

家兎眼でのヒトサイトメガロウイルス網膜炎モデル

松田 吉人¹⁾, 桜井 英二¹⁾, 尾関 年則¹⁾, 久納 紀之¹⁾, 中島 捷久²⁾, 小椋祐一郎¹⁾¹⁾名古屋市立大学医学部眼科学教室 ²⁾名古屋市立大学医学部ウイルス学教室

要 約

目的: ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 網膜炎の家兎実験モデルの作製である。

対象と方法: HCMV (AD 169 株) 1×10^6 plaque forming unit (pfu)/ml の懸濁液 0.1 ml を有色家兎 10 眼の硝子体内に注入し、投与後 1, 2, 3, 4, 7 日, 2, 3, 4 週に眼底検査を行い、検眼鏡的に硝子体と網膜所見の重症度を 0+~4+ に分けスコア化した。また、網膜炎の組織学的検索と HCMV の検出を行うため、HCMV 投与 3 週目に眼球を摘出し連続切片を作製して、組織学的および免疫組織化学的に評価した。

結果: HCMV を投与したすべての眼に検眼鏡的に硝子体、網膜病変が発症した。HCMV 注入翌日から硝子体の混濁がみられ、その後増強し、4 日目に最も強く

なった。網膜の白色滲出物は 3 日目に出現し、その後徐々に増強し、3 週目に最も強くなった。硝子体、網膜病変は 4 週目にほぼ消失した。組織学的には、網膜内に炎症細胞浸潤、網膜構造の破壊があり、免疫組織化学的検査で HCMV 抗原が網膜内に同定された。

結論: 今回の結果は、HCMV 網膜炎の実験モデルとして成立すると考えられ、新たな治療方法の開発、治療効果判定に有用であると考えられる。(日眼会誌 105 : 597-602, 2001)

キーワード: HCMV 網膜炎, 硝子体混濁, 網膜滲出物, 有色家兎

A Rabbit Model for Human Cytomegalovirus Retinitis

Yoshito Matsuda¹⁾, Eiji Sakurai¹⁾, Hironori Ozeki¹⁾, Noriyuki Kunou¹⁾, Katsuhisa Nakajima²⁾ and Yuichiro Ogura¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School,²⁾Department of Virology, Nagoya City University Medical School

Abstract

Purpose: To develop a rabbit model for human cytomegalovirus (HCMV) retinitis.

Methods: 0.1 ml of 1×10^6 plaque forming units/ml HCMV was injected into the vitreous cavity of 10 pigmented rabbit eyes. The eyes were examined ophthalmoscopically on days 1, 2, 3, 4 and 7 and once a week thereafter until 4 weeks after inoculation. Vitreal and retinal findings were graded from 0+ to 4+ on a scale of increasing severity. In addition, we examined the enucleated eyes 3 weeks after HCMV inoculation by histological and immunohistochemical techniques.

Results: All injected eyes developed vitreoretinal lesions. Vitreous opacities appeared the next day and increased until 4 days after HCMV inoculation. Whitish retinal exudates occurred on day 3 and

increased until 3 weeks after HCMV inoculation. Vitreoretinal lesions then disappeared by 4 weeks after inoculation. Histological examination revealed intraretinal infiltration of inflammatory cells and disorganization of the inner retinal architecture. HCMV antigens were detected inside the retina by immunofluorescence using anti early protein antibody against HCMV.

Conclusions: The results indicate that this rabbit model can be useful to develop and evaluate a new treatment modality for cytomegalovirus retinitis. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 597-602, 2001)

Key words: HCMV retinitis, Vitreous opacity, Retinal exudate, Pigmented rabbit

別刷請求先: 467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 松田 吉人
(平成 12 年 3 月 16 日受付, 平成 13 年 3 月 13 日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshito Matsuda, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan
(Received March 16, 2000 and accepted in revised form March 13, 2001)

I 緒 言

ヒトサイトメガロウイルス(human cytomegalovirus, HCMV)網膜炎は、初期には網膜色素上皮の障害による黄白色の滲出斑、血管の狭細化や白鞘化、網膜出血がみられ、徐々に滲出斑が拡大、融合していく。病変の進行は網膜血管に沿って後極部から周辺部に拡大していくことが多く、消退期には滲出性病変が吸収されていき、網膜壊死のため網膜が菲薄化し裂孔が生じて網膜剝離を来すこと¹⁾がある。HCMV 感染の多くは不顕性で無症状であり、本邦では成人の90%以上がHCMVの抗体保有者で、感染時期も早く、学童時期に大部分が感染する¹⁾。生体内でのHCMV感染は汎向性で、種々の器官を標的とし、初感染後、リンパ球、腎臓、性器、唾液腺、前立腺などに潜伏感染して、感染後長期間にわたって尿や唾液中にHCMVを排出し続けること²⁾が知られている。

近年、後天性免疫不全症候群(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)、臓器移植後、悪性腫瘍により免疫能、特に細胞性免疫が低下し、潜在性HCMVが再活性化される、いわゆる日和見感染が増加している。眼科領域でも、1982年にHollandら³⁾がAIDS患者にHCMV網膜炎が発症することを報告して以来、数多くの同様の報告がなされるようになり、現在ではAIDS患者の15~40%にHCMV網膜炎が発症する³⁾ため、社会的問題となっている。治療薬としては、ガンシクロビル、フォスカネットが用いられているが、一般に、HCMV網膜炎に対しては長期間の全身投与が必要となり、ガンシクロビルでは顆粒球減少、血小板減少などの骨髓抑制⁴⁾、フォスカネットでは腎障害⁵⁾といった重篤な副作用のため、投与の継続が困難になる場合が多い。

一方、これらの全身的な副作用を軽減するために、ガンシクロビルの徐放性硝子体内挿入療法が試みられているが、この局所投与方法においても眼内感染、前房出血、硝子体出血、白内障、網膜剝離などの眼合併症が問題とされている⁷⁻⁹⁾。そのため、HCMV網膜炎のさらなる病態解明、新しい治療法の確立のために、HCMV網膜炎の実験モデルの確立が必要と考える。本研究では有色家兎を用いてHCMVの感染モデルを作製した。

II 実験方法

1. HCMVの培養方法

培養細胞は、ヒト胎児肺線維芽細胞(human fetal lung fibroblast, HFL-1)(理化学研究所)を用いた。培養液は、15%のfetal bovine serumを添加したHamF 12(ICNバイオメディカルズ)を用い、75cm²のディッシュにHFL-1を密に増殖させた。5×10⁶ plaque forming unit(pfu)/mlのHCMV(AD 169株)懸濁液0.1mlをHFL-1に投与し37°Cで1時間吸着させた後、培養液を加えた。7日目頃からHCMVの増殖を推定する細胞変

性効果(細胞の円型化)がみられ、14日目に細胞変性効果がほぼ100%になり、その時点で細胞上清を採取した。抗HCMV抗体を用いて定量したところ1×10⁶ pfu/mlのHCMVがみられた。

2. HCMVの投与方法

体重1.7~1.8kgの雄の有色家兎5匹10眼にHCMV懸濁液を投与した。塩酸ケタミン(ケタラール®)とキシラジン塩酸塩(セラクター®)を7:3で混合し、その3mlを筋肉内投与し全身麻酔を行った。硝子体手術用コンタクトレンズを角膜に装着し、先に作製した1×10⁶ pfu/mlのHCMV懸濁液0.1mlを顕微鏡下で30G針を用いて角膜輪部から3mm離れた強膜から硝子体内に直接注入した。また、対照として、同様の有色家兎5匹10眼に培養液0.1mlを同様に硝子体内に注入した。

3. 網膜硝子体病変の評価

HCMV注入後1, 2, 3, 4日, 1, 2, 3, 4週に倒像鏡を用いて眼底を観察した。眼底病変は硝子体病変と網膜病変に分け、検眼鏡的に重症度をスコア化し評価した。スコア値は、Dunkelら¹⁰⁾の報告を基に一部改変した。硝子体病変は、硝子体混濁が全くないものを0+, 硝子体混濁が軽度のもを1+, 硝子体混濁が中等度のもを2+, 硝子体混濁が高度のもを3+, 網膜が透視不能なものを4+とした。網膜病変は、異常のないものを0+, 網膜滲出物が軽度のもを1+, 網膜滲出物が中等度のもを2+, 網膜滲出物が高度のもを3+, 網膜剝離、壊死がみられたものを4+とした。眼底病変は、コーワ手持ち眼底カメラGENESIS(興和オプテド)を用いて写真撮影を行った。

4. 組織学的検討

HCMV注入後3週に、十分量のペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®)を耳静脈から投与し安楽死させ、眼球を摘出後、2.5%グルタルアルデヒド・5.0%ホルムアルデヒド混合液で固定し、パラフィンに包埋して、連続切片を作製してヘマトキシリン・エオジン重染色(HE染色)を行い、光学顕微鏡で観察した。

5. 免疫組織化学的検討

組織学的検討時と同様に眼球を摘出後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋し、連続切片を作製してphosphate buffered saline(PBS)で洗浄後、一次抗体として抗サイトメガロウイルス初期蛋白に対するモノクローナル抗体¹¹⁾をPBSで2倍に希釈したものをを用い、常温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、二次抗体としてfluorescein isothiocyanate(FITC)標識抗マウス抗体を用い、常温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、無蛍光グリセリンで封入し、蛍光顕微鏡を用いて暗視野で観察した。

III 結 果

HCMVを投与した10眼すべてに検眼鏡的に網膜硝子

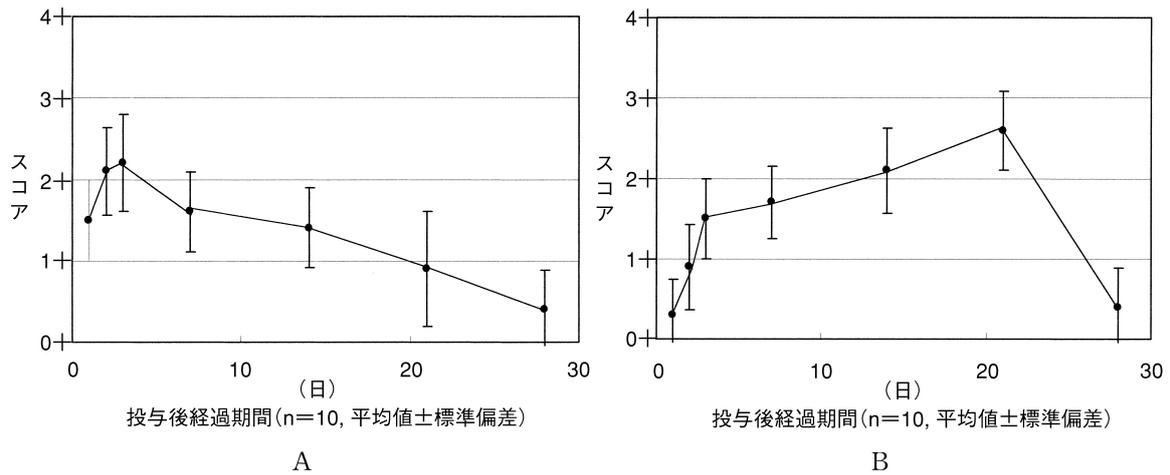


図 1

A：硝子体病変，B：網膜病変

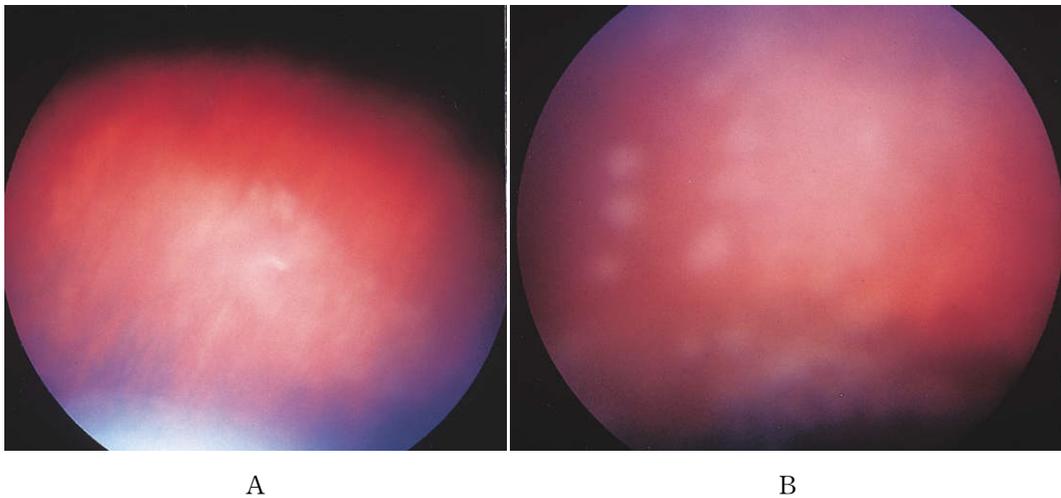


図 2

A：ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus, HCMV) 投与後 1 日の眼底写真。硝子体の混濁が出現している。
 B：HCMV 投与後 4 日の眼底写真。増強した硝子体混濁を通して網膜の白色滲出物がみられる。

体病変が発症した。硝子体病変と網膜病変のスコアの経過を図 1 A, B に示す。硝子体病変の経過は、HCMV 注入後 1 日目から硝子体混濁が出現し(図 2 A)、徐々に増強して 4 日目に最も強くなった(図 2 B)。その後、1, 2, 3 週と徐々に硝子体混濁は軽減し、4 週目にほぼ消失した。硝子体混濁から少し遅れて HCMV 注入後 3 日目から網膜の白色の滲出病変が出現し、HCMV 注入後 1 週目(図 3 A)、2 週目(図 3 B)と徐々に滲出病変の範囲が拡大、融合していき、3 週目(図 3 C)に最も網膜病変は強くなった。その後、網膜病変は軽減して 4 週目(図 3 D)には瘢痕を僅かに残すのみとなった。網膜裂孔、網膜剝離、網膜出血、眼内感染はみられなかった。前眼部の炎症所見として軽度の虹彩後癒着が 1 眼でみられた。組織学的には、白色滲出物に相当する部位にリンパ球を中心とした炎症細胞の網膜内への浸潤がみられ(図 4)、また、網膜構造、特に内層の破壊も確認された。免疫組

織化学的検査で HCMV 特異抗原が網膜内に、特に網膜内層で多く観察された(図 5 A, B)。また対照群は、臨床的にも組織学的にも炎症所見は 1 眼もみられなかった。

IV 考 按

HCMV 網膜炎の臨床所見と本研究で発症させた実験モデルの比較をしてみると、本研究で発症させた有色家兎の網膜硝子体病変は、HCMV 網膜炎と同様な黄白色の滲出斑が HCMV 注入後数日から出現し、3 週目まで徐々に拡大、融合していった。発症後約 4 週目にこの滲出斑は吸収されたが、HCMV 網膜炎と異なり網膜裂孔、網膜剝離の発症は 1 眼もないなど網膜病変は軽度であったが、一方、硝子体病変は重症であった。この原因は今回の実験モデルが硝子体内にウイルス懸濁液を局所注入して発症させたため、HCMV 網膜炎とは発症様式が完全には一致しなかったものと考えている。HCMV 網膜

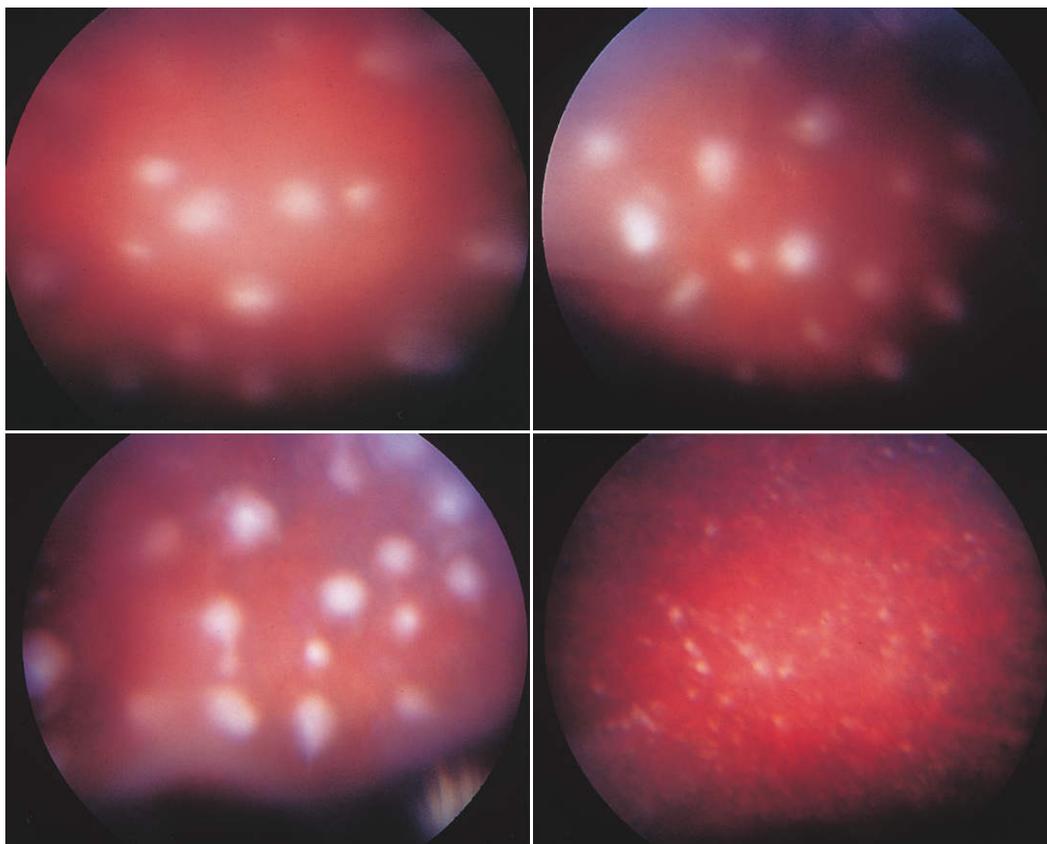
A/B
C/D

図 3

- A : HCMV 投与後 1 週の眼底写真。硝子体混濁は減少し、網膜の白色滲出物が解明にみられる。
 B : HCMV 投与後 2 週の眼底写真。白色滲出物が徐々に増加している。
 C : HCMV 投与後 3 週の眼底写真。白色滲出物は数、大きさともさらに増加している。
 D : HCMV 投与後 4 週の眼底写真。白色滲出物は軽快している。

炎で前房内の炎症はほとんどみられない¹⁾といわれている。今回は詳細な前房内の観察はしていないが、軽度の虹彩後癒着が 1 眼にみられたのみであった。以上のように網膜病変は軽症とはいえ、組織学的にも炎症所見が内境界膜を破壊して、網膜内へ侵入している像も確認でき、また、網膜硝子体病変が最も強い HCMV 投与後 3 週目に免疫組織化学的に網膜内に HCMV 特異抗原が観察できたことから、本研究の家兎眼の網膜硝子体病変は HCMV の感染によるものと考えられる。

今回、著者らが作製した有色家兎での実験的 HCMV 網膜炎では、10 眼とも HCMV 注入後 1 日目から硝子体混濁が出現し、次第に増強し 3 日目にはピークを示した。その後は軽快し、4 週目にほぼ消失するまで存在していた。HCMV 網膜炎は、末梢血 CD 4⁺リンパ球が 50 個/ μ l 以下に低下した重篤な AIDS 患者の 20~40% に生じる¹²⁾¹³⁾といわれており、免疫能の低下したものに発症しやすい。本研究で著者らが作製した有色家兎での実験的 HCMV 網膜炎は、網膜病変、硝子体病変とも HCMV 注入後 4 週間と比較的早い時期に軽快したが、HCMV 網膜炎を発症しやすい免疫能の低下した状態とは異なり、健康で免疫能の正常な有色家兎を用いたため

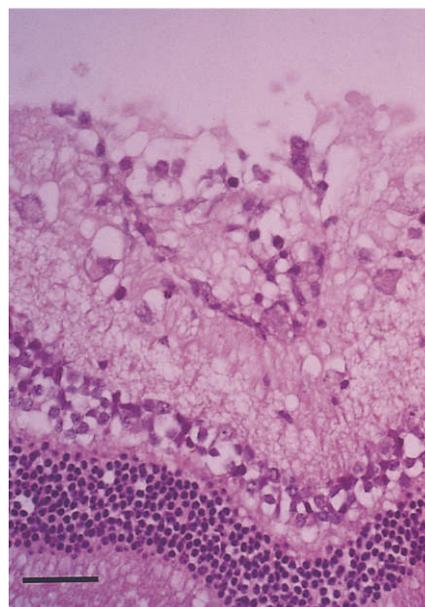


図 4 HCMV 投与後 3 週の摘出眼球のヘマトキシリン・エオジン染色光学顕微鏡写真。

硝子体および網膜内にリンパ球を中心とした炎症細胞の浸潤と、網膜構造の破壊がみられる。バーは 100 μ m

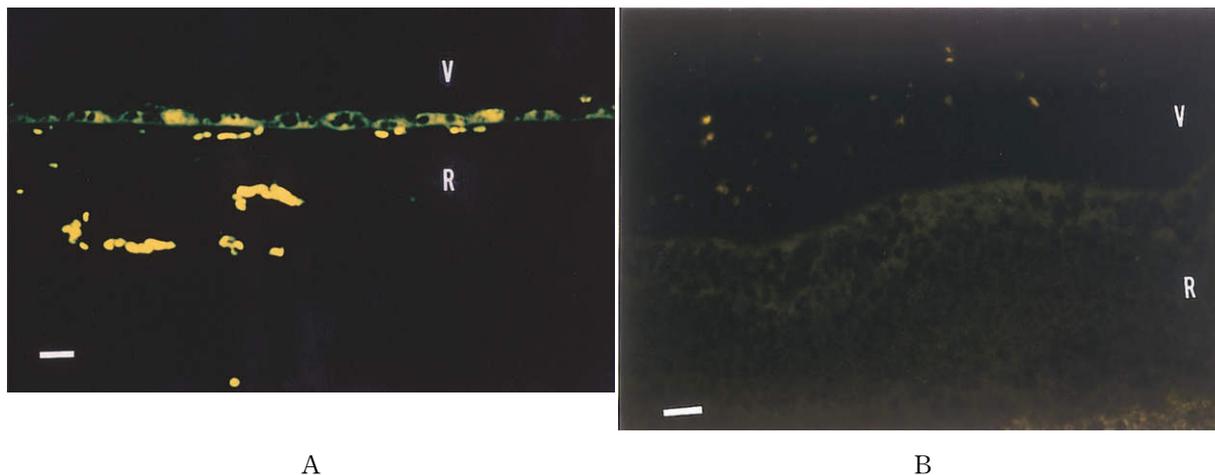


図 5

- A : HCMV 投与後 3 週の摘出眼球の免疫染色蛍光顕微鏡写真。網膜内に HCMV の局在を示す蛍光像がみられる。
V : 硝子体, R : 網膜。バーは 50 μm
- B : 対照群の摘出眼球の免疫染色蛍光顕微鏡写真。

と考える。

ウイルスの投与手技として、本研究ではウイルス懸濁液を硝子体内へ注入した。この理由は、免疫能が低下していない実験動物に眼局所投与以外では眼内移行性が悪く、HCMV 網膜炎を発症させるのは不可能と判断したこと、この投与手技が比較的簡便で、常に一定量のウイルス懸濁液を確実に眼内に投与できるためである。

これまでも HCMV を硝子体内投与することにより発症させた HCMV 網膜炎の実験モデルを Dunkel ら¹⁰⁾が報告しているが、炎症の持続期間は約 1 週間のみであり、組織学的所見も乏しかった。これは、HCMV による炎症ではなく、非特異的な炎症の可能性もあり、Tatebayashi ら¹⁴⁾は Dunkel ら¹⁰⁾が報告した HCMV 網膜炎の実験モデルを否定している。また、Laycock ら¹⁵⁾はラットの胸腺を摘出して免疫不全状態にして、さらに HCMV に感染した網膜を前房中に留置することにより、持続的に HCMV を放出させ、4 週間以上炎症を持続させることに成功した。この報告の中で、炎症を 4 週間持続させ、かつ、組織学的に網膜破壊像を確認することが、HCMV 網膜炎の実験モデルであることの条件と定めており、今回の研究の結果は、その基準に合致していた。また、免疫組織学的にも網膜内に HCMV を確認したため、非特異的な炎症ではなく、HCMV による炎症と考える。

現在、HCMV 網膜炎に対して多く行われている治療法は、ガンシクロビル、フォスカーネットといった抗 HCMV 薬の点滴静注がある。導入療法を 2~3 週間行った後に維持療法へ移行するが、ガンシクロビルの副作用として骨髄抑制⁴⁵⁾、フォスカーネットの副作用として腎機能障害⁶⁾があり、治療の継続が困難な症例がある。そのような症例や HCMV 感染症が眼局所に限られている症例に対して、ガンシクロビルの硝子体注射療法も行われ

ている^{7~9)}。この場合、週 1 回の注射が必要であり、合併症として硝子体出血、網膜剝離、細菌性眼内炎がしばしば報告^{7~9)}されている。さらに近年、徐放性ガンシクロビル硝子体内挿入療法^{16)~22)}が欧米を中心に行われるようになってきている。透過性ポリマーと非透過性ポリマーとの二重膜の中にガンシクロビルが含有され、一定の速度で放出されて約 8 か月間の治療効果がある²²⁾といわれている。しかし、この治療法にも網膜剝離、眼内出血などの副作用があり、新たな治療方法が望まれている。以上のように、HCMV 網膜炎の治療法は未だ十分には確立されておらず、HCMV 網膜炎の病態の解明、治療法についてはさらなる研究が必要である。今回、著者らは 1×10^6 pfu/ml の HCMV 懸濁液 0.1 ml を家兎眼に硝子体内注入することにより、非常に効率よく HCMV の感染モデルを作製することができた。本モデルは HCMV 網膜炎の病態解明、新たな治療方法の確立に有用であると考えられる。

稿を終えるに当たり HCMV (AD 169 株) を分与して下さった名古屋大学医学部病態制御西山幸廣教授、HCMV 抗体を分与して下さった東京医科歯科大学医学部の平井莞二教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 山本成経, 村上喜二雄: サイトメガロウイルス網膜炎. 眼科 40 : 915—923, 1998.
- 2) Holland GN, Gottlieb MS, Yee RD, Schanker HM, Pettit TH : Ocular disorders associated with a new severe acquired cellular immunodeficiency syndrome. Am J Ophthalmol 93 : 393—402, 1982.
- 3) Faber DW, Wiley CA, Lynn GB, Gross JG, Freeman WR : Role of HIV and CMV in the pathogenesis of retinitis and retinal vasculopathy

- in AIDS patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : 2345—2353, 1992.
- 4) **Holland GN, Sidikaro Y, Kreiger AE, Hardy D, Sakamoto MJ, Frenkel LM, et al** : Treatment of cytomegalovirus retinopathy with ganciclovir. *Ophthalmology* 94 : 815—823, 1987.
 - 5) **Jabs D A, Newman C, Bustros SD, Polk F** : Treatment of cytomegalovirus retinitis with ganciclovir. *Ophthalmology* 94 : 824—830, 1987.
 - 6) **Lehoang P, Girard B, Robinet M, Marcel P, Zazoun L, Matheron S, et al** : Foscarnet in the treatment of cytomegalovirus retinitis in acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology* 96 : 865—874, 1989.
 - 7) **Baudouin C, Gastaud P** : A modified procedure for intravitreal injections of ganciclovir in the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Ophthalmology* 99 : 1183, 1992.
 - 8) 藤野雄次郎, 永田洋一, 三好 和, 小野綾子, 岡慎一, 岩本愛吉, 他 : AIDS 患者に発症したサイトメガロウイルス網膜炎に対するガンシクロビル硝子体注射療法. *日眼会誌* 100 : 634—640, 1996.
 - 9) 加治優一, 藤野雄次郎 : 全身性エリテマトーデスに合併したサイトメガロウイルス網膜炎に対しガンシクロビル硝子体注射療法の著効した 1 例. *日眼会誌* 101 : 525—531, 1997.
 - 10) **Dunkel EC, Freitas DD, Scheer DI, Siegel ML, Zhu Q, Whitley RJ, et al** : A rabbit model for human cytomegalovirus-induced chorioretinal disease. *J Infect Dis* 168 : 336—344, 1993.
 - 11) **Yamamoto T, Suzuki S, Radsak K, Hirai K** : The UL 112/113 gene products of human cytomegalovirus which colocalize with viral DNA in infected cell nuclei are related to efficient viral DNA replication. *Virus Res* 56 : 107—114, 1998.
 - 12) **Hoover DR, Peng Y, Saah A, Semba R, Detels RR, Rinaldo CR, et al** : Occurrence of cytomegalovirus retinitis after human immunodeficiency virus immunosuppression. *Arch Ophthalmol* 114 : 821—827, 1996.
 - 13) **Spector SA, Mckinley GF, Lalezari JP, Samo T, Andruczk R, Follansbee S, et al** : Oral ganciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in persons with AIDS. *N Engl J Med* 334 : 1491—1497, 1996.
 - 14) **Tatebayashi M, Neyts J, Besen G, Flores-Aguilar M, Smith IL, Wiley CA, et al** : Absence of infectious retinitis after injection of human cytomegalovirus into rabbit eyes. *J Infect Dis* 171 : 782—787, 1995.
 - 15) **Laycock KA, Fenoglio ED, Hook KK, Pepose JS** : An *in vivo* model of human cytomegalovirus retinal infection. *Am J Ophthalmol* 124 : 181—189, 1997.
 - 16) **Sanborn GE, Anand R, Torti RE, Nightingale SD, Cal SX, Yates B, et al** : Sustained-release ganciclovir therapy for treatment of cytomegalovirus retinitis. *Arch Ophthalmol* 110 : 188—195, 1992.
 - 17) **Marx JL, Kapusta MA, Patel SS, Labree LD, Walonker F, Rao NA, et al** : Use of the ganciclovir implant in the treatment of recurrent cytomegalovirus retinitis. *Arch Ophthalmol* 114 : 815—820, 1996.
 - 18) 望月 學, 池田英子, 吉村浩一, 疋田直文, 永田洋一, 岩本愛吉, 他 : AIDS 患者のサイトメガロウイルス網膜炎に対する徐放性ガンシクロビル硝子体内挿入療法. *日眼会誌* 102 : 515—521, 1996.
 - 19) **Roth DB, Feuer WJ, Blenke AJ, Davis JL** : Treatment of recurrent cytomegalovirus retinitis with the ganciclovir implant. *Am J Ophthalmol* 127 : 276—282, 1999.
 - 20) **Davis JL, Tabandeh H, Feuer WJ, Kumbhat S, Roth DB, Chaudhry NA** : Effect of potent anti-retroviral therapy on recurrent cytomegalovirus retinitis treated with the ganciclovir implant. *Am J Ophthalmol* 127 : 283—287, 1999.
 - 21) **Lim JI, Woritz RA, Dowling AH, Bloom HR, Irvine AR, Schwartz DM** : Visual and anatomic outcomes associated with posterior segment complications after ganciclovir implant procedures in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophthalmol* 127 : 288—293, 1999.
 - 22) **Martin DF, Dunn JP, Davis JL, Duker JS, Engstrom RE, Friedberg DN, et al** : Use of the ganciclovir implant for the treatment of cytomegalovirus retinitis in the era of potent anti-retroviral therapy : Recommendations of the international AIDS society-USA panel. *Am J Ophthalmol* 127 : 329—339, 1999.
-