

桐沢型ぶどう膜炎患者の帯状疱疹ウイルス thymidine kinase と 各種サイトカインの眼内発現の検討

佐藤 雅美, 阿部 俊明, 玉井 信

東北大学大学院医学系研究科感覚器病態学講座眼科学分野

要 約

目的: 桐沢型ぶどう膜炎(ARN)は, 帯状疱疹ウイルス(VZV)などの感染によって発症することが知られている。今回は, これらのウイルスが実際に眼内で活動性を持つかどうかを検討し, また, 免疫反応に関与するといわれている各種サイトカインの発現についても検討を行った。

対象と方法: ARN症例8例9眼につきreverse transcriptase-polymerase chain reaction法を用いて眼内液のVZV thymidine kinaseとサイトカインの発現を検討した。

結果: 8眼に thymidine kinase 発現が確認され, 発現がなかった残る1眼は軽症例であった。また, インターフェロン(IFN) γ , 形質転換増殖因子- β 1, インター

ロイキン(IL)-1 β , IL-6, 腫瘍壊死因子(TNF) α といったサイトカインの発現が確認された。このうち, IFN γ はARNで他のぶどう膜炎や非感染性疾患である増殖性硝子体網膜症より有意に多く発現していた。また, 複数回の検査が行えた症例ではIFN γ とTNF α の発現が経過とともに減少していた。

結論: このことから, これらのサイトカインがARNに対する生体の免疫反応に重要な役割を果たしていると推測された。(日眼会誌 104: 354-362, 2000)

キーワード: 桐沢型ぶどう膜炎, 帯状疱疹ウイルス, サイトカイン, サイミシンカイネース

Expression of the Varicella Zoster Virus Thymidine Kinase and Cytokines in Patients with Acute Retinal Necrosis Syndrome

Masami Sato, Toshiaki Abe and Makoto Tamai

Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

Abstract

Purpose: Acute retinal necrosis (ARN) is caused by varicella zoster virus (VZV) infection. In this study, we investigated the activity of this virus and expressions of some cytokines.

Patients and Methods: The expression of VZV thymidine kinase and some cytokines were investigated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 9 eyes of 8 patients with ARN.

Results: Thymidine kinase expression was observed in all samples except one. Several cytokines, such as interferon (IFN) γ , tumor necrosis factor (TNF) α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, and transforming growth factor (TGF) β 1 were observed in the sam-

ples. Among these cytokines, a statistically significant expression of IFN γ was observed in the samples of ARN, when compared to those of proliferative vitreoretinopathy (PVR) or other uveitis. The expression of IFN γ also decreased during successive follow-ups.

Conclusion: These cytokines may play an important role in the immune response in ARN. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 354-362, 2000)

Key words: Acute retinal necrosis syndrome, Varicella zoster virus, Cytokines, Thymidine kinase

I 緒 言

桐沢型ぶどう膜炎 (acute retinal necrosis, ARN) は,

1971年浦山ら¹⁾によって初めて発表され, その後の様々な研究によりこの疾患の発症にヘルペス属ウイルスが重要な役割を成すことが知られてきた²⁾. このことから, 抗

別刷請求先: 980-8574 仙台市青葉区星陵1-1 東北大学医学部眼科学教室 佐藤 雅美

(平成11年9月13日受付, 平成11年11月30日改訂受理)

Reprint requests to: Masami Sato, M.D. Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan.

(Received September 13, 1999 and accepted in revised form November 30, 1999)

ウイルス剤であるアシクロビル(aciclovir, ACV)が治療に使用されるようになり,視力予後の良好な症例も報告³⁾されてきている.しかし,現在でも経過の不良な症例が存在することや,後天性免疫不全症候群(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)患者にみられる急性進行

性網膜外層壊死(rapidly progressive outer retinal necrosis, PORN)など,その病態に様々な形態があることがわかってきた.これまで,我々はARNにかかわる帯状疱疹ウイルス(varicella zoster virus, VZV)のウイルス量を推測し,臨床像との比較を行うとともに,それぞれの症例

表 1 対象症例

桐沢型ぶどう膜炎症例						
	年齢	性別	患眼	視力 (初診時/最終)	治療	合併症
1	30	女	右	0.06/LS	ACV, PSL, VIT	視神経萎縮
2	13	男	左	NLP/NLP	ACV, PSL, VIT	
3	69	女	右 左	0.1/0.6 0.1/0.1	ACV, PSL, VIT ACV, PSL, VIT	
4	53	女	右	0.7/1.5	ACV, PSL	脳梗塞
5	24	男	左	0.4/2.0	ACV, PSL, VIT	
6	70	男	右	0.4/0.3	ACV, PSL, VIT	
7	84	男	右	0.3/LS	ACV, PSL, VIT	
8	36	女	左	0.3/1.2	ACV, PSL, VIT	

ぶどう膜炎症例						
	年齢	性別	患眼	視力 (初診時/最終)	病名	
1	38	男	左	0.5/0.5	ベーチェット病疑い	
2	20	男	右	1.5/1.5	樹氷状血管炎	
3	48	女	左	0.06/1.0	APMPPE	
4	64	女	右 左	0.3/NLP 0.7/LS	悪性リンパ腫	
5	56	女	右	0.15/0.4	原因不明	
6	65	男	左	0.3/0.15	原因不明	
7	39	男	左	1.0/1.0	原因不明	
8	14	女	右	0.5/0.9	原因不明	
9	72	女	右	0.06/0.04	原田病疑い	
10	59	男	右	0.06/0.3	原因不明	

増殖性硝子体網膜症症例						
	年齢	性別	患眼	視力 (初診時/最終)	grade *	
1	27	男	右	0.1/0.07	C2	
2	49	男	左	0.5/0.1	C2	
3	46	女	左	0.08/0.3	C3	
4	21	男	左	0.05/0.08	C3	
5	82	男	左	HM/0.01	C3	
6	49	男	左	0.5/0.1	B	
7	10	男	右	HM/1.0	B	
8	73	女	左	HM/0.01	C2	
9	71	男	左	HM/0.06	D2	
10	61	女	左	0.02/0.03	C2	
11	70	女	左	0.3/0.4	C3	
12	64	女	左	HM/0.01	C3	
13	35	男	左	LS/LS	D1	
14	61	女	左	0.02/0.03	C3	
15	56	男	左	0.09/0.8	C2	
16	72	女	右	HM/LS	D1	
17	62	女	右	1.0/0.4	C2	
18	52	男	右	0.01/CF	C3	

LS : Light sense, NLP : no light perception, ACV : アシクロビル, PSL : プレドニゾン, VIT : ビトレクトミー, APMPPE : acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy, * : Retina Society classification による分類

で ACV に対する反応に違いが存在する可能性も報告⁴⁾してきた。今回は、これらのウイルスが実際に眼内で活動性を持つかどうかを検討し、また、免疫反応に関与するといわれている各種サイトカインの発現についても検討を行った。

II 実験方法

1. 対象

対象は、1990～1998年5月にかけて東北大学医学部附属病院眼科を受診し、臨床症状ならびに polymerase chain reaction (PCR)⁵⁾で眼内に VZV deoxyribonucleic acid (DNA)が確認され、ARNと診断された8例9眼(男性4例4眼、女性4例5眼)について検討した。年齢は13～84歳(平均43.0歳)である。この中で、症例2は9歳時に左蝶形骨の線維性骨異形性で手術を受けており、腫瘍の圧迫による視神経萎縮のため、発症前から視力は矯正0.1程度と不良であり、症例6は脳梗塞の既往があったが、AIDSなど特別に免疫抑制状態にある症例はなかった。

ARNの比較対照として、PCRでVZV, herpes simplex virus (HSV), cytomegalo virus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV)といったヘルペス属ウイルスが検出されなかったぶどう膜炎10例11眼(男性5例5眼、女性5例6眼)と増殖性硝子体網膜症(proliferative vitreoretinopathy, PVR)18眼(男性10例、女性8例)を用いた。ARN以外のぶどう膜炎は年齢が4～72歳(平均47.5歳)で、原因は明らかでないものが半数を占めたが、その他はベテット病疑いの症例など様々であった。PVRの症例は年齢10～82歳(平均53.4歳)であった(表1)。

2. 眼内組織の採取

ARN症例では初診時に角膜輪部から27Gまたは30G針を用いて前房水を採取、症例1,5ではさらに経過中にも採取を行った。また、症例1,3,5で硝子体手術時に眼内灌流液で希釈をせずに採取した硝子体を含め、計15サンプルについて検討を行った。その他のぶどう膜炎の症例も同様に前房水を採取、診断目的で硝子体手術を行った症例4については、同様にして採取した硝子体もサンプルとした。PVRは硝子体手術時に得られた増殖膜をサンプルとした。

3. Messenger ribonucleic acid (mRNA)の抽出と complementary DNA (cDNA)合成

前述したサンプルのうち、前房水は50 μ l、硝子体は100 μ l、そして、PVRの増殖膜から oligo dT cellulose (Pharmacia Biotech Inc, Uppsala, スウェーデン)を用いて mRNA を抽出した。まず、細胞を extraction buffer (4 M guanidinium thiocyanate and 0.5% N-lauroyl sarcosine)中に懸濁した。そして、細胞懸濁液を遠心分離して上清を oligo dT cellulose に混合した。その oligo dT cellulose を high salt buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl)で数回、その後 low salt buffer (10

mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl)で数回洗浄し、mRNA を加温した elution buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA)で溶出した (Chirgwin et al, 1979)。First-strand cDNA は、それぞれの反応に対して 0.2 mg の random hexadeoxynucleotides で生成した。これは、Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase で合成した (Pharmacia Biotech Inc)。

4. Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)

RT-PCR はサーマルサイクラー (Perkin Elmer, Norwalk, CT, 米国)を用いて、50 μ l の反応系で行った。内訳はプライマーが 20 μ M, 200 μ M の dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 50 mM の KCl, 10 mM の Tris-Cl (pH 8.3), 1.5 mM の MgCl₂ と 0.001% gelatin, そして 2.5 単位の Taq ポリメラーゼとした。反応サイクルは 28～35 回とした。PCR の設定温度は熱変性に 94 $^{\circ}$ C で 1 分間、アニーリングに 60～65 $^{\circ}$ C で 2 分間、そして伸長反応に 72 $^{\circ}$ C で 2 分間を用いた。どの場合も得られた DNA は、0.05 mg/ml 臭化エチジウムを含む 1.5% アガロースゲル (SeaKem, FMC BioProducts, Rockland, ME, 米国)で泳動、解析をし、UV トランスイルミネーターを用いて観察を行った。

発現の検討は VZV thymidine kinase および interleukin (IL)-1 α , -1 β , -2, -4, -6, -8, interferon (IFN) γ , 形質転換増殖因子 (transforming growth factor, TGF) β 1, β 2, 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) α , 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) の 11 種類のサイトカインについて行った。VZV thymidine kinase およびそれぞれのサイトカインを増幅するプライマーは表 2 に示した。

また、得られた PCR 産物はシーケンスで塩基配列を確認した。

5. 半定量的 PCR

半定量的 PCR は、Moore ら⁶⁾の方法を一部変更して行った。反応サイクル数を 28, 30, 33, 35, 40 サイクルと変えて PCR を行い、PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで泳動し、以後の解析のために写真を撮影した。その写真をコンピュータ上で NIH イメージを用いて数値化し、PCR 産物が指数関数的に増加する範囲でそれぞれの定量評価を行った。また、同時に測定した β -actin の結果を対象とし、目的とする PCR 産物との比で統計的解析を行った。

6. 統計分析

この検討は、Bartlett test, Kruskal-Wallis 検定, Scheffé' F を用いて行った。P 値は 0.05 以下を有意差ありとした。

III 結果

ARN 症例において VZV thymidine kinase の発現を検討したところ、1 例を除いてすべてのサンプルで発現が確認された(図 1)。さらに、mRNA 発現の定量的評価のため半定量的 PCR を行った。各種サイトカインと β -

表 2 RT-PCR に用いたプライマー

β actin	①5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'
313bp	②5'-CGGTGAGGATCTTCATGAGG-3'
VZV thymidine kinase	①5'-CCTAAGACGCGTTTGTCTAC-3'
325bp	②5'-CTGTTCTCCGCATGCAAITA-3'
nested	①5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'
261bp	②5'-TGCCTATTATTTTGGACGGG-3'
IL-1 α	①5'-GTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATC-3'
422bp	②5'-CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC-3'
IL-1 β	①5'-AAACAGATGAAGTGTCTCTCCAGG-3'
391bp	②5'-TGGAGAACACCACTTGTGTCTCCA-3'
IL-2	①5'-AAACTCACCAGGATGCTCAC-3'
238bp	②5'-ATGTTGCTGTCTCATCAAGC-3'
IL-4	①5'-ACGGACACAAGTGGGATATCAC-3'
371bp	②5'-CTCTCTCATGATCGTCTTTAGCC-3'
IL-6	①5'-CCACACAGACAGCCACTCAC-3'
516bp	②5'-CTACATTTGCCGAAGGCCCT-3'
IL-8	①5'-CTGTGTGTAACATGACTTCCAAGCTGG-3'
244bp	②5'-TCCAGACAGAGCTCTCTCCATCAG-3'
IFN γ	①5'-GGTTCTCTGGCTGTACTGCCAGG-3'
375bp	②5'-AGCTGCTGGCGACAGTTCAGCCATC-3'
TGF β 1	①5'-CTGCAAGTGGACATCAACGGGTTCACTA-3'
472bp	②5'-ACTTGCAGGAGCGCACGATCATGTTGGACA-3'
TGF β 2	①5'-GCCACITTTTACAGACCCTACTTCAGAAT-3'
454bp	②5'-AGTGGACTTTATAGTTTTCTGATCACCCTGG-3'
TNF α	①5'-GCCTGCTGCACITTTGGAGTGATGCG-3'
381bp	②5'-GCTCTTGTGCGAGAGAGGAGG-3'
b-FGF	①5'-GGCCACTTCAAGGACCCCAAG-3'
397bp	②5'-TCAGCTCTTAGCAGACA-3'

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction, A: adenine, G: guanine, C: cytosine, T: thymine, VZV: Varicella zoster virus, IL: interleukin, IFN: interferon, TGF: transforming growth factor, TNF: tumor necrosis factor, b-FGF: basic fibroblast growth factor, bp: base pair

actin を様々なサイクル数 (28, 30, 33, 35, 40 サイクル) で RT-PCR を行ったところ, ほとんどの症例で PCR のサイクル数の増加とともに検出されるサイトカイン遺伝子産物の増加があった. β -actin 12 例について NIH イメージで PCR 産物を定量化し, グラフ化したものを図 2 に示す. これによると, PCR 産物は指数関数的に増加し, 35~40 サイクルでほぼ一定になることが判明した. これらのことから, 今回の研究は PCR サイクルを 28~33 サイク

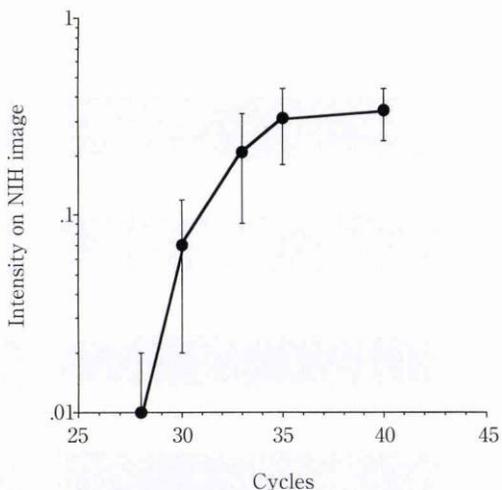


図 2 サイクル数を変えて行った polymerase chain reaction (PCR) 結果を対数グラフにしたもの (β -actin). 縦軸は β -actin の PCR 産物を NIH イメージで数値化した値を示し, 横軸は PCR サイクル数を示す (平均値 \pm 標準偏差).

ルの間で行い, サイトカインおよび対象となる β -actin の RT-PCR は同時に同じサイクル数で行った.

ARN, 種々のぶどう膜炎の各サンプルのサイトカイン発現を検討したところ, この両者とも IL-1 α , -2, -4, -8, TGF β 2, b-FGF の発現はなかった. 発現が確認されたサイトカインについて半定量化し, 統計学的に検討したところ, IFN γ および TGF β 1 の発現が ARN ではぶどう膜炎に比べて高い (IFN γ : $p=0.015$; TGF β 1: $p=0.011$) 結果が得られた. また, 非感染性の炎症が存在すると思われる PVR 18 例で硝子体手術時に採取された増殖膜についてのデータとも比較を行ってみると, IFN γ の発現は ARN において PVR より有意に高く ($p=0.004$), また, IL-6 は ARN において PVR に比べ有意に発現が低いという結果が得られた ($p=0.002$). さらに, その他のぶど

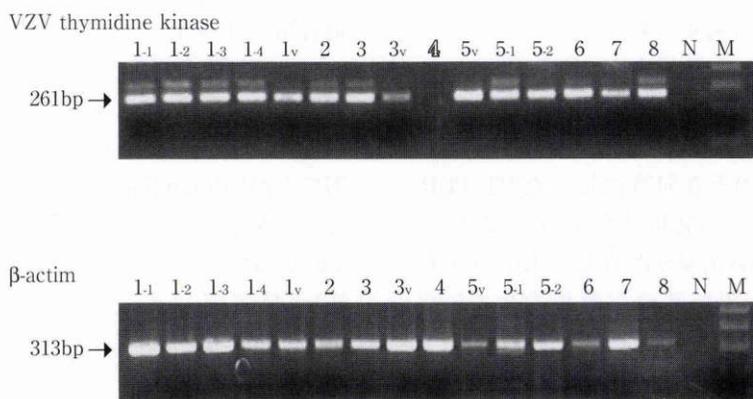


図 1 各症例の varicella zoster virus (VZV) thymidine kinase と β -actin の発現.

1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 5-1, 5-2 は同一症例で経過観察中の複数回の検査結果を示す. 1V, 3V, 5V はそれぞれ硝子体サンプルの結果を示す.

N: negative control, M: 100 base pair ladder marker, bp: base pair

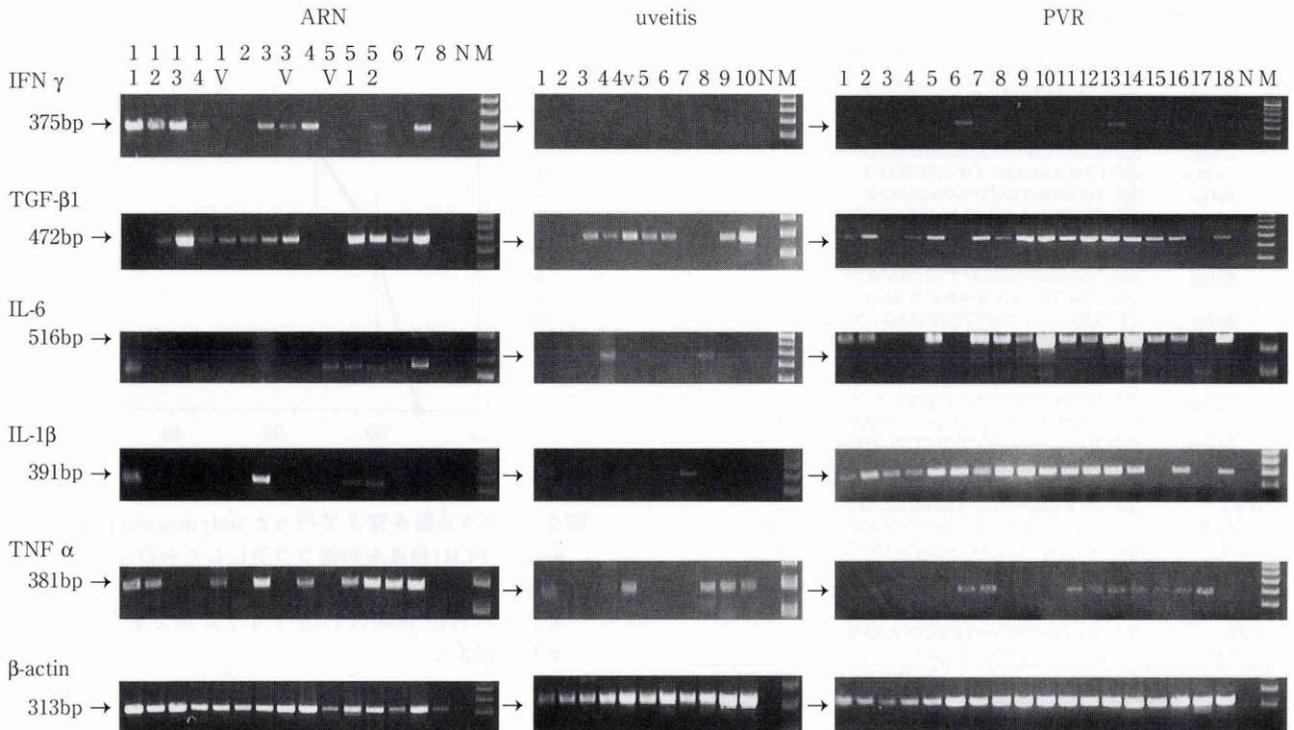


図3 各種サイトカイン発現.

それぞれのサイトカイン遺伝子が増幅されるサイズは, 375 bp (IFN γ), 472 bp (TGF β 1), 516 bp (IL-6), 391 bp (IL-1 β), 381 bp (TNF α), 313 bp (β -actin).

ARN: 桐沢型ぶどう膜炎, PVR: 増殖性硝子体網膜炎, IFN: interferon, IL: interleukin, TGF: transforming growth factor, TNF: tumor necrosis factor

う膜炎と比較すると, IL-1 β がPVRに比べて有意に低いという結果であった($p=0.014$). TNF α には明らかな差はなかった(図3, 4).

以下, 代表的症例を報告する.

症例4: 53歳, 女性.

網膜最周辺部の滲出性病変を伴うぶどう膜炎を近医で指摘され, 約1か月後に当院紹介受診となった.

初診時所見: 視力は右眼0.7, 左眼1.2. 眼圧は右眼22 mmHg, 左眼17 mmHg. 右眼前房に細胞とフィブリン形成, 角膜後面沈着物が存在し, 眼底に硝子体混濁と周辺部の血管炎, 軽度の網膜滲出性病変があった.

経過: 初診時に採取した前房水からVZV DNAが確認されたため, 入院のうえACV 1,500 mg, プレドニゾン(prednisolone, PSL) 40 mg投与で治療開始し, 以後3~7日で漸減した. このとき同時に行ったPT-PCRではVZV thymidine kinaseの発現はなかった. これらの治療で手術を行わず, 眼底所見が改善し房水中のウイルスDNAも陰性化した. 退院時の右眼視力は1.5であった.

症例1: 30歳, 女性.

右眼の充血, 眼球運動時痛のため近医受診し, ARN疑いで当院紹介受診となった.

初診時所見: 視力は右眼0.06, 左眼1.0. 眼圧は右眼29 mmHg, 左眼18 mmHg. 右眼前房に細胞, 前房蓄膿, 角

膜後面沈着物が存在し, 眼底は多量の滲出物を伴う広範な網膜炎を呈しており, 蛍光眼底造影検査では周辺部動脈の閉塞所見があった(図5).

経過: 初診時に採取した前房水からVZV DNAが確認されたため, ACV 4,000 mg, PSLの25 mgの全身投与で治療を行ったが網膜剥離が進行し, 入院から3日後ACV, デキサメタゾン灌流下で硝子体切除およびシリコーンオイル注入術を施行した. しかし, 術後2週間頃から周辺網膜の再剥離を来し, その後は徐々に角膜後面沈着物の減少, 網膜滲出物の消退傾向があるものの, 広範な血管閉塞は残存し, 術後約1か月後には鼻側の一部を除いてほぼ網膜全剥離となり, 視神経乳頭は蒼白, 視力は光覚弁となった. この症例では初診時および22, 29, 37日後にそれぞれ前房水を採取した. すなわち, 治療前後の計4回でVZV thymidine kinaseと各種サイトカインの発現を 検討した. この4回でVZV DNA, VZV thymidine kinaseはすべて発現していたが, サイトカインをみるとIFN γ , IL-6, IL-1 β , TNF α は経過に伴い発現がなくなった. TGF β 1は初診時に発現が確認できなかったが, 治療開始後, 経過中に発現があった(図6).

IV 考 按

ARNは閉塞性血管炎, 眼底周辺部の滲出病変, 多発裂孔を伴う網膜剥離などを特徴とする急性汎ぶどう膜炎で

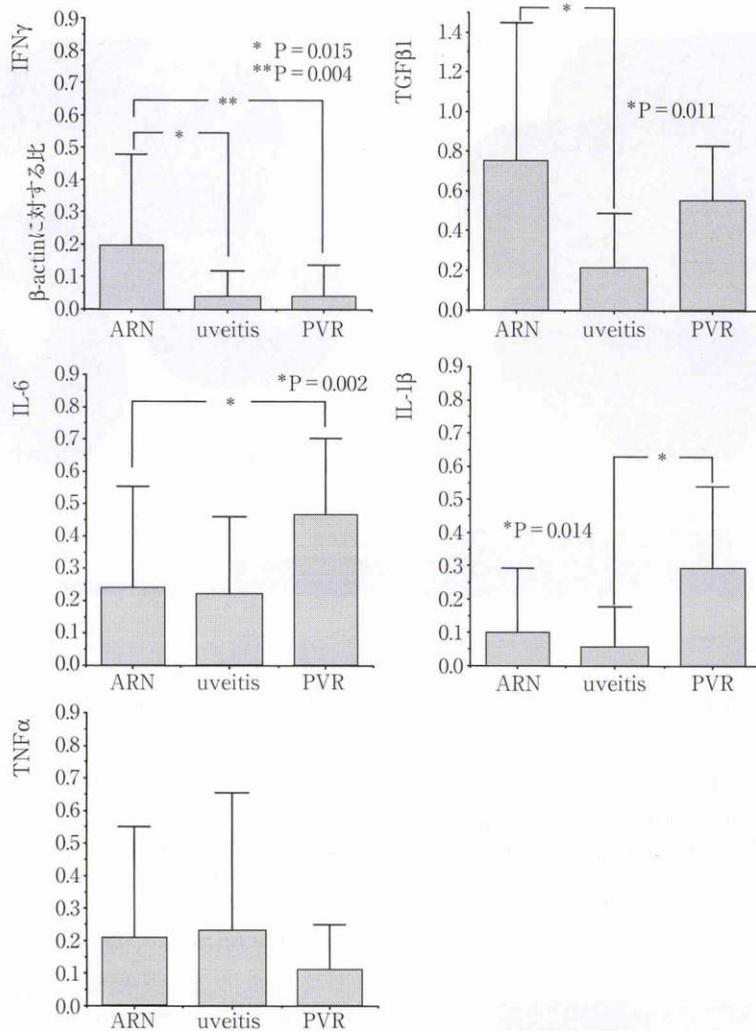


図4 各種サイトカインの発現量の比較グラフ。

縦軸はそれぞれ β -actin に対する比を示す。危険率 (P) が 5% 以下を有意差ありとした。平均値 \pm 標準偏差

あり, HSV または VZV の眼内局所感染によって生じることが知られている¹¹⁾²⁾。近年, その診断に PCR 法による分子生物学的手法が大きな成果を上げており, ウイルス DNA の検出によりかなりの精度で確定診断に至るようになった⁷⁾⁸⁾。さらに, 各症例での病態の違いと眼内のウイルス量, ウイルス株, ACV などの抗ウイルス剤への感受性などについても研究が進められている⁴⁾。

Thymidine kinase は細胞内の DNA 合成に必要とされる酵素である。ACV は感染細胞の thymidine kinase によってリン酸化され, ウイルス性 DNA ポリメラーゼを阻害することによりウイルス DNA の合成を抑制する作用を持つが⁴⁾, VZV の中には thymidine kinase を持たない種類があることが報告されており, このウイルスは ACV に耐性をもつ¹⁰⁾。今回検索を行った 8 例では, 1 例に thymidine kinase が検出されなかった。しかし, この症例は臨床的に軽症であり手術を要さず, ACV の全身投与のみで治癒した症例であった。また, 既報のごとくこの症例の眼内ウイルス量を半定量した結果, 他の症例に比べウイルス量が少ないという結果が得られている (デー

タは示さず)⁴⁾。これまでの報告から, 初診時眼内ウイルス量が少ないほど臨床症状も軽い傾向があるため, これらを総合して, この症例では今回の PCR 条件下では発現がみられなかったが, thymidine kinase の欠損株に感染していたのではなく, ウイルス量が少なかったため軽症であり, ACV に反応し治癒した可能性が高いと考えた。一方, 経時的に検討でき, 予後不良であった症例 1 は, ACV の全身および硝子体内投与にもかかわらず, thymidine kinase は発現し続けた (図 6)。図には示していないが, ウイルス DNA も同時に PCR で確認されている。このことから, この症例では感染ウイルス株の ACV への感受性の低さも推察された。

また今回, 我々は炎症性サイトカインや血管増殖因子など 11 種類のサイトカインについても検討を行った。発現がみられたのは IL-1 β , IL-6, IFN γ , TNF α , TGF β 1 の 5 種類であった。これらは, 以前から実験的ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis, EAU) の研究においても関与が報告¹¹⁾¹²⁾されているものであり, 同じようなサイトカインの発現が確認された。

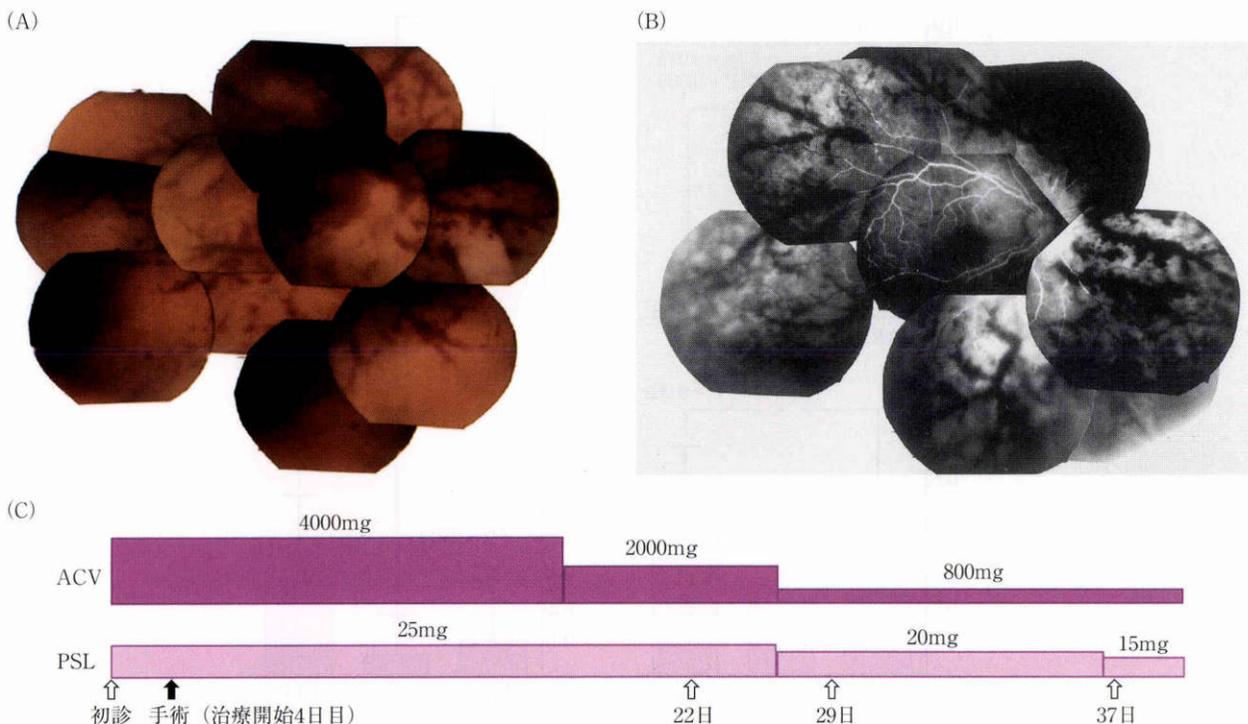
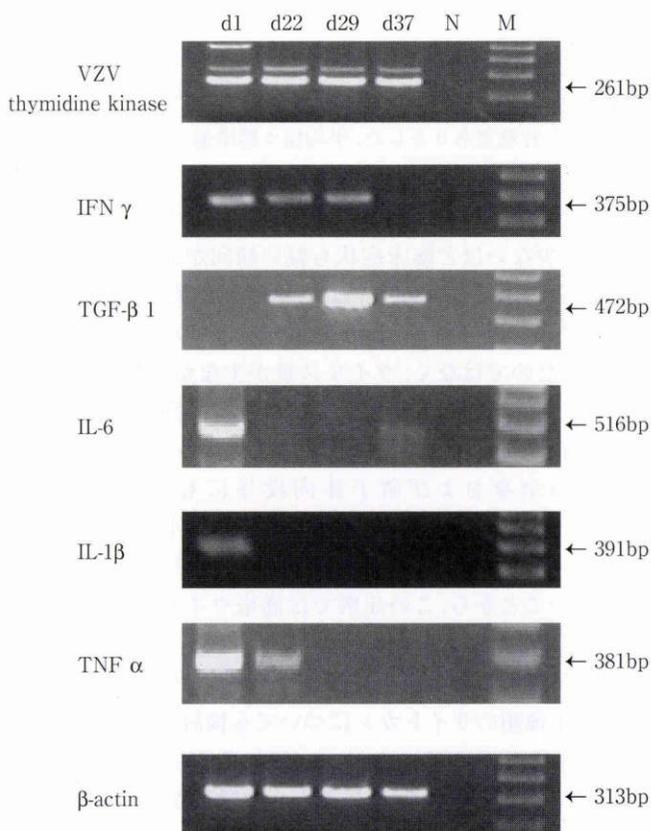


図5 症例4の臨床経過.

A：初診時カラー眼底所見. 血管に沿った網膜出血と多量の滲出物がみられる。
 B：蛍光眼底写真. 閉塞性血管炎の所見をみる。
 C：治療経過. アシクロビル(ACV)は4,000mg/dayから, プレドニゾロン(PSL)は25mg/dayから漸減した。



それぞれについて検討すると, IFNはT細胞などから分泌され, ウイルス複製を阻害する蛋白の合成を促進することによって間接的に抗ウイルス作用を持つことが知られている¹¹⁾. これまでの研究で, ARNでは白内障, アイバンク眼, 内因性ぶどう膜炎に比べ有意に増加しており, 症状発現から早期なほど, また, 炎症の程度が活動的なものほど多いといわれている¹¹⁾¹³⁾. 今回の検討でもPVR, その他のぶどう膜炎に比べ有意に高い発現があり, また, 治療により発現の減少があった(図6). IFNはその他にも細胞接着分子の発現を誘導したりなど免疫応答を調節する働きがあるといわれており, ARNにおいても様々な作用を示していると考えられる.

TGF β は正常細胞に形質転換を促す増殖因子として発見されたが, その後の研究で, 上皮由来の細胞, 血管内皮細胞などの増殖を抑制する物質として知られるようになった. また, 増殖の抑制だけでなく, 線維芽細胞などに

図6 症例4の治療経過中のVaricella zoster virus(VZV) thymidine kinase および各種サイトカイン発現.

d1, d22, d29, d37: それぞれ治療開始前, 開始後22, 29, 37日を示す.

作用して細胞外基質の蓄積を促進し、組織の線維化や損傷の修復作用を持ち、さらに、T 細胞、B 細胞およびナチュラルキラー細胞増殖抑制などの免疫抑制物質としての重要な作用がある。眼科的にも腹腔内や硝子体投与により EAU の発症が用量依存性に抑制されるという報告¹²⁾¹⁴⁾がある。この研究では ARN とぶどう膜炎の間に有意差があったが、経時的に確認できた症例では発症早期よりも中～後期に発現があったことと合わせて、ARN では免疫抑制の方向に働いているのではないと思われる。また、ARN の症例では後になって周辺網膜に強い線維化を来すことがしばしばあるが、b-FGF などの発現が確認できなかったことから、このサイトカインが関与している可能性も推測された。

IL-6 は B 細胞分化因子として発見されたが、T 細胞や線維芽細胞、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 細胞など様々な細胞から分泌され、抗体産生や炎症の急性期反応の誘導などの働きをしている¹¹⁾¹³⁾。これまでに ARN と PVR で発現量を比較した報告はないが、EAU での IL-6 の関与は知られており¹¹⁾¹³⁾、ARN と増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) は内因性ぶどう膜炎に比べ IL-6 が多い¹³⁾という報告と、PDR に比べ PVR の方が多い¹⁵⁾という報告がそれぞれにある。今回、ARN での発現が PVR に比べ有意に低いという結果が得られたが、これらの報告からは矛盾せず、また、mRNA を採取した検体が ARN では主に前房水であるのに対し、PVR では RPE や線維芽細胞などを含む増殖組織であった影響も考えられる¹⁶⁾。

IL-1 β はリンパ球の活性化など強い催炎症性をもつサイトカインであり、炎症の初期に上昇があることが知られている⁷⁾¹⁷⁾。症例 4 の経過をみても初診時にのみ発現が確認された。また、今回 PVR での有意な増加があったが、RPE の脱分化でも発現が上昇することが知られており^{16)~18)}、これも IL-6 と同様サンプルが増殖膜であったことと関係していると思われる。

TNF α はマクロファージをはじめ多くの細胞で産生されるサイトカインであり、細菌、ウイルス、ミトジェンなど様々な刺激で誘導され強い催炎症性を持つ。眼科的にはぶどう膜炎患者の硝子体や前房水中に存在すること、EAU の発症初期に IL-6 などの発現に先がけてみられることも知られており¹¹⁾、今回も経時的な発現の変動があった。また、TNF α は抗ウイルス作用を持つが、HSV-1 と human herpes virus (HHV)-6 は TNF α の抗ウイルス作用に感受性を持たず、EBV では感染により down-regulate される¹⁹⁾という報告があるなどウイルスによって作用の違いも推測されており、VZV ウイルスに関しては今後の検討が期待される。

今回はサンプルが主として前房水という限られた量であったために、それぞれの蛋白質レベルでの解析までは行えなかった。今後追加検討が必要であるが、今回の結果

からある程度標的とする対象がしぼられたと思われる。さらに、今後経時的な検討には症例の追加やさらに長期にわたる追跡が必要であるが、これらサイトカインの動態を調べることにより ARN や PORN など多彩な臨床像を示すウイルス性網膜炎における生体の免疫反応の解明に役立つものと思われる。

文 献

- 1) 浦山 晃, 山田西之, 佐々木徹郎, 西山義一, 渡辺春樹, 涌沢成功, 他: 網膜動脈周囲炎と網膜剥離を伴う特異な片眼性急性ブドウ膜炎について. 臨眼 25: 607—619, 1977.
- 2) Culbertson WW, Blumenkranz MS, Pepose JS, Stewart JA, Curtin VT: Varicella zoster virus is a cause of the acute retinal necrosis syndrome. Ophthalmology 93: 559—569, 1986.
- 3) Blumenkranz MS, Culbertson WW, Clarkson JG, Dix R: Treatment of the acute retinal necrosis syndrome with intravitreal acyclovir. Ophthalmology 93: 296—300, 1986.
- 4) Abe T, Sato M, Tamai M: Correlation of varicella-zoster virus copies and visual acuities of acute retinal necrosis syndrome. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 236: 747—752, 1998.
- 5) Abe T, Tomita H, Tamai M: Gene expression of the phosphatidylcholine-specific phospholipase C-like protein in the retina. Ophthalmic Res 30: 74—83, 1998.
- 6) Moore NC, Anderson G, Williams GT, Owen JJ, Jenkinson EJ: Developmental regulation of bcl-2 expression in the thymus. Immunology 81: 115—119, 1994.
- 7) Abe T, Tsuchida K, Tamai M: A comparative study of the polymerase chain reaction and local antibody production in acute retinal necrosis syndrome and cytomegalovirus retinitis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 234: 419—424, 1996.
- 8) 永江康信, 中川やよい, 田野保雄, 森 康子, 青野利哉: ウイルス性網膜炎での眼検体を用いた polymerase chain reaction法の診断的意義. 日眼会誌 102: 509—514, 1998.
- 9) Knox CM, Chandler D, Short GA, Margolis TP: Polymerase chain reaction-based assays of vitreous samples for the diagnosis of viral retinitis. Ophthalmology 105: 37—45, 1998.
- 10) Andrei G, Snoeck R, Reymen D, Liesnard C, Goubau P, Desmyter J, et al: Comparative activity of selected antiviral compounds against clinical isolates of varicella-zoster virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 14: 318—328, 1995.
- 11) De Vos AF, Hoekzema R, Kijlstra A: Cytokine and uveitis, a review. Curr Eye Res 11: 581—597, 1992.
- 12) Allen JB, McGahan MC, Ogawa Y, Sellon DC, Clark BD, Fleisher LN: Intravitreal transforming growth factor- β 2 decreases cellular infiltration in

- endotoxin-induced ocular inflammation. *Curr Eye Res* 15:95—103, 1996.
- 13) **Ongkosuwito JV, Feron EJ, van Doornik CEM, Van der Lelij A, Hoyng CB, La Heij EC, et al:** Analysis of immunoregulatory cytokines in ocular fluid samples from patients with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2659—2665, 1998.
- 14) 毛塚剛司, 坂井潤一, 横井秀俊, 深井 徹, 臼井正彦: Transforming growth factor- β 1 による実験的自己免疫性ぶどう膜炎の抑制機構の解析. *日眼会誌* 101:847—852, 1997.
- 15) **Kauffmann DJH, Meurs JC, Mertens DAE, van Meurs JC, Martens DAE, Peperkamp E, et al:** Cytokines in vitreous humor: Interleukin-6 is elevated in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:900—906, 1994.
- 16) **Limb GA, Earley O, Jones SE, LeRoy F, Chignell AH, Dumonde DC:** Expression of mRNA coding for TNF α IL-1 β and IL-6 by cells infiltrating retinal membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232:646—651, 1994.
- 17) **Glenn JJ, Wendy LR, Henry LW, Andrew DY, George JC:** Monocyte-induced cytokine expression in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 60:533—543, 1995.
- 18) **Stephan RP, Xiao-na H, Joseph ER, James TR:** Retinal pigment epithelial cells produce interleukin-1 β and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to interleukin-1 β . *Curr Eye Res* 12:205—212, 1993.
- 19) **Gosselin G, Flamand L, D'Addario L, Hiscott J, Stefanescu I, Ablashi DV, et al:** Modulatory effects of epstein-barr, herpes simplex, and human herpes-6 viral infections and coinfections on cytokine synthesis. *J Immunol* 149:181—187, 1992.
-