

## マウスヘルペス性角膜炎における Substance P の動態 (図2)

井上 幸次・沢井 貞子・渡辺 仁・下村 嘉一  
 笹岡 厚子・大橋 裕一・福田 全克・真鍋 禮三 (大阪大学医学部眼科学教室)

The Sequential Changes of Substance P During Acute  
 Herpetic Keratitis in Mice

Yoshitsugu Inoue, Sadako Sawai, Hitoshi Watanabe,  
 Yoshikazu Shimomura, Atsuko Sasaoka, Yuichi Ohashi,  
 Masakatsu Fukuda and Reizo Manabe

*Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School*

## 要 約

マウスのヘルペス性角膜炎における substance P (SP) の動態を、定性的(間接蛍光抗体法)定量的(RIA法)に調べた。間接蛍光抗体法では、角膜の SP 陽性神経線維は感染後2日目、病巣部においてその染色性がわずかに低下し、感染後4日目には、角膜全体にわたってほとんど認められなくなった。これに対して三叉神経節では、感染後4日目にも、SP 陽性神経線維及び SP 陽性神経節細胞を認めた。RIA を用いた SP 定量実験によると、角膜の SP 量は、コントロール群と比べて、感染後4日目に著明に低下していた。三叉神経節の SP 量は、感染後2日目に上昇し、4日目にやや低下したが、これは角膜擦過のみのコントロール群と同じ動きであり、ヘルペス感染による変化でないと考えられた。以上の結果より、角膜中の SP 量の低下がヘルペス性角膜炎における知覚鈍麻になんらかの役割を果たしていることが示唆された。(日眼 91:982-987, 1987)

キーワード：ヘルペス性角膜炎, substance P(SP), 三叉神経節, 間接蛍光抗体法, radioimmunoassay(RIA)

## Abstract

We investigated the sequential changes of substance P (SP), a neurotransmitter candidate of sensory nerve, during acute herpetic keratitis in mice by indirect immunofluorescence method and radioimmunoassay (RIA). In cornea, the SP-specific immunofluorescence of nerve fibers was slightly reduced in intensity at the infected site on the second day postinfection (PI), being undetectable in the entire cornea on the 4th day PI. In trigeminal ganglia (TG), however, the SP-specific immunofluorescence of nerve fibers and cell bodies was not affected. RIA studies revealed that the amount of SP in cornea was extremely reduced on the 4th day PI, on the other hand, TG of infected mice contained as much SP as those of controls at the times examined. These results suggest that the reduction of corneal sensitivity, which we often notice in patients with herpetic keratitis, might be related to the reduction of SP in the cornea. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 91:982-987, 1987)

**Key words:** Herpetic keratitis, Substance P, Trigeminal ganglion, Indirect immunofluorescence method, Radioimmunoassay

別刷請求先: 553 大阪市福島区福島1-1-50 大阪大学医学部眼科学教室 井上 幸次

Reprint requests to: Yoshitsugu Inoue, M.D. Dept. of Ophthalmol. Osaka Univ. Medical School, 1-1-50 Fukushima, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

(昭和62年4月7日受付) (Accepted April 7, 1987)

## I 緒 言

substance P (SP) は11個のアミノ酸残基で構成される神経ペプチドで、calcitonine gene related peptide (CGRP), cholecystokinin (CCK) などと並んで知覚をつかさどる神経伝達物質の一候補として注目されている。眼球においても、角膜、虹彩、毛様体、脈絡膜、網膜の他、眼球に関連する神経節に SP が存在していることが証明されている<sup>1)2)</sup>。また、前眼部の炎症や縮瞳に SP が関与していることを示唆する報告<sup>3)4)</sup>も見られ、眼疾患における SP の役割はきわめて興味を持たれるところである。さて、臨床的にヘルペス性角膜炎において、角膜知覚が低下することは広く知られているが、その病態は不明である。知覚伝達物質として推定される SP がヘルペス性角膜炎で角膜知覚低下に関与する可能性が報告されている<sup>5)</sup>が、なお不明な点も多い。

そこで、今回、我々はこの点を明らかにする目的で、マウスのヘルペス性角膜炎における SP の動態を定性的(間接蛍光抗体法)、定量的(radioimmunoassay 法: RIA) に調べたので報告する。

## II 実験方法

### 1. 感染及び試料採取

6週齢雌の Balb/c マウスの両眼角膜を27ゲージ針にて擦過後、 $8 \times 10^7$  PFU/ml の herpes simplex virus (HSV) type 1 福田株 0.01ml を滴下して感染させた。感染後2日目、4日目に生理的食塩水にて全身灌流後、角膜及び三叉神経節を摘出した。一部の試料は、Zamboni 液にて固定し、30% sucrose を浸透させた後、cryostat にて凍結切片を作成して、間接蛍光抗体法に供した。

残りの試料は乾燥重量測定後、1ml の1N 酢酸を添加して、homogenizer 及び超音波処理にて homogenize した。これを、100°C 3分間熱処理した後、3000rpm 20分間遠心を行い、その遠心上清を RIA に供した。

コントロールとして無処置及び擦過後2日目、4日目の角膜と三叉神経節を用いた。

### 2. 間接蛍光抗体法

一次抗体として、SP あるいは HSV 福田株を家兎に過免疫して得られた血清を1000倍希釈したものを用い、室温で24時間反応させた後、二次抗体として、FITC-conjugated anti rabbit IgG (マイルズ社製) を1000倍希釈したものを用い、再び室温で24時間反応さ

せた。反応後、phosphate buffered saline (PBS) 及び1% Triton PBS にて洗浄し、50% グリセリンにて封入し、蛍光顕微鏡にて観察した。

### 3. RIA 法<sup>6)7)</sup>

各々0.1ml の試料、抗 SP 血清、 $I^{25}$  ラベルの  $N\alpha$ - (hydroxyphenylpropionyl) SP (6.7nCi) の3者を混合し、0.4ml の0.05M クエン酸緩衝液 (pH 4.8) を加えて、4°C にて48時間反応させた。これに、1.0ml の dextran-coated charcoal を添加して、4°C にて30分間反応させた後、3,000rpm 15分間遠心を行い、その遠心上清の放射線活性をガンマ・カウンターにて計測した。同時に作成した標準曲線から、SP の量を求め、先に測定した乾燥重量で割って、単位重量当りの SP 量として表示した。

## III 結 果

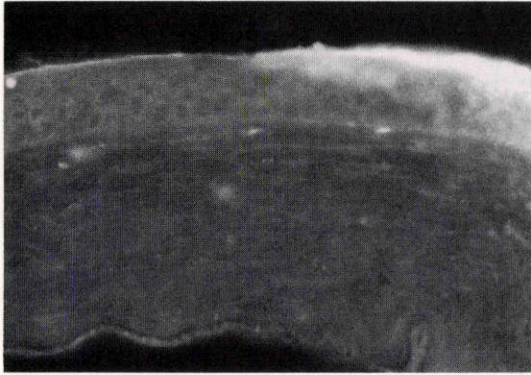
### 1. 間接蛍光抗体法

正常角膜では図1-Dのごとく、上皮内及び上皮下、実質浅層に豊富に SP 陽性神経線維を認めた。感染後2日目には、HSV 特異蛍光が上皮内に拡がってきているが(図1-A)、この際、SP 陽性神経線維の走行の乱れと、染色性の軽度低下が認められた(図1-E)。しかしながら、HSV 特異蛍光を認めない非病変部では、正常と同様の形態で SP 陽性神経線維が認められた。感染後4日目になると、HSV 特異蛍光が上皮内に更に広汎に拡がり(図1-B)一部では実質浅層にも認められるようになった。この時点では、角膜のほぼ全体において SP 陽性神経線維を認めることはできなかった(図1-F)。擦過しただけで HSV を感染させない角膜では、2日目、4日目ともに、正常と同様に SP 陽性神経線維を認めた。

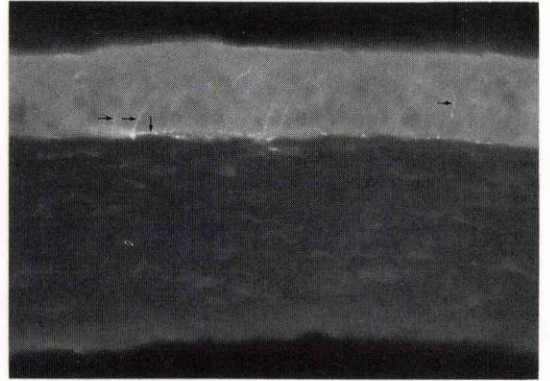
一方、正常三叉神経節では図1-Gのごとく、SP 陽性神経線維および SP 陽性神経節細胞を豊富に認めた。感染後2日目には、HSV 特異蛍光が三叉神経節の一部の神経節細胞に拡がってくるが、この際、SP 陽性神経線維及び SP 陽性神経節細胞は正常と同様のパターンで認められた(図1-H)。感染後4日目になると、HSV 特異蛍光が多数の神経節細胞に認められるようになった(図1-C)。この時点では、浸潤細胞による非特異蛍光が共存しているが、角膜とは異なり、SP 陽性神経線維及び SP 陽性神経節細胞が依然認められた(図1-D)。

また、HSV 特異蛍光を認める神経節細胞は三叉神経節の一部に密に分布し、SP 陽性神経節細胞は三叉

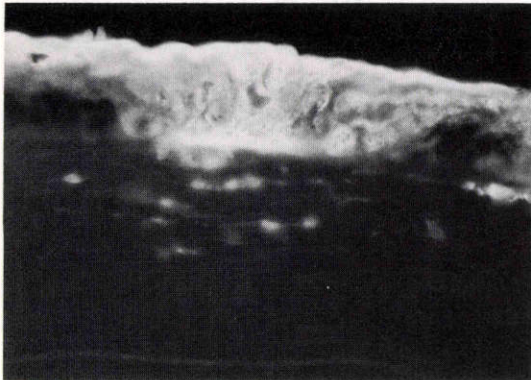




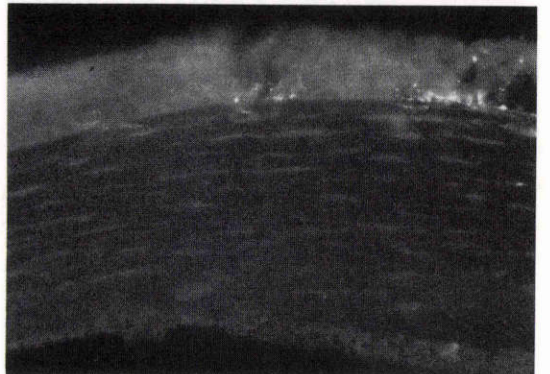
A. HSV 感染後 2 日目, 上皮内に HSV 特異蛍光を認める.



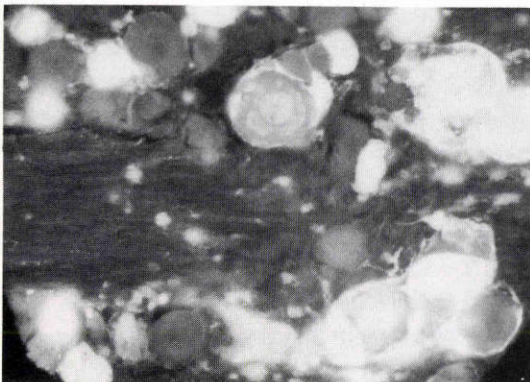
D. 正常, 上皮内及び上皮下に多数の SP 陽性神経線維 (矢印) を認める.



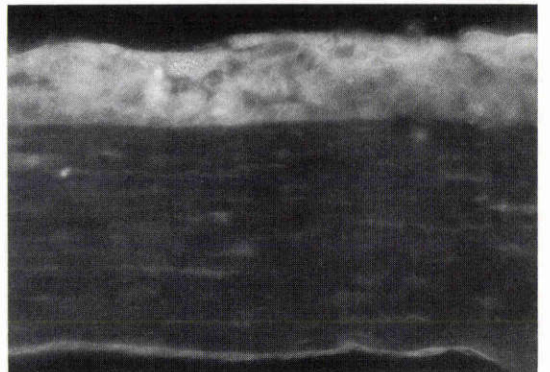
B. HSV 感染後 4 日目, HSV 特異蛍光は上皮内に広汎に認められる.



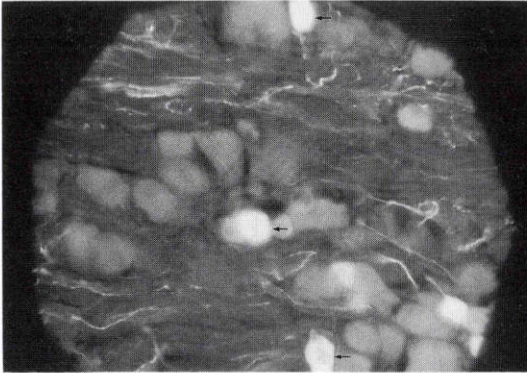
E. HSV 感染後 2 日目, SP 陽性神経線維は走行を乱し, わずかに染色性の低下を認める.



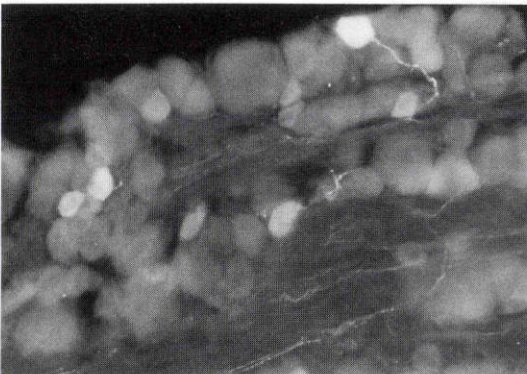
C. HSV 感染後 4 日目, 多数の神経節細胞に HSV 特異蛍光を認める.



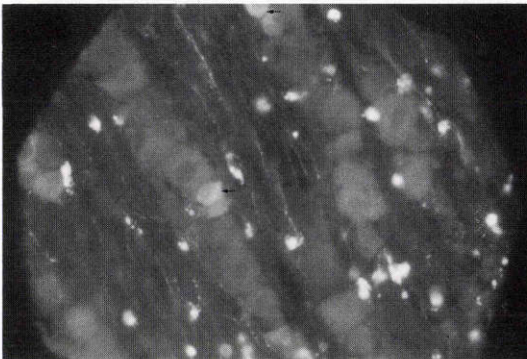
F. HSV 感染後 4 日目, SP 陽性神経線維は認められなくなっている.



G. 正常. SP 陽性神経線維及び SP 陽性神経節細胞 (矢印) を各所に認める.

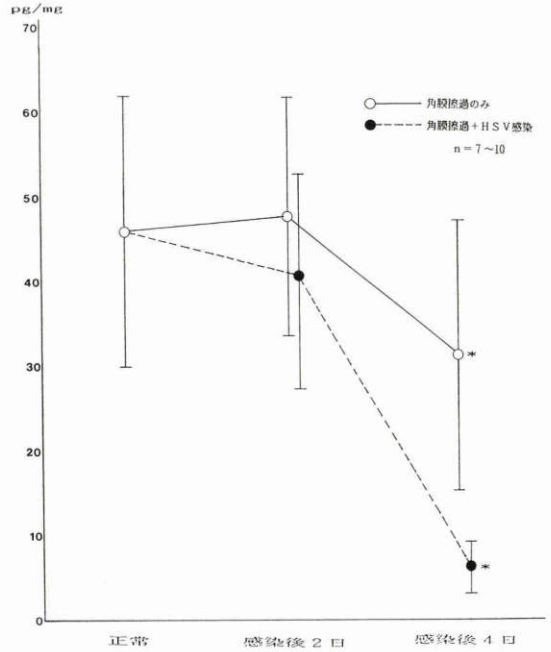


H. HSV 感染後 2 日目. 正常と同様に SP 陽性神経線維及び SP 陽性神経節細胞を認める.

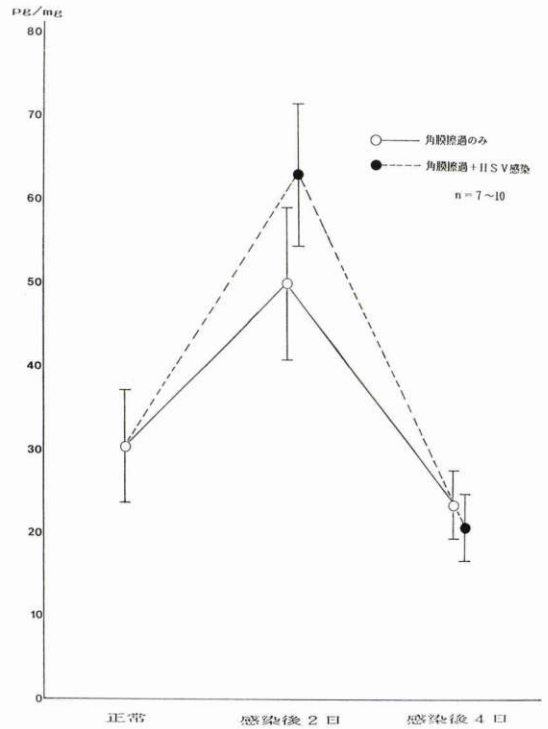


I. HSV 感染後 4 日目. SP 陽性神経線維及び SP 陽性神経節細胞 (矢印) は依然として認められる.

図1 いずれも原倍率×200. 蛍光抗体染色  
 A~C: 抗 HSV 抗体にて染色  
 D~I: 抗 SP 抗体にて染色  
 A, B, D~F: 角膜  
 C, G~I: 三叉神経節



A. 角膜中 substance P 定量(RIA), mean±S.D.で示す. \*有意差あり (p<0.01)



B. 三叉神経節中 substance P 定量(RIA), mean±S.D.で示す.

図 2



神経節全体に散在性に認められ、明らかに異なる分布を示しており、HSV が SP 陽性神経節細胞にのみ特異的に感染しているということを示唆する所見は得られなかった。

## 2. RIA 法

図 2-A のごとく、正常角膜の SP 量は  $46.0 \pm 16.0$  pg/mg ( $n=9$ ) であった。感染後 2 日目には、 $40.7 \pm 12.0$  pg/mg ( $n=8$ ) と擦過後 2 日目の  $47.7 \pm 14.1$  pg/mg ( $n=8$ ) に比して若干の低下を示した。感染後 4 日目には  $6.23 \pm 3.01$  pg/mg ( $n=7$ ) と著明な低下を示し、これは擦過後 4 日目の  $31.3 \pm 16.0$  pg/mg ( $n=8$ ) と 1% 以下の危険率にて有意差を示した。

一方、図 2-B のごとく、正常三叉神経節の SP 量は  $30.4 \pm 6.73$  pg/mg ( $n=10$ ) であった。感染後 2 日目には、 $62.9 \pm 8.50$  pg/mg ( $n=8$ ) と上昇し、感染後 4 日目には、 $20.8 \pm 4.07$  pg/mg ( $n=8$ ) と低下した。しかし、擦過のみのコントロール群でも、2 日目に  $49.9 \pm 9.07$  pg/mg ( $n=8$ ) と上昇し、4 日目に  $23.5 \pm 4.11$  pg/mg ( $n=7$ ) と低下して同じ動態を示していた。

## IV 考 按

角膜は三叉神経節第 1 枝の分枝である鼻毛様体神経によって支配されており、強膜の peri-corneal plexus より太い神経管として角膜内に入り、一部の枝は実質細胞に、その他は、ボーマン膜直下を走り上皮に終わっている。これらの神経は伝達物質として norepinephrine, acetylcholine, SP などをもっている。特に SP は知覚の伝達物質として注目されており、ヘルペス性角膜炎において知覚低下が生じる際の SP の動態を知ることは、ヘルペス性角膜炎の病態の解明と角膜における神経支配の解明の両面から重要であると考えられる。Tullo らは<sup>9)</sup>、マウスのヘルペス性角膜炎において、角膜中の SP が低下することを RIA 法で調べているが、SP 陽性神経線維の状態について組織学的には検索しておらず、また、中枢の三叉神経節における SP の動態についても検討を加えていない。

今回、角膜及び三叉神経節について、定性的（間接蛍光抗体法）定量的（RIA 法）に SP の動態を調べた結果、感染後 4 日目において、角膜中の SP が著明に低下することが判明した。感染後 2 日目でも、病巣部において SP 陽性神経線維の染色性の低下をみたが、定量的には著明な差を認めなかった。これは HSV がまだ角膜中に広汎に拡がっていないため、角膜全体としてはかなりの SP が保たれていたためと考えられる。

三叉神経節については、SP 陽性神経線維及び SP 陽性神経節細胞が感染後 4 日目でもなお認められ、定量による SP の動きも角膜擦過のみのコントロール群との間に差を認めなかった。三叉神経節は第一枝領域のみではなく全体を摘出して SP を測定しているため、第一枝領域でごく軽度到低下している可能性も否定できないが、少なくとも角膜で認められたような著明な低下は生じていないと考えられた。また、2 日目に SP が上昇し 4 日目に低下するのは、コントロール群も同じ動きを呈しているため、角膜擦過による知覚神経への一過性刺激に対応する変化であろうと考えられた。

以上のように、マウスのヘルペス性角膜炎では、末梢である角膜においては、SP が著明に低下するが、中枢の三叉神経節においてはさほどの影響を受けておらず、また、三叉神経節で、HSV 特異蛍光を示す細胞と SP 特異蛍光を示す細胞との分布が異なっていた。これらのことを考え合わせると、HSV が SP 作動システムに対して特異的な影響を与えたとは考えにくい。むしろ、HSV が SP の有無にかかわらず非特異的に角膜の神経末端に感染し、神経末端を文字どおり破壊したために SP が低下したか、あるいは感染神経細胞における macromolecular metabolism 全体が影響を受けた結果として末端における SP が低下した可能性を示唆している。しかしながら、SP がもし知覚を司っているとすれば、臨床的にしばしば見られる角膜の知覚鈍麻はこうした末梢での SP 陽性神経線維の消失によって説明できよう。さらに、臨床的に急性期に低下した角膜知覚が寛解期にはある程度回復する現象は、今回の実験で示したように、急性期の三叉神経節において、SP が保たれているという事実と関係している可能性もある。

今回は急性 HSV 感染における SP の動態を調べたが、今後は、より臨床に近い潜伏感染、再発感染のモデルにおける SP の動態について明らかにしていく必要がある。また、HSV が感染する際には、さほどの宿主特異性を示さないことが一般に知られており、今回の実験でも SP 陽性神経のみに特異的に感染すると言う結果は得られなかったことから、SP 以外の神経伝達物質の動態についても検討を加える必要がある。そして、それらを総合的に考慮して、HSV の神経親和性や角膜知覚低下との関連について解明していくことが角膜ヘルペス対策に役立つものと考えられる。

科学研究費補助金（課題番号 60480389：代表福田）の援助を受けたことを記し、深謝する。

## 文 献

- 1) 馬場さえ子, 宮地幸隆: 家兎眼における神経ペプチド. 第1報. 前房水, 虹彩, 毛様体, 網膜の endorphin, substance P 及び neurotensin 測定の試み. 日眼 85: 1267-1272, 1981.
  - 2) **Stjernschantz J, Gregerson D, Bausher L, Sears M:** Enzyme-linked immunosorbent assay of substance P: A study in the eye. J Neurochem 38: 1323-1328, 1982.
  - 3) **Stjernschantz J, Sears M, Stjernschantz L:** Intraocular effects of substance P in the rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci 20: 53-60, 1981.
  - 4) **Soloway MR, Stjernschantz J, Sears M:** The miotic effect of substance P on the isolated rabbit iris. Invest Ophthalmol Vis Sci 20: 47-52, 1981.
  - 5) **Tullo AB, Keen P, Blyth WA, Hill TJ, Easty DL:** Corneal sensitivity and substance P in experimental herpes simplex keratitis in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 596-598, 1983.
  - 6) 松林 直, 矢内原千鶴子, 山本栄仁, 矢内原昇, 玉井 一: substance P RIA 系に関する基礎的検討と体液中 substance P 免疫活性. ホルモンと臨床 31: 521-525, 1983.
  - 7) **Yanaihara C, Sato H, Hirohashi M, Sakagami M, Yamamoto K, Hashimoto T, Yanaihara N, Abe K, Kaneko T:** Substance P radioimmunoassay using N-tyrosyl-substance P and demonstration of the presence of substance P-like immunoreactivities in human blood and porcine tissue extracts. Endocrinol Japon 23: 457-463, 1976.
-