

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861579

研究課題名(和文)単純ヘルペスウイルス感染によるマウス顔面神経、聴神経障害とアポトーシスの関連

研究課題名(英文)Apoptosis induction after HSV infection on facial and auditory nerve

研究代表者

山野 耕嗣(Yamano, Koji)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20597819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HSV-1、HSV-2を中耳に投与したマウスは1週間後に難聴、眩暈を発症し、その後脳炎を引き起こし死亡した。側頭骨内の切片を作成したところ、蝸牛の血管条にHSV感染細胞を認めたが、apoptosis陽性細胞はコルチ器であり、局在が異なった。アポトーシス抑制ペプチド(AM-111)を投与してapoptosisを抑制し、難聴、眩暈の発生を検討したが、難聴、眩暈の発生頻度に変化を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：HSV types 1 and 2 were inoculated into the middle ear of mice, and the function of the cochlear and vestibular nerves was assessed. Histopathological changes were examined with hematoxylin and eosin staining. Anti-HSV immunohistochemistry staining and TUNEL staining were done to investigate the relationship between HSV-infected cells and apoptotic cells. Results: Hearing loss and vestibular dysfunction were observed in all mice after inoculation of HSV type 1 or 2. In the cochlear duct, columnar epithelial cells in the stria vascularis were infected with HSV, but only a portion of the infected cells underwent apoptosis. In contrast, many uninfected cells in the spiral organ of Corti were apoptotic. Vestibular dysfunction was observed when vestibular ganglion cells were largely infected, but not apoptotic.

Next, we injected AM-111, anti-apoptosis peptide into the middle ear of mice. However, no effect was observed.

研究分野：顔面神経麻痺

キーワード：単純ヘルペスウイルス 顔面神経 聴神経

1. 研究開始当初の背景

Bell 麻痺(特発性顔面神経麻痺)患者では神経内液から HSV-1 が検出され、Bell 麻痺と HSV-1 の関連が大きくクローズアップされることとなった。また、メニエル病患者の前庭神経節や内リンパ液から HSV を検出した報告もある。HSV は神経節で潜伏感染し、再活性化する性質を持っているので、前庭神経節、蝸牛神経節に潜伏感染している HSV が何らかのトリガーにより再活性化し、眩暈、難聴を引き起こしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

顔面麻痺・難聴・めまいなどの発症に HSV が関与しているか、また HSV 感染により誘導されるアポトーシスと臨床症状、HSV 感染が関与しているどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 顔面神経麻痺、難聴・眩暈モデルマウスの作成

日齢 28 の雌 ICR マウスを抱水クロラールで麻酔し、外耳接種モデルには右耳介を 27G 針で 20 回擦過し、 $20\mu\text{l}$ の各ウイルス液(1.0×10^7 pfu/mL)を接種した。内耳接種モデルには同濃度のウイルス液を $40\mu\text{l}$ 、右鼓室内に注入した。使用したウイルスは HSV-1 野生株(F 株)、HSV-2 野生株(186 株)、HSV-2 US3 欠損株(L1BR1 株)の 3 株である。毎日体重を測定し、顔面神経麻痺については瞬き、鼻、口髭の動きを、眩暈については水泳試験で、難聴についてはガルトン笛に対する反応を検討した。

(2) 組織切片の作成

顔面神経麻痺、難聴・眩暈を発症しているマウスの頭部を摘出し、パラフィン切片を作成した。側頭骨内顔面神経、内耳を含む切片を作成し、H&E 染色を行った。apoptosis の有無を TUNEL 染色で、HSV 感染細胞について免疫染色を行い、局在を検討した。

(3) アポトーシス抑制ペプチドによる治療効果

内耳接種モデルについては、Auris Medical 社から提供を受けたアポトーシス抑制ペプチド AM-111 を中耳に投与し治療効果を検討した。

(4) 糖尿病マウスにおける HSV-1 再活性化における顔面神経麻痺

HSV-1 KOS 株を外耳に投与して顔面神経麻痺を引き起こし治癒したマウスに対して、ストレプトゾトシンを投与して糖尿病マウスを作成し、外耳を擦過して、顔面神経麻痺の

発症の有無を検討した。顔面神経麻痺をおこしたマウスの側頭骨内顔面神経を採取して、PCR で HSV-1 の DNA 発現の有無を、電子顕微鏡で HSV-1 粒子の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 顔面神経麻痺モデルマウスの作成と組織学的検討

HSV-1、HSV-2 野生株を外耳投与したマウスは 1 週間後に顔面神経麻痺を発症し、その後脳炎を引き起こし死亡した。US3 欠損株を投与したマウスは顔面神経麻痺を発症しなかった。側頭骨内の切片を作成したところ、顔面神経膝神経節に HSV 感染細胞を認めたと、apoptosis を起こしている細胞は浸潤細胞であり、局在が異なった。



図 1 顔面神経麻痺を呈したマウス
右目は瞬目できず、右髭は弛緩している。

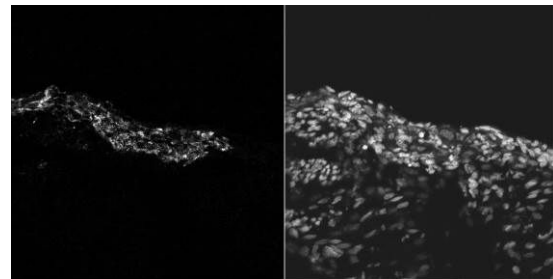


図 2 顔面神経節に感染した HSV-2
左: 抗 HSV 抗体免疫染色、右: 核染色

(2) 難聴・眩暈モデルマウスの作成と組織学的検討

HSV-1、HSV-2 野生株を内耳投与したマウスは 1 週間後に難聴、眩暈を発症し、その後脳炎を引き起こし死亡した。US3 欠損株を投与したマウスは難聴、眩暈を呈するマウスも存在したが、安定した結果を得られなかった。側頭骨内の切片を作成したところ、蝸牛の血管条に HSV 感染細胞を認めたと、apoptosis 陽性細胞はコルチ器であり、局在が異なった。

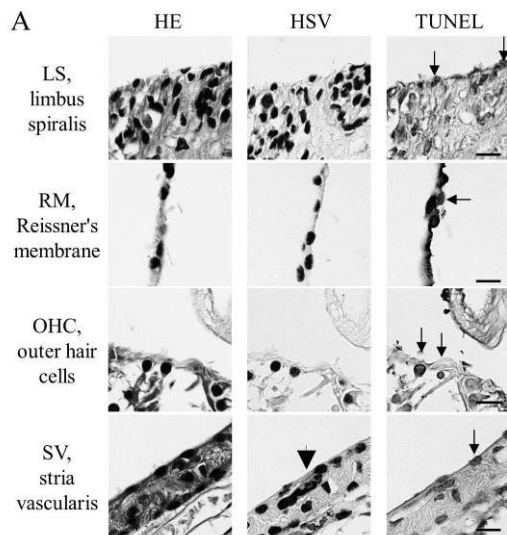


図3 HSV-1 中耳接種後の内耳組織の変化

(3) アポトーシス抑制ペプチドによる治療効果

AM-111 を投与して apoptosis を抑制し、難聴、眩暈の発生を検討したが、難聴、眩暈の発生頻度に変化を認めなかった。

KOS 株を投与して顔面神経麻痺を発症し、自然治癒したマウスをストレプトゾトシンで糖尿病とした。耳介を擦過したところ、33%のマウスが脳炎を起こして死亡し、11%のマウスが顔面神経麻痺を引き起こした。麻痺中のマウスの側頭骨内顔面神経を採取したところ、PCR で HSV-1 DNA が、電子顕微鏡で膝神経付近に HSV-1 粒子が観察された。ストレプトゾトシンを投与したマウスの脾細胞を検討したところ、CD3 陽性 T 細胞が減少していた。以上の結果より、糖尿病により T 細胞が減少し、宿主の免疫低下により HSV-1 の再活性化が引き起こされやすくなり、顔面神経麻痺を発症したと考えられた。以上の結果は論文にまとめて発表した。

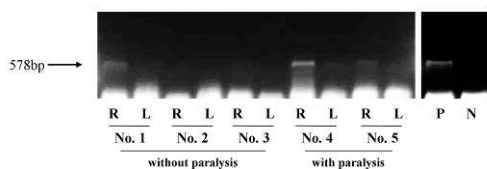


Fig. 3

図4 顔面神経麻痺マウスの顔面神経内の HSV-DNA

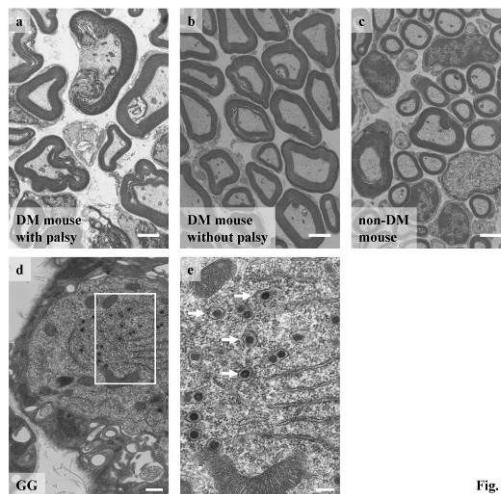


Fig. 4

図5 顔面神経麻痺マウスの膝神経節

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Facial nerve palsy after reactivation of herpes simplex virus type 1 in diabetic mice.

Esaki S, Yamano K, Katsumi S, Minakata T, Murakami S
Laryngoscope. 2015 Apr;125(4):E143-8.
査読有
10.1002/lary.24994

Quantitative analysis of facial palsy using a three-dimensional facial motion measurement system.

Katsumi S, Esaki S, Hattori K, Yamano K, Umezaki T, Murakami S.
Auris Nasus Larynx. 2015 Aug;42(4):275-83.
査読有
10.1016/j.ani.2015.01.02

[学会発表](計3件)

Efficiency of facial nerve decompression, transmastoid approach vs transmastoid approach and middle cranial fossa approaches.

Yamano K, Katsumi S, Esaki S, Murakami S
12th International Facial Nerve Symposium, Boston, (USA) 2013

Treatment for Bell's palsy associated with diabetes mellitus.

Esaki S, Katsumi S, Yamano K,
Murakami S

12th International Facial Nerve
Symposium, Boston, (USA) 2013

Quantitative analysis of facial
paralysis using a three-dimensional
facial motion measurement system.

Katsumi S, Esaki S, Yamano K,
Murakami S

12th International Facial Nerve
Symposium, Boston, (USA) 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山野 耕嗣 (Yamano, Koji)

名古屋市立大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：20597819