

学位論文題名

精神分裂病患者剖検脳からのボルナ病ウイルス分離

学位論文内容の要旨

ボルナ病(Borna disease: BD)は、1894年にドイツのSaxony地方Bornaのウマに大発生した、非化膿性の脳脊髄炎を引き起こす疾患である。BDは、その後ボルナ病ウイルス(BDV)の中枢神経への感染症であること、さらに発症馬から分離されたBDVは、その後の解析によりnonsegment、(-)鎖、1本鎖の約9kbのRNAウイルスであることが明らかになった。さらに1994年には、ウマ由来BDVの全塩基配列が決定され、少なくとも5つの蛋白質をコードしており、相同性からも狂犬病ウイルスや豚の水疱性口炎ウイルスなどのラブドウイルスとの類似性が認められている。さらに、RNAウイルスでありながら、核内で複製するという特徴を持ち、感染細胞に核内封入体(Joest-Degen小体)が認められる。その感染経路については、現在まで確定されていないが、鼻汁を介した経鼻感染の可能性も指摘されている。BDの臨床症状は、主に急性型と慢性型の2つの型に分けられる。急性型は、約4週間の潜伏期間の後、熱発、振せん、知覚過敏などの症状を示し全身麻痺状態に陥り、多くは致死的経過をたどる。一方、慢性型は症状は不明確であり、肉眼的病変は認められない。過去には、ドイツを中心に集団発生して多くのウマが死亡したが、現在はその発生も散発的で年々減少している。

近年BDVはウシ、ネコ、およびダチョウなどに対しても自然感染が認められることが明かにされている。ウシは、ドイツ、またはその周辺国でその発生が数例認められている。ネコは、スウェーデンで以前から地方病であるといわれていた原因不明の後駆麻痺等の神経症状を呈する疾患(staggering disease)ネコで、BDVに対する抗体陽性率が高いとの報告がなされている。ダチョウは、イスラエルのダチョウ飼育場で起立不能などを呈して大量死が発生し、その個体の血清中から抗BDV抗体を検出したとの報告がなされている。

我が国におけるボルナ病の発生報告は現在まで出されていない。しかしながら筆者は、以前日本で飼育されている健康なウマについてBDVの疫学調査を行ったところ、約30%のウマが末梢血単核球においてBDV-RNAを、血清中に抗BDV抗体を保有しており、日本においてBDV持続感染ウマが存在することを初めて明かにした。また、同様に日本で飼育されている健康なネコについても調査を行った結果、約10%がBDV-RNA、あるいは抗BDV抗体陽性であった。

また、BDVはげっ歯類への実験感染も可能であることから、主にラットを用いた実験感染により、その発症病態についての解析がなされてきた。BDVを成熟ラットに感染させた場合、感染後数週間後から数カ月後にかけて歩行異常や行動異常を呈し、脳組織において非化膿性の脳脊髄炎が認められる。一方、新生仔ラットに感染させた場合、持続感染し、脳炎を引き起こさないことから、BDVの発症が免疫反応によって引き起こされることが明かにされている。

さらに1985年に血清学的調査によりヒトへの感染が示唆される報告がなされ、特に精神疾患患者における抗体陽性率が高かったことから、その相関性について様々な解析がなされてきた。その後BDVの疫学調査は、他の原因不明の神経症状を示す疾患（多発性硬化症など）についても行われてきたが健常者と比べて有意に高い陽性率は認められなかった。1995年に岸らは、逆転写遺伝子増幅法(RT-PCR)による末梢血単核球(PBMC)内のBDV-RNAの検出を試み、日本の精神分裂病患者のBDV陽性率が、特に神経症状の認められない献血者に比べて有意に高いことを報告した。以来、1996年には精神疾患患者PBMCからのBDV分離がドイツのBodeらにより報告され、また精神疾患患者の剖検脳からのウイルス遺伝子の検出も数グループにより報告された。

今回、筆者は日本の精神分裂病患者剖検脳4例についてBDVの感染の有無を検討した。まず、各患者の血清中、および脳脊髄液中の抗BDV抗体検査を行った。その結果、4例中1例の患者の血清中に抗BDV抗体が検出された。次に、脳組織におけるBDV-RNAの検出をRT-PCR法を用いて行ったところ、4例の患者のうち抗体陽性であった1例の患者の脳組織においてBDV-RNAが検出された。検出された組織は、海馬、小脳、橋であった。また、そのうち海馬においては血管周囲における細胞浸潤が認められ、なんらかの原因による炎症反応が起きていることが示唆された。さらに、これらの組織におけるBDV-RNAの分布を*in situ* hybridization法により解析した。その結果、PCRにてBDV遺伝子が検出された領域と一致してBDV mRNAのシグナルが認められた。そこで、さらにこれらBDV-RNAが検出された組織からのBDV分離を試みた。筆者は、これまで従来BDVの実験動物として用いられてきたラットとは別に、スナネズミがBDVに対して強い感受性を示すことを確認していた。そこで、今回BDV陽性であった組織を新生仔スナネズミに脳内接種した。接種後、20日目に脳組織、および末梢組織を採取しBDV-RNAの検出を試みた。RT-PCRを行った結果、脳と脊髄にてBDV-RNAが検出された。そこで、これらのBDV陽性スナネズミの脳組織の乳剤をヒトオリゴデンドログリオーマ細胞(OL細胞)との共培養を行った。培養開始後、45日で間接蛍光抗体法にてウイルス抗原が(1%以下)、さらにRT-PCRによりBDV遺伝子が検出された。その後培養を続けた結果、約120日で抗原陽性率が約90%になり、BDV持続感染細胞を得ることができた。

今回の解析の結果、精神分裂病患者の4例中1例の剖検脳組織（海馬、小脳、橋）においてBDV-RNAを検出することに成功した。さらに、その患者の血清中には抗BDV抗体が存在しており、BDV-RNAが検出された場所において血管周囲性の細胞浸潤が認められた。さらに、現在までの報告では、組織からPCRによりBDV遺伝子を検出したという記載はあるものの、組織上におけるBDV-RNAの局在を*in situ* hybridizationにより明かにしたのは、今回が初めてである。またその組織を、スナネズミに脳内接種し、その脳組織を培養細胞と共培養することによりヒト由来BDV持続感染細胞を樹立することに世界で初めて成功した。これまで、ヒトから分離されたBDVは末梢血単核球由来のものであり、神経において障害を示すBDVの解析を行う上で、今回分離した脳由来BDVは極めて有用であると考えられる。今後は、この分離株を用いてウマとヒトとの比較検討を行い、ヒトにおける病態への関与を明らかにしたいと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 田 和 良
副 査 教 授 小 山 司
副 査 教 授 柿 沼 光 明

学位論文題名

精神分裂病患者剖検脳からのボルナ病ウイルス分離

ボルナ病ウイルス(Borna disease virus : BDV)は、18世紀からドイツのウマに大発生した、非化膿性の脳脊髄炎を引き起こす疾患であるボルナ病の原因ウイルスである。その後BDVはヒツジ、ウシ、ネコ、およびダチョウなどに対しても自然感染が認められ、げっ歯類への実験感染も可能であることから、主にラットを用いた実験感染により、その発症病態についての解析がなされてきた。

さらに1985年に血清学的調査により、ヒトの血清中に抗BDV抗体が存在すること、またその抗体保有率がヒトの精神疾患患者において有意に高いことが報告され、BDV感染と精神疾患との相関性について解析がなされてきた。また1995年に岸らは、末梢血単核球(PBMC)内のBDV-RNAの検出に成功し、日本の精神分裂病患者のBDV陽性率が、献血者に比べて有意に高いことを報告した。しかしながら、ヒトへのBDV感染による病態については、未だ具体的な解析はなされておらず、そのためには脳自身に存在するBDVについて解析を行う必要があると考えられる。

そこで今回、日本の精神分裂病患者剖検脳4例についてBDVの感染の有無を検討した。まず、各患者の血清中、および脳脊髄液中の抗BDV抗体検査を行った結果、4例中1例の患者の血清中に抗BDV抗体が検出された。次に、脳組織におけるBDV-RNAの検出をnested RT-PCR、及び*in situ* hybridization法にて行ったところ、抗体陽性であった1例の患者の脳組織においてBDV-RNAが検出された。検出された組織は、海馬、小脳、橋、側頭葉大脳皮質であった。また、海馬においては血管周囲における細胞浸潤が認められた。そこで、さらにBDV-RNAが検出された組織からのBDV分離を試みた。BDV陽性脳組織を新生仔スナネズミに脳内接種し、接種後20日目に採取した各組織について、nested RT-PCRにて解析した結果、脳と脊髄にてBDV-RNAが検出された。さらに、この脳組織の乳剤をヒトオリゴデンドログリオーマ細胞(OL細胞)と共培養し、抗BDV-p40モノクローナル抗体を用いて間接蛍光抗体を行った結果、培養開始後30日で初めてウイルス抗原陽性細胞が確認された。その後陽性率は徐々に上昇し、約120日で抗原陽性率約

90%となり、ヒト由来BDV持続感染細胞を樹立することに初めて成功した。

公開発表は23名の聴衆の前で行われ、副査の小山教授より、今回のBDV陽性症例の臨床的特徴について、また、BDV陽性ヒト脳組織を接種したスナネズミにおける行動異常や組織学的異常の有無、さらにBDV感染動物での脳内における一般的な組織学的所見について、そして動物界にてBDVが常在していることを仮定した上での病態との関連性について、副査の柿沼教授より、本症例における免疫反応による炎症像の有無、またウイルス分離のための動物としてスナネズミを用いた理由、さらに従来ラットとスナネズミにおけるBDV感染による病態の違いについて、また分離したウイルスの培養上清中の放出ウイルス粒子の有無などの質問がなされたが、申請者はおおむね妥当な回答をなし得た。

本研究は、精神分裂病患者脳組織由来のBDVを初めて分離したという点で高く評価され、審査員一同は申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。