

4. ポリオウイルスの体内伝播機構 ～個体から細胞まで～

大岡 静衣

東京大学大学院医学系研究科微生物学講座

ポリオウイルス (PV) のヒトにおける主要な経路には、PV が経口で取り込まれた後ウイルス血症を経て血液脳関門を越え中枢神経系内へ侵入する経路と、骨格筋へ投射している神経軸索を介して PV が直接中枢神経系内へ侵入する神経経路が知られている。ヒトにおいては PV 経口感染が成立するが、経口感染が成立する動物モデル系は見いだされていなかった。我々は、1 型インターフェロン (IFN) 受容体遺伝子欠損ヒト PV 受容体 (hPVR/CD155) 発現トランスジェニック (Tg) マウスにおいて経口感染が成立する系を確立した。また、IFN 受容体遺伝子が欠損していない CD155 発現 Tg マウスにおいても経口感染が成立する PV 変異株を分離した。ウイルス血症後、PV が血液脳関門を透過する機構を解析したところ、トランスフェリンの血液脳関門トランスサイトーシス経路と共通した機構を利用して PV が血液脳関門をトランスサイトーシスされている可能性が示唆された。一方、PV の神経経路については、運動神経初代培養細胞において、PV が CD155 と同一小胞で逆行性輸送され、その輸送系には細胞質ダイニンが関与していることを証明することができた。

ポリオウイルス (PV) はヒトにおいて主に経口で感染し小児まひ (急性灰白髄炎) を発症する。経口で取り込まれた PV は腸管のバリアーを越えて血中に侵入し、ウイルス血症を引き起こす。その後、血流中のウイルスがタイトジャンクションを形成している血液脳関門を透過することにより中枢神経系内へ侵入し、主に脊髄前角の運動神経細胞などで増殖して脱落させることにより四肢に麻痺を生じさせ、最終的には呼吸麻痺に至ると考えられている。このような経口感染経路がヒトにおいては最も主要な感染経路であると考えられているにも関わらず、経口感染が成立する良い動物モデルがこれまで存在しなかったため、経口感染機構についてはほとんど明らかにされてきていないのが現状である。この他の伝播経路には、骨格筋からそこへ投射している神経軸索内をウイルスが逆行性輸送され血流を介

さず中枢神経系内へ直接侵入する神経経路も存在する。

PV の病原性発現には、膜結合型ヒト PV 受容体 (hPVR/CD155)^{7,10)} が重要な役割を果たしていることが知られている。というのも、本来 CD155 を発現していないマウスは PV に非感受性であるが、CD155 を発現させたトランスジェニック (Tg) マウスは PV 感受性を獲得したことから、CD155 が PV の種特異性を決定していることが明らかになっているからである^{9,17)}。このように、CD155 の発現は感染成立にとって必要不可欠と考えられる。さらに、CD155 に加え、ウイルスの翻訳開始機構である IRES (Internal ribosomal entry site) による組織選択性³⁾ と、1 型インターフェロン (IFN) 応答性の差によって、中枢神経特異性が決定されていると考えられている。IFN 応答性については、小池氏らにより、中枢神経系は他の臓器に比べ IFN 応答性が悪いいため、中枢神経系内でのウイルスに対する防御が間に合わず、ウイルス増殖を許してしまうことが解明されている⁶⁾。これに加え、今回ご紹介するように、我々の経口感染に関する研究結果からも、CD155 発現 Tg マウスに PV を経口投与後、消化管におけるウイルス増殖に IFN 受容体が関与していることが示唆された。その一方で、これまでの我々の研究から、血液脳関門の PV 透過は CD155 非依存的であることが示唆されている²⁰⁾。このよう

連絡先

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
東京大学大学院医学系研究科微生物学講座
TEL : 03-5841-3407
FAX : 03-5841-3374
E-mail : seii@m.u-tokyo.ac.jp

に、PVの体内伝播は、伝播経路によって異なる様々なファクターが、時空間的に絡み合って成立している。体内伝播の観点から、本稿では、経口感染、血液脳関門透過、神経経路に分けて、最近得られた結果を中心にご紹介させていただきたい。

1. 経口感染機構

サルおよびCD155発現Tgマウスにおいて、PVを静脈内注射後はヒトと同様に麻痺を発症するのに対し、PVの経口感染は容易には成立しないことが知られていた²¹⁾。したがって、上記の小児まひの疾患モデル動物を用いた研究は、ウイルス血症以降に重点を置いた研究がこれまで行われてきている。しかし、なぜこれらのモデル動物で経口感染が成立しにくいのかはわかっていない。考えられる主な理由として、①胃の低pHや消化酵素によるウイルスの失活、②腸管におけるウイルス増殖効率の差、③感染部位の差、④防御免疫機構の種差、が挙げられる。実際にヒトと比較することは困難な事項が多いが、PVは酸に強いために胃で失活しないと教科書的には考えられている点について、まず検証を行った。

胃内容物によるPV力価低下原因の解明

CD155発現Tgマウスを用いたウイルス経口投与実験を行う中で、PVはマウスの胃を通過するだけで力価がかなり低下することを見いだした。そこで、マウスの胃内容物の何がウイルス失活の要因となっているのかを検討した(表1)。その結果、胃内の消化酵素活性が原因ではなく、低いpH条件下での37℃程度の加温が原因であることが明らかになった。また、ウイルス液にNaHCO₃やHepesを添加しあらかじめウイルス液をアルカリ性(pH9)にしておいたものと胃内容物を混ぜ合わせるにより、ウイルス力価の低下が抑制されることを明らかにした。実際に3%NaHCO₃添加PV液を経口投与すると、3%NaHCO₃を添

加しないPV液投与時よりも個体差が少なく安定して小腸までウイルスが高力価のまま到達していることを確認した。

IFN受容体遺伝子欠損CD155発現TgマウスにおけるPV経口感染系の確立

そこで、3%NaHCO₃添加PV液をマウスに経口投与後の麻痺および生死を観察した。CD155発現Tgマウス系統のひとつであるPVRTg21^{8,9)}およびそのIFN受容体遺伝子欠損マウスであるPVRTg21/*Ifnar* KO⁶⁾に3 x 10⁸ PFU/2ml/mouseのPV1型強毒Mahoney株を定量給水ボトルにより投与し、24時間以内にウイルス液を全量飲んだ個体について観察した。PVRTg21では5匹中1匹しか死亡しなかったのに対し、PVRTg21/*Ifnar* KOでは5匹中全例が死亡した。この結果は、PVRTg21/*Ifnar* KOを用いることにより、PV経口投与により全例が死亡する感染実験系が確立できたことを示している。また、IFN受容体が欠損することにより、PV経口投与による感受性が上がることから、PV経口感染には、IFN受容体が関与していることが示唆された。PVの他の血清型であるPV2型Lansing株およびPV3型Leon株についてもPVRTg21/*Ifnar* KOにおける経口投与実験を行ったところ、いずれの型も経口投与により麻痺を発症し死亡した。PVRTg21/*Ifnar* KOにPV経口投与後の臨床症状は、目やに、顔面麻痺、首の硬直、手足の弛緩性麻痺、平衡感覚の麻痺、呼吸麻痺などが観られ、ヒトに良く似た症状が観察された。しかし、別系統のCD155発現Tgマウスで肝臓でのCD155発現量が多いPVRTg25¹⁹⁾のIFN受容体遺伝子欠損マウスであるPVRTg25/*Ifnar* KO⁶⁾においては、上記の麻痺症状よりも肝硬変の方が顕著に観察される傾向があった。このことから、IFN受容体が欠損することによる中枢神経系以外でのウイルス増殖もマウスの系統によっては無視できず、実際のところこれらのIFN受容体欠損マウスを用いて臨床症状を議論するのは難しい。したがって、IFN受容体欠損マウスにおける実験では、経

表1 各pH条件下の加温によるPV安定性

	37℃ 4h	0℃ 4h	0℃ 0h
pH1	ND*	ND	ND
pH2	ND	9.0 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁵
pH3	ND	8.0 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁵
Saline pH7	1.0 x 10 ⁵	9.0 x 10 ⁴	1.2 x 10 ⁵
Gastric solution pH1	ND	9.0 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁵
Gastric solution + NaHCO ₃ pH9	1.3 x 10 ⁵	1.0 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵
Heated gastric solution pH1	ND	9.0 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁵
Saline + NaHCO ₃ pH9	1.1 x 10 ⁵	8.0 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁵

1.0 x 10⁵PFUのPVを各条件下で加温した後のウイルス力価を示した。数値の単位はPFU。

*) not detected

口感染の初期段階について議論するのが妥当と考えられる。

IFN 受容体遺伝子欠損 CD155 発現 Tg マウスにおける PV 経口投与後のウイルス力価経時変化

次に、PV を各マウスに経口投与後、どの臓器でウイルスが複製するのかを検討した。PV を経口投与後、24 時間ごとに各臓器を採取し、臓器内のウイルス力価をブランクアッセイ法で測定した。その結果、小腸において、PVRTg21/*Ifnar* KO の方が PVRTg21 よりも投与 2, 3 日後に力価が高かった。その他、咽頭、食道、大腸においても同様の傾向が観られた。血中ウイルスについては、PVRTg21/*Ifnar* KO においてウイルスが投与 2 日後から検出される個体が現れ始め、投与 3 日後には全例で検出されたのに対し、PVRTg21 においては投与 3 日後までに血中からウイルスが検出された個体はなかった。したがって、PVRTg21/*Ifnar* KO において経口投与後、早い段階からウイルス血症になっていることが明らかになった。しかし、実際に血中のウイルスが原因で血管に接している各臓器でウイルスが爆発的に増殖し始めるのは、ウイルス血症になってから約 3 日後であることがわかった。というのは、上記条件でウイルスを経口投与後 2 日目に血中に放出されると考えられるウイルス力価で PV を静脈内注射すると、3 日後から各臓器での爆発的なウイルス増殖が観察されたからである。実際に、経口投与後ウイルス血症になる投与 2 日後から数えて 3 日目にあたる投与 5 日後に、各臓器での爆発的なウイルス増殖が観察された。そして、この爆発的なウイルス増殖が起こる投与 5 日後から中枢神経系内においてもウイルスが顕著に検出されるようになった。以上の結果を総合すると、中枢神経系内に検出されるウイルスの大部分は、血中ウイルスに起因するものと考えられる。しかし依然として、神経経路により中枢神経系内へ侵入する経路がわずかながら

存在し、そちらの方が病原性発現に寄与している可能性も否定はできない。

IFN 受容体遺伝子欠損 CD155 発現 Tg マウスにおいて M 細胞ではない腸管上皮細胞に PV が取り込まれている

実際に腸管上皮に PV が取り込まれているかどうかを確認するために、蛍光標識 PV を小腸に取り込ませる実験を行った。まず、PVRTg25/*Ifnar* KO を麻酔下開腹し、小腸のパイエル板を含む領域を結紮しループを作製し、ループ内へ蛍光標識 PV を注入した。1 時間後、ループ部分を摘出し、洗浄後、観察した。未固定の状態を観察したところ、上皮細胞内と思われるところに、小胞状にウイルスが検出された。そこで、次に、ループ部分の凍結切片を作製し、ウイルスの存在部位を詳細に検討した。その結果、ウイルスは小腸上皮細胞の細胞質内に小胞状に存在していた。ウイルスが検出される細胞は、M 細胞を選択的に認識するレクチン *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA1)¹⁾ では認識されなかった。また、M 細胞中には、観察した限りウイルスは検出されなかった。したがって、この系において、ウイルスは M 細胞ではない小腸上皮細胞に取り込まれていることが明らかになった。上記の PVRTg21/*Ifnar* KO に PV1 型弱毒 Sabin1 株を経口投与しても、腸管での増殖が観られるにも関わらず、粘膜 IgA 産生は観られず、血中抗体価もほとんどの個体で上昇が観られなかった (表 2)。上記マウス腸管における CD155 の局在については、発現量が少ないために検出できず明らかになっていない。マウスで経口投与後抗体価が上昇しにくいのは、マウス腸管における CD155 の局在、および IFN 受容体遺伝子欠損による影響、マウスの腸管免疫機構が特殊である可能性が主な原因として考えられる。CD155 が M 細胞にも発現している CD155 発現 Tg マウスを用いて経口感染を試みたが感染は成立しなかった

表 2 Sabin 1 の経口投与 2 1 日後の血中 PV 中和抗体価

マウス	投与物質	投与方法	PV 中和活性 ≥ 16
PVRTg21/ <i>Ifnar</i> KO	DMEM	経口投与	0 / 6*
	Sabin 1	経口投与	1 / 8
	Sabin 1	静脈内注射	8 / 8
PVRTg21	Sabin 1	経口投与	0 / 11
C57BL/6	Sabin 1	経口投与	0 / 6

PVRTg21/*Ifnar* KO, PVRTg21, C57BL/6 に対し、DMEM または Sabin1 を経口投与 (3×10^8 PFU) あるいは静脈内注射 (1×10^5 PFU) し、2 1 日後の血中 PV 中和抗体価をブランクアッセイ法により測定した。

*) 中和抗体価が ≥ 16 だった個体数/投与した個体数。

という海外からの報告もあるが²¹⁾、現在当該マウスは絶えているため、詳細な解析をすることができず真偽のほどは定かではない。

IFN 受容体遺伝子を欠損させていない CD155 発現 Tg マウスにおいても経口感染が成立する PV 変異株の分離

上記 IFN 受容体遺伝子欠損マウスによる経口感染系では、IFN の影響を排除できない。そこで、IFN 受容体遺伝子を欠損させていない、CD155 発現 Tg マウスにおいても経口感染が成立する系の確立を試みた。PVRTg25 マウスに PV を経口投与後小腸からウイルスを分離することを繰り返すことにより、PVRTg25 において親株の 1 型強毒 Mahoney 株よりも高率に経口投与後に麻痺を発症させることのできる変異株を分離した。現在、その変異株をクローニング中である。この変異株は、通常 PV を感染増殖させるアフリカミドリザル腎臓細胞における継代によって容易に経口感染能力が低下するため、継代には工夫が必要である。今後、この変異ウイルスを用いた CD155 発現 Tg マウスにおける解析によって、経口感染機構がより詳細に解明できると考えている。

2. 血液脳関門透過機構

経口投与後の伝播経路において、上記のとおり血流を介する経路がメインだと考えられる結果が得られているが、血流中のウイルスが中枢神経系内へ侵入するためには、タイトジャンクションを形成している血液脳関門を透過することが必要である。これまでの我々の研究により、マウス個体において、PV は血液脳関門を CD155 非依存的に非常に効率よく、感染性粒子のまま透過することを明らかにしている²⁰⁾。

マウス脳血管内皮細胞を用いた血液脳関門モデルにおいて PV は高い透過性を示した

その詳細なメカニズムを解明するため、CD155 を発現していないマウス脳血管内皮細胞 (MBEC4¹⁸⁾) を用いた血液脳関門透過実験系を構築した。トランスウェルメンブレンフィルター上に上記マウス脳血管内皮細胞を単層培養し、極性を持たせタイトジャンクションを形成させた。まず、きちんとタイトジャンクションが形成され血液脳関門モデルとして機能しているかどうかを確認するため、血液脳関門を非常に効率よく能動的にトランスサイトーシスされることが知られているトランスフェリン (Tf) と、細胞間隙経路のマーカーとして用いられるデキストランの透過性を検討した。上記の系において管腔側から基底膜側への透過速度を検討した結果、数値が大きいほど高い透過性を示す指標となる数値である、Permeability-surface area product (PS) が、蛍光標識デキストランで 0.31 だったの

に比較して、蛍光標識 Tf は 0.80 と、Tf の方が圧倒的に高い透過性を示した。そこで次に、同様に、蛍光標識 PV と、ウイルスに分子量の近い蛍光標識デキストランを比較したところ、PV (PS = 1.09) の方がデキストラン (PS = 0.21) よりも圧倒的に高い透過性を示した。以上の結果から、PV の血液脳関門透過には、細胞間隙経路ではなく、Tf の血液脳関門透過と同様に能動的な機構が関与していることが示唆された。

PV はマウス脳血管内皮細胞にエンドサイトーシスされる

PV がどのように血液脳関門を透過しているのかを明らかにするために、PV が脳血管内皮細胞内にエンドサイトーシスされるかどうかを検討した。単層培養し、極性を持たせて培養したマウス脳血管内皮細胞 (MBEC4, TM-BBB⁴⁾) に蛍光標識 PV を添加し、エンドソーム内にウイルスが取り込まれるかどうかを観察したところ、PV は蛍光標識デキストランと同一の小胞にエンドサイトーシスされ細胞内輸送されていた。また、蛍光標識 Tf と同一小胞に観察された。しかし、ラフトのマーカーとして知られる蛍光標識コレラトキシンサブユニット B とは共局在していなかった。以上の結果から、PV はマウス脳血管内皮細胞内にラフトを介さずエンドソームとして取り込まれることが示唆された (図 1)。したがって、PV は血液脳関門をトランスサイトーシスされる可能性が高いと考えられる。

マウス脳血管内皮細胞への PV の取り込みは Tf と競合する

上記実験において、マウス脳血管内皮細胞への PV のエンドサイトーシスが、デキストランの共存により減少しないのに対し、Tf の共存により減少していた。この現象から、PV は Tf の取り込み経路と共通の機構を介してトランスサイトーシスされている可能性が考えられた。そこで、PV による Tf の取り込み競合阻害実験を行った。単層培養し、極性を持たせて培養したマウス脳血管内皮細胞に、非標識デキストランまたは非標識精製 PV 存在下における、蛍光標識 Tf のエンドサイトーシスを観察した。非標識デキストランを蛍光標識 Tf と競合させた場合には、蛍光標識 Tf の取り込みは、非標識デキストラン非存在下と同様に取り込まれていた。一方、非標識 PV を蛍光標識 Tf と競合させた場合には、蛍光標識 Tf の取り込みが低下していた。以上の結果から、Tf の取り込みは PV によって阻害されることが示唆された。この結果をさらに確認するため、トランスウェル上に培養したマウス脳血管内皮細胞を用い、Tf 透過性に及ぼす PV の影響を検討した。脳血管内皮細胞を非標識 PV で前処理後、蛍光標識 Tf を添加した場合、非標識デキストランで前処理した場合に比べて蛍光標識 Tf の透過性が低下していた。この結果から、脳血管内皮細胞における透過性に関して、PV は Tf と競合していることが示唆された。PV が Tf 受容体に結合能を持っている可能性や、トランスサイ

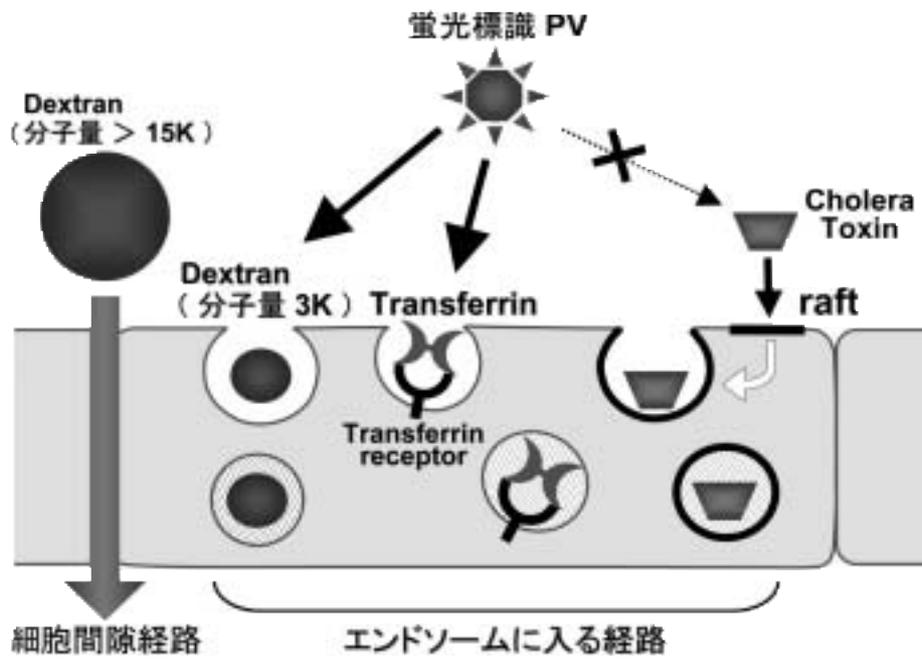


図1 脳血管内皮細胞へのPV 取り込み機構の概念図

脳血管内皮細胞に蛍光標識PV を取り込ませたところ、PV は蛍光標識デキストランあるいはトランスフェリンと同一小胞に存在していた。PV はコレラトキシンサブユニットB とは共局在しなかった。

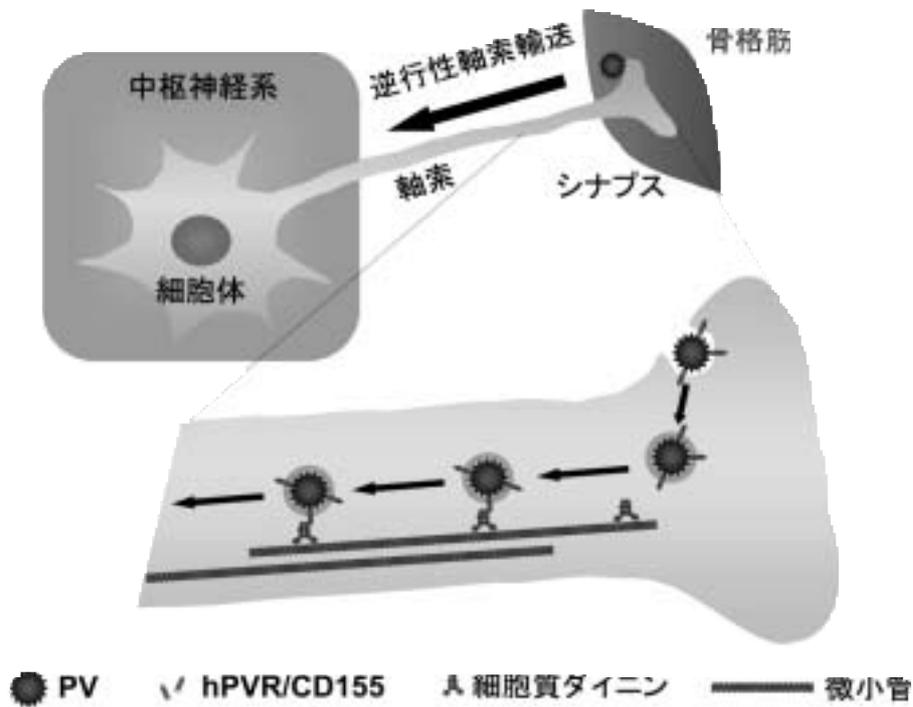


図2 PV の逆行性神経軸索輸送の仮説

PV はシナプス表面に存在している CD155 細胞外領域に結合し、エンドサイトーシスされる。ウイルスを内包しているエンドソームの外側には、CD155 細胞質内領域が存在する。そこへ細胞質ダイニンが結合することにより、ウイルス含有小胞がシナプス側から細胞体側へと微小管に沿って逆行性輸送される。実験医学 Vol.22 No.16, 2259 項を改変。

トーシス経路に関与する要素を Tf と PV が奪い合っている可能性などが考えられる。現在、PV と Tf 受容体との相互作用を検討中である。

3. 神経経路

ヒトにおいて PV が筋肉から中枢神経系内へ神経軸索を介して直接侵入する経路が存在することが知られている。不活化が不完全な PV ワクチンをヒトに筋肉内注射した後、筋注した側の手足に麻痺が発症したという Cutter incident が報告されている¹²⁾。そして、同様な神経経路がサル⁵⁾、および CD155 発現 Tg マウス^{15, 16)} においても存在することが報告されている。また、ウイルス血症になっている状態で筋肉に外傷を負うと、外傷部位からの神経経路によりウイルスが直接中枢神経系内へ侵入し麻痺を発症する、provocation poliomyelitis と呼ばれる現象がヒトにおいて観られることが知られているが、CD155 発現 Tg マウスにおいても同様の現象が再現されている²⁾。このように、ヒトにおいても重要な伝播経路である神経経路について、そのメカニズムを解析した。

PV 逆行性軸索輸送分子機構の仮説

CD155 発現 Tg マウスを用いて以下の事項が明らかになっている。上記マウスの坐骨神経経由の神経経路において、PV の神経軸索逆行性輸送系は CD155 依存的であり、速い逆行性輸送系で輸送されている。この速い逆行性輸送系は

小胞を輸送することが知られており、逆行性モーター蛋白質である細胞質ダイニンも関与している。また CD155 細胞質内領域には、細胞質ダイニンのサブユニットである Tctex-1 が直接結合することが示唆されていた^{11, 13-15)}。以上の結果から、次のような仮説を提唱した(図 2)。「シナプス表面に存在している CD155 細胞外領域に PV が結合し、エンドサイトーシスされる。ウイルスを内包しているエンドソーム外部には、CD155 細胞質内領域が存在する。そこへ細胞質ダイニンが結合することにより、ウイルス含有小胞がシナプス側から細胞体側へと微小管に沿って逆行性輸送される。¹⁴⁾」というものである。

神経様に分化させた PC12 細胞および運動神経細胞における PV 逆行性軸索輸送

そこで、まず、この仮説を検証するために、PVRTg21 に PV を筋肉内注射後、PV がどのようにシナプス内へ取り込まれているかを検討した。PV 筋注 1.5 時間後に神経筋接合部位を電子顕微鏡観察したところ、ウイルス含有小胞が運動神経シナプス部位に確認された(図 3)。したがって、PV は確かに小胞として神経細胞内へ取り込まれていることが示唆された¹³⁾。

次に、実際の細胞における PV の動態を観察した。神経様に分化させた PC12 細胞に GFP 融合 CD155 を発現させ、PV と同時に蛍光標識デキストランを取り込ませた。そうしたところ、CD155 とデキストランが同一小胞で逆行性

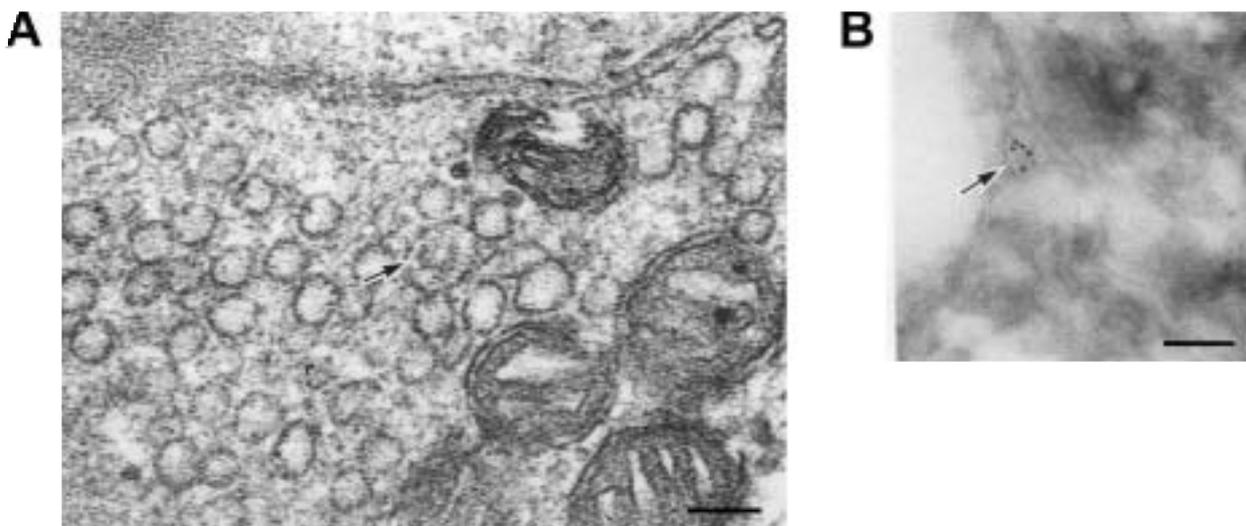


図 3 CD155 発現 Tg マウス神経筋接合部位における PV の電子顕微鏡像

PVRTg21 に PV を筋肉内注射し、1.5 時間後の神経筋接合部位のシナプスを電顕観察した。A: 透過電顕像。矢印の部分にウイルス粒子様のものを内包する小胞が観察される。B: 免疫電顕像。1 次抗体として抗 PV 抗体を用い、金コロイドで検出している。A で観察されたのと同様な小胞に(矢印)ウイルス抗原を示す金コロイドを含む小胞が観られる。スケールバーは 100nm を示す。

に輸送されているところが観察された。デキストランとPVは観察した限り小胞内で常に共局在していることは確認済みである。したがって、神経様に分化したPC12細胞内においてPVはCD155と同一小胞に内包されて逆行性輸送されていることが示唆された¹³⁾。つぎに、実際の運動神経細胞でも同様の現象が観察されるかどうかを確認するため、ラット運動神経初代培養細胞を用いて検討した。ラット運動神経初代培養細胞にGFP融合CD155を発現させ、蛍光標識PVを添加し、加温後、細胞外のウイルスを洗浄し、共焦点顕微鏡下観察を行った。そうしたところ、ラット運動神経初代培養細胞においても、CD155とPVが同一小胞に内包されて逆行性軸索輸送されているところが観察された。その逆行性輸送速度は、マウスにおいて観察されていた速度と同等であった。そこで、細胞質ダイニンの関与を検討するため、Tctex-1との結合に寄与しているアミノ酸配列に変異を導入し、Tctex-1との結合が減弱した、GFP融合変異CD155を発現させ、PV含有小胞の輸送を観察した。逆行性輸送速度カイネティックスを解析したところ、速い逆行性輸送集団が阻害されていたことから、Tctex-1との結合は少なくとも速い逆行性輸送集団に寄与している、すなわち、細胞質ダイニンが少なくとも速い逆行性輸送に寄与していることが示唆された。以上の結果から、上記仮説を運動神経細胞において実証することができた。

おわりに

PVは古いウイルスと言われているにも関わらず、まだまだ未知の領域が多く、またそうした領域はウイルスというものを理解するうえで多くの重要な示唆を含んでいると考えている。個体内でのウイルスダイナミクスを理解するためには、分子レベルから、細胞、個体レベルまでの全てを視野に入れて取り組む必要があり、なかなか手強い。人間の一生を幾重にも積み重ねて築きあげられてきた人類の叡智をもってしても、太刀打ちできない奥深さがそこにはある。これまでの人類の軌跡に畏敬の念を抱き、またこれからの人たちに引き継ぐため、この複雑な生命現象の一端を解明できたら、幸いである。

謝 辞

都立神経研の小池智先生（マウス供与）、岩手医科大学の遠山稿二郎先生（電顕観察）、Cancer Research UKのGiampietro Schiavo先生（運動神経初代培養）、国立感染症研究所の永田典代さん（免疫組織染色、IgA評価）、東京大学医科学研究所の清野宏先生、野地智法さん（M細胞染色）、東京大学分子細胞生物学研究所の鶴尾隆先生、東北大学大学院薬学研究科の寺崎哲也先生（マウス脳血管内皮細胞の供与）、国立健康・栄養研究所の大坂寿雅先生（迷走神経切断術）には、本研究に不可欠な技術や材料の供与および有意義なディスカッションをしていただきましたことを

心より感謝いたします。また、当研究室の大学院生だった坂井麻依さんには標識ウイルス作製と血液脳関門に関する研究を、技術職員の五十嵐博子さんには技術的な援護を、野本明男先生には有益なディスカッションや示唆をいただきましたことにお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Booth TA, and Hirst BH. : Differential expression of lectin-binding sites defines mouse intestinal M-cells. *J Histochem Cytochem* 41: 1679-1687, 1993.
- 2) Gromeier M, and Wimmer E. : Mechanism of injury-provoked poliomyelitis. *J Virol* 72: 5056-5060, 1998.
- 3) Guest S, Pilipenko E, Sharma K, Chumakov K, and Roos RP. : Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *J Virol* 78: 11097-11107, 2004.
- 4) Hosoya K, Tetsuka K, Nagase K, Tomi M, Saeki S, Ohtsuki S, Takanaga H, Yanai N, Obinata M, Kikuchi A, et al.: Conditionally immortalized brain capillary endothelial cell lines established from a transgenic mouse harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *AAPS PharmSci* 2: E27, 2000.
- 5) Howe H, and Bodian D. : *Neuronal Mechanisms in Poliomyelitis*. Commonwealth Fund, New York, NY, Humphrey Milford, Oxford University Press, London, England, 1942.
- 6) Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, and Koike S. : The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol* 79: 4460-4469, 2005.
- 7) Koike S, Horie H, Ise I, Okitsu A, Yoshida M, Iizuka N, Takeuchi K, Takegami T, and Nomoto A. : The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J* 9: 3217-3224, 1990.
- 8) Koike S, Taya C, Aoki J, Matsuda Y, Ise I, Takeda H, Matsuzaki T, Amanuma H, Yonekawa H, and Nomoto A. : Characterization of three different transgenic mouse lines that carry human poliovirus receptor gene--influence of the transgene expression on pathogenesis. *Arch Virol* 139: 351-363, 1994.
- 9) Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, and Nomoto A. : Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 951-955, 1991.
- 10) Mendelsohn CL, Wimmer E, and Racaniello VR. : Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56: 855-865, 1989.
- 11) Mueller S, Cao X, Welker R, and Wimmer E. : Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis. *J Biol Chem* 277: 7897-7904, 2002.
- 12) Nathanson N, and Langmuir AD. : The Cutter incident: poliomyelitis following formaldehyde-inactivated poliovirus vaccination in the United States during the

- spring of 1955. III. Comparison of the clinical character of vaccinated and contact cases occurring after use of high rate lots of Cutter vaccine. *Am J Hyg* 78: 61-81, 1963.
- 13) Ohka S, Matsuda N, Tohyama K, Oda T, Morikawa M, Kuge S, and Nomoto A. : Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. *J Virol* 78: 7186-7198, 2004.
 - 14) Ohka S, and Nomoto A. : Recent insights into poliovirus pathogenesis. *Trends Microbiol* 9: 501-506, 2001.
 - 15) Ohka S, Yang WX, Terada E, Iwasaki K, and Nomoto A. : Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the fast transport system. *Virology* 250: 67-75, 1998.
 - 16) Ren R, and Racaniello VR. : Poliovirus spreads from muscle to the central nervous system by neural pathways. *J Infect Dis* 166: 747-752, 1992.
 - 17) Ren RB, Costantini F, Gorgacz EJ, Lee JJ, and Racaniello VR. : Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 63: 353-362, 1990.
 - 18) Tatsuta T, Naito M, Oh-hara T, Sugawara I, and Tsu-ruo T. : Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *J Biol Chem* 267: 20383-20391, 1992.
 - 19) Yanagiya A, Ohka S, Hashida N, Okamura M, Taya C, Kamoshita N, Iwasaki K, Sasaki Y, Yonekawa H, and Nomoto A. : Tissue-specific replicating capacity of a chimeric poliovirus that carries the internal ribosome entry site of hepatitis C virus in a new mouse model transgenic for the human poliovirus receptor. *J Virol* 77: 10479-10487, 2003.
 - 20) Yang WX, Terasaki T, Shiroki K, Ohka S, Aoki J, Tanabe S, Nomura T, Terada E, Sugiyama Y, and Nomoto A. : Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology* 229: 421-428, 1997.
 - 21) Zhang S, and Racaniello VR. : Expression of the poliovirus receptor in intestinal epithelial cells is not sufficient to permit poliovirus replication in the mouse gut. *J Virol* 71: 4915-4920, 1997.

Dissemination pathways for poliovirus

--- cells to animal models ---

Seii OHKA

Department of Microbiology, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, 113-0033 Tokyo, Japan. seii@m.u-tokyo.ac.jp

It is considered there are two main pathways for poliovirus dissemination towards the central nervous system in humans. One is the pathway through the blood brain barrier. The orally ingested virus invades into the blood circulation, and then the virus permeates into the central nervous system through the blood brain barrier. The other is the neural pathway. In this pathway, the intramuscularly-inoculated virus is transported through the axons from the synapse to the cell body in the central nervous system. We have developed the oral infection system using the mouse models. Moreover, we proposed the possibility that PV is transcytosed through the brain capillary epithelia in a specific manner. As for the neural pathway, we have proved that PV is endocytosed into CD155 containing vesicles and the vesicles are retrogradely transported in the axon of rat primary motor neuron. We have also shown that the cytoplasmic dynein takes part in the transport.