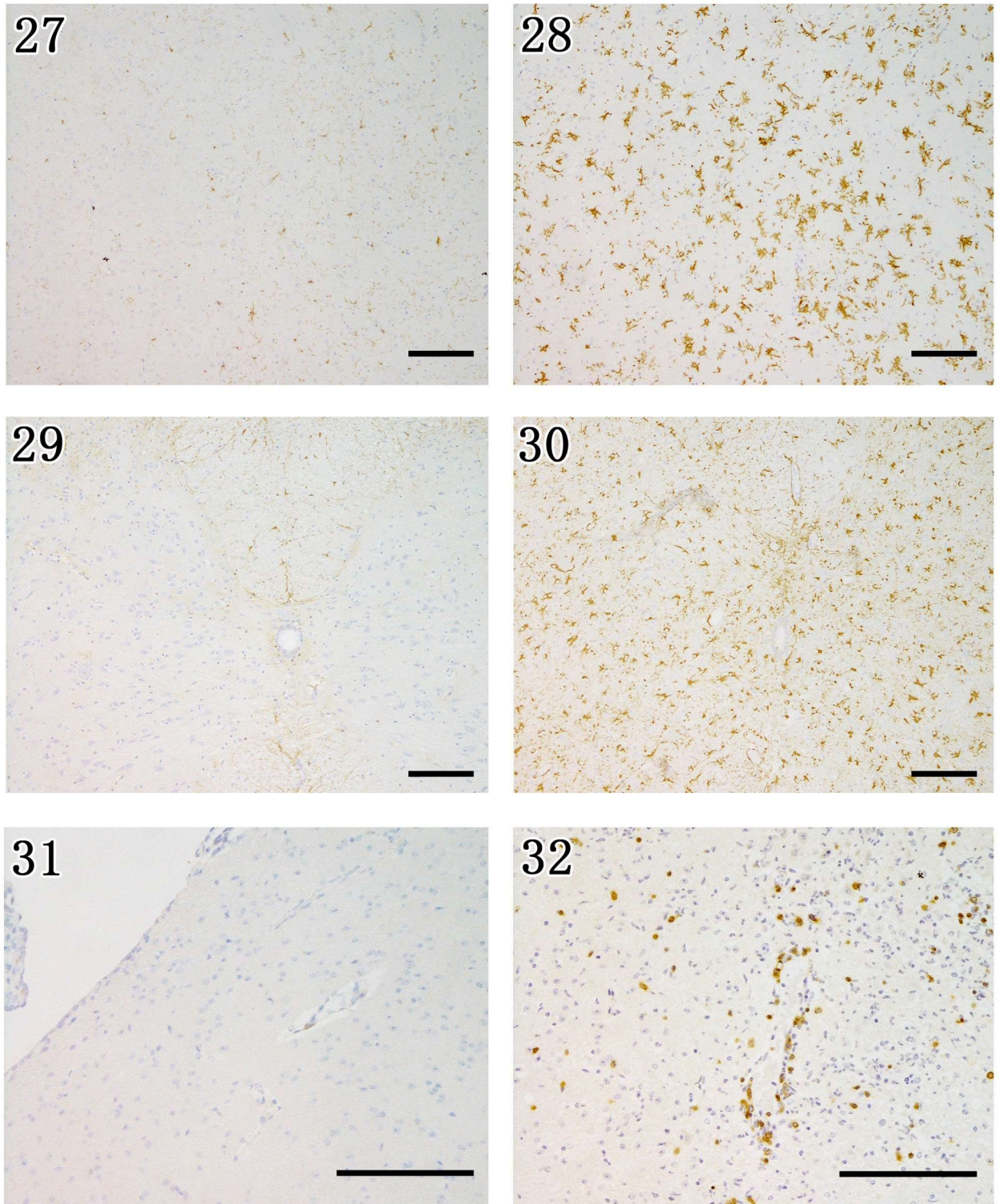


**Figs. 21-24.** 中脳 (Figs. 21, 23), 大脳皮質 (Figs. 22, 24). 5DPI. 中脳では、左側の赤核 (Figs. 21 矢印, 23) に、大脳皮質では左側の錐体細胞 (Figs. 22 矢印, 24) においてウイルス抗原が認められる。IHC (anti-P). Bar=1mm (Figs. 21, 22), 50 $\mu$ m (Fig. 23), 100 $\mu$ m (Fig. 24).

**Figs. 25, 26.** 中脳 (Fig. 25), 大脳皮質 (Fig. 26). 8DPI. 脳の広範囲にウイルス抗原が分布している。IHC (anti-P). Bar=1mm.



Figs. 27-32. グリア細胞の反応とリンパ球浸潤



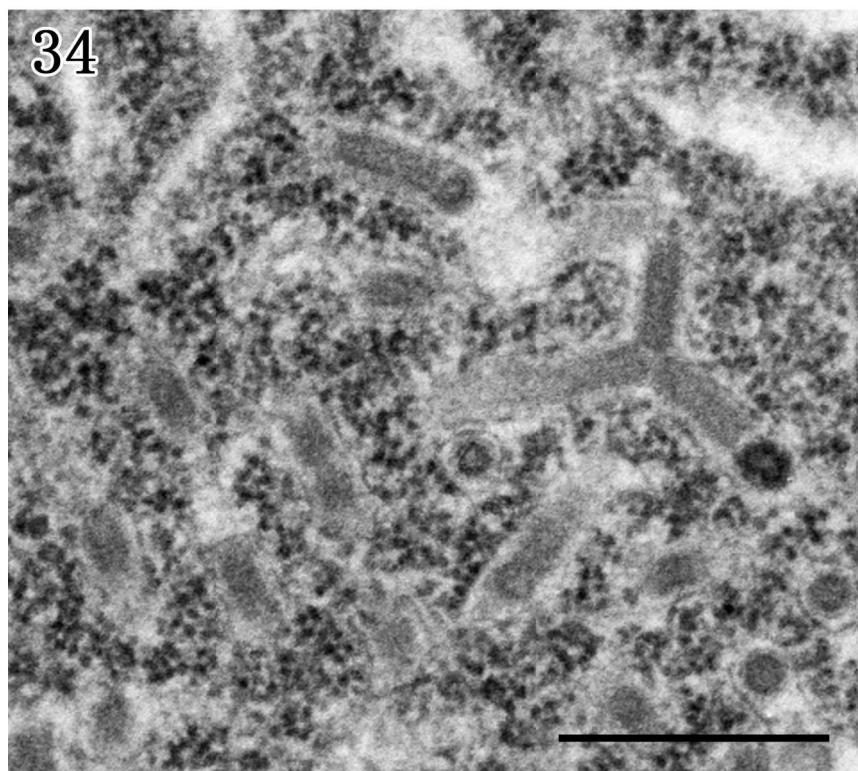
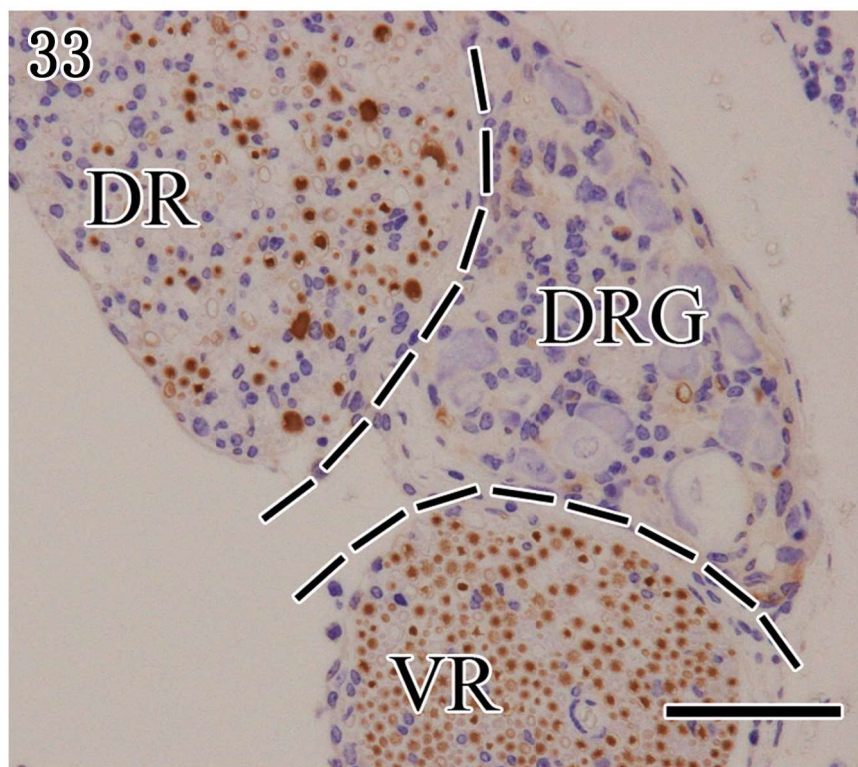
**Figs. 27, 28.** 大脳基底核. 11DPI. Control (Fig. 27) では、脳、脊髄および脊髄神経節に小型桿状ミクログリアが観察されるが、接種11日後には樹枝状を呈し増加している。IHC (Iba1). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 29, 30.** 胸髄. 11DPI. Control (Fig. 29) では、白質と中心管周囲でのみ陽性像が認められるが、接種11日後には全域にかけて陽性像が認められる (Fig. 30)。IHC (GFAP). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 31, 32.** 延髄. 11DPI. Controlでは、血管周囲に陽性細胞がわずかに認められる。感染日数の経過とともに陽性細胞が増数し、脳、脊髄実質においても陽性細胞が多数認められる。脳、脊髄実質ともに血管周囲への集簇が顕著である。IHC (CD3). Bar=100 $\mu$ m.



Figs. 33-34. 軸索の変性とウイルス粒子



**Fig. 33.** 背根神経束. 8DPI. 背根神経節 (DRG) の軸索の大小不同と数の減少が認められる。DR: 腹根神経束, VR: 背根神経束. IHC (NF). Bar=100 $\mu$ m.

**Fig. 34.** 背根神経節. 8DPI. 背根神経節細胞の細胞質にウイルス粒子が観察される。TEM. Bar=500nm.

## 第Ⅱ章 街上毒（1088株）および継代株（1088-N30株）感染

### マウスにおける中枢神経系病変に関する比較病理学的研究

#### 緒言

街上毒狂犬病ウイルスの病理発生機序についてはいまだ不明な点が多い。その理由として、ヒトの自然発症例の殆どが発病後、あるいは死後に病理検索に提供され、剖検例においても細胞質内封入体（ネグリ小体）を除けば CNS における特徴的な病変が存在しないからである[9]。動物においても同様であり、狂犬病発症動物の CNS における炎症反応と神経細胞の破壊はほとんど認められない[8]。一方、実験室株では実験動物に著しい炎症反応や神経細胞の変性をもたらす[8,15]。しかしながら、このような病原性の違いが何に起因するかについては明らかにされていない。

第Ⅰ章では、街上毒 1088 株は末梢感染により致死的な脳脊髄炎を引き起こすことが判明した。また、CNS と脊髄においてグリアの活性化と T リンパ球の浸潤がみられ、背根神経節では神経節細胞の変性壊死と軸索変性が強く誘導されることが明らかとなった。しかし、これらの細胞変性、組織傷害および炎症反応が罹患マウスの致死に直結していたかどうかは不明である。ウイルスなどの病原体は培養細胞による連続継代によって弱毒化する[2]。街上毒 1088 株においても同様な現象が報告されている。1088-N30 (N30) 株は NA 細胞（マウス神経芽細胞腫由来の株化細胞）で 30 代継代された株である。大分大学医学部微生物学講座による全ゲノム解析により、1088 (N0) 株の G 蛋白質の遺伝子上には 37 と 319 番目のアスパラギン酸（以下 Asn）の 2 か所に糖鎖付加（N-glycosylation）が認められ、N30 株の G 蛋白質の遺伝

子上にはさらに 194 番目の Asn に糖鎖付加がおこり、ゲノム全体として 7 ヲ所の変異が認められている。N30 株をマウスの頭蓋内に接種すると、高い致死性を示すが、筋肉接種では致死性が減弱する。また、血中のウイルス中和抗体（VNA）は親株と比較して顕著に高いことがわかっている。このことから長期間継代培養によって N30 株は遺伝子学的小よび生物学的性状が固定毒化した可能性が示唆される [14]。

そこで、本章では街上毒の致死に関連する病理発生機序と G 蛋白質の糖鎖付加に伴った組織病変の特徴を明らかにするため、N0 株と N30 株をマウスに末梢感染させ、両者の病理発生機序について比較検討した。

## 材料方法

### 1. ウイルス、動物、接種経路

1088(N0)株[7,14]は乳のみマウスの脳で2代継代された株で、1088-N30(N30)株はN0株をNA細胞(マウス神経芽細胞腫由来の株化細胞)で30代継代した株である。大分大学医学部微生物学講座による全ゲノム解析により、N0株のG蛋白質の遺伝子上には37と319番目のAsnの2か所にN-glycosylationが認められ、N30株のG蛋白質の遺伝子上にはさらに194番目のAsnに糖鎖付加がおこり、ゲノム全体として7ヵ所の変異が認められている(図1)。これらのウイルス液をそれぞれ6週齢、雌の*ddY*マウス(Kyudo, Saga, Japan)の右大腿部に10の6乗FFUずつ筋肉内接種した。全ての実験は大分大学の実験動物ガイドラインに従ってP3施設で行われた。

### 2. 解剖および病理組織学的検索

N0株接種群、N30株接種群および陰性コントロール群をそれぞれ接種5、8、11日後(N0株接種群、N30株接種群は各5匹ずつ、陰性コントロール群は各3匹ずつ接種)に病理解剖した。また、接種後の臨床症状や体重変化について毎日記録した。

解剖はイソフルランを用いた深麻酔によりマウスを安楽死させた後、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて浸漬固定した。解剖時に採材した血液は、ウイルス中和抗体値(VNA)の測定に用いた。脊髄を含む脊椎は脱灰液K-CX(Fujisawa, Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan)を2倍希釈して室温12時間脱灰し、その後24時間水洗した。脳は前頭葉、頭頂葉、小脳を含む脳幹で

前額断し、脊髄は頸髄（以下 C）3～4、胸髄（以下 T）1～3、腰髄（以下 L）1～2、仙髄（以下 S）、で切り出した。組織片は、上昇アルコール系列で脱水、クリアプラスで透徹後、パラフィン包埋した。包埋ブロックより 3  $\mu$  m の厚さで切片を作製し、定法によるヘマトキシリン・エオジン染色（以下 HE 染色）、特殊染色および免疫組織化学的検索に供した。

### 3. 免疫組織化学的検索

#### a) 抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

ウイルス抗原陽性細胞を同定するため、ウサギ抗狂犬病ウイルス P 蛋白質（Rabies Phosphoprotein、anti-P）抗体[12]を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、0.25%トリプシンで抗原を賦活化し、0.3%過酸化水素加メタノール（室温、60 分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応を抑制するため 10%正常ヤギ血清でブロッキングを行った。一次抗体として 1,200 倍した anti-P 抗体を、4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO(R) (Nichirei Biosciences) を室温で 30 分反応させた後、Simple Stain DAB 溶液（Nichirei Biosciences）で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性細胞数/mm<sup>2</sup>を計測した。

#### b) 抗 Iba1 抗体を用いたミクログリアの検出

CNS 内のミクログリアを同定するため、Rabbit anti-ionized

calcium binding adaptor molecule 1 polyclonal (Iba1) 抗体 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。10%正常ヤギ血清 (室温、1 時間) で非特異反応をブロックした。一次抗体として 500 倍希釈した抗 Iba1 抗体を、4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) を室温で 30 分反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性細胞数/mm<sup>2</sup>を計測した。

c) 抗 GFAP 抗体を用いたアストログリアの検出

CNS 内のアストログリアを同定するため Rabbit anti Glial Fibrillary Acidic Protein polyclonal (GFAP) 抗体 (Nichirei Biosciences) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、3%過酸化水素加メタノール (室温、15 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、抗 GFAP 抗体を室温で 60 分反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences) を 30 分間反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化し、対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性面積 (%) を計測した。



d) 抗 CD3 抗体を用いた T リンパ球の検出

T リンパ球を同定するため Rabbit anti CD3 polyclonal (以下 CD3) 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase-K (DAKO) で抗原を賦活化し、3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼを除去した。その後、10%正常ヤギ血清 (室温、60 分) で非特異反応をブロックした。一次抗体は 4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit (DAKO) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性細胞数/mm<sup>2</sup>を計測した。

e) 抗 CD20 抗体を用いた B リンパ球の検出

B リンパ球を同定する目的で Rabbit anti CD20 polyclonal (CD20) 抗体 (Thermo Scientific, MA, U.S.A.) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、マイクロウェーブ (750W、5 分) により抗原性を賦活化した。3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応をブロックするため 10%正常ヤギ血清 (室温、30 分) を反応させた。一次抗体は 4℃で一晩反応させた。二次抗体は Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit (DAKO) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

f) 抗 Neurofilament 抗体を用いた神経軸索の検出

神経軸索を同定する目的で Mouse anti Neurofilament Protein (NF) 抗体 (DAKO) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase-K (DAKO) により抗原性を賦活化した。0.3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応をブロックするため 10% 正常ウサギ血清 (室温、30 分) を反応させた。一次抗体は室温で 60 分反応させた。二次抗体は Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (DAKO) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化後、対比染色を施した。

免疫組織化学染色に用いた一次抗体と反応条件は表 1 に示した。

4. TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の検出

アポトーシス細胞を検出する目的で、市販のキット (Apop Tag® Plug peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore Corp., Billerica, MA, U.S.A.) を用いて TUNEL 法を行った。脱パラフィン後、下降アルコールによる水和、水洗をした。前処理として Proteinase-K (DAKO) により透過処理を行った。その後、3%過酸化水素加メタノール (室温、15 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。さらに、アポトーシスに特有な 3'-OH DNA 断片を検出するために Equilibration Buffer を室温で 30 分反応させた。次に TdT enzyme digoxigenin を 37℃ で 1 時間反応さ

せ、その後 37℃ に温めた Stop buffer に 10 分間反応させた。そして Anti-Digoxigenin-Peroxidase 液を室温で 30 分間反応させた後、DAB 基質で可視化させた。その後ヘマトキシリンで核染色を施した。

## 5. 血中中和抗体価 (VNA)

2%FCS 含有 MEM で二倍希釈した血清を 96 ウェルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に加えた。CVS-11 (100TCID<sub>50</sub>) を各ウェルに加え、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37℃、90 分培養し、さらに BHK-21 細胞を加え 24 時間培養した。細胞を 90%アセトンで固定し、抗狂犬病 N 蛋白質モノクローナル抗体 (Fujirebio Diagnostics, Inc., PA, U.S.A.) を 37℃、45 分反応させた後に蛍光顕微鏡下で観察した。2 列の平均を算出し、WHO 国際基準 [Anti-rabies Immunoglobulin, human National Institute for Biological Standards & Control (NIBSC)] と比較して VNA を算出した [14]。0.5IU/ml 以上の VNA は狂犬病に対する防御に適切であると定められている。

## 結果

### 1. 臨床症状およびウイルス中和抗体値（VNA）

接種 5 日後の N0 株接種群では臨床症状は認められなかった。N30 株接種群では、5 匹中 1 匹の右後肢に軽度の麻痺が観察された。接種 8 日後の N0 株接種群では、5 匹中 4 匹が右後肢麻痺、1 匹が両後肢麻痺を示した。N30 株接種群では、5 匹中 1 匹が右後肢麻痺を示したが、4 匹は示さなかった。接種 11 日後の N0 株接種群では、全ての検体が瀕死状態となった。N30 株接種群では、5 匹中 1 匹が右後肢麻痺、2 匹が両後肢麻痺を示した。

ウイルス中和抗体値（VNA）は N30 株接種群の方が顕著に高かった（図 2）。臨床症状は表 2 に纏めた。

### 2. 病理組織学的検索（Figs.1-10）

N0 株接種群の脊髄および背根神経節では、接種 5 日後より、脊髄の軟膜および背根神経節硬膜にリンパ球を主体とする炎症細胞が軽度に浸潤していた。N30 株接種群では、特に腰髄において顕著であった。また、背根神経節では濃縮あるいは融解した核と膨化した弱好酸性の均一な細胞質を有する神経細胞が散見された（Figs.1,2）。接種 8 日後では、脊髄と背根神経節にリンパ球を主体とする炎症細胞の浸潤がより顕著となり、脊髄においてはグリア細胞の増生と軽度な囲管性細胞浸潤が観察された。また、変性壊死した神経節細胞が増数していた。脊髄実質内にも変性した神経細胞が散見された。N30 株接種群では、変性壊死した神経細胞を取り囲んで炎症細胞が浸潤していた。脊髄実質内に空胞が観察された（Figs.3,4）。背根神経束において軸索の膨化と変性、

一部は脱落していた。軽度の空胞化も観察された。また、N30株接種群の脳において軟膜内および血管周囲に軽度のリンパ球浸潤が観察された (Figs.5,6)。接種 11 日後では、脊髓と背根神経節にリンパ球を主体とする炎症細胞の浸潤と脊髓におけるグリア細胞の増数が顕著であった。また、脊髓の軟膜と背根神経節硬膜に形質細胞が浸潤していた。脊髓実質には泡沫状の細胞質を有するグリア細胞と高度の囲管性細胞浸潤が観察された。背根神経束における軸索の膨化、変性像も増加していた。N30株接種群では、脊髓の軟膜と背根神経節硬膜に認められた形質細胞が増加していた。脳では囲管性細胞浸潤がより顕著になり (Figs.7-10)、大脳皮質錐体細胞、小脳プルキンエ細胞、延髄における神経細胞が変性し、グリア細胞や単核細胞浸潤が顕著となっていた。また、濃縮核を有する単核細胞が脳全域において観察された。

### 3. 免疫組織化学的検索 (Figs.11-34)

#### a) 抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出 (Figs.11-16)

接種 5 日後から胸髄、腰髄、仙髄の主に右側背根神経節細胞にウイルス抗原陽性像が観察された。脊髓においても少数観察された。脳では延髄 (両側)、視床の神経核 (左側)、大脳皮質錐体細胞 (左側) にウイルス抗原が検出された (Figs.11,12)。接種 8 日後の脊髓では、左側の神経節細胞においてもウイルス抗原が検出され、脊髓全域にかけてウイルス抗原陽性細胞が増加していた。脳では概ね全域においてウイルス抗原陽性像が認められた。陽性像は神経細胞体だけでなく、神経細胞から延びる樹状突起や軸索

にもドット状の陽性像が認められた。N0 株接種群ではウイルス抗原が広範囲に認められたが、N30 株接種群ではウイルス抗原の分布が限局していた (Figs.13,14)。接種 11 日後では、頸髄において軽度が増加したが、胸髄、腰髄では減少した。脳では、大脳と海馬において軽度増数していた。N0 株接種群におけるウイルス抗原分布はさらに拡大していたが、N30 株接種群ではウイルス抗原は接種 8 日後と比較して減少していた (Figs.15,16)。N0 株接種群では、ウイルス抗原陽性細胞が経日的に増加していたのに対し、N30 株接種群では脳および脊髄全域において顕著な増数は認められなかった (図 3)。

b) 抗 Iba1 抗体を用いたミクログリアの検出 (Figs.17-22)

接種 5 日後から脳、脊髄、背根神経節の全域において小型桿状ミクログリアが観察された (Figs.17,18)。N30 株接種群では、延髄と脊髄軟膜周囲に樹枝状のミクログリアが認められた。背根神経節では変性壊死した神経節細胞を取り囲む形で陽性細胞が観察された。接種 8 日後では、陽性細胞の数は全体として増加し、細胞形態は樹枝状を呈していた (Figs.19,20)。また、腰髄に泡沫状の細胞質を有するミクログリアの集簇巣が認められた。接種 11 日後では、陽性細胞がさらに増数し、灰白質の全域で観察された (Figs.21,22)。実験期間を通して、両群の脊髄における Iba1 陽性細胞数に大きな違いは認められなかった (図 4A)。

c) 抗 GFAP 抗体を用いたアストログリアの検出 (Figs.23-28)

接種 5 日後では、CNS の軟膜から灰白質と脊髄中心管周囲にお

いて線維性アストログリアが認められた (Figs.23,24)。接種 8 日後では、線維性アストログリアが増数していた (Figs.25,26)。脊髓灰白質と脳全域においては形質性アストログリアが顕著に認められた。経過とともに脳、脊髓全域において陽性細胞がさらに増加した (Figs.27,28)。脳では、特に延髄、視床、海馬において顕著であった。また、いずれの時期においても背根神経節に陽性細胞は認められなかった。実験期間を通して、脊髓における GFAP 陽性細胞数に大きな違いは認められなかった (図 4B)。

#### d) 抗 CD3 抗体を用いた T リンパ球の検出 (Figs.29-34)

接種 5 日後の N0 株接種群において、背根神経節に陽性細胞が散見されたが、N30 株接種群では脊髓実質内に陽性像が観察された (Figs.29,30)。CD3 陽性細胞数は、N30 株接種群が有意に増加していた (図 4C)。脳では軟膜にごくわずかの陽性細胞が認められた。接種 8 日後では両群共に脳、脊髓の軟膜、背根神経節において陽性細胞が増数し、実質内においても陽性細胞が多数認められた (Figs.31,32)。感染日数の経過とともに脳、脊髓の軟膜、背根神経節に陽性細胞が増数し、脳、脊髓実質内においても陽性細胞が多数認められた。N30 株接種群の背根神経節では、変性壊死した神経節細胞を取り囲む形で陽性細胞が観察された。脳、脊髓実質ともに血管周囲への集簇が顕著であった (囲管性細胞浸潤)。接種 11 日後の脳では両群共に陽性細胞が増数していた (Figs.33,34) が、N30 株接種群の脊髓、背根神経節では軽度に減少していた。

e) 抗 CD20 抗体を用いた B リンパ球の検出

各感染日数において、脳、脊髄軟膜あるいは背根神経節硬膜に陽性細胞が稀に観察された。

f) 抗 Neurofilament 抗体を用いた神経軸索の検出

N30 株接種群において、腰仙髄の両側背根神経束に軸索の脱落と減数が認められた。N0 株接種群では、接種 8 日後の腰髄の両側の脊髄神経軸索が萎縮し、一部は脱落していた。また、腹根神経束と比較して左右の背根神経束は髄鞘の大きさが不均等であり、髄鞘の軽度拡張も観察された。感染日数が増すごとに、軸索は脱落し、その数は減少した。

4. TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の検出 (Figs.35-38)

接種 8 日後から脳、脊髄において両群ともに陽性細胞が増数していた。脳、脊髄共に陽性細胞が全域に分布するが、脳では特に大脳皮質、延髄、視床で顕著に認められた。背根神経節においても陽性細胞が観察されたが、少数であった。陽性細胞の大半が単核細胞であったが、大脳皮質、視床、延髄における神経細胞の一部も陽性を示した。また、単核細胞の陽性像は、軟膜や血管周囲において多くみられた。陽性細胞は N30 株接種群に比較して N0 株接種群において顕著に認められた (Figs.35-38)。



## 考 察

1088-N30 (N30) 株は 1088 株を NA 細胞で継代培養することにより作出された弱毒株である。この株は末梢感染後の病原性が 1088 (N0) 株に比べて減弱することが明らかにされている[14]。そこで、本章では N0 株と N30 株をマウスに末梢感染させ、致死に関連する組織病変を明らかにするとともに、G 蛋白質の糖鎖付加に伴う組織病変の特徴について明らかにした。

両群において、感染日数の経過とともに CNS におけるウイルス抗原陽性細胞数の増加、それにともなう炎症細胞の浸潤、グリア細胞の増生、アポトーシスが認められたが、その程度は両群の間で異なっていた。接種 5 日後では、両群ともにウイルス抗原陽性細胞の局在が延髄、視床、大脳皮質であったが、接種 8 日後以降では陽性細胞数と抗原の局在が異なっていた。つまり、接種 8 日、11 日後では、N0 株接種群においてウイルス抗原陽性細胞数が多く、全てが瀕死に至っていた。培養細胞および脳内接種では、両株における増殖能、病原性が等しい[14]とされているが、末梢感染実験では明瞭な病原性の違いが認められた。このことから、N0 株の末梢組織への親和性が CNS への感染拡大に大きく関与していた可能性が考えられた。

末梢血中から CNS 内へ免疫担当細胞の浸潤は血液脳関門 (Blood-Brain Barrier、以下 BBB) を介して行われる。病原性が弱い株ほど BBB における走化性が亢進すると言われている[10,11]。実際、固定毒の弱毒株では CNS における炎症反応が強いが、強毒株では弱い[3]。また、自然免疫反応や抗ウイルス反応に係る遺伝子発現[13]、ケモカインやサイトカインなどの発現

[6]は弱毒株あるいは固定毒において上昇する。今回の結果では、N30株接種群がN0株接種群に比べて感染早期においてCD3陽性Tリンパ球が増加していた。すなわち、病原性の弱い株ほど感染早期にBBBの透過性が亢進し、CNSへの炎症細胞が浸潤しやすい環境を構築していること、また免疫反応を増強させるサイトカインなどを効率よく産生させていることが推察された。今回用いたN30株は1か所において糖鎖が付加されている[14]。狂犬病ウイルスのG蛋白質はエンベロープに発現し、ウイルス中和抗体など液性免疫を誘導する[4]ことから、G蛋白質の糖鎖付加が抗原性を増強した可能性、あるいはサイトカインの産生を増強させた要因の一つになっていた可能性も考えられる。今回、マウスを用いた感染実験により、糖鎖付加が及ぼす組織病変の一端を明らかにすることが出来たと思われる。

狂犬病の病理発生には様々な要因が関与していると考えられている。その中でもアポトーシスが注目されている。本来、生体内ではウイルス感染後にウイルスを除去する働きが発動するが、狂犬病ウイルス感染ではウイルスの除去能を有する炎症細胞がアポトーシスに陥るため、狂犬病ウイルスが神経細胞内で効率よく複製することが可能となり、CNSの感染を拡大させると考えられている[1,5]。今回の実験結果においても、N30株接種群に比較してN0株接種群においてアポトーシス細胞が顕著に認められた。したがって、ウイルス感染後の炎症細胞におけるアポトーシスが感染動物の耐過に深く関与している可能性が考えられる。

## 小括

狂犬病の病理発生はウイルス株や宿主の免疫能の違いによって多様である。今回著者は、病原性の強い 1088 (N0) 株と病原性の弱い 1088-N30 (N30) 株をそれぞれマウスに末梢感染させ、CNS における病理組織像の違いを比較検討した。

接種 5 日後、両群ともにウイルス抗原の局在は延髄、視床、大脳皮質であった。接種 8 日後、N0 株接種群ではウイルス抗原陽性像が脳の全域において検出されたが、N30 株接種群では接種 5 日後と同様の延髄、視床、大脳皮質に局限していた。このことから、病原性の異なるウイルス株においても接種部位から脳に到達するまでの移動時間や移動経路が同様であることが判明した。接種 8 日後では、N0 株を接種された群においてウイルス抗原陽性細胞数が増加し、全脳性に感染拡大が認められた。しかし、炎症反応については N30 株を接種されたマウスにおいて高い数値を示した。末梢血中から CNS への免疫担当細胞の浸潤は BBB を介して行われる。一般的に、病原性の弱い株ほど BBB における浸透性が高いと言われている。今回の結果では、N30 株接種群の感染早期において CD3 陽性 T リンパ球が優位に増数しており、このことがその後の感染拡大を規定する一因になっていた可能性が推測された。また、両群におけるアポトーシス細胞について調べたところ、N30 株接種群に比較して N0 株接種群においてアポトーシス細胞が顕著であった。今回は、アポトーシスを起こした細胞の種類については精査していないが、ウイルスを排除すべき細胞がアポトーシスによって死滅することによりウイルスの持続的な複製が可能になっていたかも知れない。

今回の実験の結果、ウイルス感染早期の CD3 陽性 T リンパ球の CNS への浸潤とアポトーシスが狂犬病の病理発生に深く関与していると考えられた。さらに、N0 株、N30 株両群において CNS への形質細胞浸潤が観察されたが、N30 株において出現時期が早かった。狂犬病ウイルスの排除には、CSF（脳脊髄液）における VNA 価の上昇が必要であり、形質細胞が抗体産生に重要な役割を果たす。したがって、感染早期における抗体産生細胞の浸潤が耐過に重要な役割を果たしていた可能性も否定できない。

## 第 II 章 参考文献

1. Baloul, L. and Lafon, M. 2003. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie* **85**: 777–788.
2. Ebert, D. 1998. Experimental evolution of parasites. *Science* **282**: 1432–1435.
3. Jackson, A. C. 2013. Pathogenesis. pp. 299–349. *In*: Rabies. 3rd ed. (Jackson, A. C. and Fu, Z. F. eds.), Academic Press, Oxford.
4. Jackson, A. C. 2013. Rabies Virus. pp. 17–60. *In*: Rabies. 3rd ed. (Wunner, W. H. and Conzelmann, K. K. eds.), Academic Press, Oxford.
5. Kojima, D., Park, C. H., Satoh, Y., Inoue, S., Noguchi, A. and Oyamada, T. 2009. Pathology of the spinal cord of C57BL/6J mice infected with rabies virus (CVS-11 strain). *J. Vet. Med. Sci.* **71**:319–324.
6. Kuang, Y., Lackay, S. N., Zhao, L. and Fu, Z. F. 2009. Role of chemokines in the enhancement of BBB permeability and inflammatory infiltration after rabies virus infection. *Virus Res.* **144**: 18–26.

7. Mifune, K., Makino, Y. and Mannen, K. 1979. Susceptibility of various cell lines to rabies virus. *Japan. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 201–208.
8. Miyamoto, K. and Matsumoto, S. 1967. Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J. Exp. Med.* **125**: 447–456.
9. Murphy, F. A. 1977. Rabies pathogenesis. *Arch. Virol.* **54**: 279–297.
10. Roy, A. and Hooper, D.C. 2008. Immune evasion by rabies viruses through the maintenance of blood-brain barrier integrity. *J. Neurovirol.* **14**: 401–411.
11. Roy, A. and Hooper, D.C. 2007. Lethal silver-haired bat rabies virus infection can be prevented by opening the blood-brain barrier. *J. Virol.* **81**: 7993–7998.
12. Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T. and Morimoto, K. 2004. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology* **318**: 295–305.
13. Wang, Z. W., Sarmiento, L., Wang, Y., Li, X., Dhingra, V., Tseggai, T., Jiang, B. and Fu, Z. F. 2005. Attenuated

rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system. *J. Virol.* **79**: 12554–12565.

14. Yamada, K., Park, C. H., Noguchi, K., Kojima, D., Kubo, T., Komiya, N., Matsumoto, T., Mitui, M. T., Ahmed, K., Morimoto, K., Inoue, S. and Nishizono, A. 2012. Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res.* **165**: 34–45.

15. Yan, X., Prosniak, M., Curtis, M. T., Weiss, M. L., Faber, M., Dietzschold, B. and Fu, Z. F. 2001. Silver-haired bat rabies virus variant does not induce apoptosis in the brain of experimentally infected mice. *J. Neurovirol.* **7**: 518–527.

表 1. 使用した抗体と条件

| 抗体名  | 会社名      | 性状         | 希釈倍率              | 温度/反応時間 | 抗原賦活化   | 二次抗体   |
|------|----------|------------|-------------------|---------|---|--|
| P    | 感染研      | polyclonal | 1:1200            | 4°C/一晚  | 0.25%トリプシン(室温/30分)                                | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                      |
| Iba1 | Wako     | polyclonal | 1:500             | 4°C/一晚  | Waterbath(20分),<br>10mMクエン酸ナトリウム/バッファー<br>(pH6.0) | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                      |
| GFAP | NICHIREI | polyclonal | RTU <sup>1)</sup> | 室温/60分  | -   | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                      |
| CD3  | DAKO     | polyclonal | RTU               | 4°C/一晚  | Proteinase-K(室温/10分)                              | Envision+® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Rabbit |
| CD20 | DAKO     | polyclonal | 1:400             | 4°C/一晚  | Autoclave(121°C/10分),<br>抗原賦活化液(pH9.0)            | Envision+® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Rabbit |
| NF   | DAKO     | monoclonal | RTU               | 室温/60分  | Proteinase-K(室温/10分)                              | Envision+® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Mouse  |

1) RTU: Ready to use



図 1. 1088-N30 株の糖鎖付加および変異部位

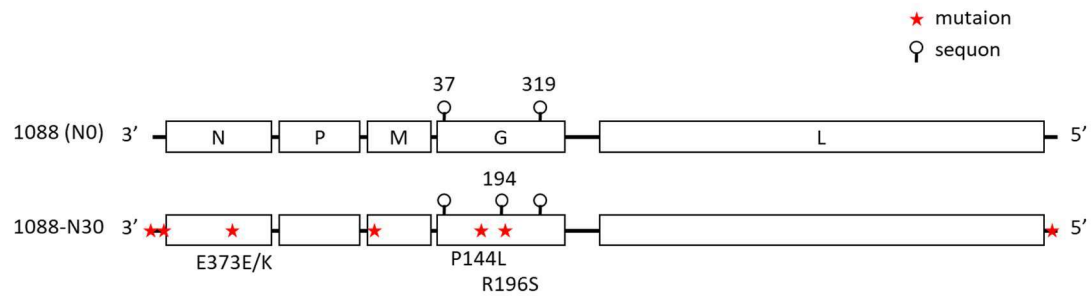


図 2. ウイルス中和抗体値（VNA）の比較

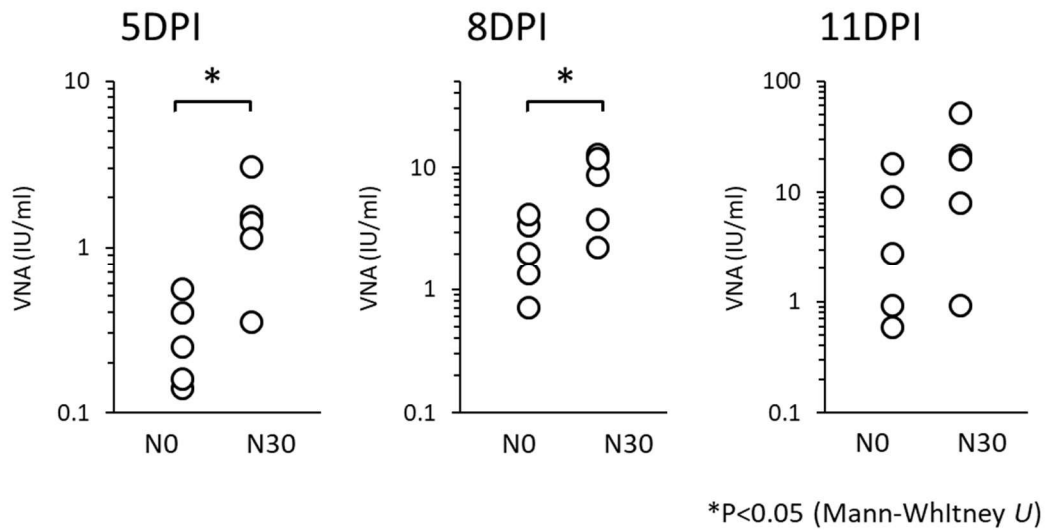


表 2. 安楽殺時の臨床症状

| Days post<br>inoculation (dpi) | Strain  | Paralysis/Total (%) |                 |                |             |
|--------------------------------|---------|---------------------|-----------------|----------------|-------------|
|                                |         | Non-paralysis       | Right hind limb | both hind limb | moribundity |
| 5DPI                           | 1088N0  | 5/5(100)            | 0/5(0)          | 0/5(0)         | 0/5(0)      |
|                                | 1088N30 | 4/5(80)             | 1/5(20)         | 0/5(0)         | 0/5(0)      |
|                                | control | 5/5(100)            | 0/5(0)          | 0/5(0)         | 0/5(0)      |
| 8DPI                           | 1088N0  | 0/5(0)              | 4/5(80)         | 1/5(20)        | 0/5(0)      |
|                                | 1088N30 | 4/5(80)             | 1/5(20)         | 0/5(0)         | 0/5(0)      |
|                                | control | 5/5(100)            | 0/5(0)          | 0/5(0)         | 0/5(0)      |
| 11DPI                          | 1088N0  | 0/5(0)              | 0/5(0)          | 0/5(0)         | 5/5(100)    |
|                                | 1088N30 | 2/5(40)             | 1/5(20)         | 2/5(40)        | 0/5(0)      |
|                                | control | 5/5(100)            | 0/5(0)          | 0/5(0)         | 0/5(0)      |

図 3. ウイルス感染細胞の経目的な変化の比較

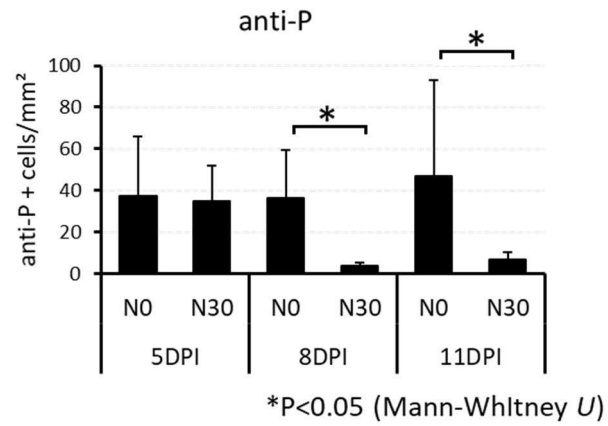
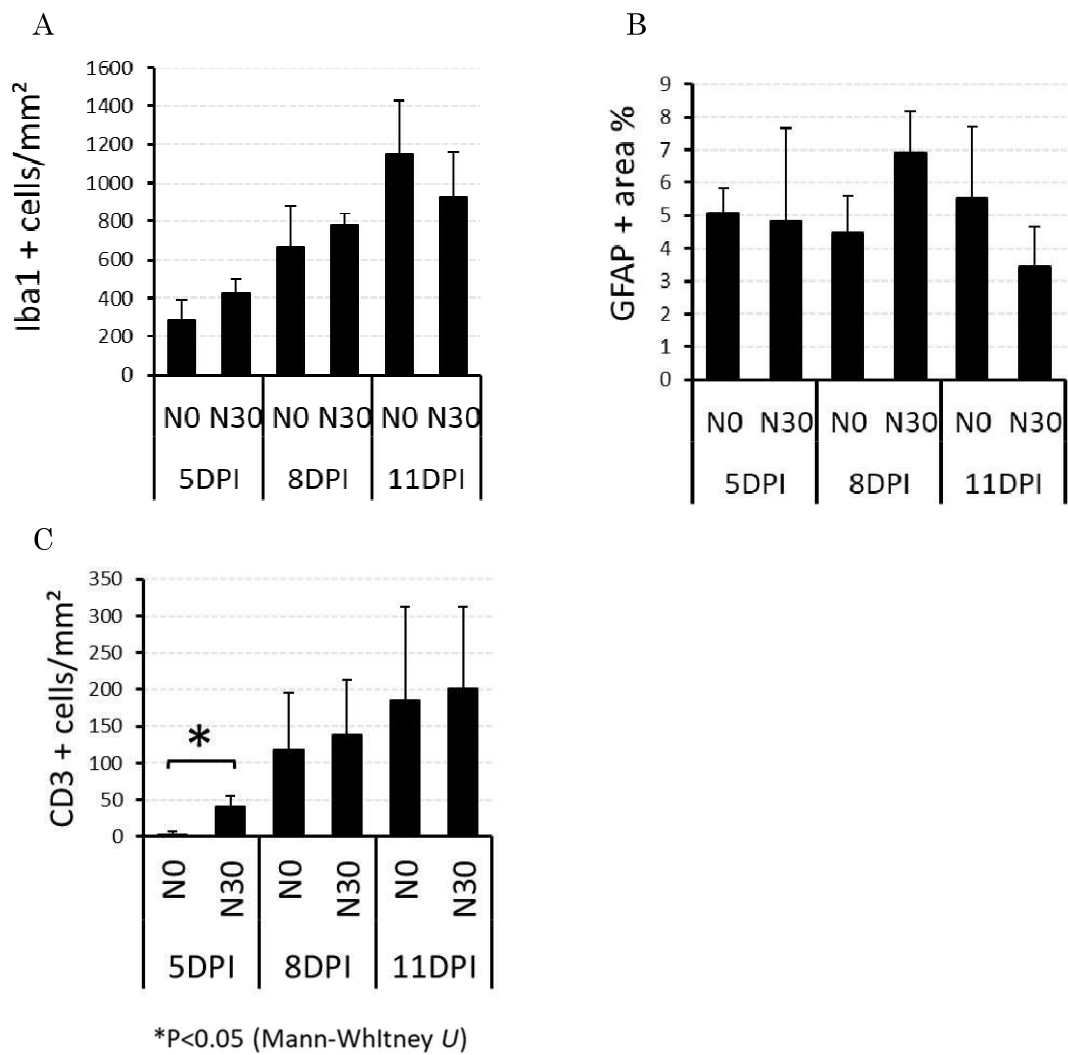
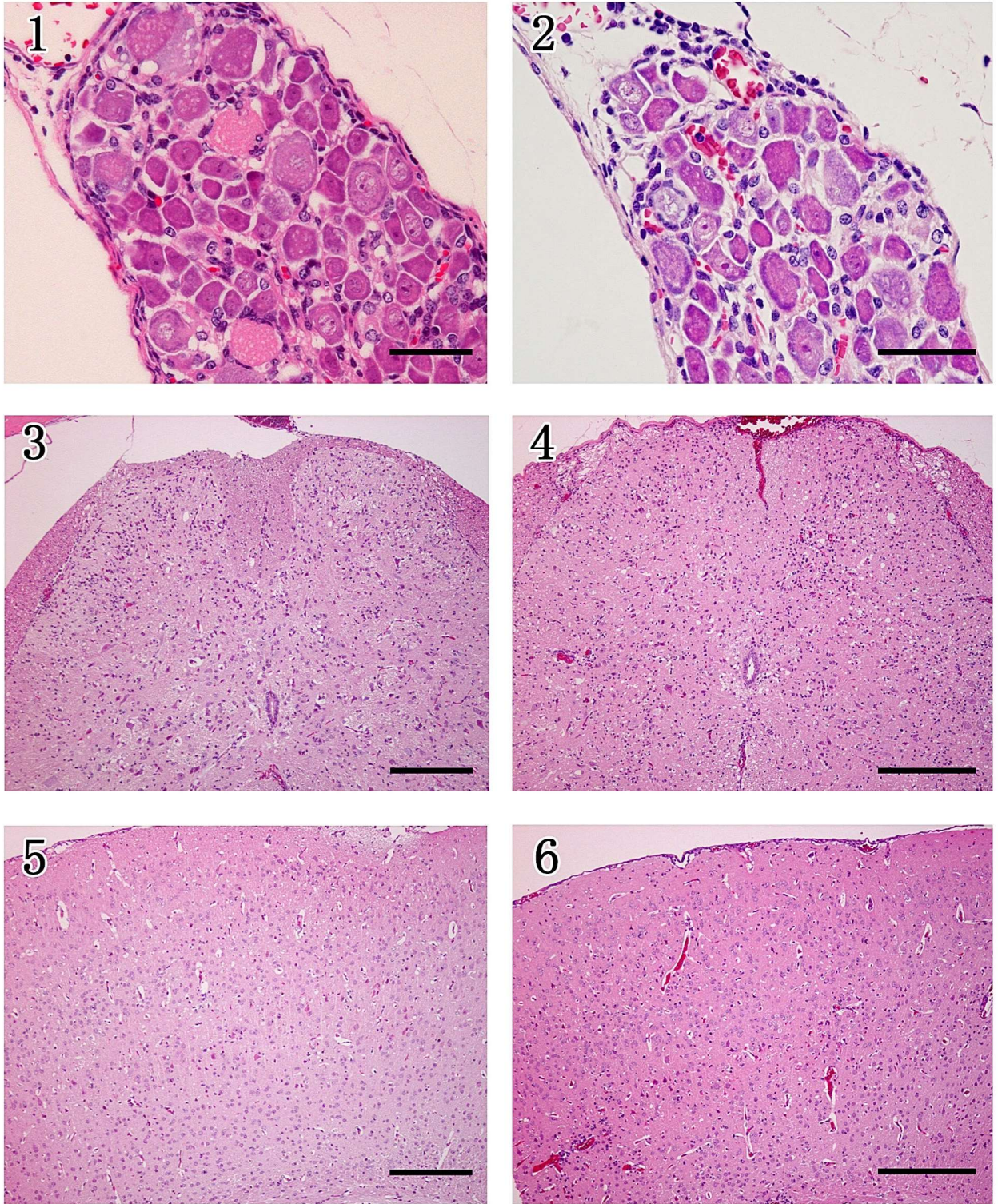


図 4. グリア細胞および T リンパ球の経目的な変化の比較





## Figs. 1-6. 病理組織学的変化の比較



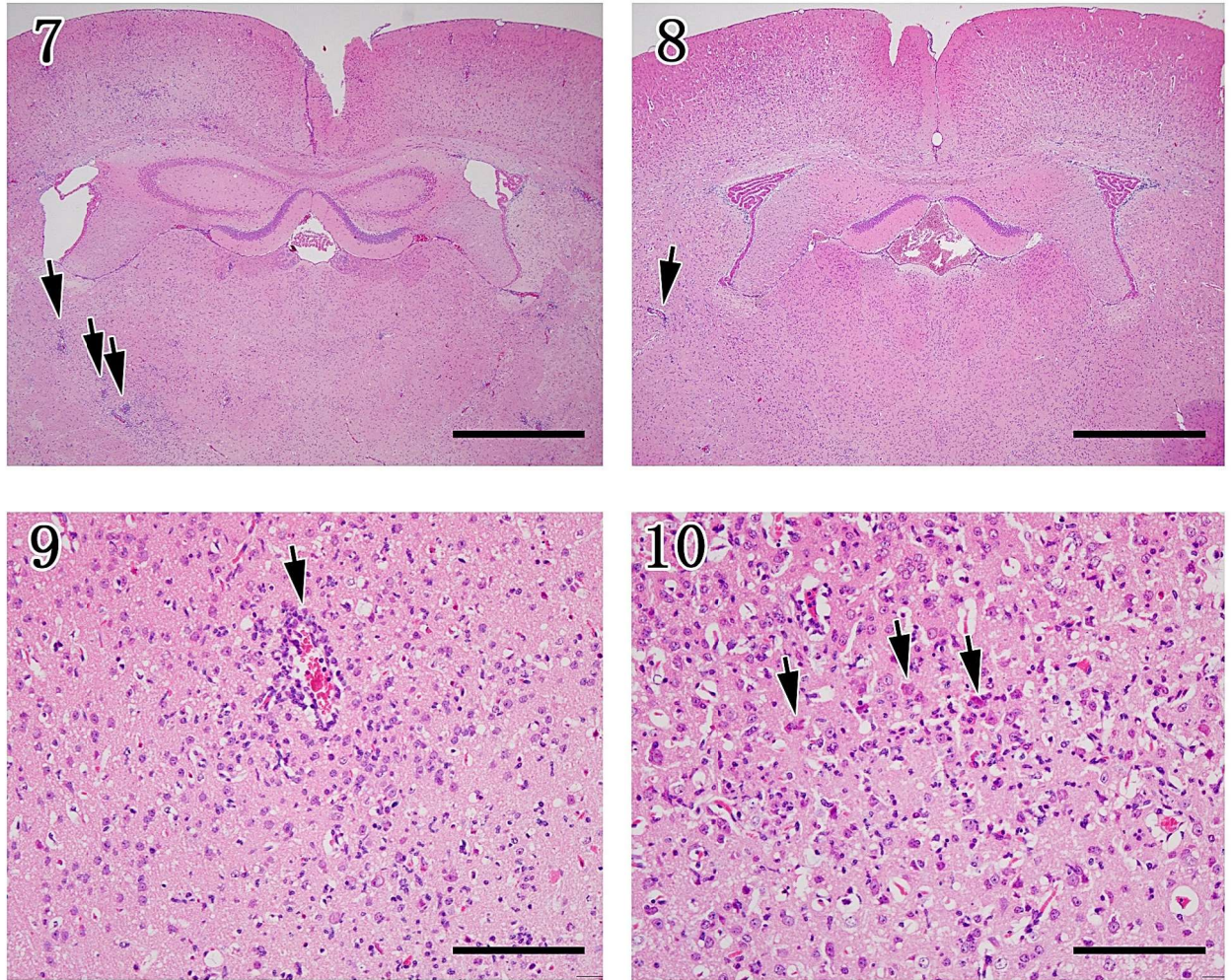
**Figs. 1, 2.** 腰髄背根神経節. 5DPI. N0株接種群 (Fig. 1), N30株接種群 (Fig. 2). 神経節細胞が変性壊死している。また、N30株接種群 (Fig. 2) はリンパ球浸潤がやや顕著である。HE. Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 3, 4.** 腰髄. 8DPI. N0株接種群 (Fig. 3), N30株接種群 (Fig. 4): 両群ともに、細胞密度が増加する。また、脊髓実質内に空胞が散在する。HE. Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 5, 6.** 大脳皮質. 8DPI. N0株接種群 (Fig. 5), N30株接種群 (Fig. 6). N30株接種群では一部の軟膜や血管に軽度のリンパ球浸潤が観察されるが両群ともに軽微である。HE. Bar=100 $\mu$ m.



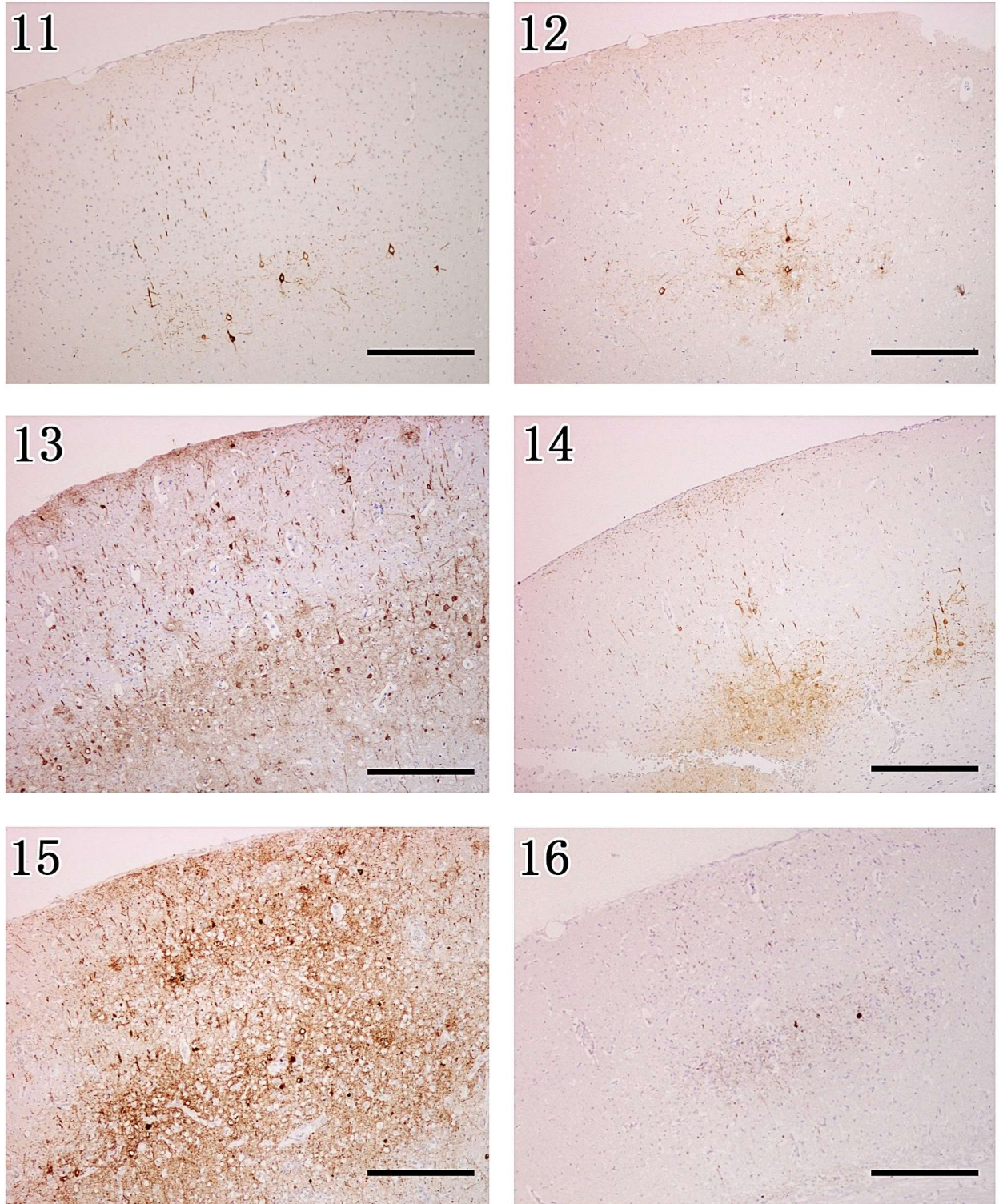
## Figs. 7-10. 病理組織学的変化の比較



**Figs. 7-10.** 大脳皮質. 11DPI. N0株接種群 (Figs. 7, 9), N30株接種群 (Figs. 8, 10). 囲管性細胞浸潤が顕著であり (Figs. 7-9 矢印)、神経細胞は変性壊死している (Fig. 10 矢印)。Figs. 9, 10はそれぞれ Figs. 7, 8の拡大像である。HE. Bar=500 $\mu$ m (Figs. 7, 8), 50 $\mu$ m (Figs. 9, 10).



## Figs.11-16. 脳におけるウイルス抗原分布の比較



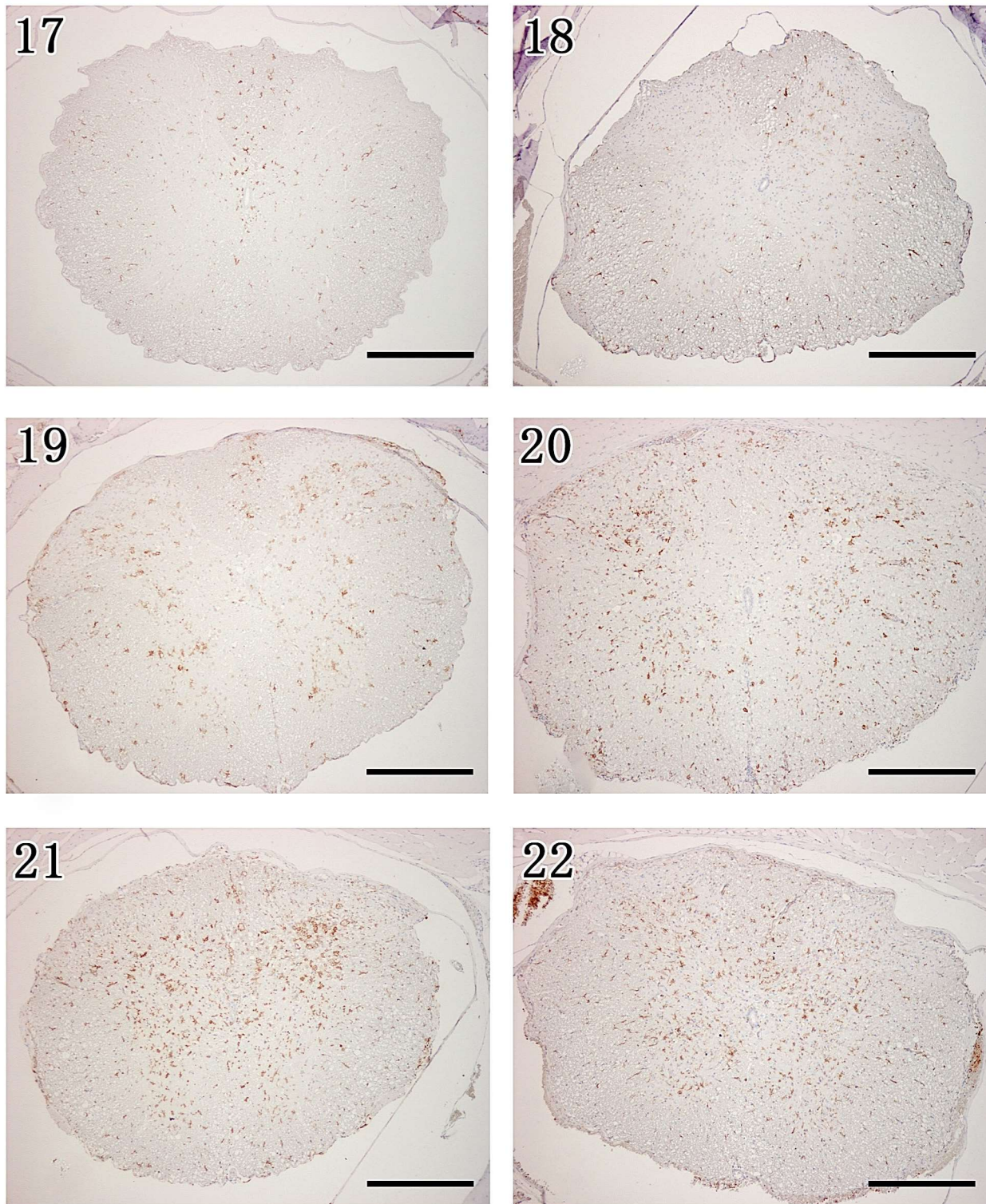
**Figs. 11, 12.** 大脳皮質. 5DPI. N0株接種群 (Fig. 11), N30株接種群 (Fig. 12). 両群ともに錐体細胞に陽性細胞が認められる。IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 13, 14.** 大脳皮質. 8DPI. N0株接種群 (Fig. 13), N30株接種群 (Fig. 14). N0株接種群ではウイルス抗原が広範囲に認められるが、N30株接種群では限局している。IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 15, 16.** 大脳皮質. 11DPI. N0株接種群 (Fig. 15), N30株接種群 (Fig. 16). N0株接種群ではウイルス抗原陽性像はさらに分布を広げているが、N30株接種群では減少している。IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m.



## Figs. 17-22. Iba1陽性細胞の比較



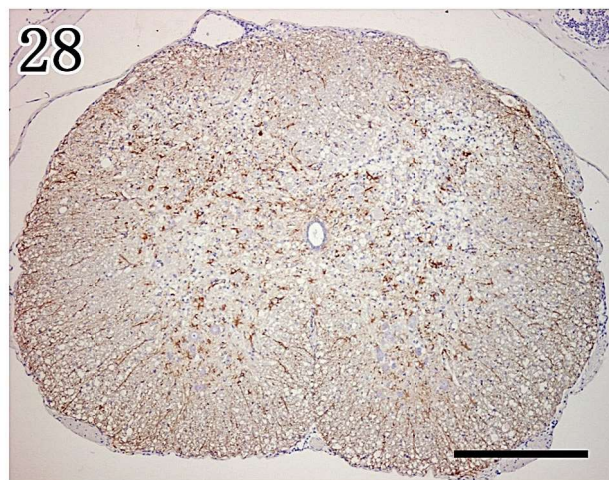
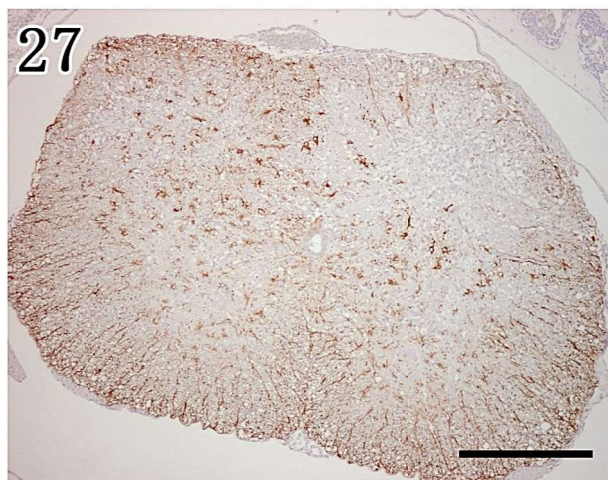
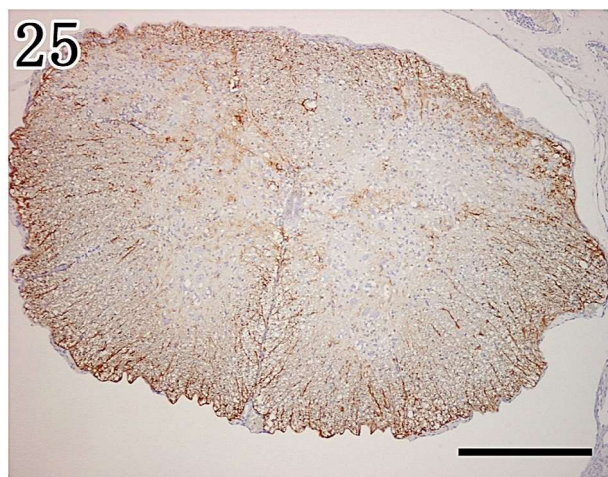
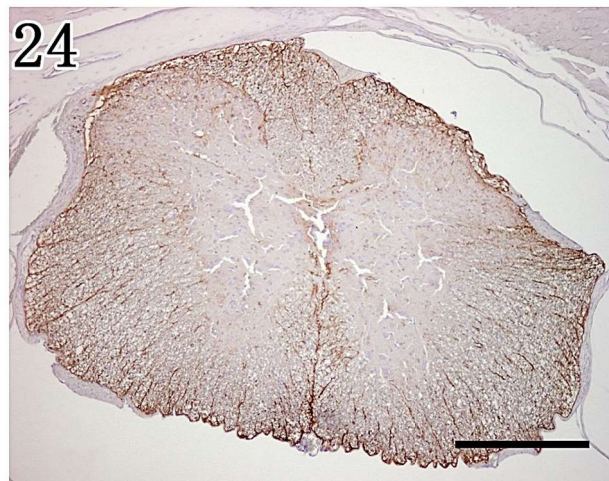
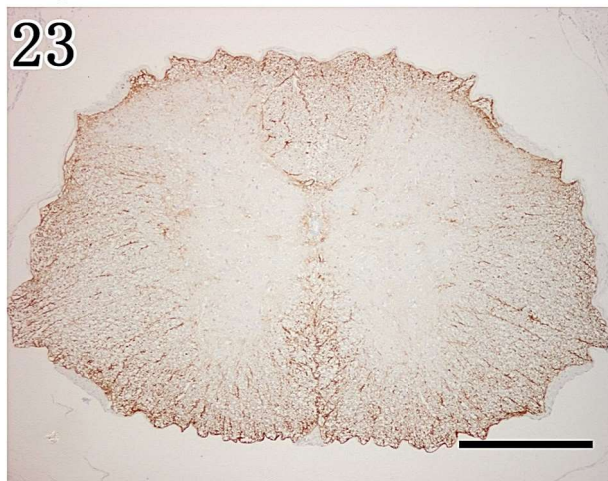
**Figs. 17, 18.** 脊髄. 5DPI. N0株接種群 (Fig. 17), N30株接種群 (Fig. 18). 両群ともに、全域に小型桿状ミクログリアが観察される。IHC (Iba1). Bar=100μm.

**Figs. 19, 20.** 脊髄. 8DPI. N0株接種群 (Fig. 19), N30株接種群 (Fig. 20). 両群ともに、陽性細胞数が増加し、樹枝状の細胞形態を呈している。IHC (Iba1). Bar=100μm.

**Figs. 21, 22.** 脊髄. 11DPI. N0株接種群 (Fig. 21), N30株接種群 (Fig. 22): 両群ともに、陽性細胞がさらに増加し、灰白質全域に及んでいる。IHC (Iba1). Bar=100μm.



## Figs. 23-28. GFAP陽性細胞の比較



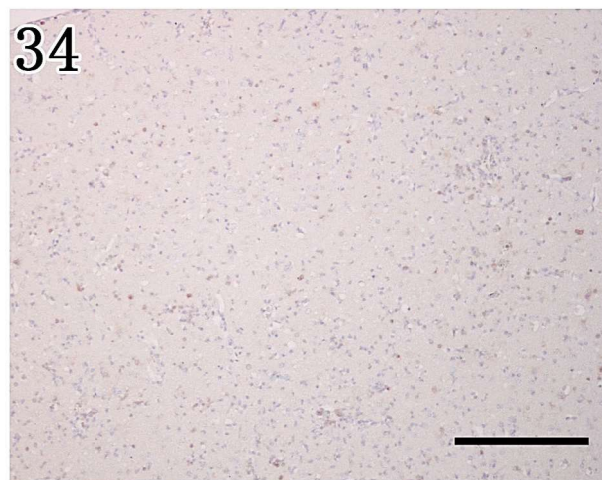
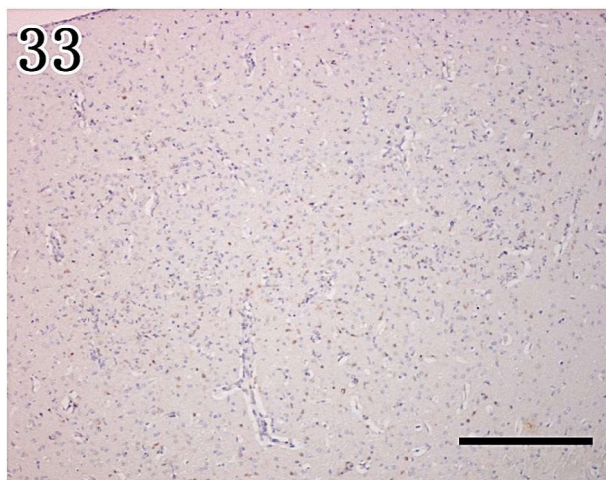
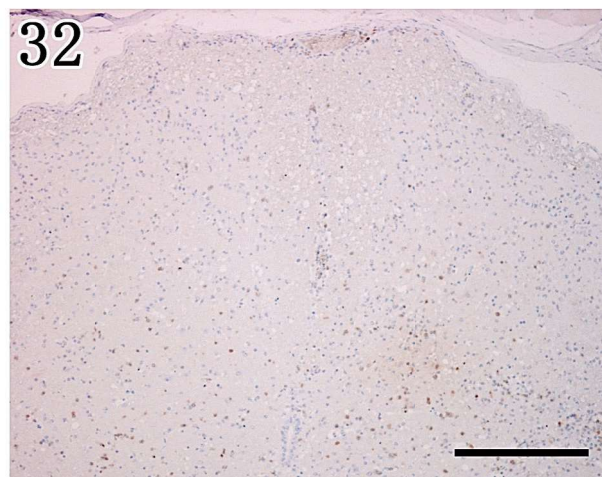
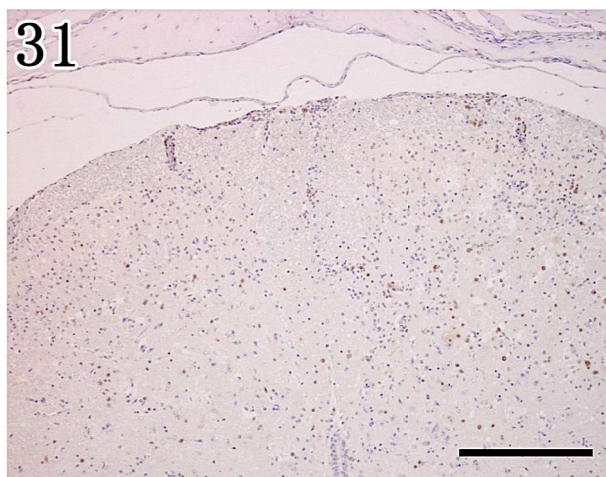
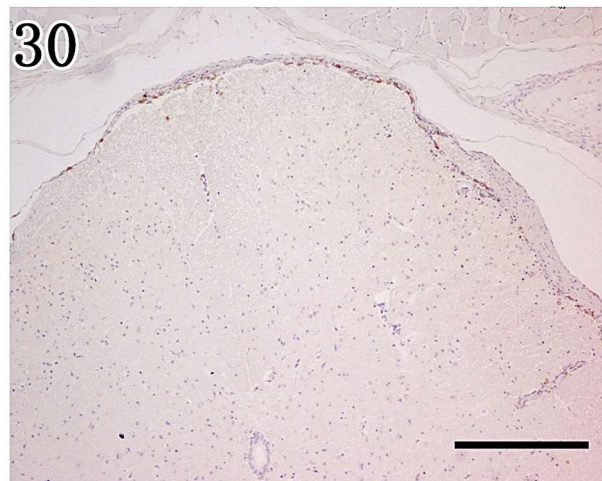
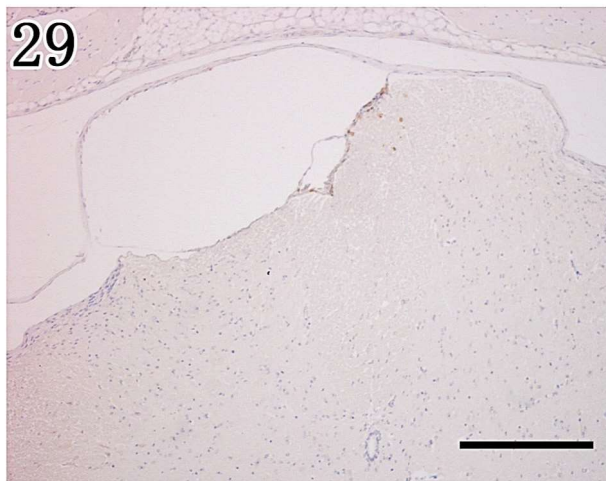
**Figs. 23, 24.** 脊髓. 5DPI. N0株接種群 (Fig. 23), N30株接種群 (Fig. 24). 両群ともに、灰白質と脊髓中心管周囲に線維性アストログリアが認められる。IHC (GFAP). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 25, 26.** 脊髓. 8DPI. N0株接種群 (Fig. 25), N30株接種群 (Fig. 26). 両群ともに、線維性アストログリアは増数している。脊髓灰白質と脳全域では、形質性アストログリアが顕著に増加している。IHC (GFAP). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 27, 28.** 脊髓. 11DPI. N0株接種群 (Fig. 27), N30株接種群 (Fig. 28). 両群ともに接種8日後に比べて線維性アストログリア、形質性アストログリアが増加している。IHC (GFAP). Bar=100 $\mu$ m.



## Figs. 29-34. CD3陽性細胞の比較



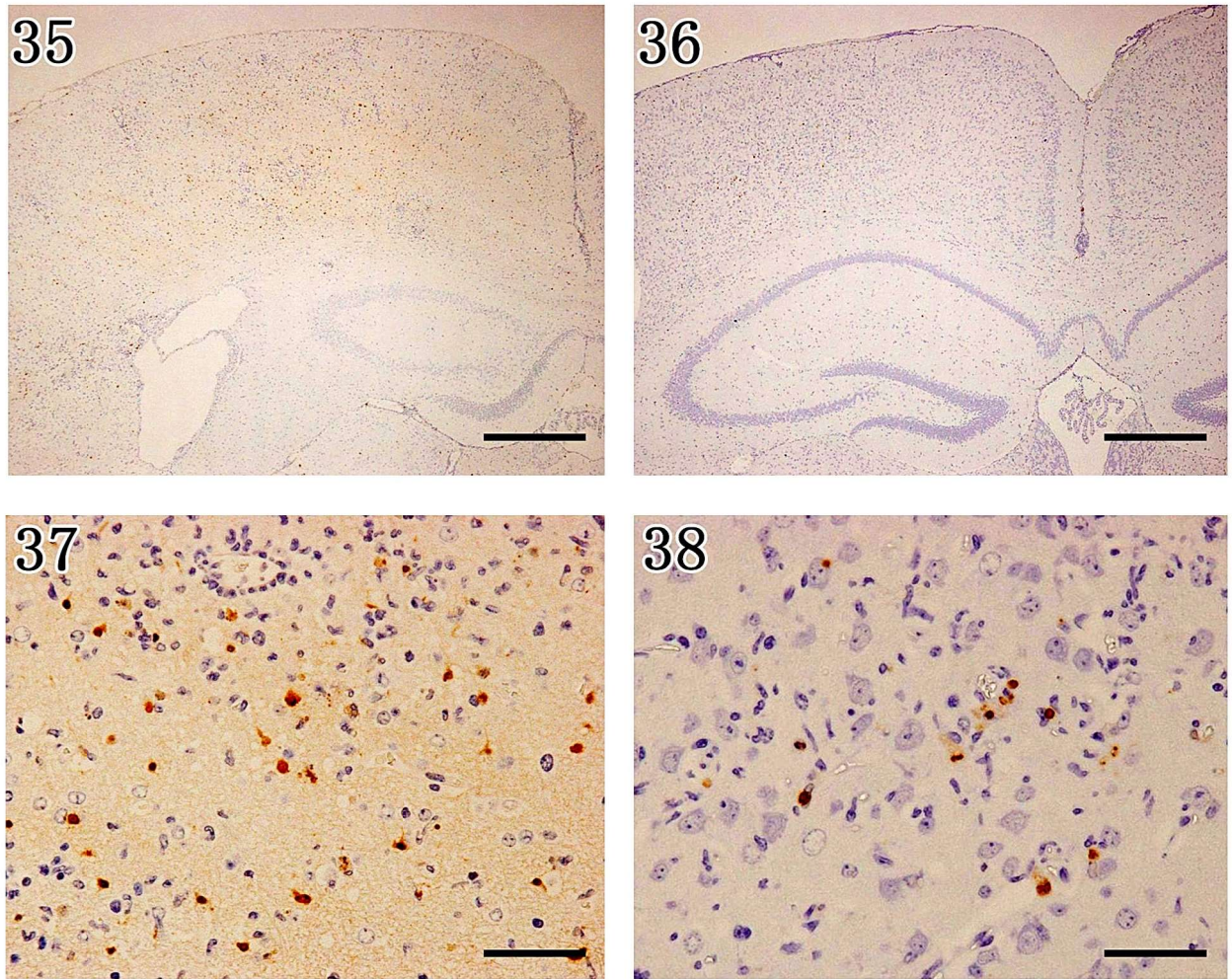
**Figs. 29, 30.** 腰髄. 5DPI. N0株接種群 (Fig. 29), N30株接種群 (Fig. 30). N30株接種群では脊髄実質に陽性像が観察される。IHC (CD3). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 31, 32.** 腰髄. 8DPI. N0株接種群 (Fig. 31), N30株接種群 (Fig. 32). 両群の脳、腰髄実質に陽性細胞が多数認められる。IHC (CD3). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 33, 34.** 大脳皮質. 11DPI. N0株接種群 (Fig. 33), N30株接種群 (Fig. 34). 陽性細胞は両群ともに増加している。IHC (CD3). Bar=100 $\mu$ m.



Figs. 35-38. 脳におけるアポトーシスの比較



**Figs. 35-38.** 大脳皮質. 11DPI. N0株接種群 (Figs. 35, 37), N30株接種群 (Figs. 36, 38). 両群とも陽性細胞が増加している。N0株接種群において、より多くの陽性細胞が認められる。Fig. 37, Fig. 38 はそれぞれ Fig. 35と Fig. 36の拡大像である。いずれの接種群においても小型円形細胞が陽性を示す。TUNEL. Bar=100 $\mu$ m (Figs. 35, 36), 50 $\mu$ m (Figs. 37, 38).

### 第Ⅲ章 街上毒（1088株）感染 BALB/c マウスおよび ヌードマウスの中樞神経系に関する比較病理組織学的研究

#### 緒言

一般的にウイルスに感染した CNS では非化膿性脳脊髄炎が観察される。非化膿性脳脊髄炎の三大特徴はグリア増数、神経食現象および血管周囲性炎症細胞浸潤（囲管性細胞浸潤）である。囲管性細胞浸潤を構成する炎症細胞は、主にリンパ球である。リンパ球の中で T リンパ球は CNS からウイルスを排除する重要な役割を担っている[3]。いっぽう、ウイルス感染後に T リンパ球がアポトーシスに陥ることによって、CNS におけるウイルス増殖が助長されることも明らかにされている[1,4]。また、狂犬病ウイルスの実験感染では、リンパ球の生体防御能に加え、麻痺症状に深く関与していることも明らかにされている[8,9]。

第Ⅱ章では、街上毒（1088株）とその継代株の感染実験を行い、1088株の感染初期における CNS へのリンパ球浸潤の抑制と感染末期におけるリンパ球のアポトーシスが致死に深く関与していることが示唆された。いっぽう、弱毒株では、リンパ球浸潤が感染初期に高度に誘導されるが、1088株に比較してリンパ球のアポトーシスは少数であった。このことから、ウイルス感染後の T リンパ球の増数とアポトーシスが生残率に深く関与している可能性が推測された。また、過度の炎症反応が組織損傷や神経細胞死を引き起こすことも知られている[2,5,10]。しかしながら、街上毒 1088株の病理発生における T リンパ球の役割については未だ不明である。

そこで、本章では、T リンパ球欠損が CNS におけるウイルス増

殖や致死にどのような影響を及ぼすのか、また、背根神経節に主座する神経節細胞の変性壊死と軸索変性が炎症に起因するかどうか明らかにするため、免疫正常マウスと T リンパ球欠損マウスに 1088 株を筋肉接種し、両者の病理発生機序について比較検討した。

## 材料方法

### 1. ウイルス、動物、接種経路

1088 株（第 1 章を参照）を 6 週齢、雌のヌードマウス（BALB/c AJcl-nu/nu, CLEA, Tokyo, Japan）と 6 週齢、雌、BALB/c マウス（BALB/c CrSlc, 日本エスエルシー, Shizuoka, Japan）の右大腿部に 10 の 6 乗 FFU ずつ筋肉内接種した。全ての実験は大分大学の実験動物ガイドラインに従って P3 施設で行われた。

### 2. 解剖および病理組織学的検索

1088 株接種群および陰性コントロール群をそれぞれ 3、5、8 日後（BALB/c *nu/nu* の 1088 株接種群は接種 3 日後に 10 匹、接種 3、5 日後に各 5 匹、陰性コントロールは 2 匹、BALB/c の 1088 株接種群は接種 3、5、8 日後に各 5 匹ずつ、陰性コントロール群は接種 3、5、8 日後に各 3 匹ずつ）に病理解剖した。また、接種後の臨床症状や体重変化について毎日記録した。

解剖はイソフルランを用いた深麻酔によりマウスを安楽死させた後、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて浸漬固定した。脊髓を含む脊椎および頭蓋は脱灰液 K-CX（Fujisawa, Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan）を 2 倍希釈して室温 12 時間脱灰し、その後 24 時間水洗した。脳は前頭葉、頭頂葉、小脳を含む脳幹で前額断し、脊髓は頸髓（以下 C）3～4、胸髓（以下 T）1～3、腰髓（以下 L）1～2、仙髓（以下 S）で、頭蓋は、切歯乳頭、眼球、舌有郭乳頭、三叉神経節を含む各面で前頭断し、切り出した。組織片は、上昇アルコール系列で脱水、クリアプラスで透徹後、パラフィン包埋した。包埋ブロックより 3  $\mu$

m の厚さで切片を作製し、定法によるヘマトキシリン・エオジン染色（以下 HE 染色）、特殊染色および免疫組織化学的検索に供した。

### 3. 免疫組織化学的検索

#### a) 抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

ウイルス抗原陽性細胞を同定するため、ウサギ抗狂犬病ウイルス P 蛋白質 (Rabies Phosphoprotein, anti-P) 抗体 [7] を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、0.25%トリプシンで抗原を賦活化し、0.3%過酸化水素加メタノール（室温、60分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応を抑制するため 10%正常ヤギ血清でブロッキングを行った。一次抗体として 1,200 倍した anti-P 抗体を、4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) を室温で 30 分反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性細胞数/mm<sup>2</sup>を計測した。

#### b) 抗 Iba1 抗体を用いたミクログリアの検出

CNS 内のミクログリアを同定するため、Rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 polyclonal (Iba1) 抗体 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、3%過酸化

水素加メタノール（室温、30分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。10%正常ヤギ血清（室温、1時間）で非特異反応をブロックした。一次抗体として500倍希釈した抗Iba1抗体を、4℃で一晩反応させた。PBS洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences) を室温で30分反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性細胞数/mm<sup>2</sup>を計測した。

c) 抗 GFAP 抗体を用いたアストログリアの検出

CNS 内のアストログリアを同定するため Rabbit anti Glial Fibrillary Acidic Protein polyclonal (GFAP) 抗体 (Nichirei Biosciences) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、3%過酸化水素加メタノール（室温、15分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、抗 GFAP 抗体を室温で60分反応させた。PBS洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences) を30分間反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化し、対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて脊髄内の陽性面積(%)を計測した。

d) 抗 CD3 抗体を用いた T リンパ球の検出

T リンパ球を同定するため Rabbit anti CD3 polyclonal (以下 CD3) 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase-K (DAKO) で

抗原を賦活化し、3%過酸化水素加メタノール（室温、30分）で内因性ペルオキシダーゼを除去した。その後、10%正常ヤギ血清（室温、60分）で非特異反応をブロックした。一次抗体は4℃で一晩反応させた。PBS洗浄後、Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit（DAKO）を30分間反応させ、Simple Stain DAB溶液（Nichirei Biosciences）で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

#### e) 抗CD20抗体を用いたBリンパ球の検出

Bリンパ球を同定する目的で Rabbit anti CD20 polyclonal（CD20）抗体（Thermo Scientific, MA, U.S.A.）を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、マイクロウェーブ（750W、5分）により抗原性を賦活化した。3%過酸化水素加メタノール（室温、30分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応をブロックするため10%正常ヤギ血清（室温、30分）を反応させた。一次抗体は4℃で一晩反応させた。二次抗体は Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit（DAKO）を30分間反応させ、Simple Stain DAB溶液（Nichirei Biosciences）で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

免疫組織化学染色に用いた一次抗体と反応条件は表1に示した。

#### 4. TUNEL法を用いたアポトーシス細胞の検出

アポトーシス細胞を検出する目的で、市販のキット（Apop Tag®



Plug peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore Corp., Billerica, MA, U.S.A.) を用いて TUNEL 法を行った。脱パラフィン後、下降アルコールによる水和、水洗をした。前処理として Proteinase-K (DAKO) により透過処理を行った。その後、3%過酸化水素加メタノール（室温、15 分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。さらに、アポトーシスに特有な 3'-OH DNA 断片を検出するために Equilibration Buffer を室温で 30 分反応させた。次に TdT enzyme digoxigenin を 37℃ で 1 時間反応させ、その後 37℃ に温めた Stop buffer に 10 分間反応させた。そして Anti-Digoxigenin-Peroxidase 液を室温で 30 分間反応させた後、DAB 基質で可視化させた。その後ヘマトキシリンで核染色を施した。

## 5. 血中中和抗体価 (VNA)

2%FCS 含有 MEM で二倍希釈した血清を 96 ウェルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に加えた。CVS-11 (100TCID<sub>50</sub>) を各ウェルに加え、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで 37℃、90 分培養し、さらに BHK-21 細胞を加え 24 時間培養した。細胞を 90%アセトンで固定し、抗狂犬病 N 蛋白質モノクローナル抗体 (Fujirebio Diagnostics, Inc., PA, U.S.A.) を 37℃、45 分反応させた後に蛍光顕微鏡下で観察した。2 列の平均を算出し、WHO 国際基準 [Anti-rabies Immunoglobulin, human National Institute for Biological Standards & Control (NIBSC)] と比較して VNA を算出した [11]。0.5IU/ml 以上の VNA は狂犬病に対する防御に適切であると定められている。



## 結果

### 1. 臨床症状およびウイルス中和抗体値（VNA）

臨床症状を比較したところ、BALB/c では接種 7 日後に 1 匹において軽度の麻痺症状が認められた。接種 8 日後には全てが軽度の麻痺症状、接種 9 日後には全てが重度の麻痺症状を呈し、接種 12 日後では全てが瀕死状態であった。BALB/c *nu/nu* では、接種 7 日後に 2 匹が軽度の麻痺症状、1 匹が重度の麻痺症状を呈した。接種 8 日後には全てが重度の麻痺症状を呈し、接種 11 日では全てが瀕死状態であった。臨床症状、発現時期および生存率に大きな違いは認められなかった（図 1）。

病理組織検索に用いたマウスは、BALB/c 群では接種 8 日後に軽度な麻痺症状（立毛が 3 匹、踏み外しが 2 匹）が 5 匹に観察された。BALB/c *nu/nu* では接種 8 日後に軽度な麻痺症状（体重減少）が 1 匹と明瞭な神経症状が 4 匹であった（表 2）。

ウイルス中和抗体値（VNA）は接種 3 日後では大きく違いは認められなかったが、接種 5、8 日後では BALB/c *nu/nu* において顕著に低かった。

### 2. 病理組織的検索（Figs.1-11）

接種 3 日後では特記すべき病理所見は認められなかった。

接種 5 日後より、BALB/c、BALB/c *nu/nu* とともに右側背根神経節の神経細胞の一部において、ニッスル顆粒の辺縁移動、細胞質の膨化および核の濃縮が観察された。脳においては顕著な変化は認められなかった。接種 8 日後では BALB/c、BALB/c *nu/nu* とともに両側の背根神経節において、神経節細胞の膨化、好酸性の増加、

空胞化が認められた。また、核濃縮と小型化が認められた。これらの変性壊死した神経節細胞は BALB/c では腰髄のみに認められたが、BALB/c *nu/nu* では腰髄から頸髄にかけて広範囲に分布していた (Figs.1-4)。脊髄では、右側脊髄背角において空胞化がみられた。左右腹角および左背角に存在する神経細胞の細胞質においても空胞化が観察された。両群ともに軟膜や血管周囲に単核細胞の浸潤が認められた。特に、BALB/c ではリンパ球による囲管性細胞浸潤が顕著であった (Fig.5,6)。脳では軟膜の血管周囲において少数の単核細胞の浸潤が認められた。実質ではグリアの軽度の増生が認められた。BALB/c *nu/nu* の大脳皮質の層構造は BALB/c と比較してやや不整であった (Figs.7-10)。また、BALB/c *nu/nu* の赤核および大脳皮質では好酸性均一な細胞質を有する神経細胞が時折観察された (Figs.10, 11)。頭蓋の三叉神経節では、背根神経節と同様の変性・壊死を示す神経節細胞が散見された。

### 3. 免疫組織化学的検索 (Figs.12-32)

#### a) 抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出 (Figs.12-28)

接種 3 日後、1 匹の BALB/c の腰髄においてウイルス抗原陽性細胞が少数 (1-2 個) 認められた (Figs.12,13)。接種 5 日後では、両群ともに脊髄および脳においてウイルス抗原陽性細胞が増加していた。背根神経節では、変性した細胞に一致して陽性像が認められた。左側の背根神経節では少数の神経節細胞が陽性を示した。脊髄実質では、右側背角の神経細胞およびその周囲の軸索あるいは樹状突起において多数観察された。いっぽう、両側腹角お

よび左側背角では、少数の神経細胞が陽性であった (Figs.14,15)。脊髄白質では、腰髄、胸髄、頸髄の薄束において陽性像が認められた。脳では延髄の左腹側および背側の神経細胞に少数の陽性像がみられた (Figs.18,19)。左側赤核および左側大脳皮質の運動野においても少数の神経細胞が抗体陽性を示した。頭蓋では BALB/c *nu/nu* の三叉神経節において少数のウイルス抗原陽性細胞が観察された。接種 8 日後では、脊髄および脳において陽性細胞数が著しく増加していた。両側の背根神経節、両側の脊髄灰白質にも多数観察された (Figs.16,17)。また、BALB/c *nu/nu* の交感神経幹神経節の神経節細胞にウイルス抗原が散見された。脳では、延髄の背・腹側、小脳プルキンエ細胞、小脳脚、左右大脳皮質、左右大脳皮質基底核、視床下部、外側視床、赤核において多数の陽性細胞が認められた (表 3, Figs.20,21)。頭蓋では、BALB/c *nu/nu* において、三叉神経節、網膜、角膜上皮、耳下腺、顔面皮膚、顔面筋肉 (筋紡錘)、眼瞼上皮、上顎口唇および舌粘膜にも多数の陽性像が認められた (図 2A)。特に、三叉神経節の神経節細胞および神経線維 (Fig.22)、舌粘膜、角膜では顕著であった。角膜では角膜前上皮と眼瞼結膜が陽性像を示した (Figs.23,24)。網膜では、外顆粒層から視神経線維層にかけて陽性像が観察された (Figs.23,25)。皮膚、洞毛 (Fig.26) および上顎口唇 (Fig.27) においては、表皮ならびに末梢神経が陽性を示し、時折外根鞘にも陽性像が観察された。舌では、粘膜上皮 (Fig.28) および舌乳頭 (味蕾) に認められた。

両群の脊髄におけるウイルス抗原陽性細胞数を比較したところ、接種 5 日後では腰髄において BALB/c *nu/nu* が顕著に多く、

接種 8 日後においては胸髄において BALB/c *nu/nu* の方が顕著に多かった (図 2B)。また、接種 8 日後の脳におけるウイルス抗原陽性細胞は BALB/c *nu/nu* において多く広範囲に及んでいた。

b) 抗 Iba1 抗体を用いたミクログリアの検出 (Figs.29,30)

接種 3 日後では、両群間に大きな違いは認められなかった。接種 5 日後では、BALB/c *nu/nu* の腰髄右側背角において Iba1 陽性細胞が多数認められ、仙髄の右側背根神経節においても陽性細胞が散見された。延髄においても反応性ミクログリアが散見された。接種 8 日後では、両群の脊髄において右側背角を中心に多数の反応性ミクログリアが観察された (Figs.29,30)。ミクログリアの細胞質は太い分岐状あるいは樹枝状を呈していた。両側の腰仙髄の背根神経節においても陽性細胞が散見された。延髄、橋、小脳分子層、中脳および大脳皮質において反応性ミクログリアが増加していた。中脳では赤核において陽性細胞が集簇していた。両群の Iba1 陽性細胞数に違いは認められなかった (図 3A)。

c) 抗 GFAP 抗体を用いたアストログリアの検出 (Figs.31,32)

接種 3、5 日後では、脊髄白質の軟膜浅層に主座する線維状の陽性反応が観察された。接種 8 日後では、軟膜浅層から灰白質に及んで陽性細胞数とその面積が増加していた (Figs.31,32)。両群の GFAP 陽性面積に大きな違いは認められなかった (図 3B)。

d) 抗 CD3 抗体を用いた T リンパ球の検出

BALB/c では、感染が進むにつれて CNS 内における CD3 陽性

細胞が増加したが、BALB/c *nu/nu* では観察されなかった。

e) 抗 CD20 抗体を用いた B リンパ球の検出

両群共に、いずれの感染時期においても認められなかった。

4. TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の検出 (Figs.33,34)

BALB/c では、接種 8 日後から脳、脊髄において陽性細胞が認められた。陽性細胞の大半が単核細胞であった (Fig.33)。また、単核細胞の陽性像は、軟膜や血管周囲において多くみられた。BALB/c *nu/nu* ではアポトーシスは認められなかった (Fig.34)。

## 考 察

本章では、Tリンパ球欠損が CNS におけるウイルス増殖や致死にどのような影響を及ぼすのか、また、背根神経節に主座する神経節細胞の変性壊死と軸索変性が炎症に起因するかどうかについて比較検討した。

ウイルス抗原陽性細胞数について比較したところ、ヌードマウスにおいて多く、接種 8 日後では末梢組織の広い範囲において検出された。このことから、Tリンパ球の存在下ではウイルスの増殖が抑制されることが示唆された。しかし、今回の実験では、Tリンパ球欠損が致死率を増強させるかどうかについては明らかにできなかった。既報では、免疫抑制マウスあるいはヌードマウスに固定毒を接種すると、免疫正常マウスに比べて免疫不全マウスにおいてウイルス抗原陽性細胞数が増加・広範囲に認められ、致死性の脳炎を引き起こすことが明らかになっている[2,5]。このことから狂犬病の病原性には Tリンパ球が深く関与していることが推察される。Tリンパ球はウイルスの感染拡大を妨ぐとともに、細胞性免疫において重要な役割を果たす[1,3]。今回の実験においても、Tリンパ球の欠損がウイルス抗原陽性細胞数を増加させること、また、それに伴う組織病変が広範囲に及ぶことが明らかとなった。

Rossiter [6]らはリンパ球浸潤や獲得免疫が神経節細胞の変性壊死に関与していると報告しているが、今回 Tリンパ球が欠損したヌードマウスにおいても神経節細胞の変性壊死が認められた。また、これらの細胞変性がヌードマウスにおいてより顕著であったことから、神経節細胞の変性壊死は Tリンパ球に起因する二次



的な細胞傷害ではなく、ウイルス増殖による直接的な変化として解釈された。すなわち、ウイルス接種 8 日後に免疫正常マウスに認められたリンパ球浸潤は、神経節細胞の変性壊死に対する二次的な炎症反応である可能性が考えられる。しかし、これらの変性壊死細胞の周囲には Iba1 陽性マクロファージも多数浸潤しており、マクロファージに起因する組織傷害である可能性も否定できない。

以上の成績から、T リンパ球が CNS におけるウイルスの増殖と末梢組織への親和性を抑制すること、並びに神経節細胞の変性壊死がウイルス増殖による直接的変化であることが示唆された。しかしながら、ヌードマウスの CNS 及び背根神経節には Iba1 陽性細胞も多数観察された。狂犬病の病理発生におけるマクロファージの役割については不明であり、今後この点については更に検討する必要があると思われる。

## 小 括

本章では、Tリンパ球欠損によって CNS におけるウイルスの増殖と致死性が増強するか、また、背根神経節に主座する変性壊死細胞や軸索変性の原因を明らかにさせるため、免疫正常マウスと免疫不全マウスに 1088 株を筋肉内接種し、両者の組織病変の違いを比較検討した。

ウイルス抗原陽性細胞数は、ヌードマウスにおいて多く、接種 8 日後には頭部の広い範囲の末梢組織へ感染が拡大していた。このことから、Tリンパ球が直接的あるいは間接的にウイルスの増殖を抑制していた可能性が示唆される。背根神経節に主座する神経節細胞の変性壊死や軸索変性像は両群のマウスにみられるが、ヌードマウスにおいて顕著であった。このことから、神経節細胞の変性壊死が炎症反応に起因するものではなく、ウイルス感染に起因する直接的な細胞傷害である可能性が示唆された。しかし、病変部にはリンパ球のほかにも Iba1 陽性マクロファージが多数集簇しており、マクロファージが細胞や組織傷害に関与していた可能性も完全に否定できない。この点については更に検討する必要があると思われる。

### 第 III 章 参考文献

1. Baloul, L. and Lafon, M. 2003. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie* **85**: 777–788.
2. Galelli, A., Baloul, L. and Lafon, M. 2000. Abortive rabies virus central nervous infection is controlled by T lymphocyte local recruitment and induction of apoptosis. *J. Neurovirol.* **6**: 359–372.
3. Hooper, D. C., Morimoto, K., Bette, M., Weihe, E., Koprowski, H. and Dietzschold, B. 1998. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J. Virol.* **72**: 3711–3719.
4. Jackson, A. C. 2011. Evasive Strategies in Rabies. pp. 33–53. *In*: Advances in Virus Research. (Lafon, M. ed.), Academic Press, Burlington.
5. Lafon, M. 2005. Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **289**: 239–258.
6. Rossiter, J. P., Hsu, L. and Jackson, A. C. 2009. Selective vulnerability of dorsal root ganglia neurons in experimental rabies after peripheral inoculation of CVS-11 in adult mice.

*Acta Neuropathol.* **118**: 249–259.

7. Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T. and Morimoto, K. 2004. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology* **318**: 295–305.
8. Smith, J. S., McClland, C. L., Reid, F. L. and Baer, G. M. 1982. Dual role of the immune response in street rabiesvirus infection of mice. *Infect. Immun.* **35**: 213–221.
9. Sugamata, M., Miyazawa, M., Mori, S., Spangrude, G. J., Ewalt, L. C. and Lodmell, D. L. 1992. Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. *J. Virol.* **66**: 1252–1260.
10. Weiland, F., Cox, J. H., Meyer, S., Dahme, E. and Reddehase, M. J. 1992. Rabies virus neuritic paralysis: immunopathogenesis of nonfatal paralytic rabies. *J. Virol.* **66**: 5096–5099.
11. Yamada, K., Park, C. H., Noguchi, K., Kojima, D., Kubo, T., Komiya, N., Matsumoto, T., Mitui, M. T., Ahmed, K., Morimoto, K., Inoue, S. and Nishizono, A. 2012. Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: Potential role of the

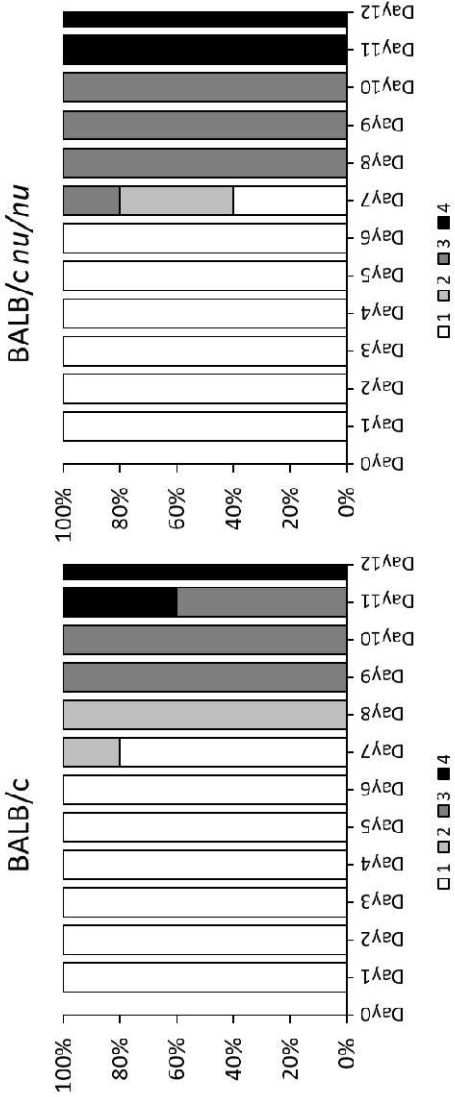
additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res.* **165**: 34–45.

表 1. 使用した抗体と条件

| 抗体名  | 会社名      | 性状         | 希釈倍率              | 温度/反応時間 | 抗原賦活化  | 二次抗体   |
|------|----------|------------|-------------------|---------|--|--|
| P    | 感染研      | polyclonal | 1:1200            | 4°C/一晚  | 0.25%トリプシン(室温/30分)<br>Waterbath(20分),<br>10mMクエン酸ナトリウムバッファー<br>(pH6.0) | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                      |
| Iba1 | Wako     | polyclonal | 1:500             | 4°C/一晚  |  | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                      |
| GFAP | NICHIREI | polyclonal | RTU <sup>1)</sup> | 室温/60分  | -  | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                      |
| CD3  | DAKO     | polyclonal | RTU               | 4°C/一晚  | Proteinase-K(室温/10分)   | Envision+® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Rabbit |
| CD20 | DAKO     | polyclonal | 1:400             | 4°C/一晚  | Autoclave(121°C/10分),<br>抗原賦活化液(pH9.0)                                 | Envision+® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Rabbit |

1) RTU: Ready to use

図 1. 臨床症状の経日的変化



1: non-paralysis, 2: mild paralysis, 3: severe paralysis, 4: moribund

表 2. 病理組織検索に用いた検体の臨床症状

| Days post<br>inoculation (dpi) |                     | Paralysis/Total (%) |          |               |                                    |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|----------|---------------|------------------------------------|
|                                |                     | mouse               | virus    | Non-paralysis | mild paralysis    severe paralysis |
| 3dpi                           | BALB/c              | 1088                | 5/5(100) | 0/5(0)        | 0/5(0)                             |
|                                | BALB/c <i>nu/nu</i> | 1088                | 5/5(100) | 0/5(0)        | 0/5(0)                             |
| 5dpi                           | BALB/c              | 1088                | 5/5(100) | 0/5(0)        | 0/5(0)                             |
|                                | BALB/c <i>nu/nu</i> | 1088                | 5/5(100) | 0/5(0)        | 0/5(0)                             |
| 8dpi                           | BALB/c              | 1088                | 0/5(0)   | 5/5(100)      | 0/5(0)                             |
|                                | BALB/c <i>nu/nu</i> | 1088                | 0/5(0)   | 1/5(20)       | 4/5(80)                            |

表 3. 脳におけるウイルス抗原陽性の検体(%)

|      | BN                        | CC   | Mb   | Tha  | Cereb | Pons | Medu | TC   | LC   |
|------|---------------------------|------|------|------|-------|------|------|------|------|
| 3DPI | BALB/c (N=5)              | 0%   | 0%   | 0%   | 0%    | 0%   | 0%   | 20%  | 20%  |
|      | BALB/c <i>nu/nu</i> (N=5) | 0%   | 0%   | 0%   | 0%    | 0%   | 0%   | 0%   | 0%   |
| 5DPI | BALB/c (N=5)              | 0%   | 60%  | 0%   | 0%    | 80%  | 60%  | 40%  | 80%  |
|      | BALB/c <i>nu/nu</i> (N=5) | 40%  | 75%  | 0%   | 20%   | 50%  | 80%  | 60%  | 80%  |
| 8DPI | BALB/c (N=5)              | 40%  | 100% | 80%  | 80%   | 100% | 100% | 100% | 100% |
|      | BALB/c <i>nu/nu</i> (N=5) | 100% | 100% | 100% | 100%  | 100% | 100% | 100% | 100% |

BN:大脳基底核, CC:大脳皮質, MB:中脳, Tha:視床, Cereb:小脳, Pons:橋, Medu:延髄, TC:胸髄LC:腰髄



図 2. ウイルス抗原陽性細胞数と頭蓋における分布

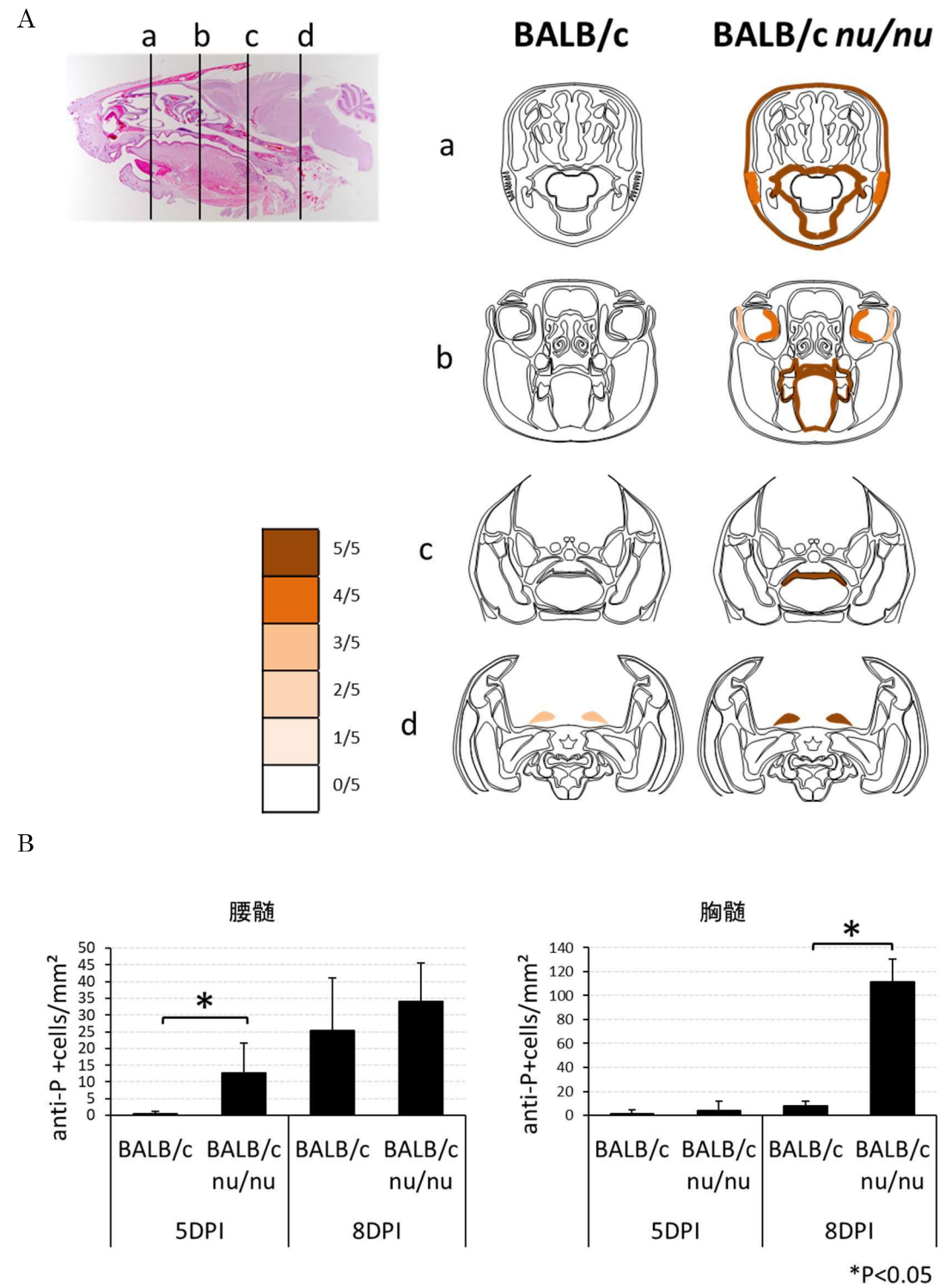
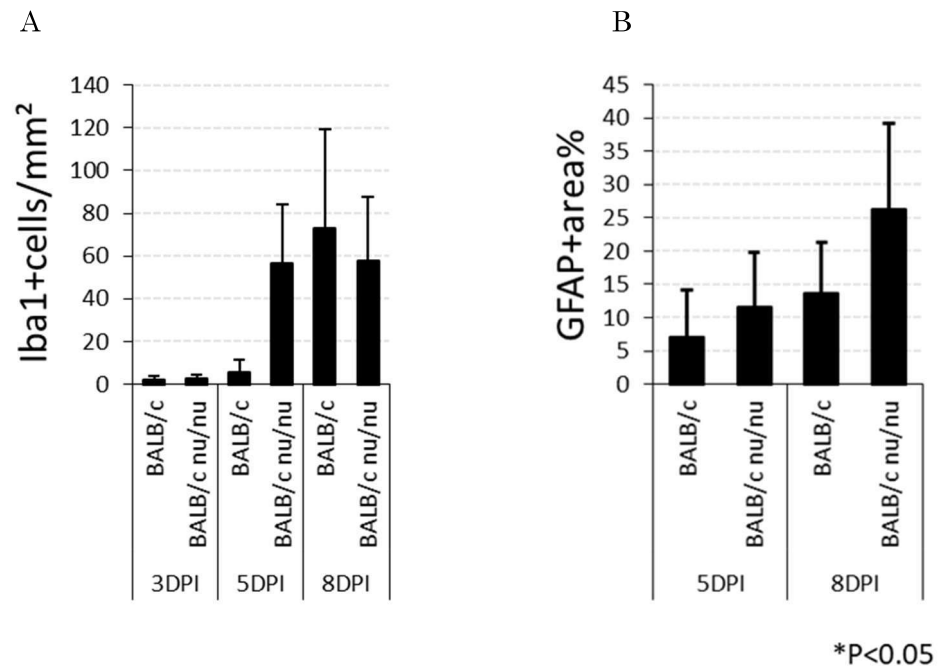
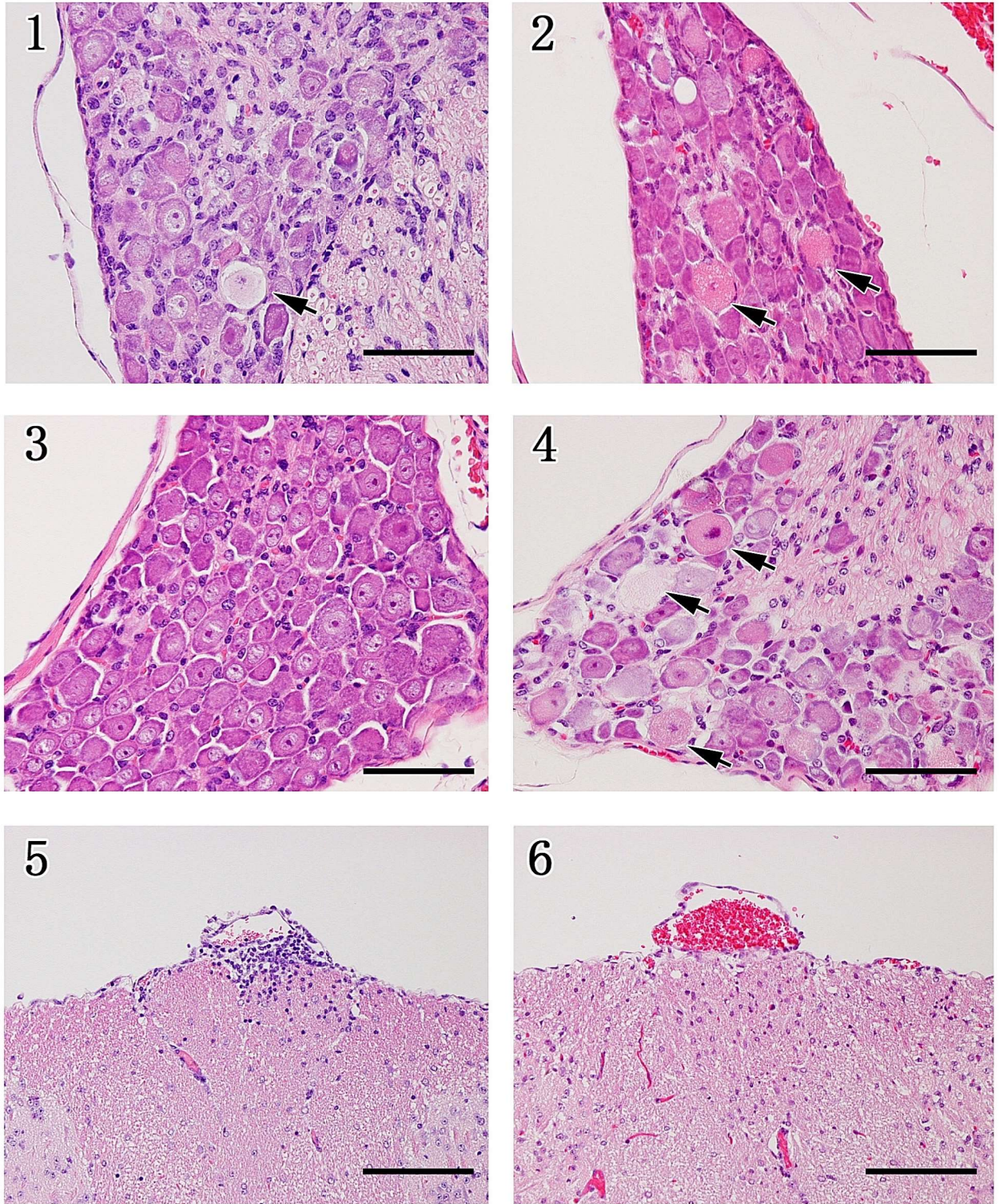


図 3. BALB/c および BALB/c nu/nu におけるグリア反応の比較





Figs. 1-6. 背根神経節・脊髄における病理組織変化の比較



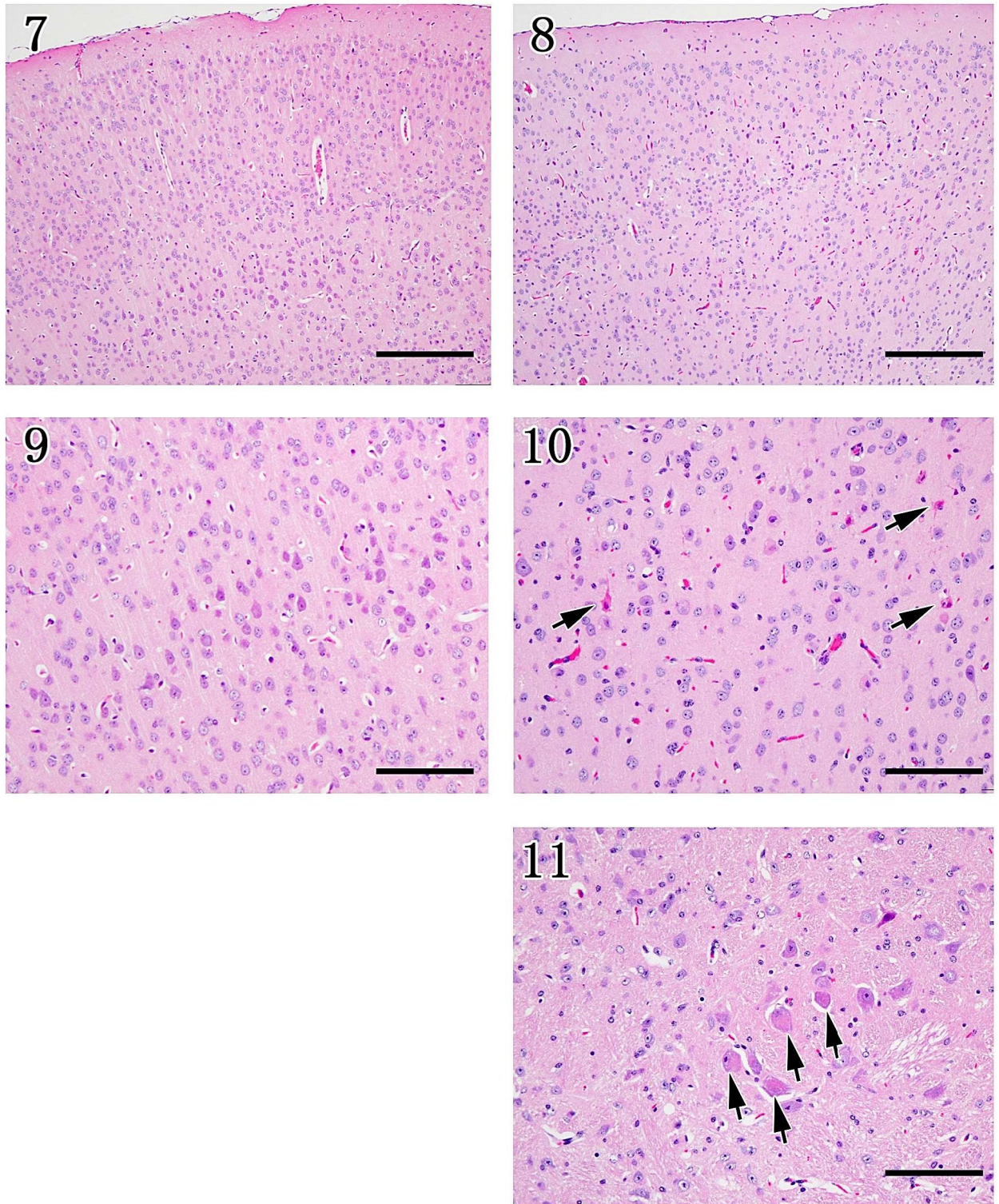
**Figs. 1, 2.** 腰髄背根神経節. 8DPI. BALB/c (Fig. 1), BALB/c *nu/nu* (Fig. 2). 両群マウスともに腰髄の神経節細胞に変性壊死が認められる (矢印)。HE. Bar=50μm.

**Figs. 3, 4.** 胸髄背根神経節. 8DPI. BALB/c (Fig. 3), BALB/c *nu/nu* (Fig. 4). BALB/c *nu/nu* の胸髄の神経節細胞に、変性壊死が認められる (矢印)。BALB/cでは変性壊死が認められない。HE. Bar=50μm.

**Figs. 5, 6.** 腰髄. 8DPI. BALB/c (Fig. 5), BALB/c *nu/nu* (Fig. 6). BALB/cでは囲管性細胞浸潤が顕著である。HE. Bar=50μm.



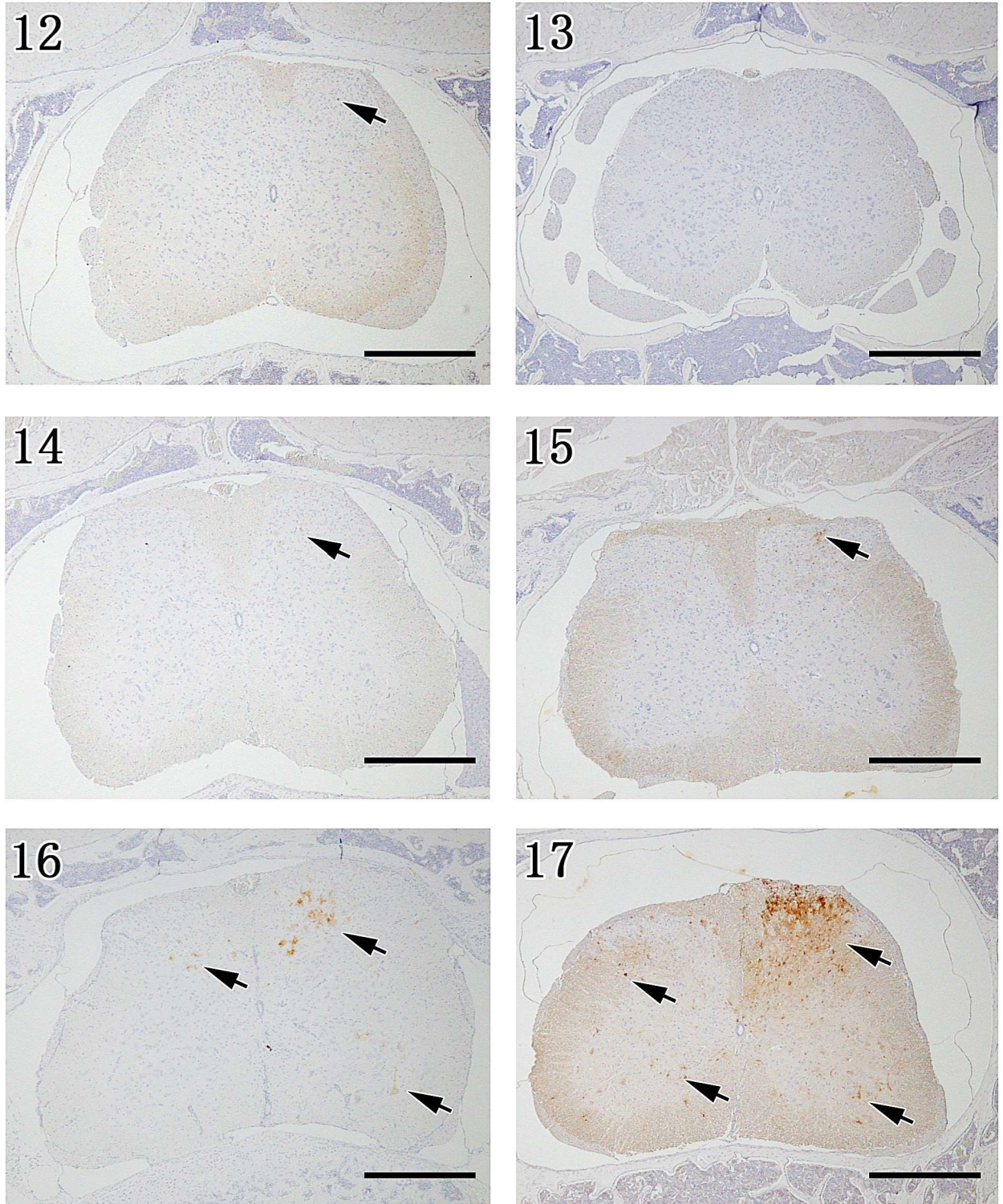
Figs. 7-11. 脳における病理組織変化の比較



**Figs. 7-11.** 大脳皮質 (Figs. 7-10), 中脳赤核 (Fig. 11). 8DPI. BALB/c (Figs. 7, 9), BALB/c *nu/nu* (Figs. 8, 10, 11). BALB/c *nu/nu*の層構造はBALB/cと比較してやや不整である。また、BALB/c *nu/nu*の大脳皮質および赤核では、好酸性均一な細胞質を有する神経細胞が時折観察される (Figs. 10, 11 矢印)。HE. Bar=100 $\mu$ m (Figs. 7, 8), 50 $\mu$ m (Figs. 9-11).



Figs. 12-17. 脊髄におけるウイルス抗原分布の比較



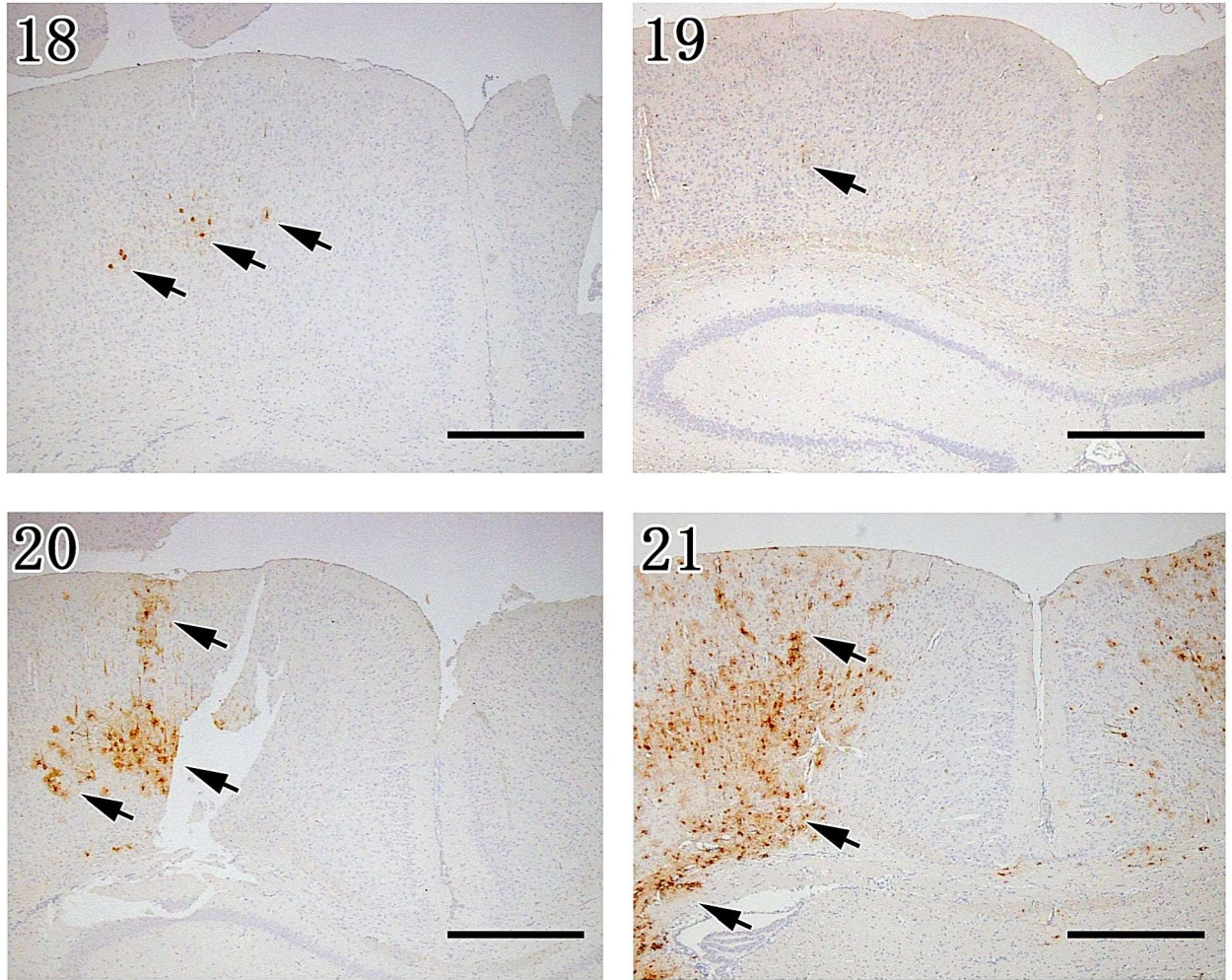
**Figs. 12, 13.** 腰髄. 3DPI. BALB/c (Fig. 12), BALB/c *nu/nu* (Fig. 13). 1匹のBALB/cの腰髄にウイルス抗原が少数認められる (Fig. 12 矢印)。それ以外のマウスでは認められない。IHC (anti-P). Bar=500 $\mu$ m.

**Figs. 14, 15.** 腰髄. 5DPI. BALB/c (Fig. 14), BALB/c *nu/nu* (Fig. 15). 両群ともに、右側背角の神経細胞およびその周囲の軸索においてウイルス抗原が多数観察される (矢印)。一方、両側腹角および左側背角では少数である。IHC (anti-P). Bar=500 $\mu$ m.

**Figs. 16, 17.** 腰髄. 8DPI. BALB/c (Fig. 16), BALB/c *nu/nu* (Fig. 17). 両群ともに、両側の背角、腹角にウイルス抗原が多数観察される (矢印)。IHC (anti-P). Bar=500 $\mu$ m.



Figs. 18-21. 脳におけるウイルス抗原分布の比較



**Figs. 18, 19.** 大脳皮質. 5DPI. BALB/c (Fig. 18), BALB/c *nu/nu* (Fig. 19). 両群とも延髄の左腹側および背側の神経細胞、左側赤核および左側大脳皮質のM1領域 (矢印) に少数の陽性細胞が認められる。IHC (anti-P). Bar=500 $\mu$ m.

**Figs. 20, 21.** 大脳皮質. 8DPI. BALB/c (Fig. 20), BALB/c *nu/nu* (Fig. 21). 両群とも接種5日後に比べて陽性細胞が増加している (矢印)。IHC (anti-P). Bar=500 $\mu$ m.



Figs. 22-28. 頭蓋におけるウイルス抗原の分布

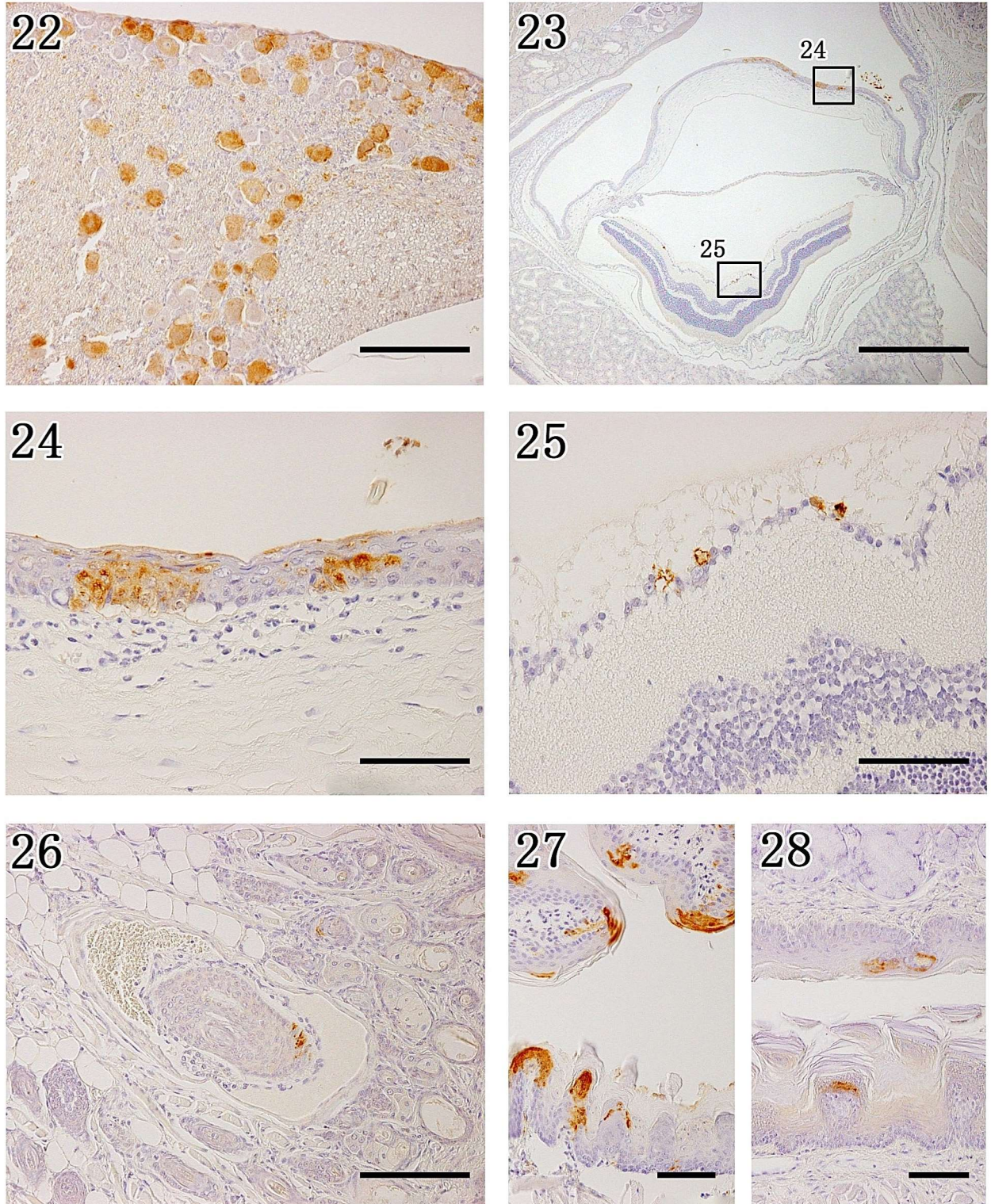


Fig. 22. 三叉神経節. 8DPI. BALB/c *nu/nu*. 神経節細胞と神経線維が陽性を示す。IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m.

Figs. 23-25. 眼球. 8DPI. BALB/c *nu/nu*. 角膜の角膜前上皮 (Fig. 24)、網膜の視神経線維層 (Fig. 25) にウイルス抗原が認められる。IHC (anti-P). Bar=500 $\mu$ m (Fig. 23), 50 $\mu$ m (Figs. 24, 25).

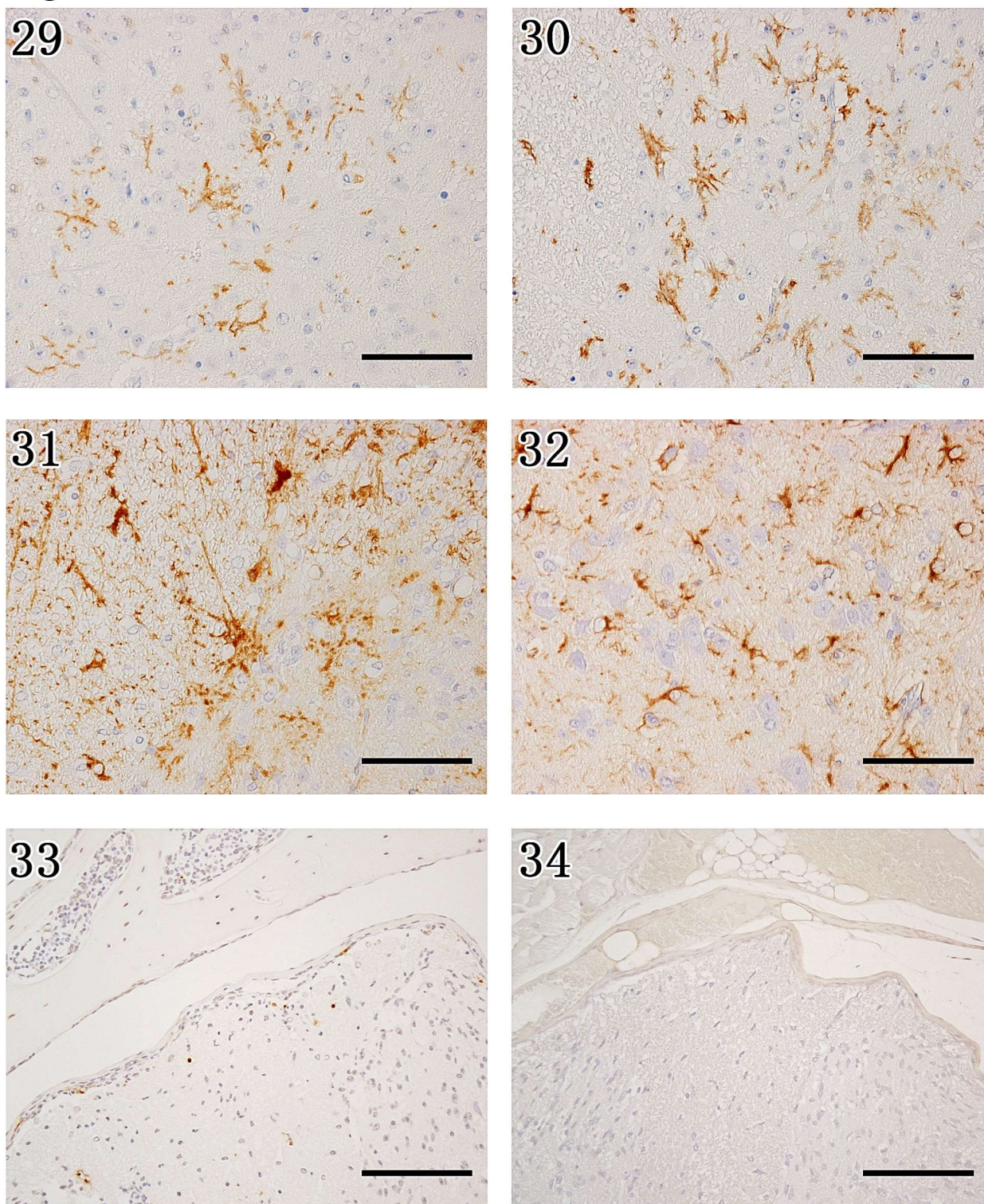
Fig. 26. 洞毛. 8DPI. BALB/c *nu/nu*. 末梢神経および外根鞘の一部が陽性を示す。IHC (anti-P). Bar=100 $\mu$ m.

Fig. 27. 口唇. 8DPI. BALB/c *nu/nu*. 粘膜上皮が陽性を示す。IHC (anti-P). Bar=50 $\mu$ m.

Fig. 28. 舌. 8DPI. BALB/c *nu/nu*. 粘膜上皮が陽性を示す。IHC (anti-P). Bar=50 $\mu$ m.



## Figs. 29-34. グリア細胞とアポトーシスの比較



**Figs. 29, 30.** 腰髄. 8DPI. BALB/c (Fig. 29), BALB/c *nu/nu* (Fig. 30). 両群ともに右背角を中心に多数の反応性ミクログリアが観察される。IHC (Iba1). Bar=50 $\mu$ m.

**Figs. 31, 32.** 腰髄. 8DPI. BALB/c (Fig. 31), BALB/c *nu/nu* (Fig. 32). 両群ともに軟膜浅層から灰白質に陽性細胞数の増加が認められる。IHC (Iba1). Bar=50 $\mu$ m.

**Figs. 33, 34.** 腰髄. 8DPI. BALB/c (Fig. 33), BALB/c *nu/nu* (Fig. 34). BALB/cにおいてアポトーシスが認められるが、BALB/c *nu/nu*では認められない。TUNEL. Bar=100 $\mu$ m.



## 第IV章 1088-N4#14株感染後に耐過したマウスの麻痺症状に

### 関する組織病理学的研究

#### 緒言

ウイルス性脳炎から生還するためには免疫反応によりウイルスを排除することが重要である。また、麻痺症状、発作、認知障害などの後遺症を防ぐには神経細胞の機能障害を防ぐ必要がある[5]。ウイルス感染後の生残例にみられる後遺症は、Polio virus 感染における下位運動ニューロン傷害に伴う後肢の機能不全[14]、Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) による脱髄性機能障害[19]、Mouse hepatitis virus による脱髄性機能障害[18]などがよく知られている。

狂犬病ウイルス感染後に後遺症を残して生還した例はこれまでに13例報告されている[1,3,4,6,9,12,13,15,20]。後遺症は四肢不全麻痺が主体であるが、なぜこのような後遺症を残して生き残ることが出来たかについてはわかっていない。

1088株はウッドチャックから分離された街上毒であり、この変異株である弱毒株1088-N4#14株はG蛋白質の196番目がアルギニンからセリンに、P蛋白質の61番目がグリシンからグルタミンに置換されている。親株である1088株はG蛋白質に2カ所の糖鎖付加がみられるが、1088-N4#14株では3カ所に糖鎖付加がみられる。また、親株である1088株と比較すると1088-N4#14株はNA細胞（マウス神経芽細胞腫由来の株化細胞）での増殖が強い。しかし、マウスへの末梢感染実験を行うと、1088株と比較して脳病変が限局性であり、多くが感染成立後に生き残る。死亡例と生き残った検体の中和抗体値は親株に比較して高いことが

報告されている[21]。したがって、1088-N4#14 はヒトの生残例の病理発生機序を解明するのによい実験モデルとして期待される。

本研究では、狂犬病の生残例にみられる後遺症の原因が何に由来するかを明らかにするため、1088-N4#14 株をマウスの後肢筋肉内に接種し生残例を中心に組織病変の違いを比較した。

## 材料方法

### 1. ウイルス、動物、接種経路

1088-N4#14 株は、マウス神経芽腫由来細胞（NA 細胞）で 4 代継代されたウイルスストックから限界希釈法によりクローニングした株である [21]。さらに、クローニングおよび増幅の過程において NA 細胞で 3 回継代している。大分大学医学部微生物学研究室における全ゲノム解析の結果、1088（N0）株の G 蛋白の遺伝子上には 37 と 319 のアスパラギン酸（以下 Asn）の 2 カ所に糖鎖付加（N-glycosylation）が認められ、1088-N4#14 の G 蛋白の遺伝子上ではそれら 2 カ所に加え 194 の Asn に糖鎖付加が起こり、ゲノム全体に 2 カ所の変異（mutation）が認められている（図 1）。このウイルス液を 6 週齢、雌の *ddY* マウス（Kyudo, Saga, Japan）の右大腿部に 10 の 5 乗 FFU ずつ筋肉内接種した。全ての実験は大分大学の実験動物ガイドラインに従って P3 施設で行われた。

### 2. 解剖および病理組織学的検索

1088-N4#14 株接種群と陰性コントロール群をそれぞれ接種 5、8、11 日後に各 5 匹、接種 30 日後に 13 匹、63 日後に 15 匹ずつ病理解剖した。また、接種後の臨床症状や体重変化について毎日記録した。接種 30 日以降の個体を生残例として判断した。

解剖はイソフルランを用いた深麻酔によりマウスを安楽死させた後、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて浸漬固定した。解剖時に採材した血液は、ウイルス中和抗体値（VNA）の測定に用いた。脊髄を含む脊椎は脱灰液 K-CX（Fujisawa, Pharmaceutical

Co., Ltd., Osaka, Japan)を2倍希釈して室温12時間脱灰し、その後24時間水洗した。脳は前頭葉、頭頂葉、小脳を含む脳幹で前額断し、脊髄は頸髄（以下C）3～4、胸髄（以下T）1～3、腰髄（以下L）1～2、仙髄（以下S）、で前頭断し、切り出した。組織片は、上昇アルコール系列で脱水、クリアプラスで透徹後、パラフィン包埋した。包埋ブロックより3 $\mu$ mの厚さで切片を作製し、定法によるヘマトキシリン・エオジン染色（以下HE染色）、特殊染色および免疫組織化学的検索に供した。また、髄鞘の走行を確認するために、Luxol Fast Blue（LFB）染色およびKlüver-Barrera（KB）染色を行った。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、0.005%酢酸溶液加精製水（室温、5分）を用いて過染色を抑制した。続いて、LFB MBS液を反応（60℃、16時間）させたのち、冷却した。純エタノールを用いて洗浄した。蒸留水により水和したのち、0.05%炭酸リチウム水溶液、70%エタノールにより分別した。クレシル紫液（室温、6分）によりニッスル染色を施した。

### 3. 免疫組織化学的検索

#### a) 抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

ウイルス抗原陽性細胞を同定するため、ウサギ抗狂犬病ウイルス P 蛋白質（Rabies Phosphoprotein、anti-P）抗体[16]を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、0.25%トリプシンで抗原を賦活化し、0.3%過酸化水素加メタノール（室温、60分）で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異

反応を抑制するため 10%正常ヤギ血清でブロッキングを行った。一次抗体として 1,200 倍した anti-P 抗体を、4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) を室温で 30 分反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

b) 抗 Iba1 抗体を用いたミクログリアの検出

ミクログリアおよびマクロファージを同定するため、Rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 polyclonal (Iba1) 抗体 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。10%正常ヤギ血清 (室温、1 時間) で非特異反応をブロックした。一次抗体として 500 倍希釈した抗 Iba1 抗体を、4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences) を室温で 30 分反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

c) 抗 CD204 抗体を用いた免疫組織化学的検索

マクロファージを同定する目的で Mouse anti human macrophage scavenger receptor A (MSR-A : CD204) monoclonal 抗体 (Trans Genic, Inc., Hyogo, Japan) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、10mM クエン酸ナトリウ

ム緩衝液 (pH2.7) により micro wave 法を実施し、抗原を賦活化した (170W、10 分) のち、20 分間冷却した。3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼを除去した (室温、30 分)。その後、10%正常ヤギ血清 (室温、10 分) で非特異反応をブロックした。200 倍希釈した CD204 抗体を 4℃で一晩反応させ、PBS 洗浄後、Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (DAKO) を室温で 30 分間反応させた後、DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで核染色を施した。

d) 抗 Lysozyme 抗体を用いた免疫組織化学的検索

マクロファージを同定する目的で、Rabbit anti human Lysozyme Polyclonal (以下 Lysozyme) 抗体 (DAKO) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteolytic enzyme solution diluted in 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.015 mol/l sodium azide, pH 7.5. (以下、Proteinase-K, DAKO) で抗原を賦活化し、3%過酸化水素加メタノール (室温、60 分) で内因性ペルオキシダーゼを除去した。その後、10%正常ヤギ血清 (室温、60 分) で非特異反応をブロックした。Lysozyme 抗体を室温にて 60 分間反応させた。PBS 洗浄後、Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit (DAKO) を室温で 30 分間反応させた後、DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

e) 抗 Neurofilament SMI311 抗体を用いた変性神経軸索の検出

変性した軸索を同定する目的で Mouse anti Neurofilament SMI311 (SMI311) 抗体 (Biolegend, San Diego, CA) を用いた [11,19]。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、マイクロウェーブより抗原性を賦活化した。0.3%過酸化水素加メタノール (室温、15 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応をブロックするため 10% 正常ヤギ血清 (室温、30 分) を反応させた。一次抗体は 8000 倍に希釈し 4℃で一晩反応させた。二次抗体は Histofine® Simple Stain MAX-PO (M) (Nichirei Biosciences) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

f) 抗 Neurofilament SMI312 抗体を用いた正常神経軸索の検出

正常の軸索を同定する目的で Mouse anti Neurofilament (SMI312) 抗体 (Biolegend) を用いた [11,19]。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase K (DAKO) により抗原性を賦活化した。0.3%過酸化水素加メタノール (室温、15 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応をブロックするため 10% 正常ヤギ血清 (室温、30 分) を反応させた。一次抗体は 8000 倍に希釈し 4℃で一晩反応させた。二次抗体は Histofine® Simple Stain MAX-PO (M) (Nichirei Biosciences) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

g) 抗 GFAP 抗体を用いたアストログリアの検出

CNS 内のアストログリアを同定するため Rabbit anti Glial Fibrillary Acidic Protein polyclonal (GFAP) 抗体 (Nichirei Biosciences) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、3%過酸化水素加メタノール (室温、15 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、抗 GFAP 抗体を室温で 60 分反応させた。PBS 洗浄後、Histofine® Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Biosciences) を 30 分間反応させた後、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化し、対比染色を施した。

h) 抗 CD3 抗体を用いた T リンパ球の検出

T リンパ球を同定するため Rabbit anti CD3 polyclonal (以下 CD3) 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、Proteinase-K (DAKO) で抗原を賦活化し、3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼを除去した。その後、10%正常ヤギ血清 (室温、60 分) で非特異反応をブロックした。一次抗体は 4℃で一晩反応させた。PBS 洗浄後、Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit (DAKO) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性細胞数/mm<sup>2</sup>を計測した。

i) 抗 CD20 抗体を用いた B リンパ球の検出



B リンパ球を同定する目的で Rabbit anti CD20 polyclonal (CD20) 抗体 (Thermo Scientific, MA, U.S.A.) を用いた。脱パラフィン後、下降アルコール系列で再水和し、マイクロウェーブ (750W、5 分) により抗原性を賦活化した。3%過酸化水素加メタノール (室温、30 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、非特異反応をブロックするため 10%正常ヤギ血清 (室温、30 分) を反応させた。一次抗体は 4℃で一晩反応させた。二次抗体は Envision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit (DAKO) を 30 分間反応させ、Simple Stain DAB 溶液 (Nichirei Biosciences) で可視化した。その後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。また、ImageJ 1.48 software を用いて、脊髄内の陽性細胞数/mm<sup>2</sup>を計測した。

免疫組織化学染色に用いた一次抗体と反応条件は表 1 に示した。

#### 4. 血中中和抗体価 (VNA)

2%FCS 含有 MEM で二倍希釈した血清を 96 ウェルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に加えた。CVS-11 (100TCID<sub>50</sub>) を各ウェルに加え、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで 37℃、90 分培養し、さらに BHK-21 細胞を加え 24 時間培養した。細胞を 90%アセトンで固定し、抗狂犬病 N 蛋白質モノクローナル抗体 (Fujirebio Diagnostics, Inc., PA, U.S.A.) を 37℃、45 分反応させた後に蛍光顕微鏡下で観察した。2 列の平均を算出し、WHO 国際基準 [Anti-rabies Immunoglobulin, human National Institute for Biological Standards & Control (NIBSC)] と比較

して VNA を算出した [21]。0.5IU/ml 以上の VNA は狂犬病に対する防御に適切であると定められている。

## 結果

### 1. 臨床症状およびウイルス中和抗体値（VNA）

接種 8 日後から神経症状を呈するマウスが認められた。主な症状は接種側の後肢の引きずりであった。30 日群では接種 12 日後に、63 日群では接種 11 日後に両後肢の麻痺を呈する検体が観察された。30 日群では接種 14 日後に、63 日群では接種 12 日後に瀕死に陥る検体が認められた。これらの検体は死亡前に顕著な神経症状を呈していた。接種 19 日以降では死亡する検体は認められなかった。接種 30 日群では、後肢麻痺を呈して 4 例が死亡、麻痺症状が持続した例が 5 例、無症状が 4 例であった。接種 63 日群では、死亡 3 例、麻痺 5 例、無症状 7 例であった（図 2）。

ウイルス中和抗体値は接種 30 日群、接種 63 日群において上昇していたが、麻痺症状を示さない個体に比べて、麻痺症状を示した個体において顕著に上昇していた（図 3）。

### 2. 病理組織学的検索（Figs.1-18）

接種 30、63 日後共に、麻痺症状を示した検体において顕著な組織病変が認められた。麻痺症状が認められた検体では、血管周囲においてリンパ球浸潤が目立っていた（Fig.1）。右側の背根神経節では、神経節細胞の減少がみられ、残存する神経細胞は細胞質の好酸性を増し、核も萎縮していた（Fig.2）。背根神経節に浸潤していたマクロファージは泡沫状を呈していた。右側脊髄の白質および右側脊髄背根神経束では、軸索の変性と空胞化がみられた（Fig.3）。脊髄実質ではアストログリアが増生していた。麻痺症状を呈した接種 63 日後の 1 個体の右側脊髄領域は炎症反応を

伴い著しく萎縮していた (Fig.4)。接種後 63 日後の病理組織学的変化は上記と類似していたが、リンパ球浸潤の減少と背根神経節におけるシュワン細胞の増生が認められた。脳全域の血管周囲における単核細胞浸潤 (囲管性細胞浸潤) およびミクログリアの増数が認められた。脳における炎症細胞の浸潤は比較的軽度であったが、所々で小空胞が観察された (Figs.5,6)。接種 30、63 日後に、麻痺症状が認められない検体ではこのような病変は観察されなかった (Figs.7-12)。小脳のプルキンエ細胞の一部は脱落し、脱落部位を置換するようにグリア細胞 (バークマングリア) の増生が認められた。小空胞が認められる部位を同定するため、Luxol Fast Blue および Klüver-Barrera 染色を行ったところ、空胞は主に中脳の赤核脊髓路 (rubrospinal tract、以下 rust) および腹側被蓋交叉 (ventral tegmental decussation、以下 vtd)、延髄・橋・中脳の内側縦束 (medial longitudinal fascicle、以下 mlf)、橋の内側毛帯 (medial lemniscus、以下 ml) であることが分かった。検体により、延髄の運動神経核群や前庭神経核でも小空胞が認められた (Figs.13-18)。

### 3. 免疫組織化学的検索 (Figs.19-34)

#### a) 抗狂犬病ウイルス P 蛋白質抗体を用いた狂犬病ウイルス抗原の検出

接種 5 日後より CNS 内にウイルス抗原が認められた。ウイルス抗原は主に右側背根神経節細胞、右側脊髓背根神経束で観察されたが、左側腹側神経細胞の一部も陽性を示した。脳では両側延髄、左視床の後外側腹側核、左大脳皮質錐体細胞が陽性を示した。

接種 8、11 日後では、左側の神経節細胞にウイルス抗原陽性細胞が増加していたが、右側の背根神経節および脊髄灰白質では減少していた。

接種 30、63 日後では、どの部位からも陽性細胞は認められなかった。(表 2)。

b) 抗 Iba1、CD204 および Lysozyme 抗体を用いたミクログリアおよびマクロファージの検出 (Figs.19-22)

脊髄において多数の Iba1 陽性細胞が観察された。陽性細胞はアメーバ状あるいは桿状に細胞突起を伸ばしていた (Fig.19)。背根神経節では、神経節細胞周囲の多角形細胞および空胞化の領域に一致して Iba1、CD204、Lysozyme 陽性像が見られた (Figs.20,21)。Lysozyme 陽性細胞は、脊髄腹根神経線維の一部にも見られた。また、軟膜の小型円形細胞も陽性を示した。接種 63 日後の 1 例にみられた右側脊髄の萎縮領域では Iba1 陽性細胞が増加していた (Fig.22)。接種 30 日後の脳では、広範な領域において脊髄同様の Iba1 陽性細胞が多数観察された。左右の中脳赤核領域では、Iba1 陽性細胞が集簇巣を形成していた。

c) 抗 NF 抗体 (SMI311 および SMI312) を用いた神経軸索の検出 (Figs.23-26)

麻痺症状を呈して生残した接種 30 日、63 日後の検体において、脊髄及び脳の一部の軸索の一部が、SMI311 に陽性を示した (Figs.23,24)。SMI311 の陽性は特に脊髄白質と背根神経束において強く発現していたが、中脳の赤核脊髄路 (rust) および腹側

被蓋交叉 (vtd)、延髄・橋・中脳の内側縦束 (mlf)、橋の内側毛帯 (ml) では弱く散在性に認められた。同部位は病理組織学的検索で空胞状の病変部が認められた部位とその局在が一致していた。SMI312 に陽性を示す軸索は、麻痺症状が認められない検体において明瞭であった (Figs.25,26)。

d) 抗 GFAP 抗体を用いたアストログリアの検出 (Figs.27,28)

脊髄では白質から灰白質にかけて陽性細胞が散在していた (Figs.27,28)。背根神経節では陽性細胞は見られなかった。接種 63 日後の 1 例にみられた右側脊髄の萎縮領域では顕著な線維性グリオシスがみられた。脳では、全域に陽性細胞が認められた。脊髄では特に、脊髄灰白質と背根神経束において強く発現していた。中脳の赤核脊髄路 (rust) および腹側被蓋交叉 (vtd)、延髄・橋・中脳の内側縦束 (mlf)、橋の内側毛帯 (ml) では散在性に認められた。小脳顆粒層においても少数の陽性細胞が見られた。

e) 抗 CD3 抗体を用いた T リンパ球および抗 CD20 を用いた B リンパ球の検出 (Figs.29-34)

接種 63 日後における CD3 および CD20 陽性細胞数は共に麻痺症状群の方が顕著に高かった (図 4)。麻痺症状を呈した検体では、脊髄の軟膜と実質内、大脳の髄膜、小脳・中脳・橋・延髄の血管周囲および実質内に陽性細胞が散在していた (Figs.29-31)。接種 63 日後では、その数が減少した。脊髄では軟膜、実質内において散在していた。一部の検体では白質に集簇巣を形成していた。背根神経節では少数の細胞が陽性であった。脊髄では、少数の CD20

陽性細胞が軟膜に見られた (Fig.32)。接種 30 日後においては背根神経節に集簇巣を形成していた (Figs.33,34)。脳では血管周囲に軽度の CD20 陽性細胞が認められた。

## 考察

狂犬病は発症すると 100% 致死に至るが、これまで人において狂犬病発症後に後遺症を残して生還した例が 13 例報告されている [1,3,4,6,9,12,13,15,20]。そこで、耐過マウスにおける麻痺症状とその関連病変を明らかにするため、生残例の背根神経節、脊髓および脳を中心に精査した。

ウイルス接種 11 日後まで、ほとんどのマウスの背根神経節、脊髓、大脳皮質および赤核においてウイルス抗原陽性細胞が検出されたが、接種 30、63 日後では全ての個体が陰性を示した。しかし、VNA は WHO が定める狂犬病予防基準値である 0.5IU/ml を大きく越えていた。抗体が介在した免疫反応は CNS からウイルスを排除するのに必要不可欠である [7]。CNS 内の VNA を上昇させる方法は、末梢血で産生された VNA が BBB を介して CNS 内に侵入する方法と CNS に浸潤した B リンパ球などの抗体産生細胞による VNA の産生であるが、CNS 内への抗体産生細胞の浸潤の方が VNA の上昇が顕著である [8]。今回、特に麻痺症状群において CNS 内に CD20 陽性の B リンパ球と形質細胞が認められた。このことから、これらの免疫細胞が CNS 内の VNA を上昇させ CNS からウイルスを除去した可能性が考えられ、結果として罹患マウスが耐過したと推測された。

本章の感染実験により、麻痺症状群では背根神経節細胞の変性壊死と軸索傷害が認められ、これらに伴って空胞化とアストログリアの増生が顕著であることが明らかとなった。CNS が傷害されると、反応性のアストログリアがプロテオグリカンを産生し軸索の再生を阻害すると報告されている [17]。今回の研究では、軸索



の再生や神経細胞の再生がほとんど認められなかったことから、ウイルス感染によって傷害を受けた CNS 内の神経組織が再生することなく残存し続けていることが後遺症の原因の一つとして考えられた。また、接種 63 日後の 1 例では、アストログリアおよびミクログリアの顕著な増生が腰髄に見られたことから、感染初期にこの部位において大量のウイルスが増殖し、その結果、重度の組織傷害が生じていたと推測された。これらの組織病変は、主に背根神経節、脊髄背根神経線維（知覚性末梢神経）、脊髄白質全域と一部延髄、橋、中脳と視床に認められ、脊髄腹側神経線維では稀であった。その理由として、1088 株並びに 1088-N4#14 株が強い知覚神経好性を示すことが挙げられる。以上のことから、麻痺症状を発現する原因は再生を伴わない知覚神経路あるいは脊髄白質における神経軸索の消失、脱髄とアストログリアの増生を伴った空胞化である可能性が示唆された。

本章の感染実験では、麻痺症状発現群においてリンパ球を中心とする炎症細胞浸潤、グリア細胞の増生が観察された。また、麻痺症状を呈し耐過したマウスでは、前述の組織病変とリンパ球浸潤が認められたが、麻痺症状を示さずに耐過したマウスでは、このような病変は認められなかった。本研究室において、過去に麻痺に関する研究が行われており、CVS11 株の筋肉内接種における麻痺の原因が、脊髄実質における活性化したグリア細胞のびまん性増生、T リンパ球浸潤及びウイルスに感染した神経細胞のネクロシスに起因すると報告している[10]。以上のことより、麻痺症状は背根神経節細胞の変性壊死とリンパ球を主体とした顕著な炎症細胞浸潤ならびに脊髄実質内におけるグリア細胞の増生

が原因であると推察され、CVS11株感染における麻痺の発生机序と類似している可能性が示唆される。

Bearらは麻痺症状を呈した後に耐過したマウスにおいて、背根神経節の腫大が認められることを報告している[2]が、今回の研究では背根神経節の腫大は認められなかった。この点については更に長期観察が必要と思われる。

## 小 括

狂犬病は発病すると殆どが死に至るが、稀に人と動物において中枢神経系の機能障害（後遺症）を残して回復する例（耐過例）が報告されている。しかしながら、耐過例の病理発生機序についてはよくわかっていない。1088-N4#14 株はウッドチャック由来の街上毒の継代株であり、マウスの末梢接種では時折、発病後に後遺症を残して耐過する個体がみられる。

今回の実験により麻痺症状を示す検体では、主に知覚神経に空胞化を伴った脱髄病変およびアストログリオシスが認められることが判明した。麻痺症状群において、空胞を伴った病変は知覚神経のほか、脊髄白質で顕著で、ミクログリアおよびリンパ球の浸潤を伴う重度の脳脊髄炎が惹起され、神経細胞および神経線維は変性、脱落していた。一方麻痺症状を示さず耐過したマウスではこのような顕著な病変は認められなかった。以上のことから、麻痺症状には知覚神経路あるいは脊髄白質における神経軸索の消失、脱髄とアストログリアの増生を伴った空胞化が関与する可能性が示唆された。

耐過例では、VNA が高値のまま推移し、脳脊髄からウイルス抗原は検出されなかった。このことから、VNA の上昇が CNS からウイルスを排除させ、結果として耐過に影響した可能性が強く推測された。

#### 第IV章 参考文献

1. Alvarez, L., Fajardo, R., Lopez, E., Pedroza, R., Hemachudha, T., Kamolvarin, N., Cortes, G. and Baer, G. M. 1994. Partial recovery from rabies in a nine-year-old boy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **13**: 1154–1155.
2. Baer, G. M., Cleary, W., Díaz, A. M. and Perl, D. F. 1977. Characteristics of 11 rabies virus isolates in mice: titers and relative invasiveness of virus, incubation period of infection, and survival of mice with sequelae. *J. Infect. Dis.* **136**: 336–345.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2012. Recovery of a patient from clinical rabies-California, 2011. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **61**: 61–65.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010. Presumptive abortive human rabies - Texas, 2009. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **59**: 185–190.
5. Griffin, D. E. 2010. Recovery from viral encephalomyelitis: immune-mediated noncytolytic virus clearance from neurons. *Immunol. Res.* **47**: 123–133.

6. Hattwick, M. A., Weis, T. T., Stechschulte, C. J., Baer, G. M. and Gregg, M. B. 1972. Recovery from rabies. A case report. *Ann. Intern. Med.* **76**: 931–942.
7. Hooper, D. C., Morimoto, K., Bette, M., Weihe, E., Koprowski, H. and Dietzschold, B. 1998. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J. Virol.* **72**: 3711–3719.
8. Hooper, D. C., Phares, T. W., Fabis, M. J. and Roy, A. 2009. The production of antibody by invading B cells is required for the clearance of rabies virus from the central nervous system. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **3**: e535.
9. Jackson, A. C. 2014. Recovery from rabies: a call to arms. *J. Neurol. Sci.* **339**: 5–7.
10. Kojima, D., Park, C. H., Satoh, Y., Inoue, S., Noguchi, A. and Oyamada, T. 2009. Pathology of the spinal cord of C57BL/6J mice infected with rabies virus (CVS-11 strain). *J. Vet. Med. Sci.* **71**: 319–324.
11. Kreutzer, M., Seehusen, F., Kreutzer, R., Pringproa, K., Kummerfeld, M., Claus, P., Deschl, U., Kalkul, A., Beineke, A., Baumgärtner, W. and Ulrich, R. 2012. Axonopathy is

associated with complex axonal transport defects in a model of multiple sclerosis. *Brain Pathol.* **22**: 454–471.

12.Madhusudana, S. N., Nagaraj, D., Uday, M., Ratnavalli, E. and Kumar, M. V. 2002. Partial recovery from rabies in a six-year-old girl. *Int. J. Infect. Dis.* **6**: 85–86.

13.Manoj, S., Mukherjee, A., Johri, S. and Kumar, K.V. 2016. Recovery from rabies, a universally fatal disease. *Mil. Med. Res.* **3**: 21.

14.Melnick, J. L. 1996. Current status of poliovirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 293–300.

15.Porras, C., Barboza, J. J., Fuenzalida, E., Adaros, H. L., Oviedo, A. M. and Furst, J. 1976. Recovery from rabies in man. *Ann. Intern. Med.* **85**: 44–48.

16.Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T. and Morimoto, K. 2004. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology* **318**: 295–305.

17.Silver, J. and Miller, J. H. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 146–156.



18. Stohlman, S. A. and Hinton, D. R. 2001. Viral induced demyelination. *Brain Pathol.* **11**: 92–106.
19. Tsunoda, I., Kuang, L., Libbey, J. E. and Fujinami, R. S. 2003. Axonal injury heralds virus-induced demyelination. *Am. J. Pathol.* **162**: 1259–1269.
20. Willoughby, R. E., Tieves, K. S., Hoffman, G. M., Ghanayem, N. S., Amlie-Lefond, C. M., Schwabe, M. J., Chusid, M. J. and Rupprecht, C. E. 2005. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* **352**: 2508–2514.
21. Yamada, K., Park, C. H., Noguchi, K., Kojima, D., Kubo, T., Komiya, N., Matsumoto, T., Mitui, M. T., Ahmed, K., Morimoto, K., Inoue, S. and Nishizono, A. 2012. Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res.* **165**: 34–45.

表 1. 使用した抗体と反応条件

| 抗体名      | 会社名           | 性状         | 希釈倍率              | 温度/反応時間 | 抗原賦活化  | 二次抗体  |
|----------|---------------|------------|-------------------|---------|--|---|
| P        | 感染研           | polyclonal | 1:1200            | 4°C/—晩  | 0.25%トリプシン(室温/30分)   | Histofine® simple stain MAX-PO(R)                       |
| Iba1     | Wako          | polyclonal | 1:500             | 4°C/—晩  | Waterbath(20分),<br>10mMクエン酸ナトリウムバッファ—<br>(pH6.0)<br>Microwave(170W, 10分),<br>10mMクエン酸ナトリウムバッファ—<br>(pH2.7) | Histofine® simple stain MAX-PO (R)                      |
| CD204    | Trans Genetic | monoclonal | 1:200             | 4°C/—晩  |  | Envision +® System Labelled<br>Polymer-HRP Anti-Mouse   |
| Lysozyme | DAKO          | polyclonal | RTU <sup>1)</sup> | 室温/60分  | Proteinase-K(室温/10分)   | Envision +® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Rabbit |
| NF311    | Biologend     | monoclonal | 1:8000            | 4°C/—晩  | Microwave(170W, 25分),<br>10mMクエン酸ナトリウムバッファ—<br>(pH6.0)   | Histofine® simplestain MAX-PO(M)                        |
| NF312    | Biologend     | monoclonal | 1:8000            | 4°C/—晩  | Proteinase-K(室温/15分)   | Histofine® simplestain MAX-PO(M)                        |
| GFAP     | NICHIREI      | polyclonal | RTU               | 室温/60分  | —  | Histofine® simple stain MAX-PO (R)                      |
| CD3      | DAKO          | polyclonal | RTU               | 4°C/—晩  | Proteinase-K(室温/10分)   | Envision +® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Rabbit |
| CD20     | DAKO          | polyclonal | 1:400             | 4°C/—晩  | Autocrave(121°C/10分),<br>抗原賦活化液(pH9.0)   | Envision +® System Labelled Polymer-<br>HRP Anti-Rabbit |

1) RTU: Ready to use

図 1. 1088-N4#14 株の糖鎖付加および変異部位

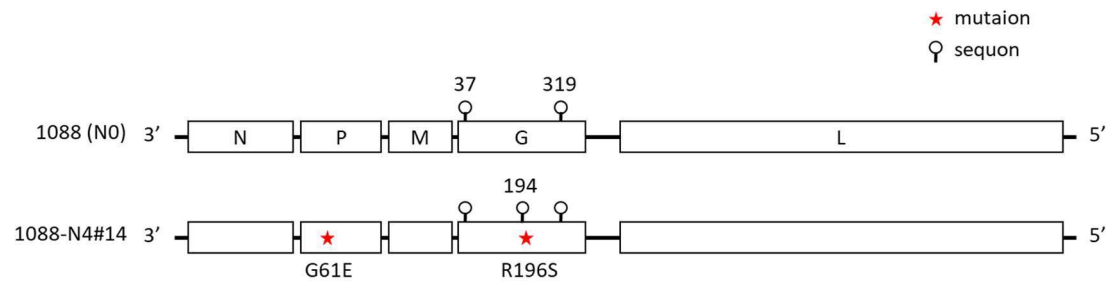


図 2. 接種 30 日および 63 日群における臨床症状の経過

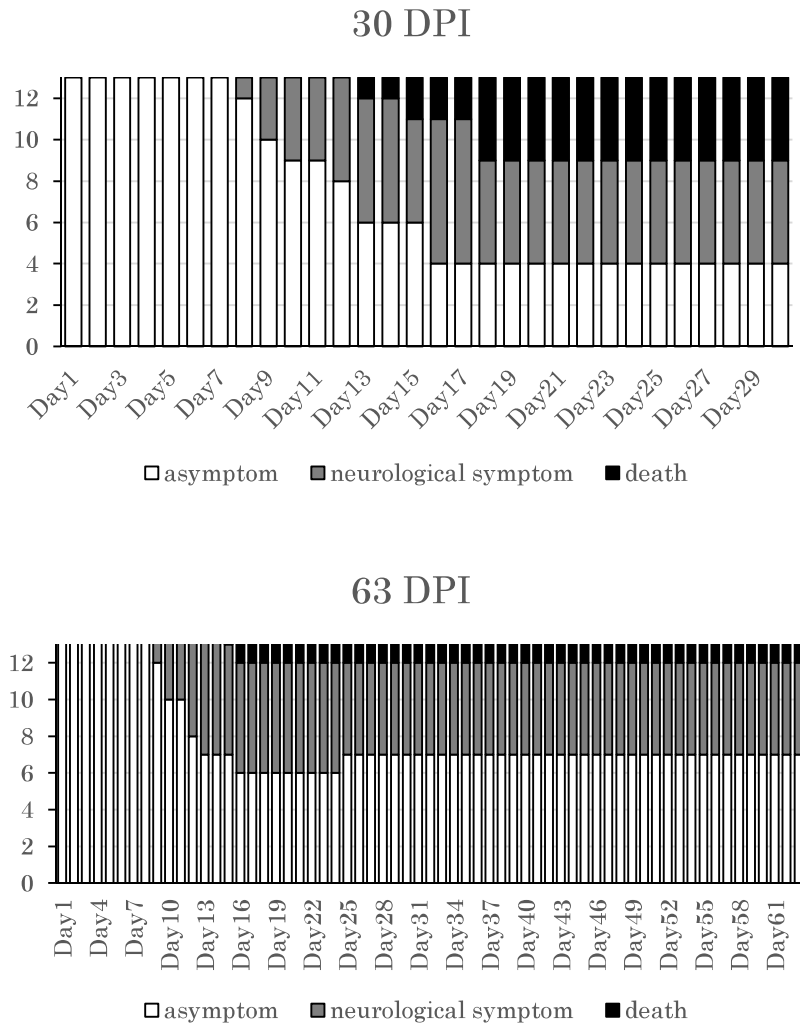


図 3. 接種 30 日および 63 日群における麻痺症状群と無症状群のウイルス中和抗体値

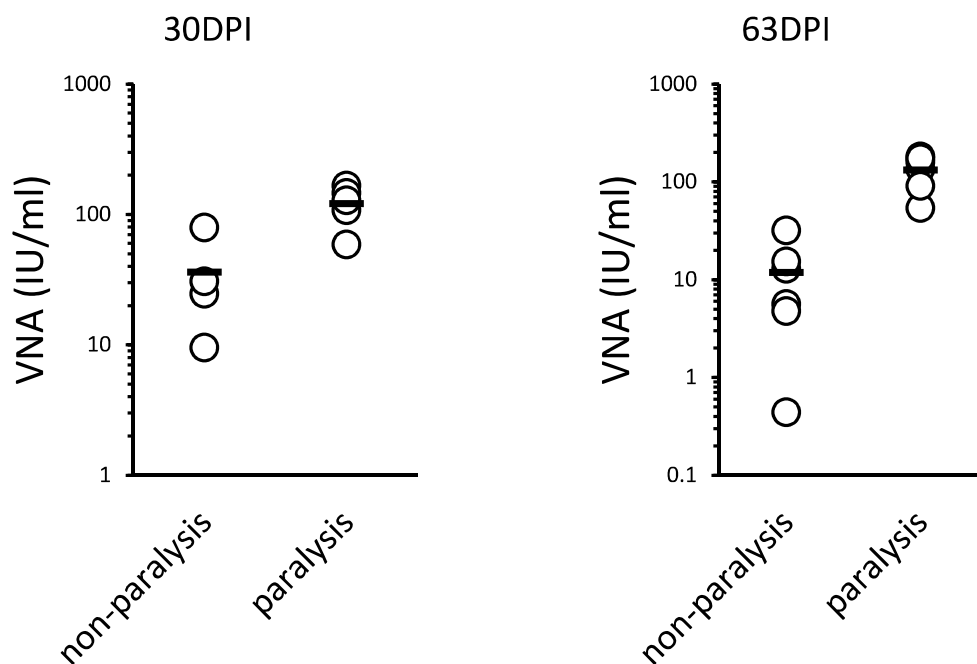
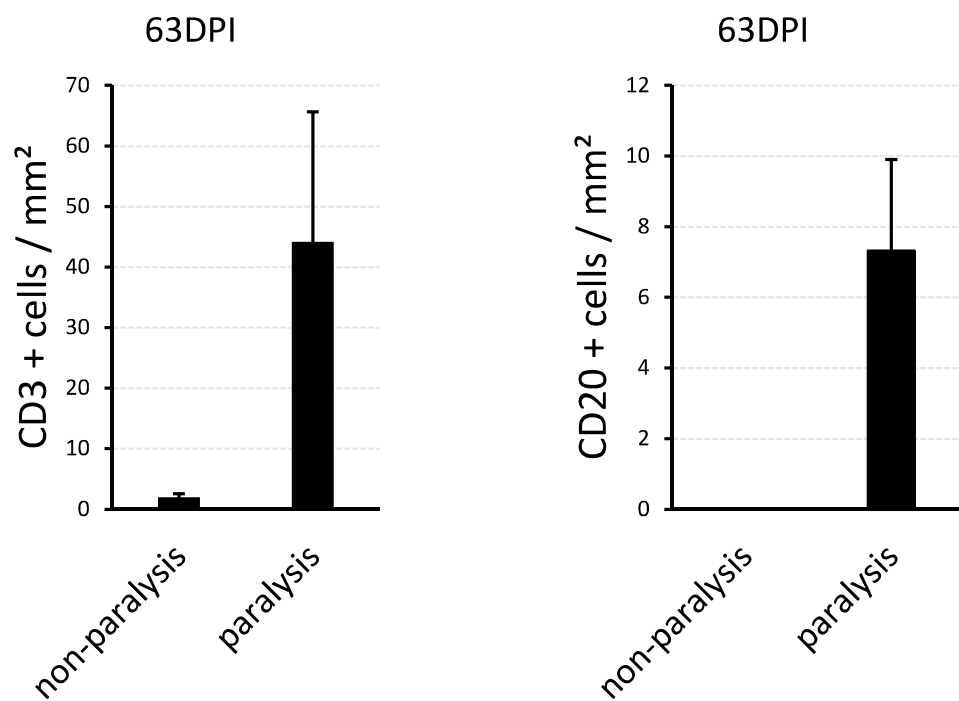


表 2. ウイルス感染がみられた検体の割合

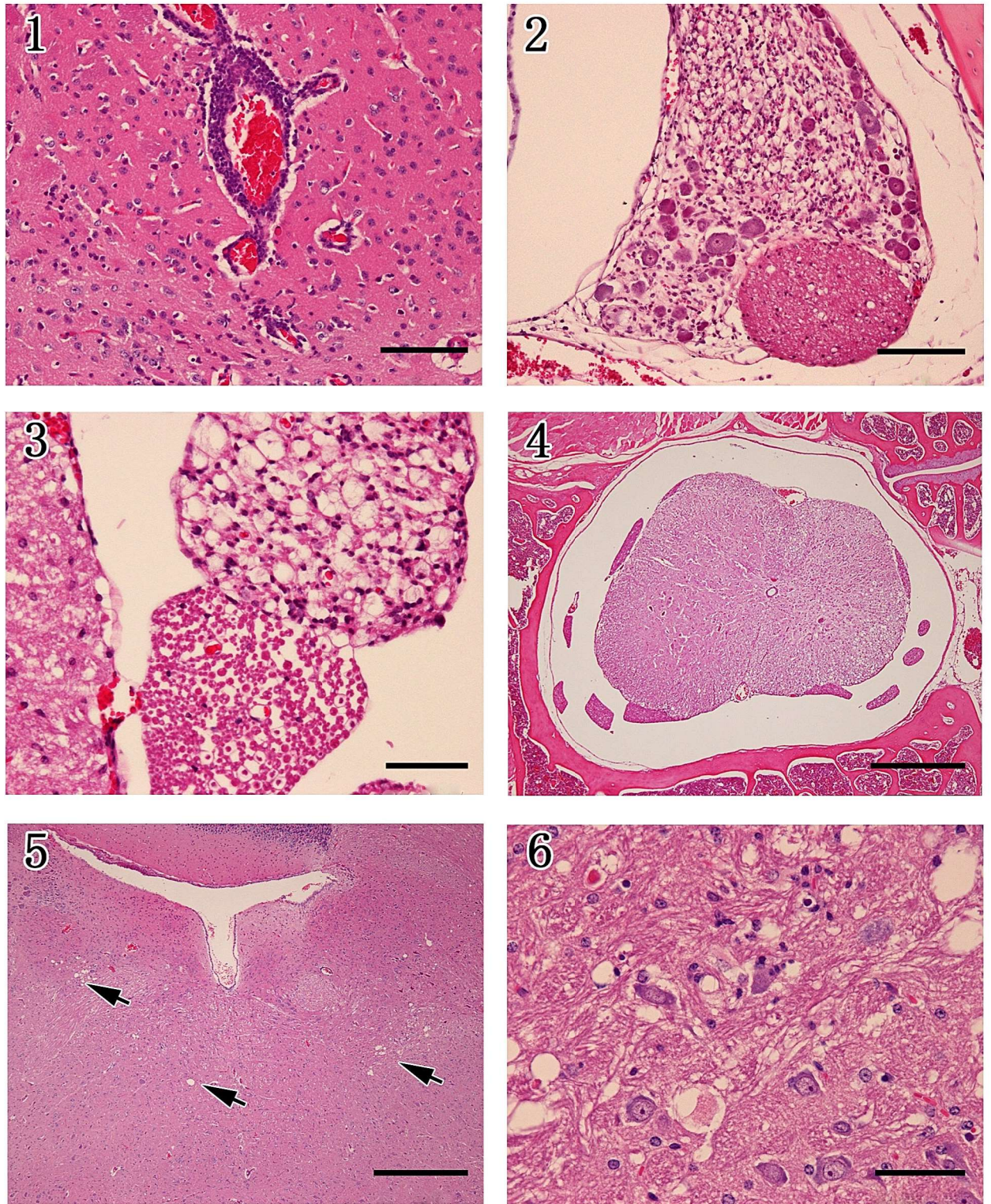
|             | Brain | C/T | L/S | TOTAL |
|-------------|-------|-----|-----|-------|
| 3DPI(N=5)   | 0%    | 0%  | 0%  | 0%    |
| 5DPI(N=10)  | 20%   | 0%  | 20% | 27%   |
| 8DPI(N=15)  | 80%   | 73% | 93% | 93%   |
| 11DPI(N=5)  | 80%   | 60% | 80% | 100%  |
| 30DPI(N=13) | 0%    | 0%  | 0%  | 0%    |
| 63DPI(N=15) | 0%    | 0%  | 0%  | 0%    |

図 4. 接種 63 日後の CD3 および CD20 陽性細胞数の比較





## Figs. 1-6. 麻痺症状群における病理組織変化



**Fig. 1.** 梨状葉. 30DPI. 麻痺症状群. 血管周囲にリンパ球浸潤が顕著である。HE. Bar=100 $\mu$ m.

**Fig. 2.** 腰髄背根神経節. 30DPI. 麻痺症状群. 右側の脊髄背根神経節では、神経節細胞の減少がみられ、残存する神経細胞は好酸性を増し、核も萎縮する。HE. Bar=100 $\mu$ m.

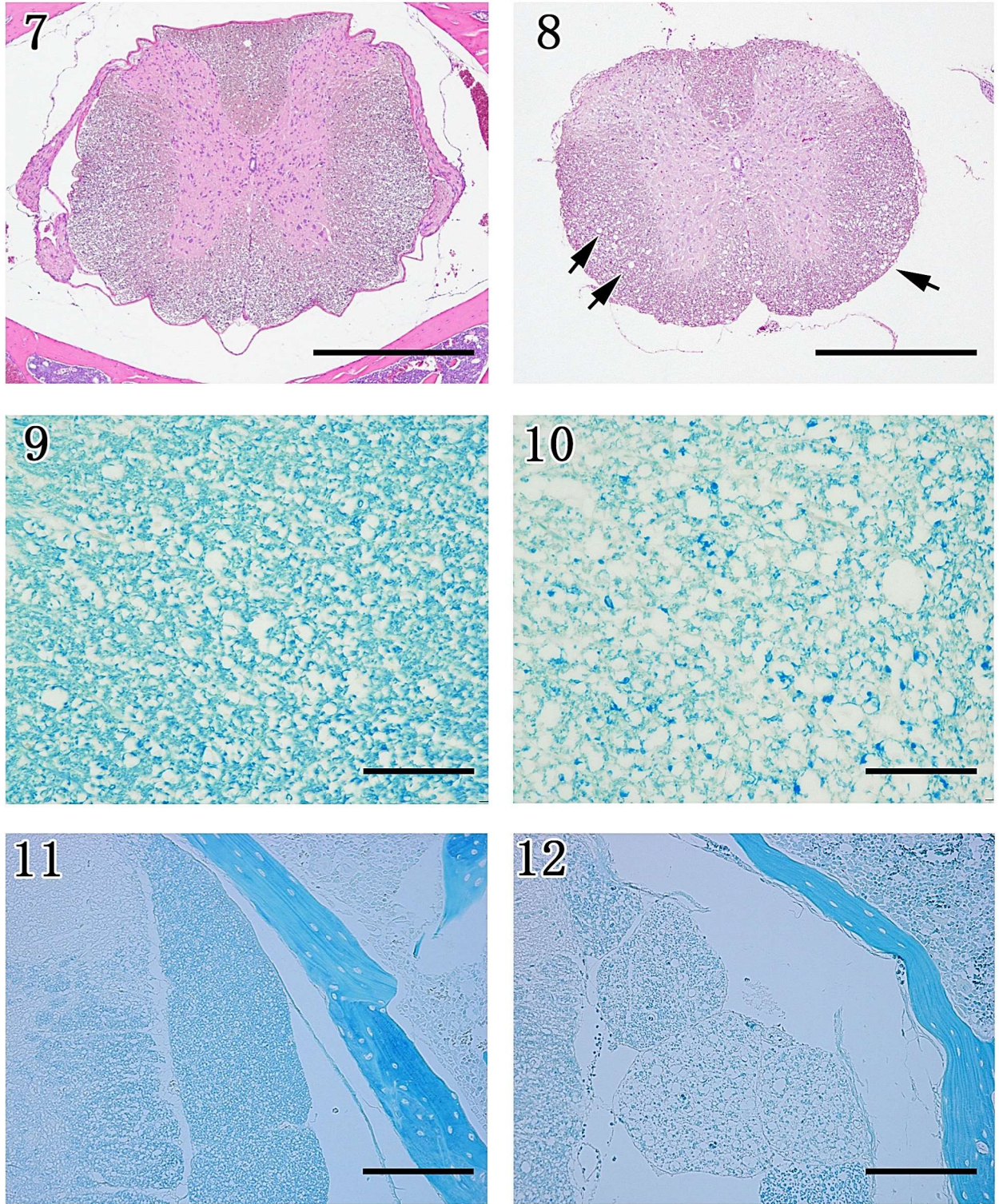
**Fig. 3.** 腰髄背根神経束. 63DPI. 麻痺症状群. 右側脊髄の白質および右側脊髄背根神経線維では軸索の変性、空胞化がみられる。HE. Bar=50 $\mu$ m.

**Fig. 4.** 腰髄. 63DPI. 麻痺症状群. 麻痺症状を呈した接種63日後の1個体の右側脊髄領域は炎症反応を伴って著しく萎縮している。HE. Bar=500 $\mu$ m.

**Figs. 5, 6.** 橋. 30DPI. 麻痺症状群. 脳全域に小空胞が散見される (Fig. 5 矢印)。Fig. 6 は Fig. 5 の拡大像である。HE. Bar=500 $\mu$ m (Fig. 5), 50 $\mu$ m (Fig. 6).



Figs. 7-12. 麻痺症状群と非麻痺症状群における組織病変



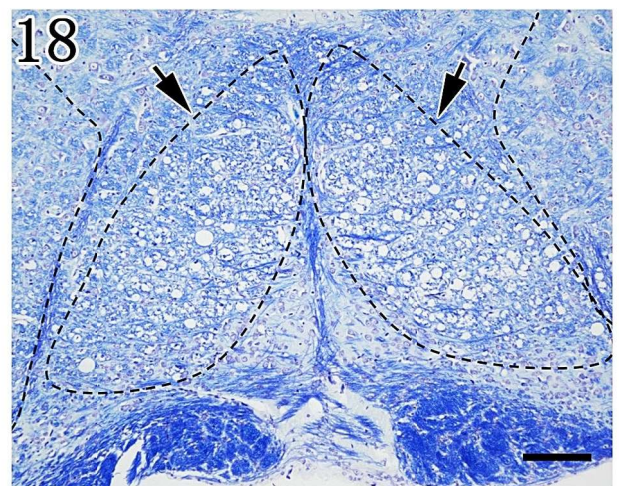
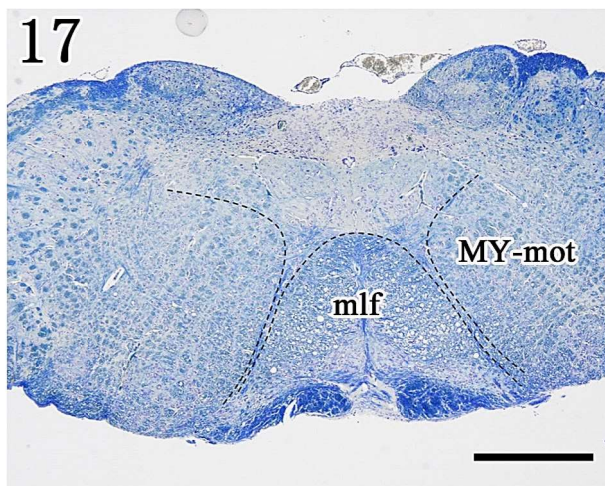
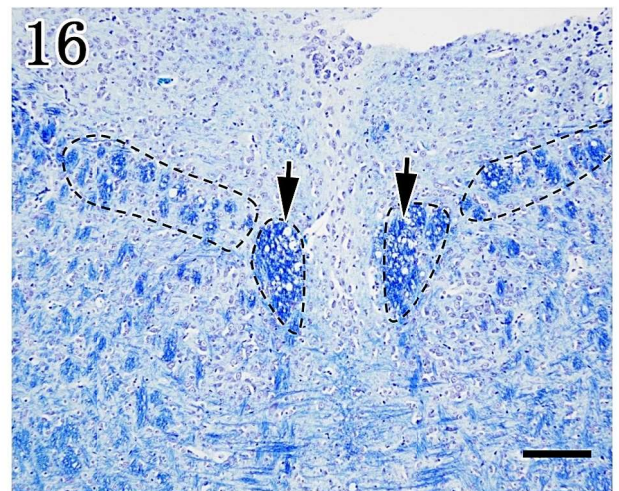
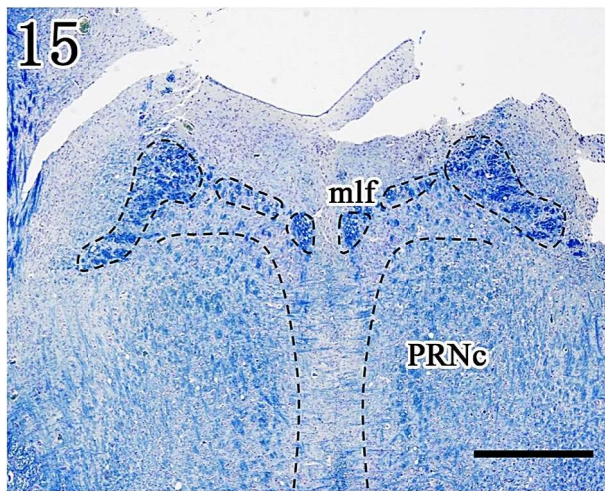
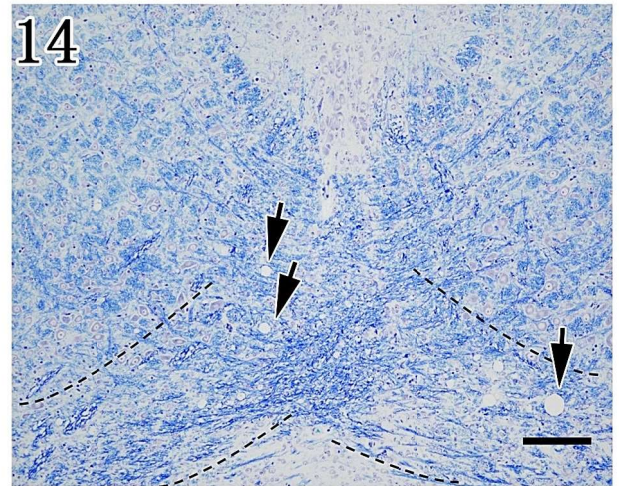
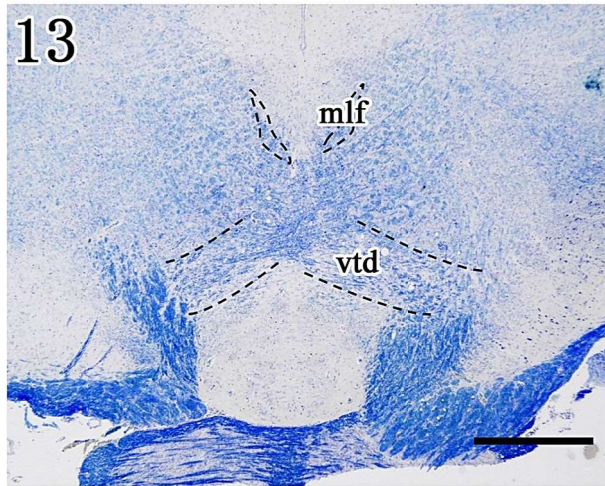
**Figs. 7, 8.** 胸髄. 30DPI. 非麻痺症状群 (Fig. 7), 麻痺症状群 (Fig. 8). 麻痺症状群の白質に小空胞が多数みられる (Fig. 8 矢印). HE. Bar=500 $\mu$ m.

**Figs. 9, 10.** 胸髄. 30DPI. 非麻痺症状群 (Fig. 9), 麻痺症状群 (Fig. 10). 麻痺症状群でみられる空胞状病変は脱髄を呈している. LFB. Bar=50 $\mu$ m.

**Figs. 11, 12.** 背根神経線維. 30DPI. 非麻痺症状群 (Fig. 11), 麻痺症状群 (Fig. 12). 麻痺症状群では背根神経線維に主座する空胞化が認められる. LFB. Bar=100 $\mu$ m.



# Figs. 13-18. 脳における空胞形成部位



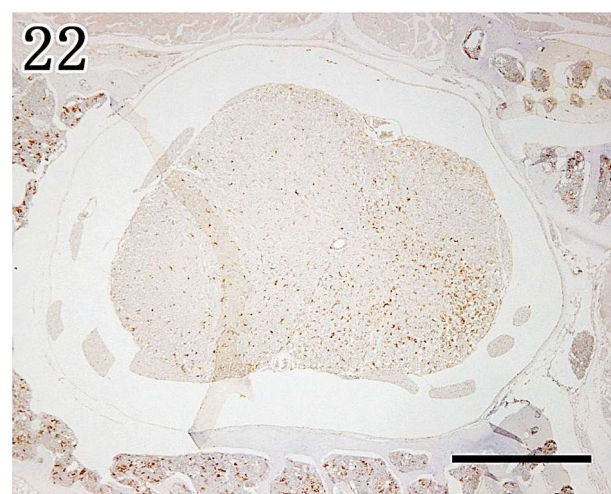
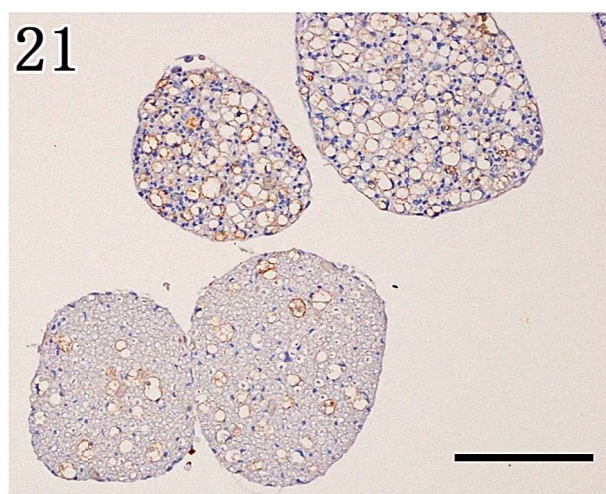
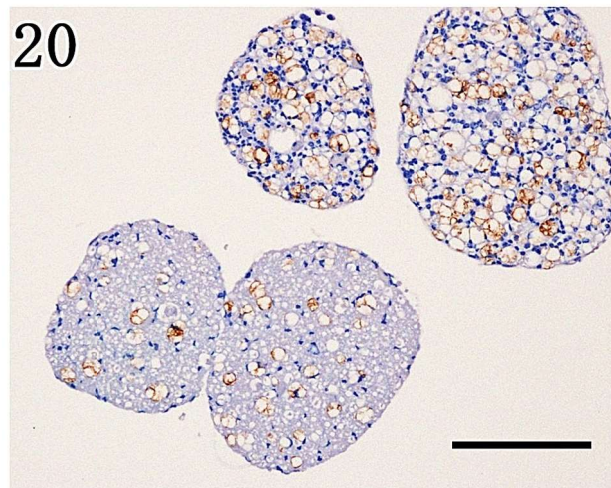
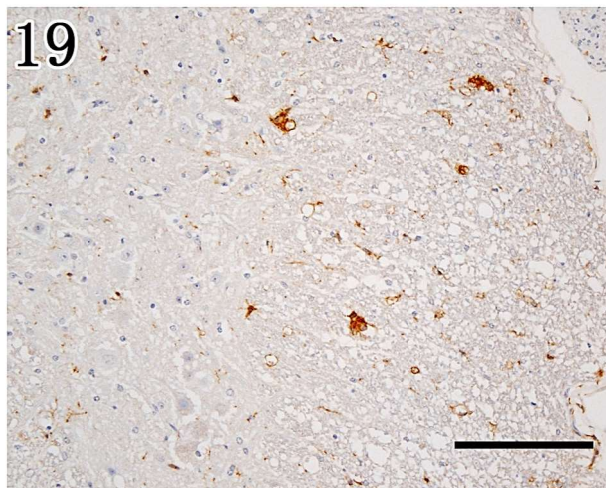
**Figs. 13, 14.** 中脳. 63DPI. 麻痺症状群. 中脳では、腹側被蓋交叉 (ventral tegmental decussation: vtd, Fig. 14 矢印) および内側縦束 (medial longitudinal fascicle: mlf) に空胞が認められる。KB. Bar=500 $\mu$ m (Fig. 13), 100 $\mu$ m (Fig. 14).

**Figs. 15, 16.** 橋. 63DPI. 麻痺症状群. 橋のmlf (Fig. 16 矢印) および時折網様体核 (Pontine reticular nucleus: PRNc)に小空胞が認められる。KB. Bar=500 $\mu$ m (Fig. 15), 100 $\mu$ m (Fig. 16).

**Figs. 17, 18.** 延髄. 63DPI. 麻痺症状群. 延髄のmlf (Fig. 18 矢印)、運動神経核群 (medulla motor related: MY-mot) や前庭神経核でも小空胞が認められる。KB. Bar=500 $\mu$ m (Fig. 17), 100 $\mu$ m (Fig. 18).



Figs. 19-22. ミクログリア、マクロファージの反応



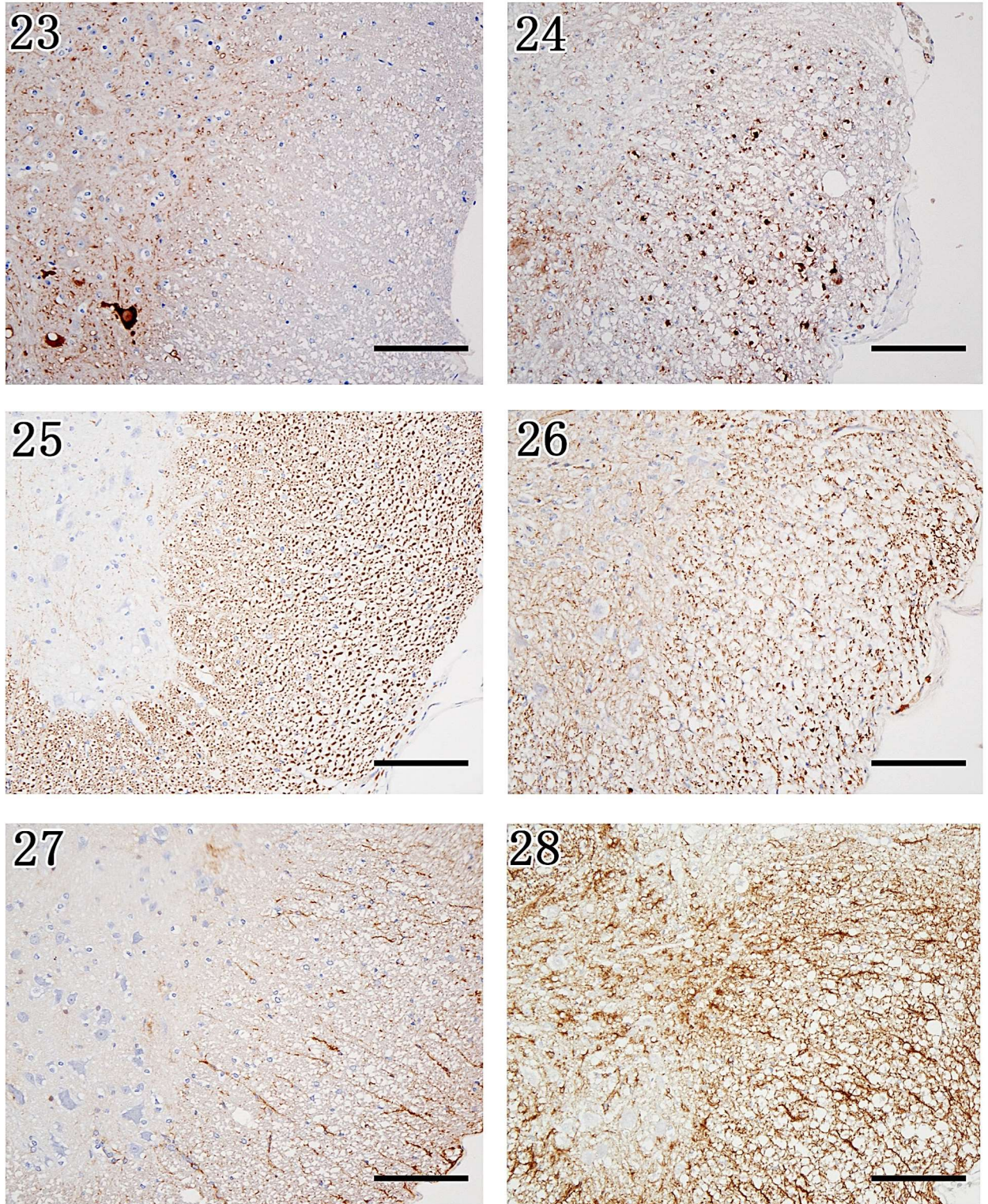
**Fig. 19.** 胸髄. 63DPI. 麻痺症状群. Iba1陽性細胞はアメーバ状あるいは桿状に細胞突起を伸長する。IHC (Iba1). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 20, 21.** 背根神経線維. 63DPI. 麻痺症状群. 空胞に一致してLysozyme (Fig. 20) と CD204 (Fig. 21) が陽性を示す。IHC (Lysozyme: Fig. 20, CD204: Fig. 21). Bar=100 $\mu$ m.

**Fig. 22.** 腰髄. 63DPI. 麻痺症状群. 接種63日後の1例の右側脊髄の萎縮領域に強い Iba1陽性像が認められる。IHC (Iba1). Bar=500 $\mu$ m.



## Figs. 23-28. 軸索傷害とグリア反応



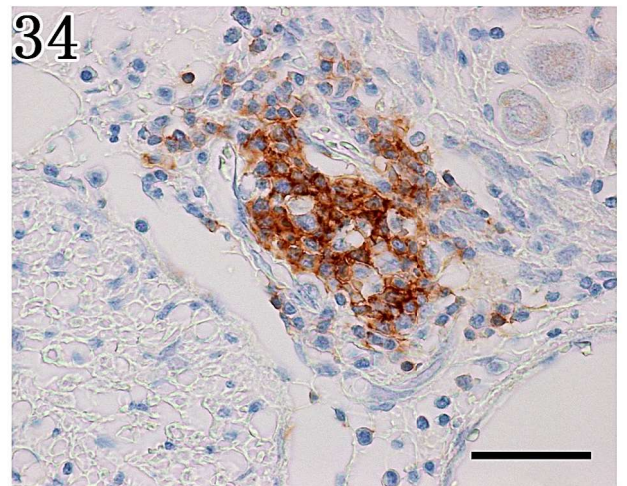
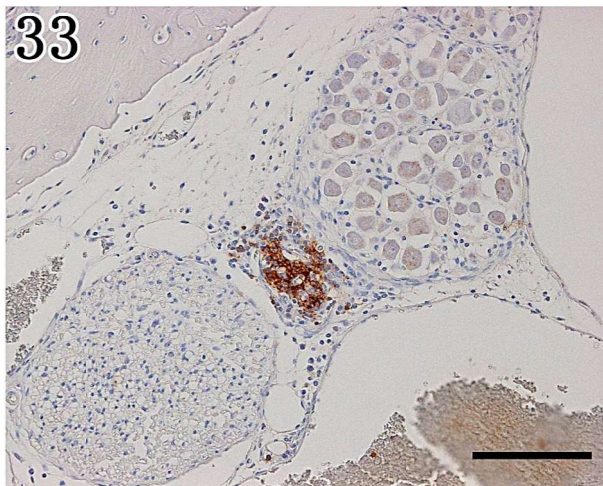
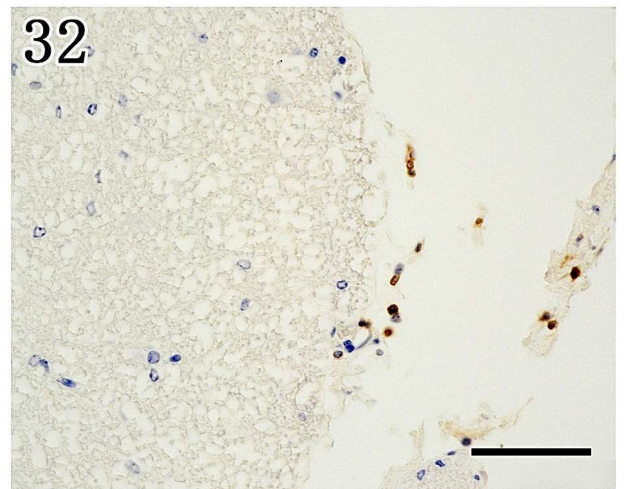
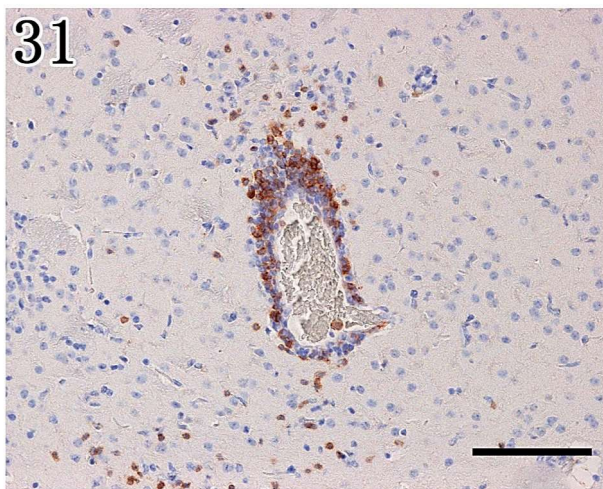
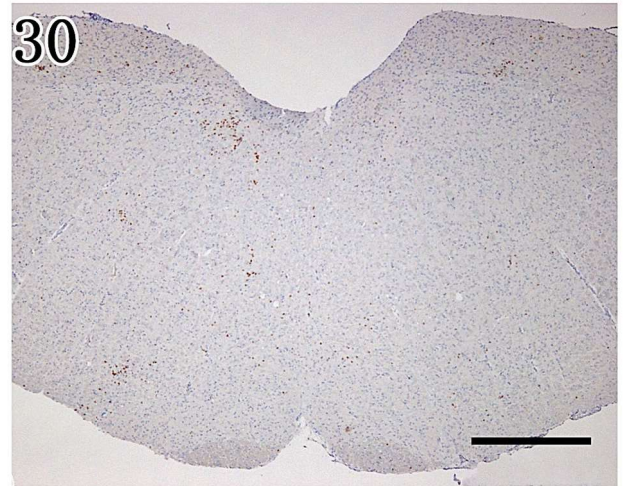
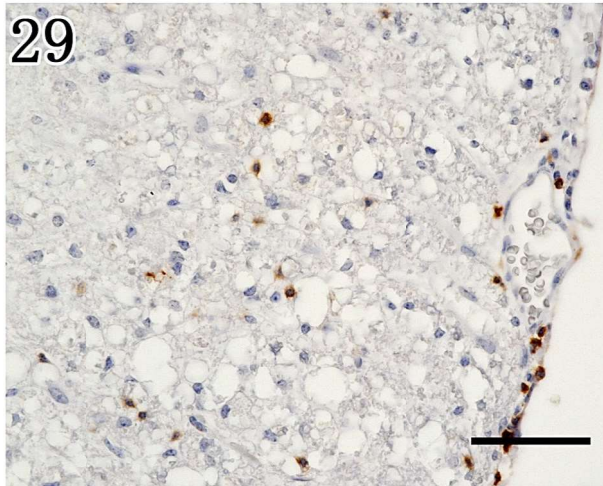
**Figs. 23, 24.** 胸髄. 63DPI. 非麻痺症状群 (Fig. 23), 麻痺症状群 (Fig. 24). 麻痺症状群では白質と背根神経線維束に強陽性像が認められる。IHC (SMI311). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 25, 26.** 胸髄. 63DPI. 非麻痺症状群 (Fig. 25), 麻痺症状群 (Fig. 26). 麻痺症状群ではSMI312に陽性を示す軸索が非麻痺症状群と比較して減少している。IHC (SMI312). Bar=100 $\mu$ m.

**Figs. 27, 28.** 胸髄. 63DPI. 非麻痺症状群 (Fig. 27), 麻痺症状群 (Fig. 28). 麻痺症状群では非麻痺症状群と比較してGFAP陽性を示すグリア細胞が増加している。IHC (GFAP). Bar=100 $\mu$ m.



Figs. 29-34. 麻痺症状群におけるリンパ球浸潤



**Fig. 29.** 腰髄. 63DPI. 麻痺症状群. 脊髓軟膜、実質内において陽性細胞が散在する。IHC (CD3). Bar=50 $\mu$ m.

**Figs. 30, 31.** 延髄 (Fig. 30), 梨状葉 (Fig. 31). 30DPI. 麻痺症状群. 血管周囲および実質に陽性細胞が散在する。IHC (CD3). Bar=500 $\mu$ m.

**Fig. 32.** 腰髄. 63DPI. 麻痺症状群. 腰髄では軟膜において陽性細胞が散在する。IHC (CD20). Bar=50 $\mu$ m.

**Figs. 33, 34.** 脊髓背根神経節. 30DPI. 麻痺症状群. 脊髓背根神経節にCD20陽性細胞の集簇がみられる。IHC (CD20). Bar=100 $\mu$ m (Fig. 33), 50 $\mu$ m (Fig. 34).

## 総括

狂犬病は狂犬病ウイルスに起因する人獣共通感染症である。狂犬病ウイルスは咬傷部位から体内に侵入し、その後軸索を利用して逆行性に中枢神経系（CNS）に到達する。罹患動物は激しい神経症状を示して死に至る。また、近年、狂犬病患者の中に発病後に後遺症を残して生残する事例が報告されているが、これら狂犬病患者にみられる臨床症状や死を規定する要因については解明されていない。

狂犬病ウイルスは大きく固定毒と街上毒に大別される。固定毒は街上毒に比べヒトに対する感染リスクが低く、街上毒に類似した神経病原性を示すため、これまで多くの研究に用いられてきた。しかし、固定毒を利用した動物実験の成績は街上毒の病原性を直接的に反映するものではなく、狂犬病の病理発生機序を解明するためには街上毒を用いた実験病理学的アプローチが必須である。

今回、著者は 1970 年代にウッドチャックから分離された街上毒（1088 株）とその継代株（1088-N30 株および 1088-N4#14 株）を用いて感染実験を実施し、以下の成績を得た。

第 I 章では、1088 株を *ddY* マウスに筋肉内接種し、経日的な臨床症状、中和抗体の推移および病理組織学的変化について調べた。その結果、感染初期に接種部位の筋線維に炎症とウイルス抗原陽性像が観察され、その後、主に知覚神経路を伝って CNS に到達することが明らかになった。CNS と背根神経節における主な組織変化は T リンパ球の浸潤、グリア細胞の活性化、神経細胞の変性壊死であった。特に、背根神経節（知覚神経）の神経節細胞に

において変性壊死や軸索の膨化・断片化が顕著であった。ウイルス抗原は背根神経節を始め、知覚神経路に沿って顕著に検出された。以上のことから、1088株は知覚神経路を利用してCNSに到達した後、同部位において炎症や細胞死を引き起こしながら死に至ることが示唆された。

狂犬病ウイルスは末梢感染によりCNSで致死性の脳脊髄炎を引き起こすが、致死性はウイルス株により異なる。そこで、第II章では、致死に関連する組織病変を明らかにするため、接種11日までに瀕死に陥る1088(N0)株と接種11日後以降も生残する1088-N30(N30)株をマウスの筋肉内に接種し、両者の組織病変の違いを比較検討した。その結果、いずれの接種群においても背根神経節細胞の変性、軸索の膨化・断片化などの組織変化が認められたが、N30株接種群では接種5日後より背根神経節にリンパ球浸潤が認められた。接種8日後以降のウイルス抗原陽性細胞はN0株接種群の方が顕著に多く、接種5日後のTリンパ球浸潤はN30株接種群の方が強いことが明らかになった。アポトーシスを呈する細胞はN0株接種群の方が顕著であった。以上のことから、病原性の発現にはCNS内でのウイルスの増殖、アポトーシス細胞の増加と感染初期のリンパ球浸潤が深く関与している可能性が示唆された。

1088株は感染初期にCNSへのTリンパ球の浸潤を抑制しており、このことがその後の感染拡大と致死に深く関与していることが示唆された。そこで、第III章では、Tリンパ球がCNSにおける



ウイルスの増殖と組織病変に及ぼす影響を明らかにするために、免疫正常マウス（BALB/c）と免疫不全マウス（BALB/c *nu/nu*、ヌードマウス）を用いて両群における組織病変の違いを比較検討した。その結果、両群ともに、接種 7 日後から明瞭な神経症状がみられ、生存率に有意な違いは認められなかった。ウイルス抗原陽性細胞数は接種 5、8 日後のヌードマウスにおいて有意に増加していた。頭部組織におけるウイルス抗原の局在は、BALB/c では三叉神経節のみに、ヌードマウスでは三叉神経節のほか、洞毛、表皮、口腔粘膜から多数検出された。また、ウイルスに感染した背根神経節細胞は変性・壊死し、一部では神経食現象が観察された。以上の結果より、T リンパ球の欠損が CNS と末梢組織における感染を増強させていることが明らかとなった。

狂犬病は致死率 100% の感染症として理解されているが、これまで 13 例が発病後に後遺症を残して生存している。後遺症は主に麻痺症状である。生残出来た理由や後遺症に関連した組織病変については分かっていない。1088 株から作出した弱毒株（1088-N4#14）をマウスの後肢筋肉に接種すると約半数が麻痺症状を残しながら耐過することが報告されている。そこで、第 IV 章では、麻痺症状を残して耐過したマウスと麻痺症状を残さず耐過したマウスの組織病変の違いについて比較検討した。CNS におけるウイルス抗原は接種 5 日後から 11 日後まで観察されたが、接種 30、63 日後では認められなかった。麻痺症状を発現した群の組織病変は知覚神経線維、脊髄、延髄、橋、中脳、視床における空胞形成と軸索変性であった。また、これらの病変部にはアストログリア

が増生していた。また、麻痺症状群では、Tリンパ球、Bリンパ球の浸潤が強く、中和抗体価が上昇していた。以上のことから神経症状の原因は末梢神経とCNSにおける軸索損傷とその後の炎症反応が深く関与していることが示唆された。

以上の成果から、①街上毒ウイルスに感染したマウスでは、主な組織病変が知覚神経路に沿って形成されること、②感染初期にCNSへのTリンパ球浸潤がその後の感染拡大を抑制していること、③Tリンパ球の欠損がCNS並びに末梢組織への感染拡大に深く関与すること、④耐過例にみられる麻痺症状が知覚神経線維、延髄、橋、中脳、視床における軸索損傷と炎症反応に起因する可能性が示唆された。本研究によって、ウッドチャック由来の街上毒1088株の病理発生機序が明らかとなった。

## 謝 辞

本論文は筆者が北里大学大学院獣医学系研究科獣医学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。博士学位論文を提出するにあたり多くの方々のご指導とご協力を頂いた。同専攻獣医病理学研究室教授小山田敏文先生、准教授朴天鎬先生、専任講師安藤亮先生、畑井仁先生（現鹿児島大学共同獣医学部組織病理学研究室准教授）にはご指導、ご鞭撻、ご厚情を頂いた。特に、朴天鎬先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、研究の初歩から博士課程を修了するまでの間、終始ご指導いただいた。また、狂犬病の研究のみならず獣医病理学の考え方、研究方法についてご指導頂いた。ここに深謝の意を表する。

大分大学医学部微生物学講座教授西園晃先生、並びに、准教授山田健太郎先生には、本研究のウイルス感染マウスの提供と感染実験の機会を頂いた。特に山田健太郎先生には、助言を頂くとともに研究計画についてご指導いただいた。ここに深謝の意を表する。

国立感染症研究所獣医科学部井上智先生には貴重な抗体を提供していただくとともに、有益なご助言を頂いた。ここに深謝の意を表する。

小嶋大亮博士、Hassadin Boonsriroj 博士、志和希氏には、同専攻の大学院生として公私ともに多大な御助力を頂いた。獣医病理学研究室第 42 期～50 期専攻生各位、特に小宮尚之氏、久保達也氏、杉下摩由璃氏、田中尚人氏、小宮拓巳氏、篠崎春美氏、高橋友里花氏、島津太一氏、川本尚未氏、須見康代氏、中島千景氏、

山岸光葉氏、井端康博氏、清水大智氏、中田浩美氏、山下緩子氏は本論文の遂行に多くの御助力を頂いた。ここに感謝の意を表する。

両親、妻、息子には多大な苦勞をかけたにもかかわらず、在学中の研究生活を支えてもらった。ここに感謝の意を表する。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金（特別研究員DC1 No.15J06440）によった。ここに感謝の意を表する。

最後に、本研究のために尊い命を捧げてくださった動物たちの冥福をお祈りするとともに、狂犬病研究と北里大学獣医学部獣医病理学研究室の更なる発展を願う。

2017 年 12 月 27 日

君付和範