

マウスアストロウイルスの病態解明に関する研究

2021 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岐阜大学)

森 田 華 子

目次

緒言	1
表	4
第一章 わが国の実験動物施設におけるマウスアストロウイルス (MuAstV) の感染状況調査	6
序論	7
材料と方法	8
1. 供試検体	8
2. 材料の採取	8
3. マウスの微生物学的モニタリング検査	9
4. MuAstV PCR	9
5. 病理組織学的解析	10
6. 統計解析	10
7. 動物実験倫理	10
結果	11
1. わが国の実験動物施設における MuAstV PCR 陽性率	11
2. 微生物学的モニタリング検査	11
3. MuAstV の病原性に関する病理組織学的検討	12

考察	13
表	15
第二章 MuAstV の病原性に関する研究	19
序論	20
材料と方法	21
1. 実験動物と飼育環境	21
2. MuAstV 含有液の調製	21
3. 感染実験計画	22
4. MuAstV の PCR による定性法と定量法	23
5. 病理組織学的解析	23
6. 透過型電子顕微鏡による観察	24
7. 動物実験倫理	24
結果	25
1. 無菌 NOG マウスにおける MuAstV の実験感染モデルの確立	25
2. 病理組織学的解析	25
3. 小腸下部の透過型電子顕微鏡観察	26
考察	27

表	30
図	32
第三章 MuAstV の感染伝播に関する研究	36
序論	37
材料と方法	38
1. 実験動物と飼育環境	38
2. 感染実験計画	38
3. MuAstV の PCR による定性法と定量法	39
4. 動物実験倫理	39
結果	40
1. MuAstV 実験感染モデルにおけるウイルス排出期間	40
2. MuAstV 実験感染モデルにおけるウイルス排出量	40
考察	41
表	42
図	44
総括	46

謝辭	50
引用文獻	51

略語一覧

BLAST: basic local alignment search tool

CIEA: Central Institute for Experimental Animals (公益財団法人 実験動物中央研究所)

HE: Hematoxylin-Eosin (ヘマトキシリンおよびエオジン)

ICLAS: International Council for Laboratory Animal Science

IQI: IQI/Jic

MAstV: Mamastroviruses

MNV: Murine norovirus (マウスノロウイルス)

MuAstV: Murine astrovirus (マウスアストロウイルス)

MHV: Mouse hepatitis virus (マウス肝炎ウイルス)

NLRP3: Nod-like receptor 3

NOG: NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*IL2rg*^{tm1Sug} / ShiJic

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

RdRp: RNA-dependent RNA polymerase

緒言

実験動物であるマウスは現在、多くの研究分野にわたる動物実験で広く用いられている。動物実験において再現性が高くかつ信頼性の高い結果を得るためには、微生物学のおよび遺伝学的品質が保証された動物の使用が必要である。近年、実験動物施設の衛生管理が向上し、重篤な呼吸器症状を呈するセンダイウイルス (Sendai virus) (31) や、四肢・耳・尾の壊死脱落症状を呈するエクトロメリアウイルス (Ectromelia virus) (47) など、重篤な症状を引き起こす病原体や致死性の高い病原体による感染症は減少した反面、症状を示さない、いわゆる不顕性感染による感染症が問題になっている (表 I)。不顕性感染による感染症は実験刺激により重症化することがある。また、症状は示さなくとも実験結果に影響を与えることも懸念される。近年、さまざまな免疫学的特徴を持つ免疫不全マウスが開発され実験動物として使用されるようになったが、これら免疫不全の実験動物の取り扱いでは特に不顕性感染による感染症について注意が必要である (15, 27, 36, 42)。

実験動物施設のマウスにおける微生物感染の流行は、その時代ごとに異なることが報告されている (21)。近年では、*Helicobacter hepaticus* (15) やマウスノロウイルス (27) などの新たな病原体が発見されたように、検査すべき微生物の数は増加している。最近では、2011 年にマウスに感染する新たなウイルスとして、野生のハツカネズミの糞便からマウスアストロウイルス (MuAstV) が発見された (40) (表 II)。マウスのアストロウイルスについては、1985 年に集団下痢を発症したヌードマウスの腸内容物から電子顕微鏡観察によりアストロウイルス様ウイルス粒子が検出されたのが最初の報告である (28)。その後、2011 年に野生のハツカネズミの糞便メタゲノム解析の一環として、MuAstV のゲノム配列が決定され、MuAstV の分類が可能となった (40)。

アストロウイルスはエンベロープを持たない一本鎖のプラス (+) 鎖 RNA ウイルスであり (11), 1975 年に小児の下痢の糞便サンプルから電子顕微鏡観察により最初に発見された (5)。アストロウイルスは哺乳類に感染する Mamastroviruses (MAstV) と、鳥類に感染する Avastroviruses (AAstV) の 2 つに分類される (11)。アストロウイルスは、野生動物、家畜を問わず、さまざまな哺乳類、鳥類に感染し、下痢や腸炎などの胃腸疾患を引き起こすとの報告がある (11, 24)。また、胃腸疾患の他、脳炎や髄膜炎などの発症に関与するとの報告もある (1, 3, 32, 41)。アストロウイルスによる感染は炎症や細胞傷害を引き起こさないことが報告されており (9, 29, 34), 七面鳥を用いた下痢発症の機序に関する研究では、アストロウイルスキャプシドタンパク質による腸上皮細胞のタイトジャンクションの破壊により、腸透過性が亢進することが示されている (34, 35)。

MuAstV は各国の実験動物施設のマウスで頻繁に検出されている (37, 43)。しかし、PCR による MuAstV 遺伝子陽性マウスでは目立った臨床症状や病変が確認されないため (8, 9, 37), 感染症例の報告が無いのが現状である。そのため、過去に集団下痢を発症したヌードマウスにおける MuAstV 感染以外の情報はなく、その病原性についても依然として不明である。そこで本研究では、わが国の実験動物施設における MuAstV 保有率調査を行い、分布状況を明らかにすると共に、実験動物であるマウスへの病原性の有無を明らかにすることを目的とした。

第一章では、わが国の実験動物施設における MuAstV の遺伝子検出率を調査した。MuAstV Polymerase chain reaction (PCR) 陽性マウスについては肉眼的、病理組織学的解析を行い、病原性との関連を調査した。第二章では、重度免疫不全動物である NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*IL2rg*^{tm1Sug}/ShiJic (NOG) マウスを用いた MuAstV 感染実験を行い、病原性との関連を検討した。第三章では、実験動物施設における MuAstV の拡散防止の観点から、免疫正常動物である IQI/Jic (IQI) マウスおよび重度免疫不全動物である NOG マウスを用いて MuAstV 感染実験により、感染

伝播に関する研究を行った。

表 I. 実験動物施設におけるマウスの代表的な致死性のウイルスおよび近年検出される不顕性感染を起こすウイルス

特徴	ウイルス	症状	引用 文献
激しい症状, 致死的	Sendai virus	呼吸器症状	(31)
	Ectromelia (Mouse pox) virus	皮膚症状	(47)
	Mouse hepatitis virus 強毒株	肝炎・脳炎・腸炎	(6)
近年日本国内で報告 される不顕性感染	Mouse hepatitis virus 弱毒株	不顕性	(21, 36)
	Murine norovirus	不顕性 (一部の系統に対し致死的)	(21, 27)
	Murine astrovirus	不顕性	(8, 37)

表Ⅱ. マウスにおいて近年発見された微生物

微生物	発見年代	由来マウス	発見時の検出法	引用 文献
<i>Helicobacter hepaticus</i>	1994	SCID / NCr マウス	培養法	(15)
Murine norovirus	2003	RAG/STAT1 ^{-/-}	ウイルス遺伝子解析	(27)
Murine astrovirus	2011	野生ハツカネズミ	ウイルス遺伝子解析	(40)

第一章

わが国の実験動物施設におけるマウスアストロウイルス (MuAstV) の感染状況調査

序論

アストロウイルスは、エンベロープを持たない一本鎖のプラス (+) 鎖 RNA ウイルスであり (11), 哺乳類に感染する Mamastroviruses (MAstV) と, 鳥類に感染する Avastroviruses (AAstV) の 2 つに分類される (11)。アストロウイルスはさまざまな哺乳類や鳥類に感染し, 下痢や腸炎などの胃腸疾患を引き起こすとの報告がある (11, 24)。また, 胃腸疾患の他, 脳炎や髄膜炎などの発症に関与するとの報告もある (1, 3, 32, 41)。

このうち MAstV に分類されるマウスアストロウイルス (MuAstV) は近年発見されたマウスにおけるアストロウイルスである。胃腸疾患などの症状や病変が確認されていないため (8, 9, 37), 感染症例報告はない。MuAstV は各国の実験動物施設のマウスにおいて頻繁に検出されているが (37, 43), わが国においては感染状況に関する報告は少ない (37)。そこで MuAstV の感染状況を明らかにするために, わが国の実験動物施設のマウスについて MuAstV 遺伝子の保有率を調査した。MuAstV の病原性を調べたこれまでの論文では, 特定の近交系マウスを対象とした調査が行われた (8)。一般に, ウイルスの感受性は実験動物のマウスの系統ごとに差があることが知られていることから (39), 本章では Central Institute for Experimental Animals (CIEA) International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) モニタリングセンター (川崎市) にて微生物学的モニタリング検査が行われた異なる系統のマウスに対し MuAstV PCR を実施し, 陽性個体について病理組織学的手法により病原性との関連を検討した。

材料と方法

1. 供試検体

試料群 1

わが国の実験動物施設における MuAstV の保有率調査の対象として、2016 年 10 月～12 月に CIEA ICLAS モニタリングセンターで微生物学的モニタリング検査を実施した全国の大学、研究所、製薬会社、委託研究機関 226 施設由来の計 1,212 匹 (免疫正常マウス：1,183 匹、免疫不全マウス：29 匹) を用いた。

試料群 2

MuAstV 病原性調査の対象として、2019 年 11 月～12 月に CIEA ICLAS モニタリングセンターで微生物学的モニタリング検査を実施した国内の実験動物施設 29 施設由来の ICR 系統：19 匹、BALB / c 系統：9 匹、C57BL / 6J 系統：4 匹、BALB / c-nu / +系統：15 匹、BALB / c-nu / nu 系統：4 匹、SCID- beige 系統：8 匹、NOG 系統：11 匹、IQI 系統：8 匹、系統不明：23 匹、合計 101 匹のマウスを用いた。

なお、この研究には、商業ブリーダーのマウスは含まれていない。

2. 材料の採取

イソフルラン麻酔下、腋窩動静脈から放血により安楽死させた。対象とした全てのマウスについて剖検を行い肉眼観察を行った後、PCR 用試料として腸内容物を含む盲腸を採取し、使用まで -80℃で保存した。盲腸は腸内容物が貯留している部位であり、目的の腸管内ウイルスを保有している可能性が高く、かつ各個体の同一部位を採取することが容易であるため、PCR 用試料として選択した。また、病理組織学的解析のため小腸中部および下部 (1 cm) を採取し、10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、使用まで 25℃で保存した。

3. マウスの微生物学的モニタリング検査

MuAstV の保有率調査に使用したマウスについては以下の微生物検査を実施した。検査のプロトコルは既報 (21) の通りである。

培養検査 : *Citrobacter rodentium*, *Corynebacterium kutscheri*, *Mycoplasma pulmonis*, *Salmonella* spp.

抗体検査 (免疫不全マウスを除く) : *Clostridium piliforme*, Ectromelia virus, Lymphocytic choriomeningitis virus, Mouse hepatitis virus (MHV), *Mycoplasma pulmonis*, Sendai virus

鏡検 : Intestinal protozoa, Pinworms (*Aspicularis* sp., *Syphacia* sp.), 外部寄生虫。

PCR: *Helicobacter hepaticus*, *H.bilis*

4. MuAstV PCR

盲腸試料から, RNA iso (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) を使用して RNA を抽出した。Prime Script One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Takara Bio Inc) を用いて逆転写反応を行い cDNA を調製し, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 遺伝子を標的としたプライマー MuAstV-BF (5'-GAATTTGACTGGACACGCTTTGA-3') および MuAstV-BR (5'-GGTTTAACCCACATGCCAAA-3') を用いて MuAstV 遺伝子を検出した。サーマルサイクラー (TP600, TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice, Takara Bio Inc.) を用い, 増幅プログラムは, 50°C 30 分, 94°C 2 分の後, 94°C 30 秒, 58°C 30 秒 (1 サイクルあたり 0.2°C ずつ漸減), 72°C 1 分, 45 サイクルとした。PCR 産物 419 bp を 2.5% アガロースゲル電気泳動により解析した。

MuAstV PCR 陽性サンプルについて PCR 産物のシーケンス解析により塩基配列を決定した。

5. 病理組織学的解析

盲腸試料を用いて MuAstV PCR を実施し、陽性が確認されたマウス、および陰性が確認されたマウスそれぞれについて小腸中部および下部の病理組織学的解析を実施した。標準的な手順に従い、組織試料を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した上、パラフィンに包埋し、ヘマトキシリンおよびエオジン (HE) で染色した。

6. 統計解析

免疫正常および免疫不全マウスにおける MuAstV PCR 陽性率を、 χ^2 検定にて検定を行った。また、MuAstV PCR 陽性および陰性個体におけるモニタリング検査項目陽性率についても、 χ^2 検定を行った。それぞれ $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと見なした。

7. 動物実験倫理

この実験は動物実験の適切な実施のためのガイドライン (日本学術会議, 2006 年, URL: <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>) に基づき、CIEA の動物実験に関する規則に従って実施された。実験プロトコルは、CIEA の動物実験委員会によって承認された (承認番号 15068A, 18077A)。

結果

1. わが国の実験動物施設における MuAstV PCR 陽性率

226 施設由来 1,212 匹のマウス (試料群 1) について MuAstV PCR を実施した結果, 226 施設中 118 施設 (52.2%), 1,212 匹中 424 匹 (35.0%) が MuAstV PCR 陽性であった (表 1, 2)。このうち免疫正常マウスでは, 1,183 匹中 413 匹が陽性 (34.9%), 免疫不全マウスでは, 29 匹中 11 匹が陽性 (37.9%) であった。免疫正常マウス, 免疫不全マウスのいずれにおいても臨床症状および肉眼的病変は観察されなかった。MuAstV 陽性率を免疫正常マウスと免疫不全マウスで比較したところ, 有意差は認められなかった (χ^2 検定)。

2. 微生物学的モニタリング検査

試料群 1 の 1,212 匹のマウスについて微生物学的モニタリング検査を実施したところ, 培養, 抗体検査ともにすべて陰性であり, 検査項目にある腸内病原性細菌およびウイルスを保有していないことが確認された。しかし, MuAstV PCR 陽性を呈した 424 匹のマウスについて十二指腸, 盲腸の鏡検を実施したところ, 27 匹 (6.4%) に非病原性消化管内原虫の存在が確認された。また, 盲腸, 肛門周囲の鏡検観察および直腸の生理食塩水浮遊法の結果, 6 匹 (1.4%) で蟯虫が確認され, その内訳は *Aspiculuris tetraptera* (0.9%) が 4 匹, *Syphacia obvelata* (0.5%) が 2 匹であることが形態観察により確認された。MuAstV PCR 陰性の 788 匹についても同様に鏡検観察を行ったところ, 34 匹 (4.3%) で非病原性消化管内原虫の存在が確認された。また, 4 匹 (0.5%) で蟯虫が検出され, 内訳は *Aspiculuris tetraptera* (0.1%) が 1 匹, *Syphacia obvelata* (0.4%) が 3 匹であった。*Helicobacter hepaticus* は MuAstV PCR 陽性の 424 匹中 6 匹 (1.4%), MuAstV PCR 陰性の 788 匹中 6 匹 (0.8%) で検出された (表 3)。

3. MuAstV の病原性に関する病理組織学的検討

試料群 2 の 101 匹のマウスに対する PCR の結果, 101 匹中 42 匹 (41.6%) で MuAstV が検出された。これらの内 MuAstV 陽性マウスの系統内訳は, ICR 系統 : 12 匹 (12/19 匹: 63.2%), BALB / c 系統 : 6 匹 (6/9 匹:66.7%), C57BL / 6J 系統 : 4 匹 (4/4 匹: 100%), BALB / c-nu / + 系統 : 5 匹 (5/15 匹: 33.3%), BALB / c-nu / nu 系統 : 4 匹 (4/4 匹: 100%), SCID- beige 系統 : 8 匹 (8/8: 100%), NOG 系統 : 3 匹 (3/11: 27.3%) であった (表 4)。これらの MuAstV 陽性マウスについて小腸中部および下部の病理組織学的解析を実施するとともに, MuAstV PCR 陰性のマウス 11 匹についても, 対照として同様の病理組織学的解析を実施した。いずれの個体においてもマウスの外観に異常はなく, 臨床症状は認められなかった。更に, 剖検所見および病理組織学的解析でも異常所見は認められなかった。

考察

2013 年に初めてわが国の実験動物施設において MuAstV の存在が報告された (37)。本研究では、調査対象施設数とサンプル数を増やし、さらに、他の微生物感染との関連について調査を行った。既報では実験動物施設数およびサンプル数が限定的であったのに対し、本研究では多数の実験動物施設由来のサンプルでの調査を行い、結果は国内の感染状況をより反映していると考えられる。

2013 年の林元らの報告によると、わが国の実験動物マウスで最も陽性率が高いウイルスはマウスノロウイルス (MNV) の 11.9% であり、MHV がそれに続く 0.68% の陽性率であるとされている (21)。本研究により MuAstV の陽性率は MNV よりも約 3 倍高い 35.0% であった。施設陽性率は 52.2% とわが国の半数以上の実験動物施設で MuAstV が検出されたことになる (表 1, 2)。この結果は MuAstV が微生物学的モニタリング検査項目として検査されておらず、統御対象とされてこなかったことに起因すると推察される。また、米国ではブリーダーのマウスからも検出されていることや (37)、野生のハツカネズミからも検出されていることから (40)、元々ある程度のマウスが MuAstV を保有しており、更にマウスにおける微生物として統御対象となっていない事により MuAstV 感染が広まっていると推察される。

実験動物のマウスは、一定の温度・湿度で飼育されるため、今回確認された MuAstV の陽性率は季節性のものではないと考えられる。本研究では、免疫正常マウスと免疫不全マウスの間で MuAstV 陽性率に有意差は認められなかった。一方、獲得免疫が MuAstV の制御に関与するとの報告もある (49) ことから、免疫正常および免疫不全マウスにおける MuAstV 陽性率を確定するには、さらなる調査が必要である。

本調査で MuAstV 陽性となった試料群 1 の 424 匹のうち 27 匹 (6.4%)、およ

び MuAstV 陰性マウス 788 匹のうち 34 匹 (4.3%)で消化管内原虫が検出されたが、これらの間には有意差は認められなかった (表 3)。消化管内原虫陽性施設は、マウスにおける他の微生物の陽性率も比較的高い傾向があることが知られているため、消化管内原虫は実験動物施設またはマウス自体の微生物学的品質の指標とされている (30)。わが国の実験動物施設のマウスはその微生物学的品質に関わらず、MuAstV を広く保有している可能性が考えられた。

更に病原性調査のため国内の実験動物施設 29 施設から異なる系統 (8 系統および系統不明) のマウス 101 匹を収集し (試料群 2), 42 匹 (免疫正常および免疫不全マウスを含む) の MuAstV PCR 陽性個体を特定し小腸組織の病変について病理組織学的解析を行ったところ、MuAstV PCR 陽性マウスについては臨床症状および剖検において異常所見は認められず、小腸中部および下部の病理組織学的解析においても異常所見は認められなかった。これらの結果から、MuAstV PCR 陽性マウスについては免疫正常および免疫不全マウスのいずれにおいても病原性を示さない、あるいは検出できない程度であると考えられた。しかし、腸管内ウイルスの病原性は、腸内細菌との相互作用によって促進または抑制される可能性があることも報告されており (25, 26, 50), それらの影響を排除して MuAstV の病原性を調べるためには、腸内細菌を保有しない無菌マウスを使用した感染実験が必要であると考えられた。

以上より、MuAstV はわが国の実験動物のマウスにおいて、その免疫不全度や微生物学的な品質に関わらず、高い陽性率であることが明らかとなった。

MuAstV PCR 陽性マウスにおいては病変が認められなかったが、さらなる病原性の確認のために、次章では無菌マウスを用い感染実験を行うこととした。

表 1. わが国の実験動物施設における MuAstV PCR 陽性率 (2016 年 10 月～12 月)

	検査数	陽性数	陽性率 (%)
実験動物施設	226	118	52.2

表 2. わが国の実験動物施設における微生物学的モニタリング検査動物の MuAstV
PCR 陽性率 (2016 年 10 月～12 月)

	個体数	陽性数	陽性率 (%)	
マウス	1,212	424	35.0	
免疫正常	1,183	413	34.9	} n.s.
免疫不全	29	11	37.9	

n.s.: not significant, χ^2 test ($P>0.05$)

表 3. MuAstV PCR 対象マウスの微生物学的モニタリング検査結果

検査法	検査項目	MuAstV 陽性個体 (n=424)	MuAstV 陰性個体 (n=788)	χ^2 検定
培養	<i>Citrobacter rodentium</i>	0	0	
	<i>Corynebacterium kutscheri</i>	0	0	
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	0	0	
	<i>Salmonella</i> spp.	0	0	
抗体	<i>Clostridium piliforme</i>	0	0	
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	0	0	
	Sendai virus	0	0	
	Ectromelia virus	0	0	
	Lymphocytic choriomeningitis virus	0	0	
	Mouse hepatitis virus	0	0	
鏡検	Intestinal protozoa	27 (6.4%)	34 (4.3%)	n.s.
	Amoeba	12 (2.8%)	16 (2.0%)	n.s.
	<i>Chilomastix</i> sp.	4 (0.9%)	2 (0.3%)	n.s.
	<i>Giardia</i> sp.	0	0	
	<i>Octomitus</i> sp.	13 (3.1%)	14 (1.8%)	n.s.
	<i>Spiroplasma</i> sp.	0	0	
	Trichomonad	4 (0.9%)	4 (0.5%)	n.s.
	Ectoparasite	0	0	
	Pinworm	6 (1.4%)	4 (0.5%)	n.s.
	<i>Aspicularis</i> sp.	4 (0.9%)	1 (0.1%)	P<0.05
	<i>Syphacia</i> sp.	2 (0.5%)	3 (0.4%)	n.s.
PCR	<i>Helicobacter bilis</i>	0	0	
	<i>Helicobacter hepaticus</i>	6 (1.4%)	6 (0.8%)	n.s.

n.s.: not significant

表 4. 試料群 2 における各マウス系統の MuAstV PCR 結果

系統	検査匹数	陽性数 (%)
ICR	19	12 (63.2)
BALB/c	9	6 (66.7)
C57BL/6J	4	4 (100)
BALB/c-nu/+	15	5 (33.3)
BALB/c-nu/nu	4	4 (100)
SCID-beige	8	8 (100)
NOG	11	3 (27.3)
IQI	8	0 (0)
不明	23	0 (0)
計	101	42 (41.6)

第二章

MuAstV の病原性に関する研究

序論

MuAstV は、近年各国の実験動物施設のマウスで頻繁に検出されている (37, 43)。第一章ではわが国の実験動物施設における感染状況調査を実施し、実験動物施設の約半数 (52.5%) から MuAstV が検出されており、個体陽性率も 35.0% と高いことを明らかにした。

MuAstV 感染は、Nod-like receptor 3 (NLRP3) 欠損マウスのデキストラン硫酸誘発性大腸炎モデルに影響を与えないことが報告されている (7)。一方、MuAstV に感染させた C57BL / 6 マウスと IFN α R マウスはどちらも、感染していない対照群マウスに比べ腸透過性が高く、IFN α R マウスは透過性が大幅に増加したことが報告されている (33)。

これまでにマウスにおける MuAstV 感染では胃腸疾患などの症状や病変が確認されていないため (8, 9, 37)、感染症例報告はない。特に免疫不全マウスにおける病原性を調査した例は少なく (37)、病原性については依然として不明である。そこで、本章では MuAstV の病原性を明らかにするために、T 細胞, B 細胞, NK 細胞, マクロファージおよび樹状細胞の機能不全, 補体活性の機能を欠く重度免疫不全である NOG マウス (23) を用いて MuAstV 感染実験を行い、MuAstV 接種後の各臓器を採取し定性 PCR, 定量 PCR, 病理組織学的解析, 腸管組織の電子顕微鏡観察を行い、病原性との関連を検討した。また、腸管内ウイルスの病原性は、腸内細菌との相互作用によって促進または抑制される可能性があるため (25, 26, 50)、本研究においては細菌を体表・体内に一切保有していない無菌マウスを用いた。

材料と方法

1. 実験動物と飼育環境

感染実験には腸内細菌の影響を排除するため CIEA の繁殖コロニーから入手した無菌状態で飼育されている NOG マウス 4 週齢, 雌を用いた。NOG マウスは重度の免疫不全動物であり, T 細胞, B 細胞, NK 細胞, マクロファージおよび樹状細胞の機能不全, 補体活性の欠失により, 異種細胞を高率に生着させることが可能である (23)。MuAstV 接種群 (実験感染群) ($n = 12$) と対照群 ($n = 12$) の 2 群に分け, それぞれを別々の滅菌されたビニールアイソレーターで飼育した。マウスを個体識別し, 各ケージに 3 匹ずつ収容した。マウスおよび滅菌飼料, 水, その他の物品は全て, ステリールロックを介して無菌的に出し入れを行った。全てのマウスから実験前に糞便を採取し, 第一章で用いた PCR 法により, MuAstV を保有しないことを確認した。また, 実験の前後にはビニールアイソレーター内の拭取り, 床敷, 動物の糞便についての培養法による無菌検査を実施し, 実験期間中の無菌状態を確認した。

2. MuAstV 含有液の調製

2017 年 11 月～2018 年 12 月に CIEA ICLAS モニタリングセンターで微生物学的モニタリング検査を実施した NOG マウスについて MuAstV の PCR を実施し, 同一実験動物施設に由来する MuAstV 陽性個体 18 匹を選抜した。MuAstV 含有液の調製は, 18 匹の MuAstV 陽性個体の盲腸に 0.96% phosphate-buffered saline (PBS) を加えホモジェネートを調製し, 204,100 g, 5 分遠心分離および上清の回収を 5 回繰返し, $0.2 \mu\text{m}$ フィルターによるろ過滅菌にて調製した。調製した MuAstV 含有液は使用まで -80°C にて保存した。MuAstV 含有液 (100 μl) には, 2.9×10^9 分子の MuAstV RNA が含まれていることを後述する定量 PCR により確

認した。

陰性対照液の調製には、2017 年 11 月から 2018 年 12 月に CIEA ICLAS モニタリングセンターで微生物学的モニタリング検査を実施した NOG マウスのうち、MuAstV PCR 陰性を示した 16 個体の盲腸ホモジェネートを使用し上述した方法で作製した。

調製した MuAstV 含有液および陰性対照液の無菌性を確認するため、血液寒天培地 (E-MP23, 栄研化学株式会社, 東京, 日本) に 100 μ l 塗抹し、37°C、48 時間培養して細菌の発育が見られないことを確認した。更に、表 5 に示す微生物学的モニタリング検査項目について PCR を実施し (4, 16, 17, 19, 20, 22, 38, 46), 全て陰性であることを確認した (表 5)。

調製した MuAstV 含有液について PCR 産物の RdRp 遺伝子塩基配列解析 (第一章参照) を行い、得られた配列を basic local alignment search tool (BLAST) 検索して MuAstV BSRI1 株 (Accession No. KC609001) と 97.82%~98.76%の相同性であることを確認した。

3. 感染実験計画

感染実験には 4 週齢の雌 NOG マウスを 24 匹用いた。マウスを感染群と対照群それぞれ 12 匹の実験群に分けた。実験感染群には MuAstV 含有液 100 μ l を経口接種し、対照群には陰性対照液 100 μ l を経口接種した。実験感染の成立、および病原性の確認のため、各接種 4 日および 28 日後に各群 6 匹のマウスを安楽殺し、前胃、腺胃、十二指腸、小腸上部、小腸中部、小腸下部、盲腸、結腸、直腸、肝臓、脾臓、腎臓、および血液を採取した。血液は心臓穿刺により回収した。MuAstV PCR に供する胃および腸管試料は滅菌 PBS で洗浄し、内容物を除去して使用まで-80°Cで保存した。病理組織学的解析に供する試料は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、使用まで 25°Cで保存した。小腸については十二指腸下部か

ら盲腸までを 3 等分にし、各中央部をそれぞれ小腸上部、小腸中部、小腸下部とした。透過型電子顕微鏡観察に供する小腸試料は、2%パラホルムアルデヒドと2%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液で固定した。

4. MuAstV の PCR による定性法と定量法

すべての臓器および血液試料における MuAstV 保有状況をスクリーニングするため、MuAstV 定性 PCR を実施した。すべての試料をホモジェナイズした後、RNA iso (Takara Bio Inc.) を使用して RNA を抽出した。定性 PCR 法は第一章に前述の通りである。

次に各試料における MuAstV 量を測定するため、各試料 RNA 50 ng を用い、定量 PCR 法により MuAstV RNA 量を測定した。MuAstV の定量 PCR は、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green RT-qPCR マスターミックス (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) と MuAstV-BF および MuAstV-BR プライマーを用い、7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific K. K., Tokyo, Japan) にて増幅反応を行った。増幅は、50°C 10 分、95°C 3 分; 95°C 5 秒、58°C 30 秒 (1 サイクルあたり 0.2°C ずつ減少)、72°C 30 秒で 40 サイクルのプログラムで行った。試料 RNA 1ng あたりの MuAstV RNA 量は、プラスミドへのクローニングにより作製した既知濃度の標的遺伝子断片を用いて作成した検量線から求めた (7500 Software v2.3, Thermo Fisher Scientific K. K.)。

5. 病理組織学的解析

採取した前胃、腺胃、十二指腸、小腸上部、小腸中部、小腸下部、盲腸、結腸、直腸、肝臓、脾臓、および腎臓試料から、常法に従いパラフィン切片を作製しヘマトキシリンおよびエオジン (HE) 染色にて病理組織学的解析を行った。小腸下部については、HE 染色画像を Nano Zoomer (浜松ホトニクス株式会社、浜松、

日本) で取り込み, NDP.view2 ソフトウェア (浜松ホトニクス株式会社) にて, 絨毛と陰窩の長さと深さをそれぞれ測定した。各スライドの平均絨毛長および平均陰窩深さについて, 対応のない t 検定にて 2 群間比較を行った。p<0.05 を統計学的有意差ありと見なした。

6. 透過型電子顕微鏡による観察

透過型電子顕微鏡観察用組織試料は, 2%パラホルムアルデヒド, 2%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液で 4℃にてオーバーナイトで固定したあと, 2%四酸化オスミウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液で 2 時間氷温浴で後固定した。固定した試料を段階的エタノールで脱水し, エポキシ樹脂に包埋した。ウルトラミクロトーム (2088 ULTRROTOME V, LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) で超薄切片を作製し, 酢酸ウラニルで 15 分間, 鉛染色液で 5 分間染色した後, 透過型電子顕微鏡 (100 kV, HITACHI H-7600, Tokyo, Japan) により観察を行った。

7. 動物実験倫理

この実験は動物実験の適切な実施のためのガイドライン (日本学術会議, 2006 年, URL: <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>) に基づき, CIEA の動物実験に関する規則に厳密に従って実施された。実験プロトコルは, CIEA の動物実験委員会によって承認された (承認番号 18035A)。

結果

1. 無菌 NOG マウスにおける MuAstV の実験感染モデルの確立

MuAstV 含有液接種 4 日および 28 日後の MuAstV 遺伝子検出状況を表 6 に示す。

MuAstV 含有液接種 4 日後，十二指腸，小腸，盲腸，結腸および肝臓，腎臓では実験感染群 6 匹すべての個体で MuAstV PCR 陽性が確認された。一方，直腸と脾臓では MuAstV PCR 陽性となったのはそれぞれ 1 匹ずつであった。接種 28 日では，十二指腸，小腸，盲腸，結腸に加え，前胃および腎臓，血液でも実験感染群の 6 匹全てで MuAstV PCR 陽性が確認された (表 6)。一方，対照群で MuAstV PCR 陽性個体は認められなかった。

MuAstV PCR 陽性試料について RNA 1 ng あたりの MuAstV RNA 量を定量 PCR 法により測定したところ，接種 4 日および 28 日後のいずれにおいても小腸下部で最も高値であった。小腸下部の MuAstV RNA 量は，接種 4 日後における 6 個体の平均値が 21,769 molecules /ng RNA であったのに対し，接種 28 日後の 6 個体の平均値は 166,760 molecules /ng RNA となり，接種 4 日後に比べ接種 28 日後には 7.7 倍に増加していることが示された (図 1)。

接種 4 日および 28 日後において，マウスの外観に異常はなく，臨床症状も示さなかった。剖検所見においても全てのマウスで肉眼的な異常は認められなかった。

2. 病理組織学的解析

MuAstV 含有液接種により作製した実験感染無菌 NOG マウスでは，前胃，腺胃，十二指腸，小腸上部，小腸中部，小腸下部，盲腸，結腸，直腸，肝臓，脾臓，および腎臓に病理組織学的な異常所見は認められなかった (図 2)。実験感染群

の小腸下部の絨毛の長さ、陰窩の深さ、および絨毛/陰窩の比率を対照群と比較したところ、接種 4 日および 28 日後のいずれにおいても対照群との間に有意差は認められなかった (図 2, 3)。

3. 小腸下部の透過型電子顕微鏡観察

MuAstV RNA 量が最も高値を示した小腸下部について透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、接種 4 日および 28 日後のいずれにおいても小腸下部上皮細胞の細胞質内にウイルス粒子の存在を確認した。円形のウイルス粒子は直径約 25 nm の電子密度の高い凝集体として観察された (図 4)。

考察

無菌状態で飼育されている重度免疫不全動物である NOG マウスを用いた感染実験により MuAstV の病原性解明を試みた。MuAstV は、多くの株が報告されているが、本研究では、わが国における代表的な MuAstV の性状を調べるため、最も多く検出されている BSRI1 株 (Accession No. KC609001) と相同性の高いウイルスを含むサンプルを収集し、感染実験に使用した。MuAstV 含有液接種 4 日後の MuAstV PCR では、直腸を除く腸管 (十二指腸, 小腸, 盲腸, 結腸) および肝臓, 腎臓において、全個体で MuAstV が検出された。一方、血液では 6 匹中 4 匹で MuAstV が検出された (表 6)。接種 28 日後では直腸を除く腸管, および前胃, 腎臓, 血液において全個体で MuAstV が検出された (表 6)。RNA 1 ng あたりの MuAstV RNA 量は MuAstV 含有液接種後の期間を問わず小腸下部で最も多く、接種 4 日後から 28 日後に約 8 倍増加したことが明らかとなった (図 1)。これらの結果から無菌 NOG マウスにおいて MuAstV は主に小腸下部で増殖することが推察された。消化管以外の臓器では MuAstV RNA 量は比較的少ないものの、多くの臓器から MuAstV が検出された。また、血液において接種 4 日後で 6 匹中 4 匹、接種 28 日後では全ての個体で MuAstV の存在が確認されており、これらの結果から小腸下部で増殖した MuAstV が血液を介して全身に広まったものと推察された。Rag1^{-/-} マウスの MuAstV PCR 陽性個体では MuAstV RNA 量は十二指腸で最も高いことが報告されている (49)。しかし、この実験では腸内容物に存在する MuAstV の影響が考慮されていない。そのため、本研究では、腸内容物に含まれる MuAstV の影響を極力避けるため、腸の内容物を滅菌 PBS で除去した後に PCR を実施したため、腸管細胞に感染した MuAstV の定量について、より信頼性の高いデータが得られていると考えられる。

定量 PCR で、MuAstV RNA 量が最も多かった小腸下部について透過型電子顕

微鏡観察を行った結果、絨毛上皮細胞の細胞質内に直径約 25 nm の円形ウイルス粒子およびその凝集体が確認された (図 4)。アストロウイルスは、星状の外観を特徴とする直径約 30 nm の粒子であるが (12)、星状のウイルス粒子は観察されないこともある (5, 18, 44, 48) と報告されていることから、本研究によるウイルス粒子の観察結果は、他の動物におけるアストロウイルスの透過型電子顕微鏡観察結果と一致していた。組織内のウイルスの局在については免疫染色による更なる確認が必要であるが、本研究における透過型電子顕微鏡観察の結果はヒト、ブタ、ヒツジ、および七面鳥の腸絨毛上皮細胞におけるアストロウイルス感染に関する以前の報告結果と一致しており (2, 14, 44, 45)、マウスでも MuAstV は小腸下部の特に絨毛上皮細胞で増殖するものと考えられた。

MuAstV 含有液接種後、臨床症状は示さず、また、剖検および病理組織学的解析においても異常所見は認められなかった (図 2)。更に、小腸下部の絨毛の長さ、陰窩の深さ、および絨毛/陰窩の比率は、MuAstV 含有液接種 4 日および 28 日後のいずれにおいても陰性対照群との間に有意差は認められなかった (図 3)。本研究の結果から無菌の重度免疫不全マウスにおいても MuAstV は肉眼的、組織学的な病変を形成しないことが明らかとなり、MuAstV に感染した免疫不全マウスにおいて病変は認められないとする以前の報告 (37) と一致した。腸管に感染するウイルスであるロタウイルスは、絨毛上皮細胞を破壊し、絨毛委縮を引き起こすが (10, 13)、アストロウイルスは細胞傷害を引き起こさないことが報告されており (9, 29, 34)、細胞死を伴わず、腸絨毛の萎縮など腸管に組織学的な影響を与えないと推察される。

以上より、本研究においては無菌の重度免疫不全動物である NOG マウスにおいて MuAstV は小腸下部の絨毛上皮細胞で増殖するものの、肉眼的、病理組織学的には病原性を示さない、あるいは検出できない程度であると考えられた。

MuAstV 感染は, NLRP3 欠損マウスのデキストラン硫酸誘発性大腸炎モデルに影響を与えないことが報告されている (7)。一方, MuAstV 増殖の抑制に自然免疫が関与しており (49), MuAstV はマウスの腸透過性を高めることも示されている (33)。また, 既報において実験動物飼育環境における温湿度の大幅な変動または重い実験的ストレスによってウイルスの病原性が増強される可能性も示唆されている (28)。環境ストレスや実験的ストレスによる発症の可能性については今後更なる研究が必要である。

表 5. MuAstV 含有液および陰性対照液の微生物学的モニタリング検査項目の PCR 結果

検査項目	MuAstV 含有液	陰性対照液
Ectromelia virus	—	—
Lactate dehydrogenase-elevating virus	—	—
Lymphocytic choriomeningitis virus	—	—
Mouse adenovirus type1	—	—
Mouse cytomegalovirus	—	—
Mouse encephalomyelitis virus	—	—
Mouse hepatitis virus	—	—
Mouse minute virus	—	—
Murine norovirus	—	—
Mouse parvovirus	—	—
Mouse rotavirus	—	—
Pneumonia virus of mice	—	—
Polyoma virus	—	—
Reovirus type 3	—	—
Sendai virus	—	—
<i>Clostridium piliforme</i>	—	—
<i>Filobacterium rodentium</i>	—	—
<i>Helicobacter bilis</i>	—	—
<i>Helicobacter hepaticus</i>	—	—
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	—	—
<i>Pneumocystis</i> spp.	—	—
<i>Aspicularis tetraptera</i>	—	—
<i>Syphacia obvelata</i>	—	—
<i>Entamoeba muris</i>	—	—

表 6. MuAstV 含有液接種 4 日および 28 日後の各臓器における MuAstV PCR 結果

臓器	接種 4 日後						接種 28 日後					
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
前胃	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
腺胃	+	+	—	—	+	—	+	+	—	+	+	+
十二指腸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
小腸上部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
小腸中部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
小腸下部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
盲腸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
結腸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
直腸	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+
肝臓	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
腎臓	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脾臓	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	+	—
血液	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
骨髓	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	+	+	+	—	+
脳	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	+	—	+	+	+

NT: not tested

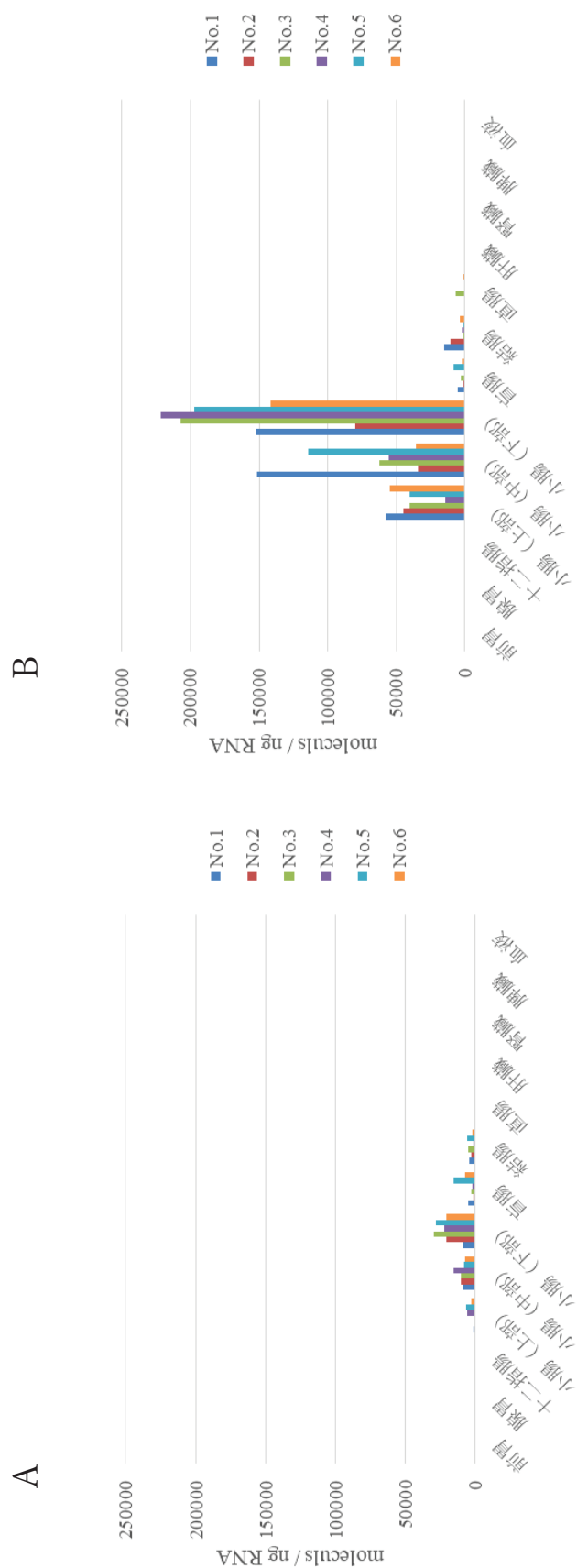


図 1. MuAstV 含有液接種後の各臓器における MuAstV RNA 量の比較

A) 接種 4 日後, B) 接種 28 日後

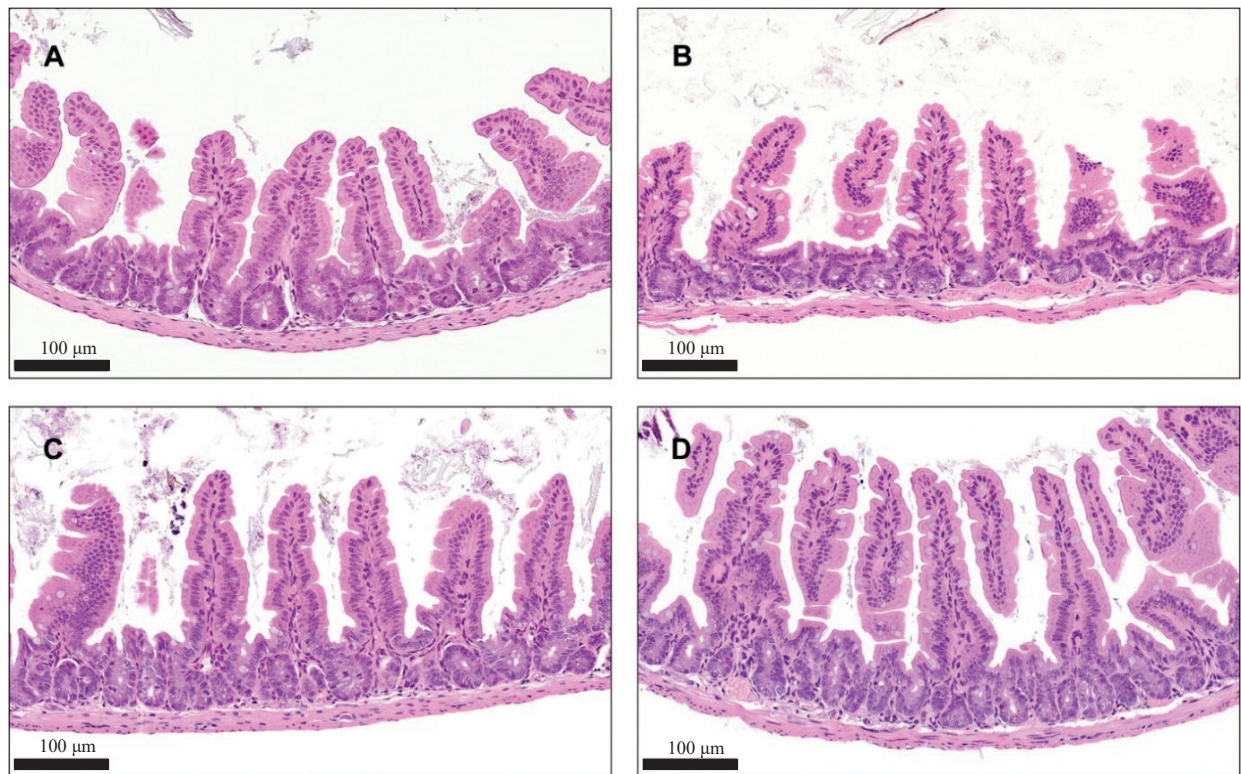


図 2. 小腸下部の病理組織学的解析

(A) 実験感染群, MuAstV 含有液接種 4 日後。(B) 対照群, 陰性対照液接種 4 日後。(C) 実験感染群, 接種 28 日後。(D) 対照群, 接種 28 日後。いずれにおいても病理組織学的に著変は認められなかった。HE 染色。

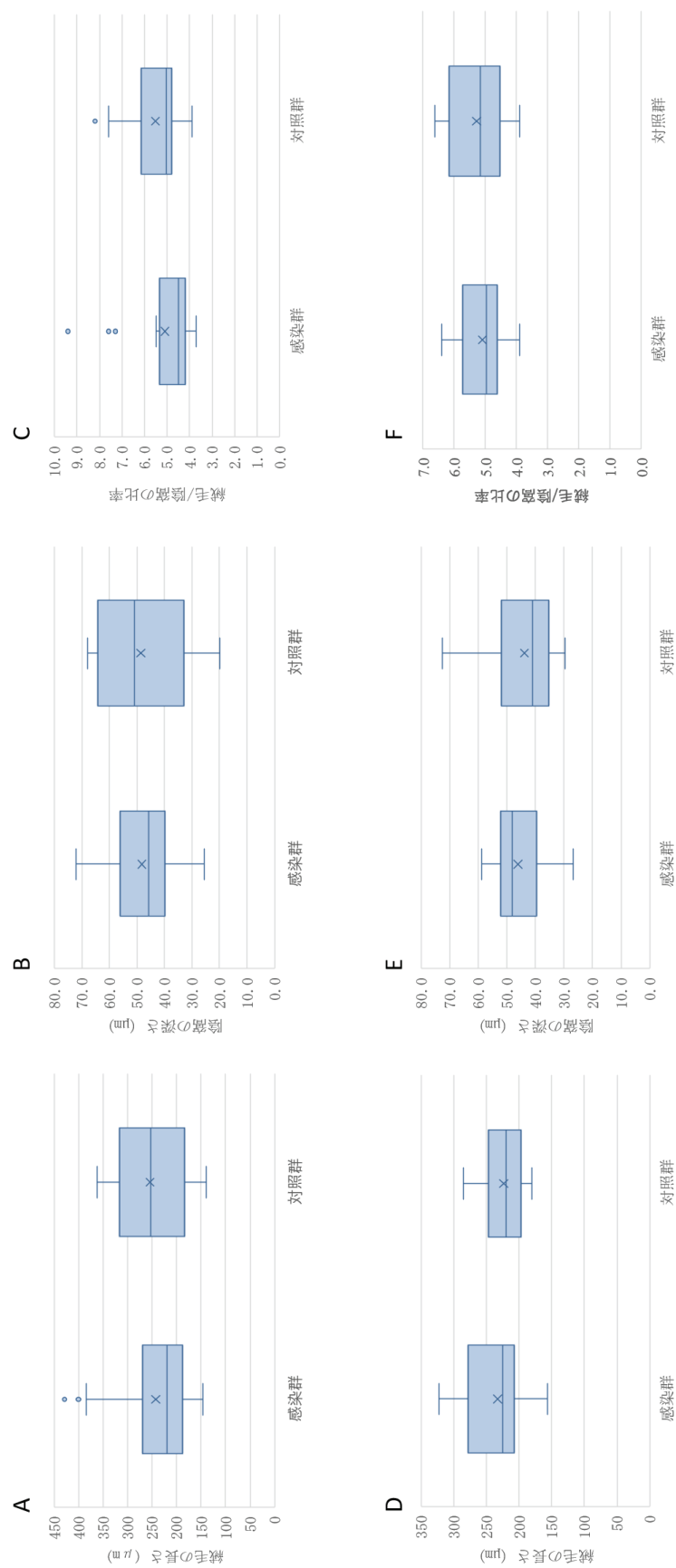


図 3. 絨毛の長さ、陰窩の深さおよび絨毛/陰窩比率の比較

(A-C): 接種 4 日後: 絨毛の長さ (A), 陰窩の深さ (B), 絨毛/陰窩の比率 (C)
 (D-F): 接種 28 日後: 絨毛の長さ (D), 陰窩の深さ (E), 絨毛/陰窩の比率 (F)

感染群と対照群の間に有意差は認められなかった。

○: 他の値から大きく外れた値, ×: 集団の平均値, バー: 最大値および最小値を示す。

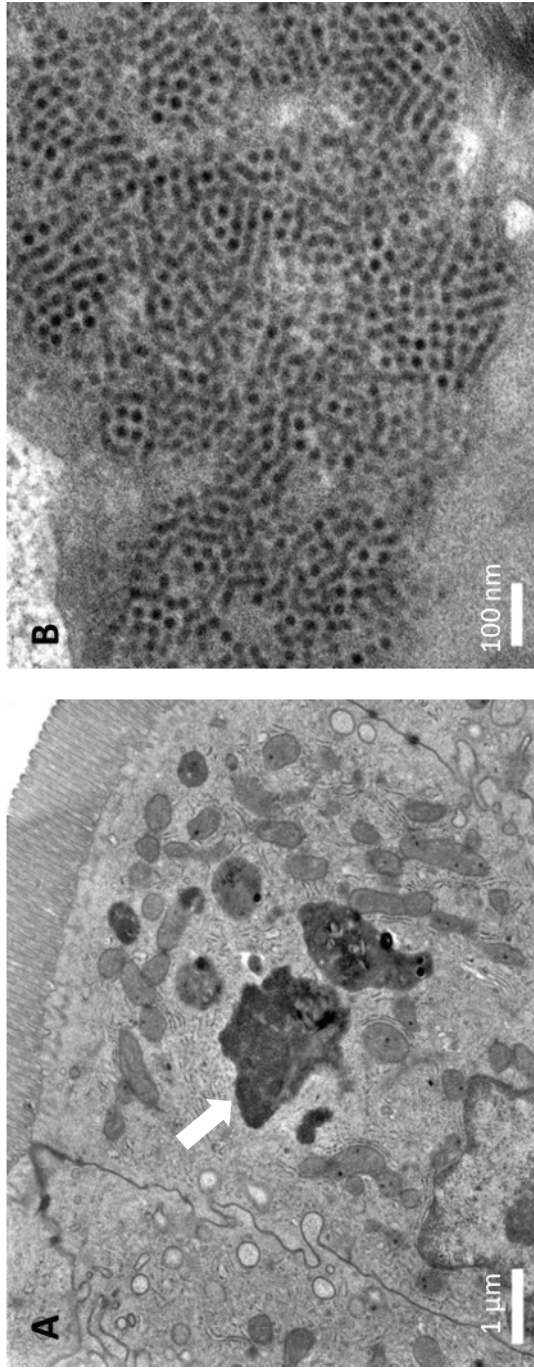


図 4. 小腸下部の絨毛上皮細胞の透過型電子顕微鏡像
MuAstV 含有液接種 28 日後の小腸下部の透過電子顕微鏡観察像を示す。
(A) 矢印は絨毛上皮細胞の細胞質内におけるウイルス凝集体を示す 8,000 倍。(B) 矢印で示した
部分の拡大像 50,000 倍。直径 25 nm 程度の円形のウイルス粒子の凝集から成る。

第三章

MuAstV の感染伝播に関する研究

序論

第一章では MuAstV が、わが国の実験動物施設のマウスにおいても施設陽性率 52.2%、個体陽性率 35%と高い陽性率であることを明らかにした。マウスにおいて MuAstV の感染により胃腸疾患などの臨床症状や病変が引き起こされたとの報告はなく (8, 9, 37), 第二章では感染実験によって、重度の免疫不全マウスにおいても病原性は示さない、あるいは検出できない程度であることを明らかにした。MuAstV の伝播形式は糞便を介した経口感染であることが明らかになっており、1~3 週間感染性を保持し伝播することが示されている (8)。しかし、マウスにおける MuAstV 感染開始から体外へのウイルスの排出時期、量についての情報は乏しい。これらの情報は MuAstV の病原性の有無にかかわらず、ウイルス拡散防止の観点から実験動物の飼育・衛生管理上重要な情報となる。第二章では MuAstV がマウスの小腸上皮細胞内で増殖していることを明らかにしたが、MuAstV 増殖後の体外への排出状況については依然として不明である。

そこで本章では、MuAstV 接種後の糞便中 MuAstV RNA 量や、MuAstV が排除されるまでの期間を調べることにより、MuAstV の伝播性を解析した。本研究においても腸内細菌の影響を排除するため、無菌マウスを用いた。

材料と方法

1. 実験動物と飼育環境

感染実験には腸内細菌の影響を排除するため CIEA の繁殖コロニーから入手した無菌 IQI マウスおよび無菌 NOG マウス 4 週齢、雌を各系統 8 匹用いた。免疫正常動物である IQI マウスは、Jcl:ICR から樹立された繁殖良好な近交系マウスである。

各系統のマウスを MuAstV 接種群 (n=6) と陰性対照群 (n=2) の 2 群に分け、それぞれを別々の滅菌されたビニールアイソレーターで飼育した。マウスを個体識別し、各ケージに実験感染群ではケージあたり 3 匹ずつ、対照群では 2 匹ずつ収容した。マウスおよび滅菌飼料、水、その他の物品は全て、ステリールロックを介して無菌的に出し入れを行った。全てのマウスから実験前に糞便を採取し PCR により、MuAstV を保有しないことを確認した。また、実験の前後にはビニールアイソレーター内の拭取り、床敷、動物の糞便についての培養法による無菌検査を実施し、実験期間中の無菌状態を確認した。

2. 感染実験計画

実験感染群接種液は、第二章と同一の MuAstV 含有液を用いた。また、対照群接種液は PBS とした。MuAstV 含有液および PBS は 1 ml ずつ滅菌容器に分注し、ステリールロックを介して無菌的にアイソレーター内に搬入した。感染実験計画の概略を図 5 に示す。実験感染群のマウスには MuAstV 含有液 100 μ l を経口接種し、対照群のマウスには PBS 100 μ l を経口接種した。接種後 14 日まで 2 日おきに糞便を採取し、14 日以降は 7 日おきに糞便を採取し、使用まで -80°C で保存した。

3. MuAstV の PCR による定性法と定量法

採取した糞便サンプルについて MuAstV の感染状況を把握するため、定性 PCR によるスクリーニングを行った。定性 PCR 法は、第一章に前述の通りである。

次に、糞便中への MuAstV 排出量の推移を調べるため、定量 PCR によりサンプル中の MuAstV RNA 量を測定した。MuAstV の定量 PCR 法は、第二章に前述の通りである。

4. 動物実験倫理

この実験は動物実験の適切な実施のためのガイドライン（日本学術会議, 2006 年, URL: <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>）に基づき、CIEA の動物実験に関する規則に厳密に従って実施された。実験プロトコルは、CIEA の動物実験委員会によって承認された（承認番号 18035A）。

結果

1. MuAstV 実験感染モデルにおけるウイルス排出期間

免疫正常動物である IQI マウスにおいては接種後 14 日までの 2 日おきの定性 PCR では全ての個体で陽性が確認された (表 7)。14 日以降 77 日までの 7 日おきの定性 PCR では陰性を示す個体が認められた (表 8)。また、陰性が確認された後、再び陽性となる個体を確認された。重度免疫不全動物である NOG マウスにおいては MuAstV 含有液接種後 14 日までの 2 日おきの定性 PCR, および 14 日以降 77 日までの 7 日おきの定性 PCR のいずれにおいても全ての個体で陽性が確認された (表 7, 8)。対照群では全ての個体が陰性であった。

MuAstV 含有液接種後 77 日後, および PBS 接種後 77 日後までの IQI マウス, NOG マウスに下痢や衰弱等の臨床症状は認められず, マウスの外観にも異常は認められなかった。

2. MuAstV 実験感染モデルにおけるウイルス排出量

免疫正常動物である IQI マウスの糞便を MuAstV 定量 PCR にて解析した結果, 糞便中の MuAstV RNA 量は MuAstV 含有液接種 4 日～6 日後に最高値を示し, その後, 減少した (図 6)。重度免疫不全動物である NOG マウスでは, 6 匹中 5 匹で MuAstV 含有液接種 4 日において最高値を示し, 接種 21 日後以降も著しい増加が確認された (図 6)。対照群では全ての個体が検出限界以下であった。

考察

本章では MuAstV に感染した後、どのように感染拡大していくかについて基礎的情報を得るため、免疫正常および免疫不全マウスに MuAstV を実験感染させ、糞便中のウイルス RNA 量を測定し、排出量の推移を明らかにした。免疫正常動物である IQI マウスでは糞便中の MuAstV RNA 量は接種 4 日～6 日後に最も高い値を示した後、減少したが、重度免疫不全動物である NOG マウスでは接種 21 日後以降も増加し続けた。MuAstV 感染の制御に獲得免疫が関与していることが報告されており (49)、今回の免疫正常マウスにおいて実験感染から 6 日以降に MuAstV 排出量が減少した結果と一致する。第一章において調査したわが国の実験動物施設におけるマウスの MuAstV 陽性率は、免疫正常マウスでは 34.9%、免疫不全マウスでは 37.9%であった。この調査では免疫不全マウスで MuAstV 陽性が高い傾向を示すものの有意差は認められなかった。今回の調査では免疫不全マウスの数が免疫正常マウスの 41 分の 1 と少ないことから、個体数を増やすことで免疫不全マウスの陽性率が免疫正常マウスに比べ更に高くなる可能性も考えられた。一方、免疫正常動物である IQI マウスにおいても糞便中の MuAstV RNA 量は低いものの、21 日以降も検出された。免疫正常マウスにおいて MuAstV は免疫により制御され増殖は抑えられるものの、PCR による検出限界に近い排出量で長期的に推移していることが推察された。

以上より、MuAstV 陽性マウスは、その免疫不全度に関わらず長期間にわたり糞便中にウイルスを排出し、汚染源となることが明らかとなった。このことから、MuAstV PCR を継続し、陽性個体を摘発するとともに、排出された糞便を汚染源と見做し、徹底した滅菌処理を行うこと、またこれらに加え MuAstV 陽性マウスの淘汰を続けることにより、実験動物施設から MuAstV を完全に排除できる可能性が示された。

表 7. MuAstV 実験感染群糞便における MuAstV 定性 PCR 結果
(接種前～接種後 14 日)

系統	No.	事前検査	接種後日数						
		3 日前	2 日	4 日	6 日	8 日	10 日	12 日	14 日
IQI	1	—	+	+	+	+	/	+	+
	2	—	+	+	+	+	/	+	+
	3	—	+	+	+	+	/	+	+
	4	—	+	+	+	+	/	+	+
	5	—	+	+	+	+	/	+	+
	6	—	+	+	+	+	/	+	+
NOG	1	—	+	+	+	+	/	+	+
	2	—	+	+	+	+	/	+	+
	3	—	+	+	+	+	/	+	+
	4	—	+	+	+	+	/	+	+
	5	—	+	+	+	+	/	+	+
	6	—	+	+	+	+	/	+	+

/: not tested

表 8. MuAstV 実験感染群糞便における MuAstV 定性 PCR 結果
(接種後 21 日～77 日)

系統	No.	接種後日数								
		21 日	28 日	35 日	42 日	49 日	56 日	63 日	70 日	77 日
IQI	1	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	2	+	+	+	—	+	—	—	—	—
	3	+	—	+	+	—	—	+	—	+
	4	—	+	+	—	+	—	+	+	—
	5	+	+	+	—	—	—	+	—	—
	6	+	+	+	—	+	—	+	+	+
NOG	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+

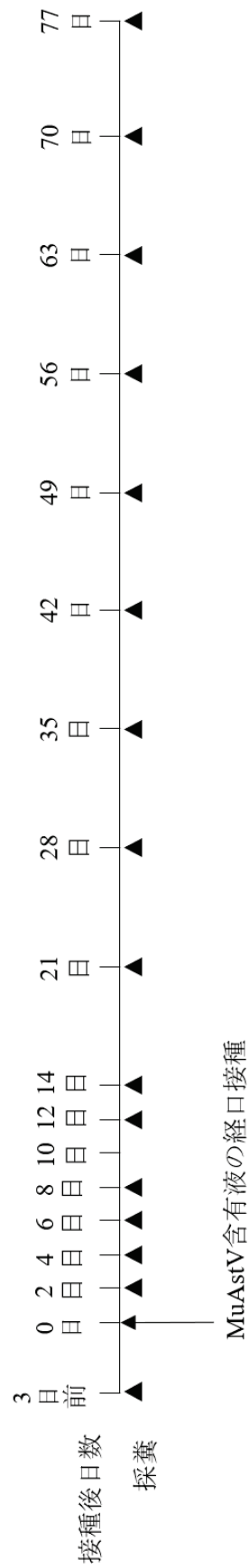


図 5. MuAstV 体外排出量調査のための感染実験計画概要
 ▲ : 採糞 (MuAstV 定性 PCR および定量 PCR を実施)

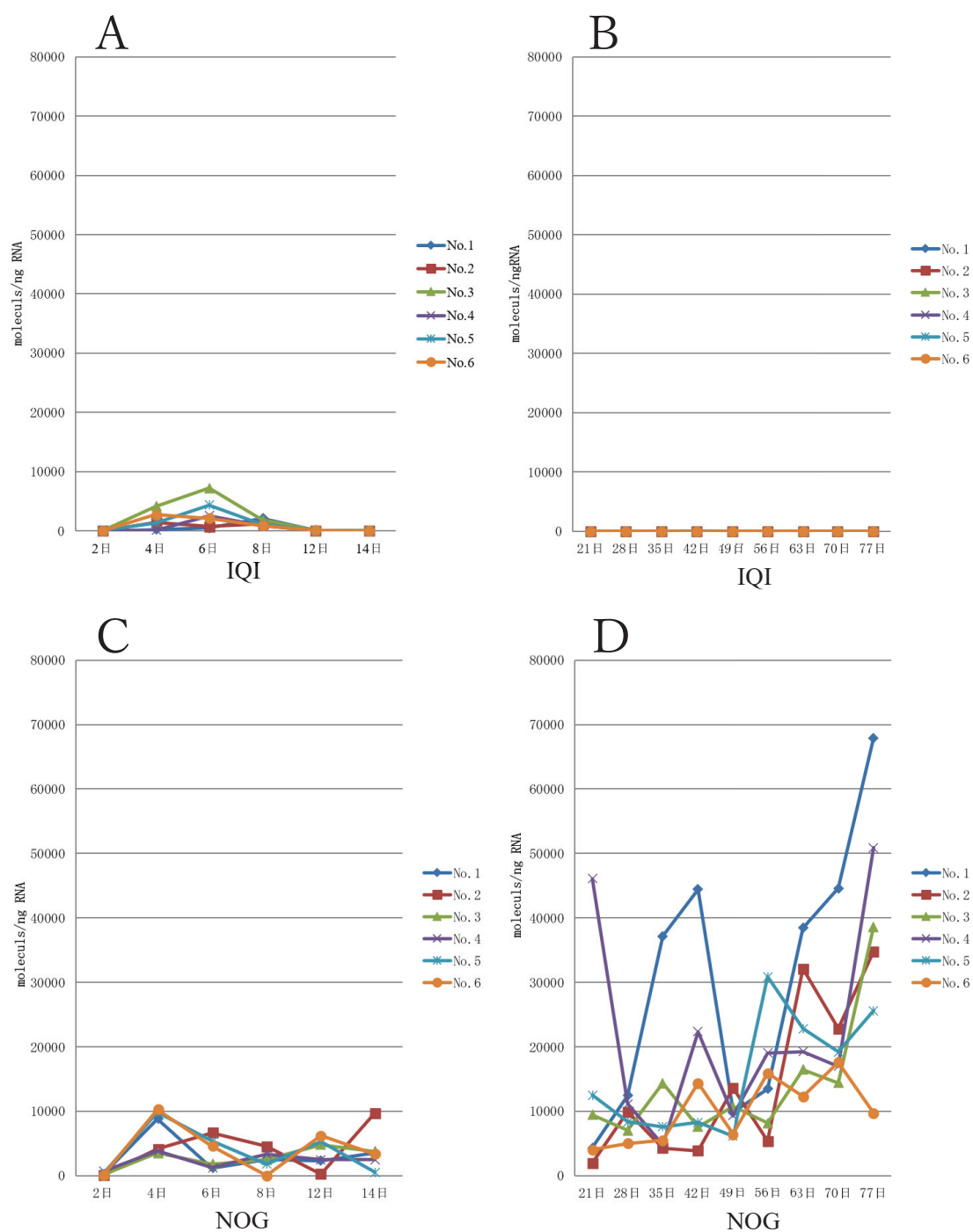


図 6. MuAstV 含有液接種後の MuAstV 排出量の推移。接種後 14 日まで 2 日おきに、接種後 14 日以降は 7 日おきに測定した。A) IQI マウス接種後 2 日から 14 日、B) IQI マウス接種後 21 日から 77 日、C) NOG マウス接種後 2 日から 14 日、D) NOG マウス接種後 21 日から 77 日、排出 MuAstV RNA 量を測定。6 個体 (No.1 ~6) の結果を示す。

総括

動物実験において再現性が高くかつ信頼性の高い結果を得るためには、微生物学的および遺伝学的品質が保証された動物の使用が必須である。近年、実験動物施設の衛生管理が向上し、重篤な症状を引き起こす病原体や致死性の高い病原体による感染症は少なくなり、その反面、症状を示さない、いわゆる不顕性感染による感染症が問題になっている。近年発見された MuAstV の感染が各国の実験動物施設から報告されているが、わが国の実験動物施設における感染状況に関する情報は乏しい。アストロウイルスは、さまざまな哺乳類や鳥類に感染し、下痢や腸炎を引き起こすことが知られている。しかし、免疫正常マウスにおいて MuAstV 感染による症例の報告はなく、下痢や腸炎などの臨床症状や腸管における病変は確認されていない。また、免疫不全マウスについても MuAstV 感染に関する情報は乏しく、その病原性については依然として不明である。本研究では、わが国での MuAstV の流行状況を明らかにすると共に、その病原性についての解明を行った。また、マウスの微生物学的品質管理を行う上で重要な情報となる MuAstV の排出時期および排出量についての解析を行った。

第一章では、わが国の実験動物施設のマウスにおける MuAstV 個体陽性率は 35.0%であり、施設陽性率は 52.2%であることを明らかにした。これらの結果から、わが国のマウスにおける他の一般的なウイルス感染に比べ高い陽性率であることが示された。その理由としては、MuAstV がこれまで微生物学的モニタリング検査の項目として検査されていなかったことに起因していると推察される。また、MuAstV 陽性マウスと MuAstV 陰性マウスとの間では、消化管内原虫の陽性率に有意差は認められなかった。これらの消化管内原虫は、実験動物施設または動物自体の微生物学的品質の指標であり、消化管内原虫陽性施設は、マウスの他の微生物による陽性率が比較的高い傾向があることが知られてい

る。わが国の実験動物マウスにおいては、その微生物学的品質に関わらず MuAstV を広く保有している可能性があると考えられた。また、様々なマウス系統における MuAstV PCR 陽性マウスでの病原性を解明する為、ICR 系統, BALB / c 系統, C57BL / 6J 系統, BALB / c-nu / + 系統, BALB / c-nu / nu 系統, SCID- beige 系統, NOG 系統のマウスから小腸を収集し、病理組織学的解析を行った。その結果、いずれの個体においてもマウスの外観に異常は見られず、下痢や腸炎などの臨床症状は示さなかった。また、剖検所見および病理組織学的解析にも異常は認められなかった。これらの結果から、MuAstV PCR 陽性マウスでは免疫正常および免疫不全マウスに関わらず病原性を示さない、あるいは検出できない程度であることが推察された。

第二章では更に、腸内細菌の影響を排除し、MuAstV の病原性を解明するため、体表および体内に細菌を保有しない無菌マウスを用いて感染実験を行った。無菌状態で飼育されている重度免疫不全動物である NOG マウスに対し、MuAstV 接種後 4 日および 28 日後における各臓器定性 PCR, 定量 PCR, 病理組織学的解析、小腸下部の透過型電子顕微鏡観察を行った。接種 4 日および 28 日後いずれも小腸下部において最も多い MuAstV RNA 量が確認され、更に接種 4 日後に比べ接種 28 日後の小腸下部では約 8 倍に増加していることが明らかとなった。また小腸下部の電子顕微鏡観察では、接種 4 日および 28 日後の小腸下部において、絨毛上皮細胞の細胞質内に直径約 25 nm のウイルス粒子が確認された。全ての個体において臨床症状、剖検所見および病理組織学的解析に異常は認められなかった。本研究の結果から、MuAstV がマウスの小腸下部の絨毛上皮細胞で増殖することが示唆された。しかし、NOG マウスなどの重度免疫不全動物でも病変を引き起こさず、MuAstV 単独では病原性を示さない、あるいは検出できない程度であると推察された。腸管に感染するロタウイルスは、絨毛上皮細胞を破壊することによって下痢を誘発し、最終的に細胞死と絨毛萎縮を引き起こす。しかし、

アストロウイルスは細胞死や病理組織学的変化を引き起こさないことが報告されており、これは本研究の結果と一致している。MuAstV は臨床症状を示さず、病変を引き起こさない為、検査されることが無く、実験動物施設での高い陽性率に繋がっていると考えられる。MuAstV 感染は、NLRP3 欠損マウスのデキストラン硫酸誘発性大腸炎モデルに影響を与えないことが報告されている。一方、MuAstV 増殖の抑制に自然免疫が関与しており、MuAstV はマウスの腸透過性を高めることも示されている。また、既報において実験動物飼育環境における温湿度の大幅な変動または重い実験的ストレスによってウイルスの病原性が増強される可能性も示唆されている。環境ストレスや実験的ストレスによる発症の可能性については今後更なる研究が必要である。

第三章では、実験動物マウスの微生物学的品質管理において重要な、ウイルスの排出時期と排出量を解明するため、免疫正常および免疫不全マウスにおける MuAstV の体外排出量の推移を解析した。MuAstV 接種後 14 日まで 2 日おきに、14 日以降は 7 日おきに採糞し糞便中の MuAstV RNA 量を測定した。その結果、免疫正常動物である IQI マウスでは接種 4 日～6 日後に最も多い排出量が確認され、その後減少したのに対し、重度免疫不全動物である NOG マウスにおいては接種 21 日以降も糞便中の排出量は増加していることが明らかとなった。また、免疫正常動物である IQI マウスにおいて接種 4 日～6 日以降 MuAstV 排出量は減少し、免疫によりウイルスの増殖が抑えられていると推察されるものの、PCR においては検出されていることから、PCR での検出限界に近い排出量で長期的に推移していることが推察された。本結果から、MuAstV 陽性マウスは、その免疫不全度に関わらず長期間にわたり糞便中にウイルスを排出し、汚染源となることが明らかとなった。このことから、MuAstV PCR を継続し、陽性個体を摘発するとともに、排出された糞便を汚染源と見做し、徹底した滅菌処理を行うこと、またこれらに加え MuAstV 陽性マウスの淘汰を続けることにより、実験動

物施設から MuAstV を完全に排除できる可能性が示された。

実験動物の品質管理のための微生物モニタリング検査を実施する CIEA ICLAS モニタリングセンターは、マウスにおける病原性に基づいて微生物を 5 つのカテゴリー (A から E) に分類している。カテゴリーについては以下の通りである。カテゴリーA：人獣共通感染症，カテゴリーB：伝染力が強く動物を致死させる恐れがある微生物，カテゴリーC：動物を致死させることはないが発病する可能性のある微生物，カテゴリーD：日和見病原体，カテゴリーE：通常病原性はないが、飼育環境の指標になる微生物。ウイルスは細胞内で増殖するため、現行のカテゴリーでは、カテゴリーA から C に分類される。

本研究の結果、MuAstV は重度免疫不全動物においても病原性を示さず、定期的な微生物モニタリング検査を行う必要はないと考えられる。しかし MuAstV 感染はマウスに対し生理機能の変化を伴う可能性もあり、特に免疫や腸透過性に関する実験においては MuAstV を検査する必要があると考えられる。これらのことから、微生物モニタリング検査における新規カテゴリー、カテゴリーF「病原性はなく、発症例も知られておらず、通常の微生物学的品質管理上の検査項目とする必要はないが、実験の種類により影響を及ぼす可能性がある微生物」を新規設定するとともに、MuAstV をカテゴリーF (消化管) に分類し、該当する実験を行う際には統御対象とすることを提案したい。

謝辞

本研究において、主査をお引き受け下さりご指導下さいました岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科 酒井洋樹教授に深堪なる謝意を表します。多大なるご助言とご指導を賜りました岐阜大学連合獣医学研究科 猪島康雄教授に深堪なる謝意を表します。ご指導を賜りました主指導教員である岐阜大学連合獣医学研究科（公益財団法人実験動物中央研究所）末水洋志教授に深謝致します。また、終始懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました岐阜大学連合獣医学研究科（公益財団法人実験動物中央研究所）林元展人准教授に深堪なる謝意を表します。

本論文草稿にあたり、有益なご高閲とご助言を賜りました帯広畜産大学獣医学研究部門 小川晴子教授、岩手大学農学部共同獣医学科 村上賢二教授、東京農工大学農学部共同獣医学科 古谷哲也准教授に厚くお礼申し上げます。

最後に、本研究への多大なるご協力を賜りました公益財団法人実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター、病理解析センター、動物資源技術センターの関係者各位、研究の機会を与えて下さいました岐阜大学連合獣医学研究科および公益財団法人実験動物中央研究所の関係者各位に深謝致します。

引用文献

1. Arruda, B., Arruda, P., Hensch, M., Chen, Q., Zheng, Y., Yang, C., Gatto, I. R. H., Ferreyra, F. M., Gauger, P., Schwartz, K., Bradner, L., Harmon, K., Hause, B. and Li, G. (2017). Porcine astrovirus type 3 in central nervous system of swine with polioencephalomyelitis. *Emerg Infect Dis.* 23, 2097–2100.
2. Behling-Kelly, E., Schultz-Cherry, S., Koci, M., Kelley, L., Larsen, D. and Brown, C. (2002). Localization of astrovirus in experimentally infected turkeys as determined by *in situ* hybridization. *Vet Pathol.* 39, 595–598.
3. Blomström, A. L., Widén, F., Hammer, A. S., Belák, S. and Berg, M. (2010). Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol.* 48, 4392–4396.
4. Bootz, F., Sieber, I., Popovic, D., Tischhauser, M. and Homberger, F. R. (2003). Comparison of the sensitivity of *in vivo* antibody production tests with *in vitro* PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials. *Lab Anim.* 37, 341–351.
5. Bosch, A., Pintó, R. M. and Guix, S. (2014). Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev.* 27, 1048–1074.
6. Cheever, F. S., Daniels, J. B., Pappenheimer, A. M., and Bailey, O. T. (1949). A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of

myelin. *J Exp Med*. 90, 181-210.

7. Compton, S. R., Booth, C. J. and Macy, J. D. (2017). Lack of effect of murine astrovirus infection on dextran sulfate-induced colitis in NLRP3-deficient mice. *Comp Med*. 67, 400–406.

8. Compton, S. R., Booth, C. J. and Macy, J. D. (2017). Murine astrovirus infection and transmission in neonatal CD1 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 56, 402–411.

9. Cortez, V., Sharp, B., Yao, J., Livingston, B., Vogel, P. and Schultz-Cherry, S. (2019). Characterizing a murine model for astrovirus using viral isolates from persistently infected immunocompromised mice. *J Virol*. 93, e00223-19.

10. Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H. B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U. and Estes, M. K. (2017). Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 3, 17083.

11. De, Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A. and Cattoli, G. (2011). Astrovirus infections in humans and animals – molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol*. 11, 1529–1544.

12. Donato, C. and Vijaykrishna, D. (2017). The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian astroviruses. *Viruses*. 9, 102

13. Du, J., Lan, Z., Liu, Y., Liu, Y., Li, Y., Li, X. and Guo, T. (2017). Detailed analysis of

BALB/c mice challenged with wild type rotavirus EDIM provide an alternative for infection model of rotavirus. *Virus Res.* 228, 134–140.

14. Fang, Q., Wang, C., Liu, H., Wu, Q., Liang, S., Cen, M., Dong, Q., Wei, Y., Chen, Y., Ouyang, K., Wei, Z. and Huang, W. (2019). Pathogenic characteristics of a porcine astrovirus strain isolated in China. *Viruses.* 11, 1156.

15. Fox, J.G., Dewhirst, F. E., Tully, J. G., Paster, B. J., Yan, L., Taylor, N. S., Collins, M. J. Jr., Gorelik, P. L. and Ward, J. M. (1994). *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol.* 32, 1238–1245.

16. Goto, K., Hayashimoto, N., Ishida, T., Takakura, A. and Kagiya, N. (2009). First trial in the developmental phase of the "performance evaluation program" based on the ICLAS animal quality network program: self-assessment of microbiological monitoring methods using test samples supplied by ICLAS. *Exp Anim.* 58, 47–52.

17. Goto, K., Nozu, R., Takakura, A., Matsushita, S. and Itoh, T. (1995). Detection of cilia-associated respiratory bacillus in experimentally and naturally infected mice and rats by the polymerase chain reaction. *Exp Anim.* 44, 333–336.

18. Gray, E. W., Angus, K. W. and Snodgrass, D. R. (1980). Ultrastructure of the small intestine in astrovirus-infected lambs. *J Gen Virol.* 49, 71–82.

19. Harasawa, R., Koshimizu, K., Uemori, T., Takeda, O., Asada, K. and Kato, I. (1990). The polymerase chain reaction for *Mycoplasma pulmonis*. Microbiol Immunol. 34, 393–395.
20. Hayashimoto, N., Morita, H., Ishida, T., Uchida, R., Tanaka, M., Ozawa, M., Yasuda, M. and Itoh, T. (2015). Microbiological survey of mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Kanagawa and Tokyo, Japan. Exp Anim. 64, 155–160.
21. Hayashimoto, N., Morita, H., Ishida, T., Yasuda, M., Kameda, S., Uchida, R., Tanaka, M., Ozawa, M., Sato, A., Takakura, A., Itoh, T. and Kagiya, N. (2013). Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan. Exp Anim. 62, 41–48.
22. Ikegami, T., Shiota, K., Une, Y., Nomura, Y., Wada, Y., Goto, K., Takakura, A., Itoh, T. and Fujiwara, K. (1999). Naturally occurring Tyzzer's disease in a calf. Vet Pathol. 36, 253–255.
23. Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T. and Nakahata, T. (2002). NOD/SCID/gamma (c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood. 100, 3175–3182.
24. Johnson, C., Hargest, V., Cortez, V., Meliopoulos, V. A. and Schultz-Cherry, S. (2017) Astrovirus pathogenesis. Viruses. 9, 22.

25. Jones, M. K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C. L., Keyes, L. R., Grau, K. R., Gonzalez-Hernandez, M. B., Lovine, N. M., Wobus, C. E., Vinje, J., Tibbetts, S. A., Wallet, S. W. and Karst, S. M. (2014). Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*. 346, 755–759.
26. Karst, S. M. (2016). The influence of commensal bacteria on infection with enteric viruses. *Nat Rev Microbiol*. 14, 197–204.
27. Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J. and Virgin, IV, H. W. (2003) STAT1 dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science Signalling*. 299, 1575.
28. Kjeldsberg, E. and Hem, A. (1985). Detection of astroviruses in gut contents of nude and normal mice. *Arch Virol*. 84, 135–140.
29. Koci, M. D., Moser, L. A., Kelley, L. A., Larsen, D., Brown, C. C. and Schultz-Cherry, S. (2003). Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. *J Virol*. 77, 11798–11808.
30. 公益社団法人日本実験動物協会編集. 2015. 実験動物の感染症と微生物モニタリング. 初版. pp. 3-5. 株式会社アドスリー, 東京
31. Kuroya, M., Ishida, N. and Shiratori, T. (1953). Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. The isolation of a new virus. *Tohoku J Exp Med*. 58, 62.
32. Li, L., Diab, S., McGraw, S., Barr, B., Traslavina, R., Higgins, R., Talbot, T.,

- Blanchard, P., Rimoldi, G., Fahsbender, E., Page, B., Phan, T. G., Wang, C., Deng, X., Pesavento, P. and Delwart, E. (2013). Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. *Emerg Infect Dis.* 19, 1385–1392.
33. Marvin, S. A., Huerta, C. T., Sharp, B., Freiden, P., Cline, T. D. and Schultz-Cherry, S. (2015). Type I interferon response limits astrovirus replication and protects against increased barrier permeability *in vitro* and *in vivo*. *J Virol.* 90, 1988–1996.
34. Meliopoulos, V. A., Marvin, S. A., Freiden, P., Moser, L. A., Nighot, P., Ali, R., Blikslager, A., Reddivari, M., Health, R., Koci, M. and Schults-Cherry, S. (2016). Oral administration of astrovirus capsid protein is sufficient to induce acute diarrhea *in vivo*. *mBio.* 7, e01494-16.
35. Moser, L. A., Carter, M. and Schultz-Cherry, S. (2007). Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. *J Virol.* 81, 11937–11945.
36. Nakanaga, K., Kitagawa, T., Kiuchi, Y, Makino, S., Hayami, M. and Fujiwara, K. (1985) Production and characterization of monoclonal antibodies to mouse hepatitis virus, MHV-NuU. *Nihon Juigaku Zasshi.* 47, 423-433.
37. Ng, T. F., Kondov, N. O., Hayashimoto, N., Uchida, R., Cha, Y., Beyer, A. I., Wong, W., Pesavento, P. A., Suemizu, H., Muench, M. O. and Delwart, E. (2013). Identification of an astrovirus commonly infecting laboratory mice in the US and Japan. *PLoS One.* 8, e66937.

38. Parel, J. D., Galula, J. U. and Ooi, H. K. (2008). Characterization of rDNA sequences from *Syphacia obvelata*, *Syphacia muris*, and *Aspiculuris tetraptera* and development of a PCR-based method for identification. *Vet Parasitol.* 153, 379–383.
39. Parker, J. C., Whiteman, M. D. and Richter C. B. (1978). Susceptibility of inbred and outbred mouse strains to Sendai virus and prevalence of infection in laboratory rodents. *Infect Immun.* 19, 123-130
40. Phan, T. G., Kapusinszky, B., Wang, C., Rose, R. K., Lipton, H. L. and Delwart, E. L. (2011). The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog.* 7, e1002218.
41. Quan, P. L., Wagner, T. A., Briese, T., Torgerson, T. R., Hornig, M., Tashmukhamedova, A., Firth, C., Palacios, G., Baisre-De-Leon, A., Paddock, C. D., Hutchison, S. K., Egholm, M., Zaki, S. R., Goldman, J. E., Ochs, H. D. and Lipkin, W. I. (2010). Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Infect Dis.* 16, 918–925.
42. Sano, R., Ymamoto, S., Kamimura, H., Kimura, M., Veda, K., Shimizu, A., Kawano, J. and Kimura, S. (1988). An Epizootic *Staphylococcus* Infection in a Nude Mouse Colony. *Exp. Anim.* 37(1), 31-38.
43. Schmidt, K., Butt, J., Mauter, P., Vogel, K., Erles-Kemna, A., Pawlita, M. and Nicklas, W. (2017). Development of a multiplex serological assay reveals a worldwide distribution of murine astrovirus infections in laboratory mice. *PLoS One.* 12, e0187174.

44. Sebire, N. J., Malone, M., Shah, N., Anderson, G., Gaspar, H. B. and Cubitt, W. D. (2004). Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Pathol.* 57, 1001–1003.
45. Snodgrass, D. R., Angus, K. W., Gray, E. W., Menzies, J. D. and Paul, G. (1979). Pathogenesis of diarrhea caused by astrovirus infections in lambs. *Arch Virol.* 60, 217–226.
46. Tang-Feldman, Y. J., Wojtowicz, A., Lochhead, G. R., Hale, M. A., Li, Y. and Pomeroy, C. (2006). Use of quantitative real-time PCR (qRT-PCR) to measure cytokine transcription and viral load in murine cytomegalovirus infection. *J Virol Methods.* 131, 122–129.
47. Frey, T. R., Forsyth, K. S., Sheehan, M. M., De, Haven, B. C., Pevarnik, J. G., Hand, E. S., Pizzorno, M. C., Eisenlohr, L. C. and Hersperger, A. R. (2018). Ectromelia virus lacking the E3L ortholog is replication-defective and nonpathogenic but does induce protective immunity in a mouse strain susceptible to lethal mousepox. *Virology.* 518, 335–348.
48. Woode, G. N., Pohlenz, J. F., Gourley, N. E. and Fagerland, J. A. (1984). Astrovirus and Breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. *J Clin Microbiol.* 19, 623–630.
49. Yokoyama, C. C., Loh, J., Zhao, G., Stappenbeck, T. S., Wang, D., Huang, H. V., Virgin, H. W. and Thackray, L. B. (2012). Adaptive immunity restricts replication of

novel murine astroviruses. *J Virol.* 86, 12262–12270.

50. Zhang, B., Chassaing, B., Shi, Z., Uchiyama, R., Zhang, Z., Denning, T. L., Crawford, S. E., Pruijssers, A. J., Iskarpatyoti, J. A., Estes, M. K., Dermody, T. S., Ouyang, W., Williams, I. R., Vijay-Kumar, M. and Gewirtz, A. T. (2014). Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science.* 346, 861–865.