

博士(医学) 鈴木清護

学位論文題名

ヒト前庭神経節における単純ヘルペスウイルス潜伏感染の検索

学位論文内容の要旨

前庭神経炎の病因については未だに不明の点が多いが、ウイルス感染が病因であるとする報告がある。中でも単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus; HSV) は神経親和性が強く、神経細胞に感染することから、最も可能性が高いウイルスと考えられる。HSV type 1 (HSV-1)はヒト三叉神経節に潜伏感染し、その再活性化により反復性ヘルペス口唇炎が引き起こされることが知られている。同様に、前庭神経節内の潜伏ウイルスが再活性化することにより前庭神経炎の病因となる可能性が考えられる。HSVの潜伏感染を証明するには潜伏感染時に特異的に見られる転写産物として知られる latency-associated transcript (LAT)の転写を確認することが必要であるが、今までヒト前庭神経節においてHSV-1 LATを検出した報告はない。本研究はまずPolymerase chain reaction (PCR)法を用いてヒト前庭神経節におけるHSV-1 DNAの存在を確認し、さらにreverse transcription-PCR (RT-PCR)法、in situ hybridization (ISH)法を用いてHSV-1 LATが転写されているか否かを検索することにより、前庭神経炎の一つの病因としてのHSV-1の再活性化の可能性について明らかにすることを目的とした。

＜材料と方法＞材料として、成人剖検症例16例31耳より側頭骨を摘出後、電気ドリルおよび実体顕微鏡を用いて、内耳道内より前庭神経節を採取した。剖検時に同時に三叉神経節も採取した。9例18耳については採取した神経節を、直ちに液体窒素で凍結し、-70°Cにて保存の後、うち5例10耳はフェノール-クロロフォルム法を用いて高分子DNAを、4例8耳はAcid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform法を用いてtotal RNAをそれぞれ抽出し、PCR法あるいはRT-PCR法に用いた。また残り7例13耳については10%中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片を作製しISH法に用いた。

HSVゲノムおよびLATを増幅するためオリゴヌクレオチドプライマー対を用意した。HSV-1 thymidine kinase geneに特異的な領域に相当するHSV TK 1, TK 2プライマーおよびHSV-1 LAT geneに特異的な領域に相当するHSV LAT 1, LAT 2プライマーである。

各神経節より抽出した高分子DNA 1μgを各々錆型とし、HSV TKプライマー対を用いて30cycleの増幅を行った (PCR)。

各神経節より抽出したtotal RNA 2μgを用いて、まずHSV LAT 1またはLAT 2プライマーのいずれか一方を加え逆転写反応を行いcDNAを合成した。その後もう一方のHSV LAT 1またはLAT 2プライマーを加えてPCRを行った (RT-PCR)。このような方法をとると、はじめに加えたプライマーがRNAに相補的な場合にのみcDNAが合成されPCR法で増幅されるはずである。

パラフィン包埋した材料から5μm切片を作製し、³⁵Sで標識したLAT sense RNA probeおよびLAT antisense RNA probeを用いてISHを行った。

＜結果＞HSV TKプライマー対を用いたPCR法では三叉神経節については5例10検体全例（100%）に、前庭神経節では10検体中6検体に、それぞれHSV-1 DNAが検出された。したがって、成人の前庭神経節の60%にHSV-1 DNAが検出された。

HSV LATプライマー対を用いたRT-PCR法では三叉神経節については4例8検体中7検体（88%）に、HSV LATに相補的なHSV LAT 2プライマーを逆転写反応の際に加えたもののみ増幅産物がみられた。前庭神経節においても8検体中5検体に、やはりHSV LATに相補的なHSV LAT 2プライマーを逆転写反応の際に加えたもののみ増幅産物がみられた。したがって、成人の前庭神経節の63%にHSV-1 LATが検出された。

LAT antisense RNA probeを用いたISH法により、三叉神経節では6例11検体中6検体（55%）にLATの発現が見られた。各切片でのLAT陽性細胞の割合は0.3～1.3%で、三叉神経節の神経節細胞全体のLAT陽性細胞出現率は0.86%（53/6,130）であった。hybridizationはすべて神経節細胞の核に一致して見られた。それに対し前庭神経節では7例13検体中1検体のみ（7.7%）にLAT陽性細胞が見られ、その症例におけるLAT陽性細胞出現率は0.3%（1/350）であった。前庭神経節の神経節細胞全体のLAT陽性細胞出現率は0.03%（1/3,830）であった。また、hybridizationは神経節細胞の核に一致して見られた。

＜考察＞本研究により剖検症例のヒト前庭神経節においてHSV-1の潜伏感染が起こっていることが示された。即ちPCR法によりHSV-1 DNAを60%のヒト前庭神経節に証明し、なおかつRT-PCR法を用いることでそれと同等の63%の神経節にHSV-1 LATの転写を証明できた。

一方、ISH法ではわずかに7.7%の神経節にしかLATの存在を確認できなかった。ISH法とRT-PCR法の結果の相違が見られた原因としていくつかの可能性が考えられる。RT-PCR法では、可及的に神経節の部分を検体として使用しても神経節以外のものもかなり含まれるため、神経節以外に潜伏していて検出されたという可能性がまず挙げられるが、諸家の報告によると三叉神経節や顔面神経膝神経節において潜伏するHSVは、ISH法で神経節細胞以外には検出されておらず、神経節細胞以外の部位に潜伏している可能性は低いと考えられる。また、一般的にRT-PCR法はISH法に比して高感度である上、RT-PCR法では神経節全体を検索できるのに対しISH法では神経節の一部しか検索できないためLAT発現率は当然低下することが考えられる。さらに、HSV-1が潜伏する個々の細胞におけるLATの発現の程度が低ければ、RT-PCR法では検出できても、ISH法では検出できない可能性も考えられる。

三叉神経が顔面皮膚、口腔内等の直接体表に分布しているのに対し、前庭神経は体表には分布せず、前庭神経節には感染する機会が少ない可能性が考えられる。同じHSVでも1型、2型では潜伏する神経節の分布が異なることが知られており、各神経節とHSV-1の間には「親和性」の差異のようなものがあるとも考えられる。

前庭神経節に潜伏するHSV-1が実際、再活性化するかどうか、また、再活性化することにより前庭神経炎のような疾患の直接原因となりうるかどうかは不明であるが、本研究から、少なくとも前庭神経節にHSV-1が潜伏感染していることを証明し、再活性化が起こる可能性があることを示した。また、前庭神経節に潜伏するHSV-1が少ないと前庭神経節内に潜伏するHSV-1の再活性化による前庭神経炎の頻度がそれほど高くないことを示唆する。前庭神経節で今後ヒトの材料を用いたさらなる研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主査 教授 犬山征夫
副査 教授 長嶋和郎
副査 教授 田代邦雄

学位論文題名

ヒト前庭神経節における単純ヘルペスウイルス潜伏感染の検索

前庭神経炎の病因については未だに不明の点が多いが、単純ヘルペスウイルス1型 (Herpes simplex virus type 1; HSV-1) 感染が病因であるとする報告がある。HSV-1はヒト三叉神経節に潜伏感染し、その再活性化により反復性ヘルペス口唇炎が引き起こされることが知られている。同様に、前庭神経節内の潜伏ウイルスが再活性化することにより前庭神経炎の病因となる可能性が考えられる。HSVの潜伏感染を証明するため潜伏感染時に特異的に見られる転写産物として知られるlatency-associated transcript (LAT)の転写を確認することが必要である。本研究はヒト前庭神経節においてHSV-1 LATが転写されているか否かを検索することにより、前庭神経炎の一つの病因としてのHSV-1の再活性化の可能性について明らかにすることを目的とした。

材料として、成人剖検症例16例31耳より前庭神経節および三叉神経節を採取した。そのうち9例18耳はPCR法あるいはRT-PCR法に用いた。また残り7例13耳は*in situ* hybridization (ISH)法に用いた。

HSVゲノムおよびLATを増幅するため、HSV-1 thymidine kinase geneおよびHSV-1 LAT geneにそれぞれ特異的な領域に相当するプライマー対TK 1, TK 2およびLAT 1, LAT 2を用意した。各神経節より抽出した高分子DNAを鑄型とし、TK プライマー対を用いて30cycleの増幅を行った (PCR)。各神経節より抽出したtotal RNAを用いて、まずLAT 1またはLAT 2プライマーのいずれか一方を加え逆転写反応を行いcDNAを合成し、その後もう一方のプライマーを加えてPCRを行った (RT-PCR)。パラフィン包埋した材料から切片を作製し、³⁵Sで標識したLAT sense RNA probeおよびLAT antisense RNA probeを用いてISHを行った。

PCR法では三叉神経節については5例10検体全例 (100%) に、前庭神経節では10検体中6検体 (60%) に、それぞれHSV-1 DNAが検出された。RT-PCR法では三叉神経節については4例8検体中7検体 (88%) に、前庭神経節においても8検体中5検体 (63%) に、HSV LATに相補的なLAT 2プライマーを逆転写反応の際に加えたもののみ増幅産物がみられた。LAT

antisense RNA probeを用いたISH法により、三叉神経節では6例11検体中6検体（55%）にLATの発現が見られた。各切片でのLAT陽性細胞の割合は0.3～1.3%で、三叉神経節の神経節細胞全体のLAT陽性細胞出現率は0.86%（53/6,130）であった。hybridizationはすべて神経節細胞の核に一致して見られた。それに対し前庭神経節では7例13検体中1検体のみ（7.7%）にLAT陽性細胞が神経節細胞の核に一致して見られ、その症例におけるLAT陽性細胞出現率は0.3%（1/350）であった。前庭神経節の神経節細胞全体のLAT陽性細胞出現率は0.03%（1/3,830）であった。

ISH法とRT-PCR法の結果の相違が見られた原因として 1) 神経節以外に潜伏していた可能性 2) RT-PCR法とISH法の感度の相違 3) HSV-1が潜伏する個々の細胞におけるLATの発現の程度の差異 4) 前庭神経は体表には分布せず、前庭神経節には感染する機会が少ない可能性 5) 各神経節とHSV-1の間の「親和性」の差異 等が挙げられる。

前庭神経節に潜伏するHSV-1が実際、再活性化するかどうか、また、再活性化することにより前庭神経炎等の疾患の直接原因となりうるかどうかは不明であるが、本研究から、前庭神経節にHSV-1が潜伏感染していることを証明し、潜伏するHSV-1が少ないことが示された。疾患との関連についてはさらなる研究を要すると考えられた。

公開発表にあたり、長嶋教授より、前庭神経節にHSVが至る感染経路、LATがISHで確認された症例の既往歴、感覺神経節のみでHSV潜伏感染が成立する理由、HSV-2についての検討の有無あるいは報告の有無、PCRで検体ごとのバンドの濃度の相違の理由について、田代教授より、前庭神経炎症例に関与するウイルスの種類、顔面神経膝神経節のHSV潜伏感染とBell麻痺との関連性、HSV再活性化の機序、動物実験モデルの最近の知見、他の感覺神経節での検討の有無について質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答を行った。

以上、本研究は、剖検症例から前庭神経節を採取し、ヒト前庭神経節におけるHSV-1の潜伏感染を明らかにしたものであり、末梢前庭疾患におけるHSV-1の関与する可能性を示すとともにHSV潜伏感染と、その再活性化の機序解明に大きく貢献したものである。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。