

学位論文審査結果の要旨

氏名	藤原 崇志
審査委員	主査 高田 清式 副査 浜川 裕之 副査 山田 武司 副査 松井 誠司 副査 林 康人

論文名：単純ヘルペスウイルス1型による顔面神経麻痺ラットの作成と病態解明
審査結果の要旨

【背景・目的】顔面神経麻痺は表情筋が麻痺し、口角下垂にともなう摂食時の流涎などの物理的症狀に加え、顔の非対称などにより精神面への影響も生じ、生活の質が大きく低下する。単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)は末梢性顔面神経麻痺の大半を占めるベル麻痺の原因であり、また脳炎に伴い顔面神経を含めた神経障害を生じる。HSV-1による神経障害はウイルス株や動物種により異なるが、これまでのHSV-1による顔面神経障害を検討した研究ではBALB/cマウスにHSV-1(KOS株)を接種した顔面神経麻痺マウスでのみ評価され病態解明が行われてきた。今回、ヒトにより近い疾患モデル作成を目的にWister系ラットにHSV-1(KOS株)を接種することで生じた顔面神経麻痺ラットに対し、電気生理学的、組織学的検討等を行い検討した。

【方法】3週齢Wister系ラット(SLC社)をセボフルレン吸入麻酔下にHSV-1(KOS株)の接種を行った。右耳介後面を27ゲージ針で擦過した後HSV-1(KOS株 1.0×10^4 pfu/ml、0.1ml)を接種した。HSV-1の感染を確認するため、HSV-1接種後24時間、48時間、72時間に側頭骨内顔面神経を採取し、定量的リアルタイムPCR法(qRT-PCR)を用いてHSV-1の検出を行った。耳介擦過で顔面神経麻痺が生じないことを確認するため、コントロール群としてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)をHSV-1の代わりに右耳介後面に接種するコントロール群を作成した。顔面神経麻痺についてはHSV-1接種後1日、3日、5日、7日に瞬目反射を確認した。さらに7日目に瞬目反射を確認した後に、吸入麻酔下にて側頭骨外顔面神経本幹を露出し、眼輪筋におけるElectroneuronography(ENoG) valueを測定した。組織学的検討として、HSV-1接種後5日目に4%ホルマリン灌流固定後、側頭骨外顔面神経を採取し、また顔面神経核評価のため全

脳を採取した。

【結果】顔面神経麻痺はHSV-1接種後2-3日目に生じ、麻痺の程度は3-5日かけて徐々に増悪した。瞬目反射での閉眼動作はHSV-1接種後3日では閉眼は不全麻痺程度であったが、HSV-1接種後5日になると完全麻痺を生じた。これらの顔面神経麻痺はPBS接種したコントロール群では生じず、HSV-1接種群のHSV-1接種側でのみ生じた。ENoGによる顔面神経麻痺の程度評価では、PBS接種群ではENoG値は $110.0 \pm 18.0\%$ と正常範囲であったが、HSV-1接種群では $33.0 \pm 15.3\%$ と有意に低値を示した。HSV-1の感染を確認するためqRT-PCRを行ったところ、HSV-1接種24時間後より徐々にHSV-1を認め、72時間後にはHSV-1のDNA量は顕著に増大を認め、HSV-1の感染が確認された。組織学的検討では側頭骨外顔面神経において脱ミエリン化が認められた。また、今回HSV-1接種による顔面神経麻痺モデルでは、マイクログリアの活性化は認められなかった。

【考察・意義】本研究ではHSV-1 (KOS株)により3週齢Wister系ラットに顔面神経麻痺を生じた。従来のBALB/cマウスを用いた顔面神経麻痺モデル動物と比べるとENoG値は低く、より重症の顔面神経麻痺が生じたと考えられた。側頭骨外顔面神経の組織像は脱ミエリン化を生じ、従来のBALB/cマウスと類似した所見であったが、顔面神経核ではBALB/cマウスと比べWister系ラットでは神経変性が強く生じていた。顔面神経の末梢神経切断モデルとした顔面神経損傷では顔面神経核においてマイクログリアの活性化が認められるが、今回Wister系ラットにHSV-1 (KOS株)を接種した顔面神経麻痺では活性化したマイクログリアは認められなかった。マイクログリアの活性・不活性の変化を加えることで、HSV-1接種による顔面神経麻痺の機序解明がさらに進むことが期待される。

本研究では、顔面神経麻痺の疾患モデルとして従来のBALB/cマウスに代わりラットで初めて作成し、本ラットがヒトにより近い重症度である点および電気生理や組織分析が容易な点で極めて有用性が高いことを明らかにした。今後この疾患モデルであるラットを応用しHSV-1による顔面神経麻痺の機序・治療などの研究がさらに大きく進歩することが期待される。

本研究による公開審査は、平成28年1月4日に開催され、申請者は研究内容を口頭発表した。各審査委員からは、①週齢による神経障害の差異、②神経障害を作成できる頻度、③耳介擦過以外での感染方法、④組織像の軸索の変性と細胞間隙、⑤核内封入体の有無、⑥神経節での変化、⑦感染後の死因、⑧抗ウイルス剤投与後の病状、⑨神経障害重症度とqRT-PCR定量的関係、⑩他のヘルペス属の実験モデルの現況、⑩KOS株以外での実験系など、多方面について質問がなされた。これらについて申請者は、質問の意図を十分に理解し明快に答え、本研究に関する領域について学位授与に値する十分な知識と見識を有することを示した。審査委員は全員一致で、本研究を高く評価し、博士(医学)に相応しいと結論した。