

特 別 講 演 (I)

眼とヘルペス (図41, 表23)

眞 鍋 禮 三 (大阪大学医学部眼科学教室)

研究協力者

湯浅武之助, 福田 全克, 清水 芳樹, 大橋 裕一, 下村 嘉一, 恵美 和幸,
春田 恭照, 山本 保範, 笹部 哲生, 井上 幸次, 張野 正誉, 前田 直之,
桑山 信也, 凡 長春, 坂東 佳子, 粟田 隆(大阪大学), 林 皓三郎(郡山免
疫研究所), 柳 壹夫, 原田志津子, 江田 浩幸(国立予防衛生研究所), 中川 尚,
風見 宣生(東京女子医大), 城野洋一郎(化学及血清療法研究所), 井原 誠(大
阪府立公衆衛生研究所)

Recent Advances in Researches for Herpetic Eye Diseases

Reizo Manabe

Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

要 約

最近のウイルス学の進歩とともに、ヘルペスウイルス感染症に対する基礎的研究の報告も増し、眼科臨床との関連において様々な興味ある事実が明らかとなってきた。ヘルペスウイルスによる眼疾患としては、第一に角膜ヘルペスがあげられるが、新しい抗ウイルス剤の開発にもかかわらず、その再発性と難治性、および病態の複雑性が非常に大きな問題となっている。また、最近では桐沢型ぶどう膜炎の病因としても、ヘルペスウイルスがにわかに注目を集めており、これらの疾患を中心として最近の臨床的および基礎的知見を紹介する。(1) 角膜ヘルペス: 133例の角膜ヘルペス患者の臨床統計に基づいて角膜ヘルペスの病型の移行形態を示し、現在の角膜ヘルペス治療における問題点(再発性、実質型角膜ヘルペスの治療)を提起した。角膜ヘルペス動物モデルの開発は、角膜ヘルペスの病態を解明し、新しい治療法を検討していく上で極めて重要である。今回作成した家兎実質型角膜ヘルペスモデルを用いて、ステロイドとグロブリン製剤の併用療法が実質型角膜ヘルペス治療において優れていることを示した。さらに、最近確立された家兎ヘルペス再活性化モデルにより、個々のヘルペスウイルス株の間に潜伏感染および再活性化率の差が存在することを示し、ウイルス再活性化の機序における眼局所の α および β レセプターの重要性を提言した。ヘルペスウイルス DNA の制限酵素切断像の分析により、新鮮分離株について株間の異同の判定が可能となり、ヘルペスウイルス感染経路の解明にも有用な手段となった。本法により、ヘルペス感染症の臨床像と各分離株の制限酵素切断像との相関性について検討を行った。角膜ヘルペス感染において作動する免疫系には液性免疫と細胞性免疫の2つがある。モノクローナル抗体を用いたマウス角膜ヘルペスモデルにおいて、ウイルスの中和や、CDACやADCCといった機構を介した液性免疫の重要性が示された。また、同じマウス角膜ヘルペスモデルを用いた細胞移入実験において、細胞性免疫がより重要で、なかでもT細胞がその役割を担っていることが明らかとなった。一方で、ヘルペスウイルス感染を免疫学的に制御できるようなワクチンの開発もまた重要な課題である。ヘルペスウイルスに対するワクチンとしてはその発癌性などからDNAを含まないものが望ましいが、ヘルペス感染細胞の抽出

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 眞鍋 禮三(昭和62年11月16日受付)

Reprint requests to: Reizo Manabe, M. D. Dept. of Ophthalmol. Osaka Univ. Medical School,

1-1-50 Fukushima, Fukushima-ku, Osaka 533, Japan

(Accepted November 16, 1987)

抗原をワクチンとして用いると、角膜ヘルペス病変や潜伏感染の樹立を抑制できた。また、ヘルペスウイルス抗原の一つである glycoprotein D をワクチンとして用いても液性抗体を主体とする免疫が誘導されて、同様な抑制効果が認められた。(2) 桐沢型ぶどう膜炎：桐沢型ぶどう膜炎は近年急増しつつある原因不明の難治性疾患であるが、ヘルペスウイルスの関与が強く示唆されている。適切な動物モデルの開発は、この桐沢型ぶどう膜炎の発症病理を解明し、治療法を開発していく上で極めて重要である。その意味で、片眼前房内にヘルペスウイルスを接種すると、非接種眼において高率に網膜炎が発症するという von Szily のモデルは有望である。マウスを用いた von Szily のモデルにおいて、ヘルペスウイルスは視神経を介して反対眼に伝播することが明らかとなった。ヌードマウスにおける免疫脾細胞の移入実験から、T 細胞がウイルスの伝播阻止に重要であることが明らかとなった。(日眼 92:1-26, 1988)

キーワード：単純ヘルペスウイルス、ヘルペス性角膜炎、再活性化、ワクチン、桐沢型ぶどう膜炎

Abstract

With the recent progress in virology, a number of reports on herpesvirus researches have been accumulated with a special reference to ocular diseases. Despite the development of new antiviral agents, the management of herpetic keratitis, the most common ocular herpetic infection, has been a serious task because of its recurrence, persistence, and complexity in pathobiology. Furthermore, herpesviruses have attracted much attention as a etiologic agent of Kirisawa's uveitis. Recent basic and clinical approaches to these two diseases were presented. (1) Herpetic keratitis: Through a retrospective survey on the clinical courses of 133 patients with herpetic keratitis, recurrent stromal keratitis has been found most difficult to treat. Studies using a rabbit model for stromal keratitis have shown the efficacy of combined treatment with systemic gamma globulins and topical steroid in clearing a virus from the eye and alleviating the corneal inflammation. Using a rabbit model for induced HSV-1 reactivation, it has been demonstrated that each virus isolate has different ability to establish latency and to reactivate from ganglia upon stimulation. Alpha and beta receptors present in the eye might be related to the virus reactivation process. The analysis of viral DNA by means of enzyme-cleavage patterns has enabled us to type and identify each viral isolate. This method has been proven extremely beneficial in elucidating the identity of several viral isolates obtained from one patient as well as assessing the relationship between the virulence and a specific DNA fragment of each isolate. The investigation of the immunity elicited against viral invasion to the cornea is essential for understanding of the pathogenesis of herpetic keratitis. The experiments using a mouse herpetic keratitis model have shown that the humoral immunity plays a role in the elimination of a virus through neutralization or immune destruction of virus-infected cells. The cell transfer studies using immunodeficient nude mice have revealed that the cellular immunity, principally mediated by T cells, is of utmost importance in the defense of ocular herpetic infection. A herpes simplex vaccine has been strongly warranted for the immunoprophylaxis of herpetic eye diseases. Because of the possible oncogenicity and latency by viral DNA, a subunit type of vaccine has been extensively studied. It has been demonstrated that the antigens extracted from virus-infected cells significantly prevented the development of keratitis as well as the establishment of ganglionic latency. Further studies have shown that herpes simplex virus glycoprotein D is effective as well. (2) Kirisawa's uveitis (Acute retinal necrosis): The incidence of Kirisawa's uveitis has been increased. The exact cause of this disease remains unknown, however, the herpesvirus group has been considered a pathogenic agent. A von Szily model, in which, after intracameral inoculation, a virus travels to the contralateral eye causing necrotizing retinitis, would be feasible for studying the pathogenesis of this particular disease. It has been shown in this study that a virus reached to the contralateral eye through the optic nerve and that this viral spread was inhibited by the transfer of sensitized T lymphocytes. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1-26, 1988)

Key words: Herpes simplex virus, Herpetic keratitis, Reactivation, Vaccine, Kirisawa's uveitis

I 緒 言

最近のウイルス学の進歩とともに、ヘルペスウイルス感染症における基礎的研究の報告も増え、眼科臨床との関連において興味ある事実が明らかとなっている。

ヘルペスウイルスによる眼疾患としては、第一に当科角膜外来の受診患者の約半数を占める角膜ヘルペスが挙げられる。近年、アシクロビルを始め新しい抗ウイルス剤が開発された¹⁾にもかかわらず、角膜ヘルペスの難治性と病態の複雑さが依然として大きな問題となっている。また、最近では桐沢型ぶどう膜炎の病因としても、ヘルペスウイルスが注目を浴びている。

本稿では、以上二つの疾患における最近の臨床的および基礎的知見について述べる。

II 角膜ヘルペス患者の臨床統計

昭和58年4月から60年3月までの2年間に阪大眼科角膜外来を受診した症例133例135眼を対象とした。しかも、2年以上の経過が観察でき、観察期間中に何らかの活動病変を認めたものについて調査した。

なお、今回はヘルペスの再発に関して調査したため、再発を減少させる可能性のある角膜移植施行症例²⁾及び角膜穿孔例は除外した。

今回対象とした角膜ヘルペス症例の受診時病型の内訳を表1に示す。角膜ヘルペスの病型は多彩であるが、今回は大きく上皮型、実質型、栄養障害型（遷延性角膜上皮欠損）と点状表層性角膜炎などの前記3型に規定できない型（その他）に分類した³⁾。

実質型は74眼（55%）で最も多く、対象症例135眼の約半数以上を占めていることが判明した。上皮型は41眼（30%）で、栄養障害型は11眼（8%）、その他のものは9眼（7%）であった。なお、上皮型と実質型を同時に合併しているものはその発生病理を考慮して、上皮型として今回の調査を施行した。

今回の臨床統計では上記3病型の角膜ヘルペス症例について、その再発移行形態と再発による治療後視力について調査した。

これら3病型（計126眼）における、男女比、平均年齢、観察期間について表2に示す。栄養障害型を除いて、男性に多いという傾向が判明した。3病型を通して、年齢は40歳を中心に多く、平均観察期間は約3年であった。

年齢分布は10歳代と30～40歳代にピークのある二相

表1 受診時病型

上皮型	41眼（30%）
実質型	74眼（55%）
栄養障害型	11眼（8%）
その他	9眼（7%）
計	135眼（100%）

表2 3病型における男女比、平均年齢、観察期間

	眼数	男	女	平均年齢	平均観察月数
上皮型病変	41	24	17	36.0	34.4
実質型病変	74	42	32	45.9	41.7
栄養障害型病変	11	5	6	41.5	36.5
	126	71	55	42.3	38.9

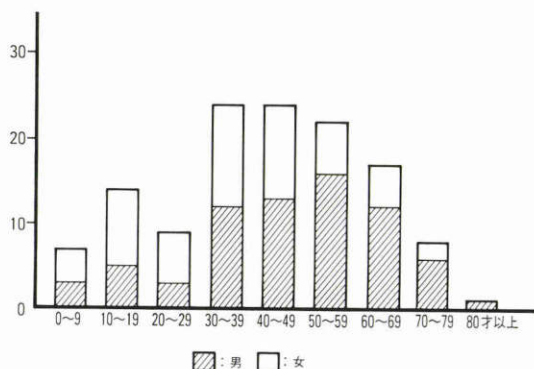


図1 年齢分布。10歳代と30～40歳代にピークのある二相性を示した

性を示した（図1）。

受診時病型が上皮型であった症例の再発時の病型とその治療後視力を調べた結果（表3），受診時病型が上皮型のもの（41眼）は再発なしに経過するもの（24眼，59%）が最も多く、かつ0.5以上の治療後視力を得た症例も17眼，71%と多かった。受診時病型が上皮型のものが再発する時は、実質型として再発するものが最も多く、9眼，22%であった。しかも、実質型として再発すると治療後視力は悪くなる傾向のあること（治療後視力：0.5以上のものは9眼中4眼，44%）が判明した。上皮型として再発するものは、5眼，12%で比較的小なく、かつ治療後視力も良好であった（治療後視力：0.5以上のものは5眼中4眼，80%）。

次に、受診時病型が実質型であったもの（74眼）の再発時の病型とその治療後視力を調べた（表4）。受診時病型が実質型のものは再び、実質型として再発する

表3 受診時病型：上皮型

		治療後視力 (0.5以上)
再発なし	24眼 (59%)	17眼 (71%)
上皮型再発	5眼 (12%)	4眼 (80%)
実質型再発	9眼 (22%)	4眼 (44%)
栄養障害型再発	3眼 (7%)	1眼 (33%)
計	41眼	26眼 (63%)

表4 受診時病型：実質型

		治療後視力 (0.5以上)
再発なし	27眼 (36%)	11眼 (41%)
上皮型再発	14眼 (19%)	4眼 (29%)
実質型再発	32眼 (43%)	14眼 (44%)
栄養障害型再発	1眼 (1%)	0眼 (0%)
計	74眼	29眼 (39%)

表5 受診時病型：栄養障害型

		治療後視力 (0.5以上)
再発なし	4眼 (36%)	1眼 (25%)
上皮型再発	0眼 (0%)	0眼 (0%)
実質型再発	3眼 (27%)	0眼 (0%)
栄養障害型再発	4眼 (36%)	2眼 (50%)
計	11眼	3眼 (27%)

ものが最も多く、32眼、43%であり、治療後視力も不良であった（治療後視力：0.5以上のものは32眼中14眼、44%）。再発なしに経過する症例は、受診時病型が上皮型であったもの（表3、59%）と比較すると、36%と頻度が低かった。換言すれば、受診時病型が実質型の症例は上皮型のものに比べ、角膜ヘルペスがより再発する傾向にあることが判明した。

栄養障害型として受診した症例の再発時病型の内訳とその治療後視力については受診時病型が上皮型（表3）ならびに実質型（表4）のものに比べ、0.5以上の治療後視力を獲得した症例は少ないこと（3眼、27%）が判明した（表5）。

次に、再々発時の移行病型について調査した。受診時上皮型の症例が、再発時また再々発時に移行する病型を呈示したのが図2である。主たる移行形態の流れを矢印の線の太さで表した。なお、図中の数字は各眼数を示している。

受診時上皮型のものは再発しないものが最も多いが、実質型として再発すると、再々発時実質型として再発するものが多いことが判明した（図2）。

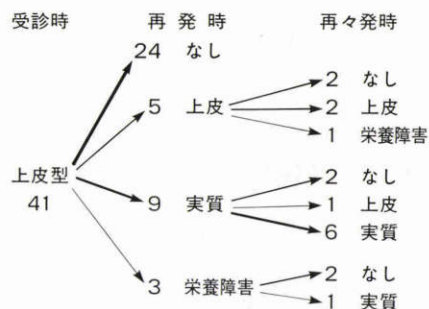


図2 上皮型症例の再発移行形態。主たる移行形態の流れを矢印の線の太さで表した。表中の数字は各眼数を示している。

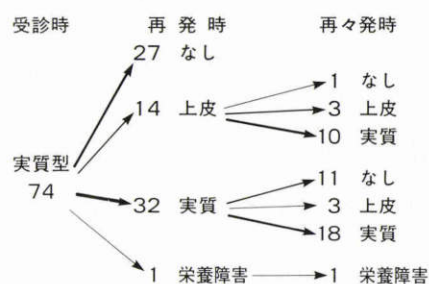


図3 実質型症例の再発移行形態。主たる移行形態の流れを矢印の線の太さで表した。表中の数字は各眼数を示している。

受診時実質型の症例の再発移行形態を示したものが図3である。実質型は再発時、再び実質型として再発するものが最も多く、しかも再々発時、実質型として再発する傾向が認められた（図3）。さらに実質型として受診した症例が再発時上皮型となっても再び実質型として再発することが判明した（実質型74→上皮型14→実質型10）。

このように実質型角膜ヘルペスが再発しやすいということが示されたので、実質型病変を1回以上経験した症例のヘルペス再発回数と治療後視力を調査した。その結果、再発回数が多くなるほど、0.5以上の治療後視力を獲得する症例は少なくなることが判明した（表6）。

小括

今回、我々は2年以上経過を観察することができ、且つ再発を減少させる可能性のある角膜移植を施行していない角膜ヘルペス症例について、その視力予後とヘルペス再発による病型の移行形態について検討した。

対象症例の中で、実質型が55%と最も多かったが、

表6 実質型病型を1回以上経験した症例の再発回数と治療後視力

再発回数	眼数	治療後視力 (0.5以上)	平均観察月数
0	31	12眼 (39%)	35.4
1	21	8 (38%)	34.7
2	14	3 (21%)	39.5
3	15	4 (27%)	38.9
4	7	1 (14%)	40.4
5回以上	10	1 (10%)	38.7

過去の報告⁴⁾⁵⁾でも、実質型が多いことが指摘されているのと合致する。さらに、近年実質型角膜ヘルペスが增加していることも16年間におよぶ臨床統計⁴⁾から報告されている。

上皮型は再発しないものが最も多い(表3)が、治療に難渋する実質型へ移行したものが、41眼中9眼、(22%)の率(表3)に認められた。北野ら⁶⁾は50%の症例で移行すると報告しているが、治療内容、病型分類、観察期間が異なるため、今回の結果とは単純に比較できない。一般には、上皮型から実質型への移行率は20~25%と言われている⁶⁾⁷⁾。

実質型から上皮型への移行は74眼中14眼、19%で、実質型への移行は74眼中32眼、43%に認められた(表4)。この数字は他の報告⁵⁾とほぼ合致する。

再々発した時の病型についての詳細な報告は少ないが、図2、3から、ヘルペス再発および再々発と実質型とは相互に深く関係していることが示唆された。即ち実質型はよく再発し、頻回再発症例は実質型のものに多いことが示された。

治療後視力については、受診時病型が上皮型のものが実質型のものに比べ良好であり(表3、4)、他の報告とも一致する⁵⁾⁷⁾。この点については上皮型の場合、実質型と比べ、病変が瞳孔縁にまで及ぶことが少ない事も関与していると思われる。

実質型病変を1回以上経験した症例において、ヘルペス再発回数が多くなる程、治療後視力は低下した(表6)が、視力予後の面からみても、現在の角膜ヘルペスの治療における最大の問題点は実質型角膜ヘルペスとその再発の克服にあることが示唆される。

III 実質型角膜ヘルペス動物モデル

実質型角膜ヘルペスの病態は角膜実質のウイルス抗原に対する宿主の免疫反応であると言われている⁸⁾⁹⁾。それ故、現在の実質型角膜ヘルペスに対する治療方針はウイルス抗原に対する免疫反応の抑制と角膜

実質からのウイルス抗原のクリアランスである。臨床的にはステロイドと数年前より当科にてその治療効果が評価されてきたグロブリン製剤^{10)~12)}が挙げられる。

しかしながら、実質型角膜ヘルペスに対して現在行われている治療は未だ満足すべきものではない。例えば、ステロイド剤による治療では根治は期待できず、再発を招くことが日常診療でよく経験されてきた。

そこで、より新しい理想的な治療法の開発には実質型角膜ヘルペスの動物モデルの作成が必要かつ重要である。従来より、実質型ヘルペス動物モデルとして報告されたものは単に角膜実質内にヘルペスウイルスを注入したものが多かった^{13)~15)}が、これでは宿主の免疫反応がその主たる病態である実質型角膜ヘルペスのモデルとは言い難い。

できるだけ臨床病態に近く、かつ確実に発症させることのできる実験モデルの開発が必要である。今回、Meyersら¹⁶⁾とBoisjolyら¹⁷⁾が報告したモデルをmodifyした新しいモデルを作成した。

モデル作成方法は単純ヘルペスウイルス1型Oda株を用いて、1週間隔で2回家兎背側皮下に前感作(接種)する。1週後に角膜実質内にウイルスを接種すると接種後の実質混濁が一旦消退し、さらに数日後に実質型角膜ヘルペスと同様の角膜病変が発生する。

上記動物モデルを用い、コントロール群として生理的食塩水点眼群、治療群として、0.1%β-methasone(ステロイド)点眼群、1家兎あたり0.25グラムの完全分子型グロブリン点滴静注群の3群に分け観察し、検討を加えた。

検討項目としては、臨床経過を細隙灯顕微鏡にて観察すると共に、病理組織学的検討および角膜実質内におけるウイルスのtitrationを施行した。

細隙灯顕微鏡検査による臨床病変のスコアを示す(表7)。角膜実質の観察には、角膜浮腫の程度と虹彩の透見度を基準とし、虹彩の観察には、虹彩上血管の充血程度を基準とした。

角膜実質内へのヘルペスウイルス接種直後の前眼部所見を図4に示すが、前感作しない場合、数日でこの所見は消退する。

次に、前感作後にヘルペスウイルスを実質内接種した後の前眼部所見の経過を示す。

接種後4日目の前眼部所見はステロイド点眼群では、著明な変化を認めず、生理的食塩水(コントロール)およびグロブリン投与群においては、虹彩および結膜の充血を認めた(図5)。

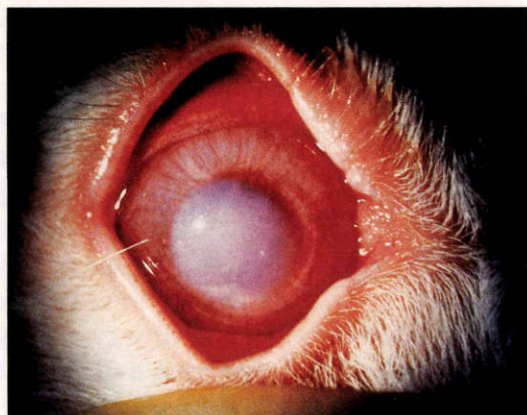
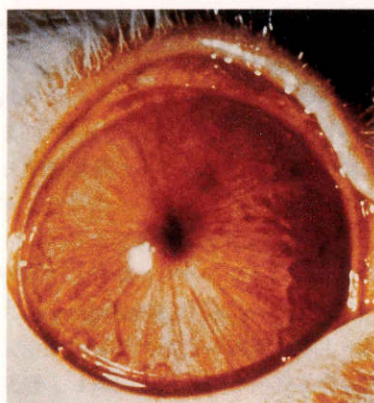
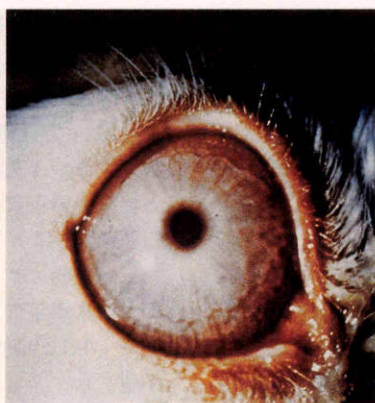


図4 角膜実質内へのヘルペスウイルス接種直後の前眼部所見（前感作していない）



生理食塩水 4日目

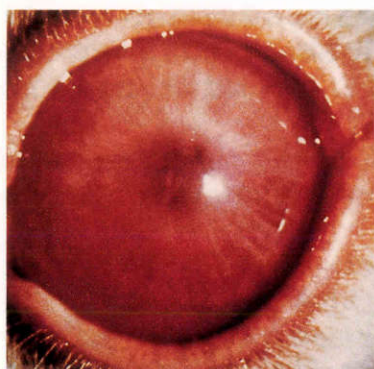


ステロイド 4日目



グロブリン 4日目

図5 前感作後、ヘルペスウイルス接種4日目の前眼部所見



生理食塩水 7日目



ステロイド 7日目



グロブリン 7日目

図6 前感作後、ヘルペスウイルス接種7日目の前眼部所見

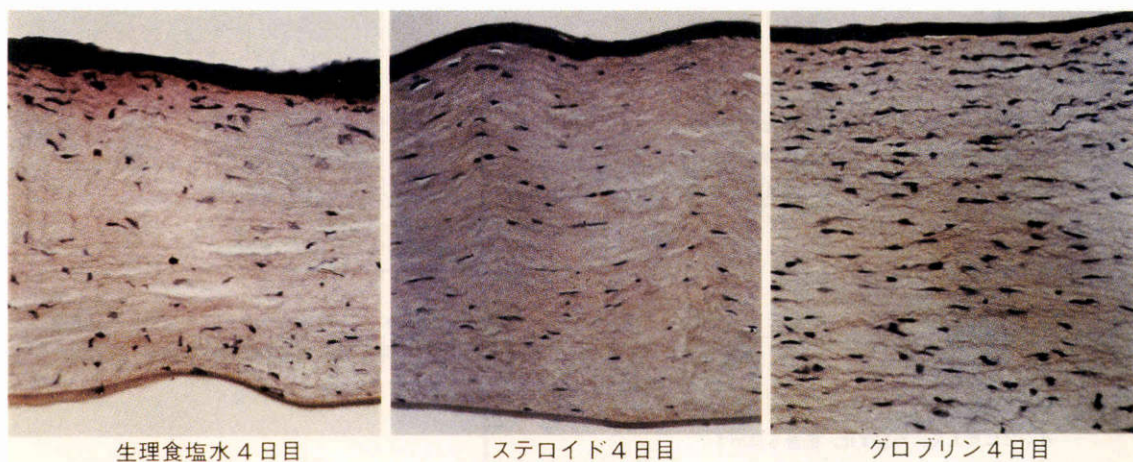


図9 前感作後、ヘルペスウイルス接種4日目の角膜病理組織像

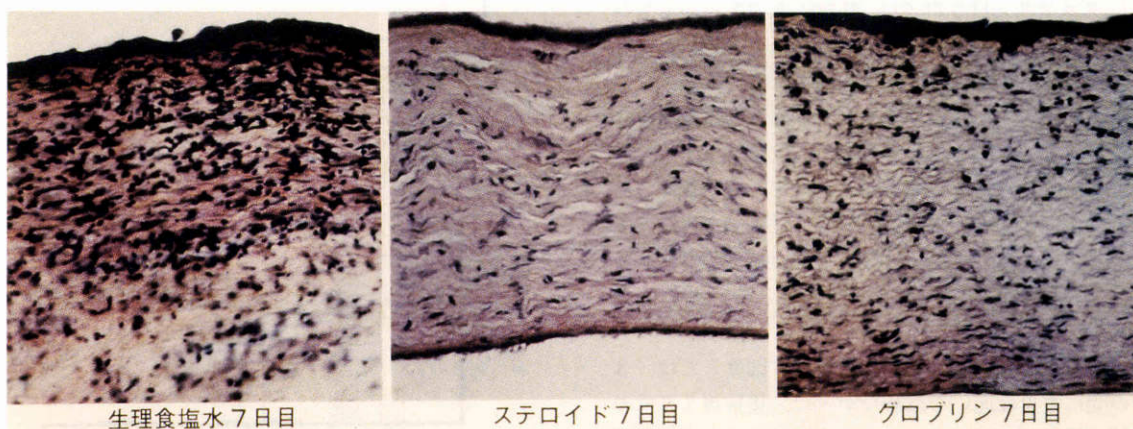


図10 前感作後、ヘルペスウイルス接種7日目の角膜病理組織像

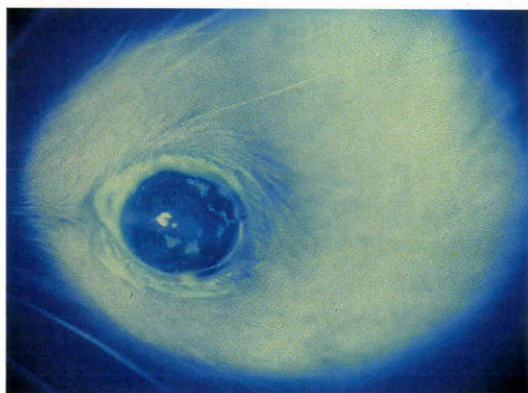


図23 マウスヘルペス性角膜炎（上皮型）



図24 マウスヘルペス性角膜炎（実質型）

表7 クリニカル・スコア

実質

- 0: 正常
 1: 僅かの浮腫, 虹彩の細部は見える
 2: 中程度の浮腫, 虹彩の細部はやや不明瞭
 3: 強度の浮腫, 混濁, 虹彩の細部は見えない
 4: 混濁, 虹彩は見えない

虹彩

- 0: 正常
 1: 軽い充血
 2: 中程度の充血
 3: 強度の充血
 4: 3に加えて, 形態変化, 癒着を認める

接種後7日目の前眼部所見はコントロール群において, 角膜実質に著明な混濁と角膜実質炎を認めた(図6), グロブリン投与群では, 虹彩に充血を認めるものの, 角膜混濁は著明ではなかった. ステロイド投与群においては炎症症状の出現は抑制されていた.

角膜実質病変と虹彩炎のクリニカルスコアの経時的变化を図7, 8に示す. ステロイド投与群で, 角膜実質および虹彩における炎症の抑制効果が著明であったが, コントロール群では臨床病型に近い強い病変の出現が認められた. 一方, グロブリン投与群においては, コントロール群とステロイド投与群との中間の値をとった.

次に, 接種後4日目の病理組織像(図9)では, 3群の間に大きな違いを認めなかった. 接種後7日目の病理組織像(図10)ではコントロール群でヒト実質型角膜ヘルペスに類似した単核球を主体とする炎症細胞の角膜実質内への強い浸潤を認めた. ステロイド投与群では, 炎症細胞の角膜実質内への浸潤像は抑制されていた. グロブリン投与群では, これら2群の中間の程度の病理組織像を呈した.

角膜から分離したウイルス力価の推移をみるために各病期に採取した角膜を homogenize し, 単層培養 vero 細胞(アフリカミドリ猿腎細胞)を用い titration を施行した.

接種4日目においては, ウイルス力価は3群で変わらなかった. 接種7日目におけるグロブリンおよびコントロール群では, ウイルスは検出不能であったが, ステロイド投与群では, ウイルス力価は高値を示した(図11).

小括

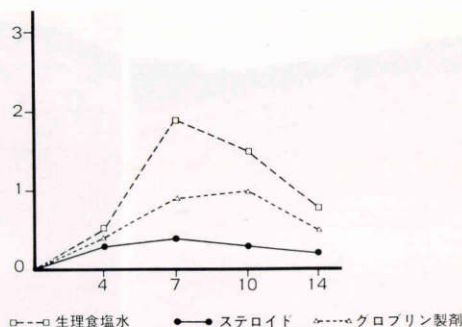


図7 角膜実質病変のクリニカルスコア

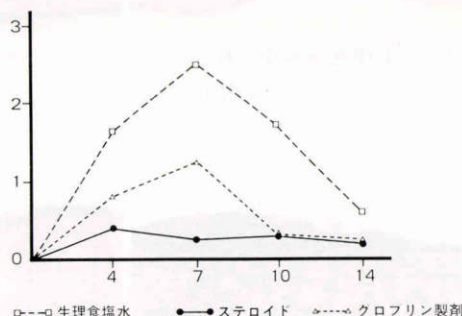


図8 虹彩炎のクリニカルスコア

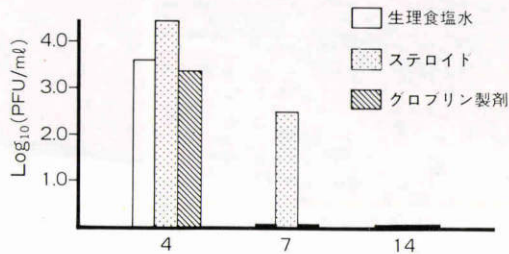


図11 ウイルスの Titration (角膜)

今回我々の使用した動物実験モデルは, 従来報告^{13)~15)}されてきた角膜へのヘルペスウイルスの直接的接種法とは異なり, 一旦感作免疫させたモデルに抗原を注入し病変を作成した点で, 実質型角膜ヘルペスの臨床病像により近いものと考えられる.

今回我々の行った動物実験モデルによる実験結果から, 現在広く汎用されているステロイド剤による治療法では, 確かに臨床所見の改善には最も優れているが, 抗原物質であるヘルペスウイルス自体を除去することにおいてはコントロール群に比べても劣っていることが判明した(図11). 臨床的にもステロイドの結膜下注射がヘルペス再発を促すと指摘している報告¹²⁾もあり, 家兎を用いた感染実験でも, ステロイドがヘルペ

スウイルスの増殖を促進させる作用を有することが証明されている¹⁸⁾。

今回使用したグロブリン製剤は完全分子型であったが、従来当教室で臨床的効果を確認したグロブリン製剤はペプシン処理後、Fc portion を欠如したものである¹¹⁾¹²⁾。従来、ペプシン処理免疫グロブリン製剤の実質型角膜ヘルペスに対する治療効果は角膜実質細胞に誘導されたウイルス関連抗原をペプシン処理免疫グロブリンが覆い隠し、理論的にはFc portion を媒体とする classical pathway を介する CDAC および ADCC を阻止すると考えられていた¹⁰⁾。

しかしながら、ペプシン処理免疫グロブリン製剤の本動物実験モデルを用いた臨床的、ウイルス学的効果は完全分子型グロブリン製剤より劣っている事が確認されているので (unpublished data)、今後の in vitro および臨床面における完全分子型グロブリン製剤の効果の検討が必要と考えられる。

以上の結果から、現時点における実質型角膜ヘルペスに対する治療法としては、優れた消炎効果を有するステロイド剤と角膜実質内のウイルス除去に効果のあるグロブリン製剤の併用療法が必要と考えられる。

IV 角膜ヘルペス再活性化動物モデル

角膜ヘルペス患者の臨床統計から判明した、今一つの角膜ヘルペスにおける問題点である再発を克服する為には、角膜ヘルペスの再発動物モデルの作成が重要である。

1983年、単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) が100%涙液中に再活性化できる動物モデルを Shimomura ら¹⁹⁾が開発した。このモデルはまず、HSV-1 を家兎角膜に接種して、HSV-1 が神経節内で潜伏感染が樹立するとされている感染後3週を経過してから、6-hydroxydopamine のイオントフォレーゼを角膜上で施行し、引き続き5日間連続してエピネフリンの点眼を開始する。涙液中より HSV-1 の分離同定を indicator cell に primary rabbit kidney cell を用いて試みたところ HSV-1 が100%涙液中で検出可能となったというものである。

HSV-1 再活性化の機序を解明するために上記 HSV-1 再活性化動物モデルを用いて、種々のアドレナリン作働性薬物の涙液中 HSV-1 の再活性化率を検討した。

即ち HSV-1 を家兎角膜に接種して、感染後3週を経過してから、6-hydroxydopamine のイオントフォ

表8 種々のアドレナリン作働性薬物による HSV-1 再活性化率について。(文献19より改変)

薬 物	レセプター	HSV-1 再活性化率
エピネフリン	α, β	100
ノルエピネフリン	α, β	70
フェニレフリン	α	62
イソプロテレノール	β	0

レーゼと種々のアドレナリン作働性薬物 (2%) の点眼 (表8²⁰⁾) を開始し、涙液中より HSV-1 の分離同定を試みた。

その結果、 α および β レセプターに作用するエピネフリン並びにノルエピネフリンは HSV-1 再活性化能が高く (HSV-1 再活性化率: エピネフリンが100%, ノルエピネフリンが70%), β 作用のみを有するイソプロテレノールには HSV-1 再活性化能が全く存在しないこと (HSV-1 再活性化率0%) が判明した (表8)。さらに α 作用のみを有するフェニレフリンの HSV-1 再活性化率は62%であった。

従って、涙液中 HSV-1 の再活性化には、 α, β 両方の作用が要求されることが示唆され、眼局所における HSV-1 の再活性化機序において、眼局所の α, β レセプターの相互的関与が考えられた。 α 及び β 作用を有するエピネフリンとノルエピネフリンの再活性化率が異なっているが、その理由として、これら2つの薬剤が保持する α 及び β 作用の強さおよび眼局所における各レセプターの量的割合が異なることが挙げられる。それ故、HSV-1 再活性化機序の解明には、ブロッカー剤を用いた動物実験²¹⁾ならびに in vitro の実験を含めた今後の進展が必要である。

さて、上記に述べた HSV-1 再活性化動物モデルで使用したウイルス株は、米国で比較的汎用されている McKrae 株という established strain である。約95%の成人がヘルペスによって神経節内潜伏感染を幼小児期に経験しているにも関わらず、ごく少数の人のみ角膜ヘルペスが発症するという事象に対する1つの可能性のある理由因子として、ウイルス株の差の存在が挙げられる。

そこで、McKrae 株以外の KOS, F, Rodanus, 17Syn⁺, E-43, CGA-3 株などのウイルス株を用いて、各々の株の三叉神経節内潜伏感染率とその再活性化率を検討した (図12, 13²²⁾)。

神経節内潜伏感染率の検出方法としては各ウイルス

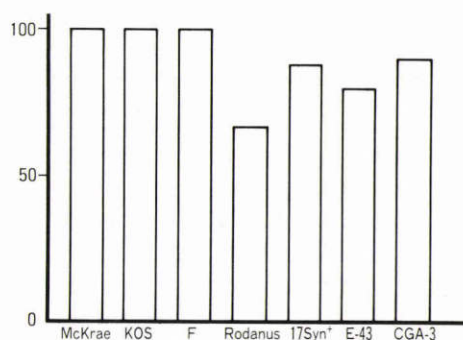


図12 各 HSV-1 株の三叉神経節内潜伏感染率 (文献22より改変)

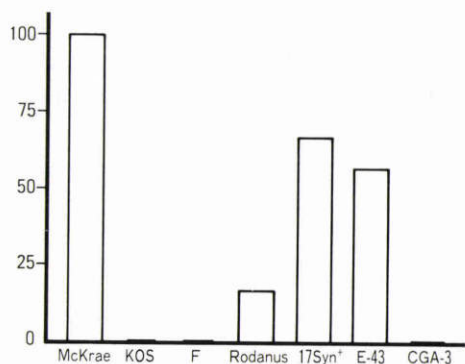


図13 各 HSV-1 株の再活性化率 (文献22より改変)

株 ($1-10 \times 10^6$ PFU/ml) を家兎角膜に点眼接種し、3週以上経過した時点で家兎を殺し、無菌的に三叉神経節を採取した。採取神経節を既に準備した単層培養 primary rabbit kidney cell 上に置き、co-cultivation を施行した。primary rabbit kidney cell の HSV-1 特異的細胞変性効果 (CPE) の有無を28日間検索し、CPE が出現した培養上清液を採取し、後日、中和法にて HSV-1 を確認した。

再活性化率は前述した HSV-1 再活性化動物モデル¹⁹⁾を用い、各ウイルス株の再活性化能を検討した。

McKrae, KOS, F 株の3株は100%の神経節内潜伏感染率をしめしたが、Rodanus, 17Syn⁺, E-43, CGA-3 株の潜伏感染率は70~80%であり、各ウイルス株によって差を認めた(図12)。再活性化率においては、ウイルス株間の差はより著明であった(図13)。特に潜伏感染率では、McKrae 株と同様に100%の潜伏感染率を有する KOS, F 株はその HSV-1 再活性化率は0%であった。

小括

角膜ヘルペスにおける問題点である再発を克服する

為には、角膜ヘルペスの再発動物モデルの開発が重要である。現在に至るまで、未だヒトにおける代表的な臨床像である再発性角膜ヘルペスの動物モデルは開発されていない。ここでは6-hydroxydopamine のイオントフォレーゼ (化学的交感神経切除) により、エピネフリンの薬理作用を増強させたため成功した HSV-1 再活性化動物モデルを紹介した。

現在このモデルは HSV-1 再活性化動物モデルの主流となり、多くの研究施設で、HSV-1 再活性化の病態解明および治療実験に使用されている^{23)~26)}。本法の merit は他の HSV-1 再活性化動物モデル²⁷⁾²⁸⁾に比し、動物死亡率が低く、かつ種々のアドレナリン作働性薬物の HSV-1 再活性化能を検討することにより HSV-1 再活性化の機序を解明できる点である。

McKrae, KOS, F, Rodanus, 17Syn⁺, E-43, CGA-3 株7株のウイルス株を用いて、各々の株の三叉神経節内潜伏感染率とその再活性化率を検討した(図12, 13)が、McKrae 株は潜伏感染率及び再活性化率ともに高いウイルス株で、HSV-1 再活性化実験に最も適した株であることが判明した。

ウイルス株間でその生物学的性状が異なることは、角膜病変において、従来から指摘されていた²⁹⁾。例えば、CGA-3 株は mild な上皮性角膜炎、F および McKrae 株は典型的な樹枝状角膜炎を呈し、RE および Shealy 株は実質型病変を引き起こし易いといわれている。

さらに、Gerdes と Smith³⁰⁾が McKrae 株を含めた3種の HSV-1 株を用いて、三叉神経節内の潜伏感染率が異なることを報告しており、今回の結果を含めて潜伏感染および再活性化におけるウイルス側の因子について、近年解明されつつある。

もし仮に KOS, F 株のように100%神経節内に潜伏感染を樹立するけれども、再活性化を起こさないウイルス株に幼小児の際、感染したヒトは終生角膜ヘルペスは発症しないのではないかと、また逆に、McKrae, 17Syn⁺株のような再活性化する傾向の強い株に感染したヒトでは、角膜ヘルペスが頻繁に再発する可能性が大きいことが推論できる。

角膜ヘルペスのヘルペス再発機序に関して、今後ウイルス株の差を考慮する必要があると思われる。

V DNA 制限酵素切断像の解析

以上のように、ヘルペスウイルス株間に潜伏感染率、再活性化率に差があることが判明したが、必然的に、

各ウイルス株間の異同の判別が重要である。従来よりの単純ヘルペスウイルス 1 型および 2 型の型同定法の進歩に加え³¹⁾、近年ウイルス分子疫学という新しい領域で、同じ型に属する分離株の識別法即ち DNA の制限酵素切断像の分析が行われるようになり、単純ヘルペスウイルス 1 型において、その新鮮分離株間の異同が鑑別可能になった^{32)~37)}。

DNA 制限酵素による DNA 切断像の作成方法には、まず新鮮分離したウイルスを単層培養した vero 細胞に感染させて、大量のウイルスを回収し、フェノール抽出法にて蛋白質を除去した後、エタノールでウイルスの DNA を沈澱させ、収集した DNA を種々の制限酵素を用いて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、ウイルス DNA の切断像を作成する方法を用いた。

従来からヘルペス感染動物実験で日本で汎用されてきた福田株と海外の施設で比較的頻繁に使用されている McKrae 株を用いて、BamHI を始めとする種々の DNA 制限酵素で切断した電気泳動のパターンを図14に示す。上記 2 株の DNA 制限酵素切断像の違いは明白である。

種々の DNA 制限酵素がどの箇所で HSV-1 DNA を切断するかを示すと図15の如くであるが、例えば Bgl II DNA 制限酵素はアデニン、グアニン、アデニン、チミン、シトシン、チミンと並んだ 6 つのヌクレオチドを認識し、最初のアデニンとグアニンの間で、DNA 鎖を切断し、Eco RI はグアニン、アデニン、アデニン、チミン、チミン、シトシンと並んだ塩基配列を認識し、最初のグアニンとアデニンとの間で DNA 鎖を切断する。

BglIII による被切断 HSV-1 の DNA は図16の如くであるが、これを電気泳動すると、各断片は大きさの順に図17のように、HSV-1 DNA 切断像が得られる(各切断片は分子量の大きいものからアルファベット順に命名される)。

近年、ウイルス分子疫学の領域で、柳ら³⁶⁾³⁷⁾は246株に昇る HSV-1 新鮮分離株の DNA 制限酵素切断像における疫学的研究調査から Bgl II 消化の K 断片のサイズの変異株が比較的高い頻度で存在し、かつその変異断片の同定が容易であることを報告し、この K 断片の大きい変異株を A 型変異株と命名した(図17)。

そこで、我々は発症組織(角膜か皮膚か)と A 型変異株の検出頻度との関連性について検討した。その結果、角膜より新鮮分離できた株において、A 型変異株は全分離株21株中 5 株、24%にみられ、皮膚からでは、

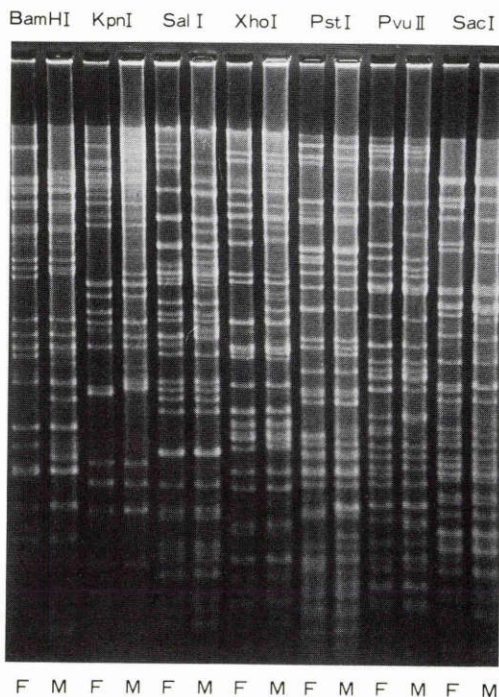


図14 Fukuda 株と McKrae 株の比較。F: Fukuda 株, M: McKrae 株

Bgl II

5'-AGATCT-3'
3'-TCTAGA-5'

Eco RI

5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

Hind III

5'-AAGCTT-3'
3'-TTCGAA-5'

Hpa I

5'-GTTAAC-3'
3'-CAATTG-5'

Kpn I

5'-GGTACC-3'
3'-CCATGG-5'

Xba I

5'-TCTAGA-3'
3'-AGATCT-5'

図15 種々の DNA 制限酵素の HSV-1 DNA 切断箇所



図16 HSV-1 DNA/BglIII, BglIII DNA 制限酵素による被切断 HSV-1 DNA を示す。

38株中23株、61%に検出できた(表9)。これら検出頻度の間には χ^2 検定で1%の危険率で統計学的に有意の

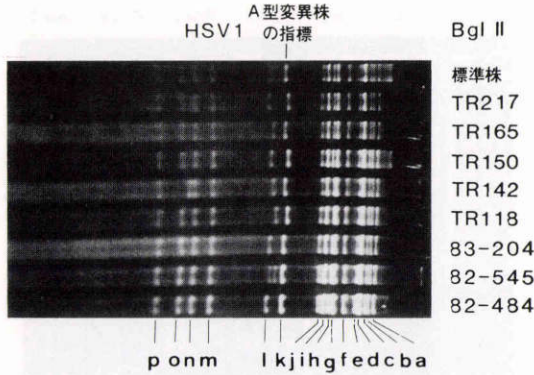


図17 A型変異株の指標であるK断片を示している (文献36より引用). TR217, 150, 118: A型変異株

表9 病巣による分離株の差

病巣	A型変異株	全分離株	A型変異株 全分離株 %
角膜	5	21	24★
皮膚	23	38	61★

(★: $P<0.01$, χ^2 test)

表10 病型による分離株の差

	A型変異株	全分離株	A型変異株 全分離株 %
上皮型	6	35	17
実質型	2	10	20

差が認められるが、この意味について論ずる前に、より多くの分離株について慎重な分析を行なうことが必要であると考えている。

臨床病型（上皮型ヘルペスと実質型ヘルペス）とA型変異株の検出頻度との関連性について検討した結果、現時点では、実質型の分離株が10株と少ない為か、臨床病型による差は認めなかった（表10）。

DNA 切断像の分析は、疫学のみならず、次に示示するような個々の角膜ヘルペスを含んだ症例におけるヘルペス感染経路および再発機序を考察する上でも重要である。

症例は56歳の男性で、両眼眼痛を主訴として、近医を受診し両眼の角膜ヘルペスと診断された。2週間にわたる IDU 治療に抵抗性を示し、当科を紹介された。

初診時、右眼に樹枝状角膜炎、左眼に地図状角膜炎

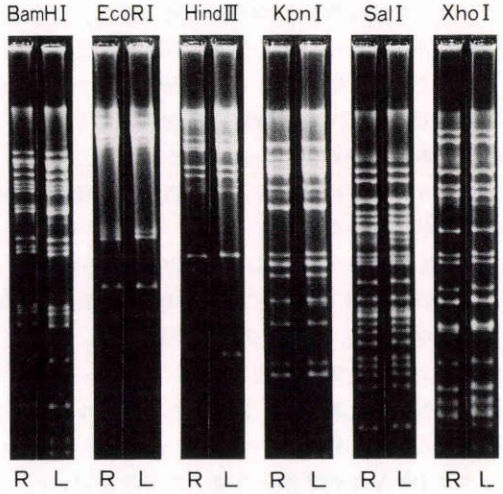


図18 各種 DNA 制限酵素で HSV-1 DNA 切断パターンを分析した所、両眼より分離できたウイルスは同じであることが判明した。R: 右眼, L: 左眼。

を認めた。両眼より HSV-1 を分離同定し、DNA 制限酵素で分離 HSV-1 の DNA 切断パターンを分析した所、両眼より分離できたウイルスは同じウイルスであることが確認できた（図18）。

さらに、採取ペアー血清の検査結果（初診時 HSV-1: IgG 2048, IgM<2, CF 64, NT 64; 2 週後: IgG 1024, IgM<2, CF 32, NT 128）から、本症例は再発性角膜ヘルペスと考えられた。

小括

近年ウイルス分子疫学という新しい領域で、DNA の制限酵素切断像の分析が行われるようになり、単純ヘルペスウイルス 1 型において、その新鮮分離株間の異同が鑑別可能になった。

さらに本 DNA の制限酵素切断像の分析は、単に疫学のみならず、分子生物学に基づく新しいウイルス株の生成の機作（インフルエンザウイルス）やウイルス感染症の病因論的研究（パピローマウイルス）に進展をもたらし、臨床ウイルス学に新たな展開を促しつつある³⁶⁾。

興味深いことに、近年柳ら³⁶⁾は DNA 制限酵素切断像の分析により A 型変異株（BglII 消化 K 断片の大きい変異株）の分布に地域的な差があることを見出している。その報告によると、A 型変異株は仙台、山梨など東日本では各 3%、8%と少なく、久留米、山口など西日本では29%、24%と多いことが統計学的有意の差を持って判明している。

そこで、我々は発症部位（角膜および皮膚病巣）とA型変異株の検出頻度との関連性について検討した結果（表9）、皮膚に比べて角膜より新鮮分離できた株において、検出できたA型変異株は少なかった（ $p < 0.01$ ； χ^2 検定）。

近年、Centifento-Fitzgerald³⁸⁾らがHSV-1 MP株（実質型）とF株（上皮型）を用いて、角膜病変の差がHSV-1 Bgl II F断片に含まれる0.70~0.83map unit上にあるDNA locusにより規定されると報告している。今回、臨床病型（上皮型ヘルペスと実質型ヘルペス）によるA型変異株の検出頻度には差が認められなかった（表10）。

一般的な角膜ヘルペス症例と比べて、呈示症例の興味深い点は、角膜ヘルペスが両眼同時に再発症した点である。その詳細な原因は不明であるが、本症例は発症時において、全身的にアルコール性肝硬変、鉄欠乏性貧血を合併しており、免疫能の低下が存在していた可能性がある。

従来より角膜ヘルペスの再発機序については、HSV-1が幼児期に神経節内に潜伏感染し、成人となつてから感冒やストレス等の誘因によって神経節内で再活性化し、角膜ヘルペスとして発症すると言われてきた²⁷⁾³⁹⁾⁴⁰⁾が、改めてこれらの事象がHSV-1のDNA制限酵素切断像の解析により、本症例で確認できたと考えられ、今後本DNA切断像の解析の眼科臨床面での進展並びに応用が期待される。

VI 角膜ヘルペス感染症における免疫系の役割

ヘルペスウイルスの潜伏感染および再発に関する研究も、角膜ヘルペスの本態を解明し効果的な治療法を開発する上に重要ではあるが、一方でヘルペスウイルス感染に対する免疫防御系の役割を無視しては、角膜ヘルペスを論じることは困難である。

さて、ヘルペスウイルスが体内に侵入すると、生体は種々の免疫防御機構を介してこれを排除しようとする。もちろん、角膜もその例外ではなく、したがって、角膜ヘルペス感染の防御に生体の免疫系がどのように働いているのかを明らかにすることは、角膜ヘルペスの病態を考える上で必須である。生体内の免疫機構は大きく『細胞性免疫』と『液性免疫』の2つの系統に分けることができる。ここでは、角膜ヘルペス感染症におけるこの2つの免疫系統の役割について検討する。

1. 角膜ヘルペスと液性免疫

液性免疫の主役は言うまでもなく抗体である。ウイルスに対する抗体の作用には、大きく分けて、ウイルス粒子に対する中和作用と、ウイルス感染細胞の破壊作用がある。中和とはウイルス粒子の表面に抗体が結合してその感染性を奪うことであり、ウイルス感染の拡大を防ぐ最も効果的な機構の一つである。細胞破壊作用としては、補体との協同作用で起こるCDAC⁴¹⁾⁴²⁾（complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity：補体依存性細胞傷害）（図19）とADCC⁴³⁾⁴⁴⁾（antibody-dependent cellular cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害）（図20）の2つが代表的なものである。この2つの免疫機構は、部位は多少異なるもののいずれも抗体のFc部分にその作用点があることが特徴である。すなわち、感染細胞の表面に存在するウイルス特異抗原に結合した抗体に対して、前者のCDACでは補体が、後者のADCCではFc受容体保有細胞（好中球・マクロファージなど）がさらに結合して感染細胞を破壊する。これらの機構のin vivoにおける意義については未だ不明な点があるが、感染初期より作働し、感染防御に重要な役割を果たしていると考えられている。

単純ヘルペスウイルスのエンベロープ表面には4つの糖蛋白が存在している（図21）。これらの糖蛋白はそれぞれgB, gC, gD, gEと呼ばれ、ウイルスの増殖に

ウイルス感染細胞

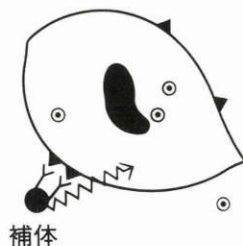


図19 補体依存性細胞傷害, complement-dependent antibody cytotoxicity.

ウイルス感染細胞

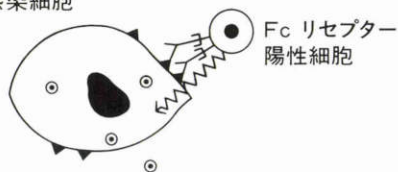


図20 抗体依存性細胞傷害, antibody-dependent cellular cytotoxicity.

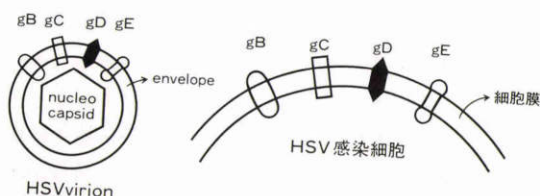


図21 単純ヘルペスウイルスのエンベロープ抗原.

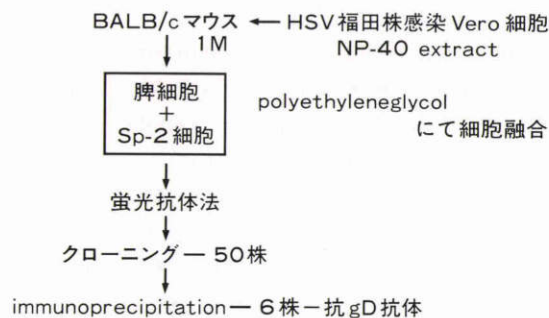


図22 抗ヘルペスモノクローナル抗体の作製法.

において重要な機能をはたしていると同時に、感染細胞の膜表面に表現されて、免疫系の主要標的抗原となっている。今回は、単純ヘルペスウイルスの1型および2型に共通な抗原であるという点と、中和反応における主要抗原という点から、このうちのgDをターゲットに液性抗体の意義について検討した。

液性抗体の意義を検討するうえで、均一の抗体、すなわちモノクローナル抗体を使用すると、よりシンプルな実験系を得ることができる。そこで、実験の第一段階としてgDに対するモノクローナル抗体の作成を試みた。単純ヘルペスウイルス1型で免疫したマウスの脾臓細胞を、抗体を産生しない特殊なマウス・ミエローマ細胞株(SP-2)とポリエチレングリコールにて細胞融合させた後、数回のクローニングを行って、いくつかのgDに対するモノクローナル抗体産生細胞株を得た(図22)。

液性抗体の角膜ヘルペス感染防御における役割を評価するために、BALB/cマウスを用いて、抗体移入後の角膜病変の推移を比較検討した⁴⁵⁾。すなわち、正常のBALB/cマウス(雌:6週齢)に対して、種々のモノクローナル抗体移入を行った24時間後に、角膜擦過を行った上で単純ヘルペスウイルス1型(河村株)を接種した。一般に、BALB/cマウスに単純ヘルペスウイルスを接種すると、2, 3日後には典型的な樹枝状角膜炎が発症する(図23)。また、接種1週間あたりの時点でウイルスは実質内へと侵入し、著明な浮腫混濁を

表11 マウスヘルペス性角膜炎の臨床スコア基準

上皮性病変

0. 病変認めず

1. 樹枝状を呈さない小さく丸い潰瘍もしくは樹枝状潰瘍の遺残
2. 4分の1象限以下の樹枝状潰瘍
3. 4分の1から2分の1象限の樹枝状潰瘍
4. 2分の1象限以上の樹枝状潰瘍及び地図状潰瘍

実質性病変

0. 病変認めず

1. 軽度の浮腫のみ、あるいは小さい混濁のみ
2. 浮腫を伴う混濁で角膜径の2分の1以下のもの
3. 浮腫を伴う混濁で角膜径の2分の1以上のもの
4. 瞳孔が見えない強い混濁

表12 M1およびM12モノクローナル抗体の免疫学的特徴

抗体	中和能	CDAC・ADCC活性
M1	+	-
M12	-	+

伴った実質型角膜炎へと移行する(図24)。移入した抗体の効果は、スリットランプによって角膜病変を連日観察し、表11のような基準により、臨床スコアとして評価した。

クローニングにより最終的に得られたgDに対するモノクローナル抗体株は全部で6種類あったが、その中に活性の相異なる2つのクローンが存在していた。すなわち、M1というモノクローナル抗体は中和作用はあるが感染細胞傷害作用はなく、逆にM12というモノクローナル抗体は中和作用がないかわりに感染細胞傷害作用を持っていた(表12)。すなわち、この2つのモノクローナル抗体を使い分ければ、角膜でのヘルペスウイルス感染防御において、どちらの機構がより重要かを知ることができるわけである。

M1およびM12の抗体移入実験の結果は図25のとおりであった。図より明らかなように、M1とM12のどちらのモノクローナル抗体も、上皮病変の発現は抑制できなかったものの、続発する角膜実質へのウイルス伝播はほぼ完全にブロックしていた。

つぎに、抗体のFc部分の存在意義をより明確にする目的で、Fc部分をペプシン処理により切断したM1およびM12モノクローナル抗体を作成した。M1モノクローナル抗体については、ペプシン処理後もFc部分と無関係のウイルス中和能は元どおりに保たれていたが、M12モノクローナル抗体については、ウイルス感染細胞の破壊能力が完全に失われていた(表13)。M1

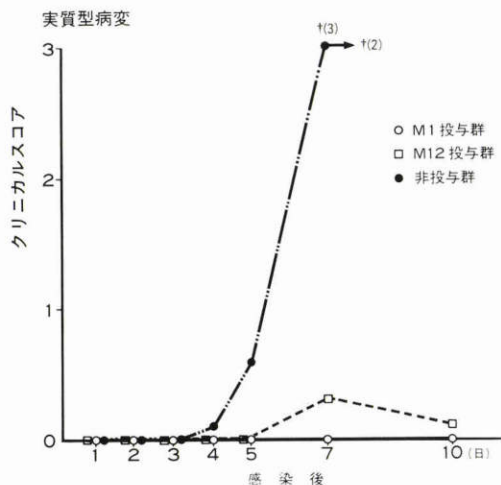


図25 M1 および M12 モノクローナル抗体移入実験。
(実質型病変)

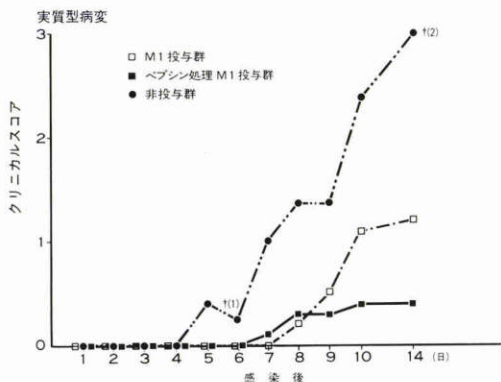


図26 ペプシン処理 M1 モノクローナル抗体移入実験
(実質型病変)

およびペプシン処理 M1 モノクローナル抗体を移入した時の角膜実質病変の臨床スコアは図26であるが、ペプシン処理を行った抗体においても、無処理の抗体と変わらない防御効果が認められた。一方、M12 およびペプシン処理 M12 モノクローナル抗体を移入した場合には、未処理の M12 移入群で実質型病変の抑制効果が前実験と同様に認められたのに反し、ペプシン処理 M12 移入群においてはその抑制効果が全く失われ、コントロール群と変わらない実質型病変が出現した (図27)。

2. 角膜ヘルペスと細胞性免疫

以上のように、抗体を介する免疫機構は角膜におけるウイルス感染拡大防止に極めて大切である。しかしながら、先天性免疫不全症候群患者における臨床的事

表13 ペプシン処理 M1 および M12 モノクローナル抗体の免疫学的特徴

抗体	中和能	CDAC・ADCC 活性
M 1	+	—
pM 1	+	—
M12	—	+
pM12	—	—

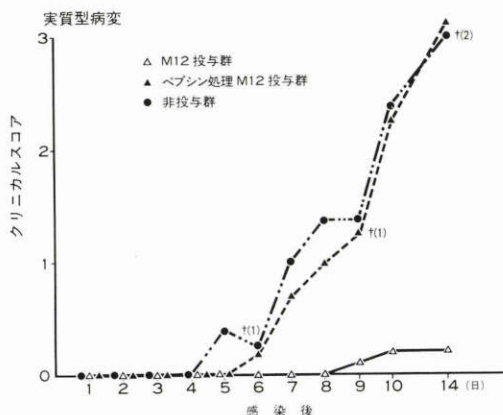


図27 ペプシン処理 M12 モノクローナル抗体移入実験
(実質型病変)

実からも明らかのように、ウイルス感染の防御には正常な細胞性免疫の発現が必須である。この細胞性免疫の意義の検討には、ヌードマウス (BALB/c マウス由来: 先天的に胸腺を欠如し、細胞性免疫能を持たない特殊な系統マウス) が適している。なぜなら、こうした細胞性免疫を欠損しているマウスに対して、種々の免疫細胞を移入してやれば、逆に、その移入した細胞の重要性を知ることができるからである。

角膜ヘルペス感染における細胞性免疫の意義を検討するために、以下のプロトコルのような実験を行った⁴⁶⁾。すなわち、未処置のヌードマウスに種々の免疫細胞を静脈内に移入し、その2時間後に単純ヘルペスウイルス (CHR-3 株) を角膜接種した。移入した細胞の感染防御効果は、感染後1週目における眼球内および周囲組織内でのウイルス量で評価した。表14にその結果を示すが、無処置のヌードマウス群では、眼球・ハーダー腺・三叉神経節のいずれの組織においても、 $10^2 \sim 10^3$ pfu オーダーのウイルスが回収されたのに反し、単純ヘルペスウイルスを接種したマウスより得られた脾細胞 (いわゆる感作脾細胞) を移入後のヌードマウス群では、どの組織においてもウイルスの増殖は完全

表14 各種免疫脾細胞移入のマウス角膜ヘルペス感染に対する効果

移入細胞	処理法	ウイルス 力価 (pfu)		
		眼 球	ハーダー氏腺	三叉神経節
正常脾細胞	な し	2.1×10^3	6.0×10^2	2.1×10^3
免疫脾細胞	な し	0	0	0
	抗 Thy 1.2 抗体 + 補体	1.9×10^2	3.2×10^2	6.0×10^2
	抗マウス Ig 抗体 + 補体	0	0	0
抗 HSV-1 抗体		3.2×10	1.6×10	0

に抑制されていた。一方で、抗 Thy-1.2 抗体（抗胸腺抗体）処理により T 細胞を除去したあとの脾細胞を移入したヌードマウス群では、無処置のマウス群と変わらないウイルス増殖が認められた。逆に、抗マウス免疫グロブリン抗体による処理によって B 細胞を除去しても同じようなウイルス増殖抑制効果が存続していた。これらの事実は、ヘルペスウイルスに特異的な感作 T 細胞が、ヘルペスウイルスの角膜での増殖を抑制し、その感染防御に大切な働きをしていることを示している。

ところで、同じ T 細胞集団にも、例えばヘルパー T 細胞とか、サブプレッサー T 細胞といった機能の異なる幾つかの T 細胞の亜集団が含まれているのは周知の事実である。そこで次に、角膜ヘルペス感染の防御において、どのような T 細胞亜集団が重要かを検討する目的で以下の実験を試みた。どのような T 細胞亜集団が重要かといっても、実際にはヘルパー T 細胞とキラー T 細胞との比較実験であるが、基本的には前実験と同様のプロトコールで行った。ただし、この実験では、ヘルパー T 細胞の細胞表面のマーカーを認識する抗 L3T4 抗体と、キラー T 細胞のマーカーを認識する抗 Lyt-2.2 抗体という特殊な抗体を用いた。すなわち、感作リンパ節細胞を、抗 L3T4 あるいは抗 Lyt-2.2 抗体のいずれかで処理することによって、対応する T 細胞の除去が可能となり、移入されたヌードマウスにおける結果から、除去された細胞の感染防御効果を知ることができる。結果は表15に示すとおりで、抗 L3T4 抗体あるいは抗 Lyt-2.2 抗体のいずれかの抗体で処理したあとの感作リンパ節細胞を移入したマウス群では、コントロールのマウス群に比較して、ウイルス量で 2 log 程度の抑制効果が見られた。一方、補体処理のみを行った感作リンパ節細胞を移入したマウス群ではほぼ完全なウイルス抑制が認められた。これらの結果は、

表15 各種免疫リンパ節細胞移入のマウス角膜ヘルペス感染に対する効果

移入リンパ節細胞	ウイルス 力価 (pfu)		
	眼 球	ハーダー氏腺	三叉神経節
な し	1.0×10^5	4.1×10^4	4.1×10^4
補体処理	3.1×10	3.7×10^2	3.7×10^2
抗 Lyt 2.2 + 補体	2.2×10^4	1.6×10^2	4.6×10^2
抗 L3T4 + 補体	1.7×10^3	2.5×10^2	2.5×10^2

単純ヘルペスウイルスによる角膜感染の防御においては、ヘルパー T 細胞とキラー T 細胞の一方のみでは不十分で、両者が同時に存在することが必要なことを意味している。

小括

角膜ヘルペス感染の防御においては、液性免疫と細胞性免疫の両者が重要な役割を果たしている。前者の液性免疫においては、ウイルスの中和機構とともに、抗体を介したウイルス感染細胞に対する破壊機構がその防御に必要なことが今回の実験により示された。以前より抗体移入によるヘルペス感染防御に関する実験は数多く行われているが、角膜感染系を用いた実験はほとんど見られない。Davis らは、マウスの角膜感染系を用いて、抗体移入がウイルスの中樞神経系への伝播を抑制すること、また中和作用以外の機構がその抑制効果に寄与していることを示した⁴⁷⁾。また、最近 Metcalf ら⁴⁸⁾は、種々のヘルペスウイルスに対するモノクローナル抗体を作成し、感染後48時間目までに投与すれば角膜病変の発現が有意に抑制されることを見出している。彼もまた、移入した抗体の作用機序として中和以外の作用が存在することを示唆しているし、Balachandran ら⁴⁹⁾は 2 型ヘルペスウイルス感染のモデルを用いて、中和能のないモノクローナル抗体でも感染防御効果を持ち得ることを証明している。これらの報告は、今回の実験結果⁴⁵⁾によく一致するものであり、中和能のない抗体でも ADCC や補体によるオプソニン効果などを介して感染防御に働いている可能性がある⁵⁰⁾。ヘルペス感染終結における抗体の Fc 部分の重要性については、Oakes ら⁵¹⁾の報告もあり、これらの事実は、現在われわれが難治性の実質型角膜ヘルペスに対して行っているガンマグロブリン療法の奏功機序を考える場合に極めて興味深い。

一方で細胞性免疫もヘルペスウイルス感染の防御に極めて重要である。今回の実験でも示したように、T 細胞がその防御機転に必須であることは言を待たな

い、むしろ、最近の研究の論点は、感染の防御機転に遅延型過敏反応を司るT細胞（広い意味でヘルパーT細胞に含まれる）と、細胞傷害を司るT細胞（一般にCTLまたはキラーT細胞と呼ばれる）のどちらが主役を演じているのかという点にある。その結果は、現時点では諸家によりまちまちであり、Oakesら⁵²⁾はヘルパーT細胞の重要性を、Larsenら⁵³⁾はキラーT細胞の重要性を示すなど結論は出ていなかった。今回の結果⁴⁶⁾では、ヘルパーT細胞とキラーT細胞のどちらもが存在することが、完璧なウイルス感染防御には必要で、片方だけではその抑制効果が不十分であることが示された。

このように、角膜ヘルペスウイルス感染においては、液性免疫も細胞性免疫もその制御に重大な役割を果たしている。しかし、表14の抗体移入マウス群における結果が示すように、抗体だけではその感染防御効果は不完全であり、細胞性免疫の方が強力な抗ウイルス作用を持っていることは間違いないと思われる。ただし、最近、Lauschら⁵⁴⁾により、抗体の存在が細胞性免疫能をより増幅することが示されており、われわれの身体の中では液性免疫と細胞性免疫の2つの機構が協同して作用しているものと考えられる。

VII ヘルペスワクチンの開発

われわれがヘルペスウイルス感染症に対抗できるもう一つの手段は、ワクチンによる制御である。実際、これまでに多くのウイルス感染症において、ワクチンによる予防が完成されており、例えば、天然痘は既に地球上より消滅している。こうしたウイルス感染症と同じように、もしヘルペスウイルス感染症を予防できるワクチンが開発されたならば、全てのヘルペス性疾患の元凶である潜伏感染を阻止できるわけで、その恩恵は計り知れないものがある。また多少の飛躍はあるが、既に潜伏しているヘルペスウイルスの再活性化をワクチンの投与で免疫学的に制御できるならば、現実的に苦しんでいる角膜ヘルペス患者にとっては大きな福音に違いない。

ウイルスワクチンのタイプには、大きく分けて、生ワクチン、不活化ワクチン、およびサブユニットワクチンの3種類がある。最も強力な免疫を誘導できるのは生ワクチンであるが、ヘルペスウイルスの場合には、ウイルスのDNAを含んだ形のワクチンを使用することは、潜伏感染や発癌の危険性を考慮すれば不可能といえる。したがって、現時点ではこうしたDNA成分を

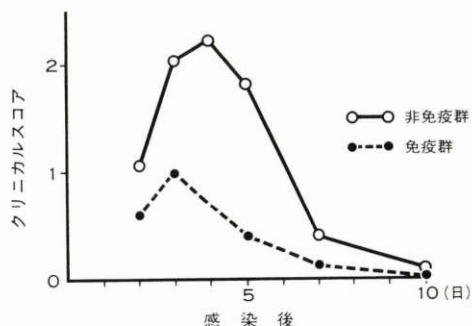


図28 ヘルペスウイルス感染細胞抽出抗原のモルモットヘルペス性角膜炎に対する効果

含まない、ウイルス抗原蛋白のみからなるサブユニットワクチンが、開発の中心となっている。

ヘルペスウイルスに対するサブユニットワクチンとしては、ヘルペスウイルス感染細胞より得たウイルス抗原か、ウイルス粒子の蛋白成分を用いるのが一般的である。こうしたサブユニットワクチンが、はたして角膜ヘルペスウイルス感染を阻止するかどうかを検討するために、プロトタイプのワクチンとして、われわれはヘルペスウイルス感染細胞よりの抽出抗原を使用した⁵⁵⁾。すなわち、ヘルペスウイルス感染細胞を界面活性剤の1種であるNP-40で処理し、その反応物の超遠心上清を抗原（ワクチン）とした。この抗原を、モルモットに対して1週毎に3回、筋肉内投与した後、単純ヘルペスウイルスを角膜に接種して、その防御効果を角膜病変のスコア値、および三叉神経節における潜伏感染率から評価した。

モルモットにおける角膜病変の推移を図28に示すが、前述の感染細胞抽出抗原であらかじめ免疫しておいたモルモット群では、ヘルペス性角膜炎の発現が非投与モルモット群と比較して抑制されていた。また、感染後1カ月目の時点で、両群のモルモットから三叉神経節を抽出してヘルペスウイルスの潜伏感染率を検討したところ、免疫モルモット群において潜伏率の有意の低下が認められた(表16)。これらの結果は、感染細胞抽出抗原という、一種のサブユニットワクチンの前投与が、ヘルペスウイルスの潜伏感染を阻止できる可能性を示唆している。

実際のサブユニットワクチンとしては、より精製されたウイルス蛋白が必要であるが、その観点から、単純ヘルペスウイルスの糖蛋白の一つである glycoprotein D (gD) に同じような防御効果があるかどうか

表16 ヘルペスウイルス感染細胞抽出抗原免疫の三叉神経節潜伏感染に対する効果

グループ	三叉神経節潜伏率
非免疫群	8/10 (80%)
免疫群	3/11 (27%)

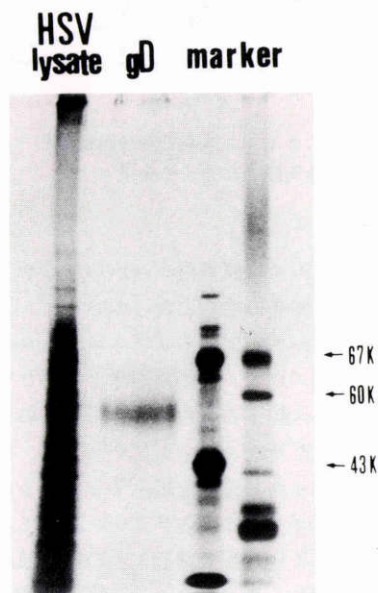


図29 精製 gD 抗原の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

を検討した⁵⁶⁾。この gD の精製には、gD に対するモノクローナル抗体を結合させたアフィニティ・カラムを用いた。すなわち、単純ヘルペスウイルスを感染させた猿腎細胞より得られた NP-40 抽出抗原を、前述のカラムに通し、カラムに結合した gD を酸性バッファーで溶出させた。この操作をもう一度繰り返して得られた抗原をワクチンとして使用したが、その精製度は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により図29のごとく確認できた。

gD のワクチンとしての効果を見る目的で、BALB/c マウス(雌、6週齢)に対して、精製した gD 抗原(0.02 mg)を1週毎に3回、腹腔内投与した。免疫終了1週後の時点でヘルペスウイルス(河村株)を角膜感染させ、角膜病変の推移を経時的に観察した。上皮型病変のクリニカルスコアの変動は図30に、実質型病変のクリニカルスコアの変動は図31に示した。上皮型病変についてはなんの抑制も見られなかったものの、実質型病変についてはコントロールのマウス群と比較して著

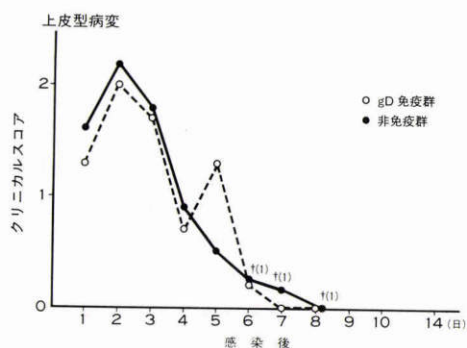


図30 gD 抗原のマウスヘルペス性角膜炎に対する効果(上皮型)

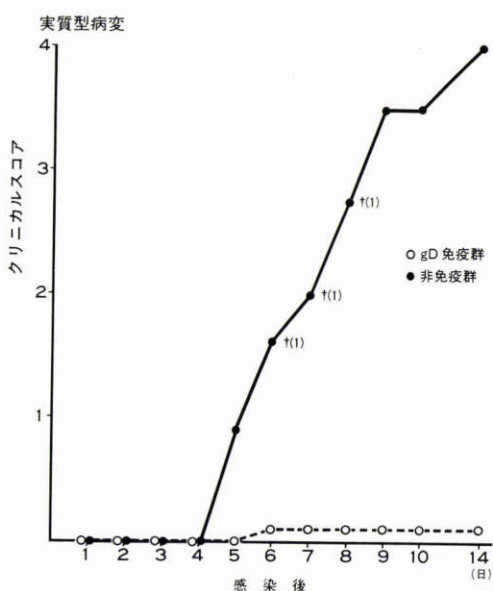


図31 gD 抗原のマウスヘルペス性角膜炎に対する効果(実質型)

明な病変の抑制効果が認められた。また、感染後1カ月目の時点における三叉神経内の潜伏感染率も、gD 免疫マウス群で有意に減少していた(表17)。これらの結果は、前述したモルモットにおける実験結果とよく一致しており、サブユニットワクチンが角膜ヘルペス感染の予防に応用できる可能性を示している。

一方で、こうしたサブユニットワクチンが、どのような免疫機構を介してその効果を発揮しているのかは非常に興味ある点である。そこで、前述したプロトコルにそって、精製 gD 抗原を1週毎に3回、腹腔内投与した BALB/c マウスにおいて、免疫終了後の種々の免疫学的なパラメーターを測定した(図32)⁵⁶⁾。具体的に

表17 gD 抗原免疫の三叉神経節潜伏感染に対する効果

グループ	三叉神経節潜伏率
非免疫群	100 %
gD 免疫群	20 %

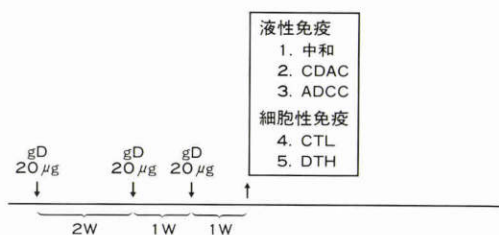


図32 gD 抗原免疫マウスにおける免疫学的パラメーターの測定

表18 液性免疫の測定法

中和抗体価

plaque reduction method
2倍段階希釈したマウス血清とHSV (2×10³ PFU/ml) を混合
plaque 数をコントロールの2分の1以下にする血清の最高希釈度を算定

CDAC (complement dependent antibody-mediated cell lysis)

10倍希釈血清 50 µl
low tox-M rabbit complement 100 µl
HSV 感染L929細胞 1×10⁴/50 µl
⁵¹Cr-release 法

ADCC (antibody dependent cell-mediated cell lysis)

10倍希釈血清 50 µl
ヒトリンパ球 2×10⁵/50 µl
HSV 感染L929細胞 1×10⁴/100 µl
⁵¹Cr-release 法

は、中和抗体価、ADCCやCDACなどの細胞傷害性抗体価、遅延型過敏反応活性、および細胞傷害性T細胞活性について表18および19に要約した方法で検討した。その結果は表20に示すとおりだが、gDのような可溶性ウイルス抗原の投与では、キラーT細胞やDTHなどの細胞性免疫の誘導は認められず、中和抗体（図33）をはじめとして液性抗体を主体とする免疫機構が強く誘導されていた。

小括

ヘルペスウイルス感染症に対する有効なワクチンの開発は、ウイルス学の分野に残された大きな課題の一つである。ただし、前述したように、ワクチンのタイプとしてサブユニット型が望ましいため、その開発には多くの制限があった。これまでに、多くの実験室から種々の実験的なヘルペスワクチンが発表され、初感

表19 細胞性免疫の測定法

CTL (cytotoxic T lymphocyte)

マウス脾細胞 2.5×10⁶/100 µl
HSV 感染3T3cloneA31 細胞 1×10⁴/100 µl
⁵¹Cr-release 法

DTH (delayed type hypersensitivity)

一側耳背側に heat-inactivated HSV 抗原 10 µl i.d.
他側耳背側に非感染細胞処理抗原 10 µl i.d.
24時間後、耳厚測定 (micrometer)

表20 gD 抗原免疫マウスにおける各種免疫学的パラメーター

	CDAC (%)	ADCC (%)	CTL (%)	DTH (mm)
gD 免疫群	*50±14 (n=10)	-3.0±6.1 (n=10)	-7.3±13 (n=13)	0.013±0.021 (n=10)
コントロール群	0.71±3.1 (n=10)	-5.1±8.0 (n=10)	-6.5±13 (n=15)	0.019±0.020 (n=10)

* コントロール群と有意差あり (p<0.01)

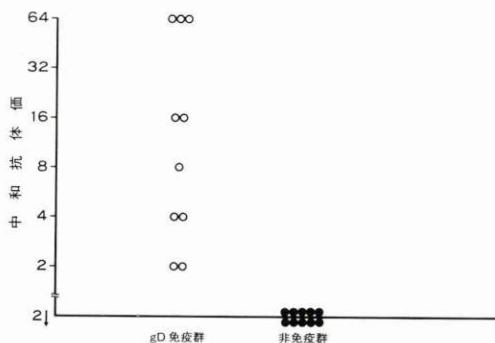


図33 gD 抗原免疫マウスにおける中和抗体価の誘導

染モデルにおいてヘルペス性病変の抑制や潜伏感染率の減少が報告されている^{57)~60)}。今回のわれわれの結果も、諸家の報告によく一致したが、誘導された免疫は液性抗体を主とするもので、抑制効果にはある種の限界があった。したがって、今後のヘルペスワクチン開発の方向としては、細胞性免疫をも誘導可能なタイプのワクチンが必要である。最近の報告によると、ヘルペスウイルスの糖蛋白のうちで、gCはキラーT細胞の主要標的抗原であり⁶¹⁾、その意味からこのgCが今後のワクチン開発の中心となる可能性もある。特にリポソームと呼ばれる人工膜上に、このgCと主要組織適合性抗原を挿入した形のワクチンは有望である。それ以外にも、遺伝子工学の技術を用いて、ワクシニアウイルスの遺伝子内にヘルペスウイルスの糖蛋白の遺伝子を組み込んだ形のワクチンも登場しており⁶²⁾、今後の発展が期待される。

VIII 桐沢型ぶどう膜炎とその動物モデル

1. 桐沢型ぶどう膜炎

桐沢型ぶどう膜炎は近年急増しつつある難治性の壊死性網膜炎を主徴とする疾患で、続発性の網膜剥離を来すためその予後は極めて不良である⁶³⁾⁶⁴⁾。桐沢型ぶどう膜炎の特徴的な病変は、眼底周辺部に初発後、後極部に次第に拡大していく黄白色の滲出様変化であるが(図34)、この黄白色の部分は実際は網膜壊死に相当する。また、網膜血管炎による血管の白鞘化や白線化が認められるが(図35)、この部分には蛍光眼底撮影により著しい血管の透過性亢進が認められる。最終的に網膜は萎縮して菲薄化し、多発性の孔が形成されて網膜剥離に至る。桐沢型ぶどう膜炎に続発する網膜剥離は、極めて難治性で、通常の手術方法では復位を得ることが困難であり、輪状締結術と硝子体腔内シリコン注入が最終的には必要となる。大阪大学眼科では、最近14年間に20例22眼の桐沢型ぶどう膜炎の症例があったが、前述の難治性の網膜剥離は、発症後約2カ月で19眼(86%)に発生し、このうち14眼すなわち罹患眼全体の64%が失明した。

この桐沢型ぶどう膜炎の原因として、近年ヘルペスウイルスが注目を集めている。実際、本疾患患者の硝子体液からウイルス粒子が証明されることも少なくなく、また、前房水や硝子体液における抗体率算定から、水痘帯状ヘルペスや単純ヘルペスウイルスに対する特異的な抗体産生が起こっている可能性が示されている。最近の報告を総合すれば、桐沢型ぶどう膜炎はヘルペスウイルス感染が原因であるとほぼ断定してよい^{65)~67)}。

2. von Szily のモデル

こうしたウイルス性ぶどう膜炎を研究する際に、適切な動物モデルの開発は極めて重要であるが、古くより知られたヘルペス性網膜炎のモデルに von Szily のモデルがある⁶⁸⁾。これは一眼にヘルペスウイルスを接種すると、他眼に1週間程度遅れて炎症が生じるというもので、以前は交感性眼炎のモデルとして考えられていた。最近の研究では、これが接種されたヘルペスウイルスが神経系を介して他眼に伝播する結果であることが分かってきたため、にわかに注目を集めている。また、このモデルが桐沢型ぶどう膜炎を含めたウイルス性のぶどう膜炎の病態解明に役立つ可能性も大いにある。

われわれも、マウスの系を用いてこの von Szily の

モデルを作成し、免疫学的、ウイルス学的に検討した⁶⁹⁾⁷⁰⁾。BALB/c マウスの一眼の前房内に単純ヘルペスウイルス1型(CHR-3株)を 10^4 pfu接種すると、翌日より激しい虹彩毛様体炎が接種眼に出現した(図36)。ところが、ウイルス接種1週後の時点で反対眼を観察すると、図37に示すような壊死性の網膜炎が発生していた。この時点において非接種眼の網膜伸展標本を作成し、間接免疫蛍光抗体法により平面的なウイルス抗原の分布を検討すると、図38のように視神経乳頭を中心として抗原が存在している場合と、図39のように網膜のやや末梢部分に散在している場合とが見られた。このうち、特に後者のパターンは桐沢型ぶどう膜炎の発症形態と似かよっていた。

この von Szily のモデルにおいて、ヘルペスウイルスがどのように反対眼へと伝播したのかは興味あるところである。前房内接種後のウイルスの動きを検討するため、接種眼、視神経、および非接種眼のウイルス力価を経時的に追跡した。結果は、図40のように、ウイルス力価はまず接種眼で上昇した後、視神経へと移り、ついで非接種眼で上昇した。これは接種されたウイルスが、視神経を介して反対眼へと伝播されていることを明快に示している。図41は、感染1週後のマウスの視神経を、間接免疫蛍光抗体法で染色した像であるが、上記の視神経内伝播を裏付けるようにウイルス特異抗原が視神経内に多量に認められた。

von Szily のモデルにおけるヘルペスウイルスの伝播は、明らかに視神経を介して行われている。このウイルス伝播に対して生体の免疫機構がどのように作用しているのかを明らかにすることは、von Szily モデルそのものの病態を解明する上で極めて重要である。ウイルス伝播に対する免疫系の関与を検討する目的で、以下のヌードマウス(BALB/c)を用いた実験を行った。すなわち、ヘルペスウイルスの皮下接種後7日目のBALB/cマウスより得た免疫脾細胞を、未処理のまま、あるいは抗Thy-1.2抗体で処理後に、ヌードマウスに移入した。移入後2時間目に右眼前房内にヘルペスウイルスを接種し、非接種眼における網膜炎の発生頻度、および両眼球内と視神経におけるウイルス量を定量した。結果は表21に示すとおりで、未処理の免疫脾細胞を移入されたヌードマウス群では、接種眼、非接種眼のいずれにおいても壊死性網膜病変の発現が著明に抑制されていた。一方、抗Thy-1.2抗体で処理した免疫脾細胞を移入されたヌードマウス群では、両眼に定型的な壊死性網膜炎が発症した。ウイルス接種眼、

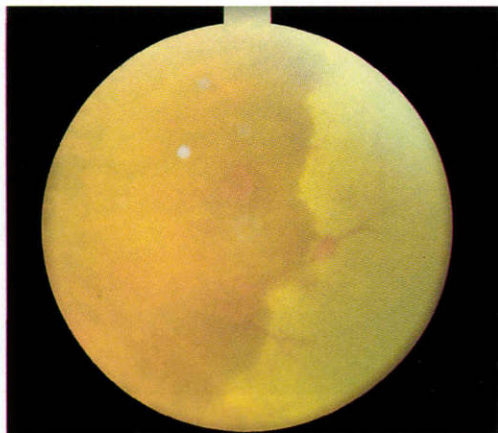


図34 桐沢型ブドウ膜炎（網膜壊死変化）

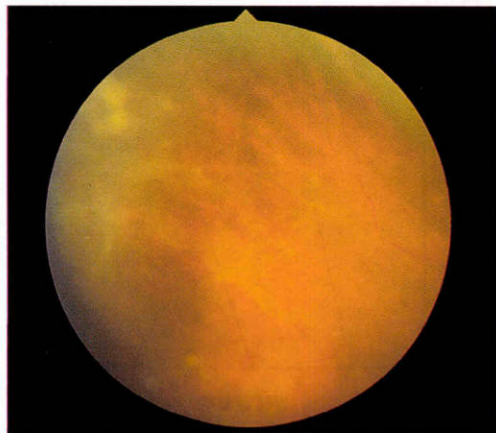


図35 桐沢型ブドウ膜炎（網膜血管炎）

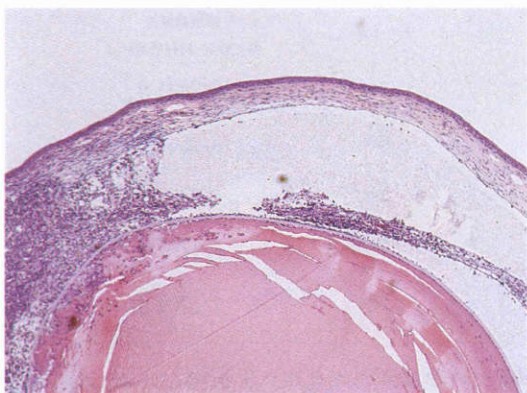


図36 ウイルス接種眼に生じたマウス虹彩毛様体炎
（前房内接種後2日目）

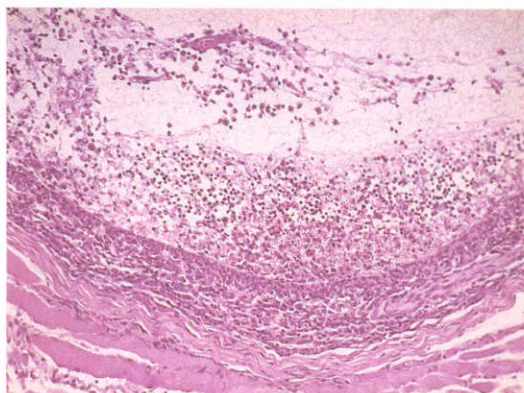


図37 ウイルス非接種眼に生じたマウス壊死性網膜炎
（前房内接種後1週目）

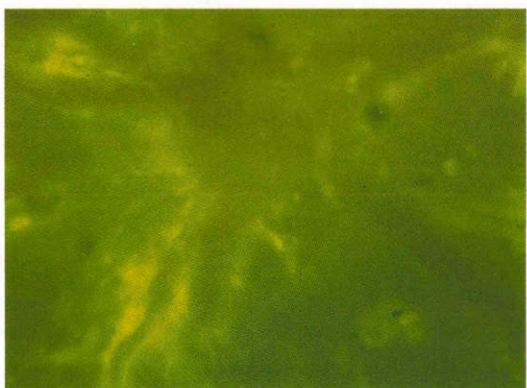


図38 非接種眼網膜（伸展標本）の蛍光抗体染色所見
（1）（前房内接種後1週目）

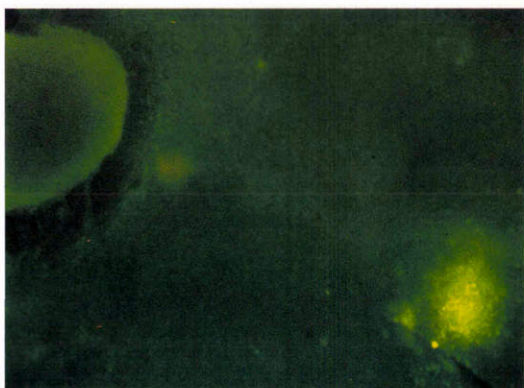


図39 非接種眼網膜（伸展標本）の蛍光抗体染色所見
（2）（前房内接種後1週目）

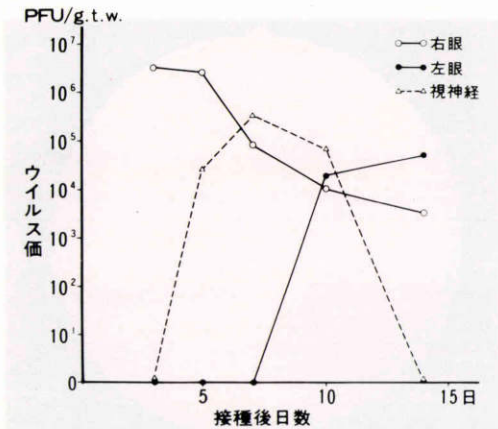


図40 前房内ウイルス接種後の接種眼・視神経・非接種眼における力価の変動

表21 各種免疫脾細胞移入のヌードマウス網膜炎発現に及ぼす効果

移入脾細胞 (1×10 ⁷ 細胞/マウス)	網膜病変の頻度	
	接種眼(右)	非接種眼(左)
未処理免疫脾細胞	1/10	2/12
抗Thy1.2処理免疫脾細胞	10/10	6/9

表22 各種免疫脾細胞移入のヌードマウス眼組織内ウイルス力価に及ぼす効果

移入細胞	ウイルス 力価 (pfu)		
	接種眼(右)	視神経	非接種眼(左)
なし	1.4×10 ⁶	1.3×10 ⁵	8.0×10 ⁵
未処理免疫脾細胞	1.0×10 ³	0	0
抗Thy1.2処理免疫脾細胞	1.0×10 ⁶	1.8×10 ⁵	1.0×10 ⁴

視神経, 非接種眼におけるウイルス力価を指標として, 免疫脾細胞の移入効果を見ても, 表22に示すように, T細胞によるウイルス増殖抑制効果と, 非接種眼へのウイルスの伝播阻止効果が認められた. これらの事実, 免疫脾細胞, その中でもT細胞が, von Szilyのモデルにおけるウイルス伝播抑制作用を担っていることを示している.

こうした前房内接種後におけるヘルペスウイルスの他眼への伝播性には, マウスの系統によって大きな差があることが判明した. 表23は, 種々の純系マウスにおける, ヘルペスウイルスの他眼伝播の頻度を示したものである. 例えば, BALB/c マウスにおいて高率に

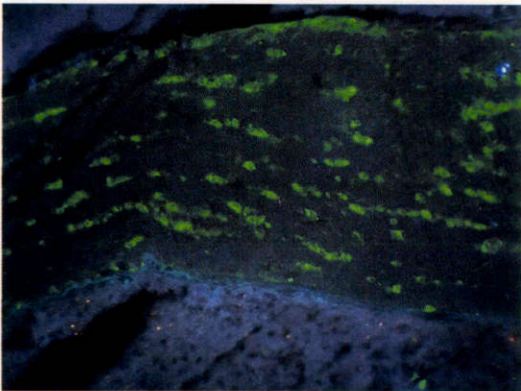


図41 視神経の蛍光抗体染色所見(前房内接種後1週目)

表23 種々の純系マウスにおけるヘルペスウイルス伝播性

マウス株(♂, ♀)	網脈絡膜炎 発症眼数/接種眼数(%)
BALB/c	18/26(69.2)
ICR	15/39(38.5)
SJL	9/33(27.3)
C57BL/6	6/47(12.8)
DBA/2	2/22(9.1)

ヘルペスウイルスが他眼へと伝播したのに対して, DBA/2マウスにおいてはほとんどウイルスは伝播しなかった. この事実, こうしたウイルスの他眼への伝播性に遺伝的な因子が関与している可能性を示唆している. ヒトにおいても, 柯沢型ぶどう膜炎の発症, 進展に同じような遺伝的因子が関与しているかもしれない.

小括

柯沢型ぶどう膜炎は, 近年突然に出現した疾患で, ヘルペスウイルス属, 特に带状疱疹ウイルスの変異株によって引き起こされている可能性が非常に高い. しかしながら, そのウイルスが何処から来るのか, なぜ他眼に遅れて発症することがあるのかなど, 病態の不明な点は数多い.

ここで述べた von Szily のモデル⁶⁸⁾は, 古く今世紀の初めに報告されたものであるが, ウイルスが非接種眼へ視神経を介して伝播することが明らかとなったのは, ごく最近のことである. どのような機序で, 非接

種眼にウイルスが伝播するのかはまだよく解明されていないが、その背景に ACAID (anterior chamber-associated immune deviation) と呼ばれる特異な免疫現象が関与していることが示唆されている⁷¹⁾⁷²⁾。

ACAID とは、前房内に抗原を投与した場合に生じる免疫の解離現象のことで、この現象においては、液性免疫が正常に誘導されるのに対して、細胞性免疫の誘導が障害されてしまう。単純ヘルペスウイルスの1型を前房内に投与した場合には、この ACAID が作動して、DTH をはじめとする細胞性免疫が抑制されるため、結果として生じる個体の免疫能低下が非接種眼へのウイルスの伝播を許しているとも考えられる。これに反して、同じ単純ヘルペスウイルスでも2型を前房内に投与した場合には、非接種眼へのウイルスの伝播は起こらない⁷³⁾。しかも、この場合には ACAID は起こらずに、DTH が正常に発動しているのである。今回のわれわれの実験でも、細胞性免疫能を持たないヌードマウスにおける非接種眼へのウイルス伝播は、感作脾細胞 (DTH のエフェクターも含んでいる) の移入によって阻止された。以上述べた壊死性網膜炎の発症と個体の免疫機能との相互関係は実に興味深く、こうした一連の研究が、桐沢型ぶどう膜炎の病態解明と治療法の開発に結びつく可能性がある。ただし、桐沢型ぶどう膜炎の原因ウイルスとされている帯状ヘルペスウイルスについては、まだ動物モデルが開発されておらず、この von Szily のモデルに合致した動きを示すのかどうかは今後の課題である。

IX ま と め

ヒトは常にこの危険なヘルペスウイルスと潜伏感染という形で共存している。ヘルペスウイルスは実に多彩な眼疾患を起こすため、われわれ眼科医にとって非常に身近なウイルスの一つである。この研究では、角膜ヘルペスと桐沢型ぶどう膜炎を中心に、現在の眼科基礎研究の一端を紹介した。以上のような基礎的、および臨床的な知見がさらに集積されれば、こうした難治性のウイルス性疾患を思いのままに制御することも可能になると考えられる。

文 献

- 1) Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, et al: Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5716—5720, 1977.
- 2) 眞鍋禮三: 治療の角膜移植. *臨眼* 40: 1017—1026, 1986.

- 3) 下村嘉一, 大橋裕一, 眞鍋禮三: 角膜ヘルペス. *臨床と微生物* 12: 411—416, 1985.
- 4) 松田英彦, 加藤富士子: 実質型角膜ヘルペスの治療. *眼科* 22: 261—268, 1980.
- 5) 北野周作, 山西政明: 角膜ヘルペスの長期観察例における病態について. *眼紀* 35: 1853—1861, 1984.
- 6) 廖 萬恵: 角膜ヘルペスに関する臨床的研究. *日大医誌* 32: 875—883, 1973.
- 7) Wilhelmus KR, Coster DJ, Donovan HC, et al: Prognostic indicators of herpetic keratitis. *Arch Ophthalmol* 99: 1578—1582, 1981.
- 8) Dawson CR, Togni B: Herpes simplex eye infections: Clinical manifestations, Pathogenesis and management. *Surv Ophthalmol* 21: 121—135, 1976.
- 9) O'Conner GR: Recurrent herpes simplex uveitis in humans. *Surv Ophthalmol* 21: 165—170, 1976.
- 10) 大橋裕一, 阪上賀洋, 平石泰三他: ペプシン γ グロブリンの抗ヘルペス作用に関する in vitro の研究. *眼紀* 31: 1033—1038, 1980.
- 11) 西田輝夫, 庄田節子, 浜野 保他: ペプシン処理免疫グロブリンの連日投与による実質型角膜ヘルペスの治療成績. *臨眼* 38: 1027—1031, 1984.
- 12) Shimomura Y, Ohashi Y, Maeda N, et al: Herpetic keratitis therapy to reduce recurrence. *Curr Eye Res* 6: 105—110, 1987.
- 13) Metcalf JF, Kaufman HE: Herpetic stromal keratitis—Evidence for cell-mediated immunopathogenesis. *Am J Ophthalmol* 82: 827—834, 1976.
- 14) McNeil JI, Kaufman HE: Local antivirals in a herpes simplex stromal keratitis model. *Arch Ophthalmol* 97: 727—729, 1979.
- 15) Hill JM, Kwon BS, Burch KD, et al: Acyclovir and vidarabine monophosphate: Comparison of iontophoretic and intravenous administration for the treatment of HSV-1 stromal keratitis. *Am J Med (Suppl)* 73: 300—304, 1982.
- 16) Meyers RL, Pettit TH: The pathogenesis of corneal inflammation due to herpes simplex virus. I. Corneal hypersensitivity in the rabbit. *J Immunol* 111: 1031—1042, 1973.
- 17) Boisjoly HM, Woog JJ, Pavan-Langston D, et al: Prophylactic topical cyclosporine in experimental herpetic stromal keratitis. *Arch Ophthalmol* 102: 1804—1807, 1984.
- 18) Zamansky GB, Lee BP, Chang RK, et al: Quantitation of herpes simplex virus in rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

- 26: 873—876, 1985.
- 19) **Shimomura Y, Gangarosa LP Sr, Kataoka M, et al:** HSV-1 shedding by iontophoresis of 6-hydroxydopamine followed by topical epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1588—1594, 1983.
 - 20) **Hill JM, Shimomura Y, Yamamoto Y, et al:** The pharmacological characterization of HSV-1 ocular shedding: Induction and attempted blockage. in Kono R and Nakajima A (ed): *Herpes Viruses and Virus Chemotherapy: Pharmacological and Clinical Approches*. Amsterdam, Excerpta Medica, 119—122, 1985.
 - 21) **Hill JM, Shimomura Y, Dudley JB, et al:** Timolol induces HSV-1 ocular shedding in the latently infected rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 585—590, 1987.
 - 22) **Hill JM, Rayfield MA, Haruta Y:** Strain specificity of spontaneous and adrenergically induced HSV-1 ocular reactivation in latently infected rabbits. *Curr Eye Res* 6: 91—97, 1987.
 - 23) **Nesburn AB, Willey DE, Trousdale MD:** Effect of intensive acyclovir therapy during artificial reactivation of latent herpes simplex virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 172: 316—323, 1983.
 - 24) **Mayers M, Matli M, Okumoto M, et al:** Recombinant human interferon α D in HSV-1 recurrence in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 237—240, 1985.
 - 25) **Gordon YJ, Araullo-Cruz TP, Romanowski E, et al:** The development of an improved murine iontophoresis reactivation model for the study of HSV-1 latency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1230—1234, 1986.
 - 26) **Zhang WH, Briones O, Dawson CR:** Effect of autonomic mediators in recurrent shedding of herpes simplex in the rabbit eye. *Curr Eye Res* 5: 79—84, 1986.
 - 27) **Nesburn AB, Dickinson R, Radnoti M:** The effect of trigeminal nerve and ganglion manipulation on recurrence of ocular herpes simplex in rabbits. *Invest Ophthalmol* 15: 726—731, 1976.
 - 28) **Green MT, Rosborough JP, Dunkel EC:** In vivo reactivation of herpes simplex virus in rabbit trigeminal ganglia. Electrode model. *Infect Immun* 34: 69—74, 1981.
 - 29) **Wander AH, Centifanto YM, Kaufman HE:** Strain specificity of clinical isolates of herpes simplex virus. *Arch Ophthalmol* 98: 1458—1461, 1980.
 - 30) **Gerdes JC, Smith DS:** Recurrence phenotype and establishment of latency following rabbit keratitis produced by multiple herpes simplex virus. *J Gen Virol* 64: 2441—2451, 1983.
 - 31) **吉野亀三郎, 柳 壹夫:** ヘルペスウイルス. ウイルス実験学各論改訂二版, 丸善, 1982.
 - 32) **Hayward GS, Frenkel N, Roizman B:** Anatomy of herpes simplex virus DNA: Strain differences and heterogeneity in the location of restriction endonuclease cleavage sites. *Proc Natl Acad Sci* 72: 1768—1772, 1975.
 - 33) **Buchman TG, Simpson T, Nosal C, et al:** The structure of herpes simplex virus DNA and its application to molecular epidemiology. *Ann New York Acad Sci* 354: 279—290, 1980.
 - 34) **柳 壹夫:** ヘルペスウイルス. 厚生省監修微生物検査必携. ウイルス・クラミジア・リケッチア検査第3版, 日本公衆衛生協会, 1987.
 - 35) **柳 壹夫:** ヘルペスウイルス感染のDNA診断, 「ウイルス病最前線」医学のあゆみ特集 142: 592—596, 1987.
 - 36) **柳 壹夫:** 単純ヘルペスウイルスの分子疫学の基礎—タイピング, DNAフィンガープリント法, 血清のイムノブロットング分析—. 臨床とウイルス 12: 379—386, 1984.
 - 37) **柳 壹夫, 江田浩幸:** ヘルペスウイルス群の分子生物学. *Therapeutic Res* 12: 580—587, 1985.
 - 38) **Centifanto-Fitzgerald YM, Yamaguchi T, Kaufman HE, et al:** Ocular disease pattern induced by herpes simplex virus is genetically determined by a specific region of viral DNA. *J Exp Med* 155: 475—489, 1982.
 - 39) **Nesburn AB, Cook ML, Stevens JG:** Latent herpes simplex virus. *Arch Ophthalmol* 88: 412—417, 1972.
 - 40) **下村嘉一:** 角膜ヘルペスにおけるHSVの潜伏感染と再活性化. 眼紀 35: 1984—1988, 1984.
 - 41) **Shore SL, Cromeans TL, Romano TJ:** Immune destruction of virus infected cells early in the infectious cycle. *Nature (London)* 262: 695—696, 1976.
 - 42) **Kohl S, Cahall DL, Walters DL, Schaffner VE:** Murine antibody-dependent cellular cytotoxicity to herpes simplex virus infected target cells. *J Immunol* 123: 25—30, 1979.
 - 43) **McClung H, Seth P, Rawls WE:** Quantitation of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 by complement dependent antibody lysis of infected cells. *Am J Epidemiol* 104: 181—191, 1976.
 - 44) **Sissons JGP, Oldstone MBA:** The antibody mediated destruction of virus-infected cells. *Adv Immunol* 29: 209—260, 1980.

- 45) 大橋裕一, 井上幸次, 下村嘉一他: HSV glycoprotein D に対するモノクローナル抗体によるマウスヘルペス性角膜炎の予防効果. 第11回角膜カンファレンス抄録, 大磯, 1987.
- 46) 風見宣生, 林皓三郎, 内田幸男: 単純ヘルペス1型角膜感染症に対するT細胞サブセットの働き, 日眼 91(臨時増刊号): 142, 1987.
- 47) Davis WB, Taylor JA, Oakes JE: Ocular infection with herpes simplex virus type 1: Prevention of acute herpetic encephalitis by systemic administration of virus-specific antibody. *J Infect Dis* 140: 534—540, 1979.
- 48) Balachandran N, Bacchetti S, Rawls WE: Protection against lethal challenge of BALB/c mice by passive transfer of monoclonal antibodies to five glycoproteins of herpes simplex virus type 2. *Infect Immun* 37: 1132—1137, 1982.
- 49) Metcalf JF, Koga J, Chatterjee S, et al: Passive immunization with monoclonal antibodies against herpes simplex virus glycoproteins protects mice against herpetic ocular disease. *Curr Eye Res* 6: 173—177, 1987.
- 50) Kumel G, Kaerner HC, Levine M, et al: Passive immune protection by herpes simplex virus-specific monoclonal antibodies and monoclonal antibody-resistant mutants altered in pathogenicity. *J Virol* 56: 930—937, 1982.
- 51) Oakes JE, Jansch RN: Role of Fc fragments in antibody mediated recovery from ocular and subcutaneous herpes simplex virus infection. *Infect Immun* 33: 109—114, 1981.
- 52) Oakes JE, Rector J, Lausch RN: Lyt-1⁺ T cells participate in recovery from ocular herpes simplex virus type 1 infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 188—194, 1984.
- 53) Larsen HS, Russell VG, Rouse BT: Recovery from lethal herpes simplex virus type 1 infection is mediated by cytotoxic cells. *Infect Immun* 41: 197—204, 1983.
- 54) Lausch RN, Monterio C, Kleinschrodt WR, et al: Superiority of antibody versus delayed type hypersensitivity in clearance of HSV-1 from eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 565—570, 1987.
- 55) Ohashi Y, Sato K, Kato S: Infectious virus-free, detergent-soluble extract of virus-infected cells prevents the establishment of trigeminal ganglionic latency after herpes simplex virus type 1 infection. *Jpn J Ophthalmol* 24: 420—427, 1980.
- 56) 井上幸次, 大橋裕一, 下村嘉一他: HSV glycoprotein D のマウスヘルペス性角膜炎に対する予防効果, 日眼 91(臨時増刊号): 159, 1987.
- 57) Kitces EN, Morahan PS, Tew JG, et al: Protection from oral herpes simplex virus infection by a nucleic acid-free virus vaccine. *Infect Immun* 16: 955—960, 1977.
- 58) Cappel R, de Cuyper F, Riackaert F: Efficacy of a nucleic acid free herpetic subunit vaccine. *Arch Virol* 65: 15—24, 1980.
- 59) Klein RJ, Kelen EB, Moser H, et al: Efficacy of a virion envelope herpes simplex virus vaccine against experimental skin infections in hairless mice. *Arch Virol* 68: 73—80, 1981.
- 60) Slichtova V, Kutinova L, Vonka V: Immunogenicity of a subviral herpes simplex type 1 preparation: Reduction of recurrent disease in mice. *Arch Virol* 71: 75—78, 1982.
- 61) Glorioso J, Kees U, Kumel G, et al: Identification of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein gC as the immunodominant antigen for HSV-1 specific memory cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 135: 575—582, 1985.
- 62) Cremer KJ, Mackett M, Wohlenberg C, et al: Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science* 228: 737—740, 1985.
- 63) 浦山 晃, 山田西之, 佐々木徹郎他: 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, 1971.
- 64) Young NJA, Bird AC: Bilateral acute retinal necrosis. *Br J Ophthalmol* 62: 581—590, 1978.
- 65) 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.
- 66) Cuberton WW, Blumenkranz MS, Pepose JS, et al: Varicella zoster virus is a cause of the acute retinal necrosis syndrome. *Ophthalmology* 93: 559—568, 1986.
- 67) 宗司西美, 小沢博子, 松橋正和: 硝子体中に水痘・帯状疱疹ウイルス抗原が検出された acute retinal necrosis syndrome の1例, 臨眼 41: 199—202, 1987.
- 68) von Szily A: Experimentelle endogene Infektionsübertragung von Bulbus zu Bulbus. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 72: 593—602, 1924.
- 69) 中川 尚, 林皓三郎, 内田幸男他: 単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)による交感性網脈絡膜炎の研究. 1: ウイルス伝播経路とマウス株差について, 日眼 90(臨時増刊号): 208, 1986.
- 70) 中川 尚, 林皓三郎, 内田幸男: 単純ヘルペス性網

膜炎における T リンパ球の役割. 日眼 91(臨時増刊号): 138, 1987.

- 71) **Whittum JA, MuCulley 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.
- 72) **Streilein JW, Atherton SS, Vann V:** A criti-

cal role for acaid in the distinctive pattern of retinitis that follows anterior chamber inoculation of HSV-1. *Curr Eye Res* 6: 127—131, 1987.

- 73) **Atherton SS, Streilein JW:** Virus-specific DTH prevents contralateral retinitis following intracameral inoculation of HSV-2. *Curr Eye Res* 6: 133—139, 1987.
-