

INFECTION OF HSV- I IN VESTIBULAR GANGLIA : DETECTION OF HSV- I GENOMES BY PCR

Hiroaki Shimogori. Toru Sekitani. Hideki Okazaki
Yoshio Koyanagi. Naoki Yamamoto

Department of Otolaryngology,
Department of Virology and Parasitology, Yamaguchi University School of Medicine

Virus or virus-like agent have been suggested to be one of the causative agents of vestibular neuronitis from accumulating clinical investigations. Among them herpes simplex virus (HSV) infection seems to be most popular because herpes virus preferentially infects nerve system and can establish latent infection in the peripheral nerve ganglia. However, it was difficult to detect very small amount of virus genomes in ganglia in latent phase of HSV infection.

In this paper, polymerase chain reaction (PCR) with thermostable DNA polymerase was developed to detect HSV-I DNA from paraffin-embedded tissues. Using this system, we examined the vestibular ganglia of five HSV-I latently infected rats that

were inoculated through the peritoneum. None of the rats displayed any pathological abnormalities such as inflammation or intranuclear inclusion. No evidence of viral expression in the ganglia was confirmed by immunofluorescent method. Amplified HSV-I genomes were detected from bilateral vestibular ganglia (six positive cases out of ten ganglia). On the other hand all trigeminal ganglia possessed HSV-I genomes. Concerning with the brain, HSV-I genomes were detected in the cerebrum only in one case. These data indicate the possibility that reactivation of HSV-I genomes may lead to the disorder of the vestibular system, which will be associated with various abnormalities of vestibular function.

前庭神経節におけるHSV- I に対するPCRの試み

下郡 博明 関谷 透 岡崎 英紀
小柳 義夫 山本 直樹

山口大学耳鼻咽喉科
同 寄生体学教室

【緒 言】

内耳におけるウイルス感染実験は、これまで数多く試みられている。なかでもDavisら¹⁾の実験(1976年)は、各種ウイルスが内耳組織のどの部位に親和性があるかを示す興味深いものであり、Herpes simplex virus type I (以下HSV-Iと略す)は外リンパ組織、神経、神経節に特異的に見出されている。もし神経親和性を有するHSVが、初感染後、前庭神経節に潜伏するとすれば、この回帰発症により、めまい・体平衡障害が生ずることは、十分に考えられる。

今回、我々はラット腹腔内にHSV-I接種後、前庭神経節に潜伏感染するHSV-IをPolymerase chain reaction^{2)~6)}(以下PCRと略す)を用いて証明した。

【方 法】

使用動物はプライエル反射正常、両鼓膜正常な生後6~8週のWistar系rat、5匹で接種前に蛍光抗体法(以下IFと略す)によりHSV-I seronegativeを確認した。接種ウイルスはHSV-I(KOS株)(1.5×10^7 pfu)である。ウイルスを腹腔内接種し、無症状に経過したものに対して接種1ヶ月後に10%中性緩衝ホルマリンで灌流固定後、前庭神経節、三叉神経節、大脳、小脳脳幹を採取し、パラフィン包埋した。各々HE染色にて病理組織学的に検討し、またIFでウイルスの発現を検索すると同時に、PCRを施行した。IFに関しては、佐多らの方法に準じて行なった^{7,8)}。またPCRはWrightら²⁾の方法に準じた。パラフィン切片からDNAを抽出、GMD社HSV-I specific primer 1 R, 2 Lを用い、5プライムのprimerを³²Pでエンドラベルした。そしてPCRを施行し、105bpの増幅したDNA bandをオートラジオグラフィにて検出した。至適な反応時間、反応温度は第1サイクルが94℃・1分、62℃・1分、72℃・2分、以後94℃・1分、60℃・1分、72℃・2分、最終サイクルが

72℃・5分である。今回は計30サイクル施行した。PCR終了後、sampleをアクリルアミド・ゲルで電気泳動し、ゲル乾燥後X線フィルムを感光させた。

【結 果】

接種後も、5匹のラットは全て眩暈・体平衡失調などの臨床症状もなく両鼓膜正常であり、プライエル反射も保たれていた。

1) 病理組織学的検索

前庭神経節、三叉神経節、大脳、小脳脳幹全てに、リンパ球浸潤、perivascular cuffing、核内封入体等、ウイルス感染を示唆する所見は認められなかった。

2) IF

前庭神経節、三叉神経節、大脳、小脳脳幹全てに、HSV-Iの特異的な蛍光を認めなかった。

3) PCR (Table 1)

前庭神経節に関しては、左右計10個中6個(60%)に、三叉神経節では100%に、105bpの特異的なバンドを認めた(Fig. 1. 2)。また、1例のみ大脳に特異的なバンドを認めた。

case	No.	vestibular ganglion	trigeminal ganglion	cerebrum	cerebellum, brainstem
1	Right	-	+	-	-
	Left	-	+	-	-
2	Right	-	+	-	-
	Left	+	+	-	-
3	Right	+	+	-	-
	Left	-	+	-	-
4	Right	+	+	+	-
	Left	+	+	-	-
5	Right	+	+	-	-
	Left	+	+	-	-
Total	Right	3/5(60%)	5/5(100%)	1/5(20%)	0/5(0%)
	Left	3/5(60%)	5/5(100%)		

Table 1. Summary of the results by PCR

Table 1 PCR analysis of HSV-I in rats inoculated in the peritoneal space. HSV-I genomes were detected in all trigeminal ganglia, in the vestibular ganglia of six out of ten, and only one case in the cerebrum.

【考 察】

当教室では、これまで前庭神経炎⁹⁾に対し、基礎的、臨床的に様々な検討を行ってきた。

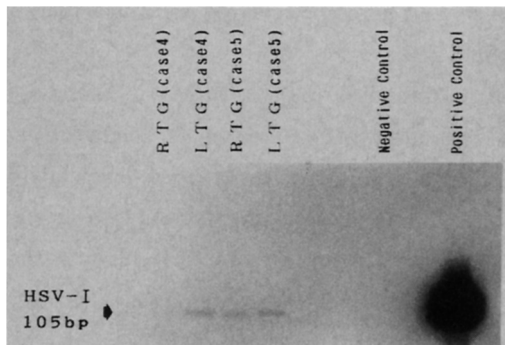


Fig1 Trigeminal ganglia were subjected to PCR reaction. Positive control (GMD) and negative control (Template free) were applied in the same PCR reaction.. HSV-I specific PCR products (105bp) were detected in all trigeminal ganglia.
RTG : Right trigeminal ganglion
LTG : Left trigeminal ganglion

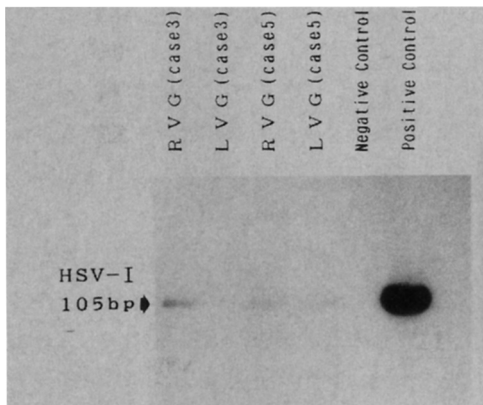


Fig2 Vestibular ganglia were subjected to PCR reaction. HSV-I specific PCR products (105bp) were detected in the right vestibular ganglion of case 3, and in both sides of the vestibular ganglia of case 5.

RVG : Right vestibular ganglion
LVG : Left vestibular ganglion

その結果、その病因としてウイルス、特に潜伏感染という独特の性格を有するヘルペスウイルス属の関与が強く示唆されていた^{10~14)}。しかしながら、これまで前庭神経節にヘルペ

スウイルスが潜伏することを証明した報告は見られていない。潜伏感染のウイルス遺伝子はごく微量であり、通常のhybridization法では検出はなかなか困難だと思われる。しかし近年の分子生物学のめざましい進歩により、PCRを用いてフェンタグラムという微量のウイルス遺伝子の検出が可能となった。さらに同方法により、パラフィン包埋組織からウイルスDNAを検出できることが報告された^{3~5)}。

今回我々は、このPCRを用いて前庭神経節に潜伏感染するウイルスDNAの検出を試みた。その結果、顕微鏡レベルで病理組織学的に著変を認めず、またIFでもウイルス抗原が認められなかった前庭神経節の60%にウイルスDNAを検出できた。このことは、sensory ganglionの中で前庭神経節にもHSV-Iは潜伏感染し得ることを示している。また、並行して三叉神経節、大脳、小脳脳幹についても検索したが、腹腔内より血行性に感染を来した際には、中枢神経系に潜伏する率は、低いと思われる。角膜からのウイルス接種では、脳幹に高率に潜伏するという報告と比較すると、神経行性に感染する際の局所の免疫応答は、血行性のそれと比べて弱い事も予想される。前庭神経節は、他の神経節とは異なり双極性神経細胞であることは周知の事実である。そして、その独特の形態ゆえ、電気生理学的にも興奮の伝導の際に重要な役割を果たすことが予想されている。それゆえ、なんらかの誘因で前庭神経節に潜伏するウイルスDNAが再活性化され、ウイルス発現が引き起こされる際には、临床上、前庭神経系の異常をきたすことは十分に考えられ、今後この点を明らかにすることが前庭神経炎の病因を解明する重要な点となると考えている。

[ま と め]

1. ラットの腹腔内にHSV-Iを接種し、無症状に経過したものに対し、1ヶ月後、PCRを用いて前庭神経節、三叉神経節、大

脳, 小脳脳幹に潜伏するHSV- I DNAを
検索した.

2. まず各sampleに対してHE染色, 蛍光抗体法を施行したが, すべてにおいて炎症所見, ウイルス発現は認められなかった.
3. しかし, PCRを用いることにより前庭神経節の60%, 三叉神経節の100%にHSV- Iの潜伏感染を証明できた. また, 大脳, 小脳脳幹では, 大脳に1例のみ潜伏感染を証明できた.

参 考 文 献

1. Larry E. Davis, Richard T. Johnson : Experimental viral infections of the inner ear I. Acute infections of the newborn hamster labyrinth. *Labo Invest* 34 : 349-356, 1976.
2. Deann K. Wright, M. Michel Manos : Sample preparation from paraffin-embedded tissues, Chapt. 19, Michael A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky et al : PCR protocols—A guide to methods and amplications. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, Academic Press, Inc, 1990, pp. 153-158.
3. Darry K. Shibata, Norman Arnheim, W. John Martin : Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 167 : 225-230, 1988.
4. Sylvia L. Brice, Donna Krzemien, William L. Weston, J. Clark Huff : Detection of herpes simplex virus DNA in cutaneous lesions of erythema multiforme. *J Invest Dermatol* 93 : 183-187, 1989.
5. Ming Cao, Xiao Xiao, Barbara Egbert, Teresa M. Darragh, T. S. Benedict Yen : Rapid detection of cutaneous herpes simplex virus infection with the polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 82 : 391-392, 1989.
6. Randall K. Saiki, David H. Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J. Scharf, Russell Higuchi, Glenn T. Horn, Kary B. Mullis, Henry A. Erlich : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487-491, 1988.
7. 佐多徹太郎, 佐藤由子, 倉田 毅 : ウイルス感染症の免疫組織化学, 病理と臨床 4 : 262-268, 1986.
8. 佐多徹太郎, 佐藤由子, 倉田 毅 : ウイルス性疾患におけるウイルス抗原の検出法, 検査と技術 15 : 896-900, 1987.
9. Toru Sekitani : Vestibular neuronitis—It's clinical characteristics. *Adv Oto-Rhino-Laryngol* 29 : 111-123, 1983.
10. 平田哲康, 関谷 透, 松尾隆晶, 日吉正明, 山田隆志他 : 前庭神経炎—血清ウイルス抗体価の追跡調査の結果—, 耳鼻臨床 76 : 2368-2375, 1983.
11. 平田哲康, 関谷 透, 日吉正明, 沖中芳彦, 木戸利成他 : 前庭神経炎—血清ウイルス抗体価の追跡調査 (第二報) —, 耳鼻臨床 77 : 2183-2190, 1984.
12. 平田哲康, 関谷 透, 兼定啓子, 日吉正明, 松尾隆晶他 : 前庭神経炎—血清ウイルス抗体価の追跡調査 (第三報) —, 耳鼻臨床 78 : 2641-2648, 1985.
13. Takaaki Matsuo : Vestibular neuronitis—Serum and CSF virus antibody titer—. *Auris Nasus Larynx* 13 : 11-34, 1986.
14. 平田哲康, 関谷 透 : 前庭神経炎の血清ウイルス学的検討, 日耳鼻 91 : 835-846, 1988.

質 疑 応 答

質問 波多野 篤 (徳島大)

- ① パラフィン包埋以外のセロイジン包埋などではウイルスを同定できるのか。また脱灰操作を行なったものではどうか。
- ② 感染経路としては腰神経節より脊髄上行性に行く経路と血行性の経路のいずれか。
- ③ 神経節中での潜伏感染の証明として共生培養などは行なっているか。

質問 田村真司 (和歌山医大)

- ① 蛍光抗体法に使用した抗体は何に対する抗体か。
- ② 蛍光抗体法で陰性、PCRで陽性なのは感度の問題なのか。ウイルスの発現の問題なのか。

応答 下郡博明 (山口大)

- ① セロイジン包埋標本、脱灰標本などは、今回施行してないが、PCRは施行可能と考える。
- ② 感染経路は viremic spread と考えている。
- ③ 共生培養は試みたことはあるが、CPEは認められなかった。

応答 下郡博明 (山口大)

- ① 使用した抗体は、ポリクローナル抗体。
- ② 感度の問題もあると思うが、ウイルスの発現の有無によると考える。厳密にはRNAのレベルでのcheckが必要であろう。