研 究

実験的内耳ウイルス感染症 (HVJ について)

——蛍光抗体法, ABR による検討——

貴田 秀樹・小宮 精一・竹中 洋

橘 正芳・水越 治

Immunofluorescent Staining and Auditory Brainstem
Response in Experimental Virus (HVJ) LabyrinthitisHideki Kida, Seiichi Komiya, Hiroshi Takenaka,
Masayoshi Tachibana and Osamu Mizukoshi

(Kyoto Prefectural University of Medicine)

Suckling and adult C3H mice were intracerebrally inoculated with the hemagglutinating virus of Japan (HVJ) which is known to cause experimental labyrinthitis. Inoculating doses were from 1/3 to 3 LD₅₀. Infection of the inner ear of the inoculated suckling mice was confirmed by immunofluorescent staining. The hearing of the mice was examined by means of auditory brainstem response one or two months after the inoculation. In comparing the virus-inoculated mice with the saline-injected mice, no hearing impairment was detected in any of the virus-inoculated animals.

はじめに

ある種のウイルス感染が内耳障害を引き起こすことは, Mumps virus をはじめとして良く知られている。また突発性難聴の原因としてもウイルス感染症は注目をあびている。一方, インターフェロンや免疫グロブリン等ウイルス感染に対して少くともある程度は有効な治療法が確立されつつある。従ってウイルス感染による内耳障害の機序を解明しておくことは, 臨床耳科学的にも急務である。本研究の主たる目的はウイルスによる内耳感染のモデルを作製すること, この感染によって聴覚障害が惹起されるか否かを検討することにある。

実験方法

1) 濃縮ウイルスの調整; 感染ウイルスとしては Hemagglutinating Virus of Japan (以下HVJと異す) を選んだ。このウイルスは東

北大学の石田等によって発見され, センダイウイルスとも呼ばれるパラミキソウイルスの一種である。このウイルスを選んだのはマウスに上

気道自然感染をおこすことが知られており¹⁾, 比較的自然的感染症モデルを作製できると思われること, このウイルスのレセプターであるシアール酸が内耳に比較的高濃度に存在することが知られていること²⁾, ヒトには重篤な感染症をひきおこすことがなく比較的扱い慣れたウイルスであること等による。

各 1 HA の HVJ (0.1 ml) を, 孵化後 9 日目の受精卵 (計 50 個) の漿尿腔に接種し, 37°C で 72 時間孵化器内に置いた。4°C にて 24 時間静置後漿尿液 (約 400 ml) を得, 3,000 rpm にて 20 分間遠沈し, 細胞残渣を沈澱せしめた。上清を採取しさらに 17,000 rpm にて 1 時間遠沈し, 沈澱をとった。0.5% ニワトリ赤血球を用いた赤血球凝集反応 (HA) 法で力価を測定したところ 50 万 HA の HVJ を得た。

2) 脳内接種力価の決定

HVJ の内耳感染を惹起せしめ得るに足る脳内接種量を知るため, 先ず脳内接種の場合の 50% 致死量 (以下 LD₅₀ と略す) を求めた。脳内接種の方法は次項に記す。HVJ 非感染成熟 C3H マウスを, 7 匹ずつの 4 群に分け, それぞれの群に 10⁴HA, 10³HA, 10²HA の HVJ および対照として生食を投与した。投与容量はいずれの場合も 20 μ l となる様に調整した。その結果, 累積死亡率は, 10⁴HA, 10³HA, 10²HA, 生食でそれぞれ 87.5%, 12.5%, 0%, 0% であり, Reed-Muench 法³⁾ により LD₅₀ は 10^{3.5} HA (=3162.7 HA) であった (簡単のため以下 LD₅₀=3000 HA とした)。

3) 内耳ウイルス感染症動物の作製

(i) Suckling マウスの場合; 蛍光抗体法でウイルスの感染を確かめるにはクライオスタット切片を作製する必要がある, また非脱灰標本を得ることが望ましい。従って側頭骨骨化の余り進んでいない Suckling マウスを使用することとした。接種量は Suckling であることを考慮し, 成熟マウスでの LD₅₀ の 1/3 とした。すなわち生後 3~5 日目の C3H マウスの頭部で両耳間の中央よりやや外側を注射点に選り, 改良し

たツベルクリン注射器および針 (No.27) を用い, 1000HA (=1/3 LD₅₀, 20 μ l) を経皮, 経頭蓋骨的に大脳髄質内に接種した。対照には等量 (20 μ l) の生食を注入した。接種後 1 ケ月, 2 ケ月の時点で聴性脳幹反応検査を施行した。

(ii) 成熟マウスの場合; Suckling マウスの場合には比較的少量の HVJ しか接種できないこと, 成熟動物とは感染様式が異なる可能性があることを考慮して成熟マウスについても検討した。すなわち成熟 C3H マウスに, Suckling マウスの場合と同様な方法で, 3 LD₅₀, 1 LD₅₀, 1/3 LD₅₀ の HVJ, および対照として等量 (20 μ l) の生食を脳内接種した。1 ケ月後聴性脳幹反応検査を施行した。

4) 蛍光抗体法によるウイルス感染の証明

Suckling マウスについて, 蛍光抗体直接法にて HVJ ウイルスの内耳感染について検討した。すなわち HVJ ウイルス脳内接種後 72 時間の時点で断頭, 側頭骨を摘出し, 非脱灰のまま -80°C で 30 分間凍結した。次いでクライオスタット (-20°C) にて 20 μ m の midmodiolar section を作製した。切片をドライヤーを用いスライドガラス上に風乾貼付した後, 室温下で純アセトン中に浸潤し 5 分間固定, さらに M₁₀ リン酸緩衝液 (pH 7.2) (以下リン酸緩衝液と略す) 中に室温下 30 分間浸潤洗滌した後, 切片上にウサギ血清由来の FITC 標識抗 HVJ 抗体 (東芝化学工業) を重ね, 37°C にて 30 分間反応させた。反応後標本をリン酸緩衝液にて十分に洗浄, 同液中にて overnight し free の抗体を除去した後, グリセロール・リン酸緩衝液 (9:1) に封入しカバーガラスを置いた。対照にはウイルスを接種しないマウスの側頭骨・蝸牛切片を用い, 同様の処理・操作を施した。標本は透過型顕微鏡を用い, 励起フィルター Y 455, 二次フィルター B にて検鏡した。

5) 聴性脳幹反応による聴力検査; マウスの聴力の判定には, 非破壊的で経時的に繰返し施行でき, しかも客観性, 再現性に富み, 比較的

図1 マウス聴性脳幹反応測定のプロックダイアグラム

容易に施行可能な聴性脳幹反応によることとした。ネブタール (35~50mg/kg 体重, 腹腔内投与) 麻酔下のマウスを自作の固定器に固定し, 聴性脳幹反応を記録した。測定装置のプロックダイアグラムを図1に示す。音刺激はDA502よりの4kHz tone pip (立上り, 立下り0.5 msec, 刺激間隔75 msec) をマウス耳側方10cmにおいたTDH-49より open method

で与えた。記録電極は脳波用針電極を用い, 頭頂部皮下と検耳耳介後部皮下に関電極をおき非検耳耳介後部皮下に接地電極をおいた。電極はDA55プリアンプに接続 (利得106dB, フィルター300~3,000Hz) 増幅した後シグナルプロセッサー7S06Aで加算した。加算回数は400回, 解析時間は10msecとし, 加算波形はX-Yレコーダーに記録した。

実験結果

1) 内耳におけるウイルス感染の証明

$\frac{1}{3}$ LD₅₀ のHVJを脳内接種した Suckling マウスを72時間後に断頭し, 蛍光抗体法を用い組織学的に検索したところ, 蝸牛軸, 蝸牛管側壁, コルチ器, ライスネル膜等に特異抗体を認めた (図2)。すなわち明らかに内耳にHVJウイルスが到達し感染を惹起していることが証明された。

2) 聴性脳幹反応による聴力検査の結果

(i) 対照群 (C3H, 成熟マウス) : 代表例の波形は図3に示す如く4つの大きな陽性ピークがみられた。これらを潜時の短かいものから順に P₁, P₂, P₃, P₄ とすると, P₁ が最も大きな振幅をしめし, 時に二峰性となることがあ

る。P₂, P₃ は P₁ に比べやや小さく, 2波間の分離は音圧が下るにつれ不明瞭となり, 二峰性の単一波となることもある。P₄ は P₁ に次いで大きな振幅で音圧を下げて安定して出現する。P₄ に続いて P₅ が出現することもあるが, 音圧差・個体差が大きく再現性に乏しかった。105dB SPL における平均潜時は P₁: 1.4msec, P₂: 2.0msec, P₃: 2.8msec, P₄: 3.7msec であった。振幅は電極の状態などにより個体差が大きく, 聴力判定の指標としては, 最も安定な P₄ 出現の有無をえらんだ。それによるこの群の域値は55~60dB であった (図3)。

(ii) Suckling マウス接種群: Suckling マウスにHVJ, $\frac{1}{3}$ LD₅₀ または生食を脳内接種

図2 HVJの蛍光抗体法による証明
 $\frac{1}{3}$ LD₅₀ のHVJ脳内接種72時間後の蝸牛組織。蝸牛軸(M), コルチ器(OC), ライスネル膜(RM), ラセン靱帯(SL)等にウイルスの存在による特異蛍光が認められる。

後, 1カ月, 2カ月後の段階で検査を施行した。実験毎に対照(生食群)をとるようにした。1カ月後の結果を図4に, 2カ月の結果を図5に示す。反応, 波形共にHVJ接種群と対照群の間に有意差はなく, 1カ月後, 2カ月後の間にも変化はみられず, 脳内接種をしなかったcontrol群との間にも差異をみとめなかった。これらのことより, HVJ接種によっても聴力障害は惹起されていないものと考えた。

■成熟マウス接種群; $\frac{1}{3}$ LD₅₀, 1 LD₅₀, 3 LD₅₀ のHVJを接種, 1カ月後に検査を施行したが, いずれの場合もSucklingマウスの場

考

ある種の感音難聴, 例えば流行性耳下腺炎罹患に際しておこる感音難聴は明らかにウイルスの内耳感染によって惹起されるものである。また原因の未だ判然としない突発性難聴の原因としても繰り返し擬せられてきている。三宅ら⁴⁾は突発性難聴患者の血清補体結合抗体価による検討からInfluenza A, Mumps, Measles,

Normal adult mouse ABR

図3 正常成熟マウスの聴性脳幹反応
 聴力判定の指標にはP₄の出現の有無を用いた。

合と同様に対照群との間に何らの相違もみいだせなかった(図6: 3 LD₅₀ 接種)。すなわち3 LD₅₀ という高単位のウイルスを接種してすら, 聴力障害は惹起できなかった。

察

Herpes zoster ウイルスが原因として関与している可能性があるとしている。従ってウイルスによる内耳感染症の動物モデルの作製も多くの研究者の興味を集めてきた。Davis ら⁵⁾⁶⁾ はすでにCytomegalovirus, Influenza A virus, Mumpus virus, Measles virus, Herpes simplex virus, Rubeola virus, Vaccinia

図4 Suckling マウス; HVJ $\frac{1}{3}$ LD₅₀ 又は生食 (対照群) 脳内接種
1ヶ月後の聴性脳幹反応
両群間に反応域値の差を認めない。

図5 Suckling マウス; HVJ $\frac{1}{3}$ LD₅₀ 又は生食 (対照群) 脳内接種
2ヶ月後の聴性脳幹反応
両群間に反応域値の差を認めない。

図 6 成熟マウス；HVJ 3 LD₅₀ 又は生食（対照群）脳内接種 1 ヶ月後の聴性脳幹反応
両群間に反応域値の差を認めない。

virus の内耳感染症成立に成功している。Shimokata ら⁷⁾ は HVJ の脳内接種による内耳感染症を報告している。しかし残念なことには、これらの動物の聴力の判定が施行されておらず果して聴力障害が惹起されているか否かは明らかではない。これはおそらく蛍光抗体法の顕微鏡観察のために凍結切片を得る必要がある関係上、マウス、ハムスター等の小動物を使わざるを得ず、再現性のある適確な聴力の判定法がなかった為であろうと思われる。

一方近年、聴性脳幹反応の開発、実際応用がすすみ、小動物においても比較的簡便に、再現性に富んだ、客観的な聴力検査が施行できるようになった。そこで私達はマウスに HVJ 内耳感染を惹起せしめ、聴性脳幹反応にて聴力を検査した。結果は残念ながら何等の聴力障害を思わせしめる証拠は得られなかった。HVJ はヒトにおいて内耳障害をもたらす得る Mumps virus と同じ paramyxovirus に属す点、神経系

に接統感染をおこさしめ得る点などから蝸牛機能障害を惹起し得ると考え Shimokata ら⁷⁾ に準じ、私達も脳内接種にて内耳感染を惹起せしめた。しかし予想に反し聴力障害はおこらなかった。その最大の理由はウイルスの virulence の問題であると思われる。

田中等⁸⁾ は外リンパ腔に HVJ ウイルスを直接接種した後、蝸牛を電顕で観察した結果、内リンパ腔面の細胞 (Claudius cell, innersulcus cell, Hensen cell, border cell) 等にウイルス感染 (budding) を認め、時に外毛細胞にも感染を認めている。また髄腔内に接種した場合は、コルチ器内無髄神経線維、外毛細胞に感染を認めている。しかしいずれの場合も聴力障害を惹起せしめうる程の細胞・組織障害を認めていない。従って HVJ ウイルスは内耳に親和性は有するものの、少なくとも短期間では余り組織障害性を発揮しないものと思われる。

臨床的に知られるウイルス性内耳障害の代表

的なものの一つは Mumps virus によるものである。Davis ら⁶⁾ はすでに Mumps virus を新生仔ハムスターの脳内あるいは蝸牛内に接種し、ライスネル膜、血管条、コルチ器支持細胞

に感染を認めている。ウイルス感染による内耳障害動物モデルには Mumps virus 等、内耳に対し virulence の高いウイルスを選ぶ必要があらう。

結 論

実験的内耳ウイルス感染症が聴力障害を惹起せしめ得るか否かを知るために、Hemagglutinating Virus of Japan (H V J) をマウスに脳内接種し内耳感染症を惹起せしめた。聴性脳幹反応にて聴力検査を施行したが、最高 3 LD₅₀ 接種したマウスについても聴力障害を認めることはできなかった。これは H V J の内耳組織に対する virulence が低いためと考えた。

本研究の一部は文部省科学研究費 No.348312 によった。

参 考 文 献

- 1) Parker, J. C., Tennant R. W., Ward, T. G. and Rowe, W. P.: Enzootic Sendai virus infection in mouse breeder colonies within the United States. Science 146: 936~938, 1964.
- 2) 上出一郎, 中村昭郎, 齊藤等: 内耳のシアル酸に関する実験的研究. 内耳生化 10: 28~30, 1979.
- 3) Reed, L. J. and Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493, 1938.
- 4) 三宅弘: 「突発難聴の臨床」日本耳鼻咽喉科学会第76回総会, 宿題報告モノグラフ.
- 5) Davis, L. E., Shurin, S. and Johnson, R. T.: Experimental viral labyrinthitis. Nature 254: 329~331, 1975.
- 6) Davis, L. E. and Johnson, R. T.: Experimental viral in newborn hamster labyrinth. Lab. Invest. 34: 349~356, 1976.
- 7) Shimokata, K., Nishiyama, Y., Ito, Y., Kimura, Y. and Nagata, I.: Affinity of Sendai virus for the inner ear of mice. Infection and immunity 16: 706~708, 1977.
- 8) 田中克彦, 寺山吉彦, 平井敏文, 酒井昇, 松宮英視: ウイルス性内耳炎の実験的研究. 内耳生化学 10: 33~35, 1979.
- 9) 田中克彦, 平井敏文, 寺山吉彦, 松宮英視: ウイルス性内耳炎の実験的研究 (第2報) 一経髄液感染について一. 内耳生化学 11, 62~65, 1980.

原稿到着: 昭和57年8月10日

別刷請求先: 橘 正芳

〒602 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465
京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室