9. サイトメガロウイルスによる脳障害

筒井 祥博

(浜松医科大学病理学第二講座)

はじめに

サイトメガロウイルス (CMV) の胎生期の感染によって脳障害が生ずることが知られている^{30,82)}。成人においても、免疫不全状態ことに HIV 感染による AIDS において CMV 脳症を25-35%に合併する^{61,84)}。CMV の胎内感染は全出産の約1%に認められ^{30,73)}、その内5-10%に出生時に全身性 CMV 感染症である巨細胞性封入体症が認められる^{15,19)}。中枢神経系の障害として、小頭症、脳室壁の石灰沈着、網膜炎、小眼球症、視神経萎縮、白内障などが挙げられる^{3,8,28,30)}。また、出生時無症状で、生後暫くして精神発達遅滞、視力障害、難聴、痙攣、てんかんなどの脳障害が生じてくることがある^{15,19,59)}。先天性 CMV 感染症における脳障害の発生機序についてはほとんど明かにされていない。ヒトの症例の解析には限界があり、またヒト CMV (HCMV) を用いた適切な動物モデルが開発されていない。

先天性 CMV 感染症の動物実験モデルはモルモット^{9,18,27)}、マウス^{5,17,35)}、サル⁴⁶⁾で報告されている。マウスなどの嚙歯類では絨毛の構造からウイルスが経胎盤感染し難いとされている。モルモット、サルは経胎盤感染するが妊娠期間が長く、飼育もマウスより困難である。私達は、宮崎医大微生物南嶋先生より供与されたマウス CMV (MCMV) (Smith 株)²²⁾を用いて MCMV の胎生期の感染による脳障害の発生機序に関する解析を試みてきた^{53,76,78,80)}。MCMV と HCMV とではウイルスの生物学的特性は必ずしも一致しているわけではないが、サイトメガロウイルスとしての基本

的特性は共通していると考えられる⁷¹⁾。ここでは、特に宿主の発育段階の相違、ウイルスの細胞特異性の変化に着目して、CMV による脳障害の発生機序について考察する。

マウス早期胚の MCMV に対する感受性

CMV の胎生期の感染経路として、経胎盤感染以外に上行感染が考えられ³⁸⁾、ことに精液を介する感染が問題になっている⁴⁴⁾。早期胚が CMV に感受性を有するかどうか明かでない。私達はマウス胚盤胞の胚腔内にて MCMV を高濃度に注入して、偽妊娠マウスの子宮内に戻し、胎令11日目の胚の発育およびウイルス抗原の存在を免疫組織化学的に調べたが、ウイルスが胚内で増殖した確証は得られなかった⁴⁰⁾。胚盤胞にウイルスを注入した胚の培養も行ったが、ウイルス抗原陽性細胞は検出出来なかった⁴⁰⁾。これらの事実はマウス早期胚は MCMV に対して感受性を持たないことを示している。SV40やポリオーマウイルスでは着床前マウス胚に感染すると報告されている²⁾。それでは何時からマウスは MCMV に感受性を示すようになるのだろうか? 胎令7.5日マウス胚を取り出し、MCMV を吸着し、全胚培養を行った⁷⁵⁾。MCMV 1 X10⁸ PFU/ml と高い感染価で吸着した時のみ、培養48-72時間で胚内の血管内皮、間葉系細胞にウイルス抗原陽性細胞が検出された。従って、マウス胚はこの時期に MCMV に感受性を獲得することが示唆された。Gonczol ら^{24,25)}によれば、未分化なヒト胚癌細胞では HCMV は増殖できないが、レチノイン酸で分化誘導すると感受性を獲得し、ウイルス増殖に許容性を示すようになる^{24,25)}。未分化胚癌細胞では、HCMV 前初期 (IE) 遺伝子の調節領域の発現抑制領域に抑制因子が結合し、細胞の分化によってこの抑制因子がはずれると IE 遺伝子が発現してウイルス増殖が開始すると考えられている⁵⁵⁾。一方、胚の分化に伴って IE 遺伝子の発現を促

Brain disorders induced by cytomegalovirus

Yoshihiro Tsutsui

2nd Department of Pathology, Hamamatsu University

School of Medicine 3600 Handa-cho, Hamamatsu 431-31

〒431-31 浜松市半田町3600

進する因子が生じてくることも推測される。Molony マウス白血病ウイルス (MoMuLV) では, epiblasts から中胚葉系へ分化する時, 感受性を獲得すると報告されている⁶⁸⁾。

MCMV のマウス胎生中期胚への感染による 眼球および脳形成障害

マウスでは胎令7日目頃から胎盤が出来始める。胎盤形成早期である胎令8.5日に Jaenisch の方法⁷³⁾によって羊膜腔内に MCMV を手術的に注入し, その後の感染を経時的に調べた。ウイルス抗原陽性細胞は, 胎令10.5日目に胎盤に, 胎令11.5日にマウス胚の血管間葉系に, 胎令12.5日に神経外胚葉に認めた⁴⁰⁾。胎令15.5日胚においては約20の胚に小眼球症を認めた⁷⁸⁾ (図1)。ウイルス感染細胞が眼球周囲の間葉系細胞に認められる例と, 眼球内のレンズ上皮, 後眼球腔内に認められる例の2つのタイプの小眼球症を認めた⁷⁸⁾。ヒトにおいて CMV の胎内感染によって網膜炎, 神経細胞の萎縮, 白内障などの眼球症状が知られており^{12,72)}, それらの病理発生の実験モデルになり得ると考えられる。この感染方法によって, 胎生後期には血管間葉系の細胞に感染が広がり, 脳においては血管内皮, 神経細胞, 脳室上衣細胞, 脈絡叢の上皮細胞にウイルス抗原陽性細胞を検出した⁷⁸⁾。

胎生期の神経系の器官形成期における間葉系細胞は一連の形態形成に関与する遺伝子の時間的, 空間的な発現制御と関連していると考えられ³¹⁾, CMV の胎内感染はそれらの遺伝子の発現調節に影響を与える可能性がある。前述のヒト未分化胚細胞においてレチノイン酸で分化誘導すると種々のホメオボックス遺伝子が発現する⁴⁸⁾, 私達は, HOX 2 A の誘導される細胞と HCMV の前初期遺伝子を発現する細胞とが *in situ* hybridization と免疫染色の二重染色で一致することを示した³⁹⁾。また, HCMV をシクロヘキシミド (CH) 存在下で HEL に感染すると, HOX 2 E が特異的に発現することを Northern blot で示した。HCMV による HOX 2 E の活性化は紫外線で不活化した HCMV によっても認められ, 前初期遺伝子の発現を介さなくても起こる現象であることが明らかになった³⁹⁾。HCMV による HOX 2 E の活性化は, 予め protein kinase C の賦活剤である TPA で細胞を処理するとほぼ完全に抑制されたが (未発表), その機序は明かでない。類似した現象として, Boldogh ら^{10,11)}は紫外線不活化 HCMV がプロトオンコジーン *fos*, *jun*, *myc* を活性化することを示した。この活性化は感染後数分で起こ

図1. 異なる発育段階のマウスへのMCMV感染による生後あるいは感染後14日 (左) および30日 (右) の各臓器のウイルス抗原陽性の個体数 (本文参照)。

るが, CH の処理を必要としない。以上の結果は, CMV が個体の発生や分化に関わる遺伝子発現に何らかの影響を与えることを示唆している。

発育の段階と MCMV への感受性の相違

一般に幼弱な細胞はウイルス感染への感受性が高いことが知られている^{29,86,87)}。幼弱な細胞自身の持つ感受性と, 幼弱な個体の感受性は分けて考える必要がある。前者はウイルスへの親和性が問題であり^{26,50)}, 後者は, 免疫系の未熟性, 脳・血液関門の未熟性などが問題になる⁶⁷⁾。

私達はマウスの発育と MCMV の感受性を知るために, MCMV を 1) 胎令8.5 (E8.5) マウス胚の羊膜腔内, 2) E15.5マウス胚の腹腔内, 3) 生後2日目 (Pn 2), 4) 生後11日目 (Pn11), 5) 生後30日目 (A30) マウスの腹腔内, 6) 生後30日マウスに免疫抑制剤であるサイクロフォスファミド投与マウス (A30-CP) の腹腔に体重なりに相応した比較的弱いウイルス感染価で注入した⁷⁹⁾。生後あるいは感染後14日目と, 30日目にウイルス抗原陽性細胞を, 大脳皮質 (Cc), 海馬 (Hi), 小脳 (Cb), 肺 (lu), 腎臓 (Ki), 肝臓 (Li) 等について比較した (図2)。その結果, 生後11日以降の感染では CP 投与群以外は感染細胞は検出出来ず, E15.5 および Pn 2 の感染において生後14日目に脳以外に肺, 腎臓にウイルス抗原陽性細胞を認め, 生後30日になると感染細胞は脳に局限する傾向を示した⁷⁹⁾。E8.5の感染では生後30日に脳のみに感染細胞を認めた (図2)。この結果は, 発育の幼弱な時期の個体は, MCMV 感染への感受性が強いことを示している。年齢が進むに従って MCMV 感染に抵抗性を示すのは NK 細胞活性

図2. 胎令8.5日マウス胚のMCMVを羊膜腔にMCMVを注入し、胎令15.5日に見られた小眼球症
A. 右目, B. 左目

の亢進^{16,29)}、マクロファージの成熟⁷⁰⁾と関連していると考えられる。私達の結果では、幼弱な時期の脳細胞、特に大脳皮質および海馬の神経細胞が、CMVに強い感受性を持ち、これらの感染細胞は比較的長期間残存する傾向を示した⁷⁹⁾(図3)。神経細胞のように再生不可能な重要な細胞は、ウイルス感染に対して、宿主の免疫監視機構から回避されて守られる必要がある⁴³⁾。Jolyら^{36,37)}によれば神経細胞はMHC class Iの発現が抑制される機構が働いており、キラーCTLの攻撃を受け難い。また、この神経細胞のMHC class Iの発現抑制はインターフェロンγによって回復するという。MHC class Iの欠損によってウイルス抗原の提示が抑制されると、感染神経細胞は持続感染へと移行しやすくなるという^{20,37)}。Rallら⁶⁶⁾によれば、神経細胞にMHC class Iを発現させたトランスゲニック(Tg)マウスにリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)を感染させると、脳・血管関門の破壊と、CD 8⁺の増加、

および神経障害が生じた。これらの報告を考慮すると、MCMVを胎生期に感染したマウスは神経細胞に持続感染が起こっている可能性が考えられる。

MCMVの神経細胞への感受性

ヒトの先天性CMV感染による巨細胞性封入体症の脳において、脳室壁あるいは脳室上衣下に石灰沈着などの強い病変が認められることより、胎生期の脳はCMVが脳室壁へ感染し易く^{8,60)}、脳室壁から大脳皮質に向けてventriculofugalな感染の広がりを示すと考えられる。この感染様式は、AIDS患者におけるCMV脳症の症例でも報告されている⁸³⁾。私達の胎生中期マウスの感染モデルでも、脈絡叢上皮細胞あるいは脳室上衣細胞にウイルス感染細胞が目立ち⁷⁸⁾、最初に脳室内に感染して、その後、脳室壁からventriculofugalに感染が広がっている可能性が高い。従って、脳室内にMCMVを注入する感染モデルは発育期脳の代表的感染ルートに類似していると考えられる。

マウスにおいて胎令13日頃から神経発生が盛んになり胎令18日頃まで続く。一方、グリアの発生は周産期から生後に盛んになりやがて減少していくとされている。私達は、神経発生の盛んな時期である胎令15.5日にMCMVを1 X 10³ PFU注入し、生後の感染を免疫組織学的に解析した⁷⁶⁾。

ウイルス抗原に対する抗体は、早期核抗原と後期核抗原を認識するモノクローナル抗体(mAb D5)を作成した。ウイルス抗原陽性細胞は大脳皮質では神経細胞の分布とはほぼ一致した層状の配列を示し、海馬においても錐体神経細胞の局在と一致していた。MCMVは脳室壁の未分化な神経前駆細胞に感染して、脳の形成に伴ってcortical plateへとmigrationする可能性が示唆された(投稿中)。MCMVに感受性を示す細胞が神経細胞であることを確かめるために、D5抗体で検出されるMCMV核抗原と、神経細胞のマーカーであるneuron-specific enolase(NSE)、あるいはグリアのマーカーであるglial fibrillary acidic protein(GFAP)とのそれぞれ二重染色を行った(図4)。その結果、核抗原を認識するD5抗体で検出されるほとんどの感染細胞は神経細胞であることが明らかとなった。GFAPと二重染色されるD5陽性細胞は数パーセントに過ぎなかった。胎生期や、周産期の腹腔内感染の場合と同様、MCMVは神経細胞に親和性を示した。

マウスの培養脳細胞にMCMVを感染した報告では、神経細胞およびアストロサイトなどでウイルスの増殖を認めている^{4,85)}。ヒトにおいて神経細胞はCMV

図3. 胎令15,5日マウス胚にMCMV腹腔内投与後, 生後14日目 (A,B) および生後30日目
の大脳皮質 (cc) (A,C) および海馬 (hc) (B,D) のウイルス抗原陽性細胞。

に感受性があるのだろうか? ヒト神経系細胞の凝集培養は神経細胞を含むと考えられるが, これらの細胞にHCMVは感染すると報告されている^{49,65)}。Polandら⁶³⁾によれば, 未分化ヒト神経細胞はdbcAMP, NGF, IBMXなどの分化誘導物質で分化させるとHCMVの増殖性が100-1000倍上昇し, 神経細胞がHCMVに感受性があることを直接示した。ヒト胎児網膜にHCMVを感染し, SCIDマウスの前眼房に移植した仕事でも, 網膜細胞でHCMVが増殖した²¹⁾。

CMVの前初期 (IE) 遺伝子の promoter/enhancer (P/E) は培養細胞においては, ほとんどの細胞で pantropic に発現することが知られているが, HCMV-IE P/Eを用いた Tg マウスにおいては, 細胞特異的に制御された発現をすることが2つのグループによって発表された^{6,7,23,41)}。この Tg マウスの幼弱な時期において, HCMV-IE P/Eの発現する細胞はヒトの先天性CMV感染症のときCMVに感受性を示す細胞とは

ほぼ一致した比較的広範な分布を示し, 成熟が進むとその発現特異性は神経細胞を含む一部の細胞群に局限する傾向が示された。以上の報告からヒトにおいてもCMVは神経細胞に親和性を持つと考えられる。

神経細胞は post-mitotic で, 高度に分化した細胞で, 抗原提示され難いため, 持続感染に移行しやすい^{20,37)}。Oldstoneによれば, ウイルスの持続感染によって細胞障害を受けず, 細胞の高度の機能のみが障害あるいは変化することによって病気になる過程を明らかにしていくことが今後の重要な課題であるという^{20,57,58)}。持続感染においては, ウイルス抗原の提示され難さなどの細胞側の特殊性に加え, ウイルスの遺伝子発現, DNA複製が著しく制限されるようにウイルス自体が変異することも必要であると考えられている⁵²⁾。この他に感染細胞と非感染細胞の細胞構築, 相互作用の特殊性なども関与すると考えられる。

図4. 胎令15.5日胚にMCMV注入後、生後7日目の大脳皮質、neuron-specific enolase (NSE) (A), GFAP(B)とウイルス抗原 (D5) の二重染色。C. H. E. 染色。VZ: 脳室壁, cc: 大脳皮質, mn: 髄膜。

神経細胞とグリア細胞における CMV の 感染動態が異なる可能性

Maeda ら⁴⁷⁾はヒトにおける CMV の先天感染と、後天感染の症例を前初期抗原を染める単クローン抗体を作成して比較した。前初期抗原は胎生期には発現し難く、発育に依存した発現の可能性が示唆された。私達は、MCMV 感染細胞をラットに免疫し、その感作脾細胞をマウスミエロマ細胞 SP 2 と細胞融合することによって、MCMV の前初期 (IE) 抗原に対するモノクローナル抗体 (N 2) を得た。胎生後期に脳室内に MCMV を感染させた生後のマウス脳を、この抗体を用いて染色し、D 5 抗体によるウイルス抗原陽性細胞の分布と比較した。D 5 抗体では大脳皮質あるいは海馬の神経細胞が陽性になるのに対して、N 2 抗体では脳室壁あるいは脳室周囲の白質の細胞が陽性になる傾向を示した。すなわち、D 5 抗体と N 2 抗体とでウイルス抗原陽性細胞の分布が異なっていた (図 4)。N 2 抗体による IE 抗原発現細胞の細胞の性質を知るために、IE 抗原と NSE, GFAP などと二重染色を行った。その結果、IE 抗原を発現している細胞と GFAP を発現する細胞がほとんど一致することが明らかとなった (未発表)。グリア細胞は IE 抗原までしか発現しないのか、それとも感染細胞の消長が速く、D 5 抗体で早

期抗原が検出出来にくいのか明らかでない。いずれにしても、神経細胞とグリア細胞で、MCMV の感染様式が異なる可能性が高い。グリア細胞もその数パーセントは D 5 を発現することは既に述べた。感染グリア細胞は許容性に感染する細胞と、IE 抗原のみを発現して潜伏感染へと移行する細胞とに分かれる可能性も考えられる。ヒトにおいてグリア系細胞における CMV の感受性に関して、Poland らは、ヒト glioblastoma 細胞に HCMV を感染させると、IE 抗原は発現したが、ウイルスゲノムは検出出来ず、abortive な感染をすると報告した⁶²⁾。グリア系細胞が脳における CMV の潜伏感染細胞である可能性を強く示唆する結果が、HCMV-IE P/E と lacZ 遺伝子を連結した組換え体による Tg マウスを用いた研究で示された²³⁾。IE promoter は Tg マウスのほとんどのアストロサイトで遺伝子発現の活性を示さないが、脳に障害性の刺激を加えると反応性アストロサイトに lacZ の発現が喚起されることが明らかにされた。このことは CMV がグリア系細胞に潜伏感染し、何らかの刺激で再活性化する可能性を示唆している。

Ogura ら⁵⁰⁾は、ヒト由来の glioma 細胞に HCMV が持続感染し、持続感染した HCMV の増殖はおそく、IE 蛋白の分子量、ウイルスの DNA 構造が異なると報

図5. ウイルス感染大脳皮質。A. 早期核抗原 (D5), B. 前初期抗原 (N2)。VZ: 脳室壁, cc: 大脳皮質, mn: 髄膜。

告した。また、MCMV が末梢神経細胞で潜伏感染するという報告もあり⁷⁾、持続感染、潜伏感染する細胞は脳においてもそれぞれ単一ではない可能性もある。

発育した個体における CMV による脳障害

胎生期の CMV の感染による脳障害は、胎生期に生じたウイルス性脳炎の癱痕化した後遺症であろうか？あるいは CMV は胎生期に中枢神経系に感染して、生後長期間、持続感染あるいは潜伏感染しているのであろうか？また、その様な感染を担う細胞は何か？本来造血細胞に親和性のある CMV が胎生期に感染すると、中枢神経系に局限した障害を残す理由は、CMV の親和性細胞、感染様式が胎生期と発育の進んだ個体とで異なるためであると考えられる。

ここで発育した個体の CMV 感染による脳障害について触れる。CMV は造血細胞親和性であり、単球/マクロファージ系細胞はその標的と見なされている⁸¹⁾。HCMV においても^{32,81)}、MCMV においても⁷⁴⁾、CMV は単球系細胞に感染して全身に散布され、また、持続感染、潜伏感染の担い手と考えられている。脳におけるミクログリアは単球/マクロファージ系細胞であり、培養系ではこれらの細胞で CMV のが増殖する^{65,69)}。単球/マクロファージ系の前駆細胞で、HCMV の潜伏感染に関わる新たな遺伝子発現が明ら

かになってきたが⁴²⁾、中枢神経系で同様なことが起っているか明らかでない。Booss らは実験的に若いモルモットに CMV を脳内接種すると、ミクログリア/単球系が反応し、T 細胞の反応は乏しく、T 細胞の反応が主体の他のウイルス性脳炎と異なっていることを指摘した¹³⁾。モルモットの CMV 脳症においても¹⁴⁾、成人における AIDS 患者の CMV 脳症においても^{51,84)}、microglial nodules が形成されることが特徴的とされている。この microglial nodules に CMV の抗原やゲノムが検出されている^{83,84)}。ヒトにおける先天性 CMV 感染症の脳においては、microglial nodules は特徴的所見ではない^{8,60)}。私達のマウスにおける MCMV の胎生期の感染実験においても、microglial nodules は認められなかった。幼弱な個体と、発育した個体において、CMV への細胞親和性、感染様式が異なる可能性が考えられる。

血管内皮は CMV の代表的標的細胞である⁸¹⁾。脳における血管内皮が CMV に感受性があることも、in vitro⁶²⁾、in vivo^{54,77)}で報告されている。成熟した個体においては脳・血管関門が中枢神経系への病原微生物の侵入の障壁になっている。HIV などの直接の感染あるいは免疫不全に伴う何らかの障害によって、ひとたびこの関門が破壊されると、神経細胞やグリア細胞が CMV に暴露される。この時ミクログリア/単球系細

胞, NK 細胞などが感染防御に当たると考えられるが, 全身の免疫系から隔離された特殊な環境における防御反応はまだ充分明らかにされていない。

CMV の脳への感染は, 宿主細胞と反応する自己抗体あるいは神経系細胞の自己抗原と反応する T 細胞の増殖などを喚起する可能性があり, Guillain-Barre 症候群, Rasmussen 脳炎などの成因のひとつになっている可能性が示唆されている^{34,64)}。

文 献

- 1) Abols-Manty, I., Siegel, L., Verity, M. A., Londe, H., Graves, M. C. (1987) Latency of mouse cytomegalovirus in sciatic nerve. *Neurology* **37**, 1809-1812.
- 2) Abramczuk, J., Vorbrodt, A., Solter, D., Koprowski, H. (1978). Infection of mouse preimplantation embryos with simian virus 40 and polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 999-1003.
- 3) Bale, J. F. (1984) Human cytomegalovirus infection and disorders of the nervous system. *Arch. Neurol.*, **4**, 310-320.
- 4) Bale, J. F. Jr, O'Neil, M., Wentzien, J., Schelper, R. (1987) Murine cytomegalovirus infection of reaggregate cultures of fetal mouse brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **46**, 72-83.
- 5) Basker, J. F., Stanat, S. C., Sulik, K. K., Huang, E. S. (1983) Murine cytomegalovirus-induced congenital defects and fetal maldevelopment. *J. Infect. Dis.*, **148**, 836-843.
- 6) Basker, J. F., Smith, P. P., Nilaver, G., Jupp, R. A., Hoffmann, S., Pfeffer, N. J., Tenney, D. J., Colberg-Poley, A. M., Ghazal, P., Nelson, J. A. (1996) The enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter determines cell type-specific expression in transgenic mice. *J. Virol.*, **70**, 3207-3214.
- 7) Baskar, J. F., Smith, P. P., Ciment, G. S., Hoffmann, S., Tucker, C., Tenney, D. J., Colberg-Poley, A. M., Nelson, J. A., Ghazal, P. (1996) Developmental analysis of the cytomegalovirus enhancer in transgenic animals. *J. Virol.*, **70**, 3215-3226.
- 8) Becroft, D. M. O. (1981) Prenatal cytomegalovirus infection: Epidemiology, pathology, pathogenesis. In: Rosenberg H. S., Bernstein J., eds. *Perspectives in Pediatric Pathology*. Masson, New York, 203-241.
- 9) Bia, F. J., Griffith, B. P., Fong, C. K. Y., Hsiung, G. D. (1983) Cytomegalovirus infections in guinea pig: Experimental models for human disease. *Rev. Infect. Dis.*, **5**, 177-195.
- 10) Boldogh, I., AbuBakar, S., Albrecht, T. (1990) Activation of proto-oncogenes: An immediate early event in human cytomegalovirus infection. *Science*, **247**, 561-564.
- 11) Boldogh, I., AbuBakar, S., Deng, C. Z., Albrecht, T. (1991) Transcriptional activation of cellular oncogenes fos, jun, and myc by human cytomegalovirus. *J. Virol.*, **65**, 1568-1571.
- 12) Boniuk, I. (1972) The cytomegalovirus and the eye. *Int. Ophthalmol. Clin.* **12**, 169-190.
- 13) Booss, J., Dann, P. R., Griffith, B. P., Kim, J. H. (1989) Host defense response to cytomegalovirus in the central nervous system: Predominance of the monocyte. *Am. J. Pathol.*, **134**, 71-78.
- 14) Booss, J., Winkler, S. R., Griffith, B. P., Kim, J. H. (1989) Viremia and glial nodule encephalitis after experimental systemic cytomegalovirus infection. *Lab. Invest.* **61**, 644-649.
- 15) Boppana, S. B., Pass, R. F., Britt, W. J., Stagno, S., Alford, C. A. (1992) Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: Neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **11**, 93-99.
- 16) Brutkiewicz, R. R., Welsh, R. M. (1995) Major histocompatibility complex class I antigens and the control of viral infections by natural killer cells. *J. Virol.*, **69**, 3967-3971.
- 17) Chantler, J. K., Misra, V., Hudson, J. B. (1979) Vertical transmission of murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.*, **42**, 621-625.
- 18) Choi, Y. C., Hsiung, G. D. (1978) Cytomegalovirus infection in guinea pigs. II. Transplacental and horizontal transmission. *J. Infect. Dis.*, **138**, 197-202.
- 19) Conboy, T. J., Pass, R. F., Stagno, S., et al. (1986) Intellectual development in school-aged children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics*, **77**, 801-806.
- 20) de la Torre, J. C., Oldstone, M. B. A. (1996) Anatomy of viral persistence: Mechanisms of persistence and associated disease. *Adv. Virus Res.*, **46**, 311-343.
- 21) DiLoreto, D. Jr., Epstein, L. G., Lazer, E. S., Britt, W. J., del Cerro, M. (1994) Cytomegalovirus infection of human retinal tissue: An in vivo model. *Lab. Invest.*, **71**, 141-148.
- 22) Ebina, K., Minamishima, Y. (1984) Protective effect of biological response modifiers on murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.*, **51**, 117

- 122.
- 23) Fritschy, J. M., Brandner, S., Aguzzi, A., Koedood, M., Lücher, B., Mitchell, P. J. (1996) Brain cell type specificity and gliosis-induced activation of the human cytomegalovirus immediate-early promoter in transgenic mice. *J. Neurosci.* **16**, (7)2275-2282.
 - 24) Gonczol, E., Andrew, P. W., Plotkin, S. A. (1984) Cytomegalovirus replicates in differentiated but not in undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Science*, **224**, 159-161.
 - 25) Gonczol, E., Andrew, P. W., Plotkin, S. A. (1985) Cytomegalovirus infection of human teratocarcinoma cells in culture. *J. Gen. Virol.*, **66**, 509-515.
 - 26) Gonzalez-Scarano, F., Tyler, K. L. (1987) Molecular pathogenesis of neurotropic viral infections. *Ann. Neurol.*, **22**, 565-574.
 - 27) Griffith, B. P., McCormick, S. R., Booss, J., Hsiung, G. D. (1986) Inbred guinea pig model of intrauterine infection with cytomegalovirus. *Am. J. Pathol.*, **122**, 112-119.
 - 28) Handshaw, J. B. (1970) Developmental abnormalities associated with congenital cytomegalovirus infection. *Adv. Teratol.*, **4**, 64-93.
 - 29) Hayashi, K., Eizuru, Y., Sato, Y., Minamishima, Y. (1985) The role of NK cells activity in age-dependent resistance of murine cytomegalovirus infection. *Microbiol. Immunol.*, **29**, 939-950.
 - 30) Ho, M. (1991) Cytomegalovirus : Biology and Infection, 2 nd edn. Plenum Press, New York, pp. 205-227.
 - 31) Holland, P. W. H., Hogan, B. L. M. (1988) Expression of homeobox genes during mouse development : A review. *Genes Dev.*, **2**, 773-782.
 - 32) Ibanez, C. E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C., Nelson, J. A. (1991) Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J. Virol.* **65**, 6581-6588.
 - 33) Jaenisch, R. (1985) Mammalian neural crest cells participate in normal embryonic development on microinjection into post-implantation mouse embryos. *Nature*, **318**, 181-183.
 - 34) Jay, V., Becker, L. E., Otsubo, H., Cortez, M., Hwang, P., Hoffman, H. J., Zielenska, M. (1995) Chronic encephalitis and epilepsy (Rasmussen's encephalitis) : Detection of cytomegalovirus and herpes simplex virus 1 by the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Neurology*, **45**, 108-117.
 - 35) Johnson, K. P. (1969) Mouse cytomegalovirus : Placental infection. *J. Infect. Dis.*, **129**, 445-450.
 - 36) Joly, E., Mucke, L., Oldstone, M. B. A. (1991) Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* **253**, 1283-1285.
 - 37) Joly, E., Oldstone, M. B. A. (1992) Neuronal cells are deficient in loading peptides onto MHC class I molecules. *Neuron* **8**, 1185-1190.
 - 38) Jordan, M. C., Rousseau, W. E., Noble, G. R., Stewart, J. A., Chin, T. D. Y. (1973) Association of cervical cytomegalovirus with venereal disease. *N. Engl. J. Med.*, **288**, 932-934.
 - 39) Kadota, C., Nagahama, M., Tsutsui, Y. (1992) Relationship between HOX 2 homeobox gene expression and the human cyto-megalovirus immediate early genes. *J. Gen. Virol.*, **73**, 975-981.
 - 40) Kashiwai, A., Kawamura, N., Kadota, C., Tsutsui, Y. (1992) Susceptibility of mouse embryo to murine cytomegalovirus infection in early and mid-gestation stages. *Arch. Virol.*, **127**, 37-48.
 - 41) Koedood, M., Fichtel, A., Meier, P., Mitchell, P. J. (1995) Human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early enhancer/promoter specificity during embryogenesis defines target tissues of congenital HCMV infection. *J. Virol.*, **69**, (4)2194-2207.
 - 42) Kondo, K., Kaneshima, H., Mocarski, E. S. (1994) Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11879-11883.
 - 43) Koszinowski, U. H., Jonjic, S., Lucin, P. (1994) Cytomegalovirus persistence by evasion from immune control. *Semina, Virol.*, **5**, 297-305.
 - 44) Lang, D. J., Kummer, J. F. (1972) Demonstration of cytomegalovirus in semen. *N. Engl. J. Med.*, **287**, 756-758.
 - 45) Lathey, J. L., Wiley, C. A., Verity, M. A., Nelson, J. A. (1990) Cultured human brain capillary endothelial cells are permissive for infection by human cytomegalovirus. *Virology*, **176**, 266-273.
 - 46) London, W. T., Martinez, A. J., Houff, S. A., et al. (1986) Experimental congenital disease with simian cytomegalovirus in rhesus monkeys. *Teratology*, **33**, 323-331.
 - 47) Maeda, A., Sata, T., Sato, Y., Kurata, T. (1994) A comparative study of congenital and postnatally acquired human cytomegalovirus infection in infants : Lack of expression of viral immediate early protein in congenital cases.

- Virch. Arch., **424**, 121-128.
- 48) Mavilio, F., Simeone, A., Boncinelli, E., Andrews, P. W. (1988) Activation of four homeobox gene clusters in human embryonal carcinoma cells induced to differentiate by retinoic acid. *Differentiation* **37**, 73-79.
- 49) McCarthy, M., Resnick, L., Taub, F., Stewart, R. V., Dix, R. D. (1991) Infection of human neural cell aggregate cultures with a clinical isolate of cytomegalovirus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **50**, (4)441-450.
- 50) Mims, C. A. (1989) The pathogenetic basis of viral tropism. *Am. J. Pathol.* **135**, 447-455.
- 51) Morgello, S., Cho, E. S., Nielsen, S., Devinsky, O., Petito, C. K. (1987) Cytomegalovirus encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome : An autopsy study of 30 cases and a review of the literatures. *Hum. Pathol.*, **18**, 289-297.
- 52) Morrison, L. A., Fields, B. N., Dermody, T. S. (1993) Prolonged replication in the mouse central nervous system of reoviruses isolated from persistently infected cell cultures. *J. Virol.* **67**, (6)3019-3026.
- 53) Naruse, I., Tsutsui, Y. (1989) Brain abnormalities induced by murine cytomegalovirus injected into the cerebral ventricles of mouse embryos ex utero. *Teratology*, **40**, 181-189.
- 54) Navin, J. J., Angevine, J. M. (1968) Congenital cytomegalovirus inclusion disease with porencephaly. *Neurology*, **18**, 470-472.
- 55) Nelson, J. A., Gnann, J. W. Jr., Ghazal, P. (1990) Regulation and tissue specific expression of human cytomegalovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **154**, 75-100.
- 56) Ogura, T., Tanaka, J., Kamiya, S., Sato, H., Ogura, H., Hatano, M. (1986) Human cytomegalovirus persistent infection in a human central nervous system cell line : Production of a variant virus with different growth. *J. Gen. Virol.*, **67**, 2605-2616.
- 57) Oldstone, M. B. A. (1989) Viral persistence. *Cell* **56**, 517-520.
- 58) Oldstone, M. B. A. (1993) Viruses and diseases of the twenty-first century. *Am. J. Pathol.* **143**, 1241-1249.
- 59) Pass, R. F., Stagro, S., Myers, G. J., Alford, C. A. (1980) Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection : Results of longterm longitudinal follow-up. *Pediatrics* **66**, 758-762.
- 60) Perlman, J. M., Argyle, C. (1992) Lethal cytomegalovirus infection in preterm infants : Clinical, radiological, and neuropathological findings. *Ann. Neurol.*, **31**, (1)64-68.
- 61) Petito, C. K., Cho, E-S., Lemann, W., Navia, B. A., Price, R. W. (1986) Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) : An autopsy review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **45**, 635-46.
- 62) Poland, S. D., Costello, P., Dekaban, G. A., Rice, G. P. A. (1990) Cytomegalovirus in the brain : In vitro infection of human brain-derived cells. *J. Infect. Dis.*, **162**, 1252-1262.
- 63) Poland, S. D., Bambrick, L. L., Dekaban, G. A., Rice, G. P. A. (1994) The extent of human cytomegalovirus replication in primary neurons is dependent on host cell differentiation. *J. Infect Dis.*, **170**, 1267-1271.
- 64) Power, C., Poland, S. D., Blume, W. T., Girvin, J. P., Rice, G. P. A. (1990) Cytomegalovirus and Rasmussen's encephalitis. *Lancet*, **336**, 1282-1284.
- 65) Pulliam, L., Berens, M. E., Rosenblum, M. L. (1988) A normal human brain cell aggregate model for neurobiological studies. *J. Neurosci. Res.* **21**, 521-530.
- 66) Rall, G. F., Mucke, L., Oldstone, M. B. A. (1995) Consequences of cytotoxic T lymphocyte interaction with major histocompatibility complex class I-expressing neurons in vivo. *J. Exp. Med.*, **182**, 1201-1212.
- 67) Risau, W., Wolburg, H. (1990) Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.*, **13**, 174-178.
- 68) Savatier, P., Morgenster, J., Beddington, R. S. P. (1990) Permissiveness to murine leukemia virus expression during preimplantation and early postimplantation mouse development . *Development*, **109**, 655-665.
- 69) Schut, R. L., Gekker, G., Hu, S., Chao, C. C., Pomeroy, C., Jordan, M. C., Peterson, P. K. (1994) Cytomegalovirus replication in murine microglial cell cultures : Suppression of permissive infection by interferon- γ . *J. Infect. Dis.*, **169**, 1092-1096.
- 70) Selgrade, M. K., Osborn, J. E. (1974) Role of macrophages in resistance to murine cytomegalovirus. *Infect. Immun.*, **10**, 1383-1390.
- 71) Staczek, J. (1990) Animal cytomegaloviruses. *Microbiol. Rev.*, **54**, 247-265.
- 72) Stagno, S., Reynold, D. W., Amos, C. S. et al. (1977) Auditory and visual defects resulting from symptomatic and subclinical congenital cytomegalovirus and Toxoplasma infection. *Pediatrics*, **59**, 669-679.
- 73) Stagno, S., Pass, R. F., Cloud, G. et al. (1986)

- Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA*, **256**, 1904-1908
- 74) Stoddart, C. A., Cardin, R. D., Boname, J. M., Manning, W. C., Abene, G. B., Mocarski, E. S. (1994) Peripheral Blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J. Virol.*, **68**, 6243-6253.
 - 75) Tsutsui, Y., Naruse, I. (1987) Murine cytomegalovirus infection of cultured mouse embryos. *Am. J. Pathol.*, **127**, 262-270.
 - 76) Tsutsui, Y., Kashiwai, A., Kawamura, N., Nagahama, M., Mizutani, A., Naruse, I. (1989) Susceptibility of brain cells to murine cytomegalovirus infection in the developing mouse brain. *Acta. Neuropathol.* **79**, 262-270.
 - 77) Tsutsui, Y., Kashiwai, A., Kawamura, N., Kadota, C., Nagahama, M. (1991) Postnatal porencephaly induced in mouse by murine cytomegalovirus. *Acta Neuropathol.*, **82**, 435-441.
 - 78) Tsutsui, Y., Kashiwai, A., Kawamura, N., Kadota, C. (1993) Microphthalmia and cerebral atrophy induced in mouse embryos by infection with murine cytomegalovirus in midgestation. *Am. J. Pathol.*, **143**, 804-812.
 - 79) Tsutsui, Y., Kashiwai, A., Kawamura, N., Aiba-Masago, S., Kosugi, I. (1995) Prolonged infection of mouse brain neurons with murine cytomegalovirus after pre- and perinatal infection. *Arch. Virol.* **140**, 1725-1736.
 - 80) Tsutsui, Y. (1995) Developmental disorders of the mouse brain induced by murine cytomegalovirus: Animal models for congenital cytomegalovirus infection. *Pathol. Inter.* **45**, 91-102.
 - 81) Waldman, W. J., Knight, D. A., Huang, E. H., Sedmak, D. D. (1995) Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: An in vitro model. *J. Infect. Dis.* **171**, 263-272.
 - 82) Waller, T. H. (1971) The cytomegalovirus: Ubiquitous agents with protean clinical manifestation. *N. Engl. J. Med.*, **285**, 203-214
 - 83) Wiley, C. A., Schrier, R. D., Denaro, F. J., Nelson, J. A., Lampert, P. W., Oldstone, M. B. A. (1986) Localization of cytomegalovirus proteins and genome during fulminant central nervous system infection in an AIDS patient. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **45**, 127-139.
 - 84) Wiley, C. A., Nelson, J. A. (1988) Role of human immune deficiency virus and human cytomegalovirus in AIDS encephalitis. *Am. J. Pathol.* **133**, 73-81.
 - 85) Willson, N. J., Schneider, J. F., Rosen, M., Belisle, E. H. (1974) Ultrastructural pathology of murine cytomegalovirus infection in cultured mouse nervous system tissue. *Am. J. Pathol.* **74**, 467-480.
 - 86) Zaia, J. A., Lang, D.J. (1984) Cytomegalovirus infection of the fetus and neonate. *Neurol. Clin.*, **2**, 384-410.
 - 87) Zeichner, S. L., Plotkin, S. A. (1988) Mechanisms and pathways of congenital infections. *Clin. Perinatol.*, **15**, 163-188.