

学 位 論 文 題 名

Detection of Latent Herpes Simplex Virus DNA
and RNA in Human Geniculate Ganglia
by the Polymerase Chain Reaction

(ヒト膝神経節における潜伏単純ヘルペスウイルス DNA および
RNA の PCR 法による検出)

学位論文内容の要旨

緒 言

特発性末梢性顔面神経麻痺（ベル麻痺）の病因の一つとして、ウイルス感染が挙げられており、なかでも単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus; HSV) は神経親和性があり、また知覚神経節に潜伏感染後に再活性化することより、原因ウイルスの一つとみなされている。しかし従来の手技を用いての、ヒト剖検症例や顔面神経減荷手術症例から得られた膝神経節を材料とした検討では、HSV は証明されえなかった。他方、これまでの患者血清抗体価の測定や動物感染モデルでの解析のみでは、ヒトにおける潜伏ウイルスと疾患とを結び付けるのに必要十分とは言えない。そこで本研究では、ヒト剖検症例の膝神経節における HSV 潜伏感染を直接証明する手段として Polymerase Chain Reaction (PCR) 法および Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) 法を用い検討を行った。

材料と方法

(1) 材料

顔面神経麻痺の既往あるいは剖検時に HSV 感染症の現病歴のない成人剖検症例 11 例より両側側頭骨を摘出後、直ちに電気ドリルにて内耳道より顔面神経水平部まで削開し、膝神経節部に到達した。摘出された同部は -70°C で保存の後、DNA あるいは全 RNA を抽出した。また、三叉神経節を同時に摘出し、同様に核酸抽出を行った。さらにコントロールとして、HSV 急性および潜伏感染マウス大脳、新生児剖検症例より摘出された神経節、成人剖検症例の脾臓、Hirt 法により抽出した HSV-1, 2 型、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV)、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の各ウイルス DNA を用いた。

(2) DNA PCR

HSV-1 の thymidine kinase (TK) 遺伝子部分に相当する primer 対を作成し、抽出した DNA 1 µg あるいはウイルス DNA 1 ng を用いて30サイクルの増幅を行い、反応量の1/4をアガロースゲルにて電気泳動後、ナイロンフィルターに転写した。その後、当該 primer 対領域を含む HSV-1 DNA BamHI Q 断片を鋳型として PCR により増幅した110塩基対の DNA を、さらに PCR により ^{32}P -dCTP で標識した DNA プローブを用いて、Southern blot hybridization を行った。

(3) RT-PCR

増幅領域として HSV-1 の TK 部分および latency-associated transcript (LAT) 部分を選定し、primer 対を作成した。抽出した RNA 5 µg について、各 primer 対のいずれか1方向の primer の存在下で逆転写酵素反応を行い、cDNA に変換した。その後、この cDNA 合成反応液に対し、cDNA 合成時に加えた primer と対応する逆方向の primer をさらに加え、30サイクルの PCR 反応を行い、アガロースゲルにて電気泳動を行った。

結 果

(1) DNA PCR の感度と特異性

段階希釈した HSV-1 DNA を用いた検討では、一連の反応・検出法により HSV-1 DNA 0.001 pg (おおよそ7コピーの HSV-1 相当) まで検出可能であり、110 bp の増幅産物が確認された。また、HSV-2 DNA に対する反応では、約300 bp と 110 bp の2本のバンドが認められ、HSV-1 DNA との判別が可能であった。他方、VZV DNA および HCMV DNA では、いずれの特異的増幅も見られなかった。

コントロール組織を用いた検討では、HSV 潜伏感染マウス大脳より HSV-1 が証明された一方、新生児剖検症例より摘出された各神経節あるいは成人剖検症例の脾臓からの DNA では目的の増幅は得られなかった。

(2) 成人剖検症例からの三叉および膝神経節に対する DNA PCR

三叉神経節では17側中16側 (94%) に、また膝神経節では17側中15側 (88%) に、110 bp の増幅産物が検出された。他方、300 bp のバンドは認められず、これらの増幅は HSV-1 由来であると考えられた。

(3) RT-PCR

HSV 急性感染マウス大脳 RNA を用いた場合には、cDNA 合成時に TK mRNA に相補的な方向の primer を加えた場合にのみ当該産物の増幅を認め、TK の逆方向の primer あるいは LAT の各 primer を加えた際には増幅は確認できなかった。

一方、ヒト三叉神経節および膝神経節より抽出した RNA では、TK mRNA は認められず、LAT の転写のみが確認された。

考 察

ヒト三叉神経節に潜伏した HSV-1 の再活性化が口唇ヘルペスを引き起こすということがほぼ確立した概念である一方、特発性末梢性顔面神経麻痺（ベル麻痺）の原因の一つとして HSV が考えられながら、顔面神経知覚枝の神経節である膝神経節における HSV 潜伏感染の探索は従来不成功に終わってきた。しかし我々は *in situ* hybridization (ISH) 法を剖検症例に適用することによって、ヒト三叉神経節（81%）とほぼ同頻度（71%）でヒト膝神経節における HSV-1 の潜伏を確認した。さらに本研究において、同じくヒト剖検症例より摘出した両神経節に対して PCR 法を適用し HSV の検索を行った結果、それぞれ 94%、88% の頻度で HSV-1 が検出された。ISH 法と比較し PCR 法では、組織全体を検討対象とでき、また感度も優れているため、高頻度に検出可能であったと考えられる。

HSV の潜伏感染期にはその増殖型感染期と異なり、 α 、 β 、 γ 遺伝子からのカスケード的発現は起きていない。しかし LAT と呼ばれる転写産物のみが潜伏感染時に比較的特異的に読まれており、 α 遺伝子群の一つである infected-cell protein number zero (ICP0) の mRNA とは逆向きに転写されている。従ってこの LAT も HSV 潜伏感染検出のターゲットとなる。本実験においてその目的のため RT-PCR 法を一部の症例に適用した結果、三叉神経節、膝神経節のいずれにも HSV-1 LAT の発現が証明され、他方、TK 遺伝子の発現は確認されなかった。一方、HSV 急性感染マウス大脳より抽出した RNA を用いた場合の結果はその逆であった。膝神経節における潜伏 HSV-1 の証明が直ちにその再活性化とベル麻痺との因果関係には結び付かないが、今後の研究において本法が再活性化の証明に有用であると考えられた。

結 語

PCR 法および RT-PCR 法を、ヒト剖検症例より摘出された膝神経節における潜伏 HSV-1 の検出に適用し、以下の結果を得た。

- (1) PCR 法により膝神経節 17 側中 15 側（88%）に HSV-1 DNA が検出された。
- (2) RT-PCR 法により膝神経節で HSV-1 LAT の発現が検出できた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫
副 査 教 授 松 田 英 彦
副 査 教 授 阿 部 弘

学 位 論 文 題 名

Detection of Latent Herpes Simplex Virus DNA and RNA in Human Geniculate Ganglia by the Polymerase Chain Reaction

(ヒト膝神経節における潜伏単純ヘルペスウイルス DNA および
RNA の PCR 法による検出)

目的：特発性末梢性顔面神経麻痺（ベル麻痺）の病因の一つとして、ウイルス感染が挙げられており、なかでも単純ヘルペスウイルス（Herpes simplex virus; HSV）は原因ウイルスの一つとみなされている。そこで本研究では、ヒト剖検症例の膝神経節における HSV 潜伏感染を直接証明する手段として Polymerase chain reaction (PCR) 法および Reverse transcription-PCR (RT-PCR) 法を用い検討を行った。

材料：顔面神経麻痺の既往あるいは剖検時に HSV 感染症の現病歴のない成人剖検症例 11 例より両側顔面神経膝神経節および三叉神経節を摘出し、 -70°C で保存の後、DNA あるいは全 RNA を抽出した。

方法：HSV-1 の thymidine kinase (TK) 部分および latency-associated transcript (LAT) 部分を PCR の増幅領域として選定した。DNA PCR では、抽出した DNA $1\ \mu\text{g}$ あるいはウイルス DNA $1\ \text{ng}$ を用いて 30 サイクルの増幅を行い、反応量の $1/4$ をアガロースゲルにて電気泳動後、ナイロンフィルターに転写し、 ^{32}P -dCTP で標識した DNA プローブを用いて、Southern blot hybridization を行った。また RT-PCR では、抽出した RNA $5\ \mu\text{g}$ について、各 primer 対のいずれか 1 方向の primer の存在下で逆転写酵素反応を行い、cDNA に変換後、この cDNA 合成反応液に対し、逆転写酵素反応時に加えた primer と対応する逆方向の primer をさらに加え、30 サイクルの PCR 反応を行い、DNA PCR の場合とほぼ同様に検出を行った。

結果：（１）コントロール組織およびウイルス DNA を用いた検討では、一連の DNA PCR およびその検出法により、HSV-1 DNA を特異的に判別できた。また、段階希釈した HSV-1 DNA を用いた検討では、HSV-1 DNA $0.001\ \text{pg}$ （お

よそ7コピーの HSV-1 相当)まで検出可能であった。(2) 成人剖検症例からの三叉および膝神経節に対する DNA PCR では、三叉神経節で17側中16側(94%)に、また膝神経節で17側中15側(88%)に、HSV-1 由来の110 bp の増幅産物が検出された。(3) RT-PCR の結果、HSV 急性感染マウス大脳 RNA を用いた場合には、TK mRNA の転写が確認されたが、LAT は認められなかった。一方、ヒト三叉神経節および膝神経節より抽出した RNA では、TK mRNA は認められず、LAT の転写のみが確認された。

本研究における PCR 法を用いた検討により、*in situ* hybridization (ISH) 法と比較し高い頻度でヒト膝神経節における HSV-1 の潜伏を確認した。この理由として、ISH 法と比較し PCR 法では、組織全体を検討対象とでき、また感度も優れているためであると考えられる。また HSV の潜伏感染期には LAT と呼ばれる転写産物のみが比較的特異的に読まれているが、本実験においてその目的のため RT-PCR 法を一部の症例に適用した結果、三叉神経節、膝神経節のいずれにも HSV-1 LAT の転写が証明され、他方、HSV 急性感染組織と異なり、TK mRNA は認められなかった。これらのことから本法が HSV-1 の潜伏、再活性化の証明に有用であると考えられた。

口頭発表にあたり、松田教授より共生培養による再活性化の検討の有無、ベル麻痺の発症機序、再活性化の頻度と再発頻度との関連等について、阿部弘教授より、各神経節の摘出方法、再活性化の要因、再活性化と疾患との関連の証明方法等について、田代教授よりウイルスとベル麻痺との因果関係等について質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答をなした。また副査の松田、阿部弘両教授には個別の審査を受け合格と判定された。

以上本研究は、特発性末梢性顔面神経麻痺(ベル麻痺)の病因として示唆されながらも証明し難かった単純ヘルペスウイルスのヒト顔面神経膝神経節における潜伏を分子生物学的に確認し、その仮説に一つの証拠を与えたもので、その発症機構の解明に大きく寄与したものである。よって博士(医学)の学位授与に充分値するものと思われる。