

綜 説

# タイラー脳脊髄炎ウイルスによる免疫性脱髄疾患

——多発性硬化症の動物実験モデル——

井上 敦\* 高 昌星

信州大学医学部第3内科学教室

## Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Induced Demyelinating Disease: A Model for Multiple Sclerosis

Atsushi INOUE and Chang-Sung KOH

Department of Medicine (Neurology), Shinshu University School of Medicine

**Key words:** encephalomyelitis, demyelination, multiple sclerosis, epitope

脳脊髄炎, 脱髄, 多発性硬化症, エピトープ

### I はじめに

多発性硬化症は通常若年成人に発症する慢性疾患で、病理学的には中枢神経の白質に“多発性”に炎症、選択的ミエリンの消失すなわち脱髄、グリア細胞の増殖（硬化）等を生じる。いわゆる空間的な“多発性”病巣である。

多発性硬化症の臨床経過はほとんど症状がなくはじまり、徐々に悪化するものから、急激に進行し重篤な神経障害を呈するものまで種々である。しかしながら、たいていの症例では、再発と寛解を繰り返す経過をとる。一般的に初期には症状の増悪があってもほとんど完全に回復するが、再発を重ねるに従い、種々の神経症状は残存し徐々に進行する。すなわち時間的“多発性”をもつ。

多発性硬化症の原因は未だ不明であるが、自己免疫機序とウイルスの2つの可能性が考えられている。おそらく何らかのウイルス感染が引き金となり自己の髄鞘成分に反応するT細胞が活性化し、分泌された種々のサイトカインを通じて活性化された貪食細胞や細胞障

害性T細胞により髄鞘が破壊されていくものと考えられている。多発性硬化症の病因を知るうえで、その動物実験モデルの研究はきわめて重要である。

多発性硬化症の動物実験モデルには髄鞘構成成分をアジュバントとともに感作することにより作成される実験的アレルギー性脳脊髄炎とウイルス感染を引き金とし免疫機序によって広範な脱髄を生じるタイラー脳脊髄炎ウイルスによる免疫性脱髄疾患の2つが代表的なものとしてされている。

われわれはこれまで両者について研究を重ねてきたが本稿ではタイラー脳脊髄炎について最近のわれわれの研究の成果もまじえ解説したい。

### II タイラー脳脊髄炎ウイルス——背景

1934年 Theiler<sup>1)</sup>が後肢麻痺の自然発症マウスよりウイルスを回収したことに始まる。このウイルスは通常は自然界のマウスの腸管に無症候性の炎症を引き起こす程度で、神経症状を呈することはきわめてまれである<sup>2)</sup>。しかしウイルスを感受性マウスに脳内接種することにより脳脊髄炎を誘導することができる。

タイラー脳脊髄炎ウイルスはピコルナウイルス群のカルジオウイルスに属し<sup>3)</sup>、数種類の亜型にわけられ

別刷請求先: 井上 敦

〒390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部第3内科

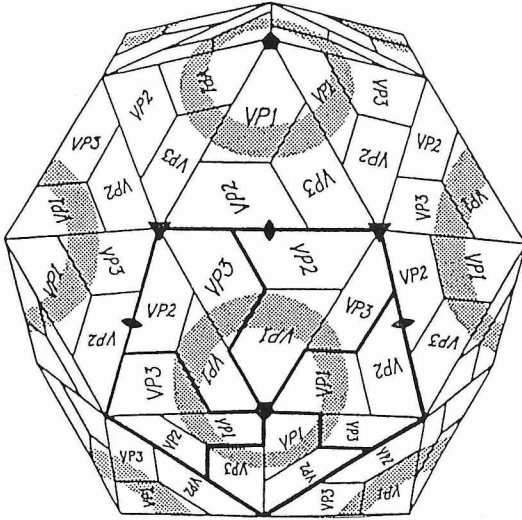


図1 タイラー脳脊髄炎ウイルスの模式図(文献45)より引用

る。いずれのウイルスも血清学的にみても、核酸配列の点からみても非常によく似ているが、脳内接種により誘導される脳脊髄炎の病型により大きく2種類に分けられる。

1つは急性脳脊髄炎を引き起こすもので、GD VII株およびFA株がそれにあたる。これらのウイルスを脳内接種されると2〜3日で急性脳脊髄炎を発症する。病理所見は脳および脊髄の灰白質優位に重篤な壊死性病変を呈し、ポリオによく似た所見である<sup>4)</sup>。さらにGD VIIは静脈内投与でも急性脳脊髄炎を誘導できる。もう一方がTO(タイラーオリジナル)類似群とよばれるグループでこれにはTO株、DA株、WW株、Yale株およびBeAn8386株が含まれる。このTO類似群は感受性マウスの脳内に接種されると通常2相性の症状を呈する。初期病変は脳内接種後2日目から20日にかけて生じ弛緩性四肢麻痺を特徴とする急性脳脊髄炎である。この病変は一旦回復するが、その後徐々に四肢麻痺が出現し慢性進行性に経過する。病理学的には後期病変は広範な脱髄が主体で、ヒトの多発性硬化症に酷似する。ウイルスは少量持続感染することが知られ、脱髄の発症機序には免疫学的過程が関与していると考えられている。特にBHK-21(幼若ハムスター腎細胞由来)中で組織培養をくりかえしたBeAn8386の株は初期の急性症状を欠き、脳内接種後30日から50日にかけて慢性進行性の病変を呈してくる。ヒトの多発性硬化症が20歳から30歳にかけてほとんど

が発症することから、マウスの寿命を考えあわせればほぼ同様な時期に発症することになる。以上のことよりBeAn8386株を感受性SjL/Jマウスに感染させて起こる免疫性脱髄疾患は多発性硬化症の動物実験モデルとして現在世界中で精力的に研究されている。このためこのBeAn8386株を中心としたTO類似群をタイラー脳脊髄炎ウイルスとして扱うことが研究者間の大勢となっており本稿でもこれに従う。

### III タイラー脳脊髄炎ウイルスの基本構造

タイラー脳脊髄炎ウイルスのゲノムは8,098個のヌクレオチドからなる1本鎖RNAで構成されており、他のピコルナウイルスとよく似た構造をしている。このゲノムは4つのポリペプチドVP1(37kDA)、VP2(34kDA)、VP3(27kDA)、VP4(6kDA)の繰り返し構造により構成されるタンパク殻(カプシド)に包まれている(図1)<sup>5)</sup>。このカプシドは直径約28nmの正20面体構造をもつ。実際にはVP4は内蔵されて

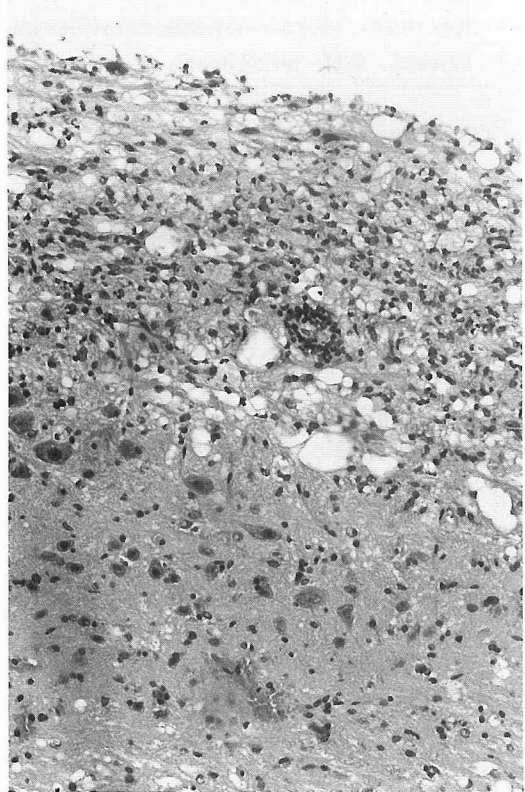


図2 脊髄白質および白質内血管周囲の単核細胞浸潤(HE)×300

おり、ウイルス抗原として重要な働きをするのはVP1, VP2, VP3である。また、ウイルス中にVP2とVP4からなる未切断のVP0も少量であるが存在する。

#### IV 症状および病理所見

脳内感染後30日頃まではまったく症状が無く経過するが、40日頃より徐々に症状が出現してくる。症状は歩行時体の左右の揺れから始まり、動作の際の失調様のふるえ、後肢麻痺がこれに続く。この時期に動物を仰向けにひっくり返すと、立ち直りがうまくできず、後肢を伸展させたままの状態——いわゆる伸展性スパズムの状態を呈する。こうした慢性期の症状は数か月にわたって続く。しかし中枢神経系以外の臓器はほとんど冒されず、食餌、給水に注意すれば死亡することはまれである<sup>6)</sup>。

慢性期の病理学的変化は脊髄が主である。慢性期の初期病変では脊髄軟膜および血管周囲の著明な細胞浸潤がみられる。浸潤細胞はリンパ球、単球、形質細胞からなる単核細胞である。これらの細胞は軟膜やVirchow-Robin腔より脊髄実質に浸潤してくる。炎症細胞のなかに脱髄線維が散在するようになり、貪食細胞がミエリンを軸索からひきはがし貪食する。やがて炎症細胞浸潤の近傍に境界明瞭な脱髄斑がみられるようになり、全脊髄が冒される(図2)。とくに前索と側索で病変が著しい。感染後9~14か月後になると炎症反応は鎮静化し、広範な脱髄とアストログリアの増殖および一部の髄鞘再生がみられるのみとなる。

#### V 疾患感受性について

最も感受性が高く、典型的な臨床経過をとり広範な脱髄を来すのはSJL/Jマウスである。生後4~6週齢のSJL/Jマウスでは脳内接種されると80~100%発症する。これに対しBALB/c, C57BL/6は抵抗性で、脳内接種されても通常は発症しない。CBA, C3H/HeJ, PL/J, AKRなどはその中間に位置するといわれている<sup>7)</sup>。これらの純系マウスによりタイラー脳脊髄炎の感受性の遺伝的素因について詳細に研究されている。第17染色体上で主要組織適合抗原(MHC)のクラスIの1つであるH-2Dの関連はきわめて強くH-2<sup>s</sup>をもつと感受性に、H-2<sup>b</sup>をもつと抵抗性となる<sup>8)9)</sup>。T細胞受容体β鎖をコードする領域である第6染色体上のTmevd-1(TMEV demyelination-1)領域<sup>10)</sup>第3染色体上のTmevd-2領域<sup>11)</sup>、性染色体<sup>12)</sup>等も疾

患感受性に関与していることが知られている。さらに、H2-Dが感受性のものであればたとえT細胞受容体のβ鎖が抵抗性のもので発症するなど染色体上の感受性を決定する領域においてもそれぞれ優位性があることも明らかになってきている<sup>13)</sup>。

多発性硬化症の疾患感受性に遺伝的素因が関与していることはよく知られている。多発性硬化症になる危険性は患者兄弟では2~5%であり、2卵性双生児でもほぼ同様である。これに対し1卵性双生児では30%といわれている。第6染色体上のMHCのクラスII抗原との関連(DR2, DR15, DQ6, Dw2)が指摘されており、T細胞受容体、免疫グロブリンH鎖、ミエリン塩基性タンパクの遺伝子等についても注目されている。

#### VI タイラーウイルスによる中枢神経系の細胞への感染と脱髄疾患発症機構について

感受性マウスでは感染後もウイルスは残存しやがて脱髄疾患発症にいたる。これに対し抵抗性マウスではウイルスは速やかに排除されて、発症することはない。いかにして脱髄疾患が発症してくるのか、どのような機序が作用すれば病気への進展が防げるのかが解明されればヒトの脱髄疾患の治療にもおおいに役立つと考えられるが、これらの点については不明なことが多い。

感受性マウスに感染するとウイルスは神経細胞とアストログリア内で増殖する。その後ウイルスは神経細胞から消失し、1か月後から数か月にわたりウイルスはアストロサイト、貪食細胞を含む単核細胞中に見いだされる<sup>14)17)</sup>。Dal Cantoらのグループによると特にウイルス感染した貪食細胞が脱髄疾患発症に重要な役割を果たす。ウイルスは貪食細胞中で複製、増殖し、少量ではあるが長期間にわたって持続感染し、この刺激により活性化された貪食細胞がいわゆるバースタンダー効果によりミエリン破壊を続ける。ミエリンを形成するオリゴデンドロサイト中にはウイルス抗原は証明されない。したがって脱髄はウイルスによる直接の細胞破壊ではなく、宿主側の免疫応答が脱髄疾患の発症を規定すると述べている<sup>14)15)</sup>。

一方、Rodriguezら<sup>16)</sup>は免疫染色法にて、Brahicら<sup>17)</sup>は*in situ* hybridization法にて慢性期のオリゴデンドロサイト中でウイルスを同定したとしている。この論争の決着はついていないが、これが真実であるならウイルスによる直接の細胞破壊、感染したオリゴデンドロサイト上に表現されたエピトープを細胞障害性

T細胞が認識し破壊する機序、エピトープに対する抗体が細胞表面上で結合し、ADCC（抗体依存性細胞障害）や補体の活性化を介した細胞障害による髄鞘破壊のメカニズムも考えられる。いずれにせよ感染性ウイルスは病気の期間中年余にわたって非常に少量ではあるが、脊髄から回収でき<sup>18</sup>、ウイルスが持続感染していることは確実であり、ウイルスの量などから、ウイルス感染による直接破壊ではなく、残存抗原により免疫機構が刺激され続けた結果にもなる免疫機序による髄鞘破壊と考えられている。

## VII 脱髄疾患発症と免疫応答との関連について

タイラー脳脊髄炎ウイルスによる脱髄疾患の発症に免疫機序が関与しているということは種々の実験結果にて裏付けられている。まず脱髄疾患の発症は種々の免疫抑制剤の投与で抑制される<sup>19)20)</sup>。先にのべたように疾患感受性は免疫応答に重要な役割を果たすMHCのH-2<sup>a</sup>領域<sup>21)</sup>およびT細胞受容体のβ鎖領域内もしくはその近傍の遺伝子によって規定される<sup>10)</sup>。次に脱髄疾患の発症はIa抗原<sup>21)</sup>やCD4<sup>22)</sup>、CD8<sup>23)</sup>に対するモノクローナル抗体を投与することにより部分的にはあるが抑制することができる。また抗TMEV抗体は感受性マウスでも抵抗性マウスでも上昇し、必ずしも疾患活動性を反映しない。これに対しタイラー脳脊髄炎ウイルス特異的でMHCクラスIIで拘束される遅延型過敏反応は疾患感受性および疾患活動性とよく相関することが知られている。

脱髄病変発症の初期に、中枢神経に持続感染しているウイルスのエピトープに反応し、かつ疾患の原因となるCD4陽性細胞が出現すると考えられる。このうちの脱髄疾患の発症のメカニズムについて1つの可能性として髄鞘を形成するタンパク質、ことに脱髄疾患起炎性エピトープを多く有するプロテオリビッドアポタンパクやミエリン塩基性タンパクに反応するT細胞が誘導され自己免疫機序により脱髄が進む過程が考えられる。この自己免疫機序はミエリンに含まれる脳炎起炎性エピトープをふくむタンパクを同じSJL/Jマウスに完全フロイントアジュバントとともに接種すると引き起こすことができ、実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)とよばれているものである。これについてはMillerら<sup>24)25)</sup>のグループがタイラー脳脊髄炎ウイルスによる脱髄疾患とEAEの精密な比較実験を行っている。かれらのデータによるとSJL/JマウスにTMEVを感染させた後、ミエリン塩基性タンパクと

プロテオリビッドアポタンパク中の脳炎起炎性エピトープに反応するT細胞を検索したが、いずれも検出できなかった。また彼らは免疫寛容実験からも自己神経抗原に対する自己免疫機序を否定している。

彼らの手法によると、まずSJL/Jマウスに脊髄のホモジネート（この中にはミエリンおよび非ミエリンよりなる脊髄中の神経抗原が含まれる）を完全フロイントアジュバントとともに感作すると、慢性再発性実験的アレルギー性脳脊髄炎を誘導することができる。またこれらで感作した動物を屠殺して得たリンパ球を同様の脊髄抗原とともに短期培養することにより刺激し、活性化し幼若化してきたリンパ球を健康な同種のSJL/Jの静脈内に移入すると、やはり同様な慢性再発性実験的アレルギー性脳脊髄炎を引き起こすことができる。

ところが同種の脾細胞をとりだし、脊髄ホモジネートとともに短期培養しさらにECDI(1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide HCl)によって脾細胞と神経抗原とを結合させ、この脾細胞を同種のSJL/Jマウスの静脈内に移入すると、移入されたマウスは移入脾細胞と結合した神経抗原に対し、免疫学的に寛容状態となる。したがってこのマウスに脊髄ホモジネートを完全フロイントアジュバントとともに感作しても、実験的アレルギー性脳脊髄炎は発症してこない。またこのマウスに脊髄ホモジネートにより活性化させた脳炎起炎性リンパ球を静脈内に注入してもやはり実験的アレルギー性脳脊髄炎は発症してこない<sup>26)28)</sup>。ところがこの脊髄抗原に対して免疫学的寛容状態になったマウスにTMEVを脳内接種すると、寛容状態となっていないマウスと変わらずに脱髄疾患は発症してくる<sup>25)</sup>。

これらの事実はタイラー脳脊髄炎ウイルスにより誘導される脳脊髄炎には実験的アレルギー性脳脊髄炎にみられるような神経抗原に対する自己免疫機序は関与していないことを示すものである。そこでMillerらの仮説によれば感受性マウスにTMEVが持続感染状態になるとTMEV特異的MHCクラスII拘束性を有し遅延型過敏反応(DTH)に関与するTh1タイプの細胞がクローン増殖し、正常の免疫機構の抑制からはずれて増殖、分化する。このTMEV特異的Th1細胞がリンフォカインを産生し、その作用で単球や貪食細胞を活性化させ、中枢神経系に多数動員し、非特異的なバイスタンダー作用により脱髄が引き起こされるとしている。このような細胞性免疫を重視する仮説に対

し、液性免疫の重要性を強調しているグループもある。脱髄病変部位にはVP1, VP2に対する抗体を産生するB細胞が見られる<sup>29)</sup>。また新生児期に抗 $\mu$ 抗体にて処理しB細胞を欠如させたマウスでは疾患が著しく悪化し、タイラー脳脊髄炎ウイルスに対する特異抗体が宿主の疾患防御に役割を果たしている可能性を示唆している<sup>30)</sup>。一方Nitayaphanら<sup>31)</sup>はタイラー脳脊髄炎ウイルスのDA株およびGDVII株を中和するモノクローナル抗体を初めて作成し、中和部位についての検索を行っている。このグループはさらに中和モノクローナル抗体に耐性の変異ウイルスの研究によりVP1のC末端付近のトリプシン切断部位付近に中和抗体のエピトープを決定している。タイラー脳脊髄炎ウイルスをトリプシン処理すると感染力が増大し、中和抗体が無効になることが知られるが、これはトリプシン処理により中和部位が破壊されることによると考えられる。生体内でもマクロファージのm2プロテアーゼによるこのような中和部位の破壊がウイルス感染の持続性、そののちの脱髄にいたる免疫反応の進展に重要な役割を果たしているものと思われる<sup>32)33)</sup>。またKimら<sup>34)</sup>は抵抗性マウスと感受性マウスとでは抗体が認識するエピトープが異なることを明らかにし、どのようなエピトープを認識する抗体が産生されるかによって脱髄疾患の発症が規定される可能性を示した。

現在先に述べたタイラー脳脊髄炎ウイルス特異的DTH細胞が認識するタイラー脳脊髄炎ウイルス中のT細胞エピトープおよび感受性マウスの抗体が認識するB細胞エピトープの研究に焦点をあてた研究が、脱髄疾患発症の鍵を握ると考えられ精力的に行われている。

### Ⅷ タイラー脳脊髄炎ウイルスのエピトープの研究

タイラー脳脊髄炎ウイルスのエピトープは先に述べたカプシドタンパク中にありその基本構造から明らかのように外殻をなすVP1, VP2, VP3の中にふくまれる。外殻タンパクをコードする核酸配列や構成するアミノ酸配列はすべて明らかになっている。このためエピトープの検索に際しては、まずすべての外殻タンパクをカバーするペプチドをフュージョンタンパクで作成して大体のエピトープ領域を決定し、さらに合成ペプチドを用いてエピトープを決定し、解析するという形をとる。

ここでは我々が行ったB細胞エピトープの研究の中

心に解説する。

### Ⅸ フュージョンタンパクを用いたB細胞エピトープの研究

タイラー脳脊髄炎ウイルス(TMEV)のゲノムはPevearら<sup>3)</sup>により解析されている。このグループより提供されたBeAN8386のcDNAクローンをを用いて解析した。

$\lambda$ gt11サブライブレイの構築とスクリーニング：BeAN8386株のviral capsid proteinのVP1, VP2, VP3, VP4およびリーダー配列の部分をコードする領域を含むヌクレオチド826から3858にわたる3kbの塩基配列をp1322TMEV cDNAクローンより分離した。このDNAをDNase Iにて無作為に切断し、短いcDNA片を多数作成した。これらのDNA片をデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)存在下でT4DNAポリメラーゼにて末端修復し、リン酸化EcoRIリンカーに結合させた。リンカー化したDNA片を脱リン酸化 $\lambda$ gt11アームに結合させ、 $\lambda$ ファージのヘッドに詰め込み、大腸菌Y1090に感染させ、フュージョンタンパクを作成した。このDNAライブレイを抗TMEV抗体および抗 $\beta$ ガラクトシダーゼ抗体にてスクリーニングした<sup>35)</sup>(図3)。このうちの陽性クローンをもとのプレートよりピックアップし、のちのファージブラックイムノドットアッセイや挿入したcDNAの塩基配列の決定などの検索に用いた(図4)。

ファージブラックイムノドットアッセイ：Mg 2+含有Luria-Bertani(LB)アガープレート上にY1090を発育させ、テンプレートに従って、0.25 $\mu$ lのリコンビナントファージ液(約10,000PFU)をスポットした。このプレートを42°C、2時間インキュベートした後10mMのイソプロピル $\beta$ -Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で浸したニトロセルロースを上からかぶせ37°C、2時間反応させ転写した。このニトロセルロース膜をブロッキングした後脳内感染したマウス、あるいはTMEVを完全フロイントアジュバントとともに皮下接種したマウス(感受性SJL/Jマウス、抵抗性BALB/cおよびC57BL/6マウス)血清と反応させた。その後アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体を反応させた後、基質を用い発色させた(図5)。

挿入 $\lambda$ gt11ヌクレオチドの配列の決定：陽性 $\lambda$ gt11クローンはY1090中にて増幅し、ポリエチレングリコール(PEG)にて沈澱させ、ドデシル硫酸ナトリウム

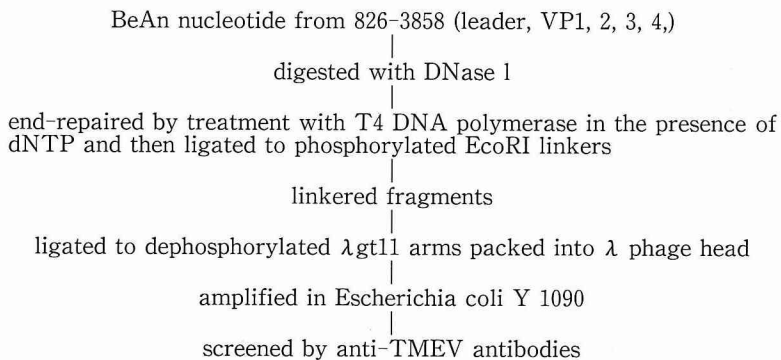


図3 λgt11 サブライプレイリの構築とスクリーニング

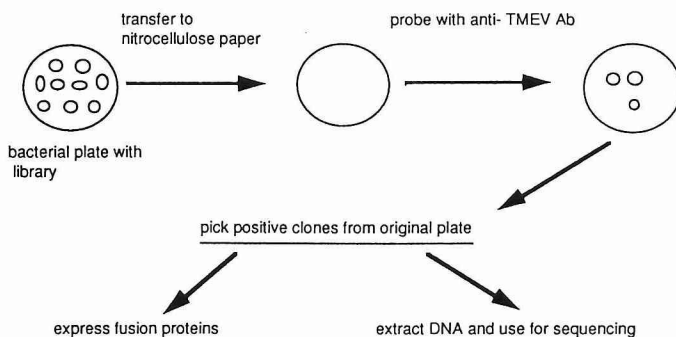


図4 λgt11 cDNA ライプレイリのスクリーニング

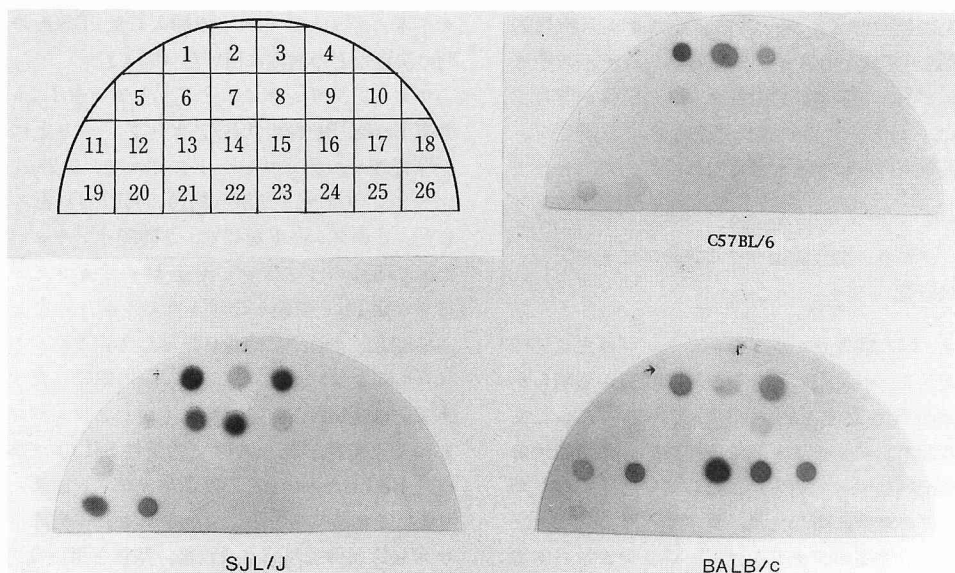


図5 テンプレートの番号は重複する外殻タンパクの断片を表現する λgt11 クローンを示す。図のごとく SJL/J, C57BL/6, BALB/c それぞれのマウス由来の抗体が認識するエピトープ領域は異なる。陽性クロンの遺伝子塩基配列を決定し、最終エピトープ領域を決定した。

Peptide	Position	Reactivity"	
		SJL	C57BL/6
A1A	<sup>12</sup> NDDASVDFVAEPVK <sup>25</sup>	-	+
A1Ba	<sup>146</sup> RWAPTGAPADVTDQL <sup>160</sup>	+	+
A1Bb	<sup>153</sup> PADVTDQLIGYTPSL <sup>167</sup>	-	-
A1Ca	<sup>251</sup> TLFFPWPTPTTTKIN <sup>265</sup>	-	-
A1Cb	<sup>262</sup> TKINADNPVPILELE <sup>276</sup>	+	+
A2A	<sup>2</sup> QNTEEMENLSDRVAS <sup>16</sup>	+	+
A2B	<sup>165</sup> TGYRYDSRTGFFATN <sup>179</sup>	+	+
A2c	<sup>250</sup> QPVNPFVNGLRHETVIAQ <sup>267</sup>	-	-
A3A	<sup>24</sup> PIYGKTISTPSDYM <sup>37</sup>	+	±
A3c	<sup>215</sup> GDDFTLRMPISPTKWVPQ <sup>232</sup>	-	-

1 : 300 dilutions of hyperimmune sera from either SJL or C57BL/6 mice that had been s.c. immunized three times with UV-inactivated TMEV.

図6 B細胞エピトープ領域の合成ペプチドと抗タイラー脳脊髄炎血清との反応性を示す文献39)より引用

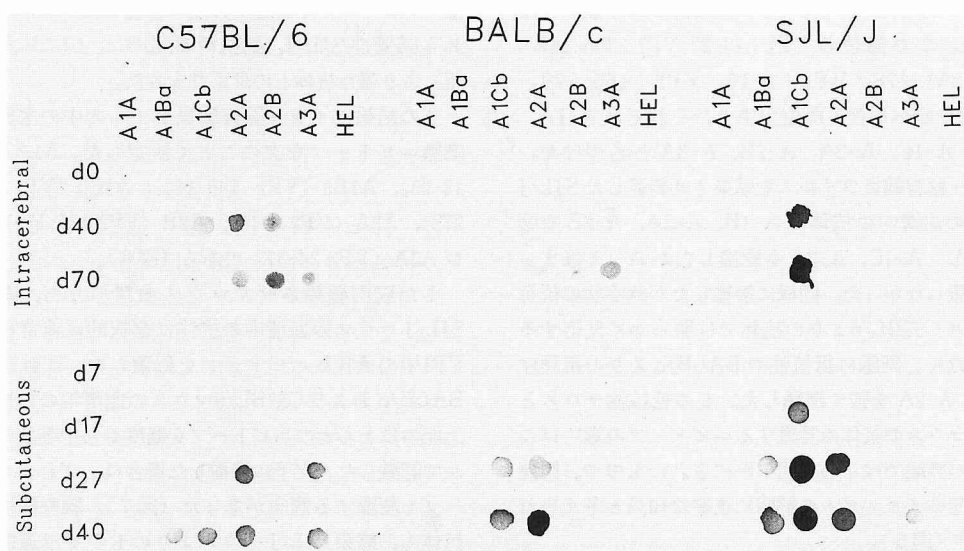


図7 エピトープと各マウスにタイラー脳脊髄炎ウイルスを脳内感染させた血清,あるいは皮下接種した血清との反応性を示す。唯一症状を呈するSJL/Jマウスに脳内感染させて得られる血清では, A-1Cbを強く認識する。文献39)より引用

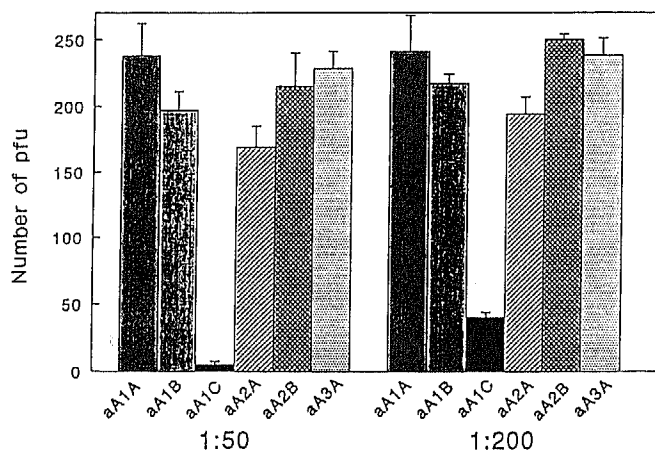


図8 各エピトープに対する特異抗体のウイルス中和能を示す。抗A-1Cb抗体は著しく高い中和能を示した。下段は抗体の希釈倍率を示す。文献39)より引用

(SDS)にて溶解した後エタノールにて析出させた後、直接法<sup>30)</sup>にて塩基配列を決定した。

上記検索の結果ウイルスの外殻タンパク(VP1,2,3,4)のほぼ全領域を重複しつつカバーするフュージョンタンパクを産生する約150の陽性リコンビナント $\lambda$ gt11クローンを得た。脳内感染させたマウスの抗体が認識するエピトープはVP1にて3カ所, VP2にて2カ所, VP3にて1カ所の計6つの領域に限られた。この部位はVP1:13-27, VP1:145-167, VP1:251-276, VP2:2-16, VP2:165-179, VP3:24-43からなる部位であり, それぞれA-1A, A-1B, A-1C, A-2A, A-2B, A-3Aと名づけた。タイラー脳脊髄炎ウイルスを感染させ発症したSJL/Jマウスの血清中の抗体はA-1B, A-2A, A-2Bを強く認識し, A-1C, A-3Aも認識したがA-1Aはまったく認識しなかった。同様に接種したが無症状の抵抗性マウスC57BL/6よりの抗体では明らかに反応するものはなく, 同様に抵抗性のBALB/cよりの抗体はA-1A, A-2Aを強く認識した。この抵抗性マウスと感受性マウスの抗体の認識するエピトープの違いはこの一連の実験ではじめて明らかにされたもので, 脱髄疾患発症のメカニズムの解明に重要な知見と考えられる<sup>34)37)38)</sup>(図5)。

#### X 合成ペプチドを用いたB細胞エピトープの研究

上記 $\lambda$ gt11システムにより得られた知見をさらに確認し, 詳細な検討を行うため先に決定されたエピトープに対応する合成ペプチドを作成し検討した。

合成したペプチドをニトロセルロース膜上にドットしこれにTMEVを脳内感染させたマウスあるいは完全アジュバントとともに皮下接種したマウス(いずれも感受性SJL/J, 抵抗性BALB/c, C57BL/6を使用)より得た抗体との反応性をみた。

この結果タイラー脳脊髄炎ウイルス中の主要なB細胞エピトープを次のごとく決定した。A1A (VP1 12-25), A1Ba (VP1 146-160), A1Cb (VP1 262-272), A2A (VP2 2-16), A2B (VP2 165-179)およびA3A (VP3 24-37)である(図6)。

また脳内感染させたマウス血清のうち, 感受性SJL/Jマウスの血清中の抗体は選択的に非常に強くVP1中のA1Cbエピトープを認識した。これに対しBALB/cおよびC57BL/6マウスの血清中の抗体は, 上記のほとんどのエピトープを軽度から中等度のレベルで認識した。皮下に接種した場合はいずれのエピトープも認識する傾向があった(図7)。脳脊髄液中の抗体も, 感染SJL/Jマウスよりのものでは選択的にA1Cbエピトープを認識した。またこれらのエピトープに対する抗体を作成し, 培養系におけるウイルス増殖にどのような影響を与えるかについて検討した。具



体的にはウイルスを感染させた BHK-21細胞を寒天培地上で単層培養したのち、ウイルスを感染させ、さらに各エピトープに対する抗体とともに培養する。一定時間後ウイルスによってつくられるブラックの数を算定し、各抗体のウイルス発育抑制効果をみた。この結果 A1Cb に対する抗体がウイルス中和能が高く (図 8), このエピトープの疾患発症に関わる重要性が示された<sup>39)</sup>。

## Ⅱ 多発性硬化症の動物実験モデルとしての意義について

以上タイラー脳脊髄炎ウイルスによる免疫性脱髄疾患についての背景および最近の知見についてのべた。このタイラー脳脊髄炎ウイルスによる脱髄疾患の多発性硬化症の動物実験モデルとしての類似点および研究上の有用性については以下のようにまとめられる。

- 1 BeAn 8386を代表とする TO 群の引き起こす病変は中枢神経白質に限られる<sup>16)40)</sup>。
- 2 タイラー脳脊髄炎ウイルスは感受性マウスに脳内感染させると長期の無症状期を経て発症にいたる<sup>41)42)</sup>。

3 マウスがタイラー脳脊髄炎ウイルスの自然界の宿主である。この点が人為的に誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) と決定的に異なる点である。またマウスは免疫学的に最もよく解析され、遺伝的操作もしやすい。またウイルス学的検索も容易である<sup>43)</sup>。

4 ウイルスはピコルナウイルス群に属する。この群にはポリオウイルス、メノゴウイルス、脳炎心筋炎ウイルス、口蹄病ウイルスなどが含まれこれらはいずれも詳細に研究されている。このためタイラー脳脊髄炎ウイルスも確立された手法にて検索ができる<sup>44)</sup>。しかもタイラーウイルスの RNA の全塩基配列およびタンパク構造はすでに決定されている<sup>35)</sup>。

5 初期病変は炎症性脱髄病変であり、慢性期には広範な脱髄と髄鞘再生像がみられ、多発性硬化症に酷似する。

6 ミエリン破壊は免疫機序による。

このためタイラー脳脊髄炎ウイルスによる脱髄疾患は今後多発性硬化症の病因の解明、治療の開発に重要な役割を果たすものと考えられる。

## 文 献

- 1 Theiler M: Spontaneous encephalomyelitis of mice—a new virus disease. *Science* 80: 122, 1934
- 2 Olisky PK: A transmissible agent (Theiler's virus) in intestine of normal mice. *J Exp Med* 72: 113-127, 1940
- 3 Pevear DC, Calenoff M, Rozhon E, Lipton HL: Analysis of the complete nucleotide sequence of the picornavirus Theiler's murine encephalomyelitis virus indicates that is closely related to cardioviruses. *J Virol* 61: 490-496, 1987
- 4 Lipton HL: Persistent Theiler's murine encephalomyelitis virus infection in mice depends on plaque size. *J Gen Virol* 46: 169-177, 1980
- 5 Luo M, He C, Toth KS, Zhang CX, Lipton HL: Three-dimensional structure of Theiler's murine encephalomyelitis virus (BeAn strain). *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2409-2413, 1992
- 6 Leirich JR, Arnason BGW, Hochberg FH: Demyelinative myelopathy in mice induced by the DA virus. *J Neurol Sci* 29: 149-160, 1976
- 7 Lipton HL, Dal Canto MC: Susceptibility of inbred mice to chronic central nervous system infection by Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Infect Immunity* 26: 369-374, 1979
- 8 Rodriguez M, Leibowitz J, David CS: Susceptibility to Theiler's virus-induced demyelination. Mapping of the gene within the H-2D region. *J Exp Med* 163: 620-631, 1986
- 9 Clatch RJ, Melvold RW, Dal Canto MC, Miller SD, Lipton HL: The Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) model for multiple sclerosis shows a strong influence of the murine equivalents of HLA-A, B, and C. *J Neuroimmunol* 15: 121-135, 1987
- 10 Melvold RW, Jonkin DM, Knobler RL, Lipton HL: Variations in genetic control of susceptibility to Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. I. Differences between

- susceptible SJL/J and resistant BALB/c strains map near the T cell  $\beta$  chain constant gene on chromosome 6. *J Immunol* 138 : 1429-1433, 1987
- 11) Melvold RW, Jokinen DM, Miller SD, Dal Canto MC, Lipton HL : Identification of a locus on mouse chromosome 3 involved in differential susceptibility to Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. *J Virol* 64 : 686-690, 1990
  - 12) Kappel CA, Melvold RW, Kim BS : Influence of sex on susceptibility in the Theiler's murine encephalomyelitis virus model for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 29 : 15-19, 1990
  - 13) Kappel CA, Dal Canto MC, Melvold RW, Kim BS : Hierarchy of effects of the MHC and T cell receptor  $\beta$  chain genes in susceptibility to Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Immunol* 147 : 4322-4326, 1991
  - 14) Dal Canto MC, Lipton HL : Ultrastructural immunohistochemical localization of virus in acute and chronic demyelinating Theiler's virus infection. *Am J Pathol* 106 : 20-29, 1982
  - 15) Dal Canto MC : Uncoupled relationship between demyelination and primary infection of myelinated cells in Theiler's virus encephalomyelitis. *Infect Immun* 35 : 1133-1138, 1982
  - 16) Rodriguez M, Leibowitz JL, Lamper PW : Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus-induced encephalomyelitis. *Ann Neurol* 13 : 426-433, 1983
  - 17) Brahic M, Stroop WG, Baringer JR : Theiler's virus persists in glial cells during demyelinating disease. *Cell* 26 : 123-128, 1981
  - 18) Lipton HL, Dal Canto MC : Chronic neurologic disease in Theiler's virus infection of SJL/J mice. *J Neurol Sci* 30 : 201-207, 1976
  - 19) Lipton HL, Dal Canto MC : Theiler's virus-induced demyelination : prevention by immunosuppression. *Science* 192 : 62-64, 1976
  - 20) Roos RP, Firestone S, Wollmann R, Variakojis D, Arnason BG : The effect of short-term and chronic immunosuppression on Theiler's virus demyelination. *J Neuroimmunol* 2 : 223-234, 1982
  - 21) Rodriguez M, Lafuse WP, Leibowitz J, David CS : Partial suppression of Theiler's virus-induced demyelination in vivo by administration of monoclonal antibodies to immune-response gene products (Ia antigens). *Neurology* 36 : 964-970, 1986
  - 22) Gerety SJ, Rundell MK, Dal Canto MC, Miller MC, Miller SD : Class II-restricted T cell responses in Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. VI. Potentiation of demyelination with and characterization of an immunopathologic CD4+T cell line specific for an immunodominant VP2 epitope. *J Immunol* 152 : 919-929, 1994
  - 23) Rodriguez M, Striam S : Successful therapy of Theiler's virus-induced demyelination (DA Strain) with monoclonal anti-Lyt-2 antibody. *J Immunol* 140 : 2950-2995, 1988
  - 24) Miller SD, Clatch RJ, Peaver DC, Trotter JL, Lipton HL : Class-II restricted T cell responses in Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. I. Cross-specificity among TMEV substrains and related picorna viruses, but not myelin proteins. *J Immunol* 138 : 3776-3784, 1987
  - 25) Miller SD, Gerety SJ, Kennedy MK, Peterson JD, Trotter JL, Tuohy VK, Waltenberg C, Dal Canto MC, Lipton HL : Class II-restricted T cell responses in Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. Failure of neuroantigen-specific immune tolerance to affect the clinical course of demyelination. *J Neuroimmunol* 26 : 9-23, 1990
  - 26) Kennedy MK, Dal Canto MC, Trotter SD : Specific immune regulation of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J Immunol* 144 : 2986-2993, 1988
  - 27) Kennedy MK, Tan LJ, Dal Canto MC, Miller SD : Regulation of the effector stages of experimental autoimmune encephalomyelitis via neuroantigen-specific tolerance. *J Immunol* 145 : 117-126, 1990

- 28) Tan LJ, Kennedy MK, Dal Canto MC, Miller SD : Successful treatment of paralytic relapses in adoptive experimental autoimmune encephalomyelitis via neuroantigen-specific tolerance. *J Immunol* 147 : 1797-1802, 1991
- 29) Cash E, Banderia, A, Chrinian S, Brahic M : Characterization of B lymphocytes present in the demyelinating lesions induced by Theiler's virus. *J Immunol* 143 : 984-988, 1989
- 30) Rodriguez M, Kennedy JJ, Thiemann RL, Woloschak GE : Theiler's virus induced demyelination in mice immunosuppressed with anti-IgM and in mice expressing the *xid* gene. *Microb Pathog* 8 : 23-35, 1990
- 31) Nitayaphan S, Toth MK, Roos RP : Neutralizing monoclonal antibodies to Theiler's murine encephalomyelitis. *J Virol* 53 : 651-657, 1985
- 32) Nitayaphan S, Toth MK, Roos RP : Localization of neutralization site of Theiler's murine encephalitis viruses. *J Virol* 56 : 887-895, 1985
- 33) Ohara Y, Senkowski A, Fu J, Kiaman L, Goodall J, Toth MM, Roos RP : Trypsin-sensitive neutralization site on VPI of Theiler's murine encephalomyelitis viruses. *J Virol* 62 : 3257-3259, 1988
- 34) Kim BS, Choe Y-K, Crane MA, Jue CR : Identification and localization of a limited number of predominant conformation-independent antibody epitopes of Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Immunol Lett* 31 : 199-206, 1992
- 35) Huynh TV, Young RA, Davis RW : Selection of clones from library. In: Glover D (ed), *DNA cloning Techniques : A practical approach*, pp49-53, IRL Press, Oxford, 1985
- 36) Kim BS, Jue C : Direct sequencing of lambda-gt11 recombinant clones. *Biol Tech* 8 : 156-159, 1990
- 37) Crane NA, Jue C, Mitchell M, Lipton HL, Kim BS : Detection of restricted predominant epitopes of Theiler's murine encephalomyelitis virus capsid proteins expressed in the  $\lambda$ gt11 system : different mouse strains. *J Neuroimmunol* 27 : 173-186, 1990
- 38) 井上敦, 高昌星, 柳澤信夫, Byung S Kim : タイラ-脳脊髄炎ウイルス(TMEV)における主要構造非依存抗体の抗原決定基の同定と局在に関する研究, *神経研究の進歩* 38 : 668-675, 1994
- 39) Inoue A, Choe Y-K, Kim BS : Analysis of antibody responses to predominant linear epitopes of Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Virol* 68 : 3324-3333, 1994
- 40) Roos RP, Richards OC, Green J, Ehrenfeld E : Characterization of a cell culture persistently infected with the DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Virol* 43 : 1118-1122, 1982
- 41) Daniels JB, Pappenheimer AM, Richardson S : Observation on encephalomyelitis of mice (DA strain). *J Exp Med* 96 : 517-535, 1952
- 42) Gerhard W, Koprowski H : Persistence of virus-specific memory B cells in mice CNS. *Nature* 266 : 360-361, 1977
- 43) Olitsky PK : A transmissible agent (Theiler's virus) in intestines of normal mice. *J Exp Med* 72 : 113-127, 1940
- 44) Rustigian R, Pappenheimer AM : Myositis in mice following intramuscular injection of viruses of the mouse encephalomyelitis group and of certain other neurotropic viruses. *J Exp Med* 89 : 69-97, 1949
- 45) Luo M, Rossmann MG, Palmenberg AC : Prediction of three-dimensional models for foot-and-mouth disease and hepatitis A virus. *Virology* 166 : 503-514, 1988

(7. 6. 13 受稿)