

学位論文題名

麻疹ウイルス感染ラット脳における
キノリン酸・キヌレニン代謝の変化

学位論文内容の要旨

はじめに

進行性の神経変性疾患については現在までその成因が明らかでないものが多い。外傷時にはサイトカインを介するアストログリアの増殖が起こると考えられ、また脳炎後のパーキンソン病にはアストログリアの反応性の変化がみられている。このように神経変性とグリア増殖の間に関連があることは広く認められてきているが、アストロサイトの持つサイトカイン産生能、物質代謝能を考慮すると、アストロサイトは単に神経変性にともない二次的に反応しているのみとは考えにくい。ウイルス感染の際に起こる神経変性の程度は、宿主の反応とウイルスのvirulenceの双方によって規定される。そこでLewisラットの脳に麻疹ウイルスを接種することにより、グリアの反応を観察してウイルス感染とニューロン・グリア相互機能におけるキノリン酸・キヌレニン代謝を検索して考察を加えた。

材料と方法

1. ウイルス接種：15日齢のLewisラット(ALAB, Sweden)の左側大脳半球前部に0.02mlの麻疹ウイルスhamster neurotropic(HNT)株溶液を用手接種した(10%w/v, titer $10^{3.7}$ 50% intracerebral lethal dose)。対照としてPBSのみを投与した。これらのラットは体重と病的変化の有無を連日観察して記録した。

2. 組織学的検索及び蛍光抗体法：ウイルス接種1、2、3、6及び12週後にコントロールとともにラット脳を摘出し、ドライアイスで凍結したのちクリオスタットで14nmの切片を作成した。切片は前頭葉皮質および海馬を含むように作成した。切片を飽和ピクリン酸加4% paraformaldehydeで30秒間固定し冷アセ

トンで、後固定した。抗麻疹NP 単クローン抗体をPBSで400倍に稀釈して4° Cでovernight反応させた。PBSで洗浄後15倍稀釈FITC標識抗マウス・ウサギIgGを反応させ包埋した。蛍光顕微鏡でウイルス抗原のfocusを数えスコア化した。アストロサイトの反応は牛glia fibrillary acidic protein(GFAP)に対するウサギ多クローン抗体(DAKO)を用い蛍光抗体法で評価した。コントロールと同程度の場合0、軽度増強+、中等度2+、高度3+と左右の皮質、海馬のスコアをつけた。神経細胞の変性を観察する目的でcresyl violet acetic acidにて単染色した。

3. 酵素活性の測定：感染群、コントロール群のラット脳を摘出し、左右前頭葉、左右海馬、小脳に分け-70° Cで保存した。酵素測定前に計量し再蒸留水を加え超音波処理して10%ホモジネートを作成した。3-hydroxy anthranillic acid oxygenase (3-HAO)はFosterら、kynurenine amino-transferase (KAT)はOkunoら、そしてglutamine synthetase (GS)はSmithらの方法によって測定した。3HAOは¹⁴C-3-hydroxy anthranillic acid(3-HANA)を加え生成する¹⁴C-quinolinic acid(QUIN)を測定した。KATの測定には、³H-L-kynurenine, α -ketoglutarate, pyridoxal-5'-phosphateを加え³H-L-kynurenic acid(KYNA)を測定した。GS測定には¹⁴C-glutamate, ATP, MgCl₂, NH₄Cl, imidazoleとともに反応させ、¹⁴C-glutamineのradioactivityを測定した。すべての検体はduplicateで測定し、10分間湯浴で煮沸加熱した検体をバックグラウンド測定用のコントロールとした。酵素活性はbovine serum albuminを標準とするLowry法で求めた蛋白量あたりの活性で表示した。

結果

ウイルス接種後1週に体重減少をきたし死亡する約10%のラット以外には興奮性の亢進などの症状を認めなかった。単染色で海馬・皮質の神経変性は認めなかった。感染7日に皮質の神経細胞内、樹状突起にウイルス抗原を認めた。感染2週間後には両側皮質により強い抗原の出現を認めたが、3週間後にはウイルス抗原を検出できなかった。アストロサイトの反応は感染1週間後から確認された。皮質・海馬全体におよぶアストロサイトの反応は接種側には、必発であるが、接種反対側に強い場合もあった。6週間後まではグリア

の反応がコントロールより強いが、12週間後では感染群とコントロール群に差を認めなかった。3HA0活性は感染1週間後にはコントロールとの間に差を認めなかったが、2、3週間後に両側皮質、海馬で約50%の酵素活性の上昇を認めた。同様の傾向は6週間後にも認めたが、12週間後には差は認めなかった。KAT活性は加齢とともに活性値の上昇を認めたが、この上昇に加え、ウイルス感染群では感染2から6週間まで同時に測定した3HA0の上昇と同程度の活性上昇を認めた。GS活性には加齢あるいは感染による変化を認めなかった。

考察

この度の実験は麻疹ウイルスHNT株をLewisラットに接種して、脳内の病変、グリアの変化、キノリン酸・キヌレニン代謝を検索したが、同じウイルスを用いたBALB/Cマウスの実験では感染神経細胞数、その分布に差はないが、海馬に広範囲の神経変性を認め、非競合性のN-methyl-D-aspartate(NMDA)レセプター拮抗剤であるMK801がその変性を予防できるという成績が得られている。

またマウスでは感染後3HA0の活性が3-4倍になるが、KATの活性は変化せずラットでは反対の結果が得られた。またマウスでは感染後に興奮性の亢進を認める。これは増加した3HA0により興奮性アミノ酸でありneurotoxicであるQUINが生成されたと考えられる。しかしながらマウスでは、NMDAレセプターを競合する事によりneuro-protectiveな作用を示すKYNAを生成するKATは変動しない。このことは動物の種の違いによりQUIN, KYNAの代謝調節に差があることを示唆している。この代謝調節の差がウイルスによる神経変性の発現に関与している可能性がある。ウイルス感染によるアストロサイトの増殖、遊走、分化、そしてその場での他のグリアあるいは神経細胞とのinteractionがQUIN, KYNAの代謝にどのような影響を与えるかを細かく解析する必要がある。

結語

Lewisラットに麻疹ウイルスHNT株を脳内接種して以下の成績を得た。

1. グリアの反応はウイルス抗原が単クローン抗体で検出できない時期まで持続していた。
2. 感染12週間後にはGFAPの染色性は感染群とコントロール群で差を認めなかった。またこの間の観察で神経変性を認めなかった。
3. 感染群で3HA0活性が軽度上昇したがKAT活性も同程度上昇した。

これらの結果はグリア増殖、3HA0活性増加、そして神経変性を認めるBALB/Cマウスの感染実験結果と対照的でグリアにおけるQUIN, KYNA代謝の調節に種差があり、そのことが麻疹ウイルス感染後の神経変性発現に関与していることを示唆するものと考えた。今後この代謝を調節する因子を明らかにすることで、ウイルス感染後の神経変性の発症機序を解析していくことが可能になるものと考えた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

麻疹ウイルス感染ラット脳における キノリン酸・キヌレニン代謝の変化

感染の際に起こる神経変性の程度は宿主の反応にウイルスvirulenceの双方によって規定される。そこで柴田氏は15日齢のLewisラットの脳内に麻疹ウイルスのハムスター神経向性株を接触し、グリアの反応を観察することによりウイルス感染とニューロン-グリア相互機能調節⁸について検討を行った。グリアの変化は接触後6週まで持続したがその際興奮性アミノ酸で neurotoxic とされるキノリン酸を生成する 3-hydroxy anthranilic acid oxygenase (3HAO)はアストロサイトに含まれるが、その活性が約50%増加していた。アストロサイトに含まれる他の酵素で neuroprotective な作用を持つキヌレニン酸を生成する Kynurenineaminotransferase (KAT) も同様に増加していた。この実験ではアストロサイトに特異的とされる glutamine synthetase (GS)の活性は変化を認めずラット脳には神経変性の徴候を認めなかった。

これらの結果はグリアの増殖、3-hydroxy anthranilic acid oxygenaseの活性増加、そして神経変性を認める BALB/C マウスの感染実験結果と対照的にグリアにおけるキノリン酸、キヌレニン代謝の調節に種差があり、そのことが麻疹ウイルス感染後の神経変性の発現に関与していることを示唆するものと考えられた。すなわちキノリン酸、キヌレニン代謝の調節の差が神経変性の出現の有無と関連する可能性を示したことはウイルス性脳炎、実験的アレルギー性脳脊髄炎等の発症病理解明の一助となるものであり、学位に値する研究と判断した。副査の長嶋、皆川両教授並びに小山教授から夫々の専門領域で幾つかの質疑があり、更に後日副査の両教授から個別に審査を受けたがいずれもほぼ妥当な答えを得たと判断された。