

## 第 111 回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

## 眼の感染と免疫

## ヘルペスの潜伏感染, 再発, 新治療法

下村 嘉一

近畿大学医学部眼科学教室

## 共同研究者

松本 長太, 福田 昌彦, 奥山 幸子, 阿部 孝助, 国吉 一樹, 丸山 耕一  
 檜垣 史郎, 高田 園子, 菅原 大輔, 妙中 直子, 出合 達則, 杉岡 孝二  
 板橋 幹城, 白根 授美, 渡辺 敬三, 若山 曉美

(近畿大学医学部眼科学教室)

松本富美子, 中尾 雄三(近畿大学医学部堺病院眼科)

三島 弘(近畿大学医学部奈良病院眼科)

中山 隆志, 義江 修(近畿大学医学部細菌学教室)

井上 幸次(鳥取大学医学部眼科学教室)

金子 久俊, 錫谷 達夫(福島県立医科大学微生物学教室)

永井 宏(神戸大学医学部皮膚科学教室)

Laura C Hooper, 林 皓三郎(Immunology &amp; Virology, National Eye Institute, National Institute of Health)

James M Hill(Microbiology, Louisiana State University)

## 要 約

角膜ヘルペスの再発はさまざまな要因で引き起こされるが, 患者サイドからの詳細な検討は少ない. 我々は再発を繰り返す角膜ヘルペス症例に対しアンケート調査を実施した. 結果は, 患者の自覚的な再発要因としては疲労, 睡眠不足, 肩こりと全身の疲労に関係するものが多く認められた. ストレスの原因はさまざま, 季節としては春から夏に多く認められた.

正常人の角膜において単純ヘルペスウイルス (HSV) がどの程度潜伏感染しているかは正確には知られていない. 我々は, 角膜移植時の宿主角膜とドナー角膜における HSV の存在を real-time polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて検討した. 角膜ヘルペスの既往のある角膜で平均  $1.6 \times 10^4$  コピー/mg の HSV DNA が検出され, 既往のない角膜からは平均 8.7 コピー/mg, ドナー角膜からは平均  $4.9 \times 10^2$  コピー/mg の HSV DNA が検出された. これらの事象は, HSV は角膜ヘルペスの既往のない角膜内にも潜伏感染していることを示し, 角膜移植に際してドナー由来のヘルペス感染の可能性を示唆するものである.

次に, 眼科手術前後における涙液中 HSV DNA の定

量を行い, 角膜移植術後では 1 週後, 硝子体手術後の片眼において術翌日に HSV DNA の検出率と平均コピー数が上昇する傾向を認めた. さらに, 再発病変を引き起こす HSV 株間の判別について検討したところ, 一例ではあるが, 得られた 2 株間で 1 塩基の違いを認め, この 2 株が異なる株である可能性が示唆された.

近年, ケモカインの一部は抗菌活性を有することが報告され, 我々は, ケモカインが抗ウイルス活性も有する可能性があると考え, ケモカインによる抗ウイルス活性を検討した. RANTES/CCL5, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 を含む 8 種類のケモカインは HSV の Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞) への感染を有意に抑制した. これらのケモカインは直接 HSV と結合し, その結合はエンベロープ蛋白質 gB に対する中和抗体で特異的に阻害された. 電子顕微鏡解析により, これらのケモカインが HSV 粒子のエンベロープに穴を開けることが明示され, ケモカイン処理した HSK モデルマウスでは, 涙液中 HSV の減少および角膜混濁の軽減が認められた. これらのことから感染初期に角膜に集積するケモカインは

別刷請求先: 589-8511 大阪狭山市大野東 377-2 近畿大学医学部眼科学教室 下村 嘉一

(平成 19 年 11 月 5 日受付, 平成 19 年 12 月 19 日改訂受理) E-mail: yoshis@med.kindai.ac.jp

Reprint requests to: Yoshikazu Shimomura, M. D. Department of Ophthalmology, Kinki University School of Medicine, 377-2 Ohno-Higashi, Osakasayama 589-8511, Japan

(Received November 5, 2007 and accepted in revised form December 19, 2007)

HSVによる感染から細胞や組織を防御する役割も持つことが示唆された。

近年、アシクロビル(ACV)のプロドラッグであるバラシクロビル(VCV)の内服薬が市販され、眼科領域以外では使用されている。角膜ヘルペス患者のACV眼軟膏使用困難例でのVCV内服の効果を知る目的でマウス角膜炎モデルを用いて検討した。VCV内服, ACV内服, ACV眼軟膏, ACV点眼についてその治療効果を

調査したところ, VCV内服投与群は有意な抗ウイルス作用を示し, ACV眼軟膏のコンプライアンスの悪い患者に対しては, VCV内服は有用な治療の一つであることが証明された。(日眼会誌 112:247-265, 2008)

キーワード: 角膜ヘルペス, 単純ヘルペスウイルス株, 単純ヘルペスウイルスDNA, ケモカイン, バラシクロビル

## A Review

# Herpes Simplex Virus Latency, Reactivation, and a New Antiviral Therapy for Herpetic Keratitis

Yoshikazu Shimomura

*Department of Ophthalmology, Kinki University School of Medicine*

### Abstract

Although many factors that trigger the herpes simplex virus (HSV) reactivation from latency have been reported, how HSV resides in a latent state in the normal human cornea still needs to be defined. We therefore conducted a series of studies regarding various aspects of HSV infections.

To understand how patients subjectively perceived changes in their daily life that could have induced HSV reactivation, we first performed a comprehensive survey on the subjective factors in patients who had experienced recurrent herpetic keratitis. The result of our survey revealed that stress, lack of sleep, shoulder stiffness, and physical fatigue were the key factors. There were various causes for stress, and stress associated with reactivation often occurred between spring and summer.

Regarding HSV latency in the normal cornea, we used real-time polymerase chain reaction (PCR) to determine the presence of HSV in the donor and host corneas. The findings showed that on average, those host corneas with a history of HSV keratitis had  $1.6 \times 10^4$  copies/mg of HSV DNA, while the host corneas without a history and the donor corneas had  $8.7$  and  $4.9 \times 10^2$  copies/mg of HSV DNA, respectively. Based on these observations, it is reasonable to infer that latent viruses could have resided in a normal cornea without a history and were transmitted to a host cornea through corneal transplantation.

We also quantified the virus load in tears before and after ocular surgery (one week after corneal transplantation or the next day after vitreous surgery). Our results indicated that both the detection rate and the average copy number of HSV DNA had a

tendency to increase postoperatively. Moreover, we tried to differentiate the HSV strains that were involved in the recurrent lesions. In only one of the studied cases, could we find a single different nucleotide between two HSV strains. It seemed possible that two different strains of HSV had set off the same episode of reactivation.

In recent years, chemokines have become known for their action in mediating inflammatory diseases. We suspected that chemokines might also play a role in the antiviral mechanism and examined the chemokine-derived antiviral activity. We used eight chemokines, including RANTES/CCL5, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, and MIP-1 $\beta$ /CCL4, in a murine HSK model with Vero cells. These chemokines directly bound to HSV and the chemokine-bound HSV was later resisted by the neutralizing antibody of envelope protein gB. Furthermore, by electron microscope analysis, it became clear that these chemokines had cut an opening in the HSV envelope. Consequently, these chemokines had significantly inhibited the HSV infection on Vero cells. In addition, the virus load in tears was decreased and the corneal opacity was less severe. We concluded in that study that during early infection, chemokines accumulated in the corneal stroma have the ability to protect cells and tissues from HSV infection.

As for antiviral therapy, acyclovir (ACV) eye ointment has been effective for patients with herpetic keratitis. However, patients often find it difficult to successfully follow the treatment due to the required frequent application and the blurred vision after application. On the other hand, valaciclovir (VCV), which

is the oral prodrug of ACV, has become commercially available in recent years for treating nonocular herpetic diseases. We therefore examined and compared the efficacies of oral VCV, oral ACV, ACV eye ointment, and ACV eye drops in a murine keratitis model; the group treated with oral VCV did show a significantly good antiviral effect. We have proved that oral VCV can be a beneficial alternative anti-

ral therapy for patients with difficulty in complying with the ACV eye ointment treatment.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 247—265, 2008)

**Key words :** Herpetic keratitis, Herpes simplex virus strain, Herpes simplex virus DNA, Chemokine, Valaciclovir

## I はじめに

単純ヘルペスウイルス (HSV) は幼少時に結膜炎などの形で初感染し, 三叉神経節あるいは角膜内に潜伏感染する。感冒, ストレス, 疲労などの全身状態の変化, あるいは点眼薬, 角膜障害などの局所変化に伴って潜伏感染 HSV は再活性化を起こし, 樹枝状角膜潰瘍あるいは円板状角膜炎などの形で角膜ヘルペスを発症する。

まず, 我々は角膜ヘルペスの最大の特徴である再発について, 患者側からのアンケート調査を行い, 再発因子について検討した。さらに, このヘルペス再発の原因となる角膜内におけるウイルス潜伏感染と無症候性ウイルス排泄について最新の分子生物学的手法を用いて調査研究した。

上記, 結果を踏まえて, 将来の角膜ヘルペス治療の可能性を孕む, HSV に対するケモカインの抗ウイルス活性とヘルペス根治療法を視野に入れた新しい抗ウイルス薬の再活性化抑制効果を検討した。特に, 従来の抗ウイルス薬の治療効果を判定する際, 急性感染時の効果を判定していたが, 今回はヘルペス再活性化時における抗ウイルス効果を判定調査した。

## II 角膜ヘルペスの再発要因に関するアンケート調査

角膜ヘルペスの再発抑制方法を開発する目的で, 再発を繰り返す角膜ヘルペス患者に対してアンケート調査を行った。

対象は 1982 年 5 月から 2004 年 5 月までに当科で角膜ヘルペスと診断され, 経過中に 2 回以上再発を起こした 42 例 (男性 20 例, 女性 22 例) である。年齢は 3 歳~84 歳 (平均値±標準偏差: 51.7±19.5) であった。アンケート方法はアンケート用紙を各症例宛に送付し, 返送してもらった。

アンケート用紙の内容と集計結果を表 1, 2 に示した。複数回答は可とし, 誘因としての項目がなければ「その他」を選択してもらった。ストレスなどの項目に関しては具体的なことを記載してもらい, 誘因が特にならぬ場合は「特になし」とした。

アンケート回収率は 76% であった。選択された項目

表 1 角膜ヘルペスの再発要因に関するアンケート調査

過去に経験された角膜ヘルペスの再発時のエピソードとして該当するものがあれば○をお付けください(複数回答も可)。該当するのがない場合はその他にご記入ください。特にエピソードがない場合は特になしに○をお付けください。

1. ストレス*	9. 眼科の病気*
2. 感冒	10. 全身の手術*
3. 発熱	11. 眼科の手術*
4. 睡眠不足	12. 点眼薬の中止*
5. 肩こり	13. 点眼薬の開始*
6. 疲労	14. その他の誘因*
7. 気候の変わり目*	15. 特になし
8. 全身的な病気*	(* : 具体的なことも記入してもらう)

表 2 再発要因の集計結果

・疲労 : 22(69%)
・睡眠不足 : 10(31%)
・肩こり : 10(31%)
・ストレス : 9(28%)
・気候の変わり目 : 9(28%)
・眼科の手術 : 6(19%)
・発熱 : 5(16%)
・眼科の病気 : 4(13%)
・特に誘因なし : 4(13%)
・その他の誘因, 感冒 : 各 2(6%)
・全身的な病気, 点眼の中止, 全身の手術 : 各 1(3%)

は疲労が 69%, 睡眠不足は 31%, 肩こりが 31%, ストレスが 28%, 気候の変わり目が 28% と続いていた(表 2)。上位 3 者はいずれも疲労に関連するもので, ストレスと回答したものは 9 であった。その内容はイライラ, 介護, 仕事, 実父の死亡, 車の運転, 孫の世話, 母の病気, 引越し, 詳細不明が各々 1 項目であった。気候の変わり目との回答は 9 で複数回答があった。その内容は春 3, 春から初夏 3, 8 月頃 3, 秋 1, 冬 2 であった。眼科手術の回答は 6 (複数回答あり), 角膜移植 3, 緑内障 2, 白内障 2, 網膜剥離 1 であった。眼科の病気の回答は 4, 角膜炎 1, 緑内障 1, 詳細不明 2 であった(表 2)。

ストレスとしては種々のものがあり, 季節としては春から夏にかけて多かった。ストレス蛋白質がヘルペス再活性化に関与する報告<sup>12)</sup>は以前からあり, 再発防止にはストレスを避けることが重要であることが判明した。

表 3 強角膜内の HSV DNA 陽性率と DNA 量

	HSV DNA 陽性率 (陽性症例/総症例)	HSV DNA 量 (平均値±標準誤差コピー/mg)
ホスト角膜 角膜ヘルペス既往(+)	85.7% (6/7)	$1.6 \pm 1.5 \times 10^4$
ホスト角膜 角膜ヘルペス既往(-)	10.8% (4/37)	$8.7 \pm 7.9$
ドナー角膜	5.7% (4/70)	$4.9 \pm 3.4 \times 10^2$
ドナー強膜	8.6% (3/35)	$10.6 \pm 6.3$

HSA: 単純ヘルペスウイルス (文献 10 から転載, 改変)

表 4 角膜ヘルペスの既往のないホスト角膜 37 眼中で HSV を検出した 4 眼の HSV DNA 量

移植術前の診断名	HSV DNA 量 (コピー/mg)	移植術後の 角膜ヘルペスの再発
1. アルカリ腐食	32.36	+
2. 水疱性角膜症 (レーザー虹彩切開術後)	0.98	-
3. 角膜白斑	0.96	-
4. 水疱性角膜症 (全層角膜移植術後 9 か月)	0.54	-

(文献 10 から転載, 改変)

実際, よく再発する患者に対しては規則的な生活を送ることを薦めている. さらに, 角膜ヘルペス患者に対する生活指導としては疲労を避けることが重要であると考えられた.

上記結果は 4,000 例を超える皮膚ヘルペスの調査結果とも符号する<sup>3)</sup>. また湿度および気温の低下に伴い, ヘルペス再発回数が有意に増加すると吉野ら<sup>4)</sup>が報告している.

### III ヒト角膜における HSV DNA 量

HSV1 型(HSV-1)は角結膜に初感染後, 三叉神経節に潜伏感染<sup>5)</sup>, さまざまな誘因により再活性化され角膜ヘルペスの再発を引き起こす<sup>6)</sup>.

我々<sup>7)</sup>は以前に, 角膜ヘルペスの既往がある症例において, 20 眼中 10 眼で潜伏感染ウイルスを認めた, と報告した. 一方, Cantin ら<sup>8)</sup>は, 角膜ヘルペス既往 11 眼中 8 眼, 角膜ヘルペス非既往 11 眼中 4 眼で, polymerase chain reaction(PCR)法にて HSV-1 DNA を認めたと報告している. また, Kaye ら<sup>9)</sup>は, 角膜ヘルペス既往症例 51 眼中 42 眼の 82%, 角膜ヘルペス非既往症例 55 眼中 12 眼の 22% で, PCR 法にて HSV-1 DNA を認めたと報告している.

今回, 我々<sup>10)</sup>は, 角膜移植手術時に得られたホスト角膜, および移植に用いたドナー角膜の残りの部分(輪部強角膜部分)における HSV DNA 量を real-time PCR 法を用いて定量し, さらに角膜ヘルペス最終発症から角膜移植までの期間と HSV ゲノム数の関係を調べた.

対象は, 角膜ヘルペス既往のあるホスト角膜 7 眼, 角

膜ヘルペス既往のないホスト角膜 37 眼, 輸入ドナー角膜 70 眼, 輸入ドナー強膜 35 眼である. これらを real-time PCR 法に供した. real-time PCR 法の設定値は 95°C 10 分間, 97°C 20 秒間, 58°C 1 分間を 5 サイクル, 96°C 20 秒間, 58°C 1 分間を 45 サイクルとし, プライマー, プローブのシーケンスは我々の従来の報告<sup>11)~15)</sup>どおりである.

角膜ヘルペスの既往のあるホスト角膜では, 7 眼中 6 眼(85.7%)に平均  $1.6 \times 10^4$  コピー/mg, 角膜ヘルペスの既往のないホスト角膜では 37 眼中 4 眼(10.8%)に平均 8.7 コピー/mg を検出し, 検出量に有意差を認めた(表 3). ドナー角膜片では, 70 眼中 4 眼(5.7%)に平均  $4.9 \times 10^2$  コピー/mg, ドナー強膜片において 35 眼中 3 眼(8.6%)に平均 10.6 コピー/mg を検出した(表 3).

角膜ヘルペスの既往のないホスト角膜 37 眼中で, HSV DNA を検出した 4 眼について詳細に検討すると, 角膜移植手術前の診断名がアルカリ腐食であった症例では 32.36 コピー/mg, レーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症で 0.98 コピー/mg, 角膜白斑で 0.96 コピー/mg, 全層角膜移植術後 9 か月の水疱性角膜症で 0.54 コピー/mg であった. これらのうち, アルカリ腐食眼のみで, 移植術後の角膜ヘルペスの再発を認めた(表 4).

図 1 は角膜ヘルペスの既往のあるホスト角膜 7 眼に関して, 角膜ヘルペスの最終発症から角膜移植術施行までの期間と, HSV DNA 量の関係を調査した結果である. 最終発症から 120 か月, すなわち 10 年以上経過した症例では, 角膜内に HSV DNA は全く検出されず, また現在まで再発も認めていない. 最終発症から短期間で移

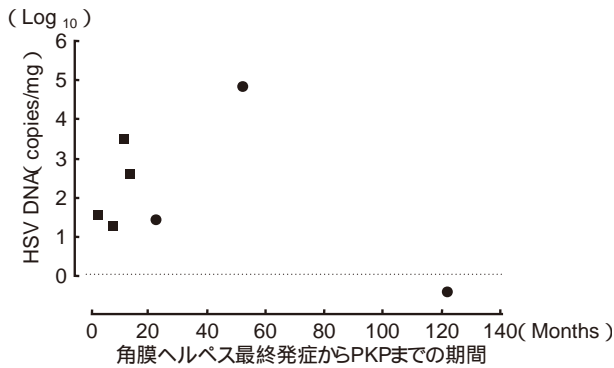


図 1 角膜ヘルペスの最終発症から角膜移植術施行までの期間と HSV DNA 量。

- : 移植術後に角膜ヘルペス再発を認めた症例。
- : 移植術後に角膜ヘルペス再発を認めていない症例。
- PKP : 全層角膜移植術 (文献 10 から転載, 改変)

植を行った場合, 再発しやすい傾向が認められた。

我々は, 角膜移植時に得られた宿主角膜を用いて, はじめてヒト角膜内の HSV DNA 量を real-time PCR 法により定量し, 角膜ヘルペスの既往のある宿主角膜では, 多くの HSV DNA が角膜中に存在することを証明した(表 3)。これらが HSV-1 の角膜潜伏感染にかかわっているのか否かに関しては, 現在 *in situ* hybridization 法を使って検討中である。角膜ヘルペスの既往のない宿主角膜でも約 10% に HSV DNA を認め, HSV DNA 量が最も多かった症例のみ, 角膜ヘルペスを発症した(表 4)。また, 最後の角膜ヘルペス発症から 20 か月以内に移植手術を施行した場合にのみ術後に角膜ヘルペス再発を認め, 20 か月以降に移植手術を施行した症例では術後の再発を認めなかった(図 1)事象は, ホスト角膜中の HSV DNA 量と術後の角膜ヘルペス発症の相関を示唆しているものと推察された。さらに, 角膜ヘルペス発症から短期間で移植を行った場合, ヘルペスが再発しやすいことが判明した。

輸入ドナー角膜からは 35 眼中 3 眼(6%)においてウイルス DNA が検出され, これは過去の報告での 2%~38%<sup>16)~18)</sup>と一致する。ドナー角膜の HSV-1 による移植片不全が報告されており<sup>19)</sup>, ドナー角膜の HSV DNA 量を検討することは临床上, 非常に重要である。

以上の結果から, ホスト角膜とドナー角膜の HSV DNA 量が, 予防的抗ウイルス薬投与の指標となることが示唆された。

#### IV 眼科手術前後における涙液中 HSV DNA の定量

HSV-1 は粘膜あるいは皮膚に初感染後, 粘膜病変形成を伴うことなく唾液中, 涙液中などに排泄されることがあり, これを無症候性排泄<sup>20)~24)</sup>という。

Kaufman ら<sup>21)</sup>は 70 眼中 8 眼の涙液中に培養法にて HSV-1 が検出されたと報告し, 一方, Kaye ら<sup>22)</sup>は 48 眼について調べ, HSV-1 は全く検出されなかったと報告している。また近年, Kaufman ら<sup>24)</sup>は real-time PCR 法を用いて, 無症候性排泄について検討している。彼らの報告では, 明らかな活動性角膜ヘルペスのない成人 50 名を対象に, 連続 30 日間涙液と唾液サンプルを採取し, 涙液からは 2,806 サンプル中 941 サンプル(33.5%), 唾液からは延べ 2,723 サンプル中 1,020 サンプル(37.5%)から HSV DNA が検出され, 期間中に一回以上 HSV DNA が検出されたのは 50 眼中 49 眼であったと報告している<sup>24)</sup>。

また眼科手術後, 特に角膜移植術後に角膜ヘルペスが再発することがあり<sup>25)~28)</sup>, 注意を要する。

以上の背景をもとに, 我々は real-time PCR 法を用いて, 眼科手術前後における涙液中 HSV DNA の定量を行い, 眼科手術侵襲が無症候性排泄に与える影響を検討した。

対象は, 平成 18 年 5 月から 10 月までの 6 か月間に, 片眼のみに眼科手術を施行した 58 例(男性 23 例, 女性 35 例)で, 年齢は平均値±標準偏差: 63.4±12.3 歳(25 歳~84 歳)であった。術式の内訳は, 超音波白内障吸引術+眼内レンズ挿入術(PEA+IOL)が 20 例 20 眼, 経毛様体扁平部硝子体切除術(PPV)が 22 例 22 眼, 全層角膜移植術(PKP)が 16 例 16 眼であった。

インフォームド Consent を行ったうえで, 患者の両眼に対し, 非術眼から術眼の順に, 術前日, 術翌日, 術 1 週後に準清潔操作下にピペットを用いて生理食塩水 500  $\mu$ l にて眼表面を wash し, 再度ピペットにて涙液サンプルを滅菌チューブに回収した。ピペットチップは各眼で交換し, DNA 抽出までは -80°C で凍凍保存した。

回収した涙液サンプルを 140  $\mu$ l に調整し, QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA mini kit (Qiagen Inc., Valencia, California, USA)を用いて DNA を抽出した。Real-time PCR の方法は, 我々の既存の報告<sup>10)~15)</sup>どおりである。各術式間, ならびに各術式における術前後の HSV DNA 量の有意差は Mann-Whitney U test を用いて解析した。

表 5 に全症例の結果を示した。検出感度以下は 0 とし, 0 であったものは含まずに平均値を算出した。

術眼の術前では, HSV DNA 陽性サンプルは 58 サンプル中 9 サンプル(検出率 15.6%), 平均 HSV DNA 量は  $2.02 \times 10^4$  コピー/サンプルであった。術後では 116 サンプル中 14 サンプル(12.1%),  $6.73 \times 10^4$  コピー/サンプルで, 術前後の間に有意差を認めなかった ( $p > 0.05$ )。非術眼においても, 術前平均  $7.94 \times 10^4$  コピー/サンプル, 術後平均  $8.62 \times 10^3$  コピー/サンプルの DNA が検出された。HSV DNA 陽性サンプルは全 348 サンプル中 43 サンプル(12.4%), 平均  $3.67 \times 10^4$  コピー/サンプルであった。

表 5 術前後の HSV DNA 量

	術前	術後	計
術眼	9/58(15.6%) ( $2.02 \pm 5.58$ ) $\times 10^4$	14/116(12.1%) ( $6.73 \pm 1.08$ ) $\times 10^4$	23/174(13.2%) ( $4.89 \pm 9.28$ ) $\times 10^4$
非術眼	4/58(6.90%) ( $7.94 \pm 14.7$ ) $\times 10^4$	16/116(13.8%) ( $8.62 \pm 26.2$ ) $\times 10^3$	20/174(11.5%) ( $2.28 \pm 6.91$ ) $\times 10^4$
計	13/116(11.2%) ( $3.84 \pm 9.09$ ) $\times 10^4$	30/232(12.9%) ( $3.60 \pm 8.06$ ) $\times 10^4$	43/348(12.4%) ( $3.67 \pm 8.28$ ) $\times 10^4$

表の上段はサンプル数を示し、下段の単位はコピー (平均値 $\pm$ 標準偏差)/サンプルである。

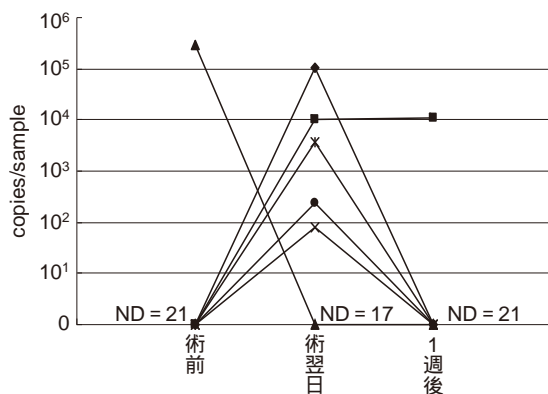


図 2 経毛様体扁平部硝子体切除術 (PPV) 非術眼の HSV DNA 量。

術翌日に検出コピー数が増加する傾向がみられた。  
ND: HSV DNA 非検出眼数。

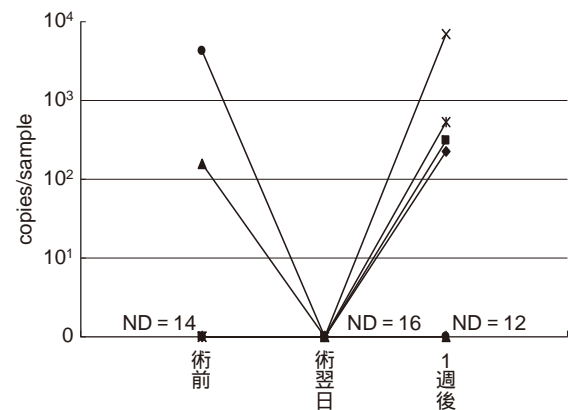


図 3 全層角膜移植術 (PKP) 術眼の HSV DNA 量。

手術翌日に検出コピー数がいったん減少し、1 週後に検出サンプル数が増加する傾向がみられた。

ND: HSV DNA 非検出眼数。

PEA+IOL, PPV, そして PKP の術前と術後の間、および術眼と非術眼間で HSV DNA 量に有意差を認めなかった (データは示していない)。図 2 は PPV 非術眼の検出 HSV DNA コピー数を示している。術翌日に検出コピー数が増加する傾向がみられた。この事象の解釈は論議のあるところで、PPV 術を施行したことにより、僚眼の角膜内に存在する潜伏ウイルス<sup>7)29)</sup>が再活性化したのではないかと推察する。しかしながら術眼においてはその傾向がなく、今後の検討の余地があると判断する。一方、図 3 は PKP 術眼の検出コピー数を示し、手術翌日に検出コピー数がいったん減少し、1 週後に検出サンプル数が増加する傾向が認められた。PKP の場合、角膜潜伏感染ウイルス<sup>7)29)</sup>が手術によりいったん除去されることが、HSV DNA コピー数の変化となった要因の一つと考察する。

活動性の角膜ヘルペスのないものを対象とした、涙液中における HSV-1 あるいは HSV DNA の検出に関する論文<sup>20)~24)</sup>は過去に数篇報告されているが、検出率は 1% 前後と低いものであった<sup>20)~23)</sup>。しかし Kaufman ら<sup>24)</sup>の real-time PCR 法を用いた報告では、HSV DNA の検出率は 33.5% と高く、検出コピー数についても 24,000 コピー以上のものが 21% と非常に高いものであった。今

回の我々の結果を比較した場合、我々の検討では全症例の平均検出コピー数  $3.67 \times 10^4$  コピー/サンプル (表 5) で、彼らの報告とほぼ同程度であった。

しかし、検出率に関しては、我々の検討では 348 サンプル中 43 サンプル (12.4%) であり、彼らの報告と比較して低い結果となった。この原因として、我々の症例では、術前および術後の点眼薬により、涙液が wash out されている可能性があると考えられる。また Kaufman ら<sup>24)</sup>はサンプル採取を綿棒によるスワブ法を用いて施行しており、この方法は我々の用いた eye wash 法と比較すると組織侵襲が大きく、HSV-1 の再活性化を促した可能性もある<sup>30)</sup>。

角膜ヘルペス既往のある患者に対して角膜移植術を施行した場合<sup>25)~28)</sup>、術後にアミクロビル (ACV) やバラシクロビル (VCV) 内服などを処方し、角膜ヘルペス再発の予防に努める<sup>28)</sup>が、今回の結果では、白内障手術においては、術前後に検出率および平均 DNA コピー数とも有意差を認めなかった。しかし、角膜移植術後では術 1 週後に、また、硝子体手術後の僚眼においても術翌日に HSV-1 DNA の検出率と平均コピー数が増加する傾向がみられたことから、角膜移植術のみでなく硝子体手術に際しても、角膜ヘルペスの既往の有無にかかわら

表 6 対象のサンプル採取病変

症例	既往歴	サンプル採取 1	サンプル採取 2
1. 60 歳女性		昭和 60 年 2 月 口唇ヘルペス	昭和 62 年 1 月 眼瞼ヘルペス
2. 56 歳男性		昭和 60 年 11 月 26 日 右 樹枝状角膜炎	同日 左 地図状角膜炎
3. 10 歳女性		昭和 61 年 12 月 26 日 右 上眼瞼水疱	同日 右 涙液 (角膜病変はなし)
4. 39 歳男性	左 PKP	昭和 62 年 1 月 5 日 右 地図状+実質型角膜ヘルペス	同日 左 実質型角膜ヘルペス
5. 72 歳女性	平成 4 年 8 月 右 PKP	平成 5 年 8 月 20 日 右 上皮型+実質型角膜ヘルペス	平成 7 年 6 月 20 日 右 上皮型角膜ヘルペス
6. 77 歳男性	平成 7 年から左上皮型および実質型角膜ヘルペスを年 2~3 回再発	平成 11 年 4 月 12 日 左 栄養障害性角膜潰瘍	平成 12 年 12 月 18 日 左 地図状角膜炎
7. 38 歳男性	平成 10 年 10 月, 両眼に角膜ヘルペス	平成 15 年 3 月 25 日 左 樹枝状角膜炎	平成 15 年 5 月 6 日 左 樹枝状角膜炎

ず、角膜ヘルペスの発症に注意を要すると考えられた。

## V 可変領域の塩基配列による HSV-1 株の判別

HSV 病変の特徴の一つとして、再発を繰り返すことがあげられる。HSV が初感染後に潜伏感染し、そして同じ HSV 株が再発病変を引き起こすと考えられてきた<sup>31)~33)</sup>。しかし、初感染時のものとは異なる株による再感染、すなわち superinfection が性器ヘルペスにおいて報告され<sup>33)34)</sup>、また眼科領域においては、Remeijer ら<sup>35)36)</sup>が、異なる株が再発の原因となる場合があることを報告した。彼らは US1, US10, US11, US12 領域内の可変領域を PCR 法にて増幅し、その PCR 産物の長さにより株の相違を検討している。その結果、全層角膜移植術が、superinfection の危険因子になりうると報告している<sup>35)</sup>。

今回我々は、臨床サンプルから得られた HSV-1 に関し、HSV-1 株間で遺伝子多型の頻度が高いとされている UL23 領域<sup>37)</sup>と US1 領域<sup>38)</sup>の塩基配列を PCR direct sequence 法<sup>39)</sup>にて決定し、HSV-1 株の判別を行った。サンプル採取は、採取時期、採取眼、採取部位(眼瞼と涙液、眼瞼と口唇)を変えて行った。

対象は、急性期ヘルペス性疾患例 7 例、男性 4 例、女性 3 例、年齢は平均値±標準偏差: 50.3±23.1 歳であった。各症例から 2 サンプルずつ、計 14 サンプルを採取した。

症例 1 では、異なる時期に口唇および眼瞼からウイルス分離を行った。症例 2 では、同じ日に左右の角膜から、症例 3 では、同じ日に眼瞼と涙液から、症例 4 では、同じ日に左右の角膜からウイルス分離を施行した。症例 5 では、異なる時期に右角膜より計 2 回、症例 6 では、異なる時期に左角膜よりウイルス分離を行った。症

例 7 では、異なる時期に左眼から、eye wash 法によりサンプルを採取した(表 6)。

HSV-1 株間で遺伝子多型の頻度が高いとされている、UL23<sup>37)</sup>(全長 1,131 bp)と US1<sup>38)</sup>(全長 1,263 bp)の塩基配列を PCR direct sequence 法にて決定し、各症例、2 サンプルずつから得られた HSV-1 株間で比較した。

症例 1 から 6 まで、各症例得られた 2 つの HSV-1 株間に、UL23 領域でも US1 領域でも多型を認めなかった。すなわち、塩基配列がすべて一致し、同一の株であった。症例 7 では、得られた 2 つの HSV-1 株間に、UL23 領域と US1 領域で 1 塩基多型を認めた。

症例 7 は 38 歳男性。平成 10 年 10 月、両眼を角膜ヘルペスに罹患。右眼は計 5 回の手術を施行していた。平成 15 年 3 月 25 日、左眼に樹枝状角膜炎を認めた。バルトレックス®(塩酸バルトレックス)2 錠/日を処方するも軽快せず、TFT(trifluorothymidine)の点眼を開始したところ、4 月 22 日には点状表層角膜炎のみとなった。しかし、5 月 6 日に左眼に樹枝状角膜炎が再発した。既往歴としてアトピー性皮膚炎がある。

平成 15 年 3 月 25 日と 5 月 6 日に左眼から涙液を採取し、得られた HSV-1 を PCR direct sequence 法に供した。図 4 は UL23 領域の塩基配列の結果で、2 株間で太字で示した 1 塩基のみ多型を認めた。図 5 は US1 領域の塩基配列の結果で、UL23 領域と同様に、2 株間で太字で示した 1 塩基のみ多型を認めた。

今回の検討では、症例 7 のみ、UL23 と US1 とともに株間で 1 塩基の違いを認めた。Remeijer ら<sup>35)</sup>の報告では、片眼性の再発性角膜ヘルペス 17 症例に対し、時期を異にして得られた HSV-1 株が同一株であるかどうかを、PCR によって得られた増幅産物の長さにより比較検討し、17 症例中 5 例で、再発時は異なる株によるもので

平成15年3月25日

TCAGTTAGCCTCCCCATCTCCCGGGCAAACGTGCGCGCCAGGTCGCAGATCGTCGGTATGGAGCCTGGGGTGGTGACGTGG  
 GTCTGGACCATCCCGGAGGTAAGTTGACGAGGGCGTCCCGGACGCGGGGGGCGATTGGTCGTAATCCAGGATAAAAGACG  
 TGCATGGGACGGAGCGTTTGGCCAAGACGTTCCAAGGCCAGGCAAAACACGTTATACAGGTCGCCCTGGGGGGCAGCAAC  
 TCGGGGGCCCGAAACAGGTAATAACGTGTCCCGATGTGGGGTCTGGGGCCCGCTTGTCTGGGGCTCGGCACCTGGG  
 GCGGCACGGCCGTCCCGAAAGCTGTCCCAATCTCCCGCCACGACCCCGCCCTCGAGATACCCGACCCGATTGGCAAG  
 CAGCCCGTAAACCGCGGAATCGCGGCCAGCATAGCCAGGTTCAAGCCGCTCGCCGGGGCGCTGGCGTTTGGCCAGGGCGTC  
 GATGTGTCTGTCTCCGGAAGGGCCCCAACACGATGTTTGTGCCGGGCAAGGTCGGCCGGATGAGGGCCACGAACGCCAG  
 CACGGCTGGGGGGTTCATGCTGCCATAAAGTATCGCGCGCCGGGTAGCACAGGAGGGCGGCATGGGATGGCGGTCGAA  
 GATGAGGGTGGAGGGCCGGGGCGGGGCATGTGAGCTCCAGCCTCCCCCGATATGAGGAGCCAGAACGGCGTCGGTAC  
 GGCATAAAGGCATGCCATTGTTATCTGGGGCGTTGTCAATACCACCGCCGCTCCCGGCCGATATCTACCCCTGGTCGAGG  
 CGGTGTGTGTGGTGTAGATGTTCCGCGATTGTCTCGGAAGCCCCAGCACCCGCCAGTAAAGTCATCGGCTCGGGTACGTAGA  
 CGATATCGTCGCGCGAACCAGGGCCACCAGCAGTTGCGTGGTGGTGGTTTTCCCATCCCGTGGGGACCGTCTATATAAAC  
 CCGCAGTAGCGTGGGCATTTTCTGCTCCGGGGCGACTTCCGTGGCTTCTGCTGCCGGCGAGGGCGCAACGCCGTACGTCCG  
 TTGCTATGGCCGCGAGAACCGCGACGCTGGTCAACGCAGACGCGTGTGATGGCCGGGGTACGAAGCCAT

5月6日

TCAGTTAGCCTCCCCATCTCCCGGGCAAACGTGCGCGCCAGGTCGCAGATCGTCGGTATGGAGCCTGGGGTGGTGACGTGG  
 GTCTGGACCATCCCGGAGGTAAGTTGACGAGGGCGTCCCGGACGCGGGGGGCGATTGGTCGTAATCCAGGATAAAAGACG  
 TGCATGGGACGGAGCGTTTGGCCAAGACGTTCCAAGGCCAGGCAAAACACGTTATACAGGTCGCCCTGGGGGGCAGCAAC  
 TCGGGGGCCCGAAACAGGTAATAACGTGTCCCGATGTGGGGTCTGGGGCCCGCTTGTCTGGGGCTCGGCACCTGGG  
 GCGGCACGGCCGTCCCGAAAGCTGTCCCAATCTCCCGCCACGACCCCGCCCTCGAGATACCCGACCCGATTGGCAAG  
 CAGCCCGTAAACCGCGGAATCGCGGCCAGCATAGCCAGGTTCAAGCCGCTCGCCGGGGCGCTGGCGTTTGGCCAGGGCGTC  
 GATGTGTCTGTCTCCGGAAGGGCCCCAACACGATGTTTGTGCCGGGCAAGGTCGGCCGGATGAGGGCCACGAACGCCAG  
 CACGGCTGGGGGGTTCATGCTGCCATAAAGTATCGCGCGCCGGGTAGCACAGGAGGGCGGCATGGGATGGCGGTCGAA  
 GATGAGGGTGGAGGGCCGGGGCGGGGCATGTGAGCTCCAGCCTCCCCCGATATGAGGAGCCAGAACGGCGTCGGTAC  
 GGCATAAAGGCATGCCATTATTATCTGGGGCGTTGTCAATACCACCGCCGCTCCCGGCCGATATCTACCCCTGGTCGAGG  
 CGGTGTGTGTGGTGTAGATGTTCCGCGATTGTCTCGGAAGCCCCAGCACCCGCCAGTAAAGTCATCGGCTCGGGTACGTAGA  
 CGATATCGTCGCGCGAACCAGGGCCACCAGCAGTTGCGTGGTGGTGGTTTTCCCATCCCGTGGGGACCGTCTATATAAAC  
 CCGCAGTAGCGTGGGCATTTTCTGCTCCGGGGCGACTTCCGTGGCTTCTGCTGCCGGCGAGGGCGCAACGCCGTACGTCCG  
 TTGCTATGGCCGCGAGAACCGCGACGCTGGTCAACGCAGACGCGTGTGATGGCCGGGGTACGAAGCCAT

図 4 症例 7 の UL23 領域(全長 1,131 bp)の塩基配列.

多型部位を太字で示した. 平成 15 年 3 月 25 日サンプルと 5 月 6 日サンプルで 1 塩基の違いを認めた.

平成15年3月25日

ATGGCCGACATTTCCCGAGGCGCTTTTGTGCCTTGTGTA AAAAGCGCGGGCGTCCCGCTCTCCGATCCCCGCTCTGGGCACGCG  
 CAAGCGCAAGCGCCCTGCCCGCCCCCTCTCATCGGAGTCTGAGGTGCGAAACCGGATAACAGCCTTGGAGTCTGAGGTGCAATCC  
 GAGACAGCATCGGATTCGACCGAGTCTGGGGACCAGGAGGAAGCCCCCGCATCGGTGGCCGTAGGGCCCCCGGAGGCTT  
 GGGGGCGGTTTTTTCTGGACATGTCCGGCGGAATCCACCAGGGGACGGAAACGGATGCGTCCGGTGTCCGACACCCCGAC  
 GACACGTCGCGACTGGTCTTTGTGACGACATTCCCCACGACCCAAAGCGGGCCGGGTAAACCTGCGGCTCACTAGCTCTCCCG  
 ATCGGGGGGATGGGGTATTTTTCCCTAAGATGGGGCGGGTCCGGTCTACCCGGGAAACGACGCCCGGGCCCCACCCCGTC  
 GGCCCCAAGCCCAATGCAATGTCCGGCGCTCGGTCGCGCCAGGCCAGAGGGCGAGCAGCGCACGATGGACCCCCGACCT  
 GGGCTACATGCGCCAGTGTATCAATCAGCTGTTTCCGGTCTGCGGGTTCGCCCCGGACCCCCACGGCAGTGCCAAACCGCTT  
 CGCCACCTGATACGCGACTGTTACCTGATGGGATACTGCCAGCCCGCTGCGCCCCGCGCACGTTGGTCCCGCTTCTGTCAG  
 GTGTCCGGCGGAACCTGGGGCATGCACTGCGCAACACCATAACGGGAGGTGGAGGCTCGATTGACGCCACCCGAGAACC  
 GTGTGCAAGCTTCTTTGTTGGAGGCCAGACGGTACCGGCCGCGAGTGTGATCTTAGTAATCTCGAGATTCATCTCAGCGCGA  
 CAAGCGATGATGAAATCTCCGATGCCACCGATCTGGAGGCCCGGGTTCGGACCACACGCTCGCCTCCAGTCCGACACCGA  
 GGATGCCCCCTCCCCGTTACGCTGGAACCCAGAACCCCGCGGGTCCCTCGCTGTGCGTCTGGAGGATGAGTTGGGGAG  
 TTTGACTGGACCCCCAGGAGGGTCCCAGCCCTGCTGTGCGGTCTGGCCGATACCAGTCCGTGGAACGCCCGGGCC  
 CATCCGATCTGGGGCGGGTTCGCGCCGCAAGAGCCGCAAGTGTCTGGACGGGTGCCGGAAAATGCGCTTCTCCACCGCCTT  
 CCCATCCGTGACGCGACACGTTTCTCCGGCCGTA

5月6日

ATGGCCGACATTTCCCGAGGCGCTTTTGTGCCTTGTGTA AAAAGCGCGGGCGTCCCGCTCTCCGATCCCCGCTCTGGGCACGCG  
 CAAGCGCAAGCGCCCTGCCCGCCCCCTCTCATCGGAGTCTGAGGTGCGAAACCGGATAACAGCCTTGGAGTCTGAGGTGCAATCC  
 GAGACAGCATCGGATTCGACCGAGTCTGGGGACCAGGAGGAAGCCCCCGCATCGGTGGCCGTAGGGCCCCCGGAGGCTT  
 GGGGGCGGTTTTTTCTGGACATGTCCGGCGGAATCCACCAGGGGACGGAAACGGATGCGTCCGGTGTCCGACACCCCGAC  
 GACACGTCGCGACTGGTCTTTGTGACGACATTCCCCACGACCCAAAGCGGGCCGGGTAAACCTGCGGCTCACTAGCTCTCCCG  
 ATCGGGGGGATGGGGTATTTTTCCCTAAGATGGGGCGGGTCCGGTCTACCCGGGAAACGACGCCCGGGCCCCACCCCGTC  
 GGCCCCAAGCCCAATGCAATGTCCGGCGCTCGGTCGCGCCAGGCCAGAGGGCGAGCAGCGCACGATGGACCCCCGACCT  
 GGGCTACATGCGCCAGTGTATCAATCAGCTGTTTCCGGTCTGCGGGTTCGCCCCGGACCCCCACGGCAGTGCCAAACCGCTT  
 CGCCACCTGATACGCGACTGTTACCTGATGGGATACTGCCAGCCCGCTGCGCCCCGCGCACGTTGGTCCCGCTTCTGTCAG  
 GTGTCCGGCGGAACCTGGGGCATGCACTGCGCAACACCATAACGGGAGGTGGAGGCTCGATTGACGCCACCCGAGAACC  
 GTGTGCAAGCTTCTTTGTTGGAGGCCAGACGGTACCGGCCGCGAGTGTGATCTTAGTAATCTCGAGATTCATCTCAGCGCGA  
 CAAGCGATGATGAAATCTCCGATGCCACCGATCTGGAGGCCCGGGTTCGGACCACACGCTCGCCTCCAGTCCGACACCGA  
 GGATGCCCCCTCCCCGTTACGCTGGAACCCAGAACCCCGCGGGTCCCTCGCTGTGCGTCTGGAGGATGAGTTGGGGAG  
 TTTGACTGGACCCCCAGGAGGGTCCCAGCCCTGCTGTGCGGTCTGGCCGATACCAGTCCGTGGAACGCCCGGGCC  
 CATCCGATCTGGGGCGGGTTCGCGCCGCAAGAGCCGCAAGTGTCTGGACGGGTGCCGGAAAATGCGCTTCTCCACCGCCTT  
 CCCATCCGTGACGCGACACGTTTCTCCGGCCGTA

図 5 症例 7 の US1 領域(全長 1,263 bp)の塩基配列.

多型部位を太字で示した. 平成 15 年 3 月 25 日サンプルと 5 月 6 日サンプルで 1 塩基の違いを認めた.

あったと報告している.

一方我々は、症例 1 では、異なる時期に口唇および眼  
 瞼から、症例 2, 4 では、同じ日に左右角膜から、症例  
 3 では、同じ日に眼瞼と涙液から、症例 5, 6, 7 では、  
 Remeijer ら<sup>35)36)</sup>の報告のように、異なる時期に片眼角膜  
 より計 2 回、サンプルを採取し、PCR direct sequence  
 法にて検討した。その結果、症例 7 のみ UL23 と US1

とも、得られた 2 株間で 1 塩基の違いを認め、この 2 株  
 が異なる株である可能性が示された。しかし、各遺伝子  
 部位で 1 塩基、計 2 塩基のみの多型であり、既に感染し  
 ていた HSV-1 株が体内で変異を起こしたとも考えられ  
 る。2 株の採取時期が近いこと、同一株である可能性も  
 否定できない。今後、他の遺伝子領域での塩基配列の比  
 較が必要であると考えられる。



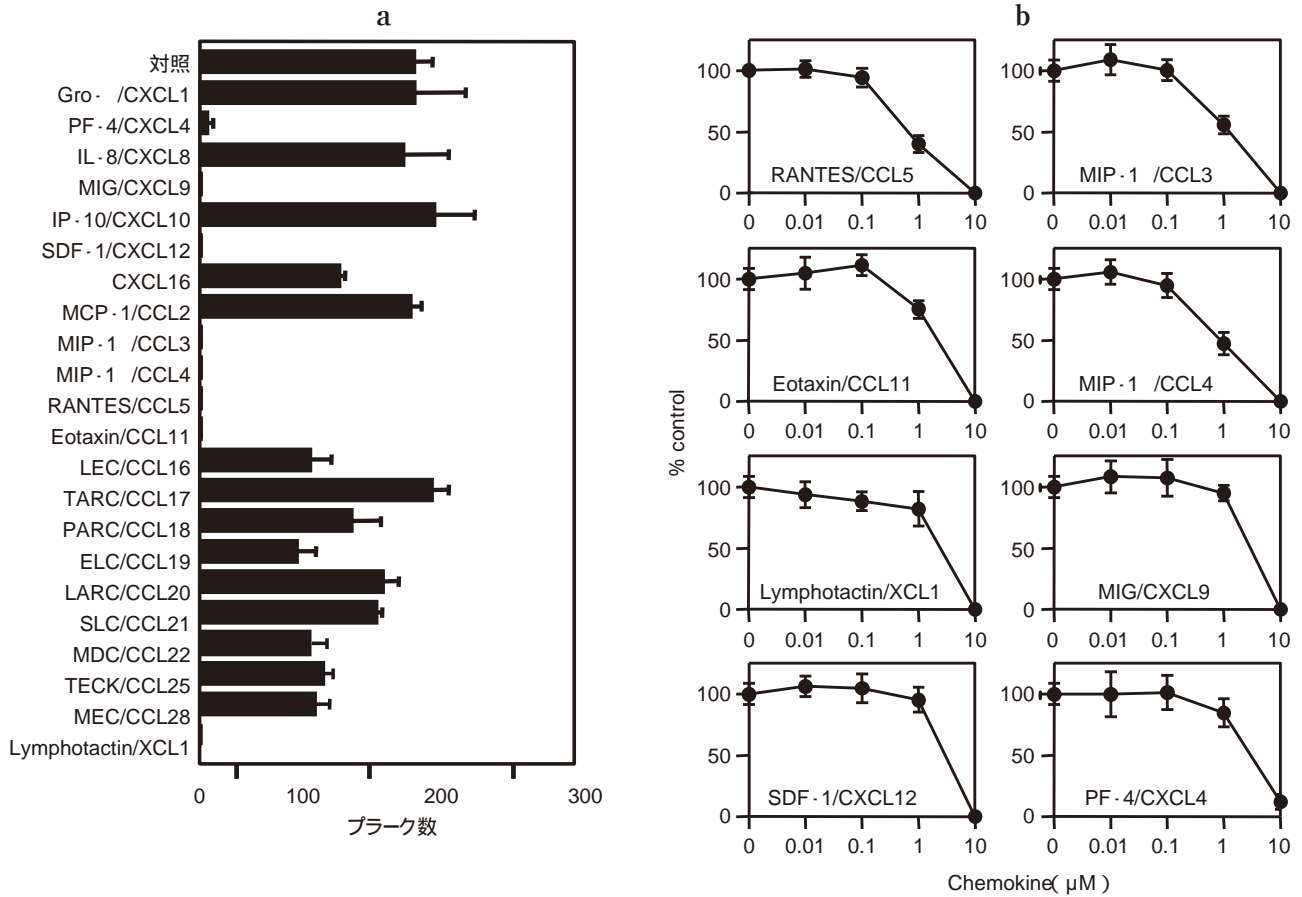


図 6 ケモカインによる抗 HSV-1 活性の網羅的解析.

a : 22 のヒトケモカインの抗 HSV-1 活性の網羅的解析を行った. HSV-1 ( $6 \times 10^2$  PFU/ml) を各種ケモカイン ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) で  $37^\circ\text{C}$ , 1 時間処理し, Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞) に感染させプラーク形成能を評価した ( $n=3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差).

b : 抗 HSV-1 活性を示したケモカイン 8 種類について, 各種ケモカインの濃度を 0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$  で抗 HSV-1 活性を同様に検討した ( $n=3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差).

PF : platelet factor, IL : interleukin, MIG : monokine induced by interferon  $\gamma$ , IP : interferon  $\gamma$ -inducible protein, SDF : stromal cell-derived factor, MCP : monocyte chemoattractant protein, MIP : macrophage inflammatory protein, LEC : liver-expressed chemokine, TARC : thymus activation-regulated chemokine, PARC : pulmonary and activation-regulated cytokine, ELC : EBI-1-ligand chemokine, LARC : liver and activation-regulated chemokine, SLC : secondary lymphoid tissue chemokine, MDC : macrophage-derived chemokine, TEC : thymus-expressed chemokine, MEC : mucosae-associated epithelial chemokine.

## VI HSV-1 に対するケモカインの抗ウイルス活性の検討

ケモカインは, 塩基性でヘパリン結合性の強い低分子分泌蛋白質 (サイトカイン) 群で, 7 回膜貫通 G 蛋白質共役型の受容体を介して作用する. ケモカインは, 炎症における細胞遊走因子という枠を超え, リンパ系組織の形成, 維持および免疫応答にも重要な役割を果たしている<sup>40)41)</sup>. 近年, ケモカインの新たな機能として抗菌活性が報告された<sup>42)~47)</sup>が, 現在のところケモカインのエンペローウイルスに対する抗ウイルス活性についての詳細は不明である. そこで, HSV-1 に対するケモカインの抗ウイルス活性について検討した.

プラーク解析を指標に, 各種ケモカインによる HSV-1 感染抑制効果を網羅的に解析した (図 6a). HSV-1 (McKrae 株) の増殖と力価測定は Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞) を用いて行った<sup>48)49)</sup>. ケモカインによる HSV-1 の直接的な抗ウイルス効果を検討するために, HSV-1 ( $6 \times 10^2$  PFU) を各種ケモカイン ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) で  $37^\circ\text{C}$ , 1 時間前処理して Vero 細胞に感染させプラーク形成能を評価した. 22 のケモカインのうち 8 つのケモカインに HSV-1 の Vero 細胞への感染抑制効果がみられた. それらは macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, eotaxin/CCL11, platelet factor (PF)-4/CXCL4, monokine induced by interferon  $\gamma$  (MIG)/CXCL9, stromal cell-

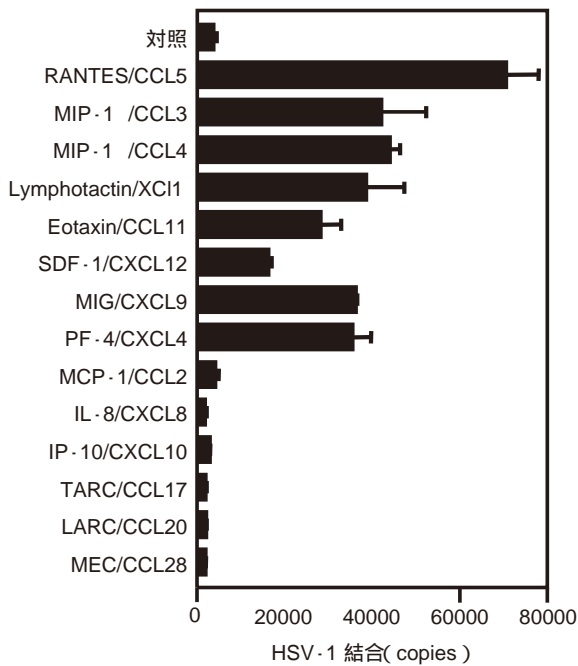


図 7 ケモカインと HSV-1 の結合.

96 穴プレートに 14 のケモカインを固層化し、そこに HSV-1 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml) を  $50 \mu\text{l}$  加え  $37^\circ\text{C}$ 、1 時間の培養を行い、非結合ウイルスを洗浄した後、ケモカインに結合した HSV-1 粒子を回収し、それを鋳型として HSV-1 UL30 gene 部位の real-time polymerase chain reaction (PCR) を行い、ウイルスコピー数を同定した ( $n = 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差)。

derived factor (SDF)-1/CXCL12, lymphotactin/XCL1 である。これら 8 つのケモカインは、HSV-1 の Vero 細胞への感染を濃度依存的に抑制した (図 6b)。

次にケモカインの HSV-1 との結合について検討した。抗 HSV-1 活性を示したケモカインを Vero 細胞に前処理しても、HSV-1 の Vero 細胞への感染抑制効果は認められなかった (データは示していない)。この結果は、ケモカインによる抗 HSV-1 効果が Vero 細胞を介してではなく、HSV-1 への直接作用を介して誘導されることを示唆する。そこで、ケモカインの HSV-1 との直接結合について検討した (図 7)。96 穴プレートにケモカインを固層化し、そこに HSV-1 を加え、ケモカインに結合した HSV-1 粒子を以前に報告した方法<sup>30)</sup>に従い HSV-1 UL30 gene に対する real-time PCR を用いて同定した。その結果、抗 HSV-1 活性を示した 8 つのケモカインは、直接 HSV-1 と結合することが明らかとなった。

さらに、ケモカインのエンベロップ蛋白質への結合部位同定のため、HSV-1 と抗 gB 抗体、抗 gC 抗体、抗 gD 抗体、抗 gE 抗体、抗 gG 抗体、抗 gP 抗体または対照としてマウス抗 IgG 抗体 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を用いてそれぞれ室温、15 分間培養した。そのサンプル溶液とケモカインを共培養し、非結合ウイルスを洗浄し、ケモカインに結合した HSV-1 粒子を同様に real-time PCR を行い

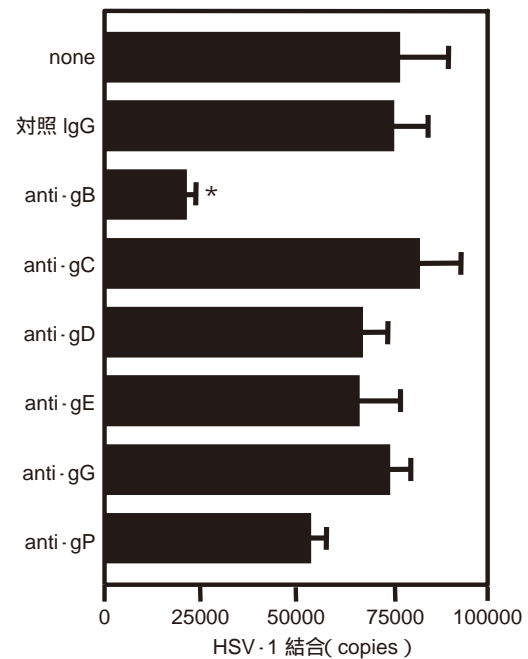


図 8 RANTES/CCL5 とエンベロップ蛋白質 gB を介した HSV-1 の結合解析.

エンベロップ蛋白質への結合部位同定のため、HSV-1 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml) と抗 gB 抗体、抗 gC 抗体、抗 gD 抗体、抗 gE 抗体、抗 gG 抗体、抗 gP 抗体または対照としてマウス抗 IgG 抗体 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) をそれぞれ室温、15 分間 ( $50 \mu\text{l}/\text{well}$ ) 培養した。そのサンプル溶液と RANTES/CCL5 を共培養し、非結合ウイルスを洗浄し RANTES/CCL5 に結合した HSV-1 粒子を回収し、それを鋳型として HSV-1 UL30 gene 部位の real-time PCR を行い、ウイルスコピー数を同定した ( $n = 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差)。Student's t test, \* :  $p < 0.05$ 。

(文献 52 から転載、改変)

同定した。図 8 に HSV-1 の RANTES/CCL5 に対する結合への影響を示す。エンベロップ蛋白質 gB に対する中和抗体を添加することで RANTES/CCL5 と HSV-1 との結合が優位に阻害された。これらの結果から、抗菌や抗真菌活性をもつケモカインと抗 HSV-1 活性をもつケモカインには大きな相違があることが分かった。Interferon  $\gamma$ -inducible protein (IP)-10/CXCL10, mucosa-associated epithelial chemokine (MEC)/CCL28, liver and activation-regulated chemokine (LARC)/CCL20 などのケモカインは抗菌および抗真菌作用をもつことが報告されている<sup>42)43)47)</sup>が、今回これらのケモカインは抗 HSV-1 活性をもたないことが明らかとなった (図 6)。逆に、抗 HSV-1 活性が認められた MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5 は、基本的には抗菌活性をもたないことが報告されている<sup>42)43)47)</sup>。ケモカインの抗菌活性には陽イオン電荷の関与が考えられており<sup>42)~47)</sup>、電荷の相互作用により細菌や真菌などの細胞膜表面に選択的に結合すると推測される<sup>43)47)</sup>。しかしながら、MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 は例外的にイオン電荷をもた

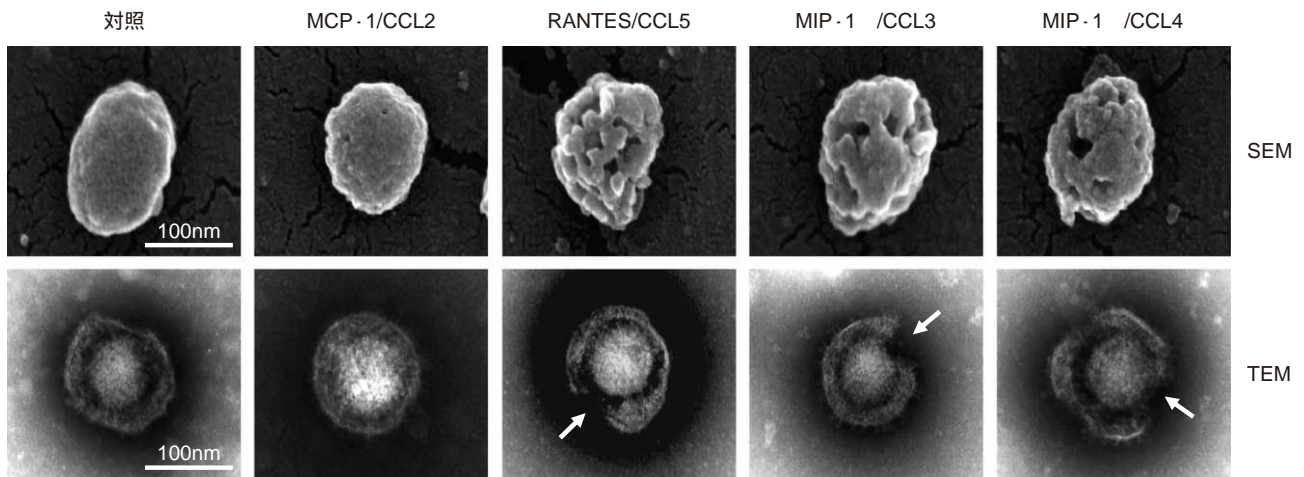


図 9 ケモカイン処理した HSV-1 粒子の電子顕微鏡解析.

HSV-1 溶液 (15  $\mu$ l,  $1 \times 10^{11}$  PFU/ml) を各種ケモカイン (1  $\mu$ M) で 37°C, 1 時間培養した. その溶液をサンプル液とし, 走査型 (SEM, 上) と透過型 (TEM, 下) 電子顕微鏡で観察した. それぞれのサンプルから, 少なくとも 200 粒子を観察した. 矢印はウイルスのエンベロープを示す. (文献 52 から転載, 改変)

ないケモカインである. これらの電荷の相違が, ケモカインの細菌, 真菌あるいは HSV-1 への結合機序の違いの一つと考えられる. さらに, エンベロープウイルスの場合, ウイルスのエンベロープ蛋白質は基本的に宿主細胞の膜蛋白質であるので, 電荷の相違はほとんどない. このことから抗 HSV-1 活性が認められたケモカインのエンベロープウイルスへの結合部位は, 抗菌および抗真菌作用をもつケモカインの細菌あるいは真菌への結合部位と異なることが示唆される.

最近, Yasin ら<sup>51)</sup> は,  $\theta$  デフェンシンがエンベロープ蛋白質 gB に結合し HSV-1 による感染を抑制することを報告している. 本研究でも, 抗 HSV-1 活性をもつケモカインはエンベロープ蛋白質 gB に結合することが明らかとなった (図 8).

ケモカインの HSV-1 粒子構造への影響を調べるため, ケモカイン処理した HSV-1 粒子を走査型と透過型電子顕微鏡により観察した (図 9). HSV-1 溶液 (15  $\mu$ l,  $1 \times 10^{11}$  PFU/ml) を各種ケモカイン (1  $\mu$ M) で 37°C, 1 時間処理し, その溶液をサンプル液とし 2% glutaraldehyde (Wako, Osaka, Japan) で 4°C, 一晚固定した<sup>52)</sup>. 走査型電子顕微鏡解析により, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL-4, RANTES/CCL5 で処理した HSV-1 粒子の最も大きな特徴として, エンベロープ表面にさまざまな大きさの穴の形成が認められた. Phosphate buffered saline (PBS) あるいは monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/CCL2 (陰性対照) で処理した HSV-1 粒子の表面はほとんど滑らかであった. 透過型電子顕微鏡解析により, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5 で処理した HSV-1 粒子において, より顕著にエンベロープでの大きな穴の形成が確認された.

そこで, より生理的な条件下でのケモカインの抗

HSV-1 効果を検討するため, 以前に報告した方法に準じて<sup>49)</sup> マウス実質型角膜ヘルペス (HSK) モデルを構築し, RANTES/CCL5 の 1 回点眼投与の影響を調べた. ジエチルエーテルによる麻酔後, 角膜上皮を 27 ゲージ針にて 5 回擦過し, 右眼には PBS, 左眼には HSV-1 溶液 (McKrae 株,  $1 \times 10^4$  PFU/eye) を 5  $\mu$ l 滴下した. PBS, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2 を各々 (1  $\mu$ g/2  $\mu$ l) 1 回点眼し, 臨床症状の経時的变化を観察した (図 10a). 角膜混濁の程度を, 0 から 5 までの 6 段階で評価した<sup>53)</sup>. 図 10b に, マウス HSK (感染後 14 日目) の前眼部写真および角膜組織像 (ヘマトキシリンとエオジンにより染色) を示す. RANTES/CCL5 の点眼処理したマウスの角膜は, 角膜擦過のみの対照群とほぼ同様に透明性を保っており, 角膜組織像にもほぼ異常を認めなかった. PBS と MCP-1/CCL2 の点眼処理したマウスの角膜は, 角膜の浮腫や細胞浸潤による混濁, 角膜輪部からの新生血管など, HSK の典型的臨床所見がみられ, 組織学的にも, 角膜実質内に多数の白血球浸潤が確認された.

次に, 感染後 3, 7, 10 日目の涙液中 (5  $\mu$ l の PBS eye wash) の HSV-1 濃度を経時的に測定した (図 11a). RANTES/CCL5 の点眼処理した HSK マウスの涙液中の HSV-1 濃度は, PBS と MCP-1/CCL2 の点眼処理したマウスに比べ優位に感染後 3 日目から減少していることが分かった. RANTES/CCL5 以外の抗 HSV-1 活性をもつ 7 つのケモカイン (図 6a) についても同様に, 感染後 3 日目の涙液中において HSV-1 濃度は減少していた (図 11b). 以上のことから HSV-1 感染後の速やかな RANTES/CCL5 点眼は, 直接的に HSV-1 を破壊し, 感染により誘導される炎症反応を阻止できる可能性が示唆された.

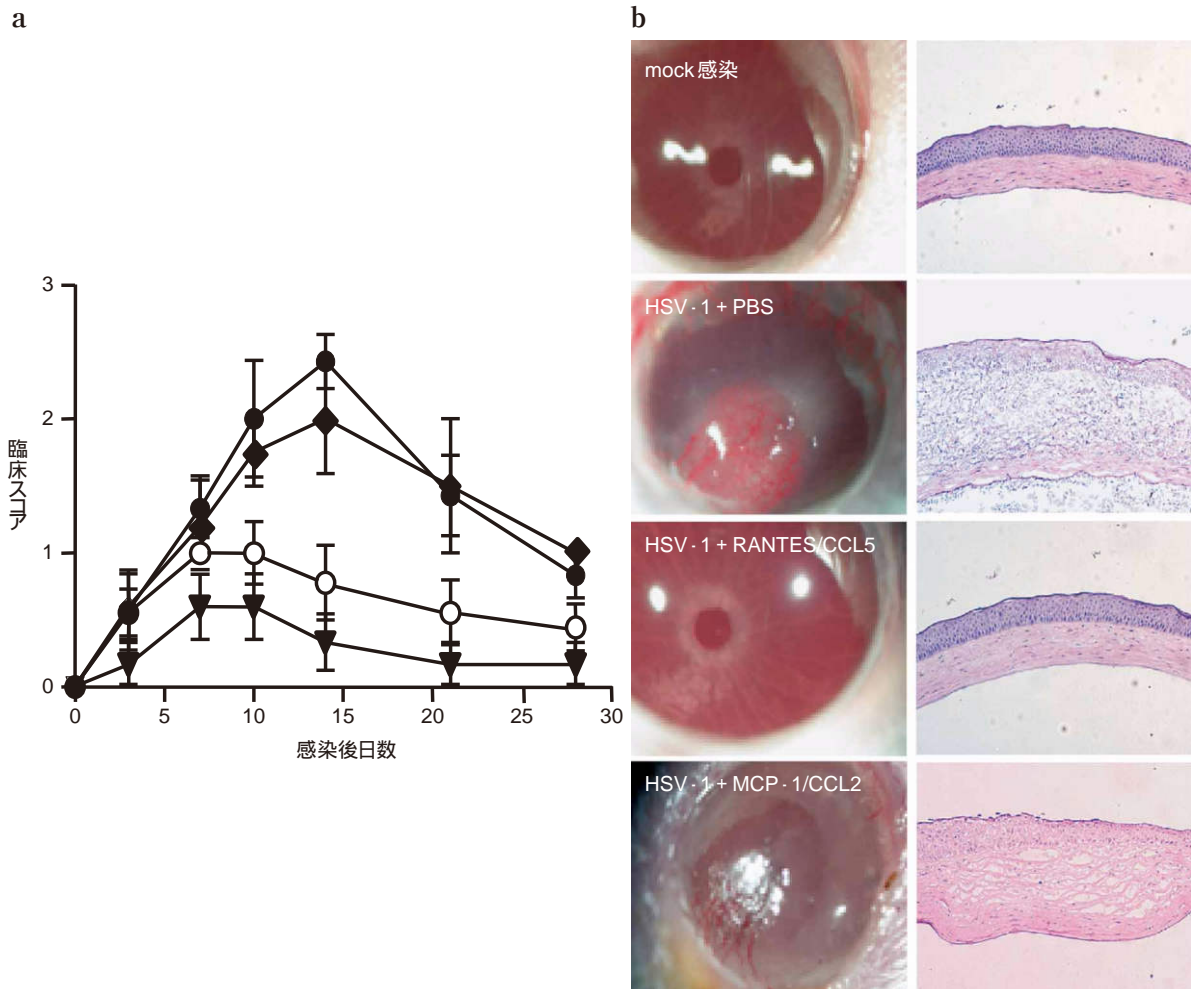


図 10 マウス実質型角膜ヘルペス(HSK)モデルにおけるケモカインの抗 HSV-1 活性(その 1).  
 a : 臨床症状の経時変化(感染後 3, 7, 10, 14, 21, 28 日)を追った.  
 ▼ : mock 感染. HSV-1 感染後に PBS(●), RANTES/CCL5(○), MCP-1/CCL2(◆)を点眼投与した.  
 臨床スコア 0 : 角膜透明, +1 : 軽度角膜混濁, +2 : 中等度角膜混濁, +3 : 重度角膜混濁(虹彩透見可能), +4 : 重度角膜混濁(虹彩透見不可能), +5 : 壊死性角膜実質炎(n=2, 平均値±標準誤差).  
 b : BALB/c マウスに HSV-1 (McKrae 株)(各 n=14)を感染させ, phosphate buffered saline (PBS), RANTES/CCL5 あるいは MCP-1/CCL2 を各々 1 回点眼し, 感染後 14 日目の前眼部写真および角膜組織像である.

## Ⅶ 新しい抗ウイルス薬の再活性化抑制

現在, HSV または帯状疱疹ウイルスによる全身感染症に対しては, アシクロビル(ACV)<sup>54)</sup>, ファンシクロビル(Famciclovir, FCV)<sup>55)</sup>, バラシクロビル(VCV)<sup>56)</sup>, ペンシクロビル(Penciclovir, PCV)<sup>57)</sup>などが有効と考えられる.

しかし, 角膜ヘルペスに対しては, 本邦では ACV 眼軟膏とイドクスウリジン(Iododeoxyuridine, IDU)点眼のみ使用可能である. ACV 眼軟膏の副作用として角膜上皮障害があげられ, また眼軟膏による霧視のためコンプライアンスが悪い場合がある. 一方 IDU 点眼は, ACV 眼軟膏に比べ治療効果が劣る, 細胞毒性が強い, 1 時間ごとの点眼が必要, などの原因により使用される頻度は非常に低い. そこで我々は, ACV に Val 基を付

けて作製された ACV のプロドラッグである VCV の上皮型角膜ヘルペスに対する効果を検討した.

塩酸 VCV は, ACV の経口吸収性を改善したプロドラッグであり, 投与後速やかに消化管より吸収された後, 活性代謝物である ACV に変換され, その生物学的利用率は ACV の約 5 倍といわれている.

ACV 眼軟膏から VCV 内服に変更した症例を提示する. 症例は 61 歳男性. 平成 12 年 2 月, 左眼を指で突いて以来, 再発性角膜びらんを繰り返していた. 平成 14 年 6 月 25 日, 左眼の偽樹枝状角膜炎を発症し, ACV 眼軟膏投与にて約 10 日後に治癒した. しかし, この際, コンプライアンスが悪く, ACV 眼軟膏による霧視があり, 非常に点入しにくいとの訴えがあった. 既往歴として, 昭和 42 年に両眼眼球熱傷となり, 左眼は矯正視力 1.0 に回復したものの, 右眼球摘出術を受けている.

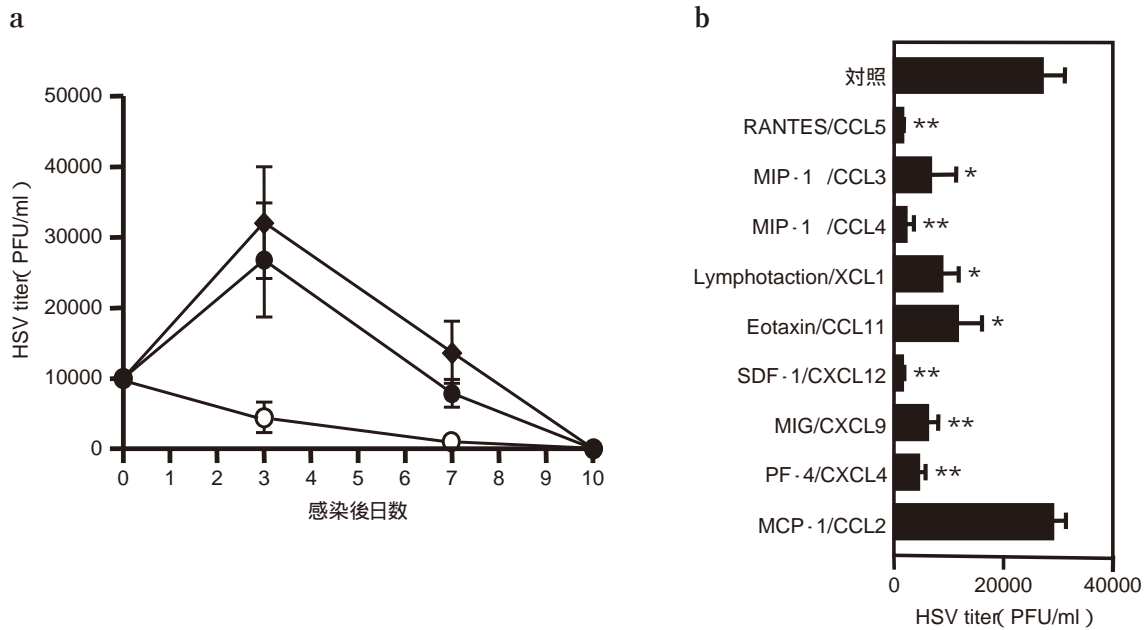


図 11 マウス HSK モデルにおけるケモカインの抗 HSV-1 活性(その 2).

- a : 涙液中の HSV-1 濃度の経時的測定(感染後 3, 7, 10 日)を行った. HSV-1 感染後(各 n=14)に PBS(●), RANTES/CCL5(○), MCP-1/CCL2(◆)を点眼投与した. (n=2, 平均値±標準誤差).
- b : 感染後 3 日目の涙液中の HSV-1 濃度測定を行った. HSV-1 感染後(各 n=5)に各種点眼投与(n=2, 平均値±標準誤差). Student's t test, \* : p<0.05, \*\* : p<0.01.

平成 16 年 2 月 17 日に左眼視力低下, 眼痛にて再来院. 左眼に樹枝状角膜炎を認めた. eye wash 法にて涙液採取し, real-time PCR 法<sup>10)~15)</sup>に供した. HSV DNA 量は  $1.0 \times 10^3$  コピー/サンプルであった. ACV 眼軟膏による治療は難しいと考え, 塩酸 VCV 内服(500 mg)2 錠を 7 日間, レボフロキサシン点眼を処方した. VCV 内服 7 日後には HSV DNA 量は測定感度以下となり, 角膜病変は消失した.

本症例により, VCV 内服が角膜ヘルペスに対して有用である可能性が示され, 角膜上皮障害の強い症例, 角膜移植術後症例やコンプライアンスの悪い症例などに対して VCV を内服処方してもよいと考えられる.

次に, 急性期および再活性化時における VCV を含めた抗ウイルス薬の角膜ヘルペスに対する治療効果を, マウスモデルを用いて検討した(図 12). 特に, 従来の抗ウイルス薬の治療効果を判定する際, 急性感染時の効果を判定していたが, 今回は再活性化時における抗ウイルス効果を判定調査した.

BALB/c マウスの両眼の角膜上皮を 27 1/2 G の注射針にて double scratch によって擦過し, HSV-1 McKrae 株 ( $5.0 \times 10^3$  PFU/eye) を接種した.

計 6 群にマウスを分類し, VCV 内服 50 mg/kg 1 日 2 回, VCV 内服 100 mg/kg 1 日 2 回, ACV 内服 50 mg/kg 1 日 5 回, 3% ACV 眼軟膏(Eye Ointment, EO) (参天製薬株式会社, 大阪)1 日 5 回, 3% ACV 点眼(Drop) (東亜薬品株式会社, 富山)1 日 5 回, 各群 23 匹ずつ,

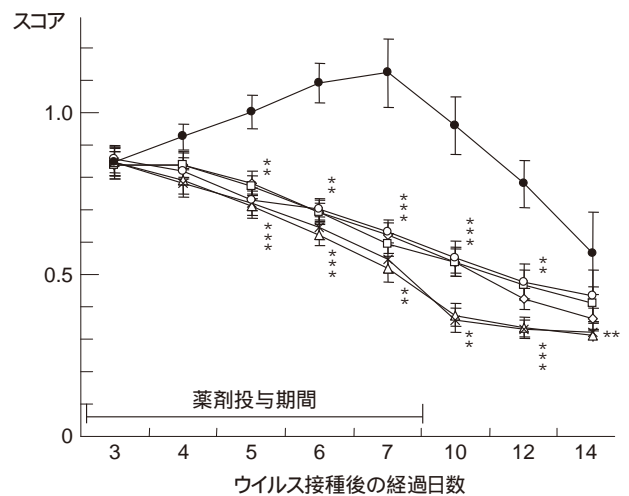


図 12 上皮型ヘルペスに対する治療効果.

- ◇ : アシクロビル(ACV)50 mg, □ : パラシクロビル(VCV)50 mg, △ : VCV 100 mg, × : 3% ACV 眼軟膏(EO), ○ : 3% ACV 点眼(Drop), ● : PBS. 平均値±標準誤差.
  - \* : PBS に対して有意差を認めた(p<0.01).
  - \*\* : PBS に対して有意差を認めた(p<0.05).
- (文献 15 から転載)

プラセボ投与群 28 匹に 1 日 5 回投与を行った. 各薬剤は, ウイルス接種 3 日後より 5 日間投与した.

薬剤の効果を測定するため, 細隙灯顕微鏡下で角膜を観察し, ウイルス接種 3 日, 4 日, 5 日, 6 日, 7 日, 10 日, 12 日, 14 日後に角膜の状態を評価した. 角膜上皮

表 7 角膜上皮障害スコア表

0.0: 上皮障害を認めない.  
 0.5: 点状表層角膜炎を認める.  
 1.0: 上皮全体の樹枝状角膜炎が角膜の 1/4 未満を占める.  
 1.5: 上皮全体の樹枝状角膜炎が角膜の 1/4 以上を占める.  
 2.0: 地図状角膜炎が角膜に認める.

これらの評価は、細隙灯顕微鏡とフルオレセイン染色を用いて行った。(文献 15 から転載)

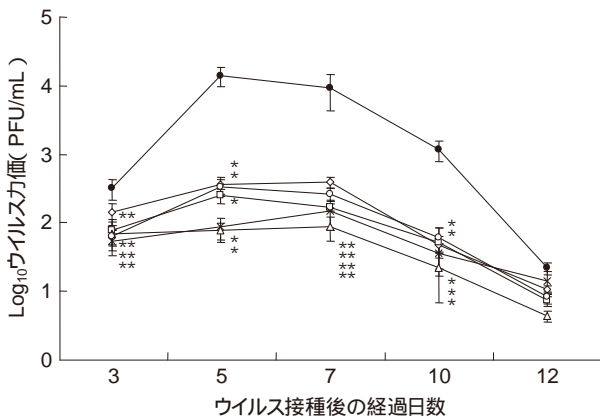


図 13 急性期の眼球ウイルス力価.

—◇—: ACV 50 mg, —□—: VCV 50 mg,  
 —△—: VCV 100 mg, —×—: 3% ACV EO, —○—  
 : 3% ACV Drop, —●—: PBS. 平均値 ± 標準誤差.  
 \* : PBS に対して有意差を認めた ( $p < 0.01$ ).  
 \*\* : PBS に対して有意差を認めた ( $p < 0.05$ ).  
 Y 軸に眼球のウイルス力価の平均値 ( $n = 6$ ) を示す.  
 (文献 15 から転載)

障害スコアは表 7 のとおりである.

眼球, 三叉神経節のウイルス力価を plaque assay により, そして三叉神経節の HSV DNA 量を real-time PCR 法<sup>10)~15)</sup>により求めた.

ウイルス接種 28 日後に潜伏感染が成立したマウスを, 再活性化群と再活性化なしの群に分類した. 再活性化法は, まずサイクロフォスファミド 200 mg/kg を腹腔内注射し, 72 時間後に同薬剤を同量, 腹腔内投与した. その 24 時間後にデキサメタゾン 16 mg/kg を腹腔内注射, 4 時間後に 43°C の温水中にマウスを 10 分間浸け, 乾燥させた. そして, 急性期の検討と同様に, 眼球, 三叉神経節のウイルス力価, 三叉神経節の HSV DNA 量を定量した.

すべての薬剤群はプラセボ投与群と比較して, ウイルス接種 5, 6, 7, 10, 12, 14 日後に, 有意 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) に上皮型ヘルペスに対する効果を認めた (図 12).

眼球の plaque assay による検討では, VCV 内服 50 mg/kg 群, VCV 内服 100 mg/kg 群, 3% ACV 点眼群, 3% ACV 眼軟膏群は, ウイルス接種 3, 5, 7, 10 日後に, 有意にウイルス力価が低かった (図 13). 三叉

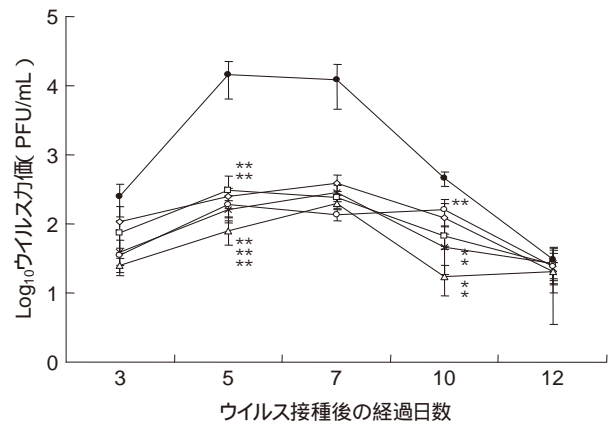


図 14 急性期の三叉神経節ウイルス力価.

—◇—: ACV 50 mg, —□—: VCV 50 mg,  
 —△—: VCV 100 mg, —×—: 3% ACV EO, —○—  
 : 3% ACV Drop, —●—: PBS. 平均値 ± 標準誤差.  
 \* : PBS に対して有意差を認めた ( $p < 0.01$ ).  
 \*\* : PBS に対して有意差を認めた ( $p < 0.05$ ).  
 Y 軸に三叉神経節のウイルス力価の平均値 ( $n = 6$ ) を示す.  
 (文献 15 から転載)

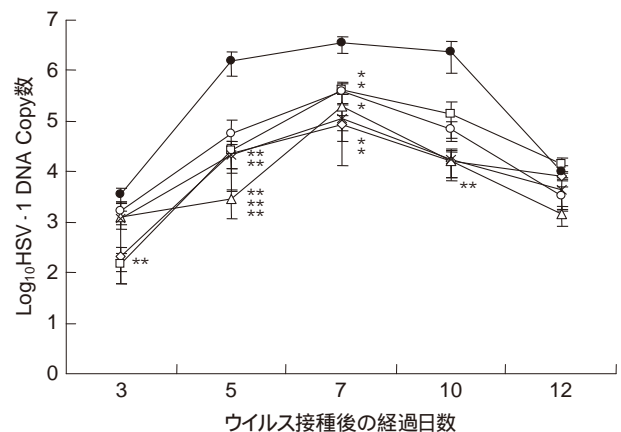


図 15 急性期の三叉神経節 HSV DNA 量.

—◇—: ACV 50 mg, —□—: VCV 50 mg,  
 —△—: VCV 100 mg, —×—: 3% ACV EO, —○—  
 : 3% ACV Drop, —●—: PBS. 平均値 ± 標準誤差.  
 \* : PBS に対して有意差を認めた ( $p < 0.01$ ).  
 \*\* : PBS に対して有意差を認めた ( $p < 0.05$ ).  
 Y 軸に三叉神経節の HSV DNA 量の平均値 ( $n = 6$ ) を示す.  
 (文献 15 から転載)

神経節では, すべての薬剤投与群がウイルス接種 5, 10 日後に, プラセボ投与群と比較して有意に抗ウイルス作用を示した (図 14).

Real-time PCR 法による三叉神経節の HSV DNA コピー数の検討では, すべての薬剤投与群で, ウイルス接種 5, 7 日後に, プラセボ投与群と比較して有意に HSV DNA 量が少なかった (図 15).

再活性化時の各薬剤群における眼球, 三叉神経節ウイルス力価の検討では, プラセボ群と比較して各薬剤投与

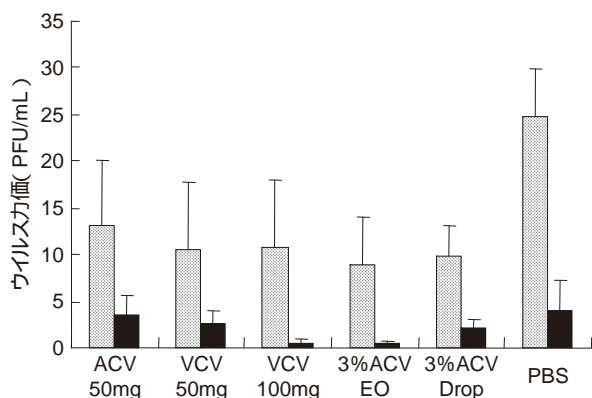


図 16 再活性化時および潜伏感染時の各薬剤における眼球ウイルス力価。

X 軸に各薬剤群における再活性化群と潜伏感染群を示し、Y 軸に眼球のウイルス力価の平均値 ± 標準誤差を示す。

□：再活性化群，■：潜伏感染群。

(文献 15 から転載)

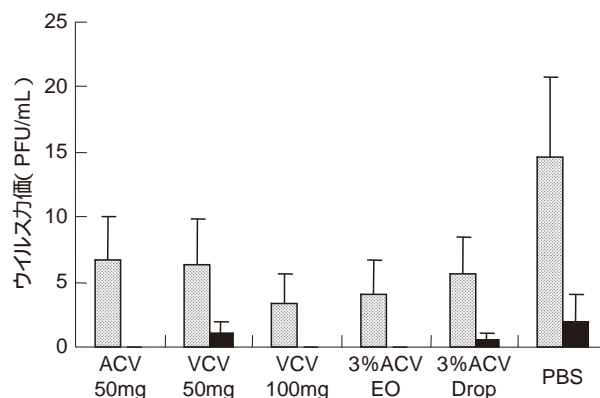


図 17 再活性化時および潜伏感染時の各薬剤における三叉神経節ウイルス力価。

X 軸に各薬剤群における再活性化群と潜伏感染群を示し、Y 軸に三叉神経節のウイルス力価の平均値 ± 標準誤差を示す。

□：再活性化群，■：潜伏感染群。

(文献 15 から転載)

表 8 再活性化時および潜伏感染時の三叉神経節における HSV DNA 量

薬剤	ACV* 50 mg	VCV 50 mg	VCV 100 mg	3% ACV EO	3% ACV Drop	PBS*
再活性化群	46.9 ± 12.9	38.9 ± 15.5	25.8 ± 8.0	19.9 ± 9.5	52.6 ± 30.3	122.4 ± 39.7
潜伏感染群	9.8 ± 7.4	27.7 ± 10.8	24.9 ± 12.2	14.8 ± 12.0	22.4 ± 13.2	12.6 ± 8.9

三叉神経節 100 ng 中における DNA コピー数を示す(平均値 ± 標準誤差)。

\*：再活性化群と潜伏感染群との比較にて有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

(文献 15 から転載)

群は、ウイルスの再活性化を抑制する傾向を認めたが、有意差は認めなかった(図 16, 17)。潜伏感染時、VCV 100 mg/kg 群において、眼球でウイルスを少量のみ(図 16)認めたが、三叉神経節では認めなかった(図 17)。

Real-time PCR 法による検討では、ACV 内服 50 mg/kg 群、プラセボ群で有意 ( $p < 0.05$ ) に再活性化群の三叉神経節中 HSV DNA 量が潜伏感染群よりも多かった。しかし、VCV 内服 50 mg/kg 群、VCV 内服 100 mg/kg 群、3% ACV 眼軟膏群、3% ACV 点眼群の各薬剤群では、再活性化群と潜伏感染群間で、HSV DNA 量に有意差を認めなかった(表 8)。

今回の結果(図 12~17, 表 8)から、HSV-1 急性感染期の抗ウイルス薬投与により、その後の潜伏感染がある程度阻止され、そして再活性化ウイルス量が減少するのではないかと考えられた。このことは、Loutsch ら<sup>58)</sup>の家兎での報告と合致する。また、マウスでは潜伏感染期には、HSV-1 の涙液中への無症候性排泄が認められないと報告されており<sup>59)</sup>、我々の実験でもこのことが確認された(図 16)。

現在、本邦における臨床の場において上皮型角膜ヘルペスに対しては、ACV 眼軟膏が第一選択薬であるが、角膜上皮障害、霧視などが問題とされる。ACV 内服は、1 日 5 回の内服が必要で、また上皮型ヘルペスに対

してその使用が適応外である。さらに、ACV は水に難溶であるため、ACV は点眼液として使用できる pH では溶解困難で、本研究では眼軟膏と同じ濃度の懸濁点眼液として用いたが、現時点では実用化に至っていない。海外では TFT<sup>60)~62)</sup>が上皮型角膜ヘルペスに対し用いられているが、本邦では認可されていない。VVACV (Val-Val-ACV)点眼<sup>63)</sup>の開発も行われ、*in vivo* では良好な成績をあげているが、臨床応用には時間を要するであろう。

以上の結果から、VCV 内服は上皮型角膜ヘルペスに対して有効であることが判明し、今後 1 日 2 回の内服というコンプライアンスの良さとウイルス再活性化を抑制するという点もあわせて、角膜ヘルペスに対して有効な薬剤であると考えられた。

## VIII おわりに

ヘルペスの潜伏感染と再発の基礎的臨床的研究を基盤として、将来のヘルペス根治療法の可能性について言及した。

根治療法開発において知っておくべき重要な因子に再発因子が存在する。本稿ではアンケートにより臨床的再発因子を調査し、疲労、睡眠不足を避けることが重要であることが判明した。

従来、角膜ヘルペス発症において HSV は神経節内に潜伏感染しているとされていたが、培養法ではなく real-time PCR 法を用いて角膜内の HSV DNA の存在を呈示し、さらに HSV 再感染の報告を含め、角膜移植時のドナー由来ヘルペス感染の可能性を示唆した。今後角膜内のウイルス DNA の局在について研究していきたい。

後半部で、ケモカインを含めた新しい抗ウイルス薬のヘルペス治療効果について基礎的研究を報告した。特に、従来の抗ウイルス薬の治療効果判定には急性感染モデルを用いていたが、我々は再活性化動物モデルを作製し、ヒトのヘルペス感染に酷似した抗ウイルス効果を検討した。今後、このようなモデルを用いることが、抗ウイルス効果判定の主流になると考えられる。

稿を終えるにあたって、宿題報告の機会を賜りました日本眼科学会評議員各位、日本眼科学会会員各位、座長の労をお取りいただいた大橋裕一教授(愛媛大学)、本研究をご支援いただきました近畿大学眼科同窓会の先生方に心から深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) **Burch AD, Weller SK** : Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase requires the mammalian chaperone hsp90 for proper localization to the nucleus. *J Virol* 79 : 10740—10749, 2005.
- 2) **Higaki S, Gebhardt B, Lukiw W, Thompson H, Hill J** : Gene expression profiling in the HSV-1 latently infected mouse trigeminal ganglia following hyperthermic stress. *Curr Eye Res* 26 : 231—238, 2003.
- 3) 永井 宏 : HSV の発症誘因としての紫外線の影響. 第 5 回ヘルペス感染症フォーラム抄録集 : 38—42, 1998.
- 4) 吉野圭子, 高村悦子, 高野博子, 荒木博子, 内田幸男 : 樹枝状角膜炎の再発に対する気温, 湿度の影響. *あたらしい眼科* 8 : 1609—1611, 1991.
- 5) **Nesburn AB, Cook ML, Stevens JG** : Latent herpes simplex virus. *Arch Ophthalmol* 88 : 412—417, 1972.
- 6) **Nesburn AB, Dickinson R, Radnoti M** : The effect of trigeminal nerve and ganglion manipulation on recurrence of ocular herpes simplex in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15 : 726—731, 1976.
- 7) **Shimomura Y, Mori Y, Inoue Y, Kiritooshi A, Ohashi Y, Manabe R** : Herpes simplex virus latency in human cornea. *Jpn J Ophthalmol* 37 : 318—324, 1993.
- 8) **Cantin EM, Chen J, McNeill J, Willey DE, Openshaw H** : Detection of herpes simplex virus DNA sequences in corneal transplant recipients by polymerase chain reaction assays. *Curr Eye Res* 10 : S15—21, 1991.
- 9) **Kaye SB, Baker K, Bonshek R, Maseruka H, Grinfeld E, Tullo A, et al** : Human herpes viruses in the cornea. *Br J Ophthalmol* 84 : 563—571, 2000.
- 10) **Shimomura Y, Deai T, Fukuda M, Higaki S, Hooper LC, Hayashi K** : Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome. *Cornea* 26 : 190—193, 2007.
- 11) **Fukuda M, Deai T, Hibino T, Higaki S, Hayashi K, Shimomura Y** : Quantitative analysis of herpes simplex virus genome in tears from patients with herpetic keratitis. *Cornea* 22 : S55—60, 2003.
- 12) **Deai T, Fukuda M, Hibino T, Higaki S, Hayashi K, Shimomura Y** : Herpes simplex virus genome quantification in two patients who developed herpetic epithelial keratitis during treatment with antiglaucoma medications. *Cornea* 23 : 125—128, 2004.
- 13) **Deai T, Fukuda M, Tomoda Y, Higaki S, Hayashi K, Shimomura Y** : Excimer laser photokeratectomy reactivates latent herpes simplex virus. *Jpn J Ophthalmol* 48 : 570—572, 2004.
- 14) **Higaki S, Itahashi M, Deai T, Fukuda M, Shimomura Y** : Effect of oral valaciclovir on herpetic keratitis. *Cornea* 25 : S64—67, 2006.
- 15) 板橋幹城 : バラシクロビル内服によるマウス上皮型角膜ヘルペスに対する効果. *近畿大学医学雑誌* 30 : 113—122, 2006.
- 16) **Garweg JG, Boehnke M** : Low rate shedding of HSV-1 DNA, but not of infectious virus from human donor corneae into culture media. *J Med Virol* 52 : 320—325, 1997.
- 17) **Morris DJ, Cleator GM, Klapper PE, Cooper RJ, Biney EO, Dennett C, et al** : Detection of herpes simplex virus DNA in donor cornea culture medium by polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 80 : 654—657, 1996.
- 18) **Sengler U, Reinhard T, Adams O, Krempe C, Sundmacher R** : Herpes simplex virus infection in the media of donor corneas during organ culture : frequency and consequences. *Eye* 15 (Pt5) : 644—647, 2001.
- 19) **Biswas S, Suresh P, Bonshek RE, Corbitt G, Tullo AB, Ridgway AE** : Graft failure in human donor corneas due to transmission of herpes simplex virus. *Br J Ophthalmol* 84 : 701—705, 2000.
- 20) **Hanna L, Jawetz E, Coleman VR** : Studies on herpes simplex. VIII. The significance of isolating herpes-simplex virus from the eye. *Am J Ophthalmol* 43 : 126—131, 1957.
- 21) **Kaufman HE, Brown DC, Ellison EM** : Recurrent Herpes in the Rabbit and Man. *Science* 156 : 1628—1629, 1967.
- 22) **Kaye SB, Madan N, Dowd TC, Hart CA, McCarthy K, Patterson A** : Ocular shedding of herpes simplex virus. *Br J Ophthalmol* 74 : 114—116, 1990.
- 23) **Okinaga S** : Shedding of herpes simplex virus type 1 into tears and saliva in healthy Japanese adults.



- Kurume Med J 47 : 273—277, 2000.
- 24) **Kaufman HE, Azcuay AM, Varnell ED, Sloop GD, Thompson HW, Hill JM** : HSV-1 DNA in Tears and Saliva of Normal Adults. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 241—247, 2005.
  - 25) **De Kesel RJ, Koppen C, Ieven M, Zeyen T** : Primary graft failure caused by herpes simplex virus type 1. *Cornea* 20 : 187—190, 2001.
  - 26) **Rezende RA, Uchoa UB, Raber IM, Rapuano CJ, Laibson PR, Cohen EJ** : New onset of herpes simplex virus epithelial keratitis after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 137 : 415—419, 2004.
  - 27) **Rezende RA, Bisol T, Hammersmith K, Hofling-Lima AL, Webster GF, Freitas JF, et al** : Epithelial herpetic simplex keratitis recurrence and graft survival after corneal transplantation in patients with and without atopy. *Am J Ophthalmol* 143 : 623—628, 2007.
  - 28) **van Rooij J, Rijneveld WJ, Remeijer L, Volker Dieben HJ, Eggink CA, Geerards AJ, et al** : Effect of oral acyclovir after penetrating keratoplasty for herpetic keratitis : a placebo-controlled multicenter trial. *Ophthalmology* 110 : 1916—1919, 2003.
  - 29) **Shimomura Y** : Reactivation and latency of herpesvirus in the eye. *Ophthalmologica* 215 : S15—24, 2001.
  - 30) **Shimomura Y, Gangarosa LP Sr, Kataoka M, Hill JM** : HSV-1 shedding by iontophoresis of 6-hydroxydopamine followed by topical epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 1588—1594, 1983.
  - 31) **Lewis ME, Leung WC, Jeffrey VM, Warren KG** : Detection of multiple strains of latent herpes simplex virus type 1 within individual human hosts. *J Virol* 52 : 300—305, 1984.
  - 32) **Asbell PA, Centifanto-Fitzgerald YM, Chandler JW, Kaufman HE** : Analysis of viral DNA in isolates from patients with recurrent herpetic keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 951—954, 1984.
  - 33) **Sakaoka H, Aomori T, Gouro T, Kumamoto Y** : Demonstration of either endogenous recurrence or exogenous reinfection by restriction endonuclease cleavage analysis of herpes simplex virus from patients with recrudescing genital herpes. *J Med Virol* 46 : 387—396, 1995.
  - 34) **Sucato G, Wald A, Wakabayashi E, Vieira J, Corey L** : Evidence of latency and reactivation of both herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 in the genital region. *J Infect Dis* 177 : 1069—1072, 1998.
  - 35) **Remeijer L, Maertzdorf J, Buitenwerf J, Osterhaus AD, Verjans GM** : Corneal herpes simplex virus type 1 superinfection in patients with recrudescing herpetic keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 358—363, 2002.
  - 36) **Remeijer L, Maertzdorf J, Doornenbal P, Verjans GM, Osterhaus AD** : Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation. *Lancet* 357 : 442, 2001.
  - 37) **Chiba A, Suzutani T, Saijo M, Koyano S, Azuma M** : Analysis of nucleotide sequence variations in herpes simplex virus types 1 and 2, and varicella-zoster virus. *Acta Virol* 42 : 401—407, 1998.
  - 38) **Maertzdorf J, Remeijer L, van Der Lelij A, Buitenwerf J, Niesters HG, Osterhaus AD, et al** : Amplification of reiterated sequences of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) genome to discriminate between clinical HSV-1 isolates. *J Clin Microbiol* 37 : 3518—3523, 1999.
  - 39) **Hu N, Shiota H** : Emergence of resistance to carbocyclic oxetanocin G in herpes simplex virus type 1 and genetic analysis of resistant mutants. *Acta Pharmacol Sin* 25 : 921—926, 2004.
  - 40) **Yoshie O, Imai T, Nomiya H** : Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 78 : 57—110, 2001.
  - 41) **Zlotnik A, Yoshie O** : Chemokines : a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12 : 121—127, 2000.
  - 42) **Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L, Strieter RM** : Cutting edge : IFN-inducible ELR-CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 167 : 623—627, 2001.
  - 43) **Hieshima K, Ohtani H, Shibano M, Izawa D, Nakayama T, Yoshie O, et al** : CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Immunol* 170 : 452—461, 2003.
  - 44) **Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J, van Veelen PA, Fang G, Poolman B, et al** : Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J Biol Chem* 275 : 20374—20381, 2000.
  - 45) **Starnes TD, Barker CK, Jia HP, Kang Y, McCray PB Jr** : CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29 : 627—633, 2003.
  - 46) **Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME** : Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 70 : 6524—6533, 2002.
  - 47) **Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, et al** : Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 74 : 448—455, 2003.
  - 48) **Hill JM, Shimomura Y, Dudley JB, Berman E, Haruta Y, Kwon BS, et al** : Timolol induces HSV-1 ocular shedding in the latently infected rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 585—590, 1987.
  - 49) **Shirane J, Nakayama T, Nagakubo D, Izawa D, Hieshima K, Shimomura Y, et al** : Corneal epithelial cells and stromal keratocytes efficiently produce CC chemokine-ligand 20 (CCL20) and attract cells expressing its receptor CCR6 in mouse herpetic stromal keratitis. *Curr Eye Res* 28 : 297—306, 2004.
  - 50) **Marquart M, Bhattacharjee P, Zheng X, Kaufman H, Thompson H, Varnell E, et al** : Ocular

- reactivation phenotype of HSV-1 strain F(MP) E, a corticosteroid-sensitive strain. *Curr Eye Res* 26 : 205—209, 2003.
- 51) **Yasin B, Wang W, Pang M, Cheshenko N, Hong T, Waring AJ**, et al : Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J Virol* 78 : 5147—5156, 2004.
- 52) **Nakayama T, Shirane J, Hieshima K, Shibano M, Shimomura Y, Yoshie O**, et al : Novel antiviral activity of chemokines. *Virology* 350 : 484—492, 2006.
- 53) **Newell CK, Martin S, Sendele D, Mercadal CM** : Rouse BTHerpes simplex virus-induced stromal keratitis : role of T-lymphocyte subsets in immunopathology. *J Virol* 63 : 769—775, 1989.
- 54) **O'Brien JJ, Campoli-Richards DM** : Acyclovir An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 37 : 233—309, 1989.
- 55) **Vere Hodge RA, Sutton D, Boyd MR, Harnden MR, Jarvest RL** : Selection of an oral prodrug (BRL 42810 : famciclovir) for the antiherpesvirus agent BRL 39123 [9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine : penciclovir]. *Antimicrob Agents Chemother* 33 : 1765—1773, 1989.
- 56) **Beauchamp LM, Krenitsky TA** : Acyclovir prodrugs : the road to valaciclovir. *Drugs Future* 18 : 619—628, 1993.
- 57) **Sutton D, Kern ER** : Activity of famciclovir and penciclovir in HSV-infected animals : a review. *Antiviral Chem Chemother* 4 : 37—46, 1993.
- 58) **Loutsch JM, Sainz B Jr, Marquart ME, Zheng X, Kesavan P, Higaki S**, et al : Effect of famciclovir on herpes simplex virus type 1 corneal disease and establishment of latency in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 45 : 2044—2053, 2001.
- 59) **Gebhardt BM, Halford WP** : Evidence that spontaneous reactivation of herpes virus does not occur in mice. *Virology* 18 : 67, 2005.
- 60) **Laibson PR, Arentsen JJ, Mazzanti WD, Eiferman RA** : Double controlled comparison of IDU and trifluorothymidine in thirty-three patients with superficial herpetic keratitis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 75 : 316—324, 1977.
- 61) **Kaufman HE** : Antimetabolite drug therapy in herpes simplex. *Ophthalmology* 87 : 135—139, 1980.
- 62) **van Bijsterveld OP, Post H** : Trifluorothymidine versus adenine arabinoside in the treatment of herpes simplex keratitis. *Br J Ophthalmol* 64 : 33—36, 1980.
- 63) **Anand BS, Hill JM, Dey S, Maruyama K, Bhattacharjee PS, Myles ME**, et al : *In vivo* antiviral efficacy of a dipeptide acyclovir prodrug, Val-Val-Acyclovir, against HSV-1 epithelial and stromal keratitis in the rabbit eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2529—2534, 2003.

**Comment : 増田寛次郎**

ヘルペス感染は、眼科領域での感染症の最も多いものの一つである。特に、角膜においては単に頻度が高いだけでなく、難治性においても問題がある疾患と言える。難治性の原因は、抗ウイルス薬の適切なものがないことと再発しやすいことにある。

下村教授らは、感染頻度の高さは潜伏感染の多さと関係があることを突き止め、角膜移植例においても、ドナー角膜にも思っていたよりも多数の例にヘルペス感染があることを示し、角膜移植によって感染することも可能性としてはありうることを示した。潜伏感染の多さに驚いた。いったん感染し、治癒した後に再発を繰り返すことはよく知られていることであるが、再発には心身の種々のストレスが関与していることを患者に対する詳細なアンケート調査によって明らかにした。眼科手術は、眼にとって大きなストレスとして働く。角膜移植や硝子体手術によっても涙液中にヘルペスウイルス DNA を検出できたことは、眼科的な手術によってもヘルペスの再発を起こすことの可能性を示唆している。私自身、スキーに行った後は、必ずと言っていいほど口唇ヘルペスを起こす。角膜においても紫外線による再発例も多く報告されており、ヘルペスの再発にはこれら種々のストレスが引き金になっていることは間違いないことであろう。ストレスを回避することはなかなか現代社会生活では困難なことではあるが。

ヘルペス感染に対する新しい治療方法の開発は、たいへん興味あるテーマである。下村教授らは、二種類の治療方法の可能性を示した。一つは、ケモカインで、ある種のケモカインは直接ヘルペスウイルスに働いて、ウイルスを包んでいるエンベロープに穴を開けることによって抗ウイルス作用を起こすことを示した。早い時期に臨床応用できることを期待したい。もう一つの治療方法は、抗ヘルペス薬として広く使用されているアシクロビルのプロドラッグであるバラシクロビルの内服である。既に他領域では使用されている薬であり、基礎研究でもよくヘルペス感染を抑えているので、局所使用の困難な例にはすぐにも使用できそうである。

下村教授は、これまで眼表面の感染症に強い関心を示してこられた。今回の宿題報告は短い期間ではあったが教授の得意とするヘルペス角膜感染症に焦点を合わせて、基礎および臨床の幅広い研究をまとめられた。非常に感銘深い宿題報告であった。