

# BALB/c マウスへの単純ヘルペスウイルス 2 型 臨床分離株経膣接種による神経伝播経路と 脊髄炎の発症病理

東京慈恵会医科大学皮膚科学講座

峰 咲 幸 哲      本 田 まりこ

長崎大学熱帯医学研究所宿主病態解析部門病変発現機序分野

岩 崎 琢 也

富山医科薬科大学ウイルス学講座

白 木 公 康

(受付 平成 14 年 8 月 15 日)

## PATHOGENESIS OF THE MYELITIS AND THE TRANSNEURONAL SPREAD OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 AFTER INTRAVAGINAL INOCULATION INTO BALB/c MICE

Yoshinori MINESAKI and Mariko HONDA

*Department of Dermatology, The Jikei University School of Medicine*

Takuya IWASAKI

*Department of Pathology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University*

Kimiyasu SHIRAKI

*Department of Virology, Toyama Medical and Pharmaceutical University*

Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) myelitis associated with primary genital herpes is a form of ascending myelitis whose pathogenesis is poorly understood. To investigate the pathogenesis of the myelitis and the transneuronal spread of HSV-2, we performed intravaginal inoculation of HSV-2 isolates into 6-week-old female BALB/c mice. We examined differences in HSV-2 susceptibility between hormone-treated and non-hormone-treated mice by means of scarification and administration of sex hormones. HSV-2 isolates were obtained from a patient with acute urinary retention induced by sacral myeloradiculitis due to primary genital herpes (Elsberg syndrome) and patients with recurrent genital or lumbosacral herpes.

Progesterone administration was more a useful method than was scarification. Regardless of the inoculated strain, HSV-2 antigen was detected immunohistochemically in the vaginal mucosa 1 to 4 days after intravaginal inoculation and in the dorsal root ganglia (DRG), spinal cord, brainstem and autonomic plexa of the lower bowel 7 to 10 days after intravaginal inoculation. These results suggest the virus arrived at the DRG from the vaginal mucosa and

reached the brainstem from the DRG via sensory neuronal circuits through the spinal cord. The hindlimb paralysis seemed to develop from the virus infecting motor neuronal circuits through the posterior or anterior columns of the spinal cord. The rectal incontinence is apparently caused by the virus infecting autonomic plexa of the lower bowel as well as the sacral spinal cord. The viral strain responsible for Elsberg syndrome was the one least virulent in the mouse, perhaps because of host differences. The period from the development of the paralysis to death was longer with weaker strains than with stronger strains. The difference in the anterograde transneuronal transport velocity from the DRG to the central nervous system may be related to virulence.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2002; 117: 427-39)

Key words: herpes simplex virus type 2, intravaginal inoculation, myelitis, Elsberg syndrome, transneuronal spread

## I. 緒 言

性器ヘルペスは、単純ヘルペスウイルス2型 (herpes simplex virus type 2, HSV-2) あるいは1型 (HSV-1) が原因のウイルス感染症である。病型には、HSV が性器の皮膚や粘膜に接触感染した後に2~10日間の潜伏期間を経て発症する急性型 (初感染) と、初感染後に後根神経節に潜伏したHSVが発熱、ストレス、疲労、性交などの刺激や細胞性免疫能の低下などの誘因によって再活性化して神経支配領域に病変を形成する再発型がある。

本邦における急性型性器ヘルペスの6~7割はHSV-1が原因で<sup>1)2)</sup>、外陰部のびらん、潰瘍による排尿時痛や痛みによる排尿障害を伴うことも少なくない。また、まれではあるもののHSVが仙髄神経S3~S4領域を含む両側仙髄神経根へ感染することによって急性尿閉を引き起こすことがあり、このような症候はElsberg症候群と呼ばれている<sup>3)4)</sup>。本症候群はHSV-2による初感染例に多くみられ、われわれはこれまでにHSV-2の初感染後に発症した成人女性例1例を経験している<sup>1)</sup>。このようにHSV感染症ではときに脊髄炎や脳炎などの中枢神経症状を併発することが知られており、一般にHSV-1は脳炎を起こしやすく、HSV-2は脊髄炎を起こしやすいといわれている<sup>5)6)</sup>。

HSVによる脳炎や脊髄炎の発症と感染ウイルスの毒性との関連についての報告は多いが<sup>5)7)-15)</sup>、同一のHSV株を用いた接種実験でも、接種部位や宿主 (接種動物) が変わることによってウイルスの毒性に大きな差がみられるなど、両者の関連についてはいまだ不明な点が多い。また

近年、HSVの神経向性という特性と免疫組織化学的手法を利用して、接種部位から中枢神経系に至る感染経路について解析した報告もみられるようになったが<sup>16)-20)</sup>、その多くはHSV-1を用いた足蹠や腹腔内、脳幹接種による解析であり、HSV-2を用いた経膣接種による解析はこれまでほとんどない。

そこで今回われわれは、Elsberg症候群患者および中枢神経症状を併発していない再発型ヘルペス患者より分離したHSV-2株を実際の感染と同じ様式で実験動物に経膣接種することで、HSV-2による脊髄炎の発症と感染ウイルスの毒性との関連やHSV-2の神経伝播経路について検討した。

なお、BALB/cマウスへのHSV経膣接種に関しては、マウスの性周期によってウイルスに対する感受性が変化するとの報告<sup>21)</sup>もあるため、われわれは外陰部を乱切する方法と性ホルモンを前投与する方法の2つの方法で接種実験を行い、HSV経膣感染実験における有用な接種方法についても検討した。

## II. 対象と方法

### 1. 動物およびウイルス

実験動物は、日本SLC (静岡) より6週齢、メスのBALB/cマウスを購入した。

ウイルス株は、これまでに当科を受診した単純ヘルペス患者より分離培養した後に凍結保存しておいたHSV-2株のうち、以下のアシクロビル感受性株5株を用いた。1つは性器ヘルペス初感染後にElsberg症候群を発症した51歳の女性患者より分離した株 (JM-1) で、他の4つは性器ヘルペスあるいは腰仙骨部ヘルペスを繰り返す65歳、

33 歳, 25 歳および 77 歳の女性患者より分離した株 (JM-2, JM-3, JM-4, JM-5) である。

## 2. 細胞

すべてのウイルス株は Vero 細胞にて培養した。まず, 単純ヘルペス患者の発疹部を綿棒にて擦過してスメアを採取した後に検体保存液に入れた。検体保存液より 1 ml をエッペンドルフチューブに入れ, 5,000 rpm にて 5 分間遠心した後に上清を別のチューブに移し, さらに 5,000 rpm にて 5 分間遠心した。次に, この上清から 200  $\mu$ l をとり, Vero 細胞を単層培養した径 6 cm のシャーレ (5% 仔牛血清入 MEM (日水, イーグル MEM) 入) に接種した。1 時間吸着後, 0.8% メチルセルロース 2% 仔牛血清入 MEM 5 ml を重層し, 37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。その後, シャーレに形成されたプラークを顕微鏡下に採取し, Vero 細胞を単層培養した 25 cm<sup>2</sup> フラスコ (2% 仔牛血清入 MEM 5 ml 入) へ接種し, 再度, 37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。フラスコ内の細胞全部にウイルスが感染した後に凍融解を 3 回繰り返す, 滅菌済みチューブに移し, 3,000 rpm にて 15 分間遠心後, 上清を回収して -80°C にて保存した。

## 3. ウイルス力価

検体保存液より 1 ml をエッペンドルフチューブに入れ, 5,000 rpm にて 5 分間遠心した後に上清を別のチューブに移し, さらに 5,000 rpm にて 5 分間遠心した。この上清から 200  $\mu$ l をとり, 2% 仔牛血清入 MEM で 10 倍ずつ段階希釈した後に Vero 細胞を単層培養した径 6 cm のシャーレに希釈液を 200  $\mu$ l ずつ接種した。1 時間吸着後, 0.8% メチルセルロース 2% 仔牛血清入 MEM 5 ml を重層し, 37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 2 日間培養した。5% ホルマリン溶液で 1 時間以上固定し, 0.03% メチレンブルー溶液にて染色した後に, それぞれのシャーレに形成されたプラーク数からウイルス力価を算出した。

## 4. 接種

### 1) 乱切群 (性ホルモン非投与群)

各株 10 匹ずつ計 50 匹のマウスの外陰部を 25 ゲージ注射針にて乱切した後に  $1 \times 10^5$  plaque-forming units (PFU)/25  $\mu$ l/マウスを滴下した。接種後, 各株ごとにマウスの陰部症状や神経症状,

生存マウス数について 1 日 1 回ずつ 4 週間観察した。

次に, 経時的な感染ウイルスの局在を観察する目的で, 新たに各株 10 匹ずつ計 50 匹のマウスを用意して, 上記と同様の方法にて同力価のウイルスを接種した。50 匹のうち, 接種 2~3 時間後に各株 1 匹ずつ計 5 匹, 接種 4 日後に各株 2 匹ずつ計 10 匹を解剖した。さらに, 接種 7~10 日後に神経症状がみられたマウスを各株ごとに 2~5 匹ずつ解剖した。なお, 全く神経症状のみられなかったマウスは, 接種 14 日後にすべて解剖した。

### 2) E/DP 群, E 群 (性ホルモン投与群)

HSV-2 株は, 乱切法にて経腔接種した 5 株のうち, BALB/c マウスにおいて最も弱毒と考えられた JM-1 株, 最も強毒と考えられた JM-5 株および中等度の毒性と考えられた JM-3 株の 3 株 (JM-1, JM-3, JM-5) を用いた。性ホルモン投与法は Parr MB et al. の報告<sup>21)</sup>に従って以下のごとく行った。まず, ウイルス接種 6 日前にエストロゲン (17 $\beta$  estradiol Sigma 社) のみを 0.1  $\mu$ g/マウス皮下接種した群 (E 群) を各株ごとに 10 匹ずつ計 30 匹と, ウイルス接種 6 日前に 17 $\beta$  estradiol を 0.1  $\mu$ g/マウス, その翌日にプロゲステロン (Depo-Provera<sup>®</sup> Sigma 社) を 2 mg/マウス皮下接種した群 (E/DP 群) を各株ごとに 10 匹ずつ計 30 匹を用意した。マウスは, ペントバルビタール皮下注射にて麻酔後, 乱切せずに  $1 \times 10^5$  PFU/20  $\mu$ l/マウスを外陰部に滴下した。接種後, 各株ごとにマウスの陰部症状や神経症状, 生存マウス数について 1 日 1 回ずつ 4 週間観察した。

次に, 経時的な感染ウイルスの局在を観察する目的で, 新たに E 群のマウスを 10 匹, E/DP 群のマウスを 50 匹用意した。上記と同様の方法で同力価の JM-1 株と JM-5 株を用いて, E 群には 5 匹ずつ, E/DP 群には 25 匹ずつ接種した。E 群は, 感染の有無を確認する目的で, 接種 3 日後に 10 匹すべてを解剖した。E/DP 群は, 接種 1, 3, 7, 10, 45 日後にそれぞれ各株 5 匹, 計 10 匹ずつを解剖した。

なお本実験は, 本学および富山医科薬科大学, 国立感染症研究所における動物実験指針に従って行われた。

## 5. 病理組織・免疫組織化学

マウスはクロロフォルム吸入による深麻酔後,

胸腔を開いて右心房に切開を入れ、左心室に25ゲージの翼状針を留置した。まず、PBS 10 ml をゆっくり注入しながら右心房より環流脱血した。次に、同翼状針より4%ホルムアルデヒド/リン酸緩衝液(pH 7.4) 15 ml をゆっくり注入して固定した。固定後、各臓器を採材し、さらに10%緩衝ホルマリンにて1週間固定した。必要に応じて、EDTAによる脱灰を加え、通常の方法によりパラフィン包埋した後に厚さ3  $\mu\text{m}$  の薄切切片を作製した。この薄切切片を脱パラフィン後親水化し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色により、光学顕微鏡下で観察した。さらに、免疫組織化学的解析にもこの切片を使用した。

抗HSV-2抗体を用いた免疫組織化学染色ではまず、切片を0.3%過酸化水素水に30分間浸漬し、PBSにて洗浄した後に0.25%トリプシンCaCl<sub>2</sub>にて37°C、30分間処理した。PBSにて洗浄後、5%ヤギ血清を切片上に滴下し、室温にて20分間放置した。さらに、ウサギ抗HSV-2抗体を滴下して4°Cにて24時間放置した。切片上の試薬を洗い流しPBSに浸漬した後に抗ウサギビオチン標識ヤギ血清(Becton社)を切片上に滴下し、37°Cにて20~30分間放置した。切片上の試薬を洗い流しPBSに浸漬した後にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(LSAB 2キット DAKO社)を切片上に滴下し、37°Cにて20~30分間放置した。切片上の試薬を洗い流しPBSに浸漬した後にメチルグリーン核染色を行った。

なお、今回用いた抗HSV-2抗体の抗原は、ウイルス感染細胞の核および細胞質内に存在するウイルス構造蛋白で、ウイルスが増殖している細胞のみが陽性となるため、潜伏感染状態では陰性となる。

### III. 結 果

#### 1. 臨床症状と生存率

乱切群では、陰部のびらんや潰瘍、神経症状の出現時期は接種した株に関係なくほぼ一致していた。接種6~7日後に陰部にびらんが生じ、その後1~2日以内に後肢麻痺や膀胱直腸障害が出現し、神経症状が出現したマウスは接種7~11日後にすべて死亡した。一方、接種後2週間以内に皮膚粘膜症状や神経症状がみられなかったマウスは、そ

Table 1. Survival rate of BALB/c mice

Virus strain	Number of animals (%)		
	non-hormone treatment	hormone treatment	
		E/DP	E
JM-1	7 (70%)	8 (80%)	10 (100%)
JM-2	4 (40%)		
JM-3	3 (30%)	7 (70%)	10 (100%)
JM-4	2 (20%)		
JM-5	0 (0%)	4 (40%)	10 (100%)

Groups of ten mice were inoculated intravaginally with HSV-2 ( $1 \times 10^5$  PFU).

の後も症状が出現することなく経過観察終了時まで全例生存した。各株ごとの生存率は、JM-1株が70%と最も高く、JM-2株が40%、JM-3株が30%、JM-4株が20%であり、JM-5株では接種後2週間以内に全例死亡した(Table 1, Fig. 1)。

E/DP群では、4週間の経過中に陰部のびらん、潰瘍や明らかな膀胱直腸障害はみられず、主な神経症状は後肢麻痺であった。後肢麻痺の出現時期は、乱切群と同様に接種した株に関係なくほぼ一致していたが、症状の出現時期は乱切群に比べるとやや遅れて、接種8~10日後より出現した。JM-1株で死亡した全2例およびJM-3株で死亡した3例中2例においては後肢麻痺が約1週間続いた後の接種14, 15日後に死亡した。一方、JM-3株の残り1例とJM-5株で死亡した6例中5例では後肢麻痺の出現から1~3日以内の接種9~11日後に死亡した。JM-5の残りの1例は他の5例と同様に後肢麻痺の出現より3日で死亡したが、神経症状の出現時期が遅く、接種13日後より後肢麻痺が出現した。なお、各株ごとの生存率は、JM-1株が80%と最も高く、JM-3株が70%、JM-5株が40%であった(Table 1, Fig. 2)。

E群では4週間の経過観察中に皮膚粘膜症状や神経症状の出現したマウスは1例もなく、3株とも全例が生存し、生存率は100%であった(Table 1)。

なお、乱切群とE/DP群の間でJM-1株、JM-3株、JM-5株の生存率を各株ごとに $\chi^2$ 検定にて統計学的に比較検討したところ( $p < 0.05$ )、3株ともすべて有意差は認められなかった。

#### 2. 病理組織および免疫組織化学的所見

抗HSV-2抗体を用いた免疫組織化学にて感染

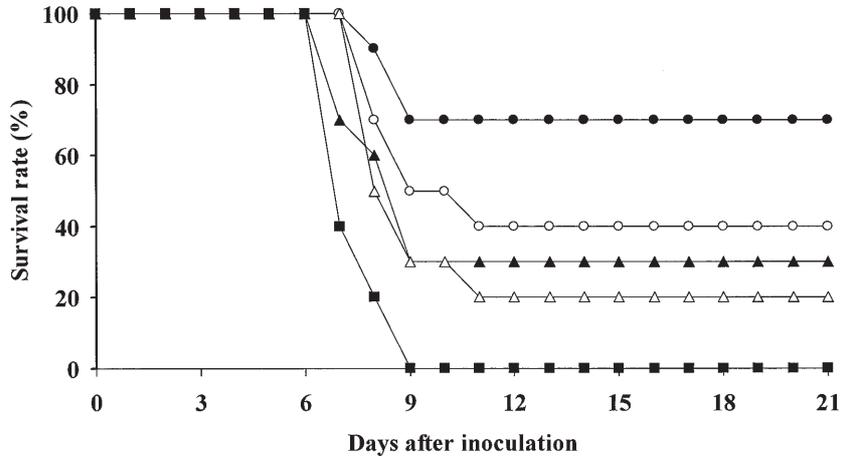


Fig. 1. Survival rate of BALB/c mice. Animals were observed once a day for 4 weeks after intravaginal inoculation with  $1 \times 10^5$  PFU of JM-1 (closed circles ●), JM-2 (open circles ○), JM-3 (closed triangles ▲), JM-4 (open triangles △) or JM-5 (closed squares ■) ( $n=10$ , each group).

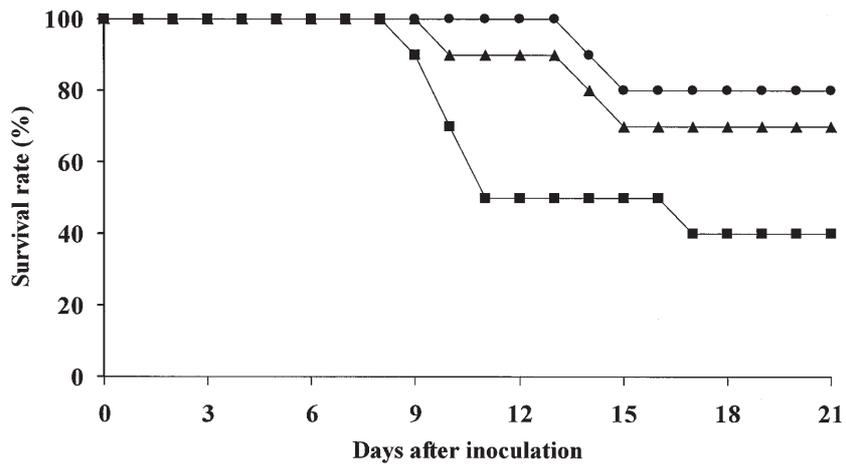


Fig. 2. Survival rate of BALB/c mice. Animals were observed once a day for 4 weeks after intravaginal inoculation with  $1 \times 10^5$  PFU of JM-1 (closed circles ●), JM-3 (closed triangles ▲) or JM-5 (closed squares ■) ( $n=10$ , each group).

ウイルスの局在を経時的に観察したところ、ウイルス接種前の処理法や接種した株による差はみられず、乱切群およびE/DP群のいずれにおいても同様の経過を示した。

接種2~3時間後では、HE染色や免疫染色のいずれにおいても腔粘膜上皮に感染を疑わせるような組織学的変化はみられなかった。

接種1~4日後のHE染色では、腔粘膜上皮内に巣状にウイルス感染細胞と思われる巨細胞や空胞化細胞が集簇してみられ、その周囲や粘膜下層には好中球を主体とした細胞浸潤を伴っていた

(Fig. 3a)。免疫染色では腔粘膜上皮内の巨細胞や空胞化細胞に一致してHSV抗原が検出されたが、粘膜下層には陽性細胞は認められなかった(Fig. 3b)。なおこの時点ではまだ、後根神経節や中枢神経系への感染は認められなかった。

接種7~10日後の免疫染色では、後根神経節内のニューロン(Fig. 4)や脊髄内のニューロンおよびグリア細胞にHSV抗原が陽性となった。HSV抗原陽性細胞は、腰仙髄などの下部脊髄では主に後根から後角にかけて分布し(Fig. 5a)、やや上方の胸腰髄では知覚神経求心路である脊髄小脳路あ

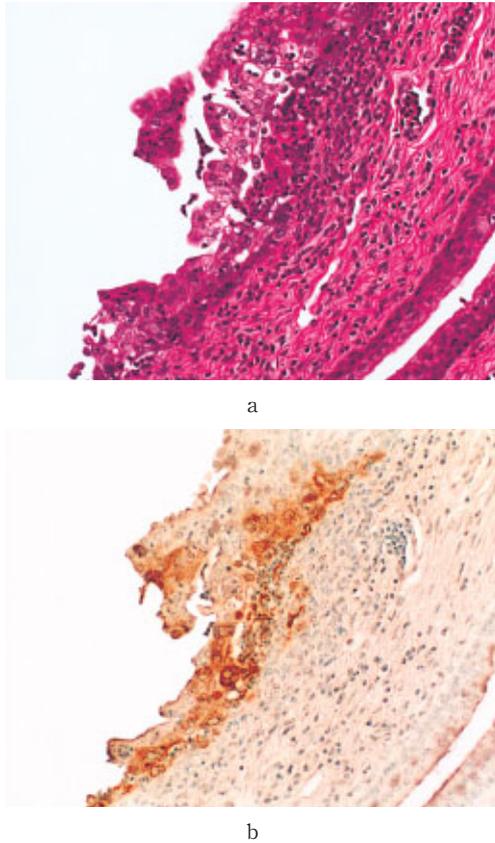


Fig. 3. Histopathological and immunohistochemical examinations of vaginal mucosa 4 days after intravaginal inoculation. Histopathological examinations of the vaginal mucosa showed multinucleated giant cells in a region of disorganized epithelium and lymphocytic infiltrates in the superficial dermis (a). HSV-2 antigen was detected in the epithelium (b).

るいは脊髄視床路を上行する側索（後外側）あるいは前索（前内側，前外側）に一致して分布しており，中心管の上皮細胞にも認められた（Fig. 5b）。一方，下部消化管粘膜下平滑筋層内神経叢への感染も認められたが（Fig. 6），膀胱神経叢や心，肺，肝，脾，膵，腎，副腎などの実質臓器あるいは消化管粘膜下パイエル氏板への感染は認められなかった（Fig. 6）。消化管粘膜下神経叢での HE 染色では，粘膜上皮から粘膜下層，筋層内にかけて著明な炎症性細胞浸潤が認められ（Fig. 7a），同部位の免疫染色では筋層間から内輪筋にかけてと粘膜下の神経叢に HSV 抗原が認められた（Fig.

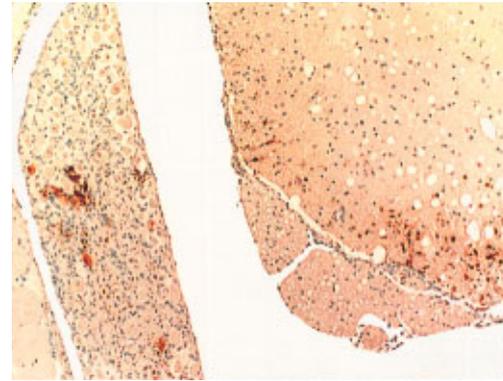


Fig. 4. Immunohistochemical demonstration of HSV-2 antigen 7 days after intravaginal inoculation.

HSV-2 antigen was detected in neurons of the dorsal root ganglia and in the ventrolateral white matter region of the thoracolumbar spinal cords.

7b)。後根から脊髄後角にかけての HE 染色では軽度の炎症性細胞浸潤と変性壊死を認め（Fig. 8a），免疫染色では同部位のニューロンやグリア細胞に一致して HSV 抗原が陽性となった（Fig. 8b）。また脳幹部でも同様に，橋部の最も腹側に炎症性細胞浸潤と軽度の変性壊死を認め（Fig. 9a），免疫染色でも同部位のニューロンやグリア細胞に一致して HSV 抗原が陽性となった（Fig. 9b）。

接種 14 日後および 45 日後の HE 染色および免疫染色では，ウイルス感染を疑わせるような所見はみられなかった。

E 群における接種 3 日後の HE 染色では，膣粘膜上皮細胞は過角化を伴って数層に厚くなり，ウイルス感染を疑わせるような巨細胞や空胞化細胞などの組織所見はみられず，免疫染色でも HSV 抗原は検出されなかった。

#### IV. 考 察

##### 1. 性ホルモン前投与の有効性

性器ヘルペスが妊婦に感染しやすいことはよく知られており<sup>22)–25)</sup>，Overall JC et al.<sup>26)</sup> や Baker DA et al.<sup>27)</sup> はマウスへの HSV-2 経膣接種実験において，妊娠マウスのほうが非妊娠マウスに比べてウイルス感受性が高いことを示した。また，Parr MB et al.<sup>21)</sup> は，様々な性周期の BALB/c マウスに HSV-2 を経膣接種した結果，性周期に

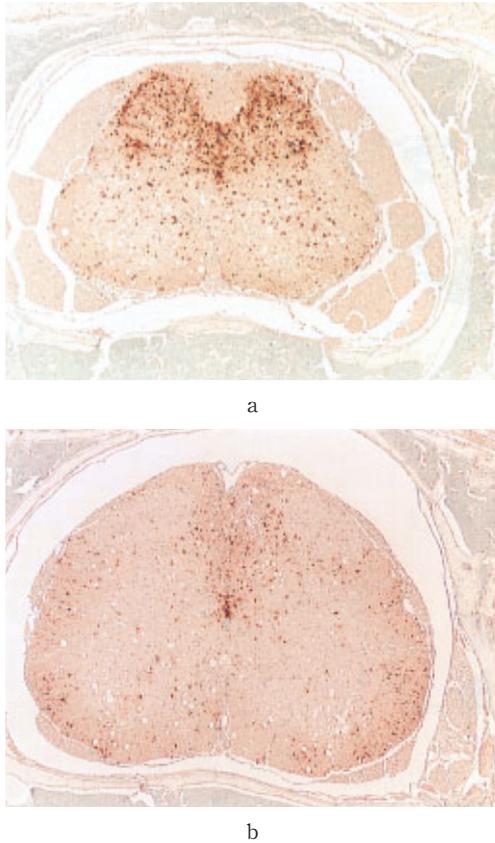


Fig. 5. Immunohistochemical demonstration of HSV-2 antigen 7 days after intravaginal inoculation.

A large amount of antigen was detected in the posterior, lateral and anterior column and in the central canal of the lumbosacral spinal cords (a). HSV-2 antigen was also detected in the ventrolateral, ventromedial and dorsolateral white matter region of the thoracolumbar spinal cords (b).

よってウイルス感受性が大きく変動することを明らかにし、妊娠マウスあるいはプロゲステロン前投与マウスのウイルス感受性が最も高いことを示した。この機序の詳細については不明であるが、プロゲステロン投与後の膣粘膜上皮のほうがエストロゲン投与後のそれよりも薄く、種々のタンパク透過性が高いことや<sup>28)</sup>、HSV の結合や侵入に必要な膣粘膜上皮細胞膜表面上の受容体がプロゲステロン優位なホルモン動態の時にのみ発現しているためとも考えられている<sup>29)30)</sup>。一方 Sanjuan NA et al. は、綿棒でマウスの外陰部を擦過した後、ウイルスを滴下する接種方法を用いた結果、

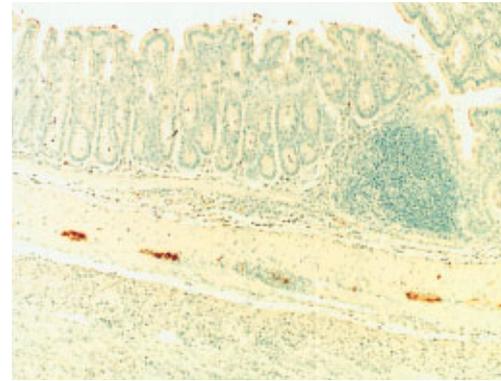


Fig. 6. Immunohistochemical demonstration of HSV-2 antigen 7 days after intravaginal inoculation. HSV-2 antigen was found in the myenteric plexa in the large bowel.

妊娠マウスと非妊娠マウスの HSV-2 経膣接種後の平均死亡率に有意差がみられなかったことより、ウイルス感染の成立にはプロゲステロン前投与に比べてウイルス接種時に生じる膣粘膜の微小外傷による影響のほうが重要であると報告した<sup>31)32)</sup>。今回われわれが行った経膣接種実験では、乱切群と E/DP 群におけるマウスの生存率に有意差は認められず、ウイルスが効率的に感染するためにはマウスへのプロゲステロン前投与や外陰部粘膜上皮への外傷はいずれも重要であることが示された。しかし、一般に乱切やウイルス接種時に生じる外傷の程度を常に一定に保つことは手技的に困難な場合が多く、同一株を接種した場合でも接種するたびごとに感染率が大きく変化してしまう可能性も否定できない。したがって、マウスへの HSV 経膣接種実験においてウイルスの感染効率を高くかつ一定に保つためには、プロゲステロン前投与法がより有用であると考えられた。

なお、E 群のマウスは接種したいずれの株に対しても感染が成立しなかったことより、エストロゲン優位なホルモン動態は HSV 感染に対して抵抗性に働くと考えられた。

## 2. HSV-2 の神経伝播経路

HSV の毒性に関しては接種した株ごとに差がみられたが、経時的な HSV の局在に関しては接種した株や接種前の処理法に関係なく、乱切群と E/DP 群では同様の結果が得られた。

HSV は接種翌日にはすでに膣粘膜上皮で増殖

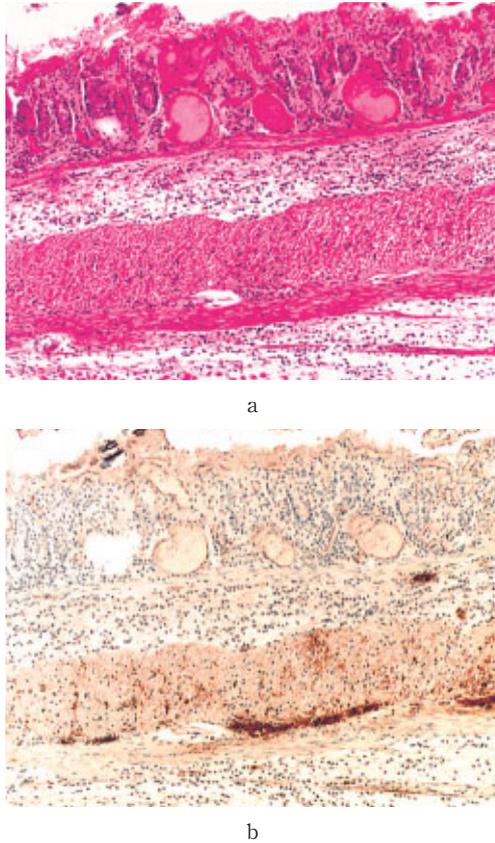


Fig. 7. Histopathological and immunohistochemical examinations of the lower bowel 7 days after intravaginal inoculation. Microscopic observation showed a massive lymphocytic infiltrate in the submucosa and around the myenteric plexa (a). A large quantity of antigen was found in the myenteric plexa (b).

し、徐々に周囲の上皮細胞に感染していくことが確認された。そして接種7日後頃より後根神経節に感染が確認されたことより、ウイルスが知覚神経末端より逆行性に軸索を上行して後根神経節に至ると推定された。さらに、ウイルスは後根から脊髄後索や後角へと進行し、同側あるいは反対側の脊髄小脳路あるいは脊髄視床路を上行して脳幹へ達すると考えられた。また、脊髄中心管の上皮細胞への感染も認められたことより、脳幹への感染は脊髄内の二次ニューロンや三次ニューロンを上行する経路以外に、上皮細胞から脳脊髄液を介して感染していく可能性も示唆された。

一方、脊髄内の前角や側角にも HSV 抗原が検

出されたことより、HSV は知覚神経系のみならず運動神経系や自律神経系ニューロンへも直接感染していくと考えられた。したがって後肢麻痺に関しては、脊髄前角の運動神経系ニューロンが侵されることによって発症したと考えられたが、齧歯類では脊髄後索の最も腹側の領域に運動神経系の遠心路である皮質脊髄路が存在することから<sup>20)33)</sup>、脊髄後索から後角への広範な HSV 感染に伴って、後索最腹側の運動神経系ニューロンへ感染が波及したことによって発症した可能性も考えられた。

さらに、自律神経系である下部消化管粘膜下平滑筋層内神経叢への感染も、接種7日後頃より認められた。Sanjuan NA et al.<sup>34)</sup> は、妊娠マウスへの HSV-2 経腔接種による流産への影響について免疫組織化学的に検討した結果、子宮筋層内神経叢およびその周囲の栄養血管へのウイルス感染が原因であると報告したが、ウイルスが経腔感染後にどのような経路で自律神経系へ侵入したかについての記載はなかった。ヒトにおいて左結腸曲から肛門までの下部消化管および子宮、膀胱を支配する副交感神経の伝導路はいずれも第2~4 仙髄から節前線維が起り、骨盤内臓神経として前根を出て、各々骨盤神経節および腸骨動脈神経叢、膀胱神経叢へ至り、それぞれの臓器に分布している。一般的には、これらの副交感神経系のいずれかの部位が障害されることによって、腸管運動は抑制され、子宮は収縮し、膀胱は尿閉となる。今回のわれわれの接種実験では HSV-2 の自律神経系への詳細な感染経路は特定できなかったが、接種4日後の時点では消化管粘膜下神経叢への感染は認められず接種7日後で初めて感染が確認されたこと、膀胱直腸障害などの神経症状もほぼ同時期頃から出現したことなどから、HSV の感染経路としては仙髄後角の二次ニューロンから側角の自律神経系ニューロンへ直接感染した後に前根から骨盤神経節に至り、消化管粘膜下神経叢に達したのではないかと推測した。一方、膀胱機能の低下に関しては、免疫染色にて膀胱神経叢に HSV 抗原の局在が認められなかったため、仙髄の自律神経系ニューロンへの感染によって発症するのか、膀胱神経叢への感染によって発症するのかは明らかとはならなかった。

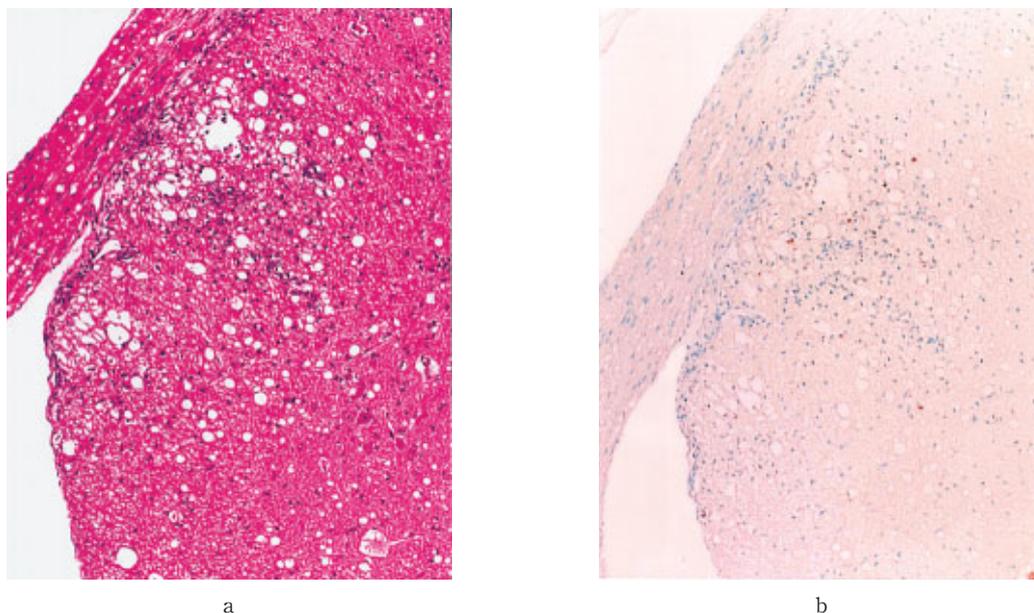


Fig. 8. Histopathological and immunohistochemical examinations of dorsal root and posterior column 10 days after intravaginal inoculation. Microscopic observation showed mild lymphocytic infiltrates and necrosis (a). HSV-2 antigen was detected in the dorsal root and posterior column (b).

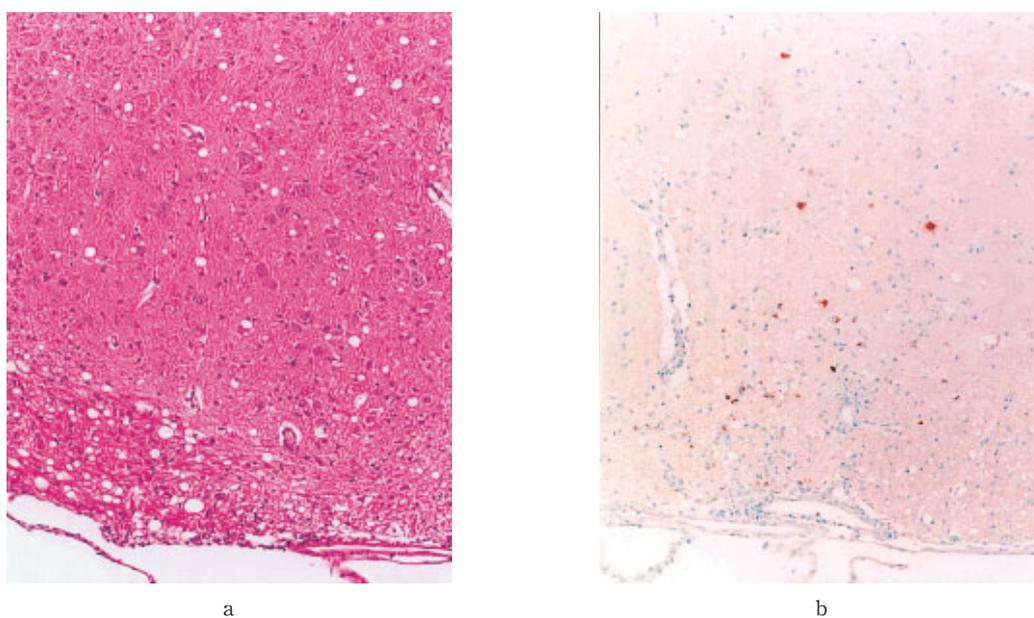


Fig. 9. Histopathological and immunohistochemical examinations of the pons 10 days after intravaginal inoculation. Microscopic observation showed mild lymphocytic infiltrates and necrosis (a). HSV-2 antigen was detected in the ventral pons (b).

なお、マウスの死因に関しては、脳炎のみならず仙髄の自律神経系ニューロンへの感染や消化管粘膜下神経叢へ至る副交感神経系への感染によって生じる高度な腸管運動の抑制や尿閉が原因となる可能性も示唆された。

### 3. HSV-2の毒性

HSVの毒性に関するこれまでの報告によると、同じHSV株を用いた接種実験でも、接種部位や宿主（接種動物）が変わることによってウイルスの毒性に大きな差がみられるなど、両者の関連については未だ不明な点が多い<sup>5)11)14)15)</sup>。Bergström T et al. は、ヘルペス脳炎患者および再発型口唇ヘルペス患者より分離したHSV-1株やヘルペス性髄膜炎患者および中枢神経症状を伴わない性器ヘルペス患者より分離したHSV-2株をoutbred Swiss albinoマウスの脳内や鼻腔へ接種する感染実験を行ったが、接種部位や接種した株によってウイルス毒性が多様に変化し、一定の傾向は得られなかった<sup>35)</sup>。今回のわれわれの接種実験では、乱切群およびE/DP群のいずれにおいてもJM-1株を接種したマウスの生存率が最も高かったことより、BALB/cマウスに対するウイルス毒性に関しては、今回用いた5株の中でElsberg症候群株が最も弱毒株と考えられた。したがって、ヒトとマウスのウイルス毒性は必ずしも一致せず、これまでの報告と同様に、感染宿主が変わることによってウイルスの毒性が変化することが明らかとなった。

一般に、脊髄後根神経節細胞は偽単極神経細胞であり、軸索はT字状に分岐し、1枝は末梢側の自由終末から神経節細胞体へ、他枝は神経節細胞体から後根、後索へと中枢神経系へ伸びている。そしてHSV-2は主に、性器の皮膚や粘膜に接触感染した後に知覚神経の自由終末から軸索を逆行性に進み脊髄後根神経節細胞に潜伏感染するが、ウイルスが後根神経節から中枢神経系への軸索流に乗って順行性に進むことは極めてまれである。近年、HSVの毒性を規定する重要な因子の一つにウイルスの神経向性の違いが関与している可能性が示唆され、ウイルスの毒性と神経向性との関連を検討した報告も散見されるようになった。Bergström T et al. は、BALB/cマウスにおいて異なったウイルス毒性を示すHSV-1標準株3株を

マウスの鼻粘膜に接種し、鼻粘膜および三叉神経節、脳幹でのウイルス量を経時的に測定した。その結果、強毒株では高率に神経節や脳幹での増殖がみられたのに対して、弱毒株では鼻腔のみで増殖がみられ、神経節や脳幹での増殖はほとんどみられなかったことより、神経節から中枢神経系に至る神経向性の違いがウイルス毒性を規定する因子の一つではないかと報告した<sup>35)</sup>。またZemanick MC et al. は、3種類のHSV-1標準株をcebus monkeyの脳皮質に接種する感染実験を行い、運動ニューロンの細胞体に感染した後に軸索を順行性に進んでいく特性を持った株(H129株)と運動ニューロンの神経接合部(シナプス)に感染した後に軸索を逆行性に進んでいく特性を持った株(MacIntyre B株)が存在することを明らかにし、株によって軸索内を進んでいく方向が異なることを示した<sup>36)</sup>。さらにLaVail JH et al. は、Zemanick MC et al. と同様の標準株を各々BALB/cマウスの角膜に接種して、三叉神経節や脳幹でのウイルス量を経時的に測定した。その結果、三叉神経節に到達するまでの時間はMacIntyre B株のほうがやや速かったものの、その後の脳幹に達するまでの時間はH129株のほうが速く、三叉神経節や脳幹での増殖ウイルス量もH129株のほうが著明に増加していたことより、H129株のほうが神経節から中枢神経系へ順行性に進んでいく神経向性が強く、強毒株であると報告した<sup>37)</sup>。

今回のわれわれの接種実験では、E/DP群における神経症状の発症から死亡までの期間が大きく2つに分かれた。神経症状の発症時期はJM-5株の1例を除き全例で差はみられなかったものの、弱毒株と考えられたJM-1株やJM-3株を接種したBALB/cマウスのほとんどは神経症状の発症から死亡までの期間が約1週間あったのに対して、JM-5株では神経症状の発症から3日以内に全て死亡した。このような臨床経過の差に関してはBALB/cマウスにおいて強毒株と考えられたJM-5株が他の株と比較して後根神経節から中枢神経系へ軸索内を順行性に進んでいく特性が強いためではないかと考えられた。

以上より、同一宿主におけるウイルス毒性は、神経細胞への細胞毒性や後根神経節から中枢神経系

へ軸索内を順行性に進んでいく特性をもった神経向性によって規定されている可能性が示唆された。

近年、HSV の遺伝子機能に関する研究が急速に進展しており、種々の遺伝子欠失変異株を実験動物に接種することで、欠失遺伝子の特性とウイルス毒性との関連が徐々に明らかになってきている<sup>38)39)</sup>。ウイルス毒性を規定する因子もおそらく、ある特定の遺伝子産物の発現あるいは欠失などが関与していると考えられ、今後、HSV の遺伝子機能とウイルス毒性との関連についての解明が期待される。

## V. 結 語

HSV-2 による脊髄炎の発症病理と感染ウイルスの神経伝播経路について明らかにする目的で、当科を受診した Elsberg 症候群患者、再発型性器ヘルペス患者および再発型腰仙骨部ヘルペス患者より分離培養した HSV-2 株を BALB/c マウスに経腔接種して、臨床経過および経時的なウイルスの局在について検討した。

ウイルス接種前の処理は、外陰部を乱切する方法 (乱切群) と、乱切せずにプロゲステロン (E/DP 群) やエストロゲン (E 群) などの性ホルモンを投与して性周期を調節する方法を用いた。乱切群と E/DP 群との間では、各株ごとのマウスの生存率に有意差を認めなかったことより、いずれの群でもマウスの HSV に対する感受性には差がないことが確認された。したがって、乱切法もプロゲステロン前投与法もマウスに対する HSV 経腔接種実験においては共に有用な方法と考えられたが、手技的な問題を考慮するとプロゲステロン前投与法のほうがより有用な方法と考えられた。

なお、E 群のマウスは接種したいずれの株にも感染しなかったことより、エストロゲン優位なホルモン動態は HSV 感染に対して抵抗性に働くことが確認された。

HSV-2 の神経伝播経路に関しては、乱切群、E/DP 群ともに接種した株に関係なく、感染ウイルスが腔粘膜上皮から後根神経節に至り、知覚性伝導路を上行していく経路が確認され、一部のマウスでは脳幹に達していた。後肢麻痺は脊髄後索または前角の運動性伝導路への感染によって発症し

たと考えられ、膀胱直腸障害の原因は仙髄のみならず仙髄前根から骨盤内臓神経を經由して下部消化管粘膜下平滑筋層内神経叢や膀胱神経叢に至る副交感神経系への感染によって発症したと考えられた。したがって、HSV は脊髄内において知覚神経系ニューロンから運動神経系や自律神経系ニューロンに直接感染することによって、後肢麻痺や膀胱直腸障害を起こすと考えられた。

HSV-2 の毒性は接種した株によって異なったが、乱切群および E/DP 群のいずれにおいても Elsberg 症候群株が最も弱毒であったことから、ヒトとマウスのウイルス毒性は必ずしも一致せず、感染宿主が変わることによってウイルスの毒性も変化すると考えられた。さらに、E/DP 群においてマウスの生存率が高かった弱毒株では強毒株と比較して神経症状の出現から死亡までの期間が長かったことより、ウイルスの毒性を規定する因子の一つに後根神経節から中枢神経系へ軸索内を順行性に上行していく速度の違いが関与している可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第 26 回日本研究皮膚科学会 (2001 年 9 月、愛媛) および第 101 回日本皮膚科学会総会 (2002 年 6 月、熊本) にて報告した。

本研究の一部は、平成 12、13 年度文部科学省科学研究費 # 12770462 および平成 14 年度日本皮膚科学会基礎医学研究費 (資生堂寄付) に拠った。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲いただいた新村真人教授に深謝いたします。また、各種検索にご協力いただいた富山医科薬科大学ウイルス学講座黒川昌彦助教、奥田智子氏、国立感染症研究所感染病理部佐藤由子氏ならびに慶應義塾大学医学部眼科学教室橋爪公平先生に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 岩崎慈子, 本田まりこ, 福地 修, 石地尚興, 新村真人. 尿閉を併発した単純ヘルペスウイルス 2 型初感染による性器ヘルペスの 1 例 (Elsberg 症候群). 臨皮 2001; 55: 357-60.
- 2) 川名 尚. STD としての  $\alpha$  ヘルペスウイルス感染症 女性. 日臨 2000; 58: 883-9.
- 3) Loperi P, Marcacci G, Gaglianone S. Elsberg syndrome: radiculomyelopathy and acute urinary retention in patient with genital herpes. Ital J Neurol Sci 1992; 13: 373-5.
- 4) 木戸道子, 川名 尚. 単純ヘルペス神経根炎

- (Elsberg 症候群). 日臨 別冊 領域別症候群シリーズ 感染症症候群 1999; 24: 52-4.
- 5) Kinjo T, Tshako K, Sirirungsi W, Sunagawa K, Nakazato I, Iwamasa T. Experimental myelitis caused by herpes simplex virus type 2 in C57BL/6N and BALB/cN mice. *Int J Exp Pathol* 1997; 78: 401-9.
  - 6) Nakajima H, Furutama D, Kimura F, Shinoda K, Ohsawa N, Nakagawa T, et al. Herpes simplex virus myelitis: clinical manifestations and diagnosis by the polymerase chain reaction method. *Eur Neurol* 1998; 39: 163-7.
  - 7) Nahmias AJ, Naib ZM, Highsmith AK, Josey WE. Experimental genital herpes simplex infection in the mouse. *Pediatr Res* 1967; 1: 209-10.
  - 8) Lopez C. Genetics of natural resistance to herpes virus infection in mice. *Nature* 1975; 258: 152-3.
  - 9) Caspary L, Schindling B, Dundarov S, Falke D. Infection of susceptible and resistant mouse strains with herpes simplex virus type 1 and 2. *Arch Virol* 1980; 65: 210-27.
  - 10) McKendall RR. Comparative neurovirulence and latency of HSV 1 and HSV 2 following footpad inoculation in mice. *J Med Virol* 1980; 5: 25-32.
  - 11) Dix RD, McKendall RR, Baringer JR. Comparative neurovirulence of herpes simplex virus type 1 strains after peripheral or intracerebral inoculation of BALB/c mice. *Infect Immun* 1983; 40: 103-12.
  - 12) Townsend JJ, Collins PK. Peripheral nervous system demyelination with herpes simplex virus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986; 45: 419-25.
  - 13) Chrisp CE, Sunstrum JC, Averill DR, Levine M, Glorioso C. Characterization of encephalitis in adult mice induced by intracerebral inoculation of herpes simplex virus type 1 (KOS) and comparison with mutants showing decreased virulence. *Lab Invest* 1989; 66: 822-30.
  - 14) Sunagawa K, Sirirungsi W, Nakazato I, Hirayasu T, Iwamasa T. Pathogenic studies and comparison of the virulence of herpes simplex virus type 2 from Okinawa, Japan and Chiang Mai, Thailand. *Int J Exp Pathol* 1995; 76: 255-62.
  - 15) Nakazato I, Kinjo T, Sirirungsi W, Tshako K, Miyagi J, Higa M, et al. Experimental myelitis in BALB/cN and C57BL/6N mice caused by herpes simplex virus type 1 compared with herpes simplex virus type 2. *Pathol Res Pract* 2000; 196: 635-45.
  - 16) Ugolini G, Kuypers HGJM, Simmons A. Retrograde transneuronal transfer of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) from motoneurons. *Brain Res* 1987; 422: 242-56.
  - 17) Ugolini G, Kuypers HGJM, Strick PL. Transneuronal transfer of herpes virus from peripheral nerves to cortex and brainstem. *Science* 1989; 243: 89-91.
  - 18) Krinke GJ, Dietrich FM. Transneuronal spread of intraperitoneally administered herpes simplex virus type 1 from the abdomen via the vagus nerve to the brains of mice. *J Comp Pathol* 1990; 103: 301-6.
  - 19) Ugolini G. Transneuronal transfer of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) from mixed limb nerves to the CNS. I. Sequence of transfer from sensory, motor, and sympathetic nerve fiber to the spinal cord. *J Comp Neurol* 1992; 326: 527-48.
  - 20) Engel JP, Madigan TC, Peterson GM. The transneuronal spread phenotype of herpes simplex virus type 1 infection of the mouse hind footpad. *J Virol* 1997; 71: 2425-35.
  - 21) Parr MB, Kepple L, McDermott MR, Drew MD, Bozzola JJ, Parr EL. A mouse model for studies of mucosal immunity to vaginal infection by herpes simplex virus type 2. *Lab Invest* 1994; 70: 369-80.
  - 22) Ng ABP, Reagan JW, Yen SSC. Herpes genitalis: clinical and cytopathologic experience with 256 patients. *Obstet Gynecol* 1970; 36: 645-51.
  - 23) Nahmias AJ, Josey WE, Naib WM, Freeman MG, Fernandez RJ, Wheeler J. Perinatal risk associated with maternal genital herpes simplex virus infection. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 110: 825-37.
  - 24) Poste G, Hawkins DF, Thomlinson J. Herpesvirus hominis infection of the female genital tract. *Obstet Gynecol* 1972; 40: 871-90.
  - 25) Hanshaw JB. Herpesvirus hominis infections in the fetus and the newborn. *Am J Dis Child* 1973; 126: 546-55.
  - 26) Overall JC, Kern ER, Schlitzer RL, Friedman SB, Glasgow LA. Genital herpes virus hominis infection in mice. I. Development of

- an experimental model. *Infect Immun* 1975; 11: 476-80.
- 27) Baker DA, Plotkin SA. Enhancement of vaginal infection in mice by herpes simplex virus type II with progesterone. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978; 158: 131-4.
- 28) Parr MB, Parr EL. Antigen recognition in the female reproductive tract: I. Uptake of intraluminal protein tracers in the mouse vagina. *J Reprod Immunol* 1990; 17: 101-14.
- 29) Wudunn D, Spear PG. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* 1989; 63: 52-8.
- 30) Shieh MT, Wudunn D, Montgomery RI, Esko JD, Spear PG. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* 1992; 116: 1273-81.
- 31) Sanjuan NA, Lascano EF. Autonomic nervous system involvement in experimental genital infection by herpes simplex virus type 2. *Arch Virol* 1986; 91: 329-39.
- 32) Sanjuan NA. Progression of intravaginal infection by herpes simplex-2 in genetically athymic mice. *Medicina (B. Aires)* 1998; 58: 492-6.
- 33) Brown LT. Projections and termination of the corticospinal tract in rodents. *Exp Brain Res* 1971; 13: 432-50.
- 34) Sanjuan NA, Zimmerlin MN. Pathogenesis of herpes simplex virus type 2 experimental genital infection in pregnant mice. *Immunol Med Microbiol* 2001; 30: 197-202.
- 35) Bergström T, Alestig K, Svennerholm B, Horal P, Skoeldenberg B, Vahlne, A. Neurovirulence of herpes simplex virus type 1 and 2 isolates in diseases of the central nervous system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 751-7.
- 36) Zemanick MC, Strick PL, Dix RD. Direction of transneuronal transport of herpes simplex virus 1 in the primate motor system is strain-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8048-51.
- 37) LaVail JH, Topp KS, Giblin PA, Garner JA. Factors that contribute to the transneuronal spread of herpes simplex virus. *J Neurosci Res* 1997; 49: 485-96.
- 38) Chou J. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to  $\gamma_1$  34.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 1990; 250: 1262-6.
- 39) Leib DA, Harrison TE, Laslo KM, Machalek MA, Moorman NJ, Virgin HW. Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex viruses in vivo. *J Exp Med* 1999; 189: 663-72.