

ポリオウイルスの神経軸索を介した
神経病原性発現機構の解析

大岡 静衣

①

ポリオウイルスの神経軸索を介した
神経病原性発現機構の解析

大岡 静衣

目次

	ページ
第一章 序論	1
第二章 材料と方法	6
1 トランスジェニックマウス	
2 ウイルスおよび細胞培養	
3 抗体およびレクチン	
4 ウイルスの調製	
4-1 組換えポリオウイルスの構築	
4-2 ウイルス cDNA からの RNA 合成	
4-3 RNA トランスフェクション	
4-4 ウイルス液の調製	
4-5 光感受性 Mahoney 株の調製	
4-6 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン標識 Mahoney 株の調製	
5 ウイルス感染および臓器からのウイルス回収	
6 ブランクアッセイ法	
7 坐骨神経切断と結紮	
8 蔗糖密度勾配遠心法による分析	
9 微小管重合阻害剤による坐骨神経の処理	
10 免疫組織染色	
第三章 結果および考察	18
1 ポリオウイルスレセプター (PVR) 発現トランスジェニック (Tg) マウスにおけるポリオウイルス (PV) の逆行性軸索輸送系と病原性発現機構	

I-1 結果

- I-1-1 筋肉内注射（筋注）によるウイルス接種および感染実験系の確立
- I-1-2 坐骨神経軸索切断による筋注感染実験系への影響
- I-1-3 血中抗ウイルス抗体の影響
- I-1-4 筋注感染後の坐骨神経断面の免疫組織染色
- I-1-5 筋注後のウイルス時間分布変化
- I-1-6 ウイルスの軸索内移行速度
 - I-1-6-(1) 坐骨神経切断によるウイルス輸送阻止実験
 - I-1-6-(2) 免疫組織染色法による軸索内抗原確認
- I-1-7 筋注後の筋肉内、血液内、坐骨神経内ウイルスの形態
- I-1-8 抗 PVR 抗体のウイルス軸索輸送に対する影響
 - I-1-8-(1) 坐骨神経内 [^{35}S] メチオニン標識ウイルス
 - I-1-8-(2) 坐骨神経断面の免疫組織染色
 - I-1-8-(3) 病態発現
- I-1-9 微小管重合阻害剤のウイルス軸索輸送への影響
- I-1-10 強毒、弱毒、および組換え PV の筋注感染実験

I-2 考察

II Tg マウスおよび non-Tg マウスにおける逆行性軸索輸送系

II-1 結果

- II-1-1 筋注後の筋肉内、血液内、坐骨神経内ウイルスの形態

- II-1-2 抗 PVR 抗体のウイルス軸索輸送に対する影響
- II-1-3 PV の逆行性移行速度
- II-1-4 小麦胚芽凝集素 (WGA) の逆行性移行速度

II-2 考察

第四章 結論	44
--------	----

第五章 付録	46
--------	----

I 図表

II 文献

III 謝辞

第一章 序論

ポリオウイルス (PV) はピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類される一本のプラス鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスである。エンベロープは持っていない。4種のキャプシド蛋白 VP1, VP2, VP3, VP4 がそれぞれ 60 コピーずつ集まり、直径約 30 nm の正二十面体構造の粒子を形成している。PV には3種類の血清型 (1 型, 2 型, 3 型) があり、それぞれの血清型に対して強毒株と弱毒株が分離されている。粒子表面にはアニオンと呼ばれるくぼみが存在し (Hogle *et al.*, 1985)、この部分が PV レセプター (PVR) (Mendelsohn *et al.*, 1989; Koike *et al.*, 1990) により認識される。PVR は PV の感染初期、すなわちウイルスの細胞表面への吸着、侵入、脱殻といった段階で重要な役割を果たしていると考えられている。感受性細胞に吸着した PV は、沈降係数 160 S の完全な感染性粒子から VP4 を失った (Lonberg-Holm *et al.*, 1975) 135 S 粒子に変化することが知られている (DeSena and Mandel, 1976, 1977; Guttman and Baltimore, 1977; Yafal *et al.*, 1993)。この 135 S 粒子から RNA ゲノムが抜けると、すなわち脱殻が起こると、80 S 粒子が生じる。精製 PVR による *in vitro* の実験からも PVR そのものがウイルスの脱殻の引き金となることが示されている (Arita *et al.*, 1998)。

ヒト PVR (hPVR) はイムノグロブリン (Ig) スーパーファミリーに属し、V-C2-C2 という3つの細胞外 Ig 様ドメインを持ち、膜貫通ドメイン、細胞質内ドメインを持つ。hPVR には少なくとも4つの mRNA アイソフォームがある

ことが知られている。膜結合型の hPVR α と hPVR δ 、そして分泌型の hPVR β と hPVR γ である。これらはヒト細胞において発現が認められている (Koike *et al.*, 1990)。細胞外ドメインでは NH₂ 末端に位置する Ig 様ドメインのみが PV の感染に必要であることが示されている (Koike *et al.*, 1991a; Selinka *et al.*, 1991)。ウイルス結合部位と抗 PVR 感染防御抗体の結合部位もまたこのドメインにあることが示された。PVR の細胞質内ドメインは PV 感染には必要ないことが、マウス細胞に変異 PVR を発現させたものを用いて示されている (Koike *et al.*, 1992, 1991a; Selinka *et al.*, 1991)。

PV は小児麻痺 (急性灰白髄炎) の原因ウイルスである。ヒトにおいて、PV の感染は経口感染で始まり、咽頭や腸管上皮で増殖した後、扁桃腺やパイエル板などの局所リンパ節へと拡がり、ウイルス血症を経た後、中枢神経に達する。血中の抗 PV 抗体が小児麻痺を阻害することから、ウイルス血症はウイルスが中枢神経系へ侵入するために不可欠な段階であることが示されている。中枢に侵入したウイルスは、主に脊髄前角の運動神経細胞を破壊し、四肢に弛緩性の麻痺を生じさせる。PV が中枢神経系へ侵入する経路には2種類が考えられる。一つは血液脳関門 (Blood Brain Barrier, BBB) を経由するもので、もう一つは末梢神経を経由するニューラルパスウェイである。

どのようにして PV が BBB を通過するのかわかっていない。ウイルス血症の段階では多くの臓器がウイルスに曝されているにも関わらず、ほとんどの臓器ではウイルスの増殖が見られない (Bodian, 1955)。PV に感受性がな

いとされるマウスに、PVR を発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを複製したところ、ウイルス感受性を獲得していた (Koike *et al.*, 1991b; Ren *et al.*, 1990)。この Tg マウスにウイルスを感染させたときに見られる現象がどこまでヒトでの現象を反映しているかは定かではないが、このマウスを用いることにより、血中ウイルスの体内分布や中枢神経系へのウイルスの蓄積を観ることができるようになった。Yang ら (Yang *et al.*, 1997) によるこの Tg マウスを用いた実験により、静脈内接種後のウイルスの中枢神経系への侵入量は他の臓器に比べ少ないこと、ウイルスは PVR 非依存的に BBB を効率よく通過することなどが明らかとなった。また、筋肉からのニューラルパスウェイはウイルスが中枢神経系へ侵入するための主要な経路ではないことも示された。

このようにニューラルパスウェイは PV の主要な感染経路ではないにもかかわらず、ヒト、サル、Tg マウスにおいて存在することが報告されている。サルにおいて坐骨神経を經由して PV が中枢神経系へ侵入することが示されている (Howe and Bodian, 1942)。また、カッターワクチンの事例では、不完全な不活化ワクチンを筋肉内注射されたヒトに、注射された四肢に高い確率で初期の麻痺 (イニシャルパラリシス) が起きたと報告されている (Nathanson and Langmuir, 1963)。さらに、Tg マウスにおいて筋肉から中枢に至るニューラルパスウェイが存在し、この経路でのウイルス伝播に PVR が重要な働きをしていることが示されていた (Ren and Racaniello, 1992)。これに加え、PV に感染している時に外傷を受けると麻痺が生じるという、ヒトで観られていた現象が Tg マウスでも観られることが報告された (Gromeier and Wimmer, 1998)。このことは骨

格筋の傷害により PV の逆行性軸索輸送が促進され、その結果ウイルスが中枢神経系へ侵入し、脊髄を侵したことを示唆している。これらの知見から、ニューラルパスウェイは PV を輸送する系として関心をひいた。

ヒト TCTEL1 のマウスホモログである Tctex-1 は、細胞質ダイニンの軽鎖であることが示された (King *et al.*, 1996)。ダイニンは微小管のマイナス方向に向かうモーター蛋白質である (Holzbaur and Vallee, 1994; Vallee and Sheetz, 1996; Hirokawa *et al.*, 1998; Hirokawa, 1998)。細胞質ダイニンは後期エンドソームやリソソーム、ゴルジ体、シナプス小胞、小胞体などと相互作用し、これらの輸送を行ったり、これらのオルガネラ間の小胞輸送を司っている (Holzbaur and Vallee, 1994; Vallee and Sheetz, 1996; Hirokawa *et al.*, 1998; Hirokawa, 1998; Aniento *et al.*, 1993)。tctex-1 (t-complex testis-expressed) は、生殖不全マウスから見つかった、子孫への伝達率が正常より高い、マウス t-complexes の候補遺伝子として同定されたものである (Lader *et al.*, 1989)。近年、ウシ脳から分離された細胞質ダイニンの軽鎖がこの Tctex-1 であることが判明した (King *et al.*, 1996)。

小児麻痺を制圧するため、1型、2型、3型の全ての弱毒株を含む PV 経口生ワクチンが使われており、高い効果が認められている (Sabin and Boulger, 1973)。サルにおいて観られる強毒株と弱毒株の表現形は、Tg マウスでも同様に観察される。Tg マウスにおける脳内接種、及び脊髄内接種の神経毒性試験の結果において (Abe *et al.*, 1995a, 1995b; Horie *et al.*, 1994)、また静脈内接種の結果においても両株間の神経毒性に差が観られた (Koike *et al.*, 1994a; Yang *et al.*, 1997)。同様に、Tg マウスに対する筋肉内接種においてもサルで観られる神経

毒性の差を観ることができる可能性が考えられる。

私は、PV 感受性の Tg マウスとその遺伝的背景が同一の non-Tg マウスを用いて、下腿背側に筋肉内注射（筋注）された PV が坐骨神経の軸索内部を完全な感染性粒子として微小管に沿った速い逆行性軸索輸送系により運ばれ、ウイルスの取り込みまたは輸送に PVR が不可欠であること、逆行性軸索輸送系にはいくつかの性格の異なるものが存在することを明らかにした。PVR 細胞質内ドメインにはダイニンのサブユニットの一つと考えられる TCTEL1 が相互作用することが共同研究者により示されたことから、PVR 依存的な輸送系のメカニズムに対する仮説を立てることができた。また、弱毒株のキャプシド蛋白質がどのようにこの輸送系に影響するののかも調べた。

第二章 材料と方法

1 トランスジェニックマウス

IQI マウスとのヘミザイゴートの ICR-PVRTg21 (Tg21) (Koike *et al.*, 1991b, 1994b) を Tg マウスとして用いた。IQI マウスを non-Tg マウスとして用いた。SPF レベルで、6-10 週齢のものを用いた。

2 ウイルスおよび培養細胞

感染性 cDNA クローンである pOMI (Shiroki *et al.*, 1995) と pVS(1)IC-0(T) (Kohara *et al.*, 1988) より合成される RNA を細胞にトランスフェクションすることにより PV 1 型強毒 Mahoney 株と弱毒 Sabin 1 株をそれぞれ得た。pOMI と pVS(1)IC-0(T) のうちキャプシド (P1) をコードしている部分に相互に入れ換えた組換え cDNA クローンを得た。pOMI に pVS(1)IC-0(T) のキャプシド領域を導入したものを pMSM、逆の構造のものを pSMS とした。これらのクローンから得られる RNA を細胞にトランスフェクションして得られたウイルスをそれぞれ MSM 株、SMS 株とした (Yang *et al.*, 1997)。

RNA トランスフェクション、ウイルスの力価測定、ウイルス液の調製に使用した African green monkey kidney (AGMK) 単層培養細胞は、5% ウシ新生児血清 (MITSUBISHI KASEI)、0.11% NaHCO₃、0.1 mg/ml カナマイシン (硫酸カナマイシン明治) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO

BRL) 培地を用い、37°C 5% CO₂ の条件下で炭酸ガス培養器内で培養した。 [³⁵S]メチオニン標識ウイルスの調製に用いた HeLa S3 浮遊細胞は、5% ウシ新生児血清 (MITSUBISHI KASEI)、0.22% NaHCO₃、0.1 mg/ml カナマイシン (硫酸カナマイシン明治) を含む RPMI 1640 (GIBCO BRL) 培地を用い、スピナーフラスコで 37°C 培養器内で培養した。

3 抗体およびレクチン

PVR の PV 軸索輸送への関与を観る際には、マウス抗ヒト PVR モノクローナル抗体 p286 (Yang *et al.*, 1997) をウイルス溶液と混合し、最終的に 5 µl の混合液をマウスに筋肉内注射 (筋注) した。 [³⁵S]メチオニン標識ウイルスを投与する場合、モノクローナル抗体を 42.2 µg ウイルスに混合し、最終的に 20 µl の混合液を筋注した。坐骨神経内のウイルス抗原に対する p286 の影響を免疫組織染色法により確認する場合、Mahoney 株 2.7 × 10⁷ PFU, p286 22.6 µg / 20 µl を筋注した。筋注部位から血中に漏れ出たウイルスを中和するために、100 µl のウサギ抗 PV 1 型高度免疫血清を静注してからすぐにウイルスを筋注した。静注した抗 PV 血清は 1 × 10⁶ PFU の Mahoney 株を中和することができる。小麦胚芽凝集素 (Wheat germ agglutinin, WGA, Vector Laboratories Inc.) の筋注の際には、10 µg / 20 µl を投与した。マウス抗ヒト PVR モノクローナル抗体 p286 を WGA に混合する場合には、p286 42.2 µg, WGA 10 µg / 20 µl 混合液を筋注した。

4 ウイルスの調製

4-1 組換えポリオウイルスの構築

pOM1 と pVS(1)IC-0(T) の BanII フラグメント (nt 905 - 3519) を BanII 制限酵素部位 (nt 471, 485) で自己環状化した pBR322 に導入し、それぞれ pBR(M)、pBR(S) と名付けた。pBR(M)、pBR(S) の NdeI (pBR322: nt 2297 - PV: nt 3381) フラグメントを相互に組換え、ウイルスの配列内にある NdeI 制限酵素部位の前後で Sabin1 の配列から Mahoney の配列に変わるものを pBR SM、Mahoney の配列から Sabin1 の配列に変わるものを pBR MS とした。BanII 制限酵素部位 (PV: nt 905, 3519) で自己環状化した pOM1 と pVS(1)IC-0(T) をそれぞれ pM-BanII、pS-BanII とし、これらの BanII 制限酵素部位に pBR SM、pBR MS の BanII フラグメント (PV: nt 905 - 3519) をそれぞれ導入し、pMSM、pSMS を得た。

4-2 ウイルス cDNA からの RNA 合成

プラスミドを PvuI (nt 12164) で切断後、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出、クロロホルム・イソアミルアルコール抽出したものをエタノール沈殿し、RNA 合成の鋳型とした。RNA 合成は、T7 ϕ 10 promoter を用いて、MEGA scriptTM *in vitro* Transcription Kits for Large Scale Synthesis of RNA :

T7 Kits (Ambion) で行った。方法はキットのプロトコールに従い、RNA 合成を行った。または、80 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 12 mM $MgCl_2$, 2 mM Spermidine, 40 mM dithiothreitol, 30 mM NTPs, 0.5 unit / μ l pyrophosphatase, 3.3 unit / μ l RNase inhibitor, 0.5 μ g / μ l 鑄型 DNA, 10 unit / μ l T7 RNA polymerase 反応液中で 37 °C 2 時間 RNA を合成した。反応終了後、鑄型 DNA を DNase I で消化し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出、クロロホルム・イソアミルアルコール抽出した後、RNA をエタノール沈殿した。エタノール沈殿は、酢酸アンモニウムを加えイソプロピルアルコールで行った。得られた沈殿は RNase-free H_2O に溶解した。

4-3 RNA トランスフェクション

6 cm プラスティックディッシュあたり $8 \sim 8.5 \times 10^5$ 個になった AGMK 単層培養細胞を使用した。DEAE dextran 法 (van der Werf *et al.* 1986) で上記合成 RNA を 1 ~ 3 μ g / dish でトランスフェクションした。細胞を PBS (-) (NaCl 8.00 g, Na_2HPO_4 1.15 g, KCl 0.20 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.10 g, KH_2PO_4 0.20 g / l) で洗い、RNA が含まれた 200 μ l の DEAE dextran 溶液を加え、37°C 5% CO_2 炭酸ガス培養器で 30 分間加温する。この間 5 分ごとに溶液を細胞全体に行き渡らせる。トランスフェクションの溶液を取り除いてから無血清 DMEM で細胞を 2 回洗い、5 ml の DMEM (5% ウシ新生児血清、0.11% $NaHCO_3$ 、0.1 mg/ml

カナマイシンを含む)を加え、37℃ 5%CO₂ 炭酸ガス培養器で2日～3日加温する。-80℃と室温で凍結融解を3回繰り返して、4℃ 3000 rpm で10分間遠心した上清がウイルス液である。

4-4 ウイルス液の調製

6 cm プラスティックディッシュあたり $8 \sim 8.5 \times 10^5$ 個の AGMK 単層培養細胞を用意し、無血清 DMEM (0.11% NaHCO₃、0.1 mg/ml カナマイシンを含む) で洗った後、multiplicity of infection (m.o.i.) が 10^3 となるように、無血清 DMEM で希釈したウイルス液を1 ml 加え、全体に行き渡らせる。37℃ 5% CO₂ 炭酸ガス培養器で30分間加温した後、ウイルス液を除く。DMEM 培地 (5%ウシ新生児血清、0.11% NaHCO₃、0.1 mg/ml カナマイシンを含む) を5 ml 加え、37℃ 5% CO₂ 炭酸ガス培養器に入れ、2日間加温する。-80℃と室温で凍結融解を3回繰り返して、4℃ 3000 rpm で10分間遠心し、上清をとる。

ウイルスを増やす場合には、プラスチックボトル (175 cm²) あたり 1×10^7 個の AGMK 単層培養細胞を用意し、無血清 DMEM で洗った後、無血清 DMEM で m.o.i. 10^3 となるように希釈した上記ウイルス液 10 ml を加え、全体に行き渡らせる。室温で20分間静置後、37℃ 5% CO₂ 炭酸ガス培養器で20分間加温し、20 ml の DMEM 培地 (5%ウシ新生児血清、0.11% NaHCO₃、0.1 mg/ml カナマイシンを含む) を加え、37℃ 5% CO₂ 炭酸ガス培養器に入れ、2日間加温する。-80℃と室温で凍結融解を3回繰り返して、4℃ 3000 rpm で

10 分間遠心した上清をとり、ウイルス液とした。

4-5 光感受性 Mahoney 株の調製

光感受性 Mahoney 株は過去の文献に従って調製した (Madhus *et al.*, 1984; Koike *et al.*, 1990)。HeLa S3 単層培養細胞に m.o.i. 0.01 (AGMK 単層培養細胞によるプラークアッセイの値で換算) のウイルスを含有する無血清 DMEM 培地 (0.11% NaHCO₃、0.1 mg/ml カナマイシンを含む) 10 ml を加え、室温 30 分置く。静かに 15 µg/ml のニュートラルレッド (特級、和光純薬) を含む DMEM 培地 (8% ウシ新生児血清、0.11% NaHCO₃、0.1 mg/ml カナマイシンを含む) を 20 ml 加える。37 °C において遮光して 2 日加温し、遮光しつつウイルスを回収する。得られたウイルスをもう一度 HeLa S3 単層培養細胞に m.o.i. 1 となるように遮光しつつ感染させ、37 °C において 1 日加温し、ウイルスを回収する。こうして得られたウイルスは、白熱球下 30 cm の所で 30 分間光を照射することにより 10⁸ PFU から 1 PFU まで力価が減少した。

4-6 [³⁵S] メチオニン標識 Mahoney 株の調製

Yang *et al.*, 1997 で述べられている方法で行った。 [³⁵S] メチオニン標識 Mahoney 株は、無メチオニン培地に [³⁵S] メチオニンを加えた培地中の HeLa S3 浮遊細胞でウイルスを複製させることにより得られた。感染細胞の細胞質抽

出液を DEAE-Sepharose CL-6B (Li *et al.*, 1992) カラムにより精製し、CsCl 平衡密度勾配遠心を二回行った (Yang *et al.*, 1997)。精製標識 Mahoney 株の放射活性は 7.3×10^8 $\mu\text{Ci} / \text{PFU}$ であった。 [^{35}S] メチオニン標識ウイルスは分解しやすいので、調製後2週間以内のものを実験に用いた。

5 ウイルス感染および臓器からのウイルス回収

マウスに 300 - 400 μl の麻酔薬 (10 mg / ml ketamine (動物用ケタラール 50、三共 (株)、5 倍希釈して用いる) と 0.2 mg / ml xylazine (スキルペン 2% 注射液、三共 (株)、100 倍希釈して用いる) を含む生理食塩水 (大塚生食注、大塚製薬工場)) を腹腔内投与し、麻酔をかけた。10 μl ハミルトンマイクロシリンジを用いて、5 μl のウイルス溶液をマウスの左側下腿背側に筋注射した。臓器からのウイルス回収の際には、クロロホルムで麻酔をかけ、左側下腿背側の筋肉、左側の坐骨神経、脊髓を採取し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結した。筋肉、坐骨神経は、Phosphate-Buffered Saline (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na_2HPO_4 , 0.2 g KH_2PO_4) (PBS(-)) で3回洗った。融かした臓器に無血清 DMEM をそれぞれ 150、100、200 μl 加え Pellet Pestle Motor (Kontes Scientific) を用いてホモジナイズした。15K rpm で 10 分間遠心後、上清中に含まれるウイルス力価を AGMK 細胞でのブランクアッセイ法により測定した。ウイルスを静注する際には、100 μl のウイルス溶液を無麻酔で尾静脈内に注射した。 [^{35}S] メチオニン標識ウイルスを筋注射する場合、5 μl ずつのウイルス溶液をマウスの左側下腿背側に4カ所注射した。

筋注した標識ウイルスは全部で 5×10^6 PFU (0.37 μ Ci) / 20 μ l である。坐骨神経内のウイルス抗原を免疫組織染色法により確認する場合、Mahoney 株 2.7×10^7 PFU / 20 μ l を同様に筋注した。

6 プラークアッセイ法

無血清 DMEM 培地でウイルス液の 10 倍希釈系列をつくる。感染時に $10 \sim 10^3$ PFU / ml となる 3 段階の希釈ウイルス液を用いる。6cm プラスティックディッシュあたり $8 \sim 8.5 \times 10^5$ 個の AGMK 単層培養細胞を用意し、無血清 DMEM 培地で洗った後、ウイルス液をそれぞれ 1ml 加え、全体に行き渡らせる。室温で 10 分間静置後、37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 炭酸ガス培養器で 30 分間加温する。ウイルス液を除き、5 ml の寒天入り DMEM 培地 (5% ウシ新生児血清、0.11% NaHCO₃、1% Agar Noble (DIFCO Laboratories) を含む) を加え、しばらく室温に静置し、寒天が固まり次第、37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 炭酸ガス培養器に入れ、2 日間加温する。10% HCHO (一級、37% ホルムアルデヒド液を 4 倍希釈したもの、和光純薬) を 3 ~ 5 ml 加え、室温で一晩放置する。寒天を剥離し軽く水洗後、1% crystal violet (特級、和光純薬、80% EtOH 溶液) を適量加えて細胞を染色し、軽く水洗後、プラークを計数する。

7 坐骨神経切断と結紮

坐骨神経の切断は Tyler *et al.*, 1986 で述べられているような方法で行った。マウスを麻酔した後、左の大腿骨に平行に表皮を切り、大腿骨に沿って存在する坐骨神経が見えるように筋肉層を切り開く。坐骨神経を周りの組織から傷つけないように分離し、大腿骨と骨盤が交差する付近で 5 mm 程度の神経を切り出し、切断した (Fig. 2B)。傷口は表皮をアロンアルファで接着して閉じた。この手術後、マウスは不全麻痺を起こすが、PV によって起こる麻痺とは区別できる。ウイルス筋注部位は、坐骨神経切断部位から約 2 cm の所にある。

[³⁵S] メチオニン標識ウイルスを筋注し、坐骨神経内の物質について解析するときには、まずマウスの左側坐骨神経の大腿骨と骨盤が交差する付近を絹製縫合糸 (硬性、No.1、夏目製作所) できつく縛った (Hirokawa *et al.*, 1990, 1991)。表皮をアロンアルファで接着した後、下腿背側に [³⁵S] メチオニン標識ウイルスを筋注した。

8 蔗糖密度勾配遠心法による分析

坐骨神経を結紮したマウスに [³⁵S] メチオニン標識ウイルスを筋注後 1.5 時間後に坐骨神経 (結紮部位より末梢側)、左側下腿筋肉、血液を採取した。坐骨神経と筋肉は PBS(-) で 3 回洗う。1% Nonidet P40 と 0.1% BSA Fraction V を含む PBS (-) で 4℃ ホモジネートし、最終的に 1 ml にする。3,000 rpm で 10

分間遠心して上清をとり、上記バッファーで作った 15-30% の蔗糖勾配の上に上清をのせる。ベックマンローター SW 41 で、39,000 rpm 4℃ 2時間遠心する。遠心後、上方から 500 μ l ずつ分画し、それぞれ 5 ml のカクテル剤 (Hionic-fluor, Packard) とともにボニーバイアル (6 ml, Packard) 中で攪拌し、液体シンチレーションカウンターで C^{14} モードで放射活性を測定する。血液、ホモジナイズ後の遠心で生じる沈殿、または左側坐骨神経 (結紮部位より脊髄側)、右側坐骨神経、右側の下腿筋肉、脊髄内に存在する標識物質の放射活性をそのまま測定する場合には、ガラスバイアルに入れた組織または血液 50 μ l を 0.1 M NaOH 500 μ l ~ 1 ml とともに 50℃ 温浴中で一晩加温し、組織が溶けたのを確認後、室温に戻し、0.1 M HCl 500 μ l ~ 1 ml で中和する。血液の場合は、ここで H_2O_2 を適当量 (50 μ l 程度) 加え、黄色になるまで脱色する。15 ~ 18 ml のカクテル剤を加え攪拌し放射活性を測定する。

9 微小管重合阻害剤による坐骨神経の処理

マウスを 300 - 400 μ l の麻酔薬 (10 mg / ml ketamine と 0.2 mg / ml xylazine を含む生理食塩水) で麻酔をかけ、左側の坐骨神経を露出させる。坐骨神経から他の組織をはがし、0.15 mM vinblastine (vinblastine sulfate salt, Sigma, 用時溶解して調製、遮光) を含む PBS (-) または含まない PBS (-) で浸した滅菌済み脱脂綿で坐骨神経をくるむ (Fig. 6)。脱脂綿とマウス組織との間には、やわらかく引き延ばしたパラフィルムを敷き、神経以外への薬物の浸透を少なくす

る。バッファの蒸発を防ぎつつ 15 分間放置し (Kashiba *et al.*, 1992; Zhuo *et al.*, 1995)、その後脱脂綿、パラフィルムを取り除き、PBS (-) で坐骨神経と周辺組織を 3 回洗浄し、表皮をアロンアルファで塞ぐ。翌日、再度上記の麻酔薬で麻酔をかけ、左または右側に 1×10^6 PFU / 5 μ l の Mahoney 株を筋注した。脊髄内ウイルス量を測定する場合には、ウイルス筋注後 16 時間で脊髄を採取し、その中に含まれるウイルス力価をブランクアッセイ法により測定した。

10 免疫組織染色

マウスをクロロホルムで麻酔後、PBS(-) で灌流する。筋注部位から約 2 cm の部分にあたる坐骨神経を取り出し、プラスチックボートの中で O.C.T. compound (Miles Inc., IN) に浸す。ドライアイスで冷却したアセトン (特級、和光純薬) 中にヘキサン (特級、和光純薬) の入ったビーカーを浮かべ、冷えたヘキサン中にボートを浸し、凍結し包埋する。クリオスタット (Jung CM 3000, Leica Instruments GmbH) で 8 ~ 10 mm 厚の切片を作製し、APS コート済みスライドガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd., Japan) に載せ、扇風機でよく乾燥させる。3 : 2 の割合で混合したアセトンとメタノールの混合液で固定を室温で 5 分程度行い、よく乾燥させる。3% BSA Fraction V (Sigma A-2058)、0.02% アジ化ナトリウムを含む PBS(-) で 37 $^{\circ}$ C 30 分間ブロッキングを行った。ウイルスの染色には、一次抗体としてウサギ抗 PV 1 型高度免疫血清を 1 : 1 0 0 で 37 $^{\circ}$ C 2 時間反応させた。二次抗体としてヤギ FITC 標識抗ウサギ IgG (Medical &

Biological Laboratories, Co., LTD.) を 1 : 3 0 0 で 37℃ 2 時間反応させた。小麦胚芽凝集素 (WGA) の染色には、一次抗体としてウサギ anti-Triticum Vulgaris Lectin (WGA) 抗血清 (Sigma Chemical Co.) を 1 : 1 0 で用いた。抗体希釈液として 0.1% BSA Fraction V、0.02% アジ化ナトリウムを含む PBS(-) を用いた。染色した切片は、80% (v / v) グリセリンでマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (BioRad) で観察した。

第三章 結果および考察

I ポリオウイルスレセプター (PVR) 発現トランスジェニック (Tg) マウスにおけるポリオウイルス (PV) の逆行性軸索輸送系と病原性発現機構

I-1 結果

I-1-1 筋肉内注射 (筋注) によるウイルス接種および感染実験系の確立

ヒトにおいて、PV を筋注した後に、投与した手足に麻痺 (イニシャルパラリシス) が生じる事例が報告されている (Nathanson and Langmuir, 1963)。この現象は、ウイルスが骨格筋から神経を經由し、中枢神経系の運動神経細胞に運ばれる経路が存在することを示している。この現象が PV 感受性 Tg マウスにおいても見られるかどうかを調べるために、Tg21 マウスの左下腿背側に 1×10^6 または 1×10^5 PFU/5 μ l の PV 1型 Mahoney 株を筋注し、麻痺と生死を観察した (Fig. 1)。 1×10^5 PFU/5 μ l 筋注した場合には、徐々に麻痺を起し死亡しているのに対し (Fig. 1B)、 1×10^6 PFU/5 μ l 筋注した場合には投与後2日目に全例に左下肢に麻痺が生じ、投与後3日目までに全例が死亡した (Fig. 1A)。投与後2日目に見られた麻痺は、ウイルスを左側に筋注すれば左側に、

右側に筋注すれば右側に、というように、投与側の下肢に麻痺が見られた (data not shown)。したがって、この時期に見られる麻痺はヒトで観察されたのと同様のイニシャルパラリシスであると考えることができる。以降の実験では、 1×10^6 PFU / 5 μ l の Mahoney 株を筋注する系を用い、投与後 48 時間後のイニシャルパラリシスを指標に、ウイルスの神経経由の逆行性輸送系について調べることにした。

1-1-2 坐骨神経軸索切断による筋注感染実験系への影響

PV を筋注後、ウイルスがニューラルパスウェイによって中枢神経系へ侵入するならば、投与部位を支配している神経を経由していると考えられる。ウイルスの筋注部位である下腿背側は、主に坐骨神経により支配されている (Fig. 2B)。坐骨神経には運動神経が多く含まれている。また、太い神経束を形成するため、手術が行いやすいという利点がある。この坐骨神経を切断することにより、イニシャルパラリシスの発症がどう影響されるかを観察した (Fig. 2A)。坐骨神経を切断せず、 1×10^6 PFU / 5 μ l の Mahoney 株を Tg21 マウスに筋注した場合には、投与後 2 日後に全例に麻痺が生じた。これに対し、坐骨神経を切断後ウイルスを筋注した場合には、2 日目の麻痺は全く見られなかった。したがって、2 日目に見られるイニシャルパラリシスは、坐骨神経を経由したウイルス伝播によることが明らかとなった。ウイルス筋注部位から血中に漏れ

出たウイルスによる影響を見るため、等価のウイルス 1×10^6 PFU/100 μ l を尾静注し、経過を観察した。この場合も2日目のイニシャルパラリシスは観察されなかった。したがって、イニシャルパラリシスは血中に漏れ出たウイルスによるものではなく、イニシャルパラリシスを観ている限りは漏出ウイルスの影響を考慮しなくても良いことが示唆された。

1-1-3 血中抗ウイルス抗体の影響

シナプスや筋肉に取り込まれたウイルスは、血中の抗 PV 抗体による影響を受けるかどうかを確かめた。ウサギ高度免疫抗 PV 血清を Tg21 マウスに尾静注し、直後に 1×10^6 PFU の Mahoney 株を筋注あるいは静注し、経過を観察した (Table 1)。ウイルスを静注した場合には投与後2週間まで全例で麻痺の発症が阻害された。これに対し、ウイルスを筋注した場合には10匹中2匹しか麻痺の発症を阻害することができなかった。このように、血中抗 PV 抗体は、筋注されたウイルスに対する中和効果は非常に低いことが示された。したがって、筋肉から中枢神経系へのニューラルパスウェイは体液性免疫の影響をほとんど受けないと思われる。

1-1-4 筋注感染後の坐骨神経断面の免疫組織染色

筋注された PV が神経軸索内部を伝播しているのかどうかを確かめるために、免疫組織染色法により坐骨神経断面における抗原の分布を調べた。Tg21 マウスに Mahoney 株を筋注後 3 時間後に、Fig. 2B でハサミで示した部分の坐骨神経を取り出し、横断面の凍結切片を作製し、ウサギ高度免疫抗 PV 血清で染色し、FITC で検出した (Fig. 3)。ウイルスを投与していないものでは抗原は観られないが、ウイルスを投与した方では、ミエリン鞘に取り囲まれた運動神経軸索内部に抗原が認められ、確かにウイルスが運動神経軸索内部を輸送されていることが示唆された。抗原はミエリン鞘に取り囲まれていない感覚神経や血管の中には認められなかった。

1-1-5 筋注後のウイルス時間分布変化

筋注されたウイルスがどのように伝播していくのかを調べるため、筋肉内と脊髄内のウイルス力価の時間変化を調べた。 1×10^6 PFU / 5 μ l の Mahoney 株を Tg21 マウスに筋注し、各時間後に臓器から回収されるウイルス力価をブランクアッセイ法により測定した (Table 2)。筋肉内においては、ウイルスは 48 時間後まで $> 2 \times 10^5$ PFU に維持されていた。コントロールとして non-Tg マウスに同様の実験を行った場合、24 時間後と 48 時間後に筋肉内から回収されるウイルスはそれぞれ $< 1 \times 10^3$ PFU と $< 1 \times 10^2$ PFU であった (data not shown)。したがって、Tg マウスにおいてはわずかながら筋肉内でウイ

ルスが複製していることが示唆された。脊髄内においては、投与後 16 時間からウイルスが検出され始め、Tg マウスがイニシャルパラリシスを起こす 48 時間後には $4 \sim 5 \times 10^7$ PFU のウイルスが検出された。このように、脊髄内で見られるウイルスの増殖は病態発現と結びついていた。光感受性 Mahoney 株を用いて同様の実験を行ったところ、脊髄内でウイルスは投与後 16 時間から検出され始めた (data not shown)。このことは、脊髄内で 16 時間後に見られるウイルスは投与したウイルスそのものではなく、複製を経たウイルスであることが示唆された。したがって、投与したウイルスそのものは、投与後 16 時間よりも前の段階で脊髄内に到達していると考えられる。

I-1-6 PV の軸索内移行速度

I-1-6-(1) 坐骨神経切断によるウイルス輸送阻止実験

筋注された PV の軸索内移行速度を調べるために、 1×10^6 PFU / 5 μ l の Mahoney 株を Tg21 マウスに筋注し、2、4、6、10 時間後に坐骨神経を切断し、ウイルス投与後 48 時間後に見られるイニシャルパラリシスを観察した (Table 3)。ウイルス投与後 2 時間後に神経を切断したものではイニシャルパラリシスは全例で阻止された。しかし、4 時間後、6 時間後に神経を切断したものでは、それぞれ 6 匹中 4 匹、6 匹中 2 匹にしかイニシャルパラリシスの阻害効果が見られなかった。10 時間後に神経を切断したものでは、全く阻害効

果が見られなかった。これらの結果から、少なくとも筋注されたウイルスのうちかなりの量のウイルスは投与後4時間後以内に切断地点に到達していると考えられる。投与地点から切断地点までの距離は約 2 cm であることから、筋注されたウイルスは 12 cm / day よりも速い速度で移行していることが示唆された。

坐骨神経切断によるウイルス輸送阻害実験の結果から、ウイルス投与後6時間後に神経を切断した場合にもイニシャルパラリシスの阻害効果が見られたことに関しては、少し遅い輸送系もウイルス輸送に関与しているか、または、ウイルスの輸送能力が投与ウイルス量に比べて小さいことに起因する可能性もある。いずれにしろ、遅い逆行性軸索輸送系として定義されているのは <0.6 cm / day であるので (Brady 1991)、ウイルスの輸送は速い軸索輸送系に属すると考えられる。

1-1-6-(2) 免疫組織染色法による軸索内抗原確認

さらに正確にウイルスの軸索内移行速度を調べるために、免疫組織染色法を用いて、坐骨神経の切断地点にいつ抗原が見え始めるかを調べた (Table 5)。Mahoney 株を Tg21 マウスに筋注し、各時間後の坐骨神経の切断地点の凍結切片を作製し、ウサギ高度免疫抗 PV 血清で染色し、FITC で検出した。各時間につき3匹ずつ行った。+は抗原がよく見えたことを、±は少なかったことを、-は見えなかったことを表す。1.5 時間後では3匹中1匹に坐骨神経に抗原が認められ、投与後3時間後には全例の坐骨神経に抗原が認められた。この結果

から、筋注されたウイルスは 16 cm/day よりも速い速度で軸索内を移行していることが示唆された。この速度は速い逆行性軸索輸送系に分類される (Brady 1991)。

1-1-7 筋注後の筋肉内、血液内、坐骨神経内ウイルスの形態

筋注後のウイルスが各組織内でどのような形態で存在しているのかを調べた。坐骨神経を結紮した Tg21 マウスに、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識した Mahoney 株を筋注し、1.5 時間後の筋肉、坐骨神経、血液を採取し、それらの中に存在する標識物質をしょ糖密度勾配遠心法により分画した。坐骨神経内部ではほとんどが完全な感染性粒子である沈降係数 160S として存在していた (Fig. 4A)。この結果より、ウイルスは軸索内部を完全な感染性粒子として輸送されることが示唆された。実際に、軸索内部に存在しているウイルスが感染性を維持していることは、AGMK 細胞に対して感染性を維持していることから示された (data not shown)。筋肉内においては、相当量のウイルスが主に 160S として存在していた。血液においては、放射活性は主に 160S として検出されたが、その量はごくわずか (~ 500 cpm / 50 μl) であった。ヘパリン血をアルカリ・脱色処理後、放射活性を測定したところ、標識物質が大量に検出され (1.2×10^4 cpm / 50 μl)、この処理をしないと本来の放射活性を測定できないことが判明した。したがって、筋肉、坐骨神経内に存在する血液の放射活性の影響は、し

よ糖密度勾配遠心法による分画時には、考えなくてよい。標識ウイルス投与後6時間後について同様の実験を行ったところ、坐骨神経内、筋肉内で、ともに、多少 135S や 80S が増加しているものの、ほとんどの標識物質が 160S として存在していた (data not shown) ことから、これらの組織内でウイルスは安定に完全な感染性粒子として存在することが示唆された。

1-1-8 抗 PVR 抗体のウイルス軸索輸送に対する影響

1-1-8-(1) 坐骨神経内 [³⁵S] メチオニン標識ウイルス

[³⁵S] メチオニンで標識した Mahoney 株と抗 PVR 抗体 p286 42.2 μg との混合液を Tg21 マウスに筋注し同様の実験を行ったところ、坐骨神経内に見られる 160S の量が激減した (Fig. 4B)。したがって、PVR はシナプスへのウイルスの取り込み、またはウイルスの軸索輸送に必要であることが示唆された。p286 は、筋肉内および血液内のウイルスには何ら影響を及ぼさなかった (data not shown)。

1-1-8-(2) 坐骨神経断面の免疫組織染色

坐骨神経の免疫染色によっても p286 の効果を確かめた (Table 5)。p286 とウイルスの混合液を Tg21 マウスに筋注した場合、投与後3時間には全例でウイルス抗原が坐骨神経内に検出されなかった。ウイルスのみを投与した場合

には、投与後3時間に全例にウイルス抗原が検出されたことから、p286によりPVの軸索輸送が阻害されたことがわかる。この結果からも、PVRがシナプスへのウイルスの取り込み、またはウイルスの軸索輸送に必須であることが強く示唆された。

I-1-8-(3) 病態発現

筋注したウイルスによる病態発現に p286 がどのような影響を及ぼすかを調べた (Table 4)。 1×10^6 PFU の Mahoney 株と BSA Fraction V または p286 の混合液を Tg21 マウスに筋注し、ウイルス投与後 48 時間後のイニシャルバラリシスを観察した。BSA Fraction V を混合した場合には、ウイルスのみを投与したとき (Fig. 1A, Fig. 2A) と同様に全例にイニシャルバラリシスが観察された。一方、p286 を混合した場合には、抗体量に比例してイニシャルバラリシスが抑制され、2.4 μ g 混合した場合には完全に抑制された。以上の結果より、PVR は坐骨神経経由の病態発現に関与していることが示唆された。

I-1-9 微小管重合阻害剤のウイルス軸索輸送への影響

速い軸索輸送には微小管が関与していると言われている (Brady 1991)。PV の軸索輸送は速い逆行性軸索輸送に分類されることがわかったので、この輸送系に微小管が関与しているかどうかを、微小管の重合阻害剤である vinblastine

を用いて検討した。Tg21 マウスの左側の坐骨神経を vinblastine あるいは PBS(-) で処理し、翌日 1×10^6 PFU の Mahoney 株を左下腿背側に筋注し (Fig. 6, 上部)、生死を観察した (Fig. 5)。PBS(-) で処理したものでは、3日目から死亡し始め、5日目までに全例が死亡した。これに対し、vinblastine で処理したものは、4日目から死亡し始め、8日目までに全例が死亡した。このように、死亡までに至る時間が vinblastine の方が長くかかり、vinblastine がウイルスの病態発現に阻害的に働いていることが示唆された。

Vinblastine の阻害効果がどの段階に働いているのかを知るため、Tg21 マウスの坐骨神経を vinblastine あるいは PBS(-) で処理し、翌日 1×10^6 PFU の Mahoney 株を筋注し、ウイルス投与後16時間後に脊髓を採取し、中に含まれるウイルス力価をブランクアッセイ法により測定した (Fig. 6)。Fig. 7 に示したように、PBS(-) で左側の坐骨神経を処理後、左右いずれの下腿背側にウイルスを筋注しても (PBS, L, R)、脊髓内から回収されるウイルス量は等しく、坐骨神経の処理による脊髓内で検出されるウイルス量への影響は無いことが示された。Vinblastine で左側の坐骨神経を処理後、左側の下腿背側にウイルスを筋注すると (Vinb. L)、脊髓内に検出されるウイルス量が減少する。また、vinblastine で左側の坐骨神経を処理後、右側の下腿背側にウイルスを筋注すると (Vinb. R)、PBS(-) で坐骨神経を処理したときと同様のウイルス量が脊髓内から検出された。したがって、vinblastine による脊髓内でのウイルス複製抑制効果は無いことが示された。以上の結果より、vinblastine は PV の坐骨神経内伝播を阻害していることが考えられる。したがって、PV の逆行性輸送には微小管が関与しているこ

とが示唆された。

1-1-10 強毒、弱毒、および組換え PV の筋注感染実験

PV のキャプシド蛋白質が病態発現にどのように影響するかを調べるために、MSM 株と SMS 株 (Fig. 8) を筋注し麻痺の発現と生死を観察した (Fig. 9)。MSM 株は Mahoney 株よりも少し弱い病原性を示した。この結果は、脳内接種 (Horie *et al.*, 1994) と静脈内接種 (Yang *et al.*, 1997) により得られている結果と矛盾しない。弱い神経病原性決定基がキャプシド領域に存在していると考えられている (Kohara *et al.*, 1988) ことにも一致する。Fig. 9 の結果では、SMS 株の病原性が Sabin1 株よりも弱かった。この結果は脳内接種による以前の結果と矛盾している (Horie *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997)。Sabin1 株のキャプシドを持つウイルスは筋注された場合に Mahoney 株のキャプシドを持つものに比べ病態の進行に有利な面を持ち合わせていることが考えられる。

1-2 考察

PV 感受性 Tg マウスを用いて、PV 筋注後の病態発現について調べた。筋注された PV は、筋注後 3 時間以内に投与地点から約 2 cm のところにある坐骨神経の観察地点に到達していたが (Table 5)、投与後 3 時間という短い時間内ではウイルスの複製は起こり得ないため、ウイルスは坐骨神経末端のシナプスから直接取り込まれていると考えられる。Tg マウスの筋肉内ではウイルスはわずかに複製する (Table 1) ので、筋細胞で複製したウイルスが神経筋接合部にあるシナプスから取り込まれることが考えられる。このようなメカニズムは、ヒトにおける Cutter ワクチンの事例 (Nathanson and Langmuir, 1963) にもあてはまる。筋肉を実験的に傷つけることにより、筋肉内での PV 複製効率が上がり、ウイルスの軸索輸送効率も上がることが示されている (Gromeier and Wimmer, 1998)。一方で、霊長類における実験から筋肉の損傷により中枢神経系の血管の透過性が変わるため、PV が中枢神経系へ侵入するのではないとも考えられている (Bodian, 1954)。

これまでに、ニューラルパスウェイは PV が中枢神経系へ侵入する主要な伝播経路ではないことが示唆されている (Yang *et al.*, 1997) が、ウイルスを筋注後に投与側の下肢に麻痺が生じる現象は致命的である。Tg マウスへの筋注の実験系において私が示した結果は、PVR がイニシャルパラリシスの発現に必要であることを示した以前の実験 (Ren and Racaniello, 1992) を支持している。イニシャルパラリシスが投与した下肢に発現する現象は、神経向性の PV 2 型 MV

状態を維持したまま細胞体へ移行し、神経の核内に存在する CREB (cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein) にシグナルを伝えることが明らかになっている (Riccio *et al.*, 1997)。このようにレセプターごと小胞輸送されることが考えられている。また、HeLa 細胞において、PV が完全な感染性粒子のまま PVR 依存的に取り込まれ、吸着後 10 分まではクラスリンコート小胞中に存在し、吸着後 30 分まで完全な粒子のまま存在していることが示唆されている (Willingmann *et al.*, 1989)。クラスリンの関与はまだはっきりしていないが (DeTulleo and Kirchhausen., 1998)、PV は細胞に吸着後、エンドサイトーシスされるようである (Kronenberger *et al.*, 1998; Madshus *et al.*, 1987; Zeichhardt *et al.*, 1985)。以上の結果を考え合わせると、PV もシナプスにおいて PVR 依存的にエンドサイトーシスされ、坐骨神経の中で PVR とともにエンドソーム中に存在している可能性が考えられる。透過型電子顕微鏡で坐骨神経断面を観察したところ、小胞に包まれたウイルスらしい形態が観察された (data not shown)。今後免疫電顕により詳しく解析する必要があるが、坐骨神経内でウイルスが小胞内に存在する可能性を示していると考えられる。

このように PV が PVR 依存的にエンドサイトーシスされるとすると、ウイルス含有エンドソームからは PVR の細胞質内ドメインが突出することになり、この部分が小胞輸送に関して重要な働きを担っている可能性が考えられた。そこで共同研究者の土田らが、PVR の細胞質内ドメインに相互作用する蛋白質を酵母 two-hybrid 系でヒト cDNA ライブラリーから検索した。その結果、マウスの逆行性モーター蛋白質ダイニンの軽鎖である Tctex-1 (King *et al.*, 1996)

株をサルに筋注した実験でも見られている (Nathanson and Bodian, 1961)。この麻痺は坐骨神経を凍結することにより阻害されることから、MV 株の筋肉から中枢神経系への伝播経路は坐骨神経を經由していると考えられた。Cutter ワクチン事例においては、麻痺を起こしたヒトの症例のうち、71 %で投与部位とイニシヤルバラリシスの発現部位の相関が見られた (Nathanson and Langmuir, 1963)。Mahoney 株を筋注されたサルでは、投与部位と麻痺の発現部位の相関は見られなかった (Nathanson and Bodian, 1961)。これは、神経細胞外でのウイルスの複製や、投与部位に投射している他の神経の影響によると考えられる。坐骨神経を切断しても投与後7日目までに全例が麻痺を起こしたことから (Fig. 2A)、坐骨神経切断によって筋注されたウイルスの中枢神経系への伝播を阻止することはできないことがわかる。この結果は、坐骨神経以外にも中枢神経系への伝播経路が存在していることを示唆している。

PVR にはウイルスを結合する働きと、ウイルスの構造変化を起こす働きがあることが知られている。精製 PVR は、完全な感染性粒子である沈降係数 160S の粒子を、135S や 80S に変化させることが報告されている (Arita *et al.*, 1998)。このように PVR 自身が PV の脱殻に関与していると考えられる。ところが坐骨神経内に検出されたウイルス関連物質は、沈降係数 160S であった (Fig. 4A)。シナプスにおいてウイルスと PVR との相互作用により細胞表面でのウイルスのエンドサイトーシスが起これると思われるが、ウイルスあたりの PVR 結合数が少ないために、ウイルスの構造変化が起きないためと考えることができる。PVR を介した細胞膜との融合によりウイルスゲノムが細胞質内へ放出さ

れたり、PVR 依存的にウイルスがエンドサイトーシスされ、エンドソーム中でウイルスが脱殻するなどといった、いくつかの経路によって PV の感染は成立すると考えられる。*in vivo* の運動神経に PV が取り込まれる場合には、後者の経路が主体となっている可能性がある。Tg マウスのニューラルパスウェイにより、ウイルスが輸送されている過程では、ウイルスの脱殻を阻害する因子が存在している可能性もある。

PV を筋注後の、筋肉細胞へのウイルスの感染、シナプスへのウイルスの取り込み、ウイルス複製につながる神経細胞体内でのウイルスの脱殻といった過程には、PVR が必要であると考えられる。PVR は筋肉内で発現している (Koike *et al.*, 1994a; Leon-Monzon *et al.*, 1995)。また、p286 抗体を用いた免疫染色の結果、Tg21 マウス胚由来運動神経のプライマリーカルチャーでは、軸索、シナプスを含め表面全体に PVR が発現していることを確認した (data not shown)。ヒトのシナプトソームも PV の結合部位を持っていることが報告されている (Brown *et al.*, 1987)。

PV は坐骨神経内を速い逆行性輸送系によって移行することが強く示唆された。この速い逆行性輸送系では、プレリソソマル小胞、多胞体、神経成長因子 (NGF)、リサイクル蛋白が輸送される (Brady, 1991)。速い逆行性輸送系によって運ばれるものの多くは、エンドソームに内包されて微小管に沿って輸送されると考えられている。NGF は PC12 細胞中でレセプター TrkA の速いエンドサイトーシスを誘導し (Grimes *et al.*, 1996)、TrkA 自体が逆行性、順行性に輸送されることが示されている (Ross *et al.*, 1994)。この TrkA は自己リン酸化

のヒトホモログ TCTEL1 (Watanabe *et al.*, 1996) が PVR (hPVR α , hPVR δ) の細胞質内ドメインに相互作用することが明らかとなった。Tctex-1 と TCTEL1 はアミノ酸レベルで 98 % のホモロジーがあるため、Tctex-1 がヒトのダイニンサブユニットとして機能する可能性は十分に考えられる。ダイニンは微小管のマイナス端向性に働くモーター蛋白質である。細胞質ダイニンは後期エンドソーム、リソソーム、ゴルジ体、シナプス小胞、小胞体などと相互作用し、それらの輸送に関与することが知られている。速い逆行性輸送系による膜小胞の輸送には、細胞質ダイニンとダイナクチンの複合体が必要であるとの報告もある (Waterman-Storer *et al.*, 1997)。したがって、ウイルス含有小胞から突き出した PVR の細胞質内ドメインにダイニンが相互作用することによって、微小管に沿った速い逆行性輸送が行われるモデルが考えられる (Fig. 11)。

Tctex-1 はいくつかの蛋白質と相互作用することが報告されている。Doc2 は Munc13 と相互作用して Ca²⁺ 依存性のエキソサイトーシスに関与していることが知られているが (Orita *et al.*, 1997, 1996)、この Doc2 は Tctex-1 とも相互作用することが報告されている (Nagano *et al.*, 1998)。また、この他にも Tctex-1 はチロシンキナーゼ p59^{Fyn} (Campbell *et al.*, 1998)、CD5 細胞質内アミノ酸配列 (Bauch *et al.*, 1998)、ヒトロドプシン (Tai *et al.*, 1998) と相互作用することが報告されている。チロシンキナーゼ p59^{Fyn} は、細胞内輸送に関与していると考えられている Caveolin-1 とともに Shc-Ras-ERK シグナル伝達を仲介している (Wary *et al.*, 1998)。このように Tctex-1 が小胞輸送機構に関与している可能性が分子生物学的にも考えられることから、TCTEL1 についても同様の機能

を持つ可能性が考えられる。

PVR の細胞質内ドメインは PV の感染にとって必要ないことがマウス細胞系で示されている (Koike *et al.*, 1992, 1991a; Selinka *et al.*, 1991)。しかし、ここで見られている現象はあくまで一般培養細胞での現象であるため、細胞の特殊性によって発揮される PVR の細胞質内ドメインの役割を見逃している可能性も考えられる。極性細胞である小腸上皮細胞において、PV が管腔側から放出される現象が報告されている (Tucker *et al.*, 1993) ことなどを考え合わせると、細胞の極性がウイルスに何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。したがって、*in vivo* の神経細胞のような極性のある特殊な細胞において、PVR の細胞質内ドメインが軸索輸送に関与する可能性も十分考えられる。

筋注によるマウス神経病原性試験の結果より、Mahoney 株は MSM 株よりも多少強い神経病原性を持つことが示された (Fig. 9)。この結果はウイルス株により安定性に差があることにより説明できる。non-Tg マウス脳においては、Sabin1 株のキャプシドを持ったウイルスの方が Mahoney 株のキャプシドを持ったものよりも不安定である (Yang *et al.*, 1997)。したがって、キャプシドの安定性は、神経病原性を決定する要因の一つと考えられる。しかし、SMS 株は Sabin1 株よりもわずかに神経病原性が弱かった (Fig. 9)。これはウイルスの安定性の差によっては説明がつかない。麻痺が起きてから死亡するまでの期間の平均について見ると SMS 株の方が Sabin1 株よりも短く、Mahoney 株が最も短い。この結果は、中枢神経系においてウイルスの複製が始まると SMS 株の方が Sabin1 株よりも強い神経病原性を示すことを示唆している。一方、軸索内輸送

については、SabinI 株のキャプシドを持ったウイルスの方が Mahoney 株のキャプシドを持ったものよりも効率よく輸送される可能性がある。このように、筋注された MSM 株と SMS 株の神経病原性については、それぞれ過大評価、過小評価されていると考えられ、脳内接種よりも筋注後の方が神経病原性発現機構が複雑なように見える。

II Tg マウスおよび non-Tg マウスにおける逆行性軸索輸送系

II-1 結果

II-1-1 筋注後の筋肉内、血液内、坐骨神経内ウイルスの形態

PVR を発現していない non-Tg マウスにおいては Mahoney 株を筋注しても病態が発現しない (Jia *et al.*, submitted)。PV が取り込まれているかどうかを見るために、坐骨神経を結紮した Tg21 マウスに、 ^{35}S メチオニンで標識した Mahoney 株を筋注し、1.5 時間後の筋肉、坐骨神経、血液を採取し、それらの中に存在する標識物質をしょ糖密度勾配遠心法により分画した (Fig. 10A)。坐骨神経内部ではほとんどが完全な感染性粒子である沈降係数 160S として存在していた。この結果より、ウイルスは non-Tg マウスにおいても軸索内部を完全な感染性粒子として輸送されることが示唆された。実際に、軸索内部に存在しているウイルスが感染性を維持していることは、AGMK 細胞に対して感染性を維持していることから示された (data not shown)。筋肉内においては、相当量のウイルスが主に 160S として存在していた。血液においては、放射活性はしょ糖密度勾配遠心分画中にほとんど検出されなかった。したがって、しょ糖密度勾配遠心による分画時に、筋肉、坐骨神経内に存在する血液の放射活性の影響はないと考えられる。

II-1-2 抗 PVR 抗体のウイルス軸索輸送に対する影響

[³⁵S] メチオニンで標識した Mahoney 株と抗 PVR 抗体 p286 42.2 μg との混合液を non-Tg マウスに筋注し同様の実験を行ったところ、坐骨神経内に見られる 160S の量に変化は見られなかった (Fig. 10B)。したがって、non-Tg マウスにおける PV の輸送に PVR は関与しないことが示唆された。p286 の存在下、筋肉内の標識物質は大部分が 160S で占められていた。血液においては、放射活性がほとんど検出されなかった。

II-1-3 PV の逆行性移行速度

non-Tg マウスにおける PV の逆行性移行速度を調べるために、免疫組織染色法により坐骨神経内に見られるウイルス抗原を時間を追って検出した (Table 5)。ウイルス抗原は、ウイルスを筋注後 12 時間に全例に検出されるようになった。ウイルス投与後 6 時間後には 3 匹中 1 匹にわずかに検出されたのみなので、ウイルスは観察地点を 6 ~ 12 時間後に通過すると考えられる。したがって、non-Tg マウスにおけるウイルスの逆行性移行速度は 4 ~ 8 cm / day と考えられる。この速度は、遅い逆行性軸索輸送として定義されている速さ < 0.6 cm / day (Brady 1991) よりも圧倒的に速く、速い逆行性輸送に属すると考えられる。

II-1-4 小麦胚芽凝集素 (WGA) の逆行性移行速度

WGA は軸索輸送のトレーサーとして使われる、レクチンの一種である。WGA は N-アセチルグルコサミンと N-アセチルノイラミン酸に結合することが知られている (Mansson and Olofsson, 1983)。細胞膜に結合し、効率よく取り込まれる (Segade *et al.*, 1991; Trojanowski *et al.*, 1981; Broadwell and Balin, 1985; Gonatas *et al.*, 1979)。この WGA が Tg マウスと non-Tg マウスにおいてどれくらいの速さで輸送されるかを免疫組織染色法で調べた (Table 6)。Tg21 マウス、non-Tg マウスに関わらず、観察部位で抗原は WGA を筋注後 1.5 時間からすでに検出され始め、筋注後 3 時間には全例で検出された。したがって、WGA は観察地点を投与後 3 時間以内に通過していると考えられ、速い集団についての逆行性移行速度は 16 cm/day 以上となる。投与後 12 時間後まで抗原が全例で検出され続け、WGA は 4 ~ 16 cm/day の幅広い輸送系において運ばれている。この WGA と p286 の混合液を筋注しても Tg マウス、non-Tg マウスに関わらず投与後 3 時間後には全例に抗原が検出されることから、WGA の逆行性輸送系には PVR が関与していないことが示唆された。

PV と WGA を混合して筋注したところ、Tg マウス、non-Tg マウスの両方で同様にウイルスの輸送がかなり阻害され、WGA の輸送が多く見られた (data not shown)。WGA のレセプターは膜上に相当多く存在すると考えられるの

で、WGA と PV がエンドサイトーシスの段階で拮抗し、PVR が特異的なレセプターである PV は取り込みの効率が低下する可能性が考えられる。

II-2 考察

PV 感受性 Tg マウスと非感受性 non-Tg マウスを用い、PV の逆行性軸索輸送について比較検討した。Non-Tg マウスにおいても、ウイルスはシナプスから取り込まれ輸送されていることが示唆された。シナプスにおいてはシナプス小胞から分泌物が放出された後、放出活性帯とは別の部分から小胞膜が特異的に取り込まれる (Ryan *et al.*, 1996)。また、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の取り込み実験から、シナプスには、効率は低いけれども (Stieber *et al.*, 1989; Gonatas *et al.*, 1979) レセプターを介さない受動的なエンドサイトーシス機構が存在することが知られている (van der Want *et al.*, 1997)。このように、シナプスには非特異的な取り込み機構が存在するようである。Non-Tg マウスにおける PV の取り込みは、PVR 非依存的であり、Tg マウスにおいて見られる PVR 依存的ウイルス輸送機構とは別の機構が存在することを示唆している。この PVR 非依存的ウイルス輸送機構は、シナプスの非特異的な取り込み機構に関連している可能性が考えられる。免疫組織染色の結果より、PV 抗原は non-Tg、Tg マウス双方の坐骨神経内に同程度存在し (data not shown)、PVR を持たない non-Tg マウスにおけるウイルスの取り込みが PVR を持つ Tg マウスに匹敵することを示唆している。したがって、non-Tg においても何らかの非特異的なウイルスレセプターによる非特異的な取り込み機構によってウイルスが取り込まれる可能性が考えられる。

Tg マウスにおいて、PV は ~ 16 cm / day で逆行性輸送されているのに対し、non-Tg マウスでは $4 \sim 8$ cm / day で輸送されていた (Table 5)。小胞輸送の速度は、小胞の大きさや、条件によって異なってくることが知られている (Nakata *et al.*, 1998)。また、取り込まれた小胞が再利用されるか否かでダウンレギュレーションの速度がレセプターによって異なることが知られているので (Fausser *et al.*, 1998; Corvera *et al.*, 1994)、レセプターによっても輸送速度が異なると考えられる。したがって、これらの移行速度は、いずれも速い逆行性輸送系に分類されると考えられる。Tg と non-Tg マウスでの移行速度の差は、レセプターの差によると考えるのが妥当であろう。速い逆行性輸送では小胞が運ばれることが知られているので、non-Tg マウスにおいてもウイルスは小胞輸送されると考えられる。

坐骨神経内にウイルスが完全な感染性粒子として認められ、ウイルスが坐骨神経内を移行して脊髄内にある細胞体まで感染性を維持したまま到達していると考えられる。それにも関わらず、non-Tg マウスにおいては、Mahoney 株を大量に筋注しても臨床症状は現れない。Mahoney 株のマウス脊髄適応変異株である SA 株は、脊髄内接種により non-Tg マウスの神経細胞で増殖し、麻痺を起こすにもかかわらず、大量に筋注しても麻痺を起こさない (Jia *et al.*, submitted)。そこで、この SA 株について軸索輸送されているかどうかを免疫組織染色法で確認したところ、Mahoney 株同様、 $4 \sim 8$ cm / day で逆行性輸送されていることが確認された (data not shown)。この結果より、non-Tg マウスでは軸索輸送に関与する要素と、細胞体でのウイルス複製へ導く要素は別なもので

あることが示唆される。non-Tg マウスの末梢神経末端には、ウイルスの取り込みや輸送を担う分子は存在しているものの、ウイルスの有効な脱殻を促す分子が発現していないため、ウイルスが脊髄内に侵入しても複製することができないか、細胞体表面からの侵入とシナプスからの侵入との間に、輸送経路などに違いがあると考えることができる。

non-Tg マウスに存在している PV の 4 ~ 8 cm / day の輸送系は、Tg マウスにも存在しているはずである。しかし、Fig. 4B と Table 5 の結果より、Tg マウスには non-Tg に見られる輸送系がほとんどまたは全く存在していないことがわかる。p286 非存在下でも Table 5 にあるように投与後 12 時間後の坐骨神経内にウイルス抗原はほとんど見られず 4 ~ 8 cm / day の輸送系がほとんど動いていないうえ、p286 存在下ではウイルスの輸送そのものが阻害され、4 ~ 8 cm / day の輸送系がほとんど動いていないことを示している。つまり p286 あるいは PV が存在すると、Tg マウスにおけるウイルスの 4 ~ 8 cm / day の輸送系が阻害される。したがって、PVR に結合したものがエンドサイトーシスされる際に、4 ~ 8 cm / day の輸送系に関わる非特異的レセプターも同時に取り込まれ、ダウンレギュレートされる可能性が考えられる。実際に、クラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて、エンドサイトーシス時にレセプターを小胞内へ導くコネクタ分子 (saturable components) が共通しているレセプター同士は、同じエンドソーム内に取り込まれることがありうるとされている (Warren *et al.*, 1998)。また、PVR にウイルスや抗体が結合することにより、シナプス膜の状態が変化する可能性も考えられる。

逆行性軸索輸送のコントロールとして、WGA の輸送速度について検討した。WGA は PVR 非依存的に 4 ~ 16 cm/day の幅広い輸送系で運ばれていると考えられた。WGA は膜上に存在するオリゴ糖に結合して細胞膜を標識し、強力にエンドサイトーシスされると考えられる。脊髄後根神経節の神経において、WGA の輸送は saturable である (DiStefano and Curtis, 1994) ので、特異的なレセプターによる輸送と考えられる。WGA はクラスリンの関与しないアドソープティブエンドサイトーシスにより取り込まれ (Broadwell and Balin, 1985)、小胞中に存在する (van der Want *et al.*, 1997; Stieber *et al.*, 1989; Broadwell and Balin, 1985; Buchner *et al.*, 1987) ことが示されている。嗅神経 (pike olfactory nerve c-fibers) においては、微小管に沿って逆行性に輸送され、25 mm/day と 7 mm/day の二相性に輸送されることが示唆されている (Buchner *et al.*, 1987)。このように、WGA の輸送は、いくつかの小胞輸送系を反映していると考えられる。

第四章 結論

PV 感受性 Tg マウスとその遺伝的背景を共有する non-Tg マウスを用いた実験から、ヒトやサルに観察されていた PV のニューラルパスウェイと同様の経路が Tg マウスに存在することを確認し、この系において軸索輸送のメカニズムについて検討した。PV は Tg マウスにおいて微小管に沿った速い逆行性輸送系により完全な感染性粒子として輸送され、ウイルスの取り込みか輸送の段階で PVR が必須であることを示した。一般的に速い逆行性輸送系においては、小胞成分が輸送されることが知られていることから、PV もエンドソームとして軸索内を移行すると考えられる。小胞輸送の際には、PVR の細胞質内ドメインが小胞の外側に位置すると考えられるが、この PVR 細胞質内ドメインへ逆行性モーター蛋白質ダイニンのサブユニットと考えられる TCTEL1 が相互作用することが明らかとなり、このドメインの小胞輸送における重要性が示唆された。以上の結果より、ダイニンによるウイルス含有小胞逆行性軸索輸送の仮説を立てるに至った。

non-Tg マウスにおいても PV は神経内に取り込まれ、輸送されていることが示唆された。それにも関わらず、マウス脊髄適応変異株ですらウイルスを筋注後に病原性を示さないことから、ウイルスが細胞体へ感染性を維持したまま到達するだけでは病原性が発現しないことが示唆された。このことは、末梢シナプスにはウイルスの有効な脱殻に必要な分子が存在しないか、細胞体表

面からの侵入とシナプスからの侵入の間に、質的な差がある可能性を示している。non-Tg マウスにおける逆行性軸索輸送を Tg マウスと比較することにより、少なくとも3種類の逆行性軸索輸送系が存在することが示唆された。Fig. 12 に示したように、Tg マウスで見られる PVR 依存的な PV を輸送する系、non-Tg マウスで見られる PVR 非依存的な PV 輸送系、そして、Tg、non-Tg マウスに関わらず見られる PVR 非依存的な WGA 輸送系である。いずれの系も速い逆行性輸送系に属するので、小胞輸送されると考えられる。

PV が細胞に侵入することと脱殻を区別して観察できる *in vivo* での系を確立することができた。また、PVR は PV を結合し、脱殻させる能力を持っていることが知られているが、軸索輸送にも関与している可能性を示唆することができた。このように、PV 感染時に種々の機能を持っている PVR の自然環境下における働きは興味深い。PVR の自然環境下におけるリガンドもウイルスや NGF と同様に軸索内部を逆行性に輸送され、何らかのシグナルを伝達している可能性が考えられる。

第五章 付録

I 図表

Table 1. PV 筋注による神経病原性発現に対する血中抗 PV 抗体の影響

Virus ^{a)} inoculation route	Anti-PV Ab ^{b)}	48 hr after inoculation	Up to 2 weeks after inoculation
IM	-	10/10 ^{c)}	10/10
IM	+	8/10	8/10
IV	-	0/10	10/10
IV	+	0/10	0/10

a) Tg21 mouse was inoculated with 1×10^6 PFU of the Mahoney virus.

b) Anti-poliovirus serum was injected into the tail vein just before the virus inoculation.

c) Number of mice paralyzed / inoculated.

Table 2. PV 筋注後のウイルス分布経時変化

Hours after IM inoculation	Mouse ^{a)} No.	Spinal Cord	Muscle
4hr	1	$1 \times 10^{1(b)}$	3×10^5
	2	ND ^{c)}	7×10^5
	3	5×10^1	3×10^5
8hr	1	ND	5×10^5
	2	ND	4×10^5
	3	5×10^1	4×10^5
12hr	1	ND	2×10^5
	2	ND	3×10^5
	3	ND	2×10^5
16hr	1	2×10^4	9×10^5
	2	ND	4×10^5
	3	4×10^4	3×10^5
20hr	1	5×10^4	3×10^5
	2	2×10^5	3×10^5
	3	5×10^4	3×10^5
24hr	1	4×10^4	2×10^5
	2	5×10^4	3×10^5
	3	5×10^4	3×10^5
48hr	1	4×10^7	5×10^5
	2	4×10^7	9×10^5
	3	5×10^7	3×10^6

a) Each mouse was inoculated with 1×10^6 PFU of the Mahoney virus.

b) Titers in AGMK cells are indicated by PFU / tissue.

c) ND means less than 10 PFU / tissue.

Table 3. PV 筋注によるイニシャルパラリシスに対する坐骨神経切断の影響

Transection	Mouse number (paralyzed / inoculated) 48 hr after virus inoculation ^{a)}
2hr ^{b)}	0/6
4hr	2/6
6hr	4/6
10hr	6/6

a) Tg21 mouse was IM-inoculated with 1×10^6 PFU of the Mahoney virus.

b) Sciatic nerve transection was performed at 2 hr after the virus inoculation.

Table 4. PV 筋注によるイニシャルパラリシスに対して抗 PVR 抗体が及ぼす影響

Amount of mAb p286 or BSA ^{a)}		Non-paralyzed mice (%) (48 hr after virus inoculation)
2.4 μ g	BSA	0
0.024 μ g	Anti-PVR Ab	0
0.24 μ g	Anti-PVR Ab	43
2.4 μ g	Anti-PVR Ab	100

a) Tg21 mouse was IM-inoculated with 1×10^6 PFU of the Mahoney virus which was mixed with anti-PVR mAb p286 or BSA.

b) Five to seven mice were used for each condition.

Table 5. PV の軸索輸送速度

h.p.i. ^{a)}	αPVR mAb	Tg21		Non-Tg	
		-	+	-	+
1.5h		---+	NT ^{b)}	NT	NT
3h		+++	---	---	NT
6h		+++	NT	---±	NT
12h		-±±	-±±	+++	NT

a) h.p.i.: Hours post inoculation

b) NT: Not tested

Table 6. WGA の軸索輸送速度

h.p.i. ¹⁾ αPVR mAb	Tg21		Non-Tg	
	-	+	-	+
1.5h	±+++	NT ²⁾	-+++	NT
3h	+++	±+++	+++	+++
6h	+++	+++	+++	+++
12h	±+++	+++	±+++	+++

1) h.p.i.: Hours post inoculation

2) NT: Not tested

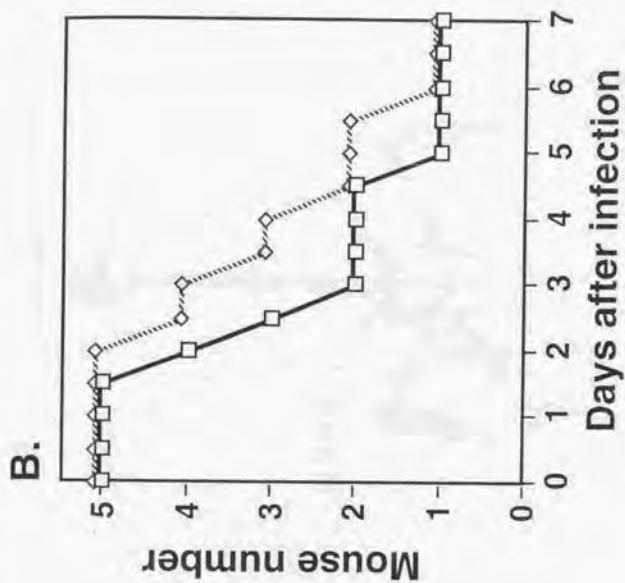
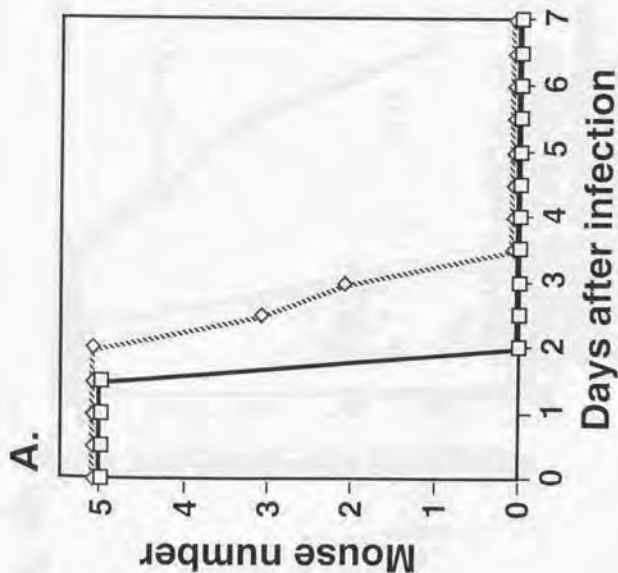


Fig. 1 Tg マウスに対するポリオウイルス筋注後の麻痺及び生死の観察
 Mahoney 株 (A: 10^6 PFU / 5μ l、B: 10^5 PFU / 5μ l) を下腿背側に筋注した。麻痺の見られない
 匹数を実線で、生存匹数を点線で示した。

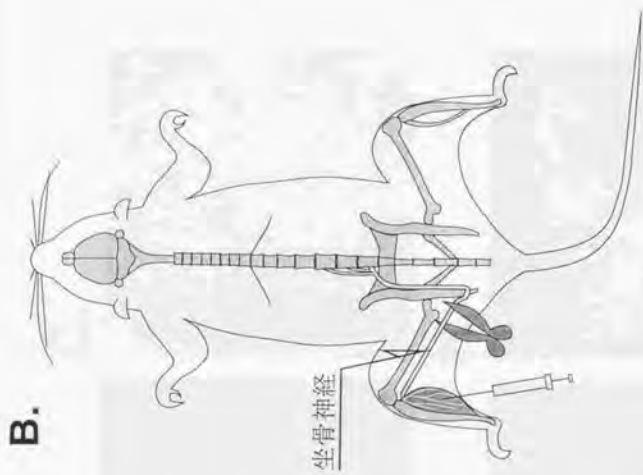
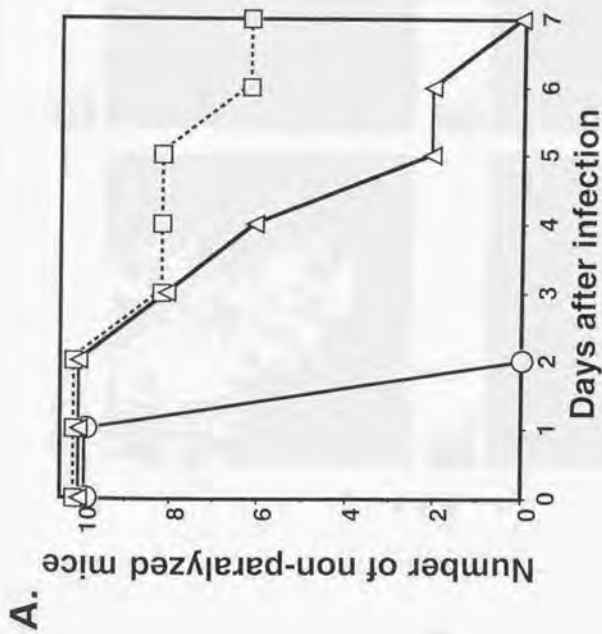


Fig. 2 筋注された PV 病原性発現に対する坐骨神経切断の影響および血中漏出ウイルスの影響

A: 10^6 PFU/5 μ l Mahoney 株を筋注したもの (○)、坐骨神経切断後筋注したもの (△)、 10^6 PFU/100 μ l Mahoney 株を静注したもの (□) の麻痺を起していない匹数を示してある。B: マウスを背面から見た実験系の説明図である。ウイルスは注射器で示した下腿背側に投与した。神経切断実験では、ハサミで示した部分で坐骨神経を切断した。

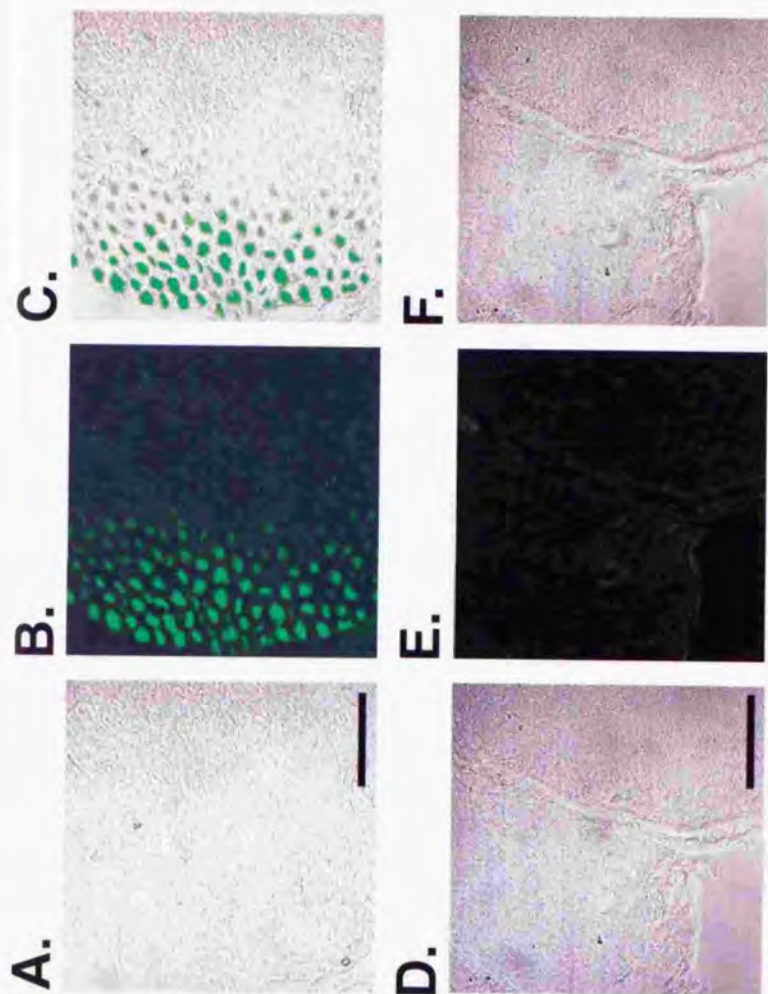


Fig. 3 Tg マウス坐骨神経断面の免疫組織染色
 Mahoney 株投与後 3 時間後の坐骨神経断面を抗ボリオウウイルス抗体で染色し、FITC で検出した。
 A-C: ウイルス感染マウス、D-F: 非感染コントロールマウス、
 A,D: 光学顕微鏡像、B,E: 共焦点顕微鏡像、C,F: Merging 像。 bar=50 μ m

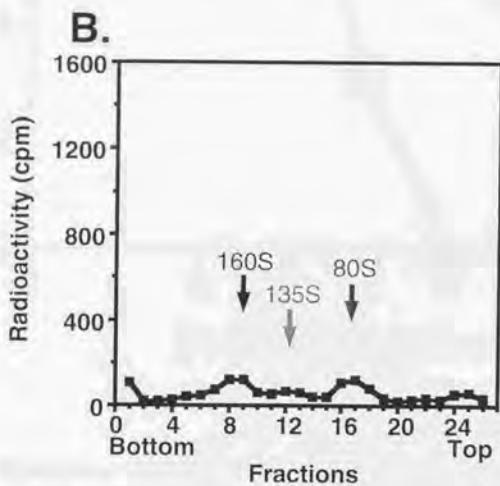
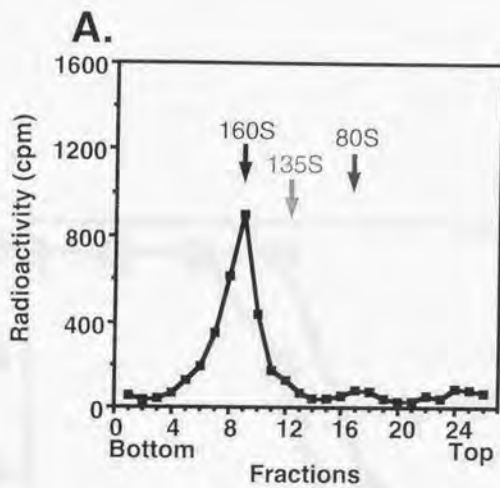


Fig. 4 [^{35}S] メチオニン標識 Mahoney 株を Tg マウスに筋注 1.5 時間後の坐骨神経内物質のしょ糖密度勾配遠心法による分析

坐骨神経を結紮した Tg マウスに 5×10^6 PFU ($0.37 \mu\text{Ci}$) / $20 \mu\text{l}$ の標識ウイルス (A) あるいは 標識ウイルスと p286 $42.2 \mu\text{g}$ の混合液 (B) を筋注し、1.5 時間後の坐骨神経をホモジネートし、しょ糖密度勾配遠心法により分画した。

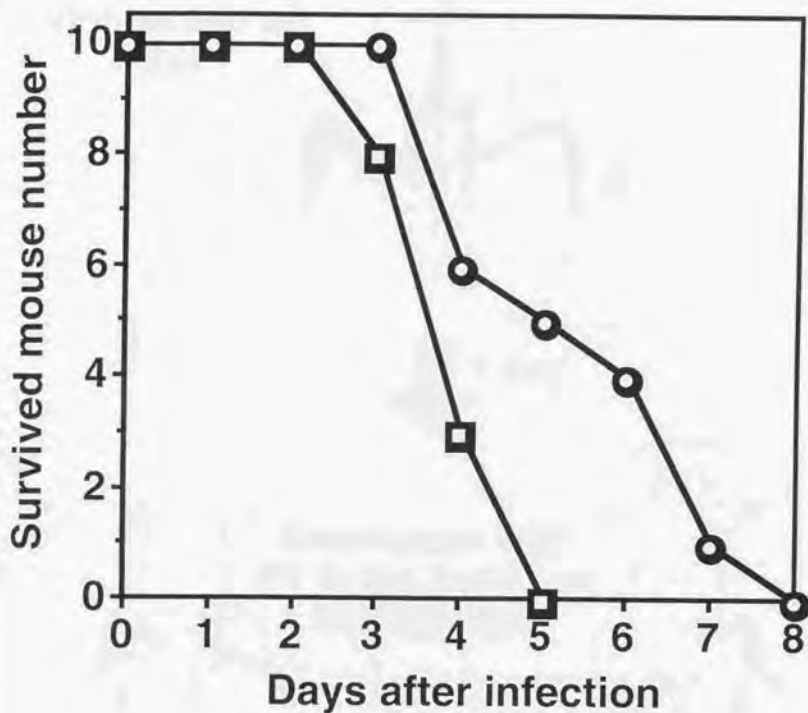
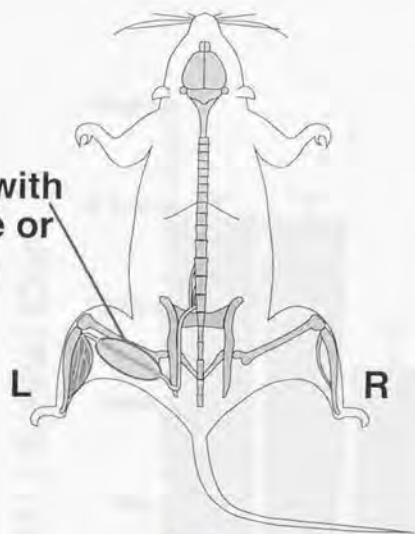
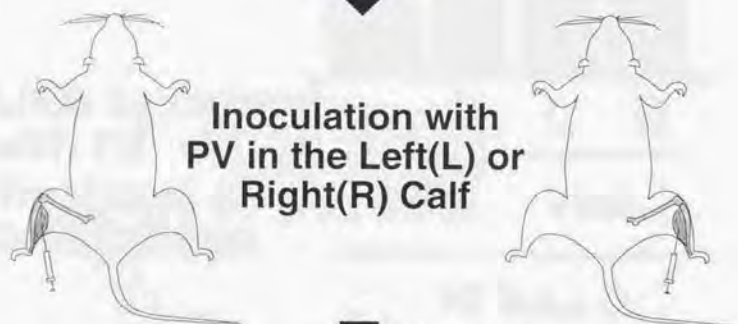


Fig. 5 Vinblastine の筋注ポリオウイルスの病態発現に対する影響
 Vinblastine (○) あるいは PBS(-) (□) で左側の坐骨神経を処理し、翌日左側の下腿背側に 10^6 PFU / 5 μ l の Mahoney 株を筋注し、生死を観察した。縦軸は生存匹数を示す。

Treatment with
Vinblastine or
PBS(-)



1 day



16 hours

Extraction of PV from Spinal Cord

Fig. 6 Vinblastine による坐骨神経処理とポリオウイルス筋注、脊髓採取の実験方法

坐骨神経の図示した部分を Vinblastine または PBS(-) で処理し、翌日 10^6 PFU/5 μ l の Mahoney 株を左 (L) または右 (R) の下腿背側に筋注する。その 16 時間後に脊髓を採取する。

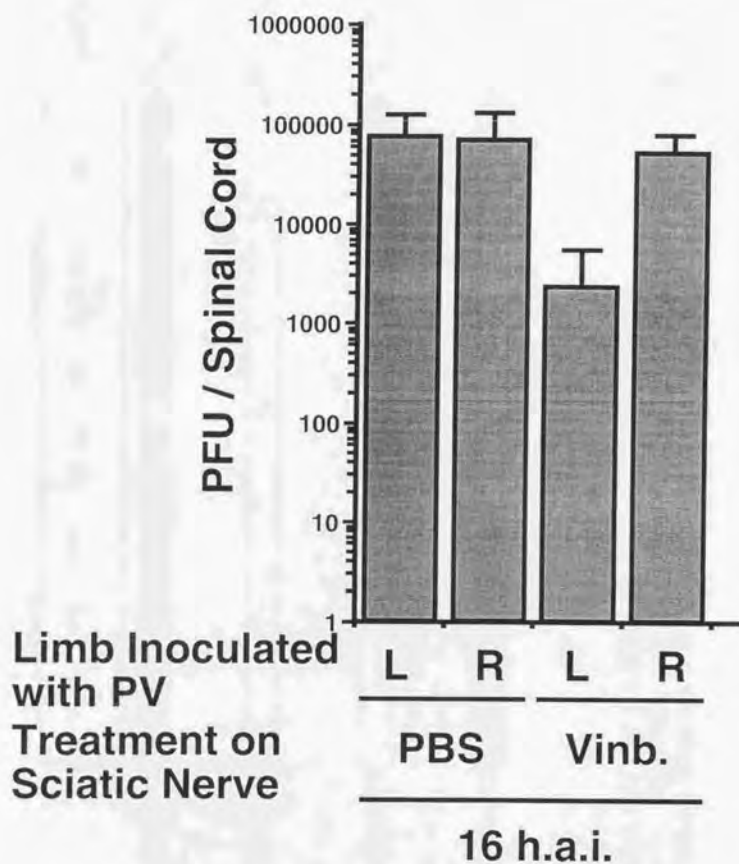


Fig. 7 Vinblastine の筋注ポリオウイルスの軸索輸送に対する影響
 Fig. 6 に示した方法で採取した脊髓から回収されたウイルス力価を縦軸に示した。
 N = 4 ~ 5。

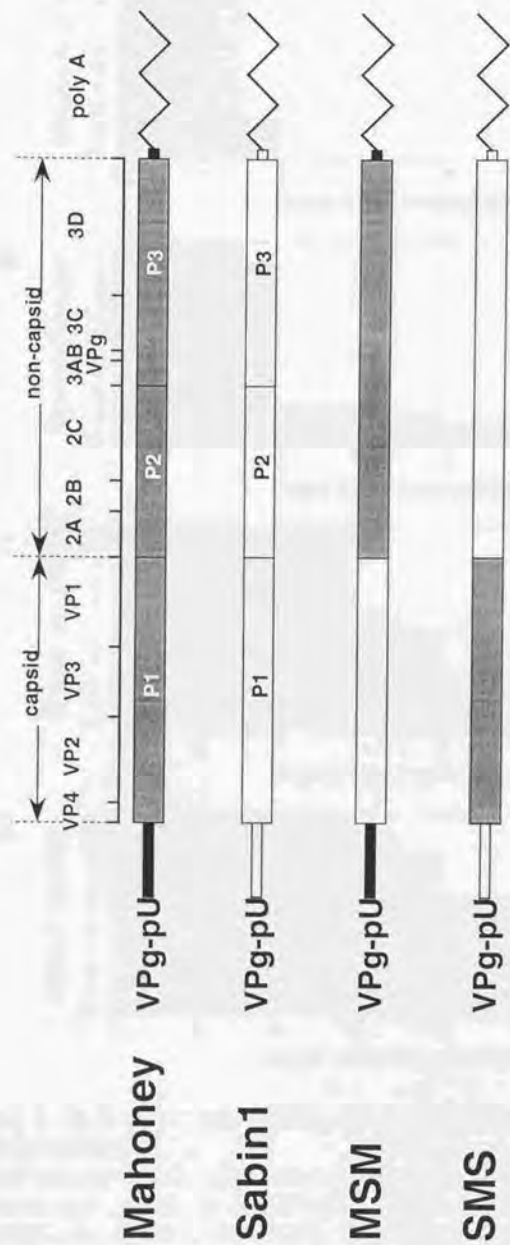


Fig. 8 キャプシド領域組換えポリオウイルスの構造
 Mahoney 株と Sabin1 株をキャプシド領域で相互に組換えた。MSM 株は Mahoney 株に Sabin1 株のキャプシドを導入した
 もの、SMS 株は Sabin1 株に Mahoney 株のキャプシドを導入したものを示す。

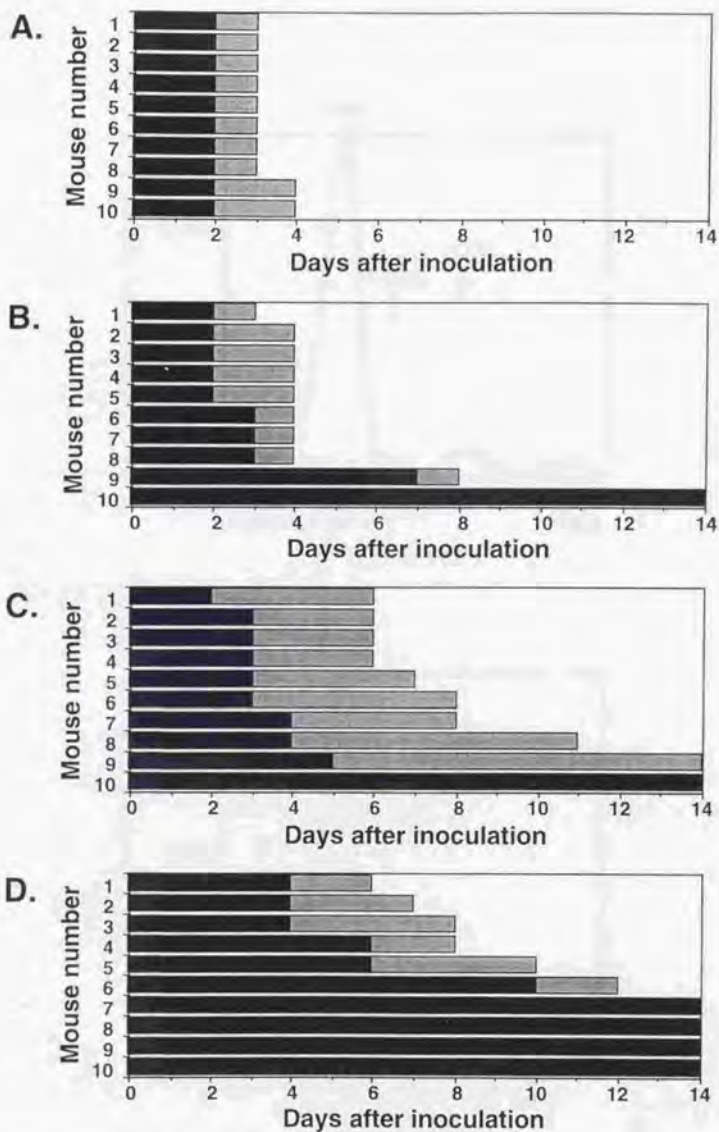


Fig. 9 Tg マウスにおける強毒、弱毒、および組換え PV の筋注後の神経毒性
 強毒 Mahoney 株 (A)、弱毒 SabinI 株 (B)、およびそれらの組換えウイルス (SMS (C)、MSM (D)) をそれぞれ 10^6 PFU/5 μ l 筋注し、麻痺および生死を観察した。黒で示した部分が正常、灰色の部分が麻痺を起こしていることを示している。

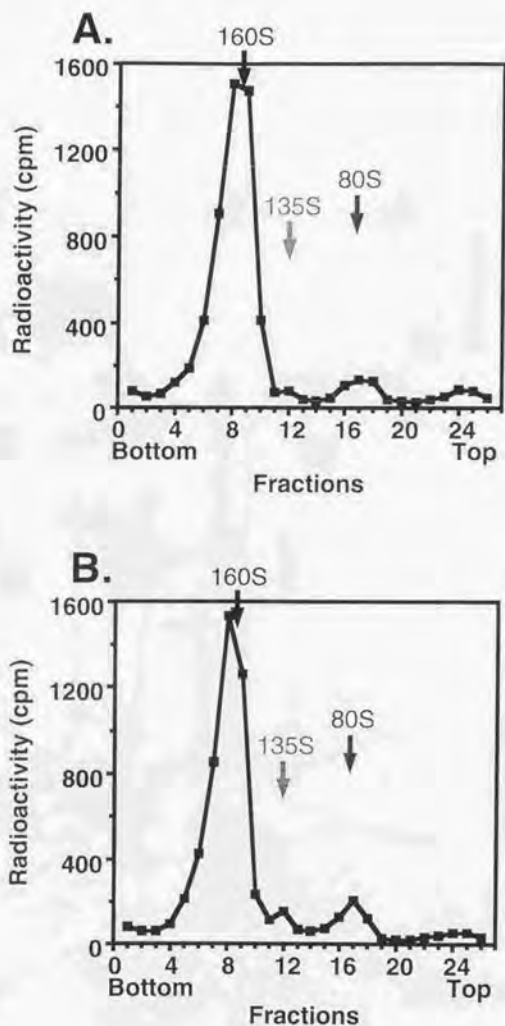


Fig. 10 ^{35}S 標識 Mahoney 株を non-Tg マウスに筋注後 1.5 時間の坐骨神経内物質のしょ糖密度勾配遠心法による分析
 坐骨神経を結紮した non-Tg マウスに 5×10^6 PFU (0.37 μCi) / 20 μl の標識ウイルス (A) あるいは標識ウイルスと抗 PVR 抗体 p286 42.2 μg の混合液 (B) を筋注し、1.5 時間後の坐骨神経をホモジネートし、しょ糖密度勾配遠心法により分画した。

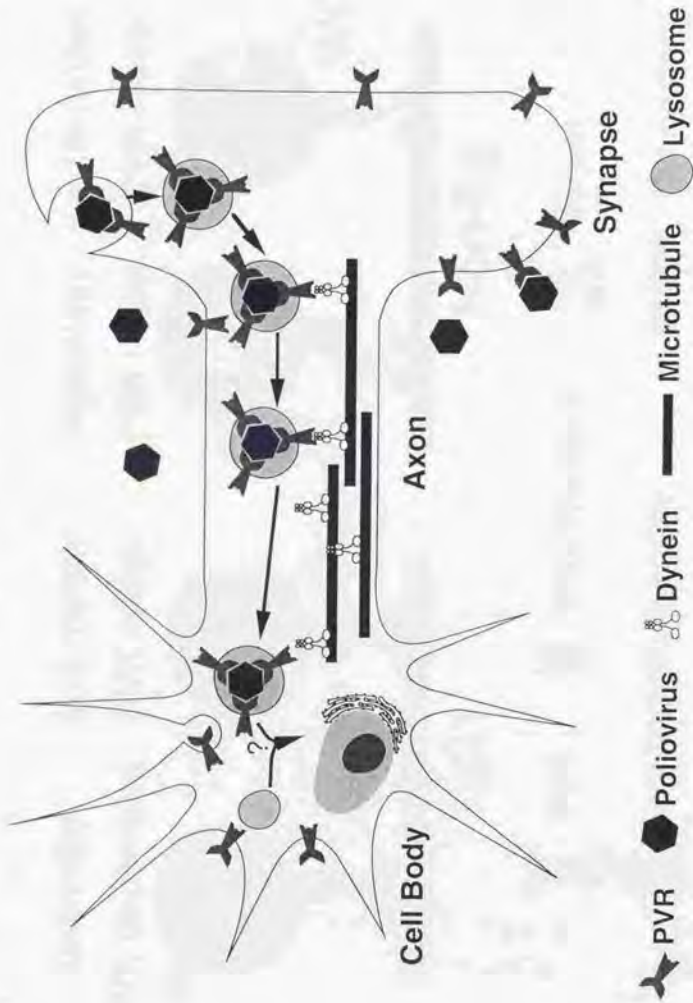


Fig. 11 Tg マウスにおけるポリオウイルスの逆行性軸索輸送メカニズムの仮説
 ポリオウイルスは神経軸索末端シナプスに発現している PVR に結合し、エンドサイトーシスされる。そのウイルス含有小胞では、外側に PVR の細胞質内ドメインが突き出している。ここへ TCTEL1 を含む逆行性モーター蛋白質ダイニンが相互作用し、微小管に沿って小胞が細胞体へと逆行性輸送されると考えられる。

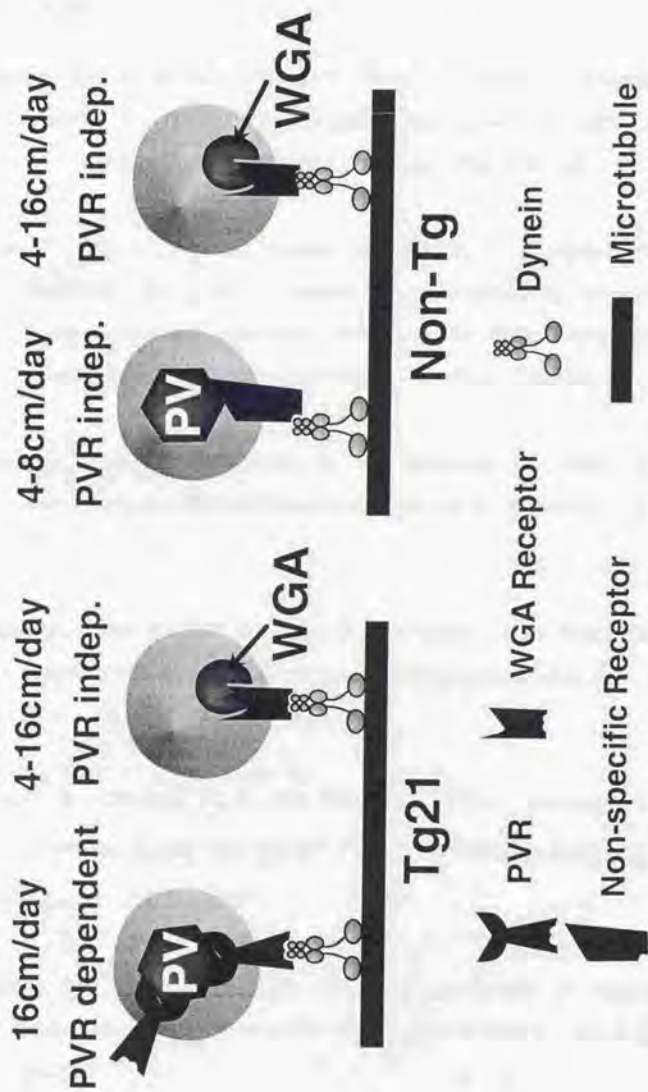


Fig. 12 Tg, non-Tg マウスで見られた逆行性輸送系において考えられる仮説図
 観察されたいくつかの輸送系について、考えられる輸送機構を示した。
 non-Tg マウスで見られたボリオウイルスの輸送には非特異的なレセプターが関与していると考えられる。
 WGA はシナプス膜表面に存在するレセプターに結合し、幅広いレンジを持つ速度で輸送されると考えられる。

II 文献

- Abe, S., Ota, Y., Koike, S., Kurata, T., Horie, H., Nomura, T., Hashizume, S., and Nomoto, A. (1995a). Neurovirulence test for oral live poliovaccines using poliovirus-sensitive transgenic mice. *Virology* **206**, 1075-1083.
- Abe, S., Ota, Y., Doi, Y., Nomoto, A., Nomura, T., Chumakov, K. M., and Hashizume, S. (1995b). Studies on neurovirulence in poliovirus-sensitive transgenic mice and cynomolgus monkeys for the different temperature-sensitive viruses derived from the Sabin type 3 virus. *Virology* **210**, 160-166.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1993). Cytoplasmic dyncin-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* **123**, 1373-1387.
- Arita, M., Koike, S., Aoki, J., Horie, H., and Nomoto, A. (1998). Interaction of poliovirus with its purified receptor and conformational alteration in the virion. *J. Virol.* **72**, 3578-3586.
- Bauch, A., Campbell, K. S., and Reth, M. (1998). Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca^{2+} / calmodulin-dependent kinase II δ . *Eur. J. Immunol.* **28**, 2167-2177.
- Bodian, D. (1954). Viremia in experimental poliomyelitis. II. Viremia and the mechanism of the "provoking effect" of injections or trauma. *Am. J. Hyg.* **60**, 358-370.

- Bodian, D. (1955). Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science* **122**, 105-108.
- Brady, S. T. (1991). Molecular motors in the nervous system. *Neuron* **7**, 521-533.
- Broadwell R. D., and Balin, B. J. (1985). Endocytic and exocytic pathways of the neuronal secretory process and trans-synaptic transfer of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase *in vivo*. *J. Comp. Neurol.* **242**, 632-650.
- Brown, R. H., Jr., Johnson, D., Ogonowski, M., and Weiner, H. L. (1987). Type 1 human poliovirus binds to human synaptosomes. *Ann. Neurol.* **21**, 64-70.
- Buchner, K., Seitz-Tutter, D., Schonitzer, K., and Weiss, D. G. (1987). A quantitative study of anterograde and retrograde axonal transport of exogenous proteins in olfactory nerve c-fibers. *Neurosci.* **22**, 697-707.
- Campbell, K. S., Cooper, S., Dessing, M., Yates, S., and Buder, A. (1998). Interaction of p59^{lck} kinase with the dynein light chain, Tctex-1, and colocalization during cytokinesis. *J. Immunol.* **161**, 1728-1737.
- Corvera, S., Chawla, A., Chakrabarti, R., Joly, M., Buxton, J., and Czech, M. P. (1994). A double leucine within the GLUT4 glucose transporter COOH-terminal domain functions as an endocytosis signal. *J. Cell Biol.* **126**, 979-989.
- De Sena, J., and Mandel, B. (1976). Studies on the *in vitro* uncoating of poliovirus .
I. Characterization of the modifying factor and the modifying reaction. *Virology* **70**, 470-483.

- De Sena, J., and Mandel, B. (1977). Studies on the *in vitro* uncoating of poliovirus. II. Characteristics of the membrane-modified particle. *Virology* **78**, 554-566.
- DeTulleo, L., and Kirchhausen, T. (1998). The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* **17**, 4585-4593.
- DiStefano, P. S., and Curtis, R. (1994). Receptor mediated retrograde axonal transport of neurotrophic factors is increased after peripheral nerve injury. *Progress in Brain Research*. **103**, 35-42.
- Faussner, A., Proud, D., Towns, M., and Bathon, J. M. (1998). Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **273**, 2617-2623.
- Gonatas, N. K., Harper, C., Mizutani, T., and Gonatas, J. O. (1979). Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 728-734.
- Grimes, M. L., Zhou, J., Beattie, E. C., Yuen, E. C., Hall, D. E., Valletta, J. S., Topp, K. S., LaVail, J. H., Bunnnett, N. W., and Mobley, W. C. (1996). Endocytosis of activated TrkA: Evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* **16**, 7950-7964.
- Gromeier, M., and Wimmer, E. (1998). Mechanism of injury-provoked poliomyelitis. *J. Virol.* **72**, 5056-5060.

- Guttman, N., and Baltimore, D. (1977). A plasma membrane component able to bind and alter virions of poliovirus type 1: studies on cell-free alteration using a simplified assay. *Virology* **82**, 25-36.
- Hirokawa, N., Sato-Yoshitake, R., Yoshida, T., and Kawashima, T. (1990). Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles *in vivo*. *J. Cell Biol.* **111**, 1027-1037.
- Hirokawa, N., Sato-Yoshitake, R., Kobayashi, N., Pfister, K. K., Bloom, G. S., and Brady, S. T. (1991). Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles *in vivo*. *J. Cell Biol.* **114**, 295-302.
- Hirokawa, N., Noda, Y., and Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 60-73.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-526.
- Hogle, J. M., Chow, M., and Filman, D. J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* **229**, 1358-1365.
- Holzbaumer, E. L., and Vallee, R. B. (1994). DYNEINS: molecular structure and cellular function. *Annual Review of Cell Biology*. **10**:339-72.
- Horie, H., Koike, S., Kurata, T., Sato-Yoshida, Y., Ise, I., Ota, Y., Abe, S., Hioki, K.,

Kato, H., Taya, C., Nomura, T., Hashizume, S., Yonekawa, H., and Nomoto, A. (1994). Transgenic mice carrying the human poliovirus receptor: New animal model for study of poliovirus neurovirulence. *J. Virol.* **68**, 681-688.

Howe, H., and Bodian, D. (1942). "Neuronal Mechanisms in Poliomyelitis." Commonwealth Fund, New York, NY, Humphrey Milford, Oxford Univ. Press, London, England.

Jia, Q., Ohka, S., Iwasaki, K., and Nomoto, A. Isolation and molecular characterization of a poliovirus type 1 mutant that replicates in the spinal cord of mice. *J. Virol.* submitted.

Kashiba, H., Senba, E., Kawai, Y., Ueda, Y., and Tohyama, M. (1992). Axonal blockade induces the expression of vasoactive intestinal polypeptide and galanin in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research.* **577**(1), 19-28.

King, S. M., Dillman III, J. F., Benashski, S. E., Lye, R. J., Patel-King, R. S., and Pfister, K. K. (1996). The mouse t-complex-encoded protein Tctex-1 is a light chain of brain cytoplasmic dynein. *J. Biol. Chem.* **271**, 32281-32287.

Kohara, M., Abe, S., Komatsu, T., Tago, K., Arita, M., and Nomoto, A. (1988). A recombinant virus between the Sabin 1 and Sabin 3 vaccine strains of poliovirus as a possible candidate for a new type 3 poliovirus live vaccine strain. *J. Virol.* **62**, 2828-2835.

Koike, S., Horie, H., Ise, I., Okitsu, A., Yoshida, M., Iizuka, N., Takeuchi, K., Takegami, T., and Nomoto, A. (1990). The poliovirus receptor protein is

produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J.* **9**, 3217-3224.

Koike, S., Ise, I., and Nomoto, A. (1991a). Functional domains of the poliovirus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4104-4108.

Koike, S., Taya, C., Kurata, T., Abe, S., Ise, I., Yonekawa, H., and Nomoto, A. (1991b). Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 951-955.

Koike, S., Ise, I., Sato, Y., Mitsui, K., Horie, H., Umeyama, H., and Nomoto, A. (1992). Early events of poliovirus infection. *Seminars in Virology* **3**, 109-115.

Koike, S., Aoki, J., and Nomoto, A. (1994a). Transgenic mouse for the study of poliovirus pathogenicity. In "Cellular Receptors for Animal Viruses" (E. Wimmer, Ed.), pp. 463-480. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Koike, S., Taya, C., Aoki, J., Matsuda, Y., Ise, I., Takeda, H., Matsuzaki, T., Amanuma, H., Yonekawa, H., and Nomoto, A. (1994b). 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.

Kronenberger, P., Schober, D., Prchla, E., Ofori-Anyinam, O., Vrijnsen, R., Rombaut, B., Blaas, D., Fuchs, R., and Boeye, A. (1998). Uptake of poliovirus into the endosomal system of HeLa cells. *Arch. Virol.* **143**, 1417-1424.

- Lader, E., Ha, H. S., O'Neill, M., Artzt, K., and Bennett, D. (1989). *tctx-1*: a candidate gene family for a mouse t complex sterility locus. *Cell* **58**, 969-979.
- Leon-Monzon M. E., Illa, I., and Dalakas, M. C. (1995). Expression of poliovirus receptor in human spinal cord and muscle. *Ann. N Y Acad. Sci.* **753**, 48-57.
- Li, T., Zhang, A., Iizuka, N., Nomoto, A., and Arnold, E. (1992). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of coxsackievirus B1. *J. Mol. Biol.* **223**, 1171-1175.
- Lonberg-Holm, K., Gosser, L. B., and Kauer, J. C. (1975). Early alteration of poliovirus in infected cells and its specific inhibition. *J. Gen. Virol.* **27**, 329-342.
- Madhus, I. H., Olsnes, S., and Sandvig, K. (1984). Mechanism of entry into the cytosol of poliovirus type 1: Requirement for low pH. *J. Cell Biol.* **98**, 1194-1200.
- Madhus, I. H., Sandvig, K., Olsnes, S., and van Deurs, B. (1987). Effect of reduced endocytosis induced by hypotonic shock and potassium depletion on the infection of Hep 2 cells by picornaviruses. *J. Cellular Physiology* **131**, 14-22.
- Mansson, J. E., Olofsson, S. (1983). Binding specificities of the lectins from *Helix pomatia*, soybean and peanut against different glycosphingolipids in liposome membranes. *FEBS letters.* **156**(2), 249-252.

- Mendelsohn, C. L., Wimmer, E., and Racaniello, V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**, 855-865.
- Nagano, F., Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Sakaguchi, G., Maeda, M., Watanabe, T., Kominami, E., Uchiyama, Y., and Takai, Y. (1998). Interaction of Doc2 with tetex-1, a light chain of cytoplasmic dynein. *J. Biol. Chem.* **273**, 30065-30068.
- Nakata, T., Terada, S., and Hirokawa, N. (1998). Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J. Cell Biol.* **140**, 659-674.
- Nathanson, N., and Bodian, D. (1961). Experimental poliomyelitis following intramuscular virus injection. I. The effect of neural block on a neurotropic and a pantropic strain. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **108**, 308-319.
- Nathanson, N., and Langmuir, A. D. (1963). 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.
- Ohka, S., Yang, W. -X., Terada, E., Iwasaki, K., and Nomoto, A. (1998). Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the fast transport system. *Virology* **250**, 67-75.
- Ohka, S., Tsuchida, J., Kato, H., Iwasaki, K., Kuge, S., and Nomoto, A. Poliovirus

receptor-mediated retrograde axonal transport of poliovirus: implication for involvement of microtubules and cytoplasmic dynein. *J. Virol.* to be submitted.

Orita, S., Naito, A., Sakaguchi, G., Maeda, M., Igarashi, H., Sasaki, T., and Takai, Y. (1997). Physical and Functional interactions of Doc2 and Munc13 in Ca^{2+} -dependent exocytotic machinery. *J. Biol. Chem.* **272**, 16081-16084.

Orita, S., Sasaki, T., Komuro, R., Sakaguchi, G., Maeda, M., Igarashi, H., and Takai, Y. (1996). Doc2 enhances Ca^{2+} -dependent exocytosis from PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 7257-7260.

Ren, R., Costantini, F., Gorgacz, E. J., Lee, J. J., and Racaniello, V. R. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: A new model for poliomyelitis. *Cell* **63**, 353-362.

Ren, R., and Racaniello, V. R. (1992). Poliovirus spreads from muscle to the central nervous system by neural pathways. *J. Infect. Dis.* **166**, 747-752.

Riccio, A., Pierchala, B. A., Ciarallo, C. L., and Ginty, D. D. (1997). An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science*. **277**, 1097-1100.

Ross, A. H., Lachyankar, M. B., Poluha, D. K., and Loy, R. (1994). Axonal transport of the trkA high-affinity NGF receptor. *Progress in Brain Research*. **103**, 15-21.

Sabin, A. B., and Boulger, L. R. (1973). History of Sabin attenuated poliovirus oral

live vaccine strains. *J. Biol. Stand.* **1**, 115-118.

Segade, L. A., Suarez Quintanilla, J., Mallo, M., Gomez Segade P. (1991). A comparative study of the transganglionic transport of cholera toxin-horseradish peroxidase (CT-HRP) and wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP) in the trigeminal system of the guinea pig. *Journal fur Hirnforschung*, **32**(2):249-55.

Selinka, H-C., Zibert, A., and Wimmer, E. (1991). Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3598-3602.

Shiroki, K., Ishii, T., Aoki, T., Kobashi, M., Ohka, S., and Nomoto, A. (1995). A new cis-acting element for RNA replication within the 5' noncoding region of poliovirus type 1 RNA. *J. Virol.* **69**, 6825-6832.

Stieber, A., Erulkar, S. D., and Gonatas, N. K. (1989). A hypothesis for the superior sensitivity of wheat germ agglutinin as a neuroanatomical probe. *Brain Research* **495**, 131-139.

Tai, A. W., Chuang, J. -Z., and Sung, C. -H. (1998). Localization of Tctex-1, a cytoplasmic dynein light chain, to the golgi apparatus and evidence for dynein complex heterogeneity. *J. Biol. Chem.* **273**, 19639-19649

Trojanowski, J. Q., Gonatas, J. O., and Gonatas, N. K. (1981). Conjugates of horseradish peroxidase (HRP) with cholera toxin and wheat germ agglutinin are superior to free HRP as orthogradely transported markers. *Brain Res.* **223**, 381-

- Tucker, S. P., Thornton, C. L., Wimmer, E., and Compans, R. W. (1993). Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* **67**, 4274-4282.
- Tyler, K. L., McPhee, D. A., and Fields, B. N. (1986). Distinct pathways of viral spread in the host determined by reovirus S1 gene segment. *Science* **233**, 770-774.
- Vallee, R. B., and Sheetz, M. P. Targeting of motor proteins. (1996) *Science* **271**, 1539-1544.
- van der Want, J. J. L., Klooster, J., Cardozo, B. N., de Weerd, H., and Liem, R. S. B. (1997). Tract-tracing in the nervous system of vertebrates using horseradish peroxidase and its conjugates: tracers, chromogens and stabilization for light and electron microscopy. *Brain Res. Protocols* **1**, 269-279.
- van der Werf, S., Bradley, J., Wimmer, E., Studier, F. W., and Dunn, J. J. (1986). Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2330-2334.
- Warren, R. A., Green, F. A., Stenberg, P. E., and Enns, C. A. (1998). Distinct saturable pathways for the endocytosis of different tyrosine motifs. *J. Biol. Chem.* **273**, 17056-17063.
- Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F. G. (1998). A requirement

for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**, 625-634.

Watanabe, TK., Fujiwara, T., Shimizu, F., Okuno, S., Suzuki, M., Takahashi, E., Nakamura, Y., and Hirai, Y. (1996). Cloning, expression, and mapping of TCTEL1, a putative human homologue of murine *Tctel1*, to 6q. *Cytogenet. Cell Genet.* **73**, 153-156.

Waterman-Storer, C. M., Karki, S. B., Kuznetsov, S. A., Tabb, J. S., Weiss, D. G., Langford, G. M., and Holzbaur, E. L. F. (1997). The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12180-12185.

Willingmann, P., Barnert, H., Zeichhardt, H., and Habermehl, K. -O. (1989). Recovery of structurally intact and infectious poliovirus type 1 from HeLa cells during receptor-mediated endocytosis. *Virology* **168**, 417-420.

Yafal, A. G., Kaplan, G., Racaniello, V. R., and Hogle, J. M. (1993). Characterization of poliovirus conformational alteration mediated by soluble cell receptors. *Virology* **197**, 501-505.

Yang, W. -X., Terasaki, T., Shiroki, K., Ohka, S., Aoki, J., Tanabe, S., Nomura, T., Terada, E., Sugiyama, Y., and Nomoto, A. (1997). Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology* **229**, 421-428.

Zeichhardt, H., Wetz, K., Willingmann, P., and Habermehl, K. O. (1985). Entry of

poliovirus type 1 and mouse elberfeld (ME) virus into HEp-2 cells: Receptor-mediated endocytosis and endosomal or lysosomal uncoating. *J. Gen. Virol.* **66**, 483-492.

Zhuo, H., Lewin, A. C., Phillips, E. T., Sinclair, C. M., and Helke, C. J. (1995). Inhibition of axoplasmic transport in the rat vagus nerve alters the numbers of neuropeptide and tyrosine hydroxylase messenger RNA-containing and immunoreactive visceral afferent neurons of the nodose ganglion. *Neuroscience*

III 謝辞

最初に、野本明男先生に心からの感謝とお礼を申し上げます。野本明男先生には、御多忙中、私のつたない英語で書かれた投稿論文を完璧な原稿に直していただいたり、さらにいろいろとこと細かく御指導いただき、素晴らしい研究の場をお与えくださいましたことを心から感謝いたします。また、今のところ結果には結びついていませんが、電子顕微鏡の技術に関して、懇切丁寧に教えていただきました鈴木えみ子先生、廣澤一成先生には大変お世話になり、どうもありがとうございます。また、大変なマウスの管理をしてくださっている技官の岩崎国子さん、日々の実験を支えてくださっている技官の佐々木ゆかりさんや非常勤の吉田ひろさん、吉村加代子さん、投稿論文の原稿を仕上げてくださいました秘書の鈴木悦子さん、岡田真紀さん、私にはよくわからない解剖学的なことやマウスの技術に関して、坐骨神経の所在から教えてくださった楊維興さん、賈慶梅さん、有意義な助言をくださった白木和子先生、久下周佐先生、鴨下信彦先生、本研究部の方々に、深く感謝いたします。また、マウスの供給をしてくださりました、北里大学理学部実験動物の故 寺田英司先生、実験動物中央研究所の野村達次先生に、心からの謝辞を申し上げます。

財政面で援助してくださいました日本育英会には、安心して研究できる環境を与えていただいたことを、医科学研究所には、国際学会に参加する貴重な機会をお与えくださいましたことを、中山報恩会の皆様には、ここまでずっと支えてくださいましたことを、本当に心から感謝いたします。また、全国の皆様方のおかげでここまで自由に研究ができたことを省み、これから少しでも人々のお役に立てる研究をすることで恩返しをしていきたいと考えています。

最後に、近くでいつも見守ってくれ、大きな犠牲を払いつつ私を支え続けてくれた両親にもお礼を述べます。

皆様、本当にどうもありがとうございました。

1999年1月

大岡静衣

