

狂犬病ウイルスの中樞神経侵入機序
に関する研究

2013 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(岐阜大学)

山岡 理子

目次

緒言	1
第1章 西ヶ原株と Ni-CE 株の中樞神経侵入性の違いに関連 するウイルス遺伝子の同定	6
序論	7
材料及び方法	8
培養細胞及びウイルス	8
フォーカス・アッセイ	8
マウスに対する各株の病原性の検討	9
結果	11
脳内接種及び筋肉内接種によるマウスに対する 西ヶ原株及び Ni-CE 株の病原性の評価	11
西ヶ原株と Ni-CE 株の中樞神経侵入性の違いに関連する ウイルス遺伝子の同定	11
考察	13
図表	16
第2章 西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の体内分布 ならびに末梢神経への感染能における P 蛋白質の役割	23
序論	24
材料及び方法	25

培養細胞及びウイルス	25
緑色蛍光蛋白質 (GFP) 発現組換えウイルス株の作出	25
感染マウスの各組織からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成	27
Nested PCR	28
マイクロ流体プラットフォームを用いた神経細胞分離培養系の構築	29
マウス初代培養運動神経細胞の分離及びプラットフォームへの播種	30
神経細胞の軸索末端への Ni-CE-GFP 株及び CE(NiP)-GFP 株の接種、 ならびにウイルス感染能の検討	31
神経細胞分離培養系を用いたウイルスの軸索輸送効率の検討	31
NA 細胞へのウイルス侵入効率の検討	32
結果	33
RT-nested PCR のウイルス遺伝子検出感度の検討	33
感染マウス体内における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の分布	33
神経細胞分離培養系を用いた	
神経細胞軸索末端からのウイルス感染能の検討	34
神経細胞分離培養系を用いたウイルスの軸索輸送効率の検討	35
NA 細胞への Ni-CE 株及び CE(NiP)株の侵入効率の比較	35
考察	36
図表	38
第 3 章 筋肉細胞における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の 増殖性の検討	49

序論	50
材料及び方法	51
培養細胞及びウイルス	51
ホタル・ルシフェラーゼ (Luc) 発現組換えウイルス株の作出	51
ルシフェラーゼ・アッセイによる	
各種培養筋肉細胞における各株の増殖性の比較	53
G-8 細胞における各株の感染性ウイルス産生能の比較	54
ルシフェラーゼ・アッセイによる	
マウス筋肉における各株の増殖性の比較	54
結果	55
培養筋肉細胞における西ヶ原-Luc 株、Ni-CE-Luc 株	
及び CE(NiP)-Luc 株の増殖性の比較	55
G-8 細胞における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の	
感染性ウイルス産生能の比較	55
マウス筋肉における西ヶ原-Luc 株、Ni-CE-Luc 株	
及び CE(NiP)-Luc 株の増殖性の比較	56
考察	57
図表	60
第 4 章 筋肉細胞における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の	
IFN 産生抑制能の検討	65
序論	66

材料及び方法	67
培養細胞及びウイルス	67
感染細胞からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成	67
感染マウス大腿筋からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成	67
リアルタイム PCR	68
結果	70
西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を感染させた	
培養筋肉細胞における <i>Ifn-β</i> 遺伝子発現量の比較	70
西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を感染させた	
培養筋肉細胞における <i>Mx1</i> 及び <i>Oas1</i> 遺伝子発現量の比較	70
西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を感染させた	
マウス大腿筋における <i>Ifn-β</i> 遺伝子発現量の比較	71
考察	72
図	75
結論	79
図	81
謝辞	82
引用文献	83

緒言

狂犬病は、重篤な神経症状を主徴とするウイルス性人獣共通感染症である。本病は、日本、オセアニア及びスカンジナビア半島などの一部地域を除く全世界に広く分布しており、その死者数はアジア、アフリカなどの発展途上国を中心に、年間 55,000 人以上と推定されている (58)。本病の病原体は、ラブドウイルス科リッサウイルス属に属する狂犬病ウイルスである。本ウイルスは、高い神経親和性と広い宿主域を持ち、ヒトを含めた全ての哺乳類に感染すると考えられている。通常、発症動物の唾液中に存在するウイルスが咬傷を介して創傷感染することにより、ウイルスの伝播が成立する。体内に侵入したウイルスは末梢神経細胞の軸索末端に感染し、神経細胞体に向かって軸索を逆行性に上行する。やがてウイルスは中枢神経系に到達し、同部位での感染拡大の結果、重篤な神経症状を特徴とする脳炎を引き起こす。感染から発症までの潜伏期間は長く不定で、20～90 日(ヒトでは平均 1 ヶ月)であると報告されている (21)。狂犬病に対する治療法は未だ確立されておらず、本病を発症したヒト及び動物は、ほぼ 100%死亡する。

幸いなことに、狂犬病はワクチン接種によって効果的に予防することが可能である。現在、ウイルスの暴露を受けるリスクの高いヒトや、ヒトへの主要な媒介動物であるイヌなどに対しては、組織培養由来不活化ワクチンを用いた予防接種が実施されている。さらに、感染動物からの咬傷などによりウイルス暴露を受けた後でも、ワクチン接種を適切に行えば、本病の発症をほぼ確実に阻止することが可能である。このような、狂犬病ウイルスに感染した可能性のあるヒトを対象としたワクチン接種は暴露後免疫といわれる。本免疫法は、ウイルス暴露を受けた場合に選択出来る唯一の狂犬病発症予防法であり、発展途上

国を中心に、世界で年間約 1500 万人が暴露後免疫を受けているとされる (59)。

狂犬病の発症予防法として、暴露後免疫の高い有効性が認められている一方で、本法にはいくつかの問題点が存在する。例えば、本法は、潜伏期間中に十分な防御免疫を誘導することで発症を予防する方法であるため、その有効性を発揮させるためには、感染直後からの集中的なワクチン接種が必要となる。WHO は、暴露後免疫のスケジュールとして、暴露後 0、3、7、14 及び 28 日目の計 5 回にわたるワクチン接種を推奨している (58)。しかしながら、狂犬病の主な流行国であるアジア、アフリカなどの発展途上国においては、高価なワクチンを頻回接種する本法の経済的負担は非常に大きいことから、その普及が困難となっている (8)。また、発展途上国では、一般的に暴露後免疫で用いられる組織培養由来不活化ワクチンではなく、より安価な動物脳由来ワクチンが使用される事例も多く、脳組織由来の不純物に対して産生された抗体を原因とする多発性神経炎や脱髄性脳炎などの重篤な副作用が問題となっている (7, 8, 58)。さらに、非常に稀ではあるものの、暴露後免疫が無効となったヒトの事例も報告されている (53)。以上のことから、現行の暴露後免疫に替わる、より安価で有効な暴露後発症予防法の開発は、狂犬病の制圧を考える上で重要な課題であるといえる。

前述のように、狂犬病ウイルスが感染動物に致死性脳炎を引き起こすには、感染部位である末梢組織からの中樞神経系へのウイルス侵入が必須となる。したがって、本ウイルスの中樞神経系への侵入を阻害する処置あるいは薬物が開発されれば、新たな暴露後発症予防法に応用できる可能性がある。そのような処置及び薬物開発のためには、狂犬病ウイルスが体内に侵入してから中樞神経系へ到達する機序、いわゆる本ウイルスの中樞神経侵入機序の詳細を理解することが不可欠である。

しかしながら、狂犬病ウイルスの中樞神経侵入機序に関しては、未だに不明な点が多い。特に、ウイルスが神経系へ侵入する最初のステップである末梢神経への感染機序については、極めて情報が少ない。例えば、非神経系末梢組織における狂犬病ウイルスの増殖が、末梢神経への感染に重要であるかについては未解決のままである。これまでに、狂犬病ウイルス街上毒（野外流行株）または固定毒（街上毒を連続継代することで得られたワクチン株・実験室株）を筋肉内接種した動物の病理組織学的解析が行われ、ウイルス抗原が神経系に先立って筋肉細胞から検出されることが報告されている（12, 13, 39, 40）。このことは、筋肉細胞におけるウイルス増殖が、末梢神経への感染に重要である可能性を示している。一方で、筋肉内接種したウイルスが非神経系末梢組織で増殖することなく、直接的に末梢神経へ感染していることを示唆する成績も報告されている（15, 48, 57）。このように、末梢神経へのウイルス感染における筋肉細胞でのウイルス増殖の重要性については結論が出ておらず、意見が分かれている。

狂犬病ウイルスの粒子は、全長約 12,000 塩基のマイナス鎖一本鎖 RNA のゲノムと、5 種類の構造蛋白質（N、P、M、G 及び L 蛋白質）で構成される。その構造は、ウイルスゲノム RNA と N、P 及び L 蛋白質で構成されるヌクレオカプシドと、宿主由来の脂質二重膜、M 及び G 蛋白質で構成されるエンベロープに区別される。N 蛋白質は、ゲノム RNA を包み込む形でヌクレオカプシドの形成に関与する。P 蛋白質は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能する L 蛋白質の共因子として、ウイルスゲノム RNA の転写及び複製を担当する。また、P 蛋白質は、インターフェロン（IFN）アンタゴニストとしての機能も有しており、IFN 産生及び応答経路の阻害に関与することが知られている（5, 9, 10, 19, 38, 45, 54, 55）。M 蛋白質は、ウイルスの粒子形成及び感染細胞からの出芽に重

要な役割を果たす。ウイルス粒子表面にスパイク状に突出する G 蛋白質は、宿主細胞の受容体との結合に必須の蛋白質である (60)。

これら 5 種類の蛋白質のうち、G 蛋白質は、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性を決定する重要なウイルス因子であることが明らかにされている。以前、Préhaud ら (42) は、G 蛋白質 147 位のアミノ酸がリジンからグルタミンに変異したウイルス株をマウスに筋肉内接種し、変異株接種マウスの発症率が親株接種マウスに比べて著しく低くなることを示した。また、Mazarakis ら (33) 及び Mentis ら (34) は、狂犬病ウイルス G 蛋白質をシュードタイプしたレンチウイルス・ベクターが、筋肉内接種によって中枢神経系に到達することを明らかにし、末梢神経及び中枢神経系へのウイルス侵入に G 蛋白質が関与することを示した。上記の報告に加え、これまでに、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性への G 蛋白質の関与を示唆する成績が多数報告されている (16, 37, 43, 56, 62)。

一方で、G 蛋白質以外のウイルス蛋白質も、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性に関与すると考えられている。以前、Pulmanausahakul ら (43) は、筋肉内接種により高率にマウスを発症させる強毒の狂犬病ウイルス SB 株と、弱毒の SN 株を用いた解析によって、中枢神経侵入性に関連するウイルス遺伝子の同定を試みた。上記の 2 親株と、SN 株の G 遺伝子を SB 株由来の G 遺伝子で置換したキメラウイルスをマウスに筋肉内接種し、各株接種マウスの発症率を比較した結果、同キメラウイルス接種マウスの発症率は SN 株接種マウスよりも高いものの、SB 株接種マウスに比べて低いことが明らかになった。この結果は、SB 株の中枢神経侵入性を決定するウイルス因子が G 蛋白質のみではないことを示している。実際、SB 株の中枢神経侵入性において M 及び L 遺伝子が補助的な役割を担っていることが明らかにされている (16, 43)。しかしながら、狂

犬病ウイルスの中枢神経侵入機序における G 蛋白質以外のウイルス因子の役割は、十分に解明されていない。

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株は、脳内接種によりマウスに致死感染を引き起こす。一方、西ヶ原株を鶏胚線維芽細胞で 100 代継代することによって確立された Ni-CE 株は、脳内接種によりマウスに一過性の体重減少を特徴とする非致死感染を引き起こす (49)。このように、両株のマウスに対する致死性には違いがあるものの、脳内接種の場合では、両株ともにマウスを発症させる。興味深いことに、筋肉内接種の場合では、西ヶ原株感染マウスが脳内接種時と同様に神経症状を示して死亡するのに対し、Ni-CE 株感染マウスは全く症状を示さない。このことは、両株の中枢神経侵入性に明瞭な違いがあることを示している。しかしながら、その機序は不明である。

そこで本研究では、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入機序の解明を目標とし、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに関する機序を明らかにすることを目的とした。第 1 章では、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに関連するウイルス遺伝子を同定する目的で、Ni-CE 株の遺伝子を西ヶ原株由来の遺伝子で 1 つずつ置換したキメラウイルスをマウスに筋肉内接種し、各感染マウス群の発症率を比較した。その結果、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株由来の P 遺伝子を持つキメラウイルス CE(NiP)株が高率にマウスを発症させたことから、両株の中枢神経侵入性の違いには P 遺伝子が主要に関連することが明らかとなった。第 2 章では、感染マウス体内における上記 3 株の分布を比較し、さらに Ni-CE 株及び CE(NiP)株について末梢神経への感染能を検討した。第 3 章及び第 4 章では、筋肉細胞における各株の増殖性及び IFN 産生抑制能を、それぞれ *in vitro* と *in vivo* で検討した。

第 1 章

西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに関連する

ウイルス遺伝子の同定

序論

狂犬病ウイルスは、感染部位である末梢組織から中枢神経系へ侵入した後に、感染動物を発症させる。したがって、狂犬病の発症機序を解明するためには、本ウイルスの中枢神経侵入機序を理解することが必須となる。しかしながら、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性については、極めて情報が少ない。これまでの報告により、本ウイルスの中枢神経侵入性には G 蛋白質が関与していることが示されているものの (16, 33, 34, 37, 42, 43, 56, 62)、その他のウイルス因子の関与について、その詳細は未だに不明である。

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株、ならびに同株の鶏胚線維芽細胞馴化株である Ni-CE 株は、両株とも脳内接種によりマウスを発症させる (49)。一方、両株を筋肉内接種した場合、西ヶ原株はマウスを発症させるのに対し、Ni-CE 株は発症させない。すなわち、両株の中枢神経侵入性には明瞭な違いが認められる。

そこで第 1 章では、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに関する機序解明の手がかりを得るため、両株の中枢神経侵入性の違いに関連するウイルス遺伝子の同定を試みた。

材料及び方法

培養細胞及びウイルス

マウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞 (47) を、CO₂ インキュベーター (ヒラサワ) 内で培養した (37°C、設定 CO₂ 濃度 : 5%)。NA 細胞の増殖用培地 (GM) として、10%ウシ胎仔血清 (FCS) (製品番号: 2917354、MP Biomedicals) 添加イーグル MEM 培地 (E-MEM) (製品番号: 05900、日水) を用いた。

本研究では、以前の研究において作出された組換え西ヶ原株及び組換え Ni-CE 株を使用した (49, 61)。Ni-CE 株の N、P、M、G、あるいは L 遺伝子を西ヶ原株由来のそれぞれの遺伝子で置換した 5 種類のキメラウイルス [それぞれ CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株及び CE(NiL)株] は、Shimizu ら (49) によって作出された (図 1-1)。また、西ヶ原株の P 遺伝子を Ni-CE 株由来の P 遺伝子で置換したキメラウイルス Ni(CEP)株は、Mita ら (36) によって作出された (図 1-1)。接着性細胞フラスコ (25cm²、製品番号: 690975、Greiner Bio-One) に培養した NA 細胞に、これらのウイルスを感染多重度 (MOI: 1 つの細胞に感染するウイルスの感染単位) =0.01 で接種した。接種後 5~6 日目の培養液を 1,580 × g・10 分間の条件で遠心し、その培養上清をストックウイルスとし、-80°C で保存した。後述のフォーカス・アッセイにより、各ウイルスの感染価を測定した。

フォーカス・アッセイ

組織培養プレート (24 ウェル、製品番号: 662160、Greiner bio-one) 上に培養した NA 細胞を用いて、各ウイルス感染価の測定を行った。5%FCS 添加 E-MEM によって 10 倍段階希釈した各ウイルス液を、1 ウェルあたり 0.1 ml ずつ NA 細胞

に接種し、37°Cで1時間吸着させた。ハンクス液（製品番号: 05905、日水）で細胞を洗浄したのち、0.5%メチルセルロース（製品番号: 22224-55、ナカライテスク）含有E-MEMを各ウェルに0.5 ml加え、CO₂インキュベーター内で培養した（37°C、設定CO₂濃度：5%）。接種後2日目に4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（製品番号: 163-20145、和光純薬）で細胞を1時間固定した後、100%メタノール（製品番号: 134-01833、和光純薬）を用いて膜透過処理を1分間行った。間接蛍光抗体法（IFA）により感染細胞を染色し、各ウェルのフォーカス（蛍光シグナルを示すウイルス感染細胞が凝集するスポット）数に基づきウイルス感染価を算出した。なお、IFAには一次抗体として抗狂犬病ウイルスN蛋白質モノクローナル抗体13-27（35）を、二次抗体としてフルオロセイン・イソチオシアネート（FITC）標識抗マウスIgG（製品番号: 55514、Cappel）を用いた。フォーカスの観察にはAxiovert200顕微鏡（Carl Zeiss Microscopy Co., Ltd.）を用いた。

マウスに対する各株の病原性の検討

本研究では、全ての動物実験において ddY マウス（4 週齢、雌、日本 SLC）を用いた。1 群あたり 5 匹のマウスに、 1×10^6 フォーカス形成単位（FFU）の西ヶ原株または Ni-CE 株を含むウイルス液 0.03 ml を脳内接種した。また、1 群あたり 5 匹のマウスの左側大腿筋に、 1×10^6 FFU の西ヶ原株、Ni-CE 株、CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株、または CE(NiL)株を含むウイルス液 0.1 ml を筋肉内接種した。別の実験では、1 群あたり 20 匹のマウスの左側大腿筋に、 1×10^6 FFU の Ni-CE 株または CE(NiP)株を筋肉内接種した。各接種実験では、陰性対照として、ウイルス希釈液（5%FCS 添加 E-MEM）のみを接種した非感染マウスを用いた。感染マウス及び非感染マウスについては、

体重及び症状の推移を 14 日間観察した。マウスの症状を「正常」、「体重減少（観察時点までに確認された体重の最大値から 5%の減少）」、「軽度の神経症状（よろめき、または片後肢の運動障害）」、「重度の神経症状（沈鬱、または両後肢の運動障害）」及び「死亡」の 5 つに分類して評価した。なお、発症が確認されたマウスのうち、観察時点までに確認された体重の最小値から 5%の体重増加が認められ、且つ神経症状を示していない個体については回復したとみなし、「正常」と判定した。感染マウスの発症率は、観察終了日までに、体重減少、または体重減少及び神経症状を示したマウスの匹数をもとに算出した。なお、立ち直り反射の消失(仰向けにした状態から 10 秒以内に体勢を立て直すことができない)が認められたマウスについては人道的エンドポイント適用の対象とし、頸椎脱臼による安楽殺を行った。本動物実験は、予め、岐阜大学動物実験委員会によって承認された（実験承認番号：10086）。

結果

脳内接種及び筋肉内接種によるマウスに対する西ヶ原株及び Ni-CE 株の病原性の評価

西ヶ原株及び Ni-CE 株の中枢神経侵入性を検討する目的で、脳内接種及び筋肉内接種により、マウスに対する両株の病原性を評価した (図 1-2 及び 1-3)。脳内接種では、西ヶ原株を接種した全てのマウスが体重減少及び神経症状を示し、接種後 6 日目までに死亡した (図 1-2A 及び 1-3A)。また、Ni-CE 株接種群では、5 匹中 1 匹のマウスが軽度の神経症状を示したことに加え、全ての個体に一過性の体重減少が認められた。このことから、両株とも脳神経に感染してマウスを発症させる能力を有していることが示された。筋肉内接種では、全ての西ヶ原株感染マウスが脳内接種時と同様に体重減少及び神経症状を示し、接種後 7 日目までに死亡した (図 1-2B 及び 1-3B)。一方、Ni-CE 株感染マウスは全て無症状であり、同株接種マウスの体重は、非感染マウスの体重と同様に観察期間を通じて増加した。以上のことから、西ヶ原株の中枢神経侵入性は Ni-CE 株に比べて高いことが示唆された。

西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに関連するウイルス遺伝子の同定

西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いにどのウイルス遺伝子が関連しているのかを検討する目的で、Ni-CE 株の遺伝子を西ヶ原株由来の遺伝子で 1 つずつ置換したキメラウイルス [CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株及び CE(NiL)株] (図 1-1) をマウス的大腿筋に接種し、各株接種マウス群の体重及び症状推移を比較した (図 1-4 及び 1-5)。CE(NiM)株及び

CE(NiL)株接種群では、Ni-CE 株接種群と同様、いずれの個体も症状を示さなかった。一方、CE(NiN)株及び CE(NiG)株接種群では 5 匹中 2 匹が体重減少及び神経症状を示し、そのうち 1 匹の CE(NiG)株感染マウスを除く全ての発症マウスが死亡した。さらに、CE(NiP)株接種群では、接種後 5~12 日目に 5 匹中 4 匹が体重減少及び神経症状を示し、接種後 13 日目までに全ての発症した個体が死亡した。同様の接種実験を繰り返し行った結果、CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株及び CE(NiL)株接種群の発症率はそれぞれ、20%、80%、0%、0%及び 0%であった（表 1-1）。以上の結果から、これらキメラウイルスのマウスへの筋肉内接種において、CE(NiP)株接種群の発症率が最も高いことが示された。さらに、Ni-CE 株及び CE(NiP)株について、1 群あたり 20 匹のマウスを用いて、両株接種群の発症率を比較した。その結果、Ni-CE 株を接種した全てのマウスが観察期間を通じて無症状のまま経過し、発症率 0%であったのに対して、CE(NiP)株接種群では 75%（20 匹中 15 匹）のマウスが神経症状を示した後に死亡した（表 1-1）。以上、独立した 3 回の接種実験により、CE(NiP)株を筋肉内接種したマウスが高い発症率を示すことが確認された。

次に、西ヶ原株の中枢神経侵入性における P 遺伝子の関連性をさらに詳細に検討する目的で、西ヶ原株の P 遺伝子を Ni-CE 株の P 遺伝子で置換した Ni(CEP)株、または西ヶ原株をマウスに筋肉内接種し、両株接種群の症状推移を比較した（図 1-6）。西ヶ原株接種群では、全てのマウスが接種後 4 日目に発症し、接種後 8 日目までに死亡した。一方、Ni(CEP)株を接種したマウスは、5 匹中 4 匹が接種後 5 日目に、1 匹が接種後 6 日目に発症し、全個体が接種後 9 日目までに死亡した。西ヶ原株接種群の発症日の平均が接種後 4 日目であったのに対し、Ni(CEP)株接種群の発症日の平均は接種後 5.2 日目であった。以上より、Ni(CEP)株接種マウスでは、西ヶ原株接種マウスよりも発症が遅くなる傾向が認められた。

考察

狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性には、G 蛋白質が関与していることが報告されている (16, 33, 34, 37, 42, 43, 56, 62)。一方で、G 蛋白質以外のウイルス因子もまた、本ウイルスの中枢神経侵入性に関与すると考えられている (16, 37, 43, 56, 62)。これまでに、本ウイルスの中枢神経侵入性における M 及び L 遺伝子の補助的な役割が報告されているが (16, 43)、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入機序における G 蛋白質以外のウイルス因子の役割は、十分に解明されていない。本章では、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに関連するウイルス遺伝子を同定する目的で、Ni-CE 株の遺伝子を西ヶ原株由来の遺伝子で 1 つずつ置換したキメラウイルスをマウスに筋肉内接種し、各株接種マウス群の発症率を比較した。その結果、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株の P 遺伝子を保有する CE(NiP)株接種群において、Ni-CE 株接種群よりも、感染マウスの発症率が著しく高くなることが示された (表 1-1)。さらに、西ヶ原株のゲノムに Ni-CE 株の P 遺伝子を保有する Ni(CEP)株を接種したマウスでは、西ヶ原株を接種したマウスよりも、発症が遅くなる傾向が認められた (図 1-6)。以上より、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに P 遺伝子に関連することが示された。

上記の結果より、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いには P 蛋白質が関与すると考えられた。狂犬病ウイルス P 蛋白質は、297 アミノ酸で構成される構造蛋白質であり、他のウイルス蛋白質及び宿主因子と相互作用することにより様々なウイルスの機能に関与することが知られている (60)。例えば、P 蛋白質は N 及び L 蛋白質とそれぞれ複合体を形成し、ウイルスゲノム RNA の転写及び複製を担当する (14, 17, 32)。さらに、P 蛋白質はその C 末端上に宿主の自然免疫関連因子との結合領域を有しており、ウイルスが宿主免疫を回避

するための機能も担っている (5, 10, 45, 54)。

一方、本章にて中枢神経侵入性に違いが認められた西ヶ原株及び Ni-CE 株 P 蛋白質の間には、5 つのアミノ酸置換が存在する (49)。すなわち、西ヶ原株 P 蛋白質の 56 位、58 位及び 66 位はロイシンであり、81 位及び 226 位はそれぞれフェニルアラニン及びアスパラギンであるのに対し、Ni-CE 株 P 蛋白質の 56 位、58 位、66 位及び 81 位は全てプロリンに置換され、226 位はヒスチジンに変異している。したがって、これらの変異アミノ酸のいずれか、もしくは組み合わせが、Ni-CE 株 P 蛋白質の機能を変化させ、Ni-CE 株の中枢神経侵入性に影響を与えたと考えられた。

CE(NiP)株及び Ni(CEP)株を用いたマウスへの接種実験の結果より、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに P 遺伝子が関連することが判明した。しかしながら、CE(NiP)株を接種したマウスの発症率は、西ヶ原株接種群よりも低かった (表 1-1)。さらに、Ni(CEP)株を接種したマウスでは、西ヶ原株接種群と比較して発症が遅くなる傾向は認められたものの、全ての個体が神経症状を示して死亡した (図 1-6)。したがって、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いには、P 遺伝子だけではなく、その他のウイルス遺伝子も関連することが明らかとなった。実際に、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株の N または G 遺伝子を保有する CE(NiN)株または CE(NiG)株も、筋肉内接種により、それぞれ、20~40%または 0~20%のマウスを発症させることが示された (表 1-1)。このことは、P 遺伝子に加えて、N 及び G 遺伝子も西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに関連していることを示している。これまでにも、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性には複数の遺伝子が関連することが報告されている (16, 37, 43, 56, 62)。以上のことから、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性は複雑な機序によって決定されると考えられた。

第 1 章では、キメラウイルスを用いたマウスへの接種実験により、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに関連するウイルス遺伝子の同定を試みた。その結果、両株の中枢神経侵入性の違いには P 遺伝子が主要に関連していることが明らかとなった。本章では、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性に P 遺伝子に関連することを初めて示すことができた。

表 1-1 西ヶ原株、Ni-CE 株、または各キメラウイルス株を筋肉内接種されたマウスの発症率 (%)

株	実験 1 ^a	実験 2 ^a	実験 3 ^b
西ヶ原	100 (5/5)	100 (5/5)	—
Ni-CE	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/20)
CE(NiN)	40 (2/5)	20 (1/5)	—
CE(NiP)	80 (4/5)	80 (4/5)	75 (15/20)
CE(NiM)	0 (0/5)	0 (0/5)	—
CE(NiG)	40 (2/5)	0 (0/5)	—
CE(NiL)	0 (0/5)	0 (0/5)	—

^a 1 群あたり 5 匹のマウスに対し、 1×10^6 FFU の各株を筋肉内接種した

^b 1 群あたり 20 匹のマウスに対し、 1×10^6 FFU の Ni-CE 株、または CE(NiP) 株を筋肉内接種した

—: 検討せず

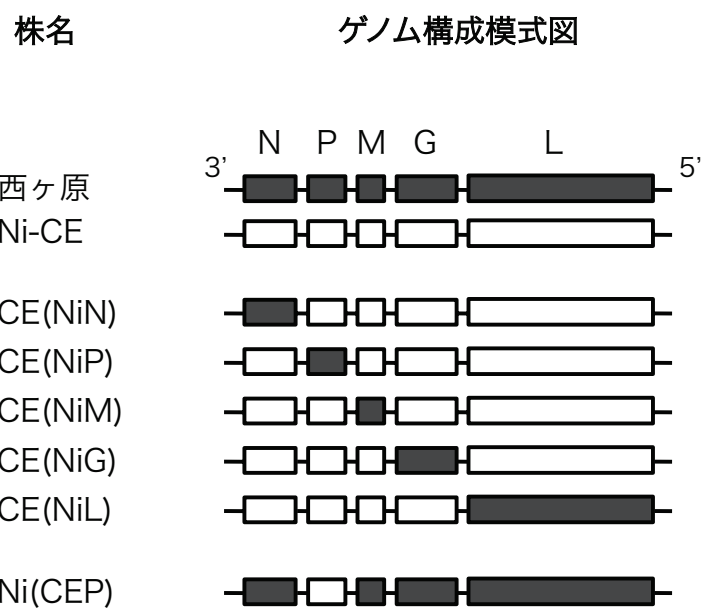


図1-1 西ヶ原株、Ni-CE株及び各種キメラウイルスのゲノム構成模式図

黒色は西ヶ原株由来の遺伝子、白色はNi-CE株由来の遺伝子であることを示す。

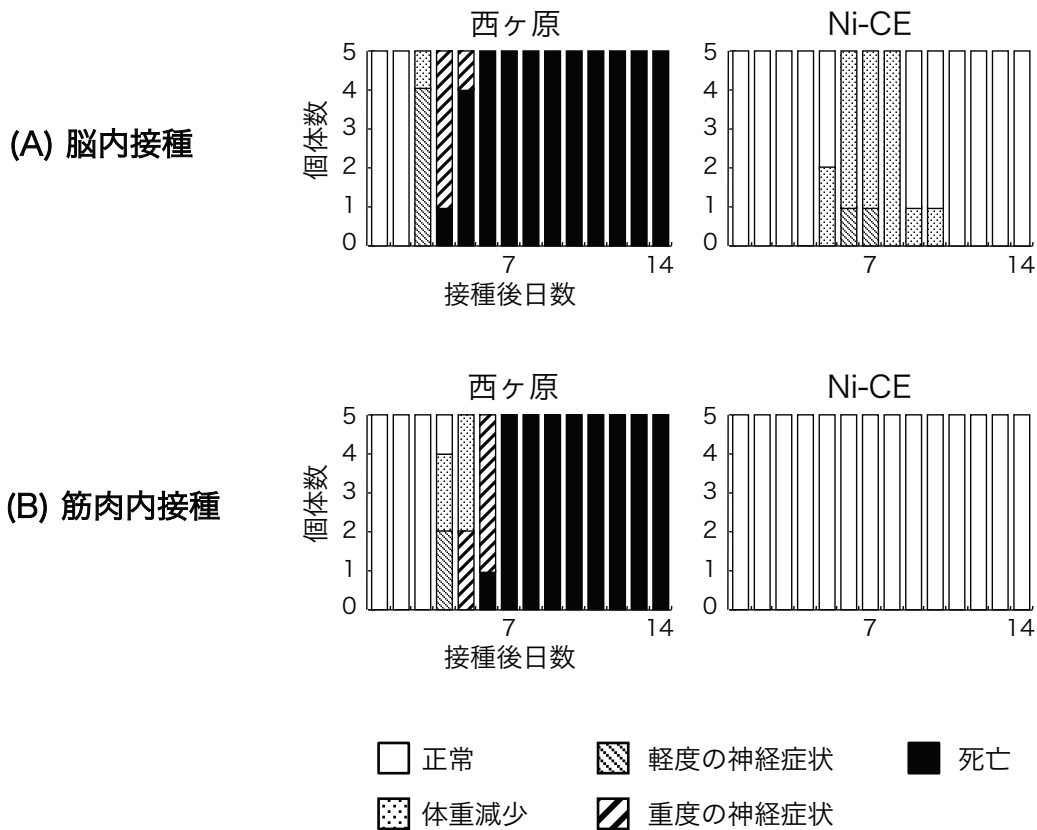


図1-2 西ヶ原株またはNi-CE株を(A)脳内接種されたマウス及び(B)筋肉内接種されたマウスの症状推移

1×10⁶ FFUの西ヶ原株またはNi-CE株を、5匹/群の4週齢マウス (ddY系統、雌)に (A) 脳内接種、または(B) 筋肉内接種した。接種後14日間における各株感染マウスの症状を観察した。感染マウスの症状を「正常」、「体重減少 (観察時点までに確認された体重の最大値から5%の減少)」、「軽度の神経症状 (よるめき、または片後肢の運動障害)」、「重度の神経症状 (沈鬱、または両後肢の運動障害)」、及び「死亡」の5つに分類した。なお、同日に複数の症状が認められた場合、グラフには重症度の高い症状を優先して示した。

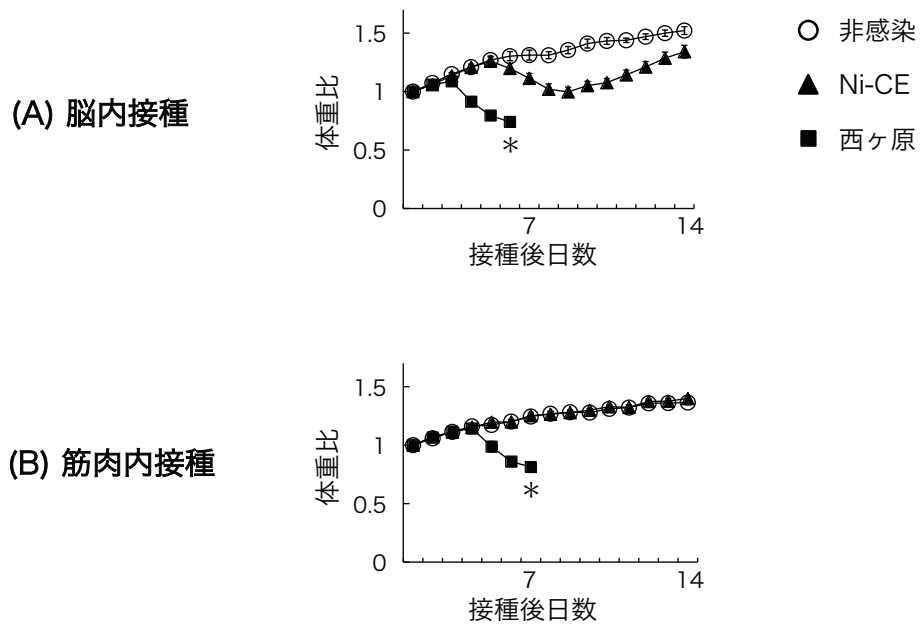


図1-3 西ヶ原株またはNi-CE株を(A)脳内接種されたマウス及び(B)筋肉内接種されたマウスの体重推移

1×10⁶ FFUの西ヶ原株またはNi-CE株を、5匹/群の4週齢マウス (ddY系統、雌) に (A) 脳内接種、または(B) 筋肉内接種した。接種後14日間における各株感染マウスの体重を記録した。体重は、接種日の体重を1とした体重比を示した。ウイルス希釈液のみを接種したマウスを非感染マウスとした。エラーバーは標準誤差を示す。*: 全個体が死亡

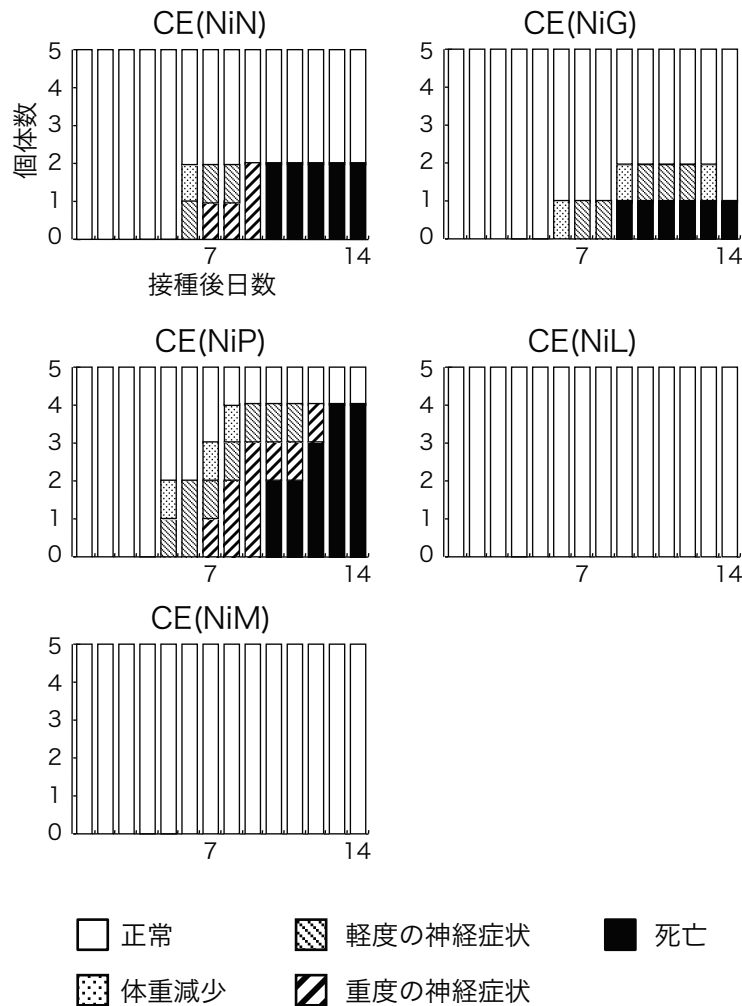


図1-4 5種類の各キメラウイルスを筋肉内接種されたマウスの症状推移

Ni-CE株の遺伝子を西ヶ原株由来の遺伝子で1つずつ置換した5種類のキメラウイルス[CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株及びCE(NiL)株]を、5匹/群の4週齢マウス (ddY系統、雌)の左側大腿筋に 1×10^6 FFU筋肉内接種した。接種後14日間における各株感染マウスの症状を観察した。感染マウスの症状を「正常」、「体重減少 (観察時点までに確認された体重の最大値から5%の減少)」、「軽度の神経症状 (よるめき、または片後肢の運動障害)」、「重度の神経症状 (沈鬱、または両後肢の運動障害)」、及び「死亡」の5つに分類した。なお、同日に複数の症状が認められた場合、グラフには重症度の高い症状を優先して示した。

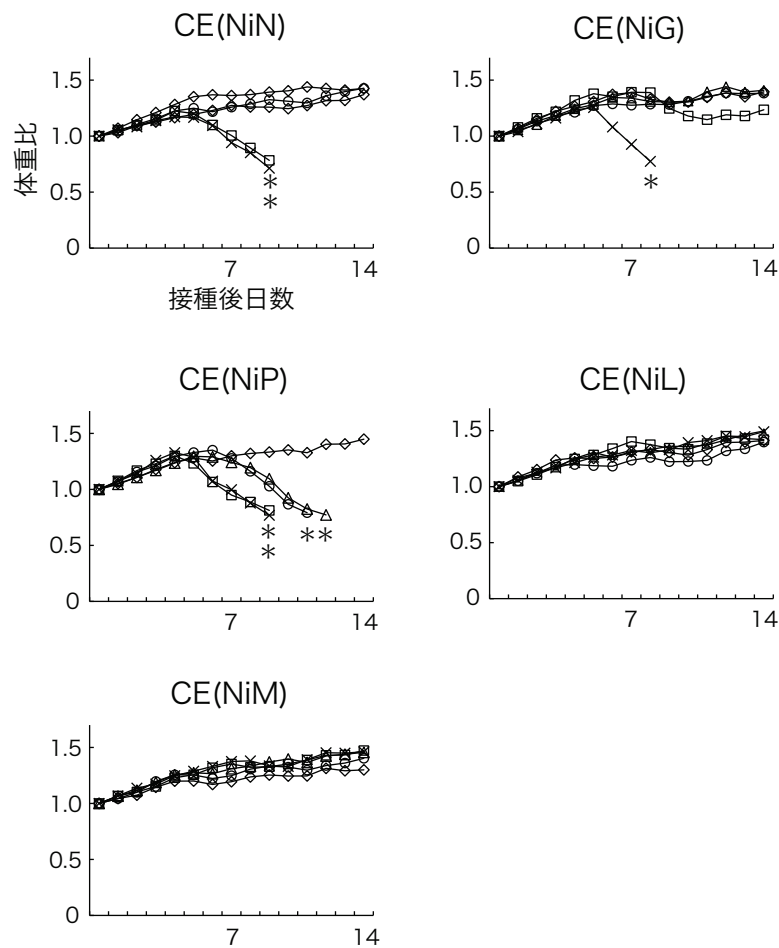


図1-5 5種類の各キメラウイルスを筋肉内接種されたマウスの個体別体重推移

Ni-CE株の遺伝子を西ヶ原株由来の遺伝子で1つずつ置換した5種類のキメラウイルス[CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株及びCE(NiL)株]を、5匹/群の4週齢マウス (ddY系統、雌) の左側大腿筋に 1×10^6 FFU筋肉内接種した。接種後14日間における各株感染マウスの体重を記録した。体重は、接種日の体重を1とした体重比を示した。*: 死亡

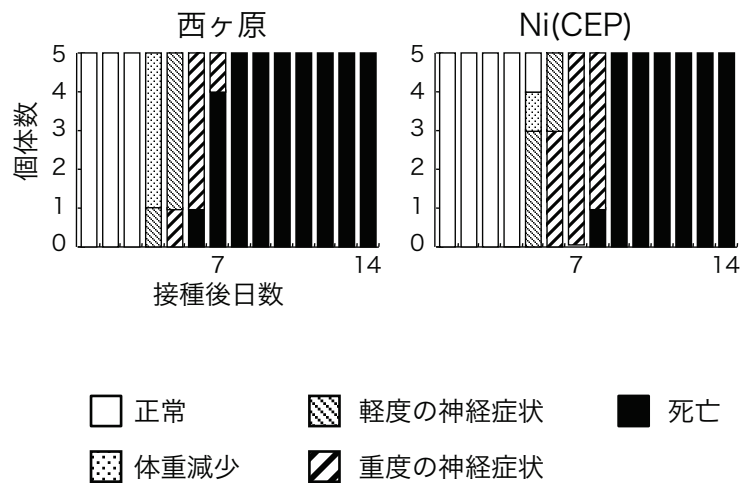


図1-6 西ヶ原株またはNi(CEP)株を筋肉内接種されたマウスの症状推移

西ヶ原株、または西ヶ原株のP遺伝子をNi-CE株由来のP遺伝子で置換したキメラウイルスNi(CEP)株を、5匹/群の4週齢マウス (ddY系統、雌) の左側大腿筋に 1×10^6 FFU筋肉内接種した。接種後14日間における各株感染マウスの症状を観察した。感染マウスの症状を「正常」、「体重減少 (観察時点までに確認された体重の最大値から5%の減少)」、「軽度の神経症状 (よるめき、または片後肢の運動障害)」、「重度の神経症状 (沈鬱、または両後肢の運動障害)」、及び「死亡」の5つに分類した。なお、同日に複数の症状が認められた場合、グラフには重症度の高い症状を優先して示した。

第 2 章

西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の体内分布
ならびに末梢神経への感染能における P 蛋白質の役割

序論

第 1 章では、中枢神経侵入性の高い西ヶ原株の P 遺伝子を弱毒の Ni-CE 株のゲノムに保有するキメラウイルス CE(NiP)株が、高率にマウスを発症させることを明らかにした。このことから、西ヶ原株の P 蛋白質がウイルスの中枢神経侵入性に関与していると考えられた。これまでに、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性に P 蛋白質が関与することを示した報告はない。したがって、西ヶ原株の中枢神経侵入性における P 蛋白質の役割を解明することにより、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入機序に関する新たな知見を得ることができると考えられた。

末梢組織に侵入した狂犬病ウイルスは、付近の末梢神経に侵入した後、脊髄を求心性に移動し、脳で増殖して動物を発症させる。すなわち、西ヶ原株及び CE(NiP)株接種群の発症マウスでは、ウイルスが接種部位の大腿筋から脳に到達していることが明らかである。一方、マウスを発症させない Ni-CE 株では、上記の体内動態のいずれかのステップが障害されていることが予想される。このことから、感染マウス体内における西ヶ原株及び CE(NiP)株の分布を Ni-CE 株と比較することにより、P 蛋白質の関与する狂犬病ウイルスの中枢神経侵入機序の手がかりを得ることができると考えられた。

そこで、第 2 章では、西ヶ原株の中枢神経侵入性における P 蛋白質の役割を検討する目的で、感染マウス体内における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の分布を比較した。さらに、西ヶ原株の P 蛋白質が末梢神経へのウイルス感染を直接的に促進しているのかを検証する目的で、神経軸索末端からのウイルス感染能及び軸索輸送能を、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の間で比較した。

材料及び方法

培養細胞及びウイルス

マウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞を、第 1 章と同様の方法で培養した。また、T7 RNA ポリメラーゼを恒常的に発現する BHK 細胞 (BHK/T7-9 細胞) (20) を、5%FCS (製品番号: 2917354、MP Biomedicals) 及び 10%トリプトース・ホスフェイト・ブロス (製品番号: 260300、Becton Dickinson) 添加 E-MEM (製品番号: 051-07615、和光純薬) で培養し (37°C、設定 CO₂ 濃度: 5%)、後述の組換え狂犬病ウイルス株の作出に用いた。西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP) 株は、第 1 章と同じものを使用した。これらのウイルスを NA 細胞に接種し、その培養上清をストックウイルスとして回収後、使用時まで-80°Cで保存した。

緑色蛍光蛋白質 (GFP) 発現組換えウイルス株の作出

GFP 発現組換え Ni-CE 株 (Ni-CE-GFP 株) を作出するため、まず、G-L 遺伝子間領域に GFP オープンリーディングフレーム (ORF) を有する Ni-CE-GFP 株のゲノムプラスミド (pNi-CE-GFP) (図 2-1A) を以下のように構築した。はじめに、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (製品番号: R045A、TaKaRa) を用いた PCR により、2 つの挿入 cDNA 断片を増幅した。すなわち、pNishi-GFP (61) を鋳型とし、PstI inf GFP (+) 及び HindIII inf GFP (-) プライマー (表 2-1) を用いた PCR により、GFP ORF の上流に、制限酵素 *Pst* I の認識配列、G 遺伝子の転写終結シグナル及び開始シグナルを有する cDNA 断片①を得た。さらに、Ni-CE 株のゲノムプラスミド (pNi-CE) (49) を鋳型とし、HindIII inf GFP (+) 及び Bsp1407I inf GFP (-) プライマー (表 2-1) を用いた PCR により、cDNA 断片②も作製した。これら 2 つの cDNA 断片の混合液を鋳型として、

再度、*Pst*I inf GFP (+) 及び *Bsp*1407I inf GFP (-) プライマーを用いて PCR を行い、両断片を連結した。いずれの PCR においても、反応液として、1 μ l の 鋳型プラスミドに、25 μ l の PrimeSTAR Max Premix、1.5 μ l ずつ の 10 μ M プライマーを加えて混和したものを作製し、滅菌超純水を加えて全量が 25 μ l となるように調整した。その後、98 $^{\circ}$ C / 10 秒間の熱変性、55 $^{\circ}$ C / 5 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C / 5 秒間の伸長反応の過程を 30 サイクル繰り返すことで PCR を行った。続いて、In-Fusion HD Cloning Kit (製品番号: 639648、Clontech) を用いて、上記のようにして得られた連結 cDNA 断片を pNi-CE に挿入した。すなわち、2 μ l の 5 \times In-Fusion HD Enzyme Premix に、1 μ l の cDNA 断片 (100ng/ μ l) と、*Pst* I 及び *Bsp*1407 I で切断した pNi-CE (50 ng/ μ l) 3 μ l を加え、滅菌超純水を加えて全量が 10 μ l となるように調整した。その後、上記混合液を 50 $^{\circ}$ C / 15 分間加温してライゲーション反応を行うことにより、pNi-CE-GFP (図 2-1A) を得た。なお、作製したゲノムプラスミドの G-L 遺伝子間領域の配列をダイレクトシーケンス法によって決定し、ゲノムプラスミドに正しい配列を持つ GFP ORF が導入されていることを確認した。

作製したゲノムプラスミドを用いて、Ito ら (20) が報告した組換え狂犬病ウイルス作出系により、Ni-CE-GFP 株を作出した。すなわち、8.1 μ l の TransIT-LT1 (製品番号: MIR2300、Mirus) を加えた 50 μ l の OPTI-MEM (製品番号: 31985-070、Gibco) を 20 分間、室温で静置することでトランスフェクション試薬を調整した。次に、pNi-CE-GFP (2 μ g)、ならびに狂犬病ウイルス RC-HL 株の N、P 及び L 蛋白質を各々発現する pT7IRES-RN (0.4 μ g)、pT7IRES-RP (0.1 μ g) 及び pT7IRES-RL (0.2 μ g) を含むプラスミド溶液を調整した。これらのトランスフェクション試薬及びプラスミド溶液を混和し、20 分間、室温で静置した。その後、組織培養プレート (24 ウェル、製品番号: 662160、

Greiner Bio-One) 上で培養した BHK/T7-9 細胞に混合液を滴下した。37°Cで4日間培養した細胞の培養液を $1,580 \times g \cdot 10$ 分間の条件で遠心し、ウイルスを含むその培養上清を回収した。接着性細胞フラスコ (25cm²、製品番号: 690975、Greiner Bio-One) に培養した NA 細胞に、これらのウイルスを MOI=0.01 で接種した。接種後 5 日目の培養液を $1,580 \times g \cdot 10$ 分間の条件で遠心し、その培養上清を Ni-CE-GFP 株 (図 2-1B) のストックウイルスとし、-80°Cで保存した。GFP 発現組換え CE(NiP)株 [CE(NiP)-GFP 株] (図 2-1B) についても、Ni-CE-GFP 株と同様の方法を用いて作出した。なお、作出したウイルスの G-L 遺伝子間領域の配列をダイレクトシーケンス法によって決定し、ウイルスゲノムに GFP ORF が導入されていることを確認した。また、第 1 章で述べたフォーカス・アッセイにより、両株のウイルス感染価を測定した。なお、GFP 発現組換えウイルス株の作出にあたり、予め文部科学大臣に、遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置を確認した (22 受文科振第 2171 号)。

感染マウスの各組織からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成

1 群あたり 3 匹の ddY マウス (4 週齢、雌、日本 SLC) に、 1×10^6 FFU の西ヶ原株または Ni-CE 株を筋肉内接種した。また、1 群あたり 5 匹のマウスに、 1×10^6 FFU の CE(NiP)株を筋肉内接種した。陰性対照として、ウイルス希釈液 (5%FCS 添加 E-MEM) のみを筋肉内接種した非感染マウスを用いた。接種後 5 日目にこれらマウスを安楽死させ、脳 (右半分)、脊髄 (第 1 頸椎から最後腰椎まで)、左側坐骨神経 (大腿関節から膝蓋関節までの部分) 及び左側大腿筋を採取し、液体窒素にて急速凍結した。別の実験では、1 群あたり 10 匹のマウスに、 1×10^6 FFU の Ni-CE 株または CE(NiP)株を筋肉内接種した。接種後 8 日目

にこれらマウスを安楽死させ、左側坐骨神経及び左側大腿筋を採取し、液体窒素にて急速凍結した。凍結した各組織を乳鉢及び乳棒を用いて粉碎後、TRIzol（製品番号: 15596-026、Invitrogen）及び PureLink™ RNA Mini Kit（製品番号: 12183018A、Invitrogen）を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を鋳型として、SuperScript III Reverse Transcriptase（製品番号: 18080-044、Invitrogen）及びウイルスゲノム特異的逆転写（RT）プライマー-RHN19(+)（表 2-2）を用いて cDNA を合成した。すなわち、抽出した RNA 11 µl に、各々 1 µl の 10 mM dNTP Mix（製品番号: 18427-013、Invitrogen）及び RHN19(+) プライマーを加えた後、65°C / 5 分間の熱変性処理を行った。このサンプル RNA 混合液に 4 µl の 5×First-Strand Buffer、各々 1 µl の 0.1 M DDT、RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor（製品番号: 10777-019、Invitrogen）及び SuperScript III Reverse Transcriptase を加え、55°C / 60 分間 RT 反応を行った後、70°C / 15 分間の保温により酵素を失活させた。このように、RT-nested PCR の標的をウイルスゲノム RNA とすることで、坐骨神経の軸索を輸送されるウイルスのような非複製ウイルスの検出も可能とした。なお、RT-nested PCR の陽性対照として、狂犬病ウイルス固定毒 Challenge Virus Standard (CVS) 株を脳内接種したマウスの脳を用いた。

Nested PCR

ウイルスゲノム N 遺伝子領域を、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version（製品番号: RR006A、TaKaRa）を用いて増幅した。PCR に使用したプライマーは表 2-2 に示した。PCR 調整液として、1 µl の鋳型 cDNA に、2.5 µl の 10×Ex Taq Buffer、2 µl の dNTP Mixture、0.25 µl ずつの 50 µM プライマー及び 0.125 µl の TaKaRa Ex Taq HS を加えて混和したものを作製し、滅菌超純水を加えて全

量が 25 μ l となるように調整した。1st PCR では、調整液を 95°C / 5 分間加温した後、95°C / 30 秒間の熱変性、58°C / 30 秒間のアニーリング、72°C / 1 分間の伸長反応の過程を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C / 5 分間保温した。また、2nd PCR では、アニーリング温度を 50°C、サイクル数を 25 とした。

TAE バッファー (40 mM Tris-acetate/1 mM EDTA) を使用して作製したエチジウムブロマイド加 (0.5 μ g/ml) 1.2%アガロースゲルを用いて、PCR 産物の電気泳動を行った。電気泳動後、UV トランスイルミネーター (ULTRA LUM) にて、PCR による遺伝子の増幅 (461 bp) を確認し、自動画像解析システム Chemidoc XRS Plus (Bio-Rad) にてゲルを撮影した。

RT-nested PCR のウイルス遺伝子検出感度を検討するため、感染性ウイルスの力価が既知である西ヶ原株ストックウイルス液から、上述の方法にて RNA を抽出し、cDNA を合成した。得られた cDNA (感染性ウイルス粒子 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^1$ FFU 相当) を鋳型として、上記と同様の方法にて 1st 及び 2nd PCR を行った。

マイクロ流体プラットフォームを用いた神経細胞分離培養系の構築

マイクロ流体プラットフォームは、Taylor ら (50) の方法に基づき、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いて作製した (図 2-2A、C 及び表 2-3)。また、その組み立てについては、Taylor ら (50) 及び Park ら (41) の方法に一部修正を加えた。すなわち、真空脱泡装置 (製品番号: 1-4211-01、アズワン) を用いてルモックスディッシュ (製品番号: 94.6077.331、Sarstadt) にプラットフォームを貼付けた後、Poly-dl-ornithine (製品番号: P8638、Sigma-Aldrich) (1,500 μ g/ml) をディッシュに流入させ、4°C で 2 日間静置することでプラットフォームとディッシュをコーティングした。さらに、神経細胞を播種する当日にディッシュをリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄したのち、Laminin (製品番号:

L-2020、Sigma-Aldrich) (3 µg/ml) をディッシュに流入させ、CO₂ インキュベーター内 (37°C、設定 CO₂ 濃度 : 7.5%) で 5 時間以上静置することで、プラットフォームとディッシュを再度コーティングした。

マウス初代培養運動神経細胞の分離及びプラットフォームへの播種

初代培養運動神経細胞の分離は、Arce ら (1) の方法に基づいて行った。すなわち、ICR マウス (プラグ確認 13 日目、雌、日本 SLC) の子宮より摘出した 7 つの 13 日目胚から脊髄を採取し、メスで細かく刻んだのち 1 ml の PBS に浮遊させた。その後、脊髄片を含む PBS に 10 µl の 2.5% w/v Trypsin (製品番号: 15090-046、Invitrogen) を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。続いて、トリプシン処理後の組織塊を、100 µl の 0.125% ウシ血清アルブミン (BSA) (製品番号: A3311-100G、Sigma-Aldrich) / L-15 Medium (製品番号: 11415-049、Gibco) / PBS、100 µl の Deoxyribonuclease I (製品番号: DN-25、Sigma-Aldrich) 及び 800 µl の Neurobasal medium (製品番号: 21103-049、Invitrogen) の混合液中に浮遊させた。緩やかなピペッティングにより組織塊をほぐした後、細胞を含んだ上清を回収し、その上清を 340 × g ・ 5 分間の条件で遠心した。最終的に、約 4 × 10⁶ 個/ml の密度となるように増殖用培地 [Enriched medium (18) : GM] 中へ細胞を再浮遊させ、2 µl の細胞液を細胞注入口からプラットフォーム細胞体側の太流路内に播種した。細胞体側のウェルには 120 µl/ウェル、軸索末端側のウェルには 140 µl/ウェルの GM を満たし、CO₂ インキュベーター内 (37°C、設定 CO₂ 濃度 : 7.5%) にて細胞を培養した。細胞播種 3 日後、各ウェルの培養液の半量を維持用培地 [Nb Active4 (BrainBits) (6) : MM] に交換した。プラットフォームにて軸索を伸長する神経細胞の模式図及び外観を図 2-3 に示した。

神経細胞の軸索末端への Ni-CE-GFP 株及び CE(NiP)-GFP 株の接種、ならびにウイルス感染能の検討

細胞播種 5 日後、細流路に入り込んだ軸索が、その末端を反対側の太流路内に伸ばしていることを確認し (図 2-3A)、GFP 発現組換えウイルス株を用いた接種実験を行った。まず、プラットフォームの細胞体側のウェルに 20 μ l/ウェルの MM を添加した後、軸索末端側のウェルから培養液を完全に取り除いた。続いて、軸索末端側の片方のウェルを、 1×10^6 FFU の Ni-CE-GFP 株または CE(NiP)-GFP 株を含む 100 μ l の MM で満たし、CO₂ インキュベーター内 (37°C、設定 CO₂ 濃度 : 7.5%) で 1 時間インキュベートした。ウイルス吸着処理後、軸索末端側のウェルからウイルス液を完全に取り除き、100 μ l/ウェルの培養液で満たした。なお、本系では、細流路を挟んだウェル間において 20 μ l 以上の液量差が存在すれば、液の移動が静水圧により厳密に制御可能であるため、ウイルス接種後は、細胞体側のウェルの液量が軸索末端側よりも常に 20 μ l 以上多い状態を維持した。ウイルス接種 48 時間後、Biozero fluorescence microscope (BZ-8000 series; Keyence) にて神経細胞体での GFP シグナルを観察し、IMARIS (Carl Zeiss Microscopy Co., Ltd.) にて画像を解析した。

神経細胞分離培養系を用いたウイルスの軸索輸送効率の検討

前述の方法にしたがって、プラットフォームに播種された神経細胞の軸索末端に GFP 発現組換えウイルス株を接種した。1 時間のウイルス吸着後、まず、軸索末端側のウェルからウイルス液を完全に取り除いた。次に、細胞体側のウェルから 50 μ l の培養液を取り除き、cell-to-cell 感染を阻害する活性をもつ抗狂犬病ウイルス G 蛋白質モノクローナル抗体 15-13 (27) を含む 50 μ l の MM を添加した (計 >100 μ l)。その後、軸索末端側のウェルに、抗体を含む 80 μ l の

MM を添加した。なお、抗狂犬病ウイルス G 蛋白質抗体は、10 国際単位 (IU) /ml になるように MM を用いて希釈した。

ウイルス接種 12、24 及び 36 時間後、Biozero fluorescence microscope (BZ-8000 series; Keyence) にて神経細胞体での GFP シグナルを観察し、撮影した。また、ウイルス接種 36 時間後には、細胞体側のウェルの培養液を 10 µg/ml の Hoechst 33342 (製品番号: PA-3014、Lonza) 100 µl に置き換え、CO₂ インキュベーター内 (37°C、設定 CO₂ 濃度 : 7.5%) で 30 分間静置して細胞の核を染色し、Biozero fluorescence microscope にて神経細胞体を撮影した。その後、接種 36 時間後での全細胞体数における GFP シグナル陽性細胞体数の割合を 1 として、各観察時間での相対値を算出することにより、吸着 1 時間のうちに感染したウイルスの軸索輸送効率を評価した。

NA 細胞へのウイルス侵入効率の検討

組織培養プレート (24 ウェル、製品番号: 662160、Greiner Bio-One) 上で培養した NA 細胞に、150 FFU の西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP) 株を接種し、37°C で 0、30、60 及び 90 分間、細胞に吸着させた。ハンクス液 (製品番号: 05905、日水) で細胞を洗浄したのち、0.5% メチルセルロース (製品番号: 22224-55、ナカライテスク) 含有 E-MEM を各ウェルに 0.5 ml 加え、CO₂ インキュベーター内で培養した (37°C、設定 CO₂ 濃度 : 5%)。接種 2 日後に、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液及び 100% メタノールによって固定及び膜透過処理された細胞を用いて、前述の IFA を実施した。ウイルス吸着時間 90 分におけるフォーカス数を 1 とした場合の相対的なフォーカス数を算出した。

結果

RT-nested PCR のウイルス遺伝子検出感度の検討

感染マウスの各組織におけるウイルスの分布を調べる目的で、RT-nested PCR によるウイルス遺伝子の高感度な検出を試みた。最初に、本法のウイルス遺伝子検出感度を検討するため、感染性ウイルスの力価が既知である西ヶ原株ストックウイルス液から RNA を抽出し、得られた RNA を鋳型として RT-nested PCR を行った (図 2-4)。その結果、感染性ウイルス粒子 1×10^5 FFU から 1×10 FFU 相当の RNA を鋳型とした場合には、予想されるサイズ (461 bp) の cDNA が増幅された。以上より、本法は、感染性ウイルス粒子 1×10 FFU に相当するウイルスゲノム RNA を検出できる高感度な系であることが示された。

感染マウス体内における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の分布

感染マウス体内における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の分布を比較する目的で、各株接種 5 日後に感染マウスの脳、脊髄、坐骨神経及び大腿筋を採取し、各組織におけるウイルス遺伝子の存在を検討した (図 2-5A)。陽性対照のマウスの脳から抽出した RNA を鋳型とした場合には、予想されるサイズ (461 bp) の cDNA が増幅されたのに対し、非感染マウスの各臓器を用いた場合には、このような cDNA の増幅は認められなかった。このことから、本法を用いることにより、マウスの各組織に存在するウイルス遺伝子を特異的に検出できることが示された。

接種後 5 日目では、西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株接種マウス群でそれぞれ 100%、0%及び 20%のマウスが体重減少ならびに神経症状を示した。その時の感染マウス各組織におけるウイルスの分布を検討した結果、全ての感染マ

ウスにおいて、接種部位である大腿筋からは複製ウイルス及び接種液に含まれる非複製ウイルスに由来すると考えられるウイルス遺伝子が検出された。西ヶ原株を接種した全てのマウスでは、大腿筋に加えて脳、脊髄、坐骨神経からもウイルス遺伝子が検出されたのに対し、Ni-CE 株接種群ではいずれの個体においても神経系組織からウイルス遺伝子は検出されなかった。一方、CE(NiP)株接種群では、症状を示した 1 匹の個体を含む 2 匹のマウスの各神経系組織からウイルス遺伝子が検出された。

Ni-CE 株及び CE(NiP)株における末梢神経への感染能の違いを確かめる目的で、1 群 10 匹のマウスに両株を筋肉内接種し、接種後 8 日目に感染マウスの坐骨神経及び大腿筋を採取して、各組織におけるウイルス遺伝子の存在を検討した (図 2-5B)。Ni-CE 株及び CE(NiP)株に感染した全てのマウス的大腿筋からは、ウイルス遺伝子が検出された。また、CE(NiP)株接種群では、症状を示した 4 匹を含む 10 匹中 6 匹のマウスの坐骨神経から、ウイルス遺伝子が検出された。一方、Ni-CE 株接種群では、いずれの個体においても坐骨神経からウイルス遺伝子は検出されなかった。

以上より、感染マウス体内において、CE(NiP)株が Ni-CE 株よりも効率良く末梢神経に感染することが示された。

神経細胞分離培養系を用いた神経細胞軸索末端からのウイルス感染能の検討

軸索末端からの神経細胞へのウイルス感染能を検討する目的で、マイクロ流体プラットフォーム (図 2-2 及び 2-3) 上でマウス初代培養運動神経細胞の細胞体と軸索末端が別々の区画で培養された、神経細胞分離培養系を用いた。Ni-CE-GFP 株または CE(NiP)-GFP 株を神経細胞の軸索末端側に接種し、接種

48 時間後に細胞体側における GFP シグナルを観察した。その結果、両株を接種した神経細胞において、その細胞体でともに明瞭な GFP シグナルが観察された (図 2-6)。このことから、Ni-CE 株は CE(NiP)株と同様、軸索末端からの神経細胞への感染能を有していることが示された。

神経細胞分離培養系を用いたウイルスの軸索輸送効率の比較

上述した神経細胞分離培養系を用いて、Ni-CE 株と CE(NiP)株の軸索輸送効率に違いがあるかを検討した。すなわち、神経細胞の軸索末端側に Ni-CE-GFP 株または CE(NiP)-GFP 株を接種し、接種 36 時間後の GFP シグナル陽性細胞体数の割合を 1 とした場合の各観察時間における相対値を算出することにより、ウイルスの軸索輸送効率を両株間で比較した。その結果、接種 12 時間後における相対値は Ni-CE-GFP 株及び CE(NiP)-GFP 株感染細胞でともに 0.07、接種 24 時間後では各々 0.7 及び 0.6 であり、ほぼ同等に推移することが示された (図 2-7)。以上より、Ni-CE 株の軸索輸送効率は CE(NiP)株と同等であることが示された。

NA 細胞への Ni-CE 株及び CE(NiP)株の侵入効率の比較

神経細胞における Ni-CE 株及び CE(NiP)株の侵入能を検討する目的で、マウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞への両株の侵入効率を比較した。ウイルス吸着時間 30 分での相対フォーカス数は、Ni-CE 株及び CE(NiP)株感染細胞で各々 0.06 及び 0.07、吸着時間 60 分では各々 0.65 及び 0.67 であり、両株の間で違いは認められなかった (図 2-8)。以上より、NA 細胞への Ni-CE 株及び CE(NiP)株の侵入効率は同等であることが示された。

考察

本章では、西ヶ原株の中枢神経侵入性における P 蛋白質の役割を明らかにする目的で、筋肉内接種後の感染マウス体内におけるウイルスの分布を検討した。その結果、Ni-CE 株接種群では全てのマウスにおいて末梢神経へのウイルス感染が認められなかったのに対し、CE(NiP)株接種群では 60%のマウスで末梢神経へのウイルス感染が認められた (図 2-5B)。このことから、CE(NiP)株は、西ヶ原株 P 蛋白質の機能により、Ni-CE 株よりも効率良く末梢神経へ感染していることが考えられた。

上記の結果より、西ヶ原株の P 蛋白質が末梢神経への感染を直接的に促進している可能性が考えられた。しかしながら、狂犬病ウイルスの粒子構造、ならびに末梢神経への本ウイルスの侵入及び軸索輸送の機序を考慮した場合、この可能性は極めて低いことが予想された。すなわち、狂犬病ウイルス P 蛋白質は、ヌクレオカプシドの構成要素としてウイルス粒子の内部に位置している。一方、これまでに、狂犬病ウイルスはヌクレオカプシドではなくウイルス粒子として軸索輸送されることが報告されている (23)。理論上、神経細胞への侵入及び軸索輸送の過程で、P 蛋白質がウイルス粒子の外側に露出されることはないと考えられるため、上記の過程において P 蛋白質が宿主因子と直接的に相互作用し、末梢神経へのウイルス感染能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

上記の可能性を実験的に検証するため、本章では、マイクロ流体プラットフォームを利用した神経細胞分離培養系を用いた。本系は、軸索を介した神経栄養因子の輸送 (11, 29)、軸索変性 (50, 63) 及び軸索とグリア細胞の相互作用 (30, 50) などを解析する神経科学研究において、有用なツールとして用いられてきた。さらに、ヘルペスウイルス (26, 31) や狂犬病ウイルス (28, 51, 52)

などの神経親和性ウイルスについて、その軸索輸送の解析に本系を利用した研究も報告されており、ウイルス学研究の分野においても有用性が示されている。そこで、本章ではこの系を利用し、軸索末端から神経細胞へ感染するためのウイルスの能力について検証した。神経細胞の軸索末端側に GFP 発現 Ni-CE 株または CE(NiP)株を接種し、細胞体側での GFP シグナルを観察した結果、両株を感染させた神経細胞において、その細胞体でともに明瞭な GFP シグナルが確認された (図 2-6)。このように、*In vitro* の実験系を用いることにより、CE(NiP)株と同様、Ni-CE 株も軸索末端からの神経細胞への感染能を保持していることが明らかとなった。

本系に培養した神経細胞に cell-to-cell 感染を阻害する活性を持つ中和抗体を添加し、Ni-CE-GFP 株及び CE(NiP)-GFP 株の軸索輸送効率を比較した。その結果、両株感染細胞における GFP シグナル陽性細胞体数の相対値が経時的に類似して増加したことから、両株の軸索輸送効率はほぼ同等であることが明らかとなった (図 2-7)。また、NA 細胞を用いた検討により、Ni-CE 株と CE(NiP)株の神経細胞への侵入効率が同等であることが示された (図 2-8)。以上の成績より、西ヶ原株と Ni-CE 株の P 蛋白質の違いは、ウイルスが軸索末端から神経細胞へ感染する能力及びその効率に、直接的には影響しないことが示唆された。

第 2 章では、*in vivo* 及び *in vitro* の実験系により、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の末梢神経への感染能を検討した。その結果、初代培養神経細胞の軸索末端にウイルスを接種した場合には (*in vitro*)、両株は神経細胞へ同等に感染した一方で、マウス筋肉内に接種した場合には (*in vivo*)、神経細胞への CE(NiP)株の感染効率が Ni-CE 株よりも高いことが判明した。以上より、西ヶ原株の P 蛋白質は末梢神経への感染を直接的に促進しているのではなく、筋肉細胞でのウイルス増殖に寄与することで間接的に促進する機能を持つ可能性が示唆された。

表 2-1 GFP 発現組換えウイルスのゲノムプラスミド作製に使用した各 PCR 用プライマー

プライマー	配列 (5'→3')	制限酵素配列
PstI inf GFP (+)	AGACGCTTCAAGTT <u>CTGCAGAG</u> AAAAA- AACTAACA	<i>Pst</i> I
HindIII inf GFP (-)	CTCAACTGAAAAGCTTCGCCGGTGTTA- CTTATACA	
HindIII inf GFP (+)	AGCTTTTCAGTTGAGAAAAAACTGTAG- ATCGAGA	
Bsp1407I inf GFP (-)	TGTTTCCCAGT <u>GTACA</u> ATTTAACAACCTT- CTCTATG	<i>Bsp1407</i> I

表 2-2 RT 及び Nested PCR に使用した各プライマー

	プライマー	配列 (5'→3')	位置 ^a
RT	RHN19 (+)	AAAATGTAACACCTCTACAATG	52 - 73
1 st PCR	N501 (+)	TCCTGAGTCTGTATAGGTTGAGCAA	501 - 525
	RHN18 (-)	CCATGTAGCATCCAACAAAGT	1008 - 1028
2 nd PCR	N540 (+)	ACACCGGTA ACTATAAAAACAAACAT	540 - 564
	N1000 (-)	ATTGAACACATGACCAACGGCATTTC	976 - 1000

^a 狂犬病ウイルス西ヶ原株のフルゲノム配列 (Accession No. AB044824.1) の 5'末端からの位置。

表 2-3 マイクロ流体システムに用いたプラットフォームの各寸法

	幅	高さ	長さ	本数
細流路	10 μm	1.5 μm	450 μm	117 本
太流路	500 μm	128 μm	7mm	2 本

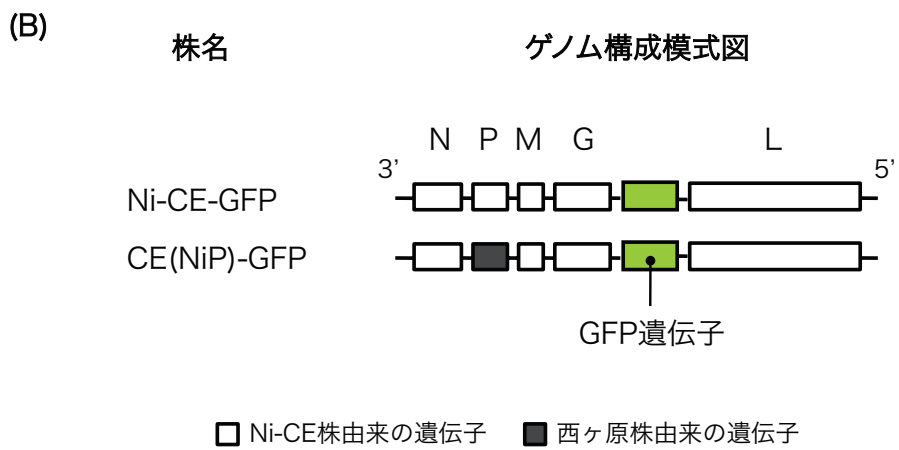
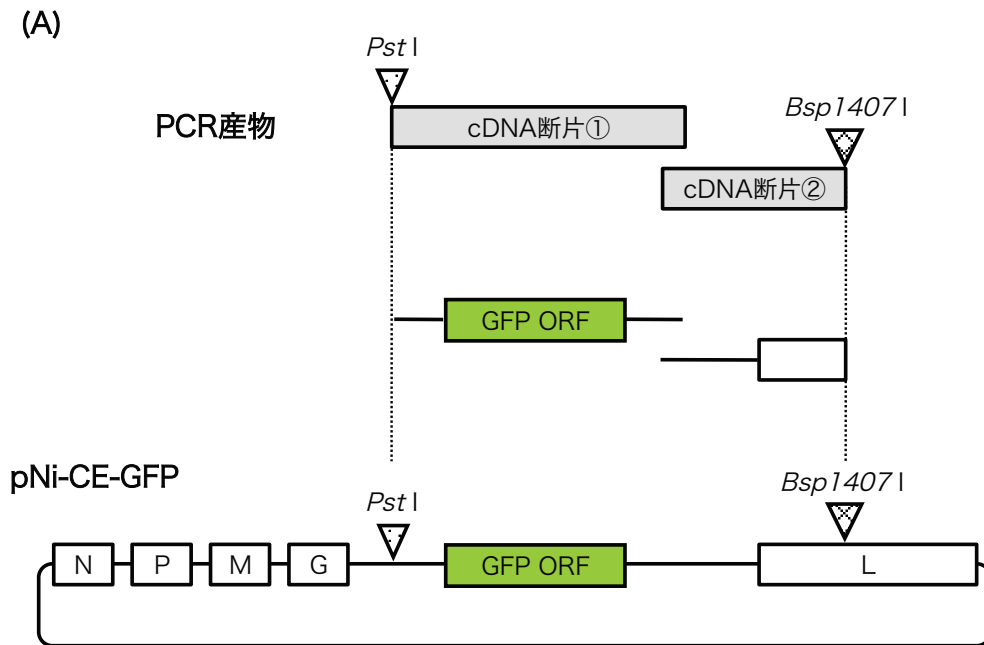


図2-1 (A) Ni-CE-GFP株のゲノムプラスミド作製ならびに
(B) Ni-CE-GFP株及びCE(NiP)-GFP株のゲノム構成模式図

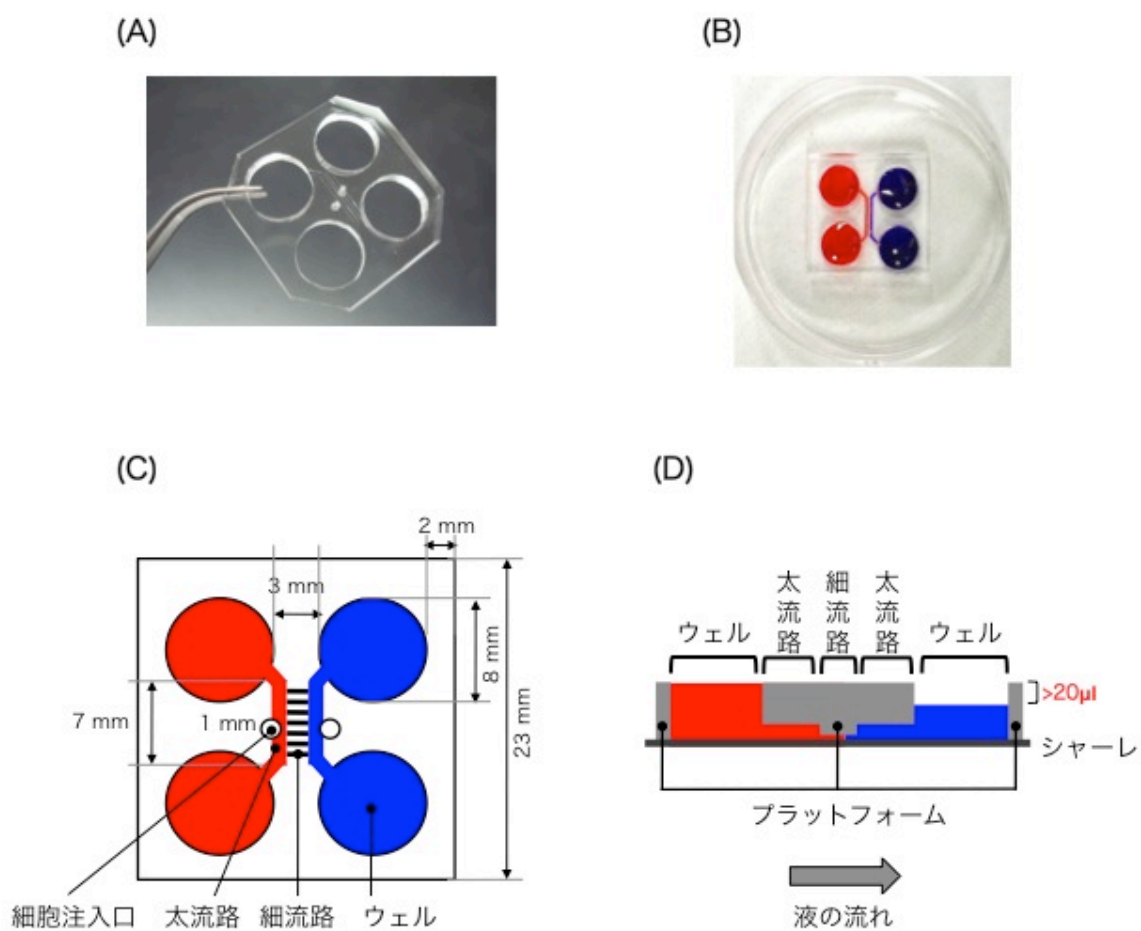


図2-2 神経細胞分離培養系マイクロ流体システムの外観及び模式図

(A) マイクロ流体システムに用いたプラットフォーム。(B) マイクロ流体システムの上からの外観。ウェルには、赤色または青色の色素液を満した。(C) プラットフォームの模式図。(D) マイクロ流体システムの断面の模式図。両側ウェル間において $20\mu\text{l}$ 以上の液量差が存在すれば、液の移動は静水圧により厳密に制御可能であることを確認した。

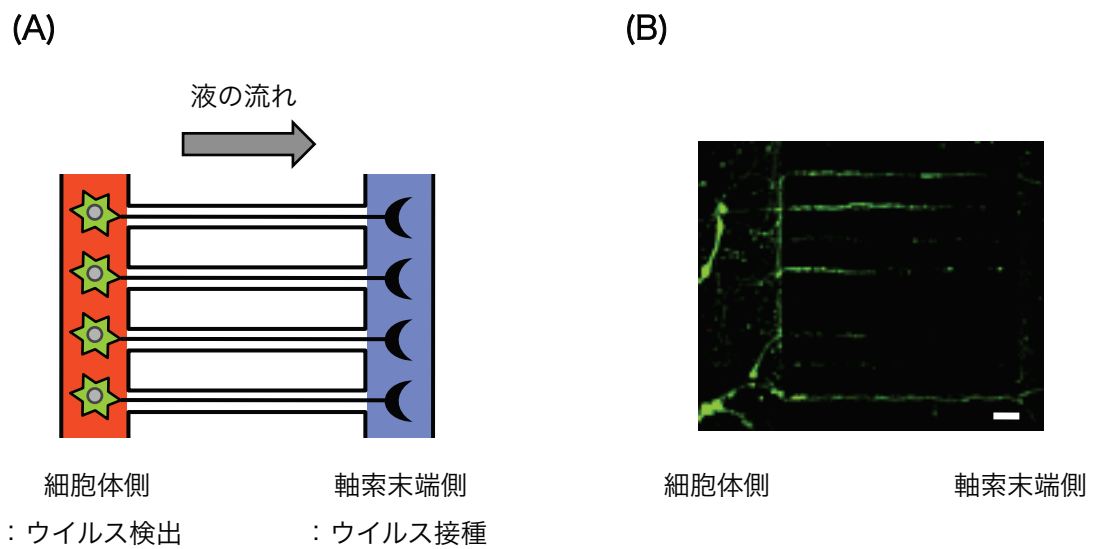


図2-3 プラットフォームに播種された神経細胞の模式図及び外観

(A) プラットフォームに播種された神経細胞の模式図。左側の太流路内に播種された細胞は、その軸索末端を反対側の太流路内へと伸長する。(B) Ni-CE-GFP株を軸索末端側に接種した48時間後の神経細胞。バーは50 μ mを示す。

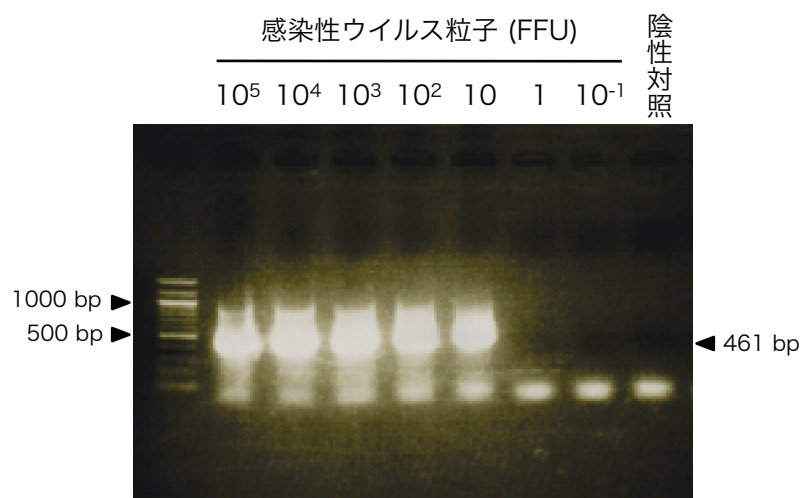


図2-4 RT-nested PCRのウイルス遺伝子検出感度の検討

感染性ウイルスの力価が既知である西ヶ原株ストックウイルス液からRNAを抽出し、得られたRNA（感染性ウイルス粒子 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{-1}$ FFU相当）を鋳型としてウイルスN遺伝子(461bp)をターゲットとしたRT-nested PCRをおこなった。陰性対照: 蒸留水

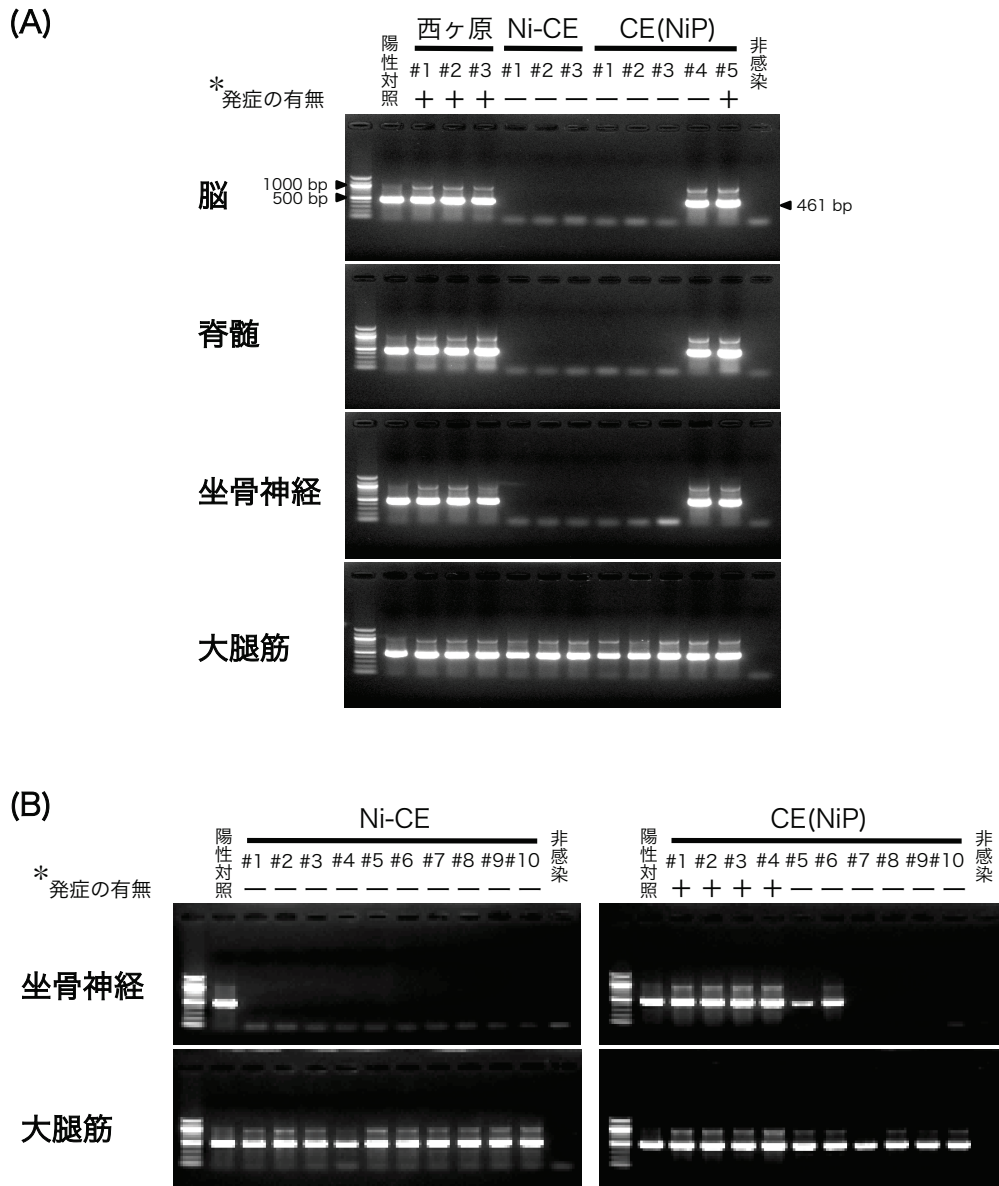


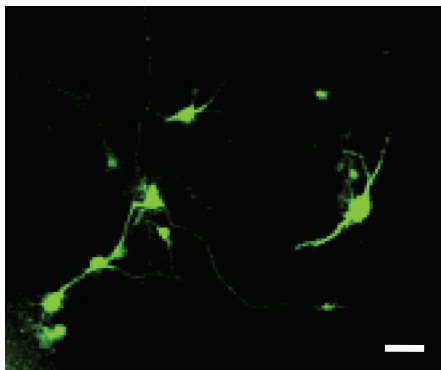
図2-5 感染マウスの各組織におけるウイルス遺伝子の検出

(A) 西ヶ原株及びNi-CE株については3匹/群、CE(NiP)株については5匹/群の4週齢マウス (ddY系統、雌) の左側大腿筋に、各株を 1×10^6 FFU筋肉内接種した。接種後5日目に、感染マウスの脳、脊髄、坐骨神経及び大腿筋を採取し、RNAを抽出後、ウイルスN遺伝子(461bp)をターゲットとしたRT-nested PCRにより各組織におけるウイルス遺伝子を検出した。(B) 1×10^6 FFUのNi-CE株またはCE(NiP)株を、10匹/群のマウスに筋肉内接種し、接種後8日目に坐骨神経及び大腿筋を採取して、各組織におけるウイルス遺伝子を検出した。

#: マウス個体識別番号、陽性対照: 狂犬病ウイルスCVS株を脳内接種したマウスの脳、非感染: ウイルス希釈液を筋肉内接種したマウスの各組織

* 症状の有無: 組織を採取した日 (接種後5日目または8日目) までに、体重減少及び軽度もしくは重度の神経症状を示した個体を+、無症状であった個体を-とした。

Ni-CE-GFP



CE(NiP)-GFP

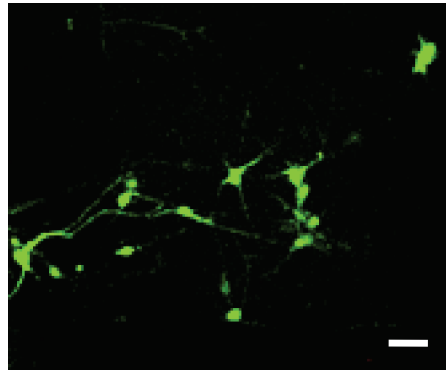


図2-6 軸索末端からの神経細胞へのウイルス感染能の検討

1×10^6 FFUのNi-CE-GFP株またはCE(NiP)-GFP株を軸索末端側に接種した48時間後における神経細胞体の像。バーは50 μ mを示す。

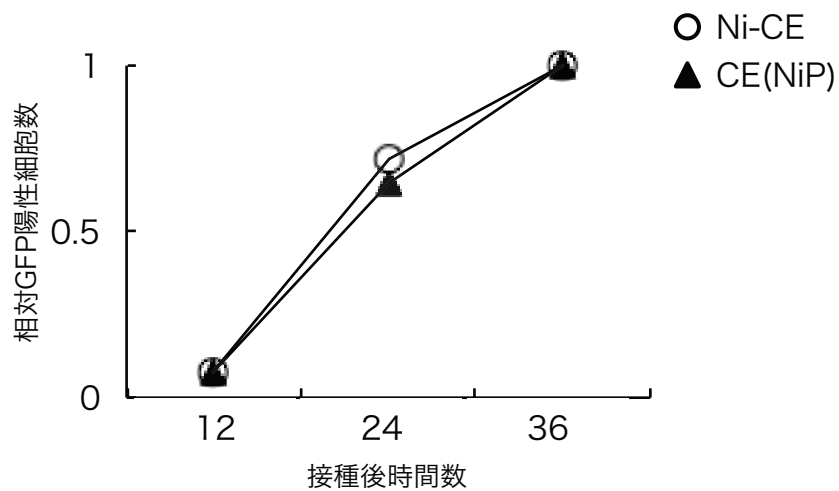


図2-7 Ni-CE-GFP株とCE(NiP)-GFP株の軸索輸送効率の比較

Ni-CE-GFP株またはCE(NiP)-GFP株を軸索末端側に接種し、1時間のウイルス吸着後、軸索末端側及び細胞体側の培養液にウイルス中和抗体を添加した。接種12、24及び36時間後に、細胞体におけるGFPシグナルを観察し、各観察時間での全細胞体数におけるGFPシグナル陽性細胞体数の割合を算出した。その後、接種36時間後のそれを1とした場合の相対値をそれぞれ算出した。

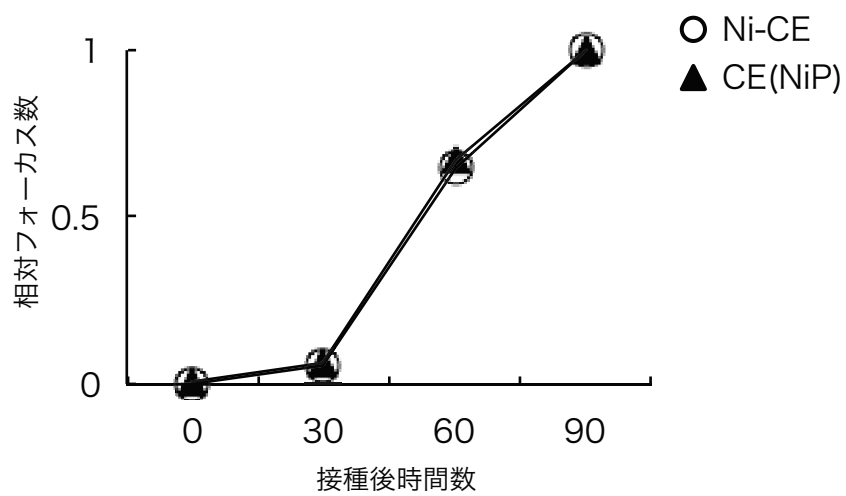


図2-8 Ni-CE株とCE(NiP)株のNA細胞へのウイルス侵入効率の比較

150 FFUのNi-CE株またはCE(NiP)株をNA細胞に接種し、0、30、60及び90分間、細胞に吸着させた。IFAによりフォーカス数を記録した後、ウイルス吸着時間90分におけるフォーカス数を1とした場合の相対的なフォーカス数を算出した。

第 3 章

筋肉細胞における西ヶ原株、Ni-CE 株
及び CE(NiP)株の増殖性の検討

序論

第2章で得られた結果より、西ヶ原株のP蛋白質は末梢神経軸索末端への感染を直接的には促進しないと考えられた。このことから、西ヶ原株及びNi-CE株のP蛋白質による中枢神経侵入性の違いを決定する事象は、ウイルスが末梢神経に感染する前段階の筋肉において起こっていることが予測された。

体性末梢神経系を構成する運動神経は、脊髓の腹角内に細胞体を持ち、その軸索末端を骨格筋へと伸張している。各々の神経軸索末端は、それぞれ1つの筋細胞ごとに神経-筋シナプスを形成していることから、骨格筋には神経細胞の軸索末端が極めて高密度に分布していることが知られている。一方、狂犬病ウイルスのレセプターとして同定されているニコチン性アセチルコリンレセプターは(25)、神経-筋シナプス間における筋細胞上に多く発現している。これらのことから、狂犬病ウイルスが同レセプターを介して筋肉細胞に感染し増殖することで、近接する末梢神経軸索末端へ効率良く感染している可能性が考えられている(46)。しかしながら、これまでに、筋肉細胞におけるウイルス増殖性と末梢神経への感染能が関連することを実験的に示した報告はない。

そこで第3章では、西ヶ原株のP蛋白質が筋肉細胞でのウイルス増殖に寄与するかを検証する目的で、筋肉細胞における西ヶ原株、Ni-CE株及びCE(NiP)株の増殖性を比較し、同蛋白質が筋肉細胞でのウイルス増殖を介して間接的に末梢神経への感染を促進している可能性を検討した。

材料及び方法

培養細胞及びウイルス

マウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞を、第 1 章と同様の方法で培養した。マウス骨格筋由来 G-8 細胞 (American Type Culture Collection [ATCC] Number: CRL-1456)、C2C12 細胞 (ATCC Number: CRL-1772) 及びヒト横紋筋肉腫由来 A-673 細胞 (ATCC Number: CRL-1598) を、CO₂ インキュベーター (ヒラサワ) 内で培養した (37°C、設定 CO₂ 濃度: 5%)。G-8 細胞用 GM として、10%FCS 及び 10%ウマ血清 (HS) (製品番号: 26050-088、Invitrogen) 添加ダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM) (製品番号: 11995-065、Invitrogen) を用いた。C2C12 細胞及び A-673 細胞用 GM には、10%FCS 添加 D-MEM を用いた。G-8 細胞及び C2C12 細胞の分化誘導は、ATCC の記載に従った。すなわち、G-8 細胞の分化誘導用培地として、2%FCS 及び 2%HS 添加 D-MEM を用いた。また、C2C12 細胞の分化誘導培地には、C2C12 細胞用 GM の添加 FCS を HS に代えたものを用いた。西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株は、第 1 章と同じものを使用した。これらのウイルスを NA 細胞に接種し、その培養上清をストックウイルスとして回収後、使用時まで -80°C で保存した。

ホタル・ルシフェラーゼ (Luc) 発現組換えウイルス株の作出

Luc 発現組換え西ヶ原株 (西ヶ原-Luc 株) を作出するため、まず、G-L 遺伝子間領域に Luc ORF を有する西ヶ原-Luc 株のゲノムプラスミド (pNishi-Luc) (図 3-1A) を以下のように構築した。はじめに、KOD-Plus-Neo (製品番号: KOD-401、TOYOBO) を用いて pGL3-Control Vector (製品番号: E1741、Promega) を鋳型とし、PS-TS-Luc+2 (+) 及び NheI-Luc+ (-) プライマー (表

3-1) を用いた PCR を行った。これにより、Luc ORF の上流に、制限酵素 *Pst*I の認識配列、G 遺伝子の転写終結シグナル及び開始シグナルを有する cDNA 断片を得た。続いて、再度、KOD-Plus-Neo を用いた PCR を行い、2 つの挿入 cDNA 断片を増幅した。すなわち、上記で得られた cDNA 断片を鋳型とし、*Pst*I-firefly luc inf (+) 及び *Nhe*I-firefly luc inf (-) プライマー (表 3-1) を用いた PCR により、Luc ORF を含む cDNA 断片①を得た。さらに、西ヶ原株のゲノムプラスミド (pNishi) (61) を鋳型とし、*Nhe*I-firefly luc inf (+) 及び *Bsp*1407 I inf (-) プライマー (表 3-1) を用いた PCR により、cDNA 断片②も作製した。これら 2 つの cDNA 断片の混合液を鋳型として、再度、*Pst*I-firefly luc inf (+) 及び *Bsp*1407 I inf (-) プライマーを用いた PCR を行い、両断片を連結した。PCR 調整液は、1 μ l の鋳型プラスミドまたは鋳型 cDNA に、5 μ l の 10 \times PCR buffer for KOD-Plus-Neo、5 μ l の 2 mM dNTPs、3 μ l の 25 mM MgSO₄、1.5 μ l ずつの 10 μ M プライマー及び 1 μ l の KOD-Plus-Neo を加え、滅菌超純水を加えて全量が 50 μ l となるように調整した。上記混合液を 94 $^{\circ}$ C / 2 分間加温し、98 $^{\circ}$ C / 10 秒間の熱変性、57 $^{\circ}$ C / 30 秒間のアニーリング、68 $^{\circ}$ C / 1 分間の伸長反応の過程を 30 サイクル繰り返して反応させた。続いて、In-Fusion HD Cloning Kit (製品番号: 639648、Clontech) を用いて、上記のようにして得られた連結 cDNA 断片を pNishi に挿入した。すなわち、2 μ l の 5 \times In-Fusion HD Enzyme Premix に、1 μ l の cDNA 断片 (50 ng/ μ l) と、*Pst*I 及び *Bsp*1407I で切断した pNishi (150 ng/ μ l) 1 μ l を加え、滅菌超純水を加えて全量が 10 μ l となるように調整した。その後、上記混合液を 50 $^{\circ}$ C / 15 分間加温してライゲーション反応を行うことにより、pNishi-Luc (図 3-1A) を得た。なお、作製したゲノムプラスミドの G-L 遺伝子間領域の配列をダイレクトシーケンス法によって決定し、ゲノムプラスミドに正しい配列の Luc ORF が導入されていることを確認した。

作製したゲノムプラスミドを用いて、第 2 章で述べた組換えウイルス株作出法と同様の手法で、西ヶ原-Luc 株 (図 3-1B) を作出した。Luc 発現組換え Ni-CE 株及び CE(NiP)株 [Ni-CE-Luc 株及び CE(NiP)-Luc 株] (図 3-1B) についても、西ヶ原-Luc 株と同様の方法を用いて作出した。なお、作出したウイルスの G-L 遺伝子間領域の配列をダイレクトシーケンス法によって決定し、ウイルスに Luc ORF が導入されていることを確認した。また、第 1 章で述べたフォーカス・アッセイにより、各株のウイルス感染価を測定した。

ルシフェラーゼ・アッセイによる各種培養筋肉細胞における各株の増殖性の比較

組織培養プレート (24 ウェル、製品番号: 662160、Greiner bio-one) 上に培養した分化 G-8 細胞、C2C12 細胞及び A-673 細胞に、西ヶ原-Luc 株、Ni-CE-Luc 株または CE(NiP)-Luc 株を MOI=1 となるよう接種した。接種 7 日後に、感染細胞をダルベッコ PBS(-) (製品番号: 05913、日水) で洗浄した後、100 μ l の Cell Culture Lysis Reagent (製品番号: E1531、Promega) を用いて溶解し、 -80°C で凍結させた。融解した溶解液をボルテックスで攪拌し、 $13,200 \times g \cdot 2$ 分間の条件で遠心後、その上清 10 μ l を用いて Luciferase assay system (製品番号: E1500、Promega) によりルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、Relative Light Unit (RLU)/sec として表記した。なお、上記のウイルス接種については、1 ウイルス株あたり 3 ウェルで行い、各々のルシフェラーゼ活性の平均値及び標準誤差を算出した。統計処理には Student の t 検定を適用した。

G-8 細胞における各株の感染性ウイルス産生能の比較

組織培養プレート（6 ウェル、製品番号: 657160、Greiner bio-one）に培養した分化 G-8 細胞に、西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を MOI=1 となるよう接種し、0、1、3、5 及び 7 日後に培養上清を回収した。培養上清中のウイルス感染価を第 1 章で述べたフォーカス・アッセイにより測定した。なお、上記のウイルス接種については、1 ウイルス株あたり 3 ウェルで行い、各々の培養上清中のウイルス感染価の平均値及び標準誤差を算出した。統計処理には Student の *t* 検定を適用した。

ルシフェラーゼ・アッセイによるマウス筋肉における各株の増殖性の比較

1 群あたり 3 匹の ddY マウス（4 週齢、雌、日本 SLC）に、 1×10^6 FFU の西ヶ原-Luc 株、Ni-CE-Luc 株または CE(NiP)-Luc 株を筋肉内接種した。陰性対照として、ウイルス希釈液（5%FCS 添加 E-MEM）のみを筋肉内接種した非感染マウスを用いた。接種 0、12、24 及び 72 時間後にこれらマウスを安楽死させ、左側大腿筋を採取した。続いて、採取した大腿筋の重さを計測し、1 ml の Passive Lysis Buffer（製品番号: E1941、Promega）を用いて溶解した後、 -80°C で凍結させた。融解した溶解液をボルテックスで攪拌し、 $20,600 \times g \cdot 5$ 分間の条件で遠心後、その上清 10 μl を用いて Luciferase assay system（製品番号: E1500、Promega）によりルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、RLU/sec/g（筋肉の重量）として表記した。なお、3 匹/群で得られたルシフェラーゼ活性の値から、各々の平均値及び標準誤差を算出した。統計処理には Student の *t* 検定を適用した。

結果

培養筋肉細胞における西ヶ原-Luc 株、Ni-CE-Luc 株及び CE(NiP)-Luc 株の増殖性の比較

培養筋肉細胞における各株の増殖性を比較する目的で、マウス骨格筋由来 G-8 細胞にルシフェラーゼ発現各組換えウイルスを接種し、接種 7 日後の感染細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した (図 3-2A)。西ヶ原-Luc 株及び CE(NiP)-Luc 株感染細胞におけるルシフェラーゼ活性は、Ni-CE-Luc 株感染細胞よりも各々約 2.5 倍及び 2.8 倍高く、有意差が認められた ($p < 0.05$)。同様に、マウス骨格筋由来 C2C12 細胞及びヒト横紋筋肉腫由来 A-673 細胞を用いた場合にも、西ヶ原-Luc 株及び CE(NiP)-Luc 株感染細胞で、Ni-CE-Luc 株感染細胞よりも有意に高いルシフェラーゼ活性が認められた ($p < 0.05$) (図 3-2B、C)。以上より、培養筋肉細胞における西ヶ原株及び CE(NiP)株の増殖性は、Ni-CE 株よりも高いことが示された。

G-8 細胞における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の感染性ウイルス 産生能の比較

培養筋肉細胞における各株の感染性ウイルス産生能を比較する目的で、西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株に感染させた G-8 細胞の培養上清中ウイルス感染価を測定した (図 3-3)。西ヶ原株及び CE(NiP)株のウイルス感染価は、接種 0、1、3 及び 5 日後にかけて緩やかに増加し、接種 7 日後には各々 4.5×10^4 FFU/ml 及び 6.7×10^4 FFU/ml に達した。一方、Ni-CE 株のウイルス感染価は接種 1 日後には上記 2 株と同等であったものの、その後徐々に低下し、接種 7 日後には西ヶ原株及び CE(NiP)株よりも有意に低い 2.7×10^2 FFU/ml を示した。

($p<0.05$)。以上より、培養筋肉細胞における西ヶ原株及び CE(NiP)株の感染性ウイルス産生能は、Ni-CE 株よりも高いことが示された。

マウス筋肉における西ヶ原-Luc 株、Ni-CE-Luc 株及び CE(NiP)-Luc 株の増殖性の比較

マウス筋肉における各株の増殖性を比較する目的で、ルシフェラーゼ発現各組換えウイルスを接種したマウスの大腿筋を経時的に採取し、ルシフェラーゼ・アッセイを行った (図 3-4)。接種 0 時間後の各株感染マウス大腿筋におけるルシフェラーゼ活性は、いずれも非感染マウスと同等であった。Ni-CE-Luc 株感染マウスの大腿筋におけるルシフェラーゼ活性は接種 12、24 及び 72 時間後までほぼ一定であったのに対し、西ヶ原-Luc 株及び CE(NiP)-Luc 株接種群では、そのルシフェラーゼ活性は時間経過とともに上昇した。接種 72 時間後において、西ヶ原-Luc 株及び CE(NiP)-Luc 株感染マウスの大腿筋におけるルシフェラーゼ活性は、Ni-CE-Luc 株感染マウスよりも各々約 4.0 倍及び 6.2 倍高く、西ヶ原-Luc 株と Ni-CE-Luc 株接種群の間では有意差が認められた ($p<0.05$)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株のマウス筋肉における増殖性は、Ni-CE 株よりも高いことが示された。

考察

本章では、末梢神経へのウイルス感染機序における西ヶ原株 P 蛋白質の役割を明らかにする目的で、培養筋肉細胞及びマウス大腿筋におけるウイルスの増殖性を検討した。その結果、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、筋肉細胞において Ni-CE 株よりも効率良く増殖することが示された (図 3-2、3-3 及び 3-4)。このことから、西ヶ原株の P 蛋白質は筋肉細胞でのウイルス増殖に重要であると考えられた。以前、当研究室は、マウス及びヒト神経芽細胞腫由来の細胞においては、Ni-CE 株と CE(NiP)株が同等に増殖することを報告している (19, 49)。筋肉細胞では効率良く増殖できない Ni-CE 株であっても、神経細胞で増殖可能であるという事実より、Ni-CE 株の増殖性は細胞種依存的に決定されることが示唆された。

これまでに行われた病理組織学的解析により、狂犬病ウイルスが末梢神経に感染する前に筋肉細胞で複製することが示されている (12, 13, 39, 40)。このことは、筋肉細胞でのウイルス増殖が、末梢神経への狂犬病ウイルスの感染を促進している可能性を示している。しかしながら、筋肉細胞でのウイルス増殖性と末梢神経への感染能の関連性を示す実験結果はこれまでに報告されていない。本章では、マウス体内における末梢神経への感染能が高い西ヶ原株及び CE(NiP)株が、筋肉細胞で効率良く増殖することを明らかにした (図 3-2、3-3 及び 3-4)。一方で、マウスへの筋肉内接種により末梢神経への感染が認められなかった Ni-CE 株では、筋肉細胞における増殖性が上記 2 株よりも低いことが示された。すなわち、本章において、筋肉細胞における狂犬病ウイルスの増殖能は、末梢神経への本ウイルスの感染能と正の相関関係にあることが、初めて実験的に示された。したがって、筋肉細胞においてウイルスが増殖することは、

末梢神経への狂犬病ウイルスの感染を成立させる上で重要であると考えられた。

本章では、末梢神経への狂犬病ウイルスの感染能における筋肉でのウイルス増殖の重要性を示した。その一方で、これまでに、狂犬病ウイルス街上毒ならびに固定毒が、筋肉細胞で増殖することなく、直接的に末梢神経へ感染していることを示唆する成績も報告されている (4, 15, 22, 48, 57)。狂犬病ウイルス G 蛋白質をシュードタイプしたレンチウイルス・ベクターが、筋肉内接種によって中枢神経系に到達する (33, 34) という事実もまた、狂犬病ウイルスが末梢神経へ直接的に感染する能力を有していることを示している。興味深いことに、高用量 (5×10^7 FFU) の Ni-CE 株を筋肉内接種した場合には、一部の感染マウス (~60%) が発症し、一時的な体重減少を示した (データ未掲載)。このことは、高用量のウイルスを接種したことにより、Ni-CE 株が末梢神経へ直接的に感染したことを示唆している。したがって、狂犬病ウイルスが末梢神経へ直接的に感染する能力は、接種するウイルス量や、筋肉細胞または神経細胞に対するウイルスの親和性などの因子によって影響を受けることが予想された。したがって、上記の報告 (4, 15, 22, 48, 57) では、何らかの条件下で末梢神経へのウイルスの直接感染が推進され、結果として末梢神経への感染における筋肉でのウイルス増殖の重要性が評価されなかった可能性があることが考えられた。

本章で得られた結果より、筋肉細胞における西ヶ原株と Ni-CE 株の増殖性の違いには、両株の P 蛋白質の相違が関与していると考えられた。狂犬病ウイルス P 蛋白質は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである L 蛋白質の共因子として、ウイルスゲノム RNA の転写及び複製に関与している (60)。したがって、筋肉細胞において、この Ni-CE 株 P 蛋白質の RNA ポリメラーゼ共因子としての機能が減弱している可能性が考えられた。その一方で、Ni-CE 株または CE(NiP) 株を接種した G-8 細胞において、接種 1 日後の両株の上清中ウイルス力価はほ

ぼ同等であったことから (図 3-3)、培養筋肉細胞での両株の増殖性は感染初期においては同程度であることが示唆された。以上より、筋肉細胞でのウイルス増殖性に、西ヶ原株及び Ni-CE 株 P 蛋白質の RNA ポリメラーゼ共因子としての機能の違いが関与した可能性は低いと予想された。一方で、狂犬病ウイルス P 蛋白質は IFN アンタゴニストとしての機能も有していることから (5, 9, 10, 19, 38, 45, 54, 55)、本機能が筋肉細胞でのウイルス増殖性に影響した可能性が考えられた。

第 3 章では、マウス体内における末梢神経への感染能が高い西ヶ原株及び CE(NiP)株と、感染能が低い Ni-CE 株について、培養筋肉細胞及びマウス大腿筋における各株の増殖性を比較した。その結果、筋肉細胞における西ヶ原株及び CE(NiP)株の増殖性は、Ni-CE 株よりも高いことが示された。したがって、西ヶ原株の P 蛋白質は筋肉細胞でのウイルス増殖に重要であると考えられた。また、筋肉細胞における各株の増殖能が、第 2 章にて明らかにした末梢神経への各株の感染能と正の相関関係にあることから、筋肉細胞でのウイルス増殖が末梢神経への感染を促進していることが示唆された。

表 3-1 Luc 発現組換えウイルスのゲノムプラスミド作製に使用した各 PCR 用プライマー

プライマー	配列 (5'→3')	制限酵素配列
PS-TS-Luc+2 (+)	<u>ACTGCAGCCGCGGTG</u> AAAAAAAACTAA- CACCTCTACAATGGAAGACGCCAAAA- ACATAAA	<i>Pst</i> I
NheI-Luc+ (-)	AAGCTAGCCTCTAGAATTACACGGCGA- TCTT	
PstI-firefly luc inf (+)	CGACGCTTCAAGTT <u>CTGCAGCCGCGG</u> - TGAAAAAAAA	<i>Pst</i> I
NheI-firefly luc inf (-)	CTCAACTGAAAAGCTTAGATGAGCTAG	
NheI-firefly luc inf (+)	AATTCTAGAGGCTAGCTCATCTAAGCTT- TTCAGTT	
Bsp1407 I inf (-)	TGTTTCCCAGT <u>GTACA</u> ATTTAACAACCTT- CTCTATG	<i>Bsp1407</i> I

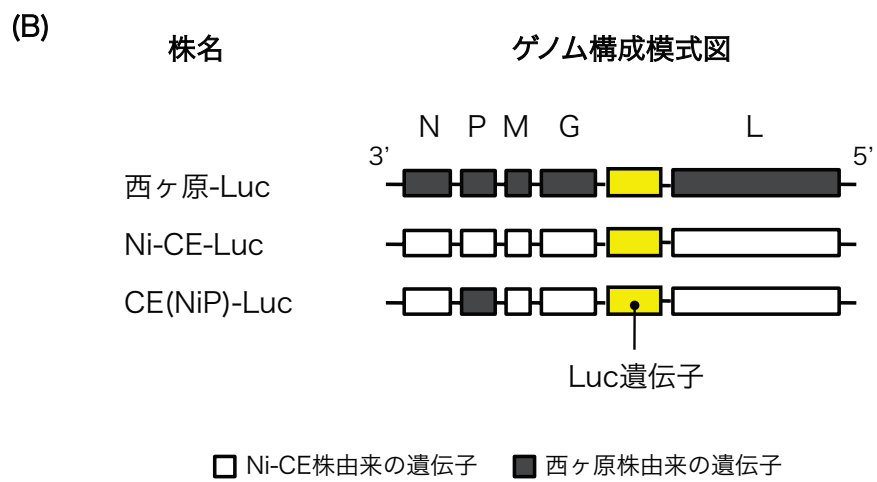
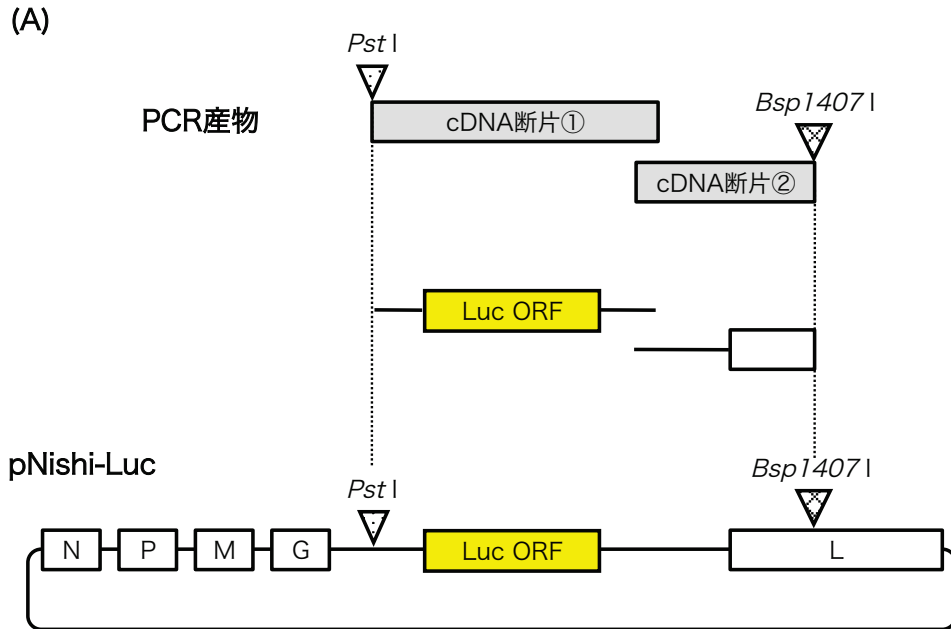


図3-1 (A) 西ヶ原-Luc株のゲノムプラスミド作製ならびに
(B) 西ヶ原-Luc株、Ni-CE-Luc株及びCE(NiP)-Luc株のゲノム構成模式図

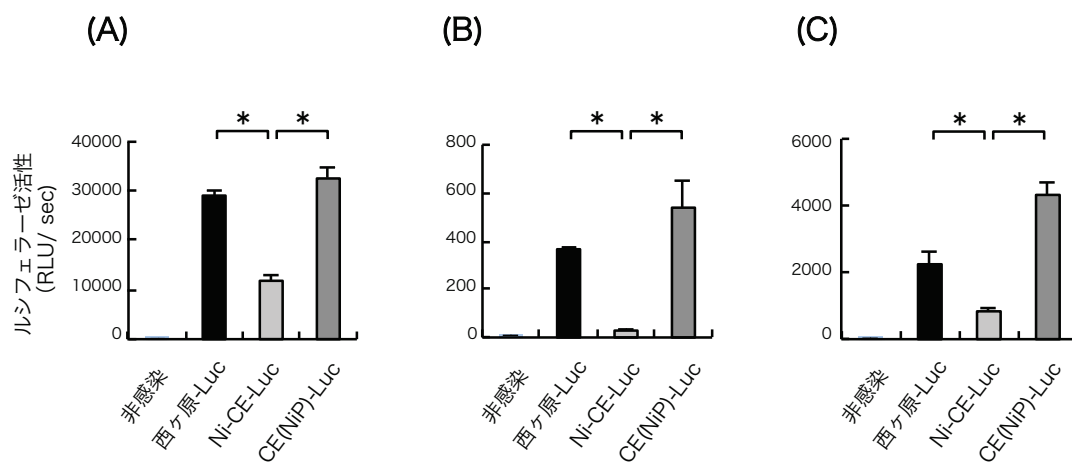


図3-2 各Luc発現組換えウイルス株を接種した培養筋肉細胞におけるルシフェラーゼ活性

(A) 分化G-8細胞、(B) C2C12細胞及び (C) A673細胞に、西ヶ原-Luc株、Ni-CE-Luc株またはCE(NiP)-Luc株をMOI=1となるよう接種し、接種7日後に感染細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した。ウイルス希釈液のみを接種したものを非感染とした。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。*: $p < 0.05$

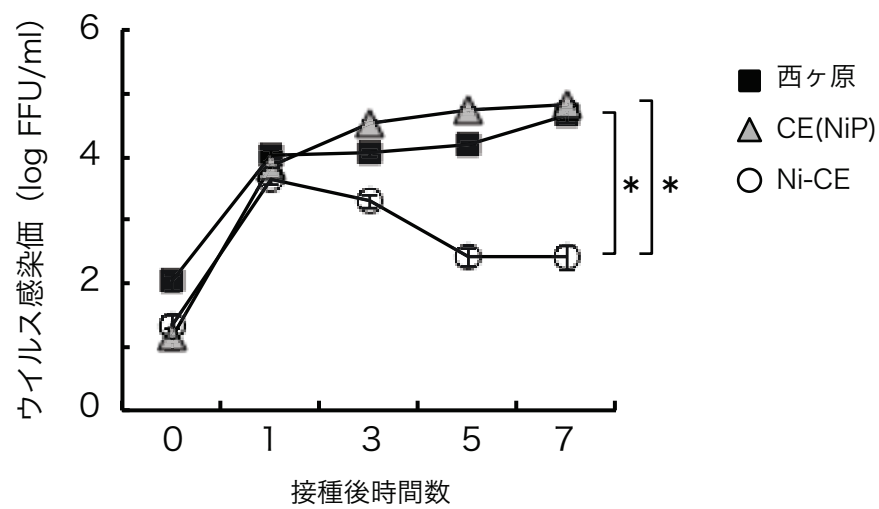


図3-3 各株を接種したG-8細胞の培養上清中ウイルス感染価

分化G-8細胞に、西ヶ原株、Ni-CE株またはCE(NiP)株をMOI=1で接種し、0、1、3、5及び7日後に培養上清中のウイルス感染価をフォーカス・アッセイにて測定した。エラーバーは標準誤差を示す (n=3) 。*: $p < 0.05$

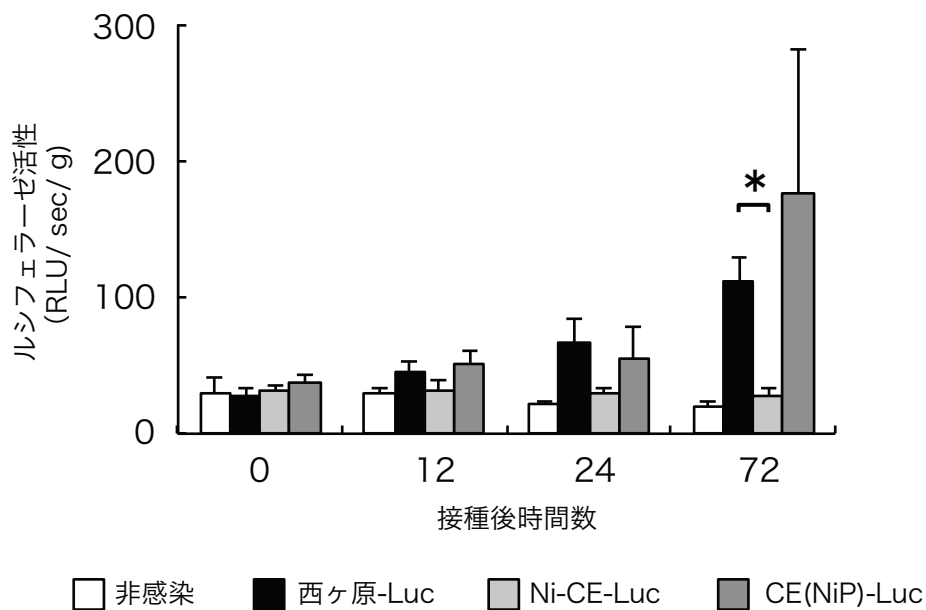


図3-4 各Luc発現組換えウイルス株を接種したマウスの筋肉におけるルシフェラーゼ活性

10⁶ FFUの西ヶ原-Luc株、Ni-CE-Luc株またはCE(NiP)-Luc株を3匹/群の4週齢マウス（ddY系統、雌）の左側大腿筋に筋肉内接種した。ウイルス希釈液のみを接種したマウスを非感染マウスとした。接種0、12、24及び72時間後に、感染マウスの大腿筋を採取し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、RLU/sec/g（筋肉の重量）により算出した。エラーバーは標準誤差を示す。
*:*p*<0.05

第 4 章

筋肉細胞における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の

IFN 産生抑制能の検討

序論

第3章では、西ヶ原株及び CE(NiP)株が、筋肉細胞において Ni-CE 株よりも効率良く増殖することが示された。このことから、西ヶ原株の P 蛋白質は筋肉細胞でのウイルス増殖において重要な機能を持つと考えられた。

これまでに、狂犬病ウイルス P 蛋白質が感染細胞において IFN 遺伝子及び IFN 誘導遺伝子群の発現を抑制し、宿主の IFN システムを阻害する機能を担うことが報告されている (図 4-1) (5, 9, 10, 19, 38, 45, 54, 55)。I 型 IFN (主に IFN- α 及び β) は、自然免疫における抗ウイルス活性の中心的な役割を担っている分子である。IFN はウイルス感染によって一時的に分泌され、周囲の細胞に抗ウイルス蛋白質を産生させることで強力な抗ウイルス状態を誘導する (44)。したがって、狂犬病ウイルス P 蛋白質の IFN 産生抑制機能は、このような宿主の防御機構に対抗し、ウイルスが増殖性を維持する上で極めて重要である。以上のことから、西ヶ原株 P 蛋白質が IFN 産生を抑制する機能を保持しているのに対し、Ni-CE 株 P 蛋白質ではその機能が減弱しており、その違いが筋肉細胞におけるウイルスの増殖性に影響している可能性が考えられた。

そこで第4章では、西ヶ原株及び Ni-CE 株 P 蛋白質の IFN 産生抑制能を検証する目的で、西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を感染させた筋肉細胞における IFN 関連遺伝子の発現量を比較し、筋肉細胞におけるウイルス増殖性に P 蛋白質の IFN 産生抑制能が関連する可能性を検討した。

材料及び方法

培養細胞及びウイルス

マウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞を、第 1 章と同様の方法で培養した。マウス骨格筋由来 G-8 細胞及び C2C12 細胞の培養及び分化誘導は、第 3 章と同様の方法で行った。西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株は、第 1 章と同じものを使用した。これらのウイルスを NA 細胞に接種し、その培養上清をストックウイルスとして回収後、使用時まで -80°C で保存した。

感染細胞からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成

組織培養プレート（24 ウェル、製品番号: 662160、Greiner bio-one）上に培養した G-8 細胞または C2C12 細胞をハンクス液（製品番号: 05905、日水）で洗浄した後、西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株を $\text{MOI}=1$ となるように接種した。ウイルス接種 24 時間後の細胞をダルベッコ PBS (-)（製品番号: 05913、日水）で洗浄した後、RNeasy（製品番号: 74134、QIAGEN）を用いて感染細胞から RNA を抽出した。抽出した RNA を鋳型として、Super ScriptIII 逆転写酵素（製品番号: 18080-044、Invitrogen）及び Random Primer (hexadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)₆)（製品番号: 3801、TaKaRa）を用いて cDNA を合成した。なお、RT 反応条件は、 25°C / 5 分間、 50°C / 60 分間、 70°C / 15 分間とした。合成した cDNA は、後述のリアルタイム PCR で使用するまで 4°C で保存した。

感染マウス大腿筋からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成

1 群あたり 3 匹の ddY マウス（4 週齢、雌、日本 SLC）に、 1×10^6 FFU の西

ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を筋肉内接種した。陰性対照として、ウイルス希釈液（5%FCS 添加 E-MEM）のみを筋肉内接種した非感染マウスを用いた。接種 12 時間後にこれらマウスを安楽死させ、左側大腿筋を採取して液体窒素にて急速凍結した。凍結した各組織を乳鉢及び乳棒を用いて粉碎後、TRIzol 及び PureLink™ RNA Mini Kit を用いて、第 2 章で述べたものと同様の手法で RNA を抽出した。また、抽出した RNA を鋳型として、上述の方法で cDNA を合成した。合成した cDNA は、後述のリアルタイム PCR で使用するまで 4°C で保存した。

リアルタイム PCR

cDNA 中における *Ifn-β*、ミクソウイルス耐性遺伝子 1 (*Mx1*)、2'-5'-オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子 1 (*Oas1*) 及びマウスグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*Gapdh*) mRNA 発現量を TaqMan 法に基づいたリアルタイム PCR により測定した。すなわち、10 μl の 2×TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems、製品番号: 4369016) にサンプル cDNA を 2 μl 混合した。この混合液に各標的遺伝子の 20×Primer & Probe Mix (*Ifn-β* [Mm00439546]、*Mx1* [Mm00487796]、*Oas1* [Mm00449297] 及び GAPDH [4352339E]、Applied Biosystems) を 1 μl 加え、滅菌超純水を加えて最終量が 20 μl になるように調整した。上記調整液を、7300 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて以下の条件で反応させた。50°C / 2 分間、95°C / 10 分間の熱反応の後、95°C / 15 秒間の熱変性及び 60°C / 1 分間のアニーリング・伸長反応を 40 サイクル繰り返した。各サンプルにおける遺伝子発現量を *Gapdh* mRNA の発現量で割ることにより、サンプル間の初期細胞数、RNA 抽出効率及び cDNA 合成効率の差異による影響を補正した。なお、上記のリアル

タイム PCR については、1 条件あたり 3 ウェルの細胞または 3 匹のマウスを用いて実施し、*Gapdh* mRNA により補正した各々の遺伝子発現量の平均値及び標準誤差を算出した。統計処理には Student の *t* 検定を適用した。

結果

西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を感染させた培養筋肉細胞における *Ifn-β* 遺伝子発現量の比較

培養筋肉細胞における各株の IFN 産生抑制能を検証する目的で、西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を G-8 細胞に接種し、24 時間後の感染細胞における *Ifn-β* mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて定量し比較した。その結果、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における *Ifn-β* mRNA 発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低く ($p<0.05$)、それぞれ約 1/47 及び 1/10 であった (図 4-2A)。また、各株感染 C2C12 細胞における *Ifn-β* mRNA 発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった ($p<0.05$) (図 4-2B)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 産生を抑制することが示された。

西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を感染させた培養筋肉細胞における *Mx1* 及び *Oas1* 遺伝子発現量の比較

上記で示された各株の IFN 産生抑制能の違いが、筋肉細胞における IFN 誘導遺伝子群の発現量にも反映されるか否かを検討する目的で、上述の感染細胞における *Mx1* 及び *Oas1* mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて定量し比較した。西ヶ原株及び CE(NiP)株を感染させた G-8 細胞における *Mx1* mRNA 発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低く ($p<0.05$)、それぞれ約 1/74 及び 1/14 であった (図 4-3A)。また、各株感染 G-8 細胞における *Oas1* mRNA 発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株

感染細胞に比べて有意に低かった ($p < 0.05$) (図 4-3B)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 誘導遺伝子の発現を抑制することが示された。

西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株を感染させたマウス大腿筋における *Ifn- β* 遺伝子発現量の比較

マウス大腿筋における各株の IFN 産生抑制能を検証する目的で、西ヶ原株、Ni-CE 株または CE(NiP)株をマウス大腿筋に接種し、12 時間後の感染マウス大腿筋における *Ifn- β* mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて定量し比較した。その結果、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染マウスの大腿筋における *Ifn- β* mRNA 発現量は、Ni-CE 株感染マウスに比べて低い傾向を示し、それぞれ約 1/8 及び 1/5 であった (図 4-4)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染マウス大腿筋において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 産生を抑制することが示された。

考察

これまで、狂犬病ウイルス P 蛋白質が、宿主の IFN 遺伝子及び IFN 誘導遺伝子群の発現シグナルを抑制し、IFN アンタゴニストとして機能することが報告されている (図 4-1) (5, 9, 10, 19, 38, 45, 54, 55)。このことから、西ヶ原株 P 蛋白質は筋肉細胞において IFN 産生を抑制する機能を保持しているのに対して、Ni-CE 株 P 蛋白質ではその機能が減弱している可能性が考えられた。そこで第 4 章では、この可能性を検討する目的で、各株の IFN 産生抑制能を比較した。その結果、CE(NiP)株を感染させた培養筋肉細胞における *Ifn-β* 遺伝子の発現量は、Ni-CE 株感染に比較して低いことが示された (図 4-2)。このことは、CE(NiP)株を感染させたマウス大腿筋における *Ifn-β* 遺伝子の発現量が、Ni-CE 株感染に比較して低い傾向にあることによっても支持された (図 4-4)。また、西ヶ原株 P 蛋白質を発現させた G-8 細胞では、Poly I:C 処理による IFN-β プロモーター活性の上昇が抑えられたのに対し、Ni-CE 株 P 蛋白質を発現させた細胞では同プロモーター活性の上昇が抑制されなかった (データ未掲載)。これらのことから、西ヶ原株の P 蛋白質が筋肉細胞において IFN 産生を抑制する機能を持つ一方で、Ni-CE 株 P 蛋白質ではその機能が減弱していることが明らかとなった。

上記のように、Ni-CE 株の P 蛋白質では、IFN 産生抑制機能が減弱していることが示された。以前、Brzózka ら (9) は、IFN の発現誘導に重要な転写因子である IFN regulatory factor 3 (IRF-3) のリン酸化が、狂犬病ウイルス P 蛋白質によって阻害されることを報告している。Ni-CE 株と CE(NiP)株は、P 蛋白質上の 5 つのアミノ酸置換 (56、58、66、81 及び 226 位) を除いて遺伝的に同一である (49)。以上のことから、Ni-CE 株 P 蛋白質上のこれらアミノ酸変

異によって、筋肉細胞における同蛋白質の IRF-3 リン酸化阻害機能が減弱した可能性が考えられた。

CE(NiP)株を感染させた培養筋肉細胞では、*Ifn-β* mRNA の発現量に加え、*Mx1* 及び *Oas1* mRNA の発現量も Ni-CE 株感染に比較して低いことが示された (図 4-3)。このことから、両株の IFN 産生抑制能の違いが、筋肉細胞における IFN 誘導遺伝子群の発現量にも反映されたことが示唆された。その一方で、これまでに狂犬病ウイルス P 蛋白質が IFN 応答抑制機能を持つことが報告されていることから (図 4-1) (10, 54)、両株 P 蛋白質の IFN 応答抑制能の違いが、IFN 誘導遺伝子の発現レベルに影響した可能性も考えられた。これまでに、当研究室は、西ヶ原株 P 蛋白質が、神経細胞において IFN 応答シグナルを抑制する機能を持つものに対して、Ni-CE 株 P 蛋白質ではその機能が減弱していることを報告している (19)。両株 P 蛋白質の IFN 応答シグナル抑制能が、筋肉細胞においても異なることを検証するためには、さらなる解析が必要である。

本章では、筋肉細胞での増殖性の高い CE(NiP)株が、増殖性の低い Ni-CE 株よりも効率良く IFN 産生を抑制することが明らかとなった。したがって、筋肉細胞における各株の増殖能と IFN 産生抑制能の間には、正の相関関係があることが示された。興味深いことに、IFN 産生能を有する筋肉細胞における Ni-CE 株の増殖性が CE(NiP)株に比較して著しく低かった一方で (第 3 章)、IFN 産生能を欠くアフリカミドリザル腎臓上皮由来 Vero 細胞では、両株は同等に増殖した (データ未掲載)。このことから、筋肉細胞での両株の増殖性の違いは、両株 P 蛋白質の IFN 産生抑制能の相違に起因することが示唆された。

これまでに、神経向性ウイルスであるポリオウイルスのマウスへの筋肉内接種において、宿主の I 型 IFN が筋肉でのウイルス増殖を抑制することで、同ウイルスの神経系への侵入を抑制することが示されている (24)。このことは、末

梢神経への神経向性ウイルスの感染に対する宿主の防御機構として、筋肉での IFN 産生が重要であることを示唆している。一方、本章では、感染筋肉細胞における Ni-CE 株の IFN 誘導能が CE(NiP)株よりも高いことを明らかにした。これらのことから、IFN システムを介した宿主自然免疫が、筋肉細胞における Ni-CE 株の増殖を抑制し、結果として、末梢神経への同株の感染を阻害したと考えられた。

本章で得られた結果から、狂犬病ウイルスが末梢組織において IFN システムを介した宿主自然免疫を回避することにより、末梢神経へ効果的に感染していることが示唆された。以前、狂犬病ウイルスを筋肉内接種されたサルに対し、IFN 誘導能を有するポリ-L-リジン・カルボキシメチルセルロース含有 Poly I:C (Poly ICLC) を投与することで、狂犬病ワクチンの暴露後免疫効果が高まることが報告されている (2, 3)。これらのことから、末梢組織における宿主 IFN システムは、狂犬病に対する新たな暴露後発症予防法を開発する上で有効な標的となる可能性が示唆された。

第 4 章では、筋肉細胞における増殖性が高い西ヶ原株及び CE(NiP)株と、増殖性が低い Ni-CE 株について、筋肉細胞における各株の IFN 産生抑制能を比較した。その結果、西ヶ原株及び CE(NiP)株に感染した筋肉細胞における IFN 関連遺伝子発現量は、Ni-CE 株感染よりも低いことが示された。したがって、西ヶ原株の P 蛋白質は、感染筋肉細胞において効果的に IFN 産生を抑制すると考えられた。また、筋肉細胞における各株の IFN 産生抑制能が、第 3 章にて明らかにした各株の増殖能と正の相関関係にあることから、筋肉細胞でのウイルスの IFN 産生抑制能が、同細胞におけるウイルス増殖に重要であることが示唆された。

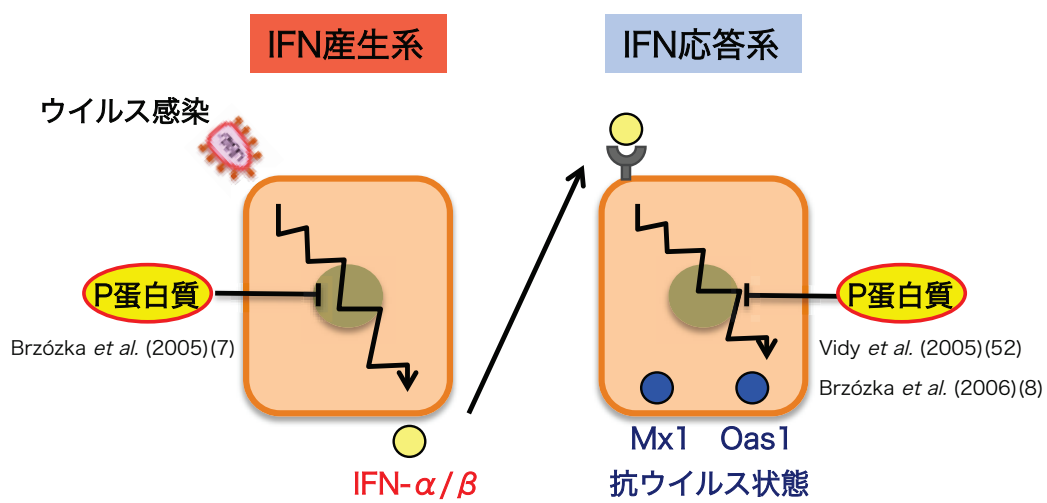


図4-1 宿主細胞におけるIFN産生シグナル及び応答シグナルと狂犬病ウイルスP蛋白質によるシグナル阻害

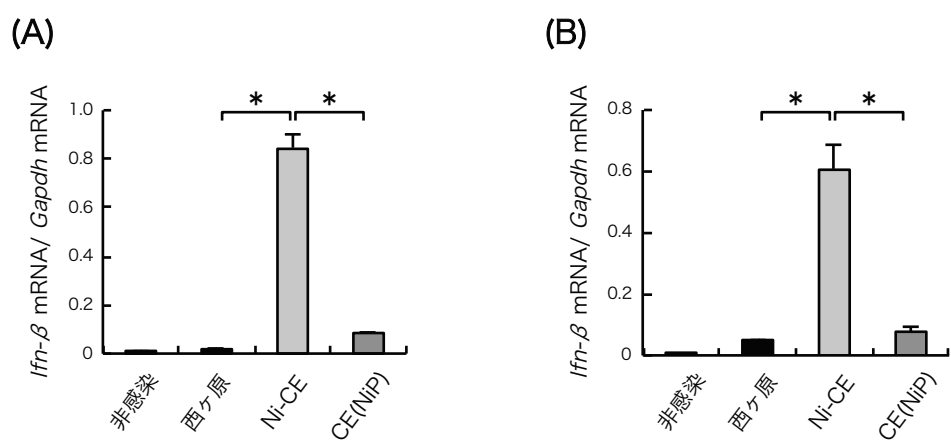


図4-2 各株を接種した培養筋肉細胞における *Ifn-β* 遺伝子の発現量

(A) 分化G-8細胞、(B) C2C12細胞に西ヶ原株、Ni-CE株またはCE(NiP)株をMOI=1で接種し、接種24時間後に感染細胞における *Ifn-β* 遺伝子発現量をリアルタイムPCRにて定量した。ウイルス希釈液のみを接種したものを非感染とした。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。*: $p < 0.05$

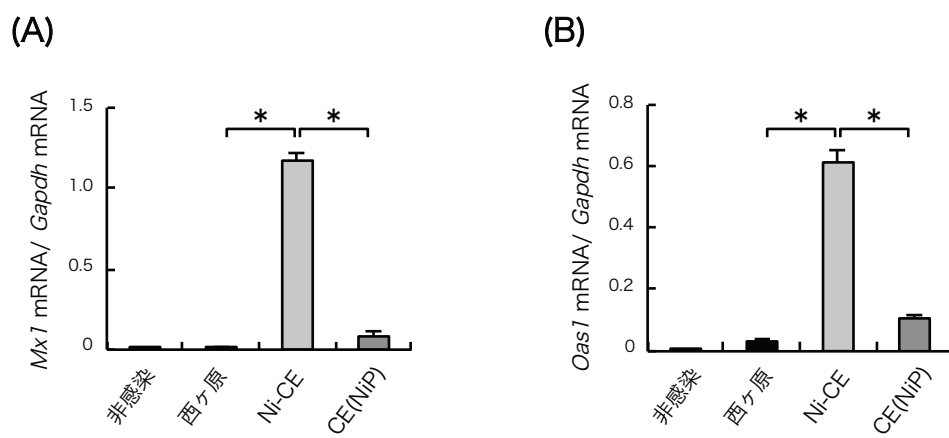


図4-3 各株を接種した培養筋肉細胞におけるIFN誘導遺伝子の発現量

分化G-8細胞に西ヶ原株、Ni-CE株またはCE(NiP)株をMOI=1で接種し、接種24時間後に感染細胞における (A) *Mx1*、(B) *Oas1* 遺伝子発現量をリアルタイムPCRにて定量した。ウイルス希釈液のみを接種したものを非感染とした。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。*: $p < 0.05$

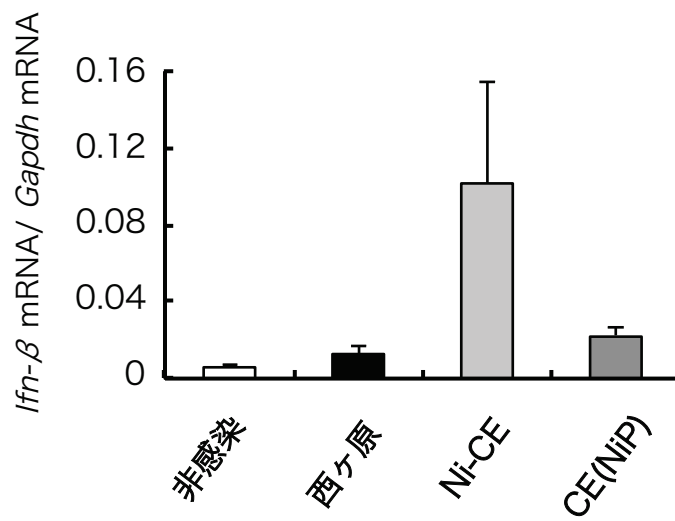


図4-4 各株を接種したマウス大腿筋における*Ifn-β*遺伝子の発現量

1×10⁶ FFUの西ヶ原株、Ni-CE株またはCE(NiP)株を3匹/群の4週齢マウス (ddY系統、雌) の左側大腿筋に筋肉内接種した。ウイルス希釈液のみを接種したマウスを非感染マウスとした。接種12時間後に、マウス的大腿筋を採取し、大腿筋における*Ifn-β*遺伝子発現量をリアルタイムPCRにて定量した。エラーバーは標準誤差を示す。

結論

狂犬病の病態形成において、感染部位である末梢組織からの中枢神経系へのウイルス侵入は、極めて重要な過程である。しかしながら、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入機序の詳細は未だに不明である。そこで本研究では、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入機序の解明を目標とし、マウスにおける中枢神経侵入性の異なる狂犬病ウイルス 2 株、西ヶ原株及び Ni-CE 株の比較解析を行った。その結果、以下の知見が得られた。

1. 西ヶ原株の P 遺伝子は、ウイルスの中枢神経侵入性に関連する。
2. 西ヶ原株の P 遺伝子は、末梢神経へのウイルス感染効率を高める。
3. 西ヶ原株の P 遺伝子は、筋肉細胞でのウイルス増殖を促進する機能をもつ。
4. 西ヶ原株の P 遺伝子は、筋肉細胞において IFN 産生を抑制する機能をもつ。

上記の知見から、西ヶ原株 P 蛋白質は、その IFN アンタゴニスト機能によって筋肉細胞におけるウイルス増殖性を高め、結果として、末梢神経へのウイルス感染を促進する役割を持つと考えられた (図 5)。

本研究では、P 遺伝子が狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性に関連することを初めて明らかにした。また本研究では、末梢神経への狂犬病ウイルスの感染能と、筋肉細胞での同ウイルスの増殖能が、正の相関関係にあることを初めて実験的に示した。本研究により得られた知見は、狂犬病に対する新たな暴露後発

症予防法を開発する上で有用な情報となることが期待される。

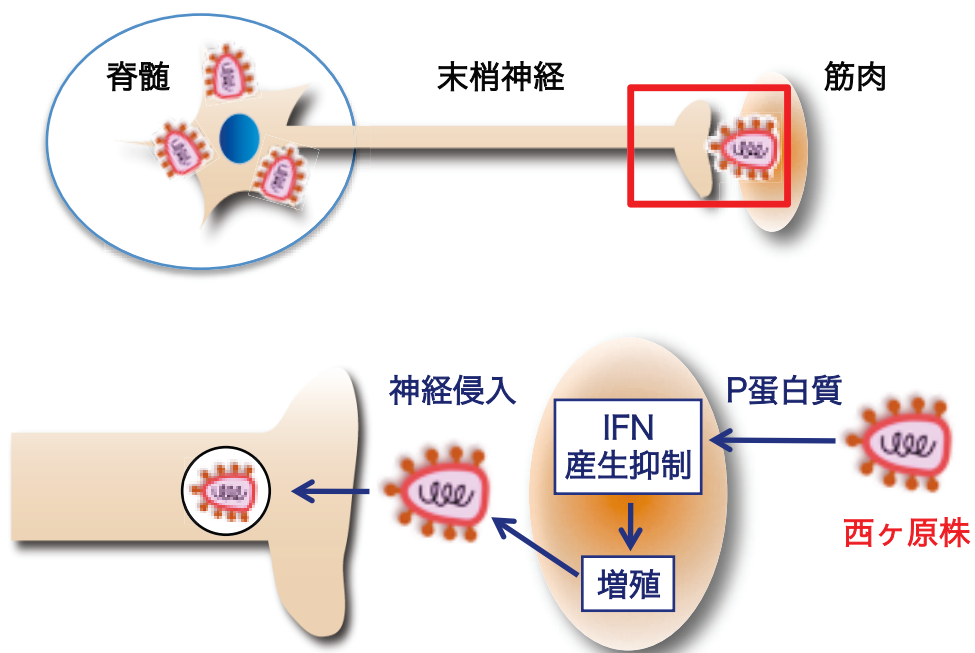


図5 本研究で得られた結果から考えられるP蛋白質の関与する西ヶ原株の末梢神経侵入機序

謝辞

本研究において、終始懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました 岐阜大学 人獣共通感染症学研究室 杉山 誠 教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり終始熱心なご指導を賜り、本稿を微細にわたり校閲していただいた 岐阜大学 人獣共通感染症学研究室 伊藤 直人 准教授に深く感謝いたします。

論文草稿にあたり適切な助言を賜りました 帯広畜産大学 原虫病研究センター 鈴木 宏志 教授、帯広畜産大学 原虫病研究センター 横山 直明 教授、岩手大学 農学部 獣医微生物学研究室 村上 賢二 教授、東京農工大学 農学部 国際家畜感染症防疫研究教育センター 水谷 哲也 教授に心からの謝意を表します。

マイクロ流体プラットフォームを用いた神経細胞分離培養系の実験を行うにあたり、終始熱心な技術指導及び適切な助言を賜りました 東京都医学総合研究所 大岡 静衣 主席研究員に厚く御礼申し上げます。また、マイクロ流体プラットフォームを作製・分与していただき、神経細胞分離培養系の実験を行うにあたり多大なご協力を賜りました 東京大学生産技術研究所 マイクロナノメカトロニクス国際研究センター 藤井 輝夫 教授、金田 祥平 特任助教授、中村 寛子 特任研究員に深謝いたします。

最後に、本研究の基礎となる知見を明らかにされた諸先輩方、私の研究生生活を支えていただいた岐阜大学 人獣共通感染症学研究室の皆様心から感謝いたします。

引用文献

- 1) Arce, V., Garces, A., de Bovis, B., Filippi, P., Henderson, C., Pettmann, B. and deLapeyriere, O. (1999). Cardiotrophin-1 requires LIFRbeta to promote survival of mouse motoneurons purified by a novel technique. *J. Neurosci. Res.* 55, 119-26.
- 2) Baer, G.M., Moore, S.A., Shaddock, J.H. and Levy, H.B. (1979). An effective rabies treatment in exposed monkeys: a single dose of interferon inducer and vaccine. *Bull. World Health Organ* 57, 807-13.
- 3) Baer, G.M., Shaddock, J.H., Moore, S.A., Yager, P.A., Baron, S.S. and Levy, H.B. (1977). Successful prophylaxis against rabies in mice and Rhesus monkeys: the interferon system and vaccine. *J. Infect. Dis.* 136, 286-91.
- 4) Baer, G.M., Shantha, T.R. and Bourne, G.H. (1968). The pathogenesis of street rabies virus in rats. *Bull. World Health Organ* 38, 119-25.
- 5) Blondel, D., Regad, T., Poisson, N., Pavie, B., Harper, F., Pandolfi, P.P., De The H. and Chelbi-Alix, M.K. (2002). Rabies virus P and small P products interact directly with PML and reorganize PML nuclear bodies. *Oncogene* 21, 7957-70.
- 6) Brewer, G.J., Boehler, M.D., Jones, T.T. and Wheeler, B.C. (2008). NbActive4 medium improvement to Neurobasal/B27 increases neuron synapse densities and network spike rates on multielectrode arrays. *J. Neurosci. Methods* 170, 181-87.
- 7) Briggs, D.J. (2007). Humans Rabies Vaccines. In: Jackson, A.C. and Wunner, W.H. [eds] *Rabies* 2nd ed., pp. 505-15. Elsevier Inc., London, U.K.

- 8) Briggs, D.J. and Mahendra, B.J. (2007). Public Health Management of Humans at Risk. In: Jackson, A.C. and Wunner, W.H. [eds] Rabies 2nd ed., pp. 545-71. Elsevier Inc., London, U.K.
- 9) Brzózka, K., Finke, S. and Conzelmann, K.K. (2005). Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 79, 7673-81.
- 10) Brzózka, K., Finke, S. and Conzelmann, K.K. (2006). Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J. Virol.* 80, 2675-83.
- 11) Campenot, R.B. and MacInnis, B.L. (2004). Retrograde transport of neurotrophins: fact and function. *J. Neurobiol.* 58, 217-29.
- 12) Charlton, K.M. and Casey, G.A. (1979). Experimental rabies in skunks: immunofluorescence light and electron microscopic studies. *Lab. Invest.* 41, 36-44.
- 13) Charlton, K.M., Nadin-Davis, S., Casey, G.A. and Wandeler, A.I. (1997). The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. *Acta. Neuropathol.* 94, 73-7.
- 14) Chenik, M., Chebli, K. Gaudin, Y. and Blondel, D. (1994). In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 11), 2889-96.
- 15) Coulon, P., Derbin, C., Kucera, P., Lafay, F., Préhaud, C. and Flamand,

- A. (1989). Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. *J. Virol.* 63, 3550-54.
- 16) Faber, M., Pulmanausahakul, R., Nagao, K., Prośniak, M., Rice, A.B., Koprowski, H., Schnell, M.J. and Dietzschold, B. (2004). Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 16328-32.
- 17) Fu, Z.F., Zheng, Y., Wunner, W.H., Koprowski, H. and Dietzschold, B. (1994). Both the N- and the C-terminal domains of the nominal phosphoprotein of rabies virus are involved in binding to the nucleoprotein. *Virology* 200, 590-7.
- 18) Guo, X., Das, M., Rumsey, J., Gonzalez, M., Stancescu, M. and Hickman, J. (2010). Neuromuscular junction formation between human stem-cell-derived motoneurons and rat skeletal muscle in a defined system. *Tissue Eng. Part. C. Methods* 16, 1347-55.
- 19) Ito, N., Moseley, G.W., Blondel, D., Shimizu, K., Rowe, C.L., Ito, Y., Masatani, T., Nakagawa, K., Jans, D.A. and Sugiyama, M. (2010). Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity. *J. Virol.* 84, 6699-710.
- 20) Ito, N., Takayama-Ito, M., Yamada, K., Hosokawa, J., Sugiyama, M. and Minamoto, N. (2003). Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system. *Microbiol. Immunol.* 47, 613-7.
- 21) Jackson, A.C. (2007). Pathogenesis. In: Jackson, A.C. and Wunner, W.H.[eds] *Rabies* 2nd ed., pp. 341-381. Elsevier Inc., London, U.K.
- 22) Johnson, R.T. (1965). Experimental rabies. Studies of cellular vulnerability and pathogenesis using fluorescent antibody staining. *J.*

Neuropathol. Exp. Neurol. 24, 662-74.

- 23) Klingen, Y., Conzelmann, K. K. and Finke, S. (2008). Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport. *J. Virol.* 82, 237-45.
- 24) Lancaster, K.Z., and Pfeiffer, J.K. (2010). Limited trafficking of a neurotropic virus through inefficient retrograde axonal transport and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 6, e1000791.
- 25) Lentz, T.L., Burrage, T.G., Smith, A.L., Crick, J. and Tignor, G.H. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 215, 182-4.
- 26) Liu, W.W., Goodhouse, J., Jeon, N.L. and Enquist, L.W. (2008). A microfluidic chamber for analysis of neuron-to-cell spread and axonal transport of an alpha-herpesvirus. *PLoS One* 3, e2382.
- 27) Luo, T.R., Minamoto, N., Hishida, M., Yamamoto, K., Fujise, T., Hiraga, S., Ito, N., Sugiyama, M. and Kinjo, T. (1998). Antigenic and functional analyses of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.* 42, 187-93.
- 28) Lycke, E. and Tsiang, H. 1987. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. *J. Virol.* 61, 2733-41.
- 29) MacInnis, B.L. and Campenot, R.B. (2002). Retrograde support of neuronal survival without retrograde transport of nerve growth factor. *Science* 295, 1536-9.
- 30) Marker, D.F., Puccini, J.M., Mockus, T.E., Barbieri, J., Lu, S.M. and Gelbard, H.A. (2012). LRRK2 kinase inhibition prevents pathological microglial phagocytosis in response to HIV-1 Tat protein. *J. Neuroinflammation* 9, 261-72.

- 31) Markus, A., Grigoryan, S., Sloutskin, A., Yee, M.B., Zhu, H., Yang, I.H., Thakor, N.V., Sarid, R., Kinchington, P.R. and Goldstein, R.S. (2011). Varicella-zoster virus (VZV) infection of neurons derived from human embryonic stem cells: direct demonstration of axonal infection, transport of VZV, and productive neuronal infection. *J. Virol.* 85, 6220-33.
- 32) Mavrikakis, M., McCarthy, A.A., Roche, S., Blondel, D. and Ruigrok, R.W. (2004). Structure and function of the C-terminal domain of the polymerase cofactor of rabies virus. *J. Mol. Biol.* 343, 819-31.
- 33) Mazarakis, N.D., Azzouz, M., Rohll, J.B., Ellard, F.M., Wilkes, F.J., Olsen, A.L., Carter, E.E., Barber, R.D., Baban, D.F., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J., O'Malley, K. and Mitrophanous K.A. (2001). Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2109-21.
- 34) Mentis, G.Z., Gravell, M., Hamilton, R., Shneider, N.A., O'Donovan, M.J. and Schubert M. (2006). Transduction of motor neurons and muscle fibers by intramuscular injection of HIV-1-based vectors pseudotyped with select rabies virus glycoproteins. *J. Neurosci. Methods* 157, 208-17.
- 35) Minamoto, N., Tanaka, H., Hishida, M., Goto, H., Ito, H., Naruse, S., Yamamoto, K., Sugiyama, M., Kinjo, T., Mannen, K. and et al. (1994). Linear and conformation-dependent antigenic sites on the nucleoprotein of rabies virus. *Microbiol. Immunol.* 38, 449-55.
- 36) Mita, T., Shimizu, K., Ito, N., Yamada, K., Ito, Y., Sugiyama, M. and Minamoto N. (2008). Amino acid at position 95 of the matrix protein is a cytopathic determinant of rabies virus. *Virus Res.* 137, 33-9.

- 37) Morimoto, K., Foley, H.D., McGettigan, J.P., Schnell, K.J. and Dietzschold, B. (2000). Reinvestigation of the role of the rabies virus glycoprotein in viral pathogenesis using a reverse genetics approach. *J. Neurovirol.* 6, 373-81.
- 38) Moseley, G.W., Lahaye, X., Roth, D.M., Oksayan, S., Filmer, R.P., Rowe, C.L., Blondel, D. and Jans, D.A. (2009). Dual modes of rabies P-protein association with microtubules: a novel strategy to suppress the antiviral response. *J. Cell Sci.* 122, 3652-62.
- 39) Murphy, F.A., Bauer, S.P., Harrison, A.K. and Winn, W.C. Jr. (1973). Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. *Lab. Invest.* 28, 361-76.
- 40) Park, C.H., Kondo, M., Inoue, S., Noguchi, A., Oyamada, T., Yoshikawa H. and Yamada A. (2006). The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 589-95.
- 41) Park, J.W., Vahidi, B., Taylor, A.M., Rhee, S.W. and Jeon, N.L. (2006). Microfluidic culture platform for neuroscience research. *Nat. Protoc.* 1, 2128-36.
- 42) Préhaud, C., Coulon, P., LaFay, F., Thiers, C. and Flamand, A. (1988). Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J. Virol.* 62, 1-7.
- 43) Pulmanausahakul, R., Li J., Schnell, M.J. and Dietzschold, B. (2008). The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J. Virol.* 82, 2330-8.

- 44) Randall, R.E. and Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89, 1-47.
- 45) Rieder, M., Brzózka, K., Pfaller, C.K., Cox, J.H., Stitz, L. and Conzelmann, K.K. (2011). Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity. *J. Virol.* 85, 842-52.
- 46) Schnell, M.J., McGettigan, J.P., Wirblich, C. and Papaneri A. (2010). The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 51-61.
- 47) Schubert, D., Humphreys, S., Baroni, C. and Cohn, M. (1969). In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 64, 316-23.
- 48) Shankar, V., Dietzschold, B. and Koprowski, H. (1991). Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. *J. Virol.* 65, 2736-8.
- 49) Shimizu, K., Ito, N., Mita, T., Yamada, K., Hosokawa-Muto, J., Sugiyama, M. and Minamoto, N. (2007). Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice. *Virus Res.* 123, 154-60.
- 50) Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W. and Jeon, N.L. (2005). A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods* 2, 599-605.
- 51) Tsiang, H., Ceccaldi, P.E. and Lycke, E. (1991). Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 5), 1191-4.

- 52) Tsiang, H., Lycke, E., Ceccaldi, P.E., Ermine, A. and Hirardot X. (1989). The anterograde transport of rabies virus in rat sensory dorsal root ganglia neurons. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 8), 2075-85.
- 53) Turkmen, S., Sahin, A., Gunaydin, M., Tatli, O., Karaca, Y., Turedi, S. and Gunduz, A. (2012). A wild wolf attack and its unfortunate outcome: rabies and death. *Wilderness Environ. Med.* 23, 248-50.
- 54) Vidy, A., Chelbi-Alix, M. and Blondel, D. (2005). Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways. *J. Virol.* 79, 14411-20.
- 55) Vidy, A., El Bougrini, J., Chelbi-Alix, M.K. and Blondel, D. (2007). The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1. *J. Virol.* 81, 4255-63.
- 56) Virojanapirom, P., Khawplod, P., Sawangvaree, A., Wacharapluesadee, S., Hemachudha, T., Yamada, K., Morimoto, K. and Nishizono A. (2012). Molecular analysis of the mutational effects of Thai street rabies virus with increased virulence in mice after passages in the BHK cell line. *Arch. Virol.* 157, 2201-5.
- 57) Watson, H.D., Tignor, G.H. and Smith, A.L. (1981). Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice. *J. Gen. Virol.* 56, 372-82.
- 58) World Health Organization. (2004). Introduction. *In: WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO Technical Report Series; 931.* World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 59) World Health Organization. (2013). Rabies Fact Sheet. No. 99.
- 60) Wunner, W.H. (2007). Rabies Virus. *In: Jackson, A.C. and Wunner,*

W.H.[eds] Rabies 2nd ed., pp. 23-68. Elsevier Inc., London, U.K.

- 61) Yamada, K., Ito, N., Takayama-Ito, M., Sugiyama, M. and Minamoto, N. (2006). Multigenic relation to the attenuation of rabies virus. *Microbiol. Immunol.* 50, 25-32.
- 62) Yamada, K., Park, C.H., Noguchi, K., Kojima, D., Kubo, T., Komiya, N., Matsumoto, T., Mitui, M.T., Ahmed, K., Morimoto, K., Inoue, S. and Nishizono, A. (2012). Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res.* 165, 34-45.
- 63) Yang, I.H., Siddique, R., Hosmane, S., Thakor, N. and Hoke, A. (2009). Compartmentalized microfluidic culture platform to study mechanism of paclitaxel-induced axonal degeneration. *Exp. Neurol.* 218, 124-8.