

単純ヘルペスウイルスによる実験的網脈絡膜炎の研究

1. ウイルス伝播経路について (図10, 表1)

中川 尚* ・林 皓三郎** ・内田 幸男*
井上 幸次*** ・大橋 裕一****

(*東京女子医科大学眼科, **郡山免疫医学研究所)
(***大阪大学眼科, ****関西労災病院眼科)

Route of the Virus Propagation in Experimental Herpes Simplex Retinitis in Mice

Hisashi Nakagawa*, Kozaburo Hayashi**, Yukio Uchida*
Yoshitsugu Inoue***, and Yuichi Ohashi****

**Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical College*

***Laboratory of Viral Immunology, The Koriyama Institute of Medical Immunology*

****Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School*

*****Department of Ophthalmology, Kansai Rosai Hospital*

要 約

BALB/c マウス右眼前房内に1型単純ヘルペスウイルスを接種後、7日目以降に対側眼26眼中18眼(69.2%)に網脈絡膜炎が発症した。ウイルス接種眼では、網膜炎が認められたのは19眼中1眼のみであった。ウイルス接種後、ウイルス価は接種眼、視神経、対側眼の順に認められ、ウイルス価のピークも同様の推移を示した。蛍光抗体法でも前述の各組織に多数のウイルス抗原を認めた。以上のことから、右眼前房内に接種されたウイルスは視神経を介して対側眼に到達したものと考えられた。(日眼 91:1023-1029, 1987)

キーワード：単純ヘルペス性網膜炎, von Szily のモデル, ウイルス伝播経路, 視神経

Abstract

Unilateral intracameral inoculation of the HSV-1 (CHR-3 strain) in BALB/c mice resulted in necrotizing chorioretinitis in about 70% of contralateral eyes. On the other hand, inoculated eyes showed inflammation primarily restricted to the anterior segment and most of their chorioretinal areas were spared from viral invasion. The virus was first titrated in the inoculated eye followed by the optic nerve and contralateral eye. Immunofluorescence test demonstrated viral antigens in the glial cells of the optic nerve of the contralateral eye at 5 to 7 days postinoculation. At 10 days postinoculation they were seen in the necrotizing retina of the opposite eye. These results strongly suggested that the virus spread to the opposite eye via the optic nerve. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 1023-1029, 1987)

Key words: Herpes simplex retinitis, von Szily model, Virus propagation, Optic nerve

別刷請求先: 162 東京都新宿区河田町8-1 東京女子医科大学眼科学教室 中川 尚

Reprint requests to: Hisashi Nakagawa, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tokyo Women's Medical College

8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

(昭和62年5月21日受付) (Accepted May 21, 1987)

I 緒 言

単純ヘルペス性網膜炎は、ヘルペス脳炎に合併して起こるヘルペス眼感染症の重要な疾患の1つで、新生児^{1)~3)}や、immunocompromised host⁴⁾⁵⁾だけでなく健康成人にも起こることが知られている^{6)~8)}。臨床例において、組織学的、免疫学的、あるいはウイルス学的検索がなされているが、その発症機序やウイルスの伝播経路については未だ不明な点が多い^{1)~8)}。また一方では、単純ヘルペスウイルス(HSV)^{9)~11)}あるいは水痘-带状疱疹ウイルス(VZV)¹²⁾が acute retinal necrosis の原因の1つであることが最近報告されており、ヘルペス性網膜炎の発症病理の解明は重要な課題と考えられる。

ヘルペス性網膜炎の動物モデルとしては、いわゆる von Szily のモデル¹³⁾が古くから知られている。これは当初交感性眼炎の動物モデルを意図して考えられたものであるが、その後ヘルペス性網膜炎のモデルとして、現在までウサギあるいはマウスを用いていくつかの追試がなされている^{14)~17)}。von Szily のモデルでは、ウイルスを一眼の前房内に接種後1~2週間で対側眼の40~70%¹⁴⁾¹⁶⁾に壊死性網膜炎が発症する。この網膜炎はウイルス感染に対する免疫反応によるものではなく、ウイルスの直接侵襲によって生ずることが明らかにされており¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、ウイルス伝播経路として視神経¹³⁾¹⁴⁾、血行性¹⁵⁾¹⁶⁾など、いくつかの経路が考えられている。また対側眼には高率に網膜炎が起こるのに対し、接種眼では網膜炎は発症しないという retinal sparing の現象が知られているが^{15)~17)}、その機序についてはほとんど明らかにされていない。

われわれはこのヘルペス性網膜炎の発症病理を明らかにする目的で一連の実験を計画し、その第一段階としてウイルスの伝播経路について検討した。

II 実験方法

1. 材料

1) ウイルス：アフリカミドリザル腎(GMK)細胞で継代した1型単純ヘルペスウイルス(HSV-1) CHR 3株¹⁸⁾(ウイルス価 $10^{6.8}$ plaque forming unit/ml)をもちいた。

2) マウス：6~8週齢のBALB/cマウス雄および雌各々40匹、計80匹をもちいた。

2. 方法

ジエチルエーテル麻酔下に、マウス右眼前房内にウ

イルス0.01mlを接種した。接種後3日目、5日目、7日目、10日目、14日目に、ウイルス接種眼、非接種対側眼、視交叉部を含めた両側の視神経、および左右の三叉神経節をとりだした。

3. 病理組織学的検討

採取した各組織を10%ホルマリンにて固定後、エタノールで脱水しパラフィン包埋した。約5 μ mの切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡で鏡検した。

4. ウイルス価の測定

以下のような手技で、plaque法によりウイルス価を測定した。

それぞれの組織の10%乳剤を作り、10段階希釈した乳剤遠沈上清をマイクロプレート上のGMK細胞に37°Cで2時間吸着させた後、ウサギ抗HSV抗体を2%に含む培養液でおおい、2時間処理した。37°Cで48時間インキュベート後、plaque数をかぞえてウイルス価(plaque forming unit/グラム組織重量)をもとめた。

5. ウイルス抗原の検索

採取した組織から約6 μ mの凍結切片を作成した。アセトン固定後、FITC標識ウサギ抗HSV抗体¹⁹⁾を37°C1時間作用し、phosphate buffered saline(PBS)で洗浄後封入して蛍光顕微鏡下に観察した。一部の網膜については、Sanboni液で固定後伸展標本を作成した。1次抗体として、HSV-1福田株の静脈内接種により過免疫して得たウサギ抗HSV血清を48時間、2次抗体としてFITC標識抗ウサギIgG抗体(Miles Laboratory社)を24時間作用させ、同様に蛍光顕微鏡で鏡検した。

III 結 果

1. 病理組織学的所見

HSV-1 CHR 3株をマウス右眼前房内に接種後、7日目より対側眼に網脈絡膜炎が認められた。7日目では網膜の変化は網膜内層に瀰漫性にみられ、一部の島状の壊死巣が観察されたが、網膜の層構造は比較的よく保たれていた。神経節細胞層から内顆粒層にかけて浮腫と好中球からなる炎症性細胞浸潤がみられた。この部位には核染色質の異常を示す細胞や、また核染色質が核の周辺部に偏在しその中が淡い好酸性を示す核内封入体を持つ細胞が多数認められた(図1)。脈絡膜は軽度の肥厚を示していたが著しい細胞浸潤はみられなかった。硝子体中には多核白血球、単核球が散在し

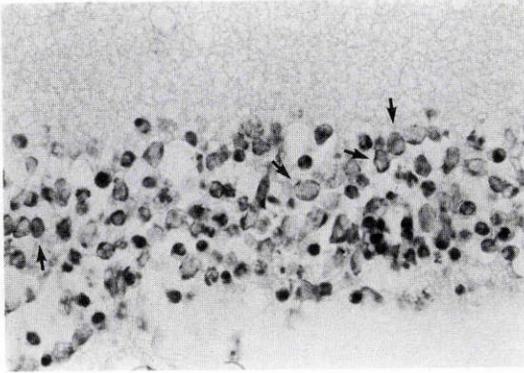


図1 接種後7日 対側眼
網膜内顆粒層の細胞に、核染色質の辺縁化と核内の好酸性物質を認められた(→)。(H.E.染色, ×200)

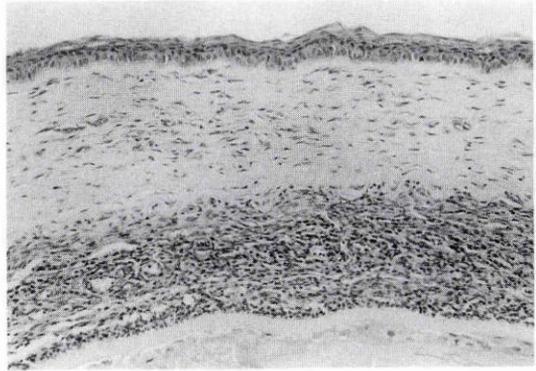


図3 接種後14日 接種眼
前房は多数の炎症性細胞と線維性組織で満たされていた。角膜実質内にも細胞浸潤を認められた。(H.E.染色, ×50)

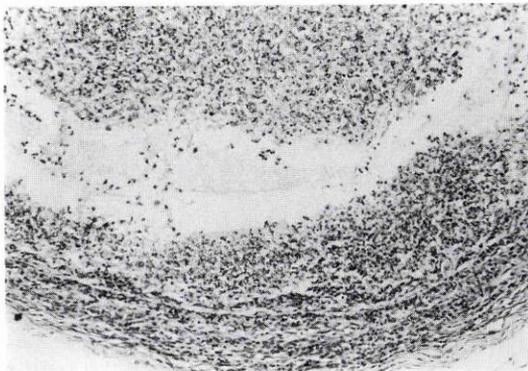


図2 接種後14日 対側眼
網膜は全層にわたって破壊され、多数の炎症性細胞、細胞残渣が認められた。脈絡膜にも炎症性細胞浸潤がみられた。(H.E.染色, ×50)

ていた。接種後14日目の標本では、網膜は著しく破壊され、正常な層構造は全く認められないものがほとんどであった(図2)。好中球、リンパ球を主体とする炎症性細胞が網膜全体にみられ、破壊された細胞の残渣が混在していた。同時に脈絡膜にも浮腫と単核球、多核白血球の浸潤を認め、その厚さは正常の数倍に達していた。網膜の一部には線維性組織の増殖がみられた。多くの標本では前房中、虹彩、毛様体にも多核白血球や単核球が認められたが、角膜には異常はみられなかった。視神経は多くの例で軽度の浮腫と細胞成分の増加がみられた。

ウイルス接種眼(右眼)では角膜、前房に強い変化が認められた。接種後14日目では、角膜、前房、虹彩、

表1 ウイルス接種後の各組織のウイルス価の変化。
PFU : plaque forming unit

組 織	ウイルス価 PFU/グラム組織重量				
	3	5	7	10	14 (接種後日数)
右 眼 (接種眼)	10 ^{6.5}	10 ^{6.4}	10 ^{4.9}	10 ^{4.0}	10 ^{3.5}
左 眼	0	0	0	10 ^{4.3}	10 ^{4.7}
視 神 経	0	10 ^{4.4}	10 ^{5.5}	10 ^{4.8}	0
右三叉神経節	0	10 ^{5.0}	10 ^{3.6}	10 ^{2.8}	0
左三叉神経節	0	10 ^{4.3}	0	0	0

毛様体に多核白血球、単核球の著しい浸潤があり、細胞残渣が散在していた。また前房内は線維性組織が増殖していた(図3)。硝子体中にも好中球を主体とする炎症細胞がみられ、変化の強い例では硝子体腔は増殖した線維性組織により満たされていた。これらの変化とは対照的に、網膜では神経節細胞層に浮腫と少数の炎症性細胞を認めただけであった(図4)。対側眼網膜にみられたような細胞核染色質の変化、核内封入体、壊死などは認められなかった。

2. ウイルス価の測定

ウイルス接種後の各組織のウイルス価の変化は表1のごとくであった。接種後3日目までは接種眼にのみウイルス価が検出され、5日目では視神経(視交叉を含めた両側の視神経)と左右の三叉神経節にもウイルス価が認められた。対側眼では10日目以降にウイルスが認められた。接種眼、対側眼、視神経の3者につい

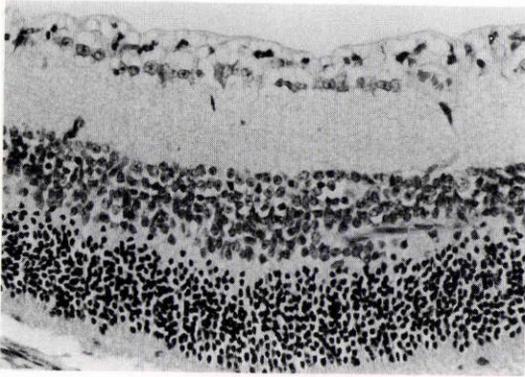


図4 接種後14日 接種眼

網膜の神経節細胞層を中心に浮腫と軽度の細胞浸潤が認められた。(H.E. 染色, ×50)

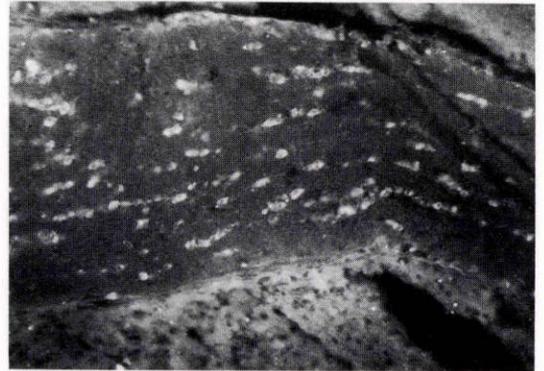


図6 接種後7日 左視神経

視神経内の神経膠細胞にHSV 特異蛍光を認めた。(蛍光抗体直接法, ×100)

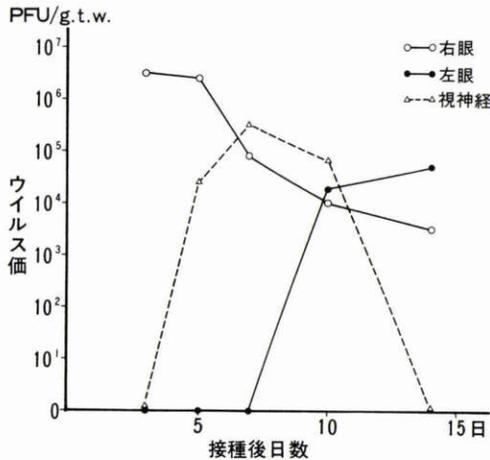


図5 接種眼(右眼), 対側眼(左眼), 視神経のウイルス価の変化。

PFU: plaque forming unit, g.t.w.: グラム組織重量

でウイルス価の変化をみると(図5), 接種眼では接種後時間とともに漸減した。視神経では7日目をピークに一峰性のカーブを描き, 接種後14日目にはウイルスは検出されなくなった。一方対側眼では視神経よりおくれてウイルス価が認められるようになり, 10日目, 14日目とウイルス価の上昇を認めた。

3. ウイルス抗原の検出

蛍光抗体法によりウイルス抗原を検索した結果, ウイルス価の認められた各組織に特異蛍光を認めた。接種後5日目の左視神経ではウイルス抗原はわずかに数カ所に認められたのみであったが, 7日目になると視

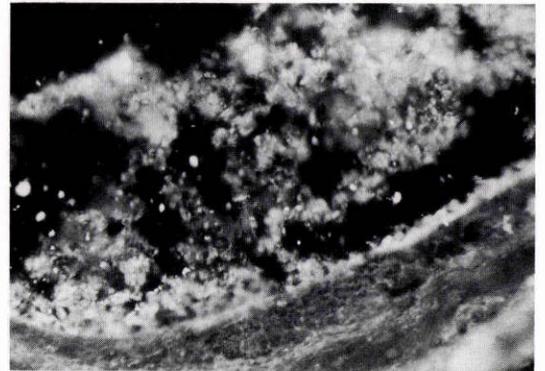


図7 接種後10日 対側眼

網膜全体に特異蛍光を認めた。脈絡膜にはウイルス抗原は認められなかった。(蛍光抗体直接法, ×100)

神経内の神経膠細胞と思われる細胞に一致して, 多数の特異蛍光が観察された(図6)。接種後10日目の対側眼の標本では破壊された網膜全体に特異蛍光が観察された(図7)。脈絡膜には特異蛍光は認められなかった。接種後7日目の対側眼の網膜伸展標本でもHSV 特異蛍光が認められた。ウイルス抗原は, 視神経乳頭の周囲に放射状にみられるもの(図8), 網膜の中間周辺部から周辺部にかけてみられるもの(図9)などがあったが, 網膜全体に散在性に認められるもの(図10)がもっとも多かった。蛍光は伸展標本の表層の神経節細胞ならびに神経線維に一致して認められた。

4. 接種眼および対側眼の網膜炎発症頻度

ウイルス抗原の分布, 病理組織学的所見から, 対側眼網膜にみられた炎症性細胞浸潤, 網膜細胞の核染色



図8 接種後7日 対側眼網膜伸展標本
視神経乳頭(*)の周囲に、放射状に特異蛍光が認められた。(蛍光抗体間接法, ×200)



図9 接種後7日 対側眼網膜伸展標本
図8と同一眼の周辺部網膜。神経節細胞および神経線維に特異蛍光を認めた。(蛍光抗体間接法, ×200)

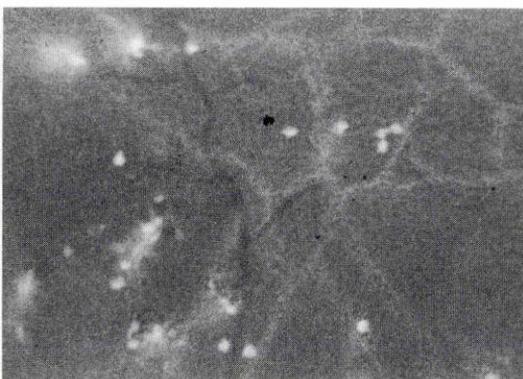


図10 接種後7日 対側眼網膜伸展標本
特異蛍光は散在性に認められた。(蛍光抗体間接法, ×100)

質の変化, 核内封入体, 網膜壊死などの所見は HSV の感染によって生じた変化と考えられる。一方これらの所見を伴わない網膜の軽度の浮腫や限局性細胞浸潤は周囲組織の炎症による二次的なものと考えられた。この基準にしたがい接種眼および対側眼の網膜炎の発症頻度を比較してみると、接種後14日目では接種眼で19眼中1眼(5.3%)、対側眼では26眼中18眼(69.2%)であった。

IV 考 按

BALB/c マウスの1眼の前房内に HSV-1 を接種後、対側眼に高率(69.2%)に網脈絡膜炎が発症した。対側眼網膜に核内封入体が認められたこと、蛍光抗体法で多数のウイルス抗原が証明されたこと、また対側眼に高力価のウイルスを認めたことは、網膜病変がウイルスの直接侵襲によりおこったことを示している。またウイルス抗原は網膜に限局し、脈絡膜には全く認められなかったことから、対側眼に生ずる病変は基本的には網膜炎であり、脈絡膜の炎症は二次的なものと考えられる。Pettit¹⁶⁾もウサギを用いた同様のモデルでこのことを示している。

対側眼へのウイルス伝播経路として、かつて von Szily¹³⁾や Kimura¹⁴⁾は視神経を考えた。しかしその後 Pettit¹⁶⁾は、蛍光抗体法によりウイルス抗原を追跡した結果、視神経を介した対側眼への連続的伝播を証明することができず、血行性の経路が考えられるとした。今回の我々の実験では、ウイルスは接種後、接種眼、視神経、対側眼の順に検出され、さらにそのウイルス価のピークも同様の推移を示した。またこれらの組織のウイルスの伝播は蛍光抗体法によっても示された。このことは右眼前房内に接種されたウイルスが視神経を介して対側眼網膜に到達したことを強く示唆していると考えられる。最近 Olson²⁰⁾は、ウサギを用いた von Szily のモデルにおいて、あらかじめ非接種対側眼の視神経を切断しておく、対側眼には網膜炎はまったく発症せず、ウイルスは対側眼の視神経を通して対側眼網膜に到達すると述べている。一方、接種眼の視神経を切断しておいた場合には、前房内接種では対側眼の2/15に網膜炎を認め、硝子体内接種ではまったくみられなかったことから、ウイルスの接種眼からの伝播経路は接種方法により異なると考えている。

単純ヘルペスウイルスが視神経を介して他の組織へ伝播することは、ウイルスの硝子体内あるいは脳内接

種実験により示されている²¹⁾²²⁾。Kristenssonら²¹⁾はウサギの1眼の硝子体中へ2型単純ヘルペスウイルスを接種し、3日目に対側の外側膝状体、上丘にウイルスが到達することを電子顕微鏡で観察した。その電子顕微鏡所見およびウイルス伝播の速度から、ウイルスは主に視神経の軸索流によって運ばれたものと考えた。しかし視神経の神経膠細胞にもウイルスを認めており、cell-to-cellの感染も同時におこっていると述べている。今回の実験でも接種後5日目には対側眼の視神経に、7日目には対側眼網膜にウイルス抗原を認めており、その速度から考えてこれらのウイルスは軸索流により運ばれたと考えられる。おそらく接種眼から視神経の順行性軸索流により一度外側膝状体へ運ばれ、次いで逆行性軸索流によって対側眼網膜へ到達したものと推察される。また視神経の多数の神経膠細胞にウイルス抗原を認めたことから、神経膠細胞のcell-to-cell感染も同時におこっていると考えられる。

接種後7日目の対側眼網膜の伸展標本では、神経節細胞に一致してウイルス抗原が認められ、対側眼に達したウイルスは最初神経節細胞に感染するものと考えられる。組織学的にも、対側眼網膜の変化は感染後7日目では神経節細胞から内顆粒層に限局し、10日目になると網膜全層の壊死を示した。したがって、対側眼の網膜炎は神経節細胞層に始まり、網膜内層から外層へと拡がってゆくものと考えられる。

今回の実験でも示されたように、von Szilyのモデルでは対側眼には高率に網膜炎が発症するが、接種眼には網膜炎はほとんどおこらない。網膜炎の発症阻止には感作Tリンパ球が重要な役割を果たしていることがWhittum-Hudsonら²³⁾により示されているが、何故接種眼の網膜炎だけが阻止されるのか、その機序については明らかにされていない。接種眼局所の何らかの防御因子の存在、HSVの前房内接種により誘導される全身的免疫反応の特異性などにつき、今後検討していきたいと考えている。

なお、本研究は、昭和61年度文部省科学研究補助金奨励研究A61771384の補助を受けた。

References

- 1) Cogan DG, Kuwabara T, Toung GF, et al: Herpes simplex retinopathy in an infant. Arch Ophthalmol 72: 641-645, 1964.
- 2) Hagler WS, Walters PV, Nahmias AJ: Ocular involvement in neonatal herpes simplex virus infection. Arch Ophthalmol 82: 169-176, 1969.
- 3) Cibis GW, Flynn JT, Davis EB: Herpes simplex retinitis. Arch Ophthalmol 96: 299-302, 1978.
- 4) Partamian LG, Morse PH, Klein HZ: Herpes simplex type 1 retinitis in an adult with systemic herpes zoster. Am J Ophthalmol 92: 215-220, 1981.
- 5) Pepose JS, Kreiger AE, Tomiyasu U, et al: Immunocytologic localization of herpes simplex type 1 viral antigens in herpetic retinitis and encephalitis in an adult. Ophthalmology 92: 160-166, 1985.
- 6) Minckler DS, McLean EB, Shaw CM, et al: Herpesvirus hominis encephalitis and retinitis. Arch Ophthalmol 94: 89-95, 1976.
- 7) Johnson BL, Wisotzkey HM: Neuroretinitis associated with herpes simplex encephalitis in an adult. Am J Ophthalmol 83: 481-489, 1977.
- 8) Grutzmacher RD, Henderson D, McDonald PJ, et al: Herpes simplex chorioretinitis in a healthy adult. Am J Ophthalmol 96: 788-796, 1983.
- 9) Peyman GA, Goldberg MF, Uninsky E, et al: Vitrectomy and intravitreal antiviral drug therapy in acute retinal necrosis syndrome. Arch Ophthalmol 102: 1618-1621, 1984.
- 10) Ludwig IH, Zegarra H, Zakov N: The acute retinal necrosis syndrome, possible herpes simplex retinitis. Ophthalmology 91: 1659-1664, 1984.
- 11) Freeman WR, Thomas EL, Rao NA, et al: Demonstration of herpes group virus in acute retinal necrosis syndrome. Am J Ophthalmol 102: 701-709, 1986.
- 12) Culbertson WW, Blumenkranz MS, Pepose JS, et al: Varicella zoster virus is a cause of the acute retinal necrosis syndrome. Ophthalmology 93: 559-569, 1986.
- 13) von Szily A: Experimentelle endogene Infektionsübertragung von Bulbus zu Bulbus. Klin Monatsbl Augenheilkd 72: 593-602, 1924.
- 14) Kimura SJ: Herpes simplex uveitis; a clinical and experimental study. Trans Am Ophthalmol Soc 60: 440-470, 1962.
- 15) Martenet A-C: Herpes simplex uveitis. Arch Ophthalmol 76: 858-865, 1966.
- 16) Pettit TH, Kimura SJ, Uchida Y, et al: Herpes simplex uveitis: An experimental study with the fluorescein-labeled antibody technique. Invest Ophthalmol Vis Sci 4: 349-357, 1965.
- 17) Whittum JA, McCulley JP, Niederkorn JY, et al: Ocular disease induced in mice by anterior

- chamber inoculation of herpes simplex virus. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 1065—1073, 1984.
- 18) **Hamper B, Notkins AL, Mage M, et al:** Heterogeneity in the properties of 7S and 19S rabbit-neutralizing antibodies to herpes simplex virus. J Immunol 100: 586—593, 1968.
- 19) **Shimizu F:** Labelled antibody preparation, In Kawamura A and Aoyama Y, ed: Immunofluorescence in Medical Science, University of Tokyo Press, Tokyo, Japan, 1982.
- 20) **Olson RM, Holland GN, Goss SJ, et al:** Routes of viral spread in von Szily model of herpes simplex virus retinopathy. Curr Eye Res 6: 59—62, 1987.
- 21) **Kristensson K, Ghetti B, Winsniewski MM:** Study on the propagation of herpes simplex virus (type 2) into the brain after intraocular injection. Brain Research 69: 189—201, 1974.
- 22) **Peiffer RL, Dekker CD, Siegel FL:** Ocular lesions in mice following intracerebral injection of herpes simplex virus type 1. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1070—1078, 1983.
- 23) **Whittum-Hudson J, Farazdaghi M, Prendergast RA:** A role for T lymphocytes in preventing experimental herpes simplex virus type 1-induced retinitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 1524—1532, 1985.
-