

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591986

研究課題名（和文） 特発性顔面神経麻痺の新たな麻痺発症責任部位に関する基礎的研究

研究課題名（英文） A fundamental study for the degeneration site of Bell's palsy

研究代表者

脇坂 浩之 (WAKISAKA HIROYUKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30304611

## 研究成果の概要（和文）：

初感染顔面神経麻痺モデルにおける免疫組織化学では、膝神経節、顔面神経下行脚部、顔面神経核の3部位が顔面神経におけるウイルス増殖部位であると考えられ、電子顕微鏡による検討でもこれらの部位にウイルス増殖を認めたため、この3部位がウイルスの潜伏、再活性化に関与しうる部位であると考えられた。一方、再活性化顔面神経マウスモデルでは、免疫組織化学では、膝神経節、顔面神経核の2部位が顔面神経におけるウイルス増殖部位であると考えられ、電子顕微鏡による検討でもこれらの部位にウイルス増殖を認めたため、この2部位が再活性化時のウイルス増殖に関与しうる部位であると考えられた。以上のことより、HSV-1再活性化による顔面神経麻痺の責任部位は膝神経節部と顔面神経核と考えられるがその責任の割合について今後の検討が必要である。

## 研究成果の概要（英文）：

HSV-1 infected to the geniculate ganglion, the root entry zone, facial nucleus in the HSV-1 primary infected mouse facial palsy model. Therefore, these three sites are thought as HSV-1 latency sites. Moreover, HSV replicated in the neuron of the the geniculate ganglion and facial nucleus in the HSV-1 reactivated mouse facial palsy model. These facts suggested that the nerve degeneration at these two sites may occur the facial palsy with HSV-1 reactivation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：ベル麻痺、HSV-1、電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

特発性顔面神経麻痺（ベル麻痺）の原因は近年の研究により、単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）を原因とするものが主体と考えられて来ている。本疾患の発症のメカニズムについては、様々な研究がなされているが、臨床検体を用いた研究の困難さから、その病態や神経障害発症のメカニズムなど依然不明な点が多い。また、アシクロビルやバラシクロビルを用いた治療も開始されてきているが、十分満足を得られる結果には至っていない。その理由として、病態や神経障害の発生機序などが明らかにならないために、抗ウイルス薬などの適切な投薬時期、投薬方法の確立が出来ないことに帰すると考えられる。病態メカニズムの解明には、麻痺発症前後の顔面神経を用いた分子科学的・組織科学的検討が不可欠である。しかしながら、ベル麻痺患者の生命予後は非常に良好であり、急性期の患者検体を用いた研究は極めて困難である。そこで、申請者らは本疾患の発症のメカニズムを明らかにするために様々な動物実験を行ってきた。まず、マウスの耳介にウイルスを接種することで一過性の顔面神経麻痺を誘発するモデルの作成に世界で初めて成功し、同モデルを用いて初感染でのウイルス感染メカニズムや麻痺発症に至るメカニズムを研究してきた。

## 2. 研究の目的

一般に、HSV-1は、初感染後に知覚神経節に潜伏し、その後何らかの刺激により、同神経節から再活性化したウイルスが知覚神経細胞を障害することで神経症状を発症すると考えられている。知覚神経麻痺であればこれだけで説明が

つくが、顔面神経の場合は知覚神経である中間神経線維と運動神経である顔面神経運動線維より成り立っている。膝神経節で再活性化したHSV-1が膝神経節の神経細胞を傷害しても顔面神経運動線維が障害されない限りは顔面麻痺には至らない。ところが、ウイルス学的にはウイルスが運動神経線維を直接障害することはありえない。そこで顔面神経運動線維が障害されるメカニズムとして二つの可能性が示唆される。一つは膝神経節周囲のウイルス感染に端を発した炎症による顔面神経管内の内圧上昇による二次的な顔面神経運動線維の障害。もう一つは顔面神経核における神経細胞のウイルス感染に伴う運動線維の機能障害である。近年の申請者らの動物モデルを用いた研究では、顔面神経管内の運動線維の障害はあまり高度とはいえず(Wakisaka et al 2002)、ある程度の炎症性障害はあっても、それらは麻痺を発症するには十分とはいえないと考えられている。また、ウイルス初感染時において、脳幹部や顔面神経核神経細胞へのHSV-1の感染を確認しており、申請者らがさらに開発したHSV-1再活性化顔面神経麻痺モデルを用いて、脳幹あるいは顔面神経核からのウイルス再活性化の有無や同部位での神経障害発症の有無、そのメカニズムの解明を行うことは、特発性顔面神経麻痺の病態解明に大きく貢献できるものと考えられる。

## 3. 研究の方法

- (1) 初感染ヘルペス顔面神経麻痺マウスモデルを用いて、免疫組織化学、in situ hybridization法を用い、

中枢神経内でのHSV-1の進展、増殖経路、潜伏部位の時間的、空間的解析を行う。HSV-1接種により初感染顔面神経マウスモデルを作成し、同モデルからHSV-1接種後1日から14日後まで連日で生理食塩水および4%パラホルムアルデヒドで経心還流固定を行い、顔面神経管内顔面神経（膝神経節を含む）及び脳幹を摘出し、再びパラホルムアルデヒドにて後固定後にパラフィンにて包埋、薄切して切片を作成する。その切片を用いて抗HSV-1抗体を一次抗体に用いた免疫組織化学を行って末梢および中枢神経内での感染標的細胞、感染部位を明らかにするとともに、その時間的、空間的増殖経路も明らかにする。また、HSV-1 DNA及びLATS（ウイルス潜伏中の証明に用いられる）をプライマーとする *in situ hybridization* 法を用いて、HSV-1の潜伏部位および潜伏標的細胞、潜伏時期を明らかにする。

(2) ハイブリドーマの培養により作成した、免疫細胞への選択的抗体を感染マウスに投与し、ウイルスを再活性化させて再活性化顔面神経麻痺モデルを作成する。抗CD3抗体、抗CD4、抗CD8、抗CD72抗体産生ハイブリドーマを培養し、培養液より抗CD3抗体、抗CD4、抗CD8、抗CD72抗体を精製する。同時に再活性化モデル用の初感染顔面神経麻痺モデルを作成する。精製した各抗体を、顔面神経麻痺の治癒した初感染顔面神経麻痺マウスモデルに腹腔内投与す

るとともに耳介擦過を行い、HSV-1再活性化を促して再活性化顔面神経麻痺マウスモデルを作成する。再活性化顔面神経麻痺マウスモデルより、中枢神経を摘出し、PCR法を用いて中枢神経内でのHSV-1の再活性化を確認し、同時に顔面神経管内顔面神経（膝神経節を含む）および脳幹部を、マウスを生理食塩水および4%パラホルムアルデヒドで経心還流固定した後に摘出し3.の研究に用いる。

(3) 再活性化マウスモデルを用いて、再活性化HSV-1の進展、増殖経路、潜伏部位の時間的、空間的解析を中枢を中心に行うと共に電子顕微鏡を用い、細胞レベルでのHSV-1の中枢神経の細胞内増殖経路を明らかにし、中枢病変による顔面神経麻痺発症メカニズムについて考察する。抗体を接種後に顔面神経麻痺を発症した再活性化マウスモデルを生理食塩水および4%パラホルムアルデヒドで経心還流固定を行い、顔面神経管内顔面神経（膝神経節を含む）及び脳幹を摘出し、再びパラホルムアルデヒドにて後固定後にパラフィンにて包埋、薄切して切片を作成する。その切片を用いて抗HSV-1抗体を一次抗体に用いた免疫組織化学を行って末梢および中枢神経内での再活性化時の感染標的細胞、感染部位を明らかにするとともに、その時間的、空間的増殖経路も明らかにする。また、再活性化顔面神経麻痺モデルを生理食塩水および4%パラホルムアルデヒドで経心還流固定を行い、

顔面神経管内顔面神経（膝神経節を含む）及び脳幹を摘出し、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドで固定後、エポキシ樹脂に包埋、ダイヤモンドナイフ（申請備品）で薄切し切片を作成する。透過型電子顕微鏡による細胞レベルでのHSV-1の感染経路、増殖標的細胞の同定、細胞内増殖経路を明らかにする。また、顔面神経核内の神経細胞の感染数を明らかにする。

#### 4. 研究成果

初感染顔面神経麻痺モデルにおける免疫組織化学では、膝神経節、顔面神経下行脚部、顔面神経核の3部位が顔面神経におけるウイルス増殖部位であると考えられた。

次に、電子顕微鏡を用いてこれらウイルス増殖部位における、ウイルス増殖およびその後の神経障害発生のメカニズムに関する検討を行った。

膝神経節では、接種4日目になるとHSV-1が神経細胞で増殖していた。5日目にはウイルスはシュワン細胞に感染し、これら感染を来たしたシュワン細胞は細胞質に空胞変性と脱髄を来たしていた。9日目ではHSV-1に感染した神経細胞の空胞変性は顕著となり、運動神経線維領域では先に認められた感染シュワン細胞内の脱髄および軸索の変性（混合性神経障害）を認めた。

下行脚部では、接種5日目にアストロサイトにウイルス感染を認めた。6日目にはこれらの感染したアストロサイトは下降脚部から消失し、代わりに死滅したアストロサイトのデブリとオリゴデンドロサイトへのウイルス感染を認めた。感染したオリゴデンドロサイトでは、細胞変性と脱髄を認めた。接種

9日後には、オリゴデンドロサイトの著明な変性と、それに伴う高度な脱髄を認めるとともに、下行脚部に免疫系細胞の浸潤を認め、免疫系細胞による細胞貪食像やそれに伴う軸索変性を認めた。顔面神経核の神経細胞でもウイルス増殖を認め、膝神経節、顔面神経下行脚部、顔面神経核の3部位が顔面神経麻痺発症の責任部位である可能性が示唆された。

一方、再活性化顔面神経マウスモデルでは、抗HSV-1抗体を用いた免疫組織化学で再活性化3日後より末梢の膝神経節と顔面神経核でウイルス増殖が認められた。これらの感染部位での抗体反応は再活性化7日後をピークとして再活性化刺激14日後ごろまで見られた。以上より、膝神経節、および顔面神経核がウイルス再活性化および感染の中心部位であることが明らかになったため、この3か所より同条件の電子顕微鏡用の資料を作成し、同資料を用いて電子顕微鏡での観察を続けているが概要は以下の通りである。膝神経節部では神経節神経細胞内でウイルスの増殖が2日後には始まり、再活性化刺激後の4日後には神経細胞の変性が出現するとともにシュワン細胞の変性が見られた。シュワン細胞の変性は脱髄性変性と軸索変性が混在していた。顔面神経核では再活性化4日ごろに神経細胞にウイルス増殖を認め、5日後には神経細胞の空胞変性が著名となった。

#### 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9件）

1. Takahashi H, Hinohira Y, Hato N, Wakisaka H, Hyodo J, Ugumori T, Gyo K.

Clinical features and outcomes of four patients with invasive fungal sinusitis.

Auris Nasus Larynx. 査読あり 2011 Apr;38(2):289-94. Epub 2010 Dec 4.

2. Wakisaka H, Takahashi H, Ugumori T, Motoyoshi K and Takagi D A case of a wooden foreign body penetrating the oral cavity and reaching the posterior neck 査読あり In Injury Extra. June 23 2010.[Epub ahead of print]

3. Wakisaka H, Yamada H, Motoyoshi K, Ugumori T, Takahashi H, Hyodo M. Incidence of long-term ipsilateral and contralateral ototoxicity following radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. 査読あり Auris Nasus Larynx. Jun 9. Epub ahead of print 2010

4. Yamada H, Hato N, Murakami S, Honda N, Wakisaka H, Takahashi H, Gyo K. Facial synkinesis after experimental compression of the facial nerve comparing intratemporal and extratemporal lesions. 査読あり Laryngoscope. May;120(5):1022-7 2010

5. Komobuchi H, Hato N, Teraoka M, Wakisaka H, Takahashi H, Gyo K, Tabata Y, Yamamoto M. Basic fibroblast growth factor combined with biodegradable hydrogel promotes healing of facial nerve after compression injury: an experimental study. 査読あり Acta Otolaryngol. 2010;130(1):173-8.

6. 澤井尚樹, 羽藤直人, 寺岡正人, 高橋宏尚, 脇坂浩之, 飴矢美里, 暁清文 顔面像

センシング技術OKAO VISIONを用いた顔面神経麻痺の新しい客観的評価法の開発 査読あり Facial Nerve Research 29巻 Page 68-70 2010

7. Matsuda S, Hasegawa M, Muro H, Asano H, Hamada F, Shimokawa T, Miyawaki K, Nabeka H, Wakisaka H, Hamai M, Kobayashi N. The effects of a novel local ventilation system to reduce the health hazard to students during gross anatomy courses 査読あり Kaibogaku Zasshi. 2009 Dec;84(4):103-9.

8. Hato N, Sawai N, Teraoka M, Wakisaka H, Takahashi H, Hinohira Y, Gyo K. Valacyclovir for the treatment of Bell's palsy. 査読あり Expert Opin Pharmacother. 2008 Oct;9(14):2531-6.

9. 澤井尚樹, 羽藤直人, 寺岡正人, 脇坂浩之, 高橋宏尚, 暁清文 当科における両側性および反復性顔面神経麻痺症例の検討 査読あり Facial Nerve Research 28巻 Page 54-57, 2009

[学会発表] (計 2 件)

1. Matsumoto S, Hato N, Kohno H, Yamada Y, Kisaki H, Wakisaka H, Takahashi H, Honda N, Gyo K Distribution of herpes simplex virus type 1 in mouse model of Bell's palsy XI International Facial Nerve Symposium Roma Italy 2009

2. Sawai N, Hato N, Teraoka M, Takahashi H, Wakisaka H, Gyo K The real time objective and quick evaluation of facial paralysis XI International Facial Nerve Symposium Roma Italy 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇坂 浩之 (WAKISAKA HIROYUKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30304611