

PATHWAY INTO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AFTER INTRANASAL INFECTION OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 IN MICE

Atsushi Hatano, Motoharu Fukazawa,
Katsuichiro Ohsaki

Division of Clinical Otolaryngology, University Hospital,
The University of Tokushima, School of Medicine

The nasopharyngeal cavity is one of the common natural routes of infection with herpes simplex virus type 1 (HSV-1). However, the pathway into the central nervous system (CNS) after intranasal infection of HSV-1 has not yet been extensively studied. Five-week-old male ICR mice were inoculated with HSV-1 by intranasal inoculation, and viral antigens in several tissues were examined by peroxidase-antiperoxidase methods using paraffin sections compared with histopatho-

logical changes.

Viral antigens were observed at the site of inoculation-epithelium of the nasal and oral cavity-and in the nervous system tissues, such as olfactory bulb, maxillary nerve, pterygopalatine ganglion, trigeminal ganglion, and brain stem. These data suggest that after intranasal infection, HSV-1 can be transmitted to the CNS by the olfactory and neural route in relation to the trigeminal pathway.

マウス鼻腔内接種による単純ヘルペスウイルス 1型の中樞神経系への感染経路

波多野 篤 深澤 元晴 大崎 勝一郎

徳島大学附属病院難聴診療部

1. はじめに

単純ヘルペスウイルス (HSV) は、歯肉口内炎、角膜ヘルペス、咽頭炎といった局所感染的なものばかりでなく中枢神経系 (CNS) への侵入によりヘルペス脳炎という致死的な全身感染症を引き起こす病原因子である。鼻腔は、HSVの自然な感染経路の一つであり、

マウスの鼻腔内接種はヘルペス脳炎の発症機構を明らかにするモデルとして有意義でありこれを用いてウイルスのCNSへの感染経路に関しての種々の報告があるが、不明の点もいくつか認められる。¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

今回、単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) を用いてマウスの鼻腔内接種による感染

実験を行い、感染局所や神経系組織における病理学的変化及び免疫組織学的手法によりウイルス抗原の分布を調べウイルスのCNSへの感染経路につき検討した。

2. 材料と方法

1) マウスとウイルスの接種方法

動物は非近交系ICRマウスの雄、5週齢を用い、ウイルスは、HSV-1 F株を用いた。マウスをエーテル麻酔後鼻腔内に約 $10^{6.5}$ PFU (plaque forming unit)/ $60 \mu l$ のウイルス液を滴下し接種した。

2) 病理組織学的検討

ウイルスを接種したマウスを連日観察し、ウイルス感染価の上昇の認められる3日後屠殺し⁵⁾、マウスの頭部を緩衝ホルマリンにて固定、EDTAにて脱灰後、パラフィンに包埋し薄切切片を作製した。一部のマウスでは、上顎神経を含め三叉神経節、脳および肺を摘出し、脱灰操作を省き同様の処理により切片を作成した。一部の切片はヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行い、他の切片はウイルス抗原検索用に用いた。

3) ウイルス抗原の検索

酸素抗体法のPAP (peroxidase-anti-peroxidase)法を用いた。薄切切片を、内因性ペルオキシダーゼをブロック後正常ブタ血清と反応させた。1次抗体はウサギ抗HSV-1抗体(フクダ株, 中和抗体価 1:128)を用いて室温で60分反応させ、2次抗体としてブタ抗ウサギ IgG (DAKO社)を室温で60分反応させた。次にウサギPAPを室温で30分反応後、DAB溶液にて発色させヘマトキシリンにて核染色を行った。陽性コントロールとして、HSVに感受性のあるVero細胞にウイルスを感染させ、cytopathic effect (CPE)により感染を確認後、この感染細胞と非感染細胞を混合しペレットとし、固定、包埋後、同様に染色し用いた。また、同じ感染細胞およびマウスの薄切切片を用

いて、1次抗体のかわりに正常ウサギ血清を用いて反応させ陰性コントロールとした。

3. 結 果

1) 臨床症状：マウスはウイルス感染2-3日後より立毛してうずくまり脳炎様症状を示し、4日目までにはほぼ全例死亡した。

2) 組織学的所見およびウイルス抗原の局在：

感染局所の鼻粘膜では上皮の剥離が見られたが、炎症細胞浸潤は軽度であった。

PAPによりウイルス抗原が嗅上皮および粘膜固有層に認められた。口蓋粘膜の一部では、ホモジナスな物質が核の中をしめてクロマチンが核周囲へ圧排されスリガラス状となりいわゆるfull型封入体を示し、H-E染色にてHSV感染所見を呈する。同部に一致してPAPにてウイルス抗原が検出された。

神経系組織では嗅球、上顎神経、翼口蓋神経節、三叉神経節と脳幹でウイルス抗原が認められた。鼻腔天蓋部では嗅上皮より連続して、嗅神経繊維および嗅球の糸球層にウイルス抗原が検出され嗅覚経路を介したウイルスのCNSへの感染波及が示唆された。鼻腔外側で上顎神経の腹側に位置する翼口蓋神経節と思われる神経節ではH-E染色にて神経節細胞にfull型封入体を認め、PAPにて神経節細胞および衛星細胞にウイルス抗原を認めた (Fig-1)。上顎神経では炎症細胞浸潤や空胞変性は軽度であった。

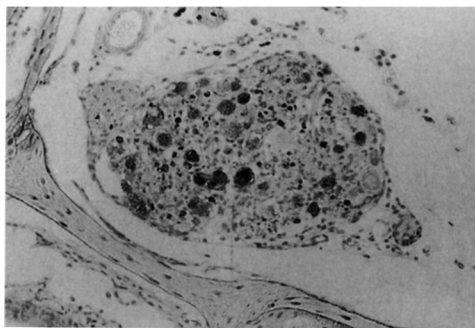


Fig-1.
HSV antigens in the pterygopalatine ganglion. (PAP)

PAPにてウイルス抗原が検出されたが、必ずしも全ての神経繊維には認められず、一部の神経繊維にみられ、前額断の所見では上顎神経の背内側の繊維で強くウイルス抗原が検出された。神経繊維の中ではシュワン細胞にウイルス抗原が検出された。上顎神経と共に三叉神経節を摘出し、脱灰処理を省き同様に染色したもので、三叉神経節内では神経節細胞及び衛星細胞に(Fig-2)、また神経繊維ではシュワン細胞でウイルス抗原が検出された(Fig-3)。また、核の同

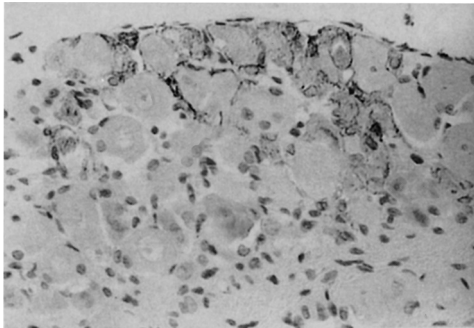


Fig-2.
HSV antigens in the trigeminal ganglion.
(PAP)

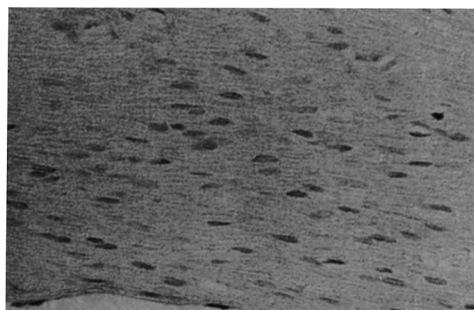


Fig-3.
HSV antigens in the Schwann's cells of
the maxillary nerve. (PAP)

定は行っていないが、脳幹の腹側の核にもウイルス抗原を認めた。これより感染局所より上顎神経を介して脳幹へ至る経路が示唆された。

他の臓器では肺で終末気管支などにウイルス抗原が検出された。

4. 考 察

ヘルペス脳炎では主に嗅球、側頭葉などの辺縁系が侵されることよりウイルスのCNSへの侵入経路として嗅覚経路が想定されているが⁴⁾、三叉神経節に潜伏したウイルスが上行性に感染する経路や血行性経路の可能性も報告されている¹⁾²⁾³⁾。我々⁵⁾もマウスの鼻腔内接種感染モデルを用いて、感染後の諸臓器のウイルス感染価の測定により嗅覚経路と三叉神経節を介した経路により脳へ感染波及することを報告している。今回、免疫組織学的手法により感染局所である鼻腔と口腔粘膜、および三叉神経節、上顎神経、翼口蓋神経節、嗅球、脳幹にHSV抗原の陽性所見を認め、感染局所にてのウイルスの増殖、及び各神経組織への感染波及を認め、これらの経路により、中枢神経系へ感染が波及したことが示された。今回の結果は、Johnson¹⁾²⁾、Kernら³⁾のHSVを用いた鼻腔内接種の感染モデルの報告とほぼ一致するが、翼口蓋神経節における所見は、Slavinら⁶⁾がH-Eにて神経節細胞に核内封入体を認めた報告以外少ない。Insaustiら⁷⁾はHRPをラットの上顎神経の翼口蓋神経節の近くに接種し脳幹の種々の部位にHRPを認めたことよりHRPが大錐体神経を介して脳幹へ達するであろうと推論している。またIshiiら⁸⁾も、鼻腔内接種による顔面神経のHSV感染モデルを作成し、鼻腔粘膜より三叉神経及び大錐体神経経由での膝神経節などの顔面神経、橋へのウイルスの感染波及を示しているが、翼口蓋神経節についての記載はない。以上のごとく翼口蓋神経節は顔面神経を介したCNSへの経路の一部であると考えられており今回この神経節におけるHSV感染が観察された。現段階では、顔面神経においてはウイルス抗原を認めていないが、鼻腔、口腔粘膜上皮の陽性所見及び、翼口蓋神経節などにHSV抗原

の陽性所見が見られており、感染局所より脳幹への経路としては三叉神経ばかりでなく、翼口蓋神経節を介した顔面神経経由の経路の可能性も示唆された。今後は顔面神経を含んだより中枢側でのウイルス抗原の検索を行っていく予定である。

ウイルスの神経性伝播様式については、電顕的観察などより逆行性軸索内輸送によるものであらうとされている⁹⁾。我々も接種局所よりの感染波及の速度などより軸索内輸送によるものと考えているが、今回の結果では神経繊維内ではシュワン細胞にウイルス抗原が認められておりシュワン細胞も主なものではないが、感染の場および感染経路となり得る可能性が示唆された。

参 考 論 文

- 1) Johnson RT: Pathogenesis of CNS Infections, Chapt. 3 in Viral Infections of the Nervous System. Raven Press, New York, 37-60, 1982.
- 2) Johnson RT: Herpesvirus Infections, Chapt. 6 in Viral Infections of the Nervous System. Raven Press, New York, 129-157, 1982.
- 3) Kern ER et al: Herpesvirus hominis infection in newborn mice. I. An experimental model and therapy with iododeoxyuridine. J Infect Dis, 128: 290-299, 1973.
- 4) Esiri MM: Herpes simplex encephalitis. An immunohistological study of the distribution of viral antigen within the brain, J Neurol Sci, 54: 209-226, 1982.
- 5) 波多野篤: 単純ヘルペスウイルス1型の鼻腔内接種によるマウスに対する病原性, 日耳鼻, 92: 579-587, 1989.
- 6) Slavin HB et al: Studies on herpetic infection in mice. II. The pathways of invasion of the central nervous system after intranasal instillation of virus in suckling mice, J Exp Med, 78: 315-320, 1943.
- 7) Insausti R et al: New data on the precise location of the lacrimo-muconasal nucleus of the rat, Experientia, 36: 977-978, 1980.
- 8) Ishii K et al: An animal model of type-1 herpes simplex virus infection of facial nerve, Acta Otolaryngol, Suppl. 446: 157-164, 1988.
- 9) Cook ML et al: Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: Evidence for intra-axonal transport of infection, Infect Immunity, 7: 272-288, 1973.

質 疑 応 答

質問 愛場康雅 (大阪市大)

- ① 嗅神経束にウイルスは認められたか。
- ② 呼吸部の三叉神経にウイルスは認められたか。
- ③ 嗅上皮の形態学的変化は無かったか。

応答 波多野 篤 (徳島大学難聴診療部)

- ① 鼻腔天蓋部では、嗅上皮より連続して嗅神経線維にウイルス抗原をみとめた。
- ② 呼吸部は今回観察を行っていない。
- ③ 数ヶ所上皮剥離を認める以外は著変を認めなかった。

質問 田端敏秀 (和医大)

ウイルスの接種量と組織採取の時期についてお教え下さい。

応答 波多野 篤 (徳島大学難聴診療部)

HSV-1 F株を用いて $10^{6.5}$ PFU/60 μ l のウイルス液を鼻腔内に接種し、臓器別のウイルス感染価測定により感染価の上昇が認められた接種3日後組織を採取した。