

3. サイトメガロウイルスによる神経病原性

筒井 祥博

はじめに

サイトメガロウイルス (CMV) は胎生期の感染によって脳の発達障害を起す最も頻度の高いウイルスである^{1,2)}。全出産の0.4-1.0%に胎内感染が報告され、その中の5-10%は出生時に巨細胞性封入症として生まれ、肝脾腫、黄疸、出血傾向とともに、小頭症、脳室壁の石灰沈着、小眼球症などの重篤な脳障害が生ずる³⁻⁷⁾。胎内感染児の他の約10%は出生時は無症状で、生後数年してから精神発達遅滞、視力障害、難聴、てんかん、痙攣などの脳障害が生ずることが知られている^{8,9)}。健康な成人においてはCMVの感染は無症状であるが、AIDSなどの感染による免疫不全状態において、日和見感染を起し重篤な肺炎やCMVの脳室脳炎を生ずる¹⁰⁻¹²⁾。CMVの脳障害の発生機序について人の材料で研究するのは限界がある。私達はマウスの実験モデルによって解析してきた¹³⁻¹⁵⁾。CMVが発育期脳の神経前駆細胞に感受性があること、グリア細胞と神経細胞で感染動態が異なること、さらにCMVは脳で潜伏感染することについて述べ、これらの結果よりヒトのCMV脳症の発生機序について考察する。

発育期脳における感染感受性

マウスでは胎齢7日目ころから胎盤が形成されるので、胎齢8.5日目に羊膜腔内へMCMVを手術的に注入し、その後の胎仔を経時的に調べた結果、小眼球症や小頭症が胎生期に認められた¹³⁾。胎盤は胎内感染の最初の関門である¹⁶⁾。マウスではCMVは胎盤の構造から経胎盤感染しないとされているのでより自然の感染に近づけるために、私達は胎齢12.5日の胎盤へ直接MCMVを注入し、胎齢18.5日で胎仔を取り出し、各臓器について胎仔への感染をPCRおよび抗体を用いて免疫染色によって感染を調べた¹⁵⁾。そ

の結果、ウイルスを注入した胎盤の約60%が感染し、その50%以上が胎仔に感染した。中でも脳へ27%と高率に感染した(表1)。脳における感染細胞の局在は脳室壁のventricular zone (VZ)に高頻度に認められた。このことは胎生期において脳はCMVの感染を受けやすく、特に脳室壁の未分化神経系細胞が感受性が高いことが示唆された。胎盤感染して出産させた新生児マウスではその25%に発育遅滞と小頭症を認め、ヒトの先天性CMV感染症によく類似していた¹⁵⁾。この胎盤感染の実験モデルから胎生期にはCMVは脳に感染しやすく特にVZが感受性が高いことが分かった。

神経幹・前駆細胞への感染感受性

脳の発育において、胎生期に脳室壁のVZで未分化神経上皮はその層の中でエスカレーター運動をして増殖を続ける。脳の発育とともに神経細胞は非対称分裂する細胞の割合が増加する¹⁷⁾。すなわち一方は未分化細胞としてVZ内で増殖を続け、他方はVZを離れて将来白質になる中間層intermediate zone (IZ)、さらに大脳皮質になる皮質板cortical plate (CP)へと移動し、その間、神経細胞、グリア系細胞へと分化する。未分化な神経細胞は未分化なradial glialの線維に沿って脳室壁からCPへと移動し¹⁸⁾、将来の皮質の層形成、さらに神経回路形成へと進行すると考えられている。脳の発育におけるこれらのステップへCMVは如何に作用し傷害を与えるかが問題である(図1)。

発育期脳の脳室壁のVZに神経幹細胞(neural stem cells)が存在すると考えられている。この神経幹細胞は自己増殖し、しかも神経系細胞、グリア系細胞へ分化する能力を潜在している^{19,20)}。近年Reynolds & Weissは発育期あるいは発達した脳から神経幹細胞を含む未分化な神経系細胞を分離し、epidermal growth factor (EGF)存在下で培養するとneurospheresというマリモ状の浮遊状態で増殖可能であることを明らかにした²¹⁾。このneurospheresはnestin陽性で自己再生し、分化へと誘導すると神経細胞へもグリア細胞へも分化することから、神経幹細胞の培養と考えられたが、神経幹細胞だけでなくそこから分化した神経前駆細胞も含まれることが明らかになってきた。教室の小杉らは胎生期マウス脳から分離したneurospheres

浜松医科大学病理学第二講座
(〒431-3192 浜松市半田山1-20-1)
Neuropathogenesis by cytomegalovirus
Yoshihiro Tsutsui
Second Department of Pathology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu 4341-3192

表1 MCMV 胎盤感染後の胎盤および胎仔への感染率

	MCMV		MEM	
	PCR	免疫染色	PCR	免疫染色
胎盤	22/36 (61.1%)	16/26 (61.5%)	1/13 (7.7%)	0/6 (0%)
胎仔	13/36 (36.1%)	8/26 (30.8%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
脳	10/36 (27.8%)	7/26 (26.9%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
肺	7/36 (19.4%)	4/26 (15.4%)	0/3 (0%)	0/10 (0%)
肝	10/36 (27.8%)	7/26 (26.9%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
生存率	36/62 (58.1%)		29/48 (60.4%)	

胎令12.5日 ICR マウスの右側子宮内に MCMV (1×10^3 PFU) を手術的に注入し、左側子宮内に MEM を注入して、胎令18.5日に胎仔脳を取り出し、前初期遺伝子の PCR 及び MCMV 早期抗原に対する抗体で PCR を行った。

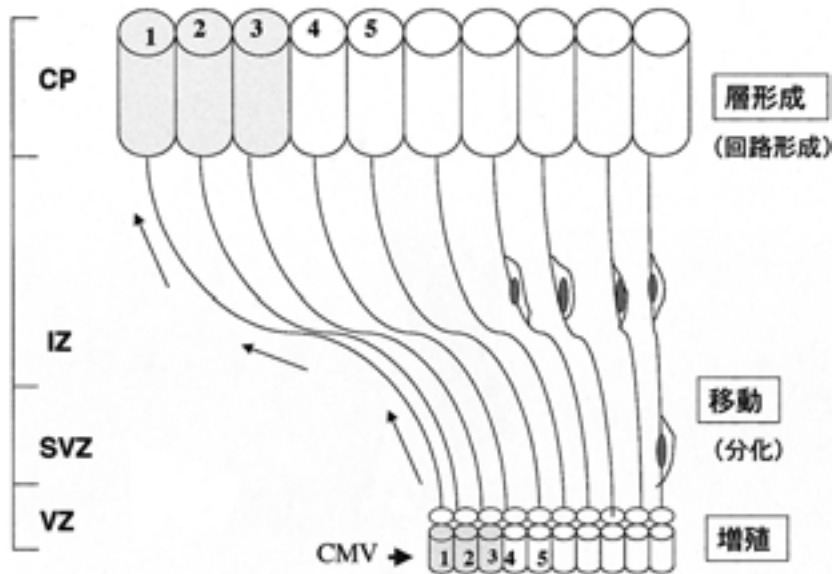


図1 大脳形成における神経系細胞の増殖，移動，層形成 (Rakic 1988を参考)

VZ : ventricular zone, SVZ : subventricular zone, IZ : intermediate zone,

CP : cortical plate.

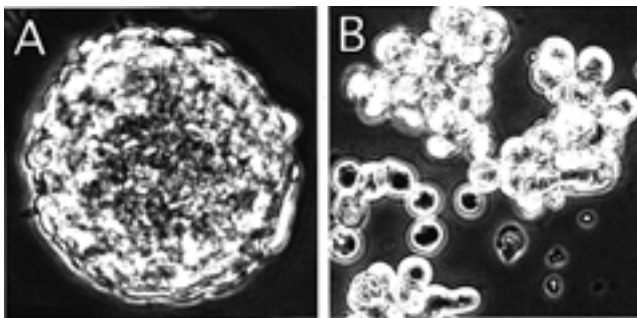


図2 胎生期マウス脳からの neurospheres

A : 非感染, B : MCMV 感染.

に対して MCMV の感染が如何なる影響を与えるかを解析した²²⁾. MCMV は neurospheres に感染し (図2), ウイルス抗原を産生し, ウイルスを産生すること, 自己再生能

力もウイルス感染価の増加とともに低下することが分かった. このことは発生早期の胚細胞や未分化胚癌細胞が MCMV にほとんど感受性を示さないことと相違している. Neurospheres は培養液から EGF を除いて 2% horse serum 存在下で培養すると分化へと誘導することが出来る. MCMV 感染によって neurospheres の細胞は分化へと誘導されにくくなり, グリア系細胞より神経細胞への分化が阻害される傾向を示した. neurospheres を BrdU で標識して新生児ラットの脳へ移植すると感染細胞は GFAP を発現してグリア系細胞へ分化する傾向を示したが, 神経細胞への分化は示さなかった²²⁾. このことはヒトの先天性 CMV 感染症の脳では脳室壁のグリア系細胞がウイルス感染しやすいことと一致していた. CMV は脳室壁の神経幹細胞あるいは神経前駆細胞に感染しやすく, その増殖と分化を抑制することによって小頭症などの脳発達障害を起す可能性が示唆された.

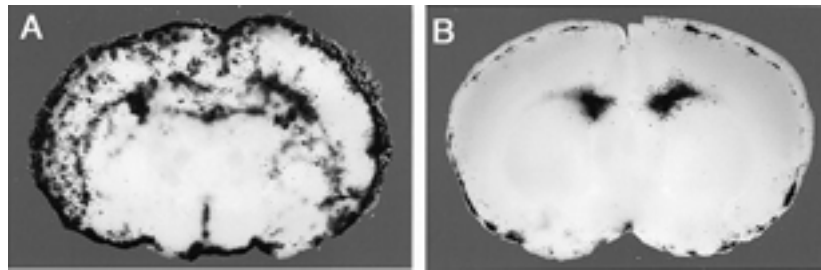


図3 大脳スライスに変異 MCMV (RM461)²⁵⁾を感染し5日間培養, X-Gal 染色した
A: 生後1週マウス, B: 生後3週マウス.

脳の発育段階と感受性の変化

ヒトにおいて CMV は胎生期の感染によって脳障害を起すが, 生後に成長してからは免疫不全状態にならない限り健康な状態では CMV 感染症にならない. 胎生期にはなぜ感染しやすく, 障害が脳に残りやすいのか充分には明らかにされていない. 成長に伴って宿主の免疫機構が発達し, 感染細胞が排除されやすいことが主たる要因と考えられる.

新村らは Stoppini らの方法²³⁾を改良して大脳スライス培養の系に MCMV を感染して解析する方法を確立した²⁴⁾. 用いたウイルスは MCMV の後期遺伝子 $\gamma 0.85$ に大腸菌 LacZ 遺伝子が発現プロモーターの下流に挿入され, 感染すると β -galactosidase (β -gal) が発現する変異ウイルス RM461 であり, スタンフォード大学の Dr. Mocarski から供与された²⁵⁾. この変異ウイルスによる感染細胞は X-Gal 染色で β -gal の発現を青く染め出すことが出来る. 大脳スライス培養は分離細胞の培養に比して3次元の構造を保ったまま培養が出来, しかも培養環境を人工的に変えることが出来る利点がある²⁶⁾.

私達はミクロマニピュレーターで大脳スライスの任意の部位へウイルスを注入し培養する方法を確立した²⁴⁾. 変異 MCMV ウイルス RM461 を大脳スライスの皮質, 脳室上衣下の subventricular zone (SVZ), 線状体と異なる部位へ注入したところ, 注入した SVZ の部位のみ X-Gal 染色で感染細胞が認められ, *in vivo* と同じようにこの部位が感受性が高いことが分かった²⁷⁾.

教室の河崎らは脳の発育に伴う感染感受性を大脳スライスを用いて比較した²⁷⁾. 出生直後, 生後1週, 2週, 3週のマウスから大脳スライスを作成し, 変異ウイルス RM461 を大脳スライス全面に吸着し, 3日および5日間培養した. 大脳スライスを X-Gal で染色すると, 発育に伴って感染細胞の出現が著明に減少した. しかし, 大脳辺縁部および脳室壁周辺には発育した脳においても感受性細胞が残存することが明らかになった (図3). 感染細胞を神経組織特異抗原に対する抗体で染色したところ, 神経幹・前駆

細胞のマーカである nestin²⁸⁾, Musashi²⁹⁾で染色され, 増殖のマーカである BrdU の取込みが認められた²⁷⁾. このことは, 感染感受性を示す細胞は神経幹・前駆細胞であり, これらの細胞の減少と相関して感受性が低下する可能性が示された. 脳室壁の感受性細胞の減少した生後3週令のマウス脳の大脳スライスを2週間培養すると, これらの神経前駆細胞が有意に増加を示し, しかも MCMV に感受性を示すことが明らかとなった²⁷⁾. これらの結果から発育期脳における CMV に対する感染感受性は, 主として脳室壁にある未分化な神経幹・前駆細胞の量と相関していると考えられる.

培養することによって脳室壁の神経前駆細胞が増生することは, 神経幹・前駆細胞は成長しても生涯に渡って神経再生に寄与するという近年の報告に一致している^{19,30)}. AIDS 脳症によって神経細胞が脱落しやすいことが知られている^{31,32)}. この神経細胞の消失は SVZ における神経前駆細胞の再生を誘導し, そこに CMV が感染しやすい可能性がある. AIDS 脳症などの脳障害によって脱落する神経細胞を補うため脳室壁の未分化神経系細胞の増生が誘導され, そこで CMV が再活性化されやすい可能性が考えられる.

発育期脳における細胞特異性

CMV による発育期脳障害の病理発生を明らかにする上で, ウイルス感染の細胞特異性が重要である. ヘルペスウイルス属である CMV はその200近い遺伝子群は, 前初期 (IE), 早期 (E), および後期 (L) 遺伝子に分類され, それらはカスケード状に発現することが知られている³³⁾. 私達は MCMV の前初期遺伝子産物 (89K) に対するラットで作ったモノクローナル抗体 (mAb N2)³⁴⁾ および早期遺伝子 (32K から38K の複数) の遺伝子産物に対するマウスのモノクローナル抗体 (mAb D5)³⁵⁾ を作成して免疫組織化学的に MCMV を感染した発育期マウス脳での発現について解析した. 培養線維芽細胞において mAb N2 では感染初期から核内が瀰漫性に染色され, mAb D5 では感染初期は核内が点状に染まり, それが次第に大きく顆粒状になり, 感染後期になると核内封入体が染色された³⁴⁾. 胎生期

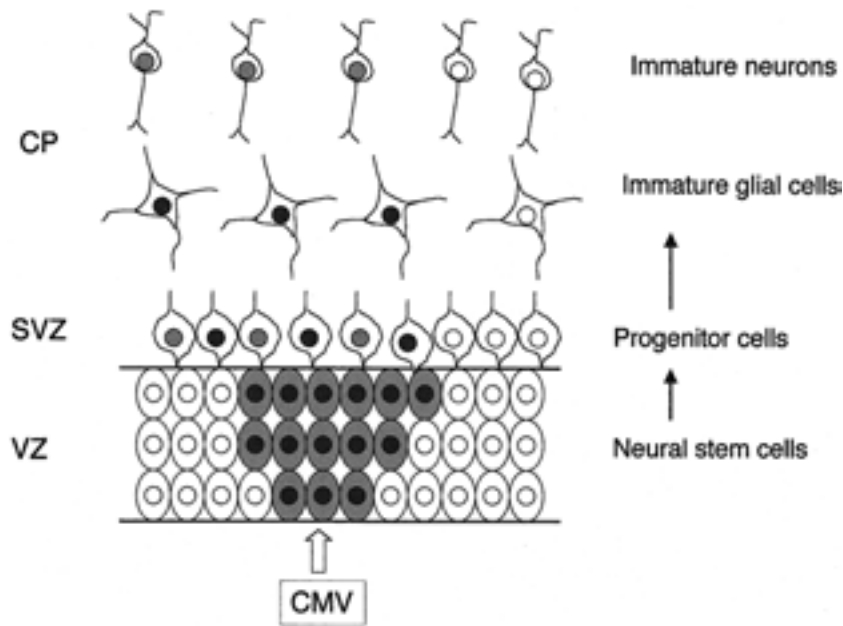


図4 胎生期脳室壁へのMCMV感染と感染細胞の分化, 移動
グリア系細胞ではIE遺伝子が発現しやすく, 神経細胞では早期e1遺伝子が発現しやすい.
VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone, CP: cortical plate.

マウス脳 (E15.5) にMCMVを手術的に注入し, 新生マウス脳を免疫染色で観察すると, mAb N2で認識される前初期抗原IE1は主として脳室壁のグリアのマーカーであるGFAP陽性細胞で発現し, mAb E1で認識される早期抗原E1は大脳皮質および海馬の神経細胞で発現する傾向を示した³⁴⁾. このことは, 発育期脳の神経細胞およびグリア細胞でMCMVの遺伝子発現の動態が異なることを示している (図4). 脳室壁のグリア系細胞はMCMVが許容感染しやすく, 同時にMCMV DNAをプローブとして *in situ* hybridizationするとそれらの細胞でウイルスが増殖が示された³⁴⁾. 一方, 早期抗原E1は感染神経細胞で比較的長期間発現することが明らかとなった³⁶⁾ (Tsutsui et al., 1995).

私達はMCMV IE遺伝子 promoterに reporter geneであるLacZを繋いだ組換え体を導入したTgマウスの作成を試みていた³⁷⁾. 脳においてはアストロサイト特異的に発現し, 神経細胞やオリゴデンドロサイトでは発現しなかった. 私達のTgマウスの結果は, 脳における急性感染においてmAb N2による免疫染色でグリア系細胞においてIE1が発現しやすいという結果と一致している. Tgマウス脳においてMCMV IE promoterが発育段階に従ってどのように発現するか調べた³⁸⁾. 神経発生の早期では, IE promoterは血管内皮で既に発現したが神経上皮では発現していなかった. 胎齢後期 (E18)になると脳室壁のventricular zone (VZ)の未分化神経系細胞で発現を認めた. 発現している細胞はnestin, GFAP陽性でBrdUを取込み, 神

経系前駆細胞と見なされた. このことは感染実験において胎生期マウス脳の脳室壁の細胞がMCMVに感染感受性があることと一致していた.

発育期脳における急性期感染においてはグリア系細胞で許容感染するが, 感染が慢性期に移行すると, 上述した早期抗原E1は神経細胞で比較的長期間発現することが分かった³⁶⁾. 遺伝子を培養細胞へ導入してmAb D5で染色されることから, この早期抗原はHCMVの早期遺伝子UL112-113³⁹⁾に相当するMCMV e1 (M112-113)であることが明らかとなった⁴⁰⁾. 教室の新井らはこのMCMV早期遺伝子e1 promoter (1572bp)にlacZを繋いだ組換え体を導入してTgマウスを作成した⁴¹⁾. MCMV e1 promoter導入Tgマウスが4系統出来たが, 驚いたことにX-Gal染色で中枢神経系のみが β -galを発現した. 組織レベルで見ると神経細胞に限局して発現していることが分かった. 大脳皮質, 海馬, 脳底核などの神経細胞の一部に発現することが明らかとなった. 神経細胞以外の細胞では発現していなかった. 許容感染細胞であるグリア細胞と異なり, このTgマウスの系では, 神経細胞においては前初期遺伝子産物であるIE3が働かなくても早期遺伝子e1 promoterが活性化されるということは, IE3に類似したe1 promoterを活性化する因子が神経細胞に存在する可能性を示唆している (図5).

このe1 promoterが神経細胞特異的に発現することは, 先天性CMV感染症の小児や, 免疫不全患者とくにAIDS患者で脳障害が起きやすいことと関連している可能性があ

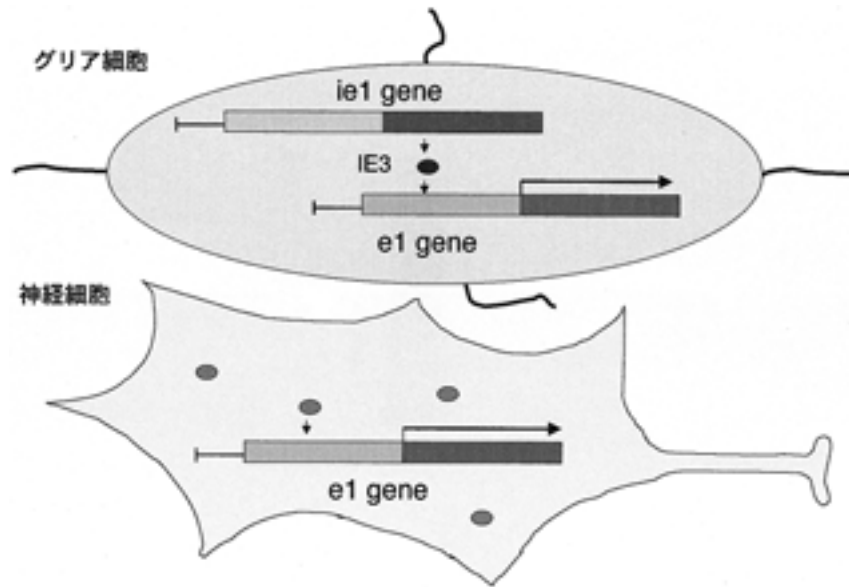


図5 許容感染をするグリア細胞では前初期 (IE) 遺伝子産物 IE 3 が早期遺伝子 *e1* promoter を活性化するが, *e1* promoter 発現 Tg マウスの神経細胞では, IE 3 に類似した神経特異的細胞因子が *e1* promoter を活性化すると考えられる。

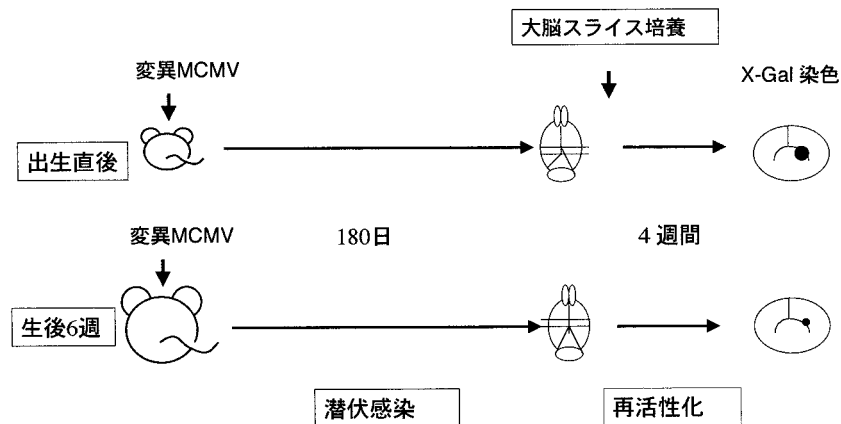


図6 脳における変異 MCMV (RM461) の潜伏感染と, 大脳スライス培養による再活性化の実験

り, また, この *e1* promoter が発現しやすいことは, 神経細胞で持続感染が起りやすいことの分子的基盤である可能性を示唆している. 最近教室の小杉らは, 発育期マウス脳に MCMV を感染すると, 海馬の *e1* 遺伝子産物を発現している神経細胞は innate immunity の反応を回避して持続感染に移行する可能性を示した⁴²⁾. また, 感染神経細胞はアポトーシスに陥りにくく⁴³⁾, 神経細胞は MHC Class I の発現が抑制されており特異的キラー T 細胞の攻撃を受けにくいことも持続感染へ移行しやすい要因と考えられる⁴⁴⁾. *e1* 遺伝子の神経細胞における持続的発現が神経機能に如何に影響するかが今後の課題である.

マウス脳における MCMV の潜伏感染

脳は先天性 CMV 感染症や AIDS の HCMV 感染症において主要な標的であるにも関わらず, CMV の脳における潜伏感染と再活性化に関する報告はない^{45~47)}. 種々のヒトの脳由来の培養細胞の HCMV に対する感受性に関する報告があり, グリア細胞⁴⁸⁾, ミクログリア⁴⁹⁾, 神経細胞⁵⁰⁾, 脳血管内皮細胞⁵¹⁾で HCMV が増殖することが知られている. しかし, *in vivo* における HCMV の感染動態に関しては, 剖検脳で推測する以外にはない⁵²⁾. 私達は発育期マウス脳における MCMV の急性期及び亜急性期のグリア細胞および神経細胞の感染動態について感染動態が異なること

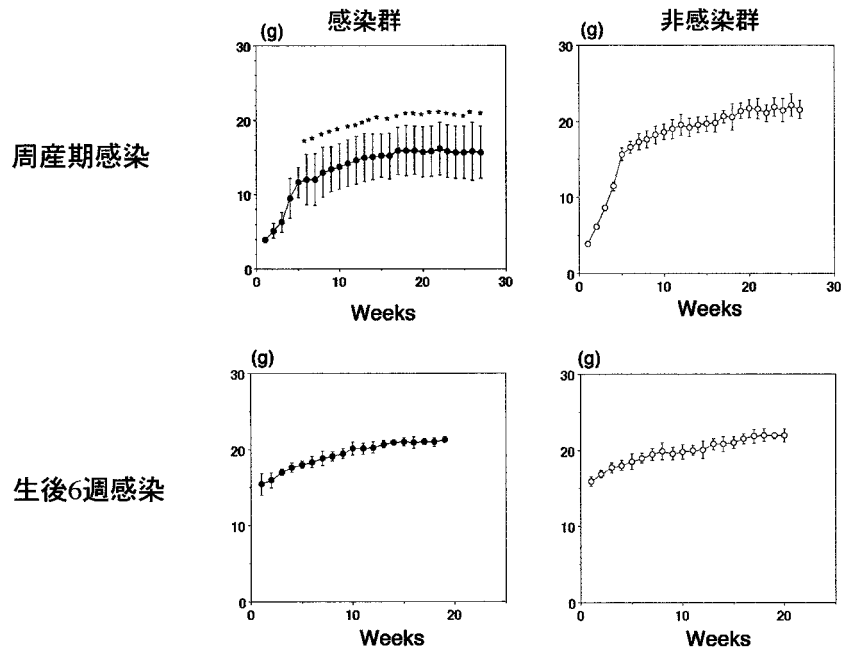


図7 周産期および生後6週マウスの脳に変異MCMV (RM461) を感染した群および非感染群の体重増加曲線

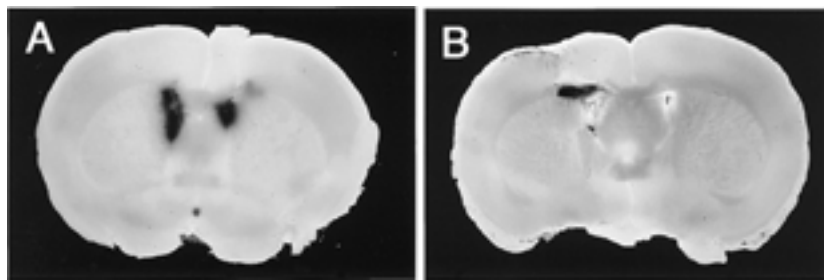


図8 潜伏感染後(180日), 4週間大脳スライス培養後, X-Gal染色
A: 周産期感染マウス, B: 生後6週感染マウス.

を報告した^{34,36)}. 急性感染においては前初期 (IE) 遺伝子がグリア系細胞で発現しやすく, 感染が持続すると神経細胞で早期遺伝子 e1 が発現しやすい傾向を示した.

マウス脳で MCMV が潜伏感染するかどうか分っていない. 私達は長期感染脳を取り出して大脳スライス培養することによって再活性化してくることを明らかにした. 感染すると β -gal が発現する変異ウイルス RM461 を用いた²⁵⁾. 出生直後に RM461 を 5×10^2 PFU 脳内感染したマウス (新生感染群) と生後6週後に 5×10^4 PFU 脳内感染したマウス (若成獣感染群) をそれぞれ6か月飼育し, 大脳スライス培養へ移した (図6). 新生感染群は非感染群と比較して平均体重が有意に低く, またバラツキが大きかった. これに対して若成獣感染群は非感染群と比較して平均体重に差がなくバラツキもなかった (図7). 感染後経時的に脳を取り出して大脳スライスおよびプラークアッセイしたところ, ウイルス感染価は両群とも感染1か月までに消失し, X-Gal 染色による脳室壁の感染細胞の検出も感染後3

週までに消失した. 従って両群ともに感染1か月までに脳に感染性のウイルスおよび感染細胞が消失し, 潜伏感染状態に移行したと見なした.

感染後3か月および6か月で脳を取り出し, 大脳スライス培養を行ったところ, X-Gal 染色によって特定の部位に感染細胞が出現することが明らかとなった⁵³⁾. この様な方法によって MCMV の脳での潜伏感染からの再活性化を検出したのは初めてである. 培養4週までに新生感染群では75%が X-Gal 染色で陽性となり, 陽性細胞の局在は主に脳室壁周囲であった (図8). 予想外なことに, 若成獣感染群でも75%に陽性所見を認めた. しかし, 感染細胞の量は新生感染群と比較して有意に少なかった. また, ウイルス感染価を 5×10^3 PFU に落とした若成獣感染群では再活性化率は42%と低下した. 大脳スライスのウイルス感染価をプラークアッセイしたところ, 培養3週目をピークとして感染性のウイルスの放出を認めた (図9). Reddehars⁵⁴⁾ は新生児期に MCMV を感染させ1年後に全身 γ 線照

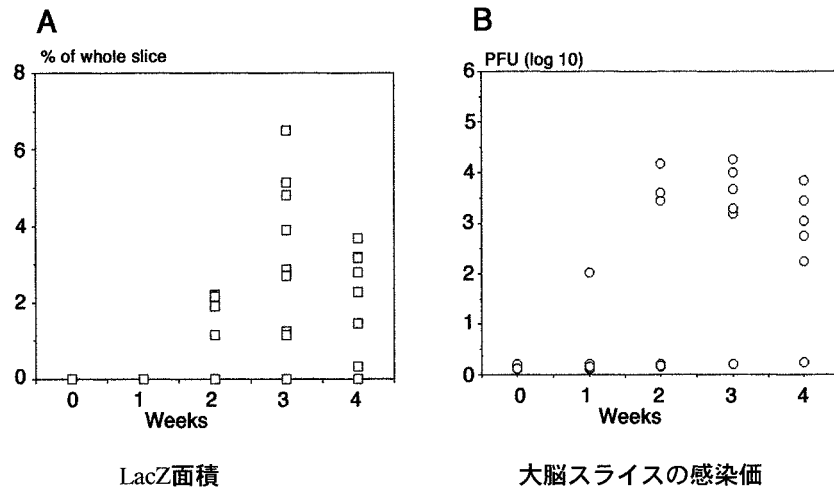


図9 周産期感染マウスを180日間飼育後、大脳スライス培養し、X-Gal染色後の感染細胞の量とプラークアッセイによるウイルス感染価

射したマウスでは肺、脾臓で約30%再活性化したのに対して、成獣マウス感染群では6.7%であったと報告している。私達の再活性化率は高かったが、これは脳へ直接感染させたことによると考えられる。若成獣感染群で再活性化率が高かったことは、成人においてもCMVの潜伏感染がおりAIDSなどの免疫不全によって再活性化する可能性が示唆された。

大脳スライス培養によって潜伏感染から再活性化してくる機序は明らかではないが、以前から行われている explant 培養法と同様であろうと考える。すなわち、潜伏感染細胞とCMVに感受性のある線維芽細胞の混合培養によって再活性化を検出する^{25,55}。しかし、大脳スライス培養法での再活性化の検出の利点は再活性化してくる細胞の局

在をみる事が出来る点にある。

再活性化してくる細胞の大脳スライスにおける局在は脳室壁周辺と大脳皮質辺縁部であるが、若成獣感染群および低い感染価で感染した脳では脳室周囲に局在する傾向が強かった(図8)。また、ウイルス感染細胞のX-Gal染色と神経前駆細胞のマーカーであるnestin, Musashi, GFAPとの二重染色で、両者が一致する傾向を認め、活性化してくる細胞はグリア系神経前駆細胞である可能性が示唆された。脳室壁のsubventricular zone (SVZ)は、神経幹細胞を含む神経前駆細胞の存在する部位である^{19,56}。大脳辺縁部にも未分化神経系細胞があるという報告がある⁵⁷。神経幹細胞は自己再生能を持ち、神経細胞、グリア細胞、オリゴデンドロサイトへ分化する能力を有する細胞である。

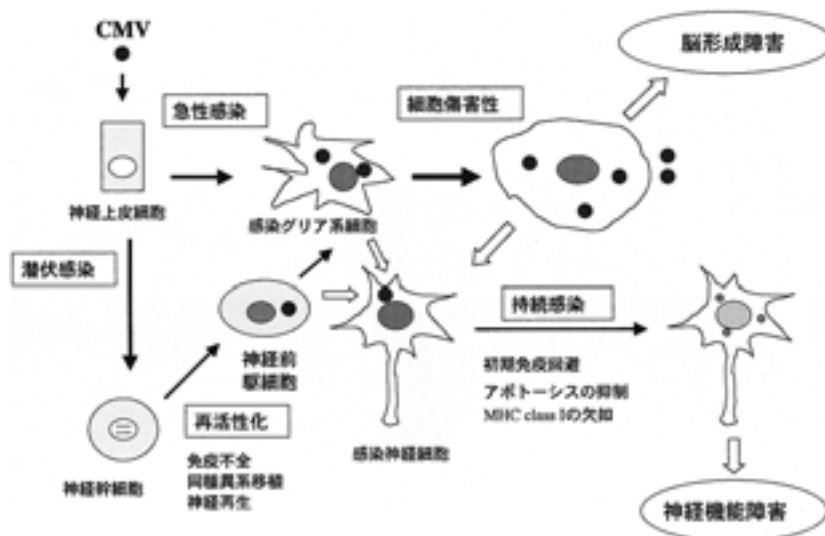


図10 CMVの胎生期脳への感染による脳形成障害、および生後長期間して脳機能障害の生ずるプロセスの想定図

神経前駆細胞は神経幹細胞から神経細胞あるいはグリア系細胞の方向へ分化が限定された未分化細胞と考えられている。再活性化した細胞はグリア系神経前駆細胞の性質を有すると考えられるが、この様な移行的な細胞で潜伏感染するとは考えにくいので、私達の仮説としてCMVは神経幹細胞に潜伏感染すると考える。培養によって神経前駆細胞へ分化することによって再活性化したと考えられる。最近Murphyら⁵⁸⁾は分化に伴うhistone deacetylase (HDACs)の低下によるクロマチン構造のゆるみがIE遺伝子を活性化させ、再活性化へと移行すると報告している。

CMVは胎生期の感染および生後の感染によって潜伏感染しやすく、免疫不全状態および同種異系の移植による刺激などによって再活性化すると考えられている^{46,47)}。神経疾患を神経幹細胞の移植によって治療しようとする試みがなされている。私達の結果から神経幹細胞でのCMVの潜伏感染を考慮に入れる必要があると考える。

おわりに

CMVは胎生期あるいは発育期脳に感染しやすい。その原因は主として脳室壁に存在する神経幹・前駆細胞が感受性が高いことに起因する。急性期の感染においてはグリア細胞において前初期遺伝子が活性化され許容感染になりやすい。感染神経細胞においては前初期遺伝子は発現しにくく、早期遺伝子e1が発現しやすい。Tgマウスにおいてプロモーターは神経細胞特異的に活性化された。これらの事実はe1遺伝子がCMVの神経細胞における持続感染に関与していると考えられる。e1遺伝子の神経細胞での発現が神経機能にどのように障害を起こすかは今後の課題である(図10)。感染後長期間したマウスから大脳スライス培養に移すと再活性化されることにより、私達はMCMVが脳で潜伏感染することを初めて示した。潜伏感染している細胞は神経幹・前駆細胞である可能性が高いと考える。

文 献

- 1) Weller TH. The cytomegalovirus: Ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N Engl J Med* **285**: 203-214, 1971.
- 2) Yow MD, Demmler GL. Congenital cytomegalovirus disease—20 years is long enough. *N Engl J Med* **326**: 702-703, 1992.
- 3) Ho M. Congenital and perinatal human cytomegalovirus infection. In: Ho M (ed) *Cytomegalovirus: biology and infection*. New York: Plenum Press, 205-277, 1991.
- 4) Bale JF. Human cytomegalovirus infection and disorders of the nervous system. *Arch Neurol* **41**: 310-320, 1984.
- 5) Becroft DMO. Prenatal cytomegalovirus infection: Epidemiology, pathology, pathogenesis. In: Rosenberg HS and Bernstein J (eds) *Perspectives in Pediatric Pathology*, New York: Massohn, 203-241, 1981.
- 6) Demmler GJ. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis* **13**(2): 315-329, 1991.
- 7) Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DR, Page F, Alford CA. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* **256**: 1904-1908, 1986.
- 8) Conboy TJ, Pass RF, Stagno S, Britt WT, Alford CA, McFarland CE, Boll TJ. Intellectual development in school-aged children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **77**: 801-806, 1986.
- 9) Pass RF, Stagno S, Myers GJ, Alford CA. Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics* **66**: 758-762, 1980.
- 10) Morgello S, Cho ES, Nielsen S, Devinsky O, Petito CK. Cytomegalovirus encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: An autopsy study of 30 cases and review of literature. *Human Pathol* **18**: 289-297, 1987.
- 11) Setinek U, Wondrucsh E, Jellinger K, Steuer A, Drlicek M, Grisold W, Lintner F. Cytomegalovirus infection of the brain in ADIS: A clinicopathological study. *Acta Neuropathol* **90**: 511-515, 1995.
- 12) Wiley CA, Nelson JA. Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis. *Am J Pathol* **133**: 73-81, 1988.
- 13) Tsutsui Y, Kashiwai A, Kawamura N, Kadota C. Microphthalmia and cerebral atrophy induced in mouse embryos by infection with murine cytomegalovirus in midgestation. *Am J Pathol* **143**: 804-813, 1993.
- 14) Tsutsui Y. Developmental disorders of the mouse brain induced by murine cytomegalovirus: Animal models for congenital cytomegalovirus infection. *Pathol Int* **45**: 91-102, 1995.
- 15) Li RY, Tsutsui Y. Growth retardation and microcephaly induced in mice by placental infection with murine cytomegalovirus. *Teratology* **62**: 79-85, 2000.
- 16) Griffith BP, McCormick SR, Fong CK, Lavalley JT, Lucica HL, Goff E. The placenta as a site of cytomegalovirus infection in guinea pig. *J Virol* **55**: 402-409, 1985.
- 17) McConnell SK. Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* **15**: 761-768, 1995.
- 18) Rakic P. Specification of cerebral cortical area. *Science*. **241**: 170-176, 1988.
- 19) McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* **276**: 66-71, 1997.
- 20) Stemple DL, Mahanthappa NK. Neural stem cells are blasting off. *Neuron* **18**: 1-4, 1997.
- 21) Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Develop Biol* **175**: 1-13, 1996.
- 22) Kosugi I, Shinmura Y, Kawasaki H, Arai Y, Li RY,

- Baba S, Tsutsui Y. Cytomegalovirus infection of the central nervous system stem cells from mouse embryo : a model for developmental brain disorders induced by cytomegalovirus. *Lab Invest* **80** : 1373–1383, 2000.
- 23) Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* **37** (2) : 173–182, 1991.
 - 24) Shinmura Y, Kosugi I, Kaneta M, Tsutsui Y. Migration of virus-infected neuronal cells in cerebral slice cultures of developing mouse brains after *in vitro* infection with murine cytomegalovirus. *Acta Neuropathol* **98** : 590–596, 1999.
 - 25) Stoddart CA, Cardin RD, Boname JM, Manning WC, Abenes GB, Mocarski ES. Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J Virol* **68** : 6243–6253, 1994.
 - 26) Lo DC, McAllister AK, Katz LC. Neuronal transfection in brain slice using particle-mediated gene transfer. *Neuron* **13** : 1263–1268, 1994.
 - 27) Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Tsutsui Y. The amount of immature glial cells in organotypic brain slices determines the susceptibility to murine cytomegalovirus infection. *Lab Invest* **82** : 1347–1358, 2002.
 - 28) Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class intermediate filament protein. *Cell* **60** : 585–595, 1990.
 - 29) Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H. Musashi 1 : an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci* **22** : 139–153, 2000.
 - 30) Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in adult mammalian brain. *Cell* **97** : 703–716, 1999.
 - 31) Everall I, Luthert P, Lantos P. A review of neuronal damage in human immunodeficiency virus infection : its assessment, possible mechanism and relationship to dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* **52** : 561–566, 1993.
 - 32) Petit CK, Kerza-Kwiatecki AP, Gendelman HE, McCarthy M, Nath A, Podack ER, Shapshak p, Wiley CA. Review : Neuronal injury in HIV infection. *J Neurovirol* **5** : 327–341, 1999.
 - 33) Mocarski ES Jr. Cytomegalovirus and their replication. In : Field BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Virology*, 3rd edn. Philadelphia : Lippincott-Raven, 2447–2449, 1996.
 - 34) Shinmura Y, Aiba-Masago S, Kosugi I, Li R-Y, Baba S, Tsutsui Y. Differential expression of the immediate-early and early antigens in neuronal and glial cells of developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus. *Am J Pathol* **151** : 1331–1340, 1997.
 - 35) Tsutsui Y, Naruse I. Murine cytomegalovirus infection of cultured mouse embryos. *Am J Pathol* **127** : 262–270, 1987.
 - 36) Tsutsui Y, Kashiwai A, Kawamura N, Aiba-Masago S, Kosugi I. Prolonged infection of mouse brain neurons with murine cytomegalovirus after pre- and perinatal infection. *Arch Virol* **140** : 1725–1736, 1995.
 - 37) Aiba-Masago S, Baba S, Li RY, Shinmura Y, Kosugi I, Arai Y, Nishimura M, Tsutsui Y. Murine cytomegalovirus immediate-early promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *Am J Pathol* **154** : 735–743, 1999.
 - 38) Li R-Y, Baba S, Kosugi I, Arai Y, Kawasaki H, Shinmura Y, Sakakibara S, Okano H, Tsutsui Y. Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in cerebral ventricular zone and glial progenitor cells in transgenic mice. *Glia* **35** : 41–52, 2001.
 - 39) Iwayama S, Yamamoto T, Furuya T, Kobayashi R, Ikuta K, Hirai K. Intracellular localization and DNA-binding activity of a class of viral early phosphoproteins in human fibroblasts infected with human cytomegalovirus (Towne strain). *J Gen Virol* **75** : 3309–3318, 1994.
 - 40) Rawlinson WD. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* **70** : 8833–8849, 1996.
 - 41) Arai Y, Ishiwata M, Baba S, Kawasaki H, Kosugi I, Li R-Y, Tsuchida T, Miura K, Tsutsui Y. Neuron-specific activation of murine cytomegalovirus early gene e1 in transgenic mice. *Am J Pathol* in press, 2003.
 - 42) Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Tsutsui Y. Innate Immune Responses to Cytomegalovirus Infection in the Developing Mouse Brain and Their Evasion by Virus-Infected Neurons. *Am J Pathol* **161** : 919–928, 2002.
 - 43) Kosugi I, Shinmura Y, Li RY, Aiba-Masago S, Baba S, Miura K, Tsutsui Y. Murine cytomegalovirus induces apoptosis in non-infected cells of the developing mouse brain and blocks apoptosis in primary neuronal culture. *Acta Neuropathol* **96** : 239–247, 1998.
 - 44) Joly E, Mucke L, Oldstone MB. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* **253** : 1283–1285, 1991.
 - 45) Cinque P, Marenzi R, Ceresa D. Cytomegalovirus infections of the nervous system. *Intervirology* **40** : 85–97, 1997.
 - 46) Hummel M, Abecassis MM. A model for reactivation of CMV from latency. *J Clin Virol* **25** : S123–136, 2002.
 - 47) Sissons JGP, Bain M, Wills MR, Scinclair JH. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Infect* **44** : 73–77, 2002.
 - 48) Ogura T, Tanaka J, Kamiya S, Sato H, Ogura H, Hatano M. Human cytomegalovirus persistent infection in a human central nervous system cell line : Production of a variant virus with different growth characteristics. *J Gen Virol* **67** : 2605–2616, 1986.
 - 49) Pulliam L. Cytomegalovirus preferentially infects a monocyte derived macrophage/microglial cells in human brain cultures : Neuropathology differs between strains. *J Neuropathol Exp Neurol* **50** : 432–440, 1991.
 - 50) Poland S, Bambbrick L, Dekaban GA, Rice GPA. The extent of human cytomegalovirus replication in primary neurons is dependent on host cell differentiation. *J Infect Dis* **170** : 1267–1271, 1994.
 - 51) Poland SD, Costello P, Dekaban GA, Rice GP. Cy-

- cytomegalovirus in the brain : *in vitro* infection of human brain-derived cells. J Infect Dis **162** : 1252-1262, 1990.
- 52) Perlman JM, Argyle C. Lethal cytomegalovirus infection in premature infants : Clinical, radiological, and neuropathological findings. Ann Neurol **13** : 64-68, 1992.
- 53) Tsutsui Y, Kawasaki H, Kosugi I. Reactivation of latent cytomegalovirus infection in mouse brain cells detected after transfer to brain slice cultures. J Virol **76(14)** : 7247-7254, 2002.
- 54) Reddehase MJ, Baltesen M, Rapp M, Jonjic S, Pavic I, Koszinowski UH. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. J Exp Med **179** : 185-193, 1994.
- 55) Jordan MC, Mar, VL. Spontaneous activation of latent cytomegalovirus from murine spleen explant. Role of lymphocytes and macrophages in release and replication of virus. J Clin Invest **70** : 762-768, 1982.
- 56) Sakakibara S, Okano H. Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS : implication of their roles in neural and glial cells development. J Neurosci **17** : 8300-8312, 1997.
- 57) Mercier F, Hatton GL. Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain parenchyma : roles in stem cell proliferation and morphological plasticity ? J Comp Neurol **431** : 88-104, 2001.
- 58) Murphy JC, Fische W, Verdin E, Sinclair JH. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. EMBO J **21** : 1112-1120, 2002.