
 綜 説

細胞のストレス応答と眼 (図8, 表3)

若 倉 雅 登 (北里大学医学部眼科)

要 約

細胞のストレス応答は正常蛋白合成抑制と熱ショック蛋白 (HSPs) もしくはストレス蛋白 (SPs) の合成促進という2つの事象から成立している。HSPs ははじめショウジョウバエで見出されたがその後ヒトを含むあらゆる生物の種々の細胞で、その存在が確かめられた。major HSPs としてはその分子量に従って HSP 90, HSP 70, small HSP, およびユビキチンの4群に分けられ、他に多くの minor HSPs が報告されている。これらの多くは系統発生的に保持されており、それゆえストレス負荷時のホメオスタシスや熱耐性といった生命維持にとって重要な役割を細胞骨格蛋白の変化と相互的に働きながら果たしていると考えられる。本総説ではまず HSPs の発見から今日の研究に至る推移を概観しながら、HSPs がどのようにして産生され、なにをしているのか考えてみた。その上で近年多少蓄積されてきた眼組織と HSPs との関係につき、筆者の研究成績を含めながら紹介した。水晶体では small HSPs をはじめとする HSPs がクリスタリンの構造に似ており、機能的にも近いかもしれないことを述べた。網膜細胞 (ミュラー細胞、網膜ニューロン、色素上皮細胞) においても、熱ショックやヘルペスウイルス感染後に HSPs 産生システムが稼動することを明らかにした。眼組織においても細胞のストレス応答の仕方、HSPs 産生の意義を検討してゆくことは、眼の生理、病理を新しい視点から解明してゆくことになり、これからの重要なテーマの1つになると考えられる (日眼会誌 93: 511-523, 1989)

キーワード: ストレス応答, 熱ショック蛋白, ストレス蛋白, 網膜細胞, 細胞骨格蛋白

Review

Cellular Stress Response in the Eye

Masato Wakakura

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kitasato University

Abstract

The cellular stress response consists of general inhibition of normal protein synthesis and enhancement of a group of stress or heat shock proteins (SPs or HSPs). Current studies show this response system to be present in various cells from bacteria to man. A number of HSPs have been described, and four are now regarded as universal. Three are described in terms of their molecular weights of 90K, 70K and 20-30K daltons, respectively, and a fourth is known as ubiquitin. Most of these have been highly preserved throughout evolution. One important role for HSPs is certainly related to cellular homeostasis including thermotolerance. It is quite possible that cytoskeletal

別刷請求先: 228 神奈川県相模原市北里1-15-1 北里大学医学部眼科学教室 若倉 雅登
(平成元年2月9日受付, 平成元年4月12日改訂受理)

Reprint requests to: Masato Wakakura, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Kitasato Univ.
1-15-1 Kitasato, Sagami-hara 228, Japan

(Received February 9, 1989 and accepted in revised form April 12, 1989)

changes occurring during heat shock are involved in the regulation of HSP synthesis and that HSPs themselves have cytoarchitectural roles. In this review, the history of research on heat shock proteins was introduced to elucidate their functions. Cellular stress response in ocular tissues was also taken into account. For example, immunocytochemical investigations have indicated that normally less detectable glial fibrillary acidic protein in Müller cells is expressed in response to neuronal injury, degeneration, retinal detachment and under in vitro conditions. Current studies, including our own, show the accumulation of HSPs or SPs in various retinal cells (e.g. Müller cells, retinal neurons, and retinal pigment epithelia) following either herpes simplex infection or heat shock. The possible clinicopathological significance of the above cellular responses is discussed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 511-523, 1989)

Key words: Stress response, Heat shock protein, Stress protein, Retinal cells, Cytoskeleton

I 緒 言

細胞が高温、感染原、毒性物質やある種の重金属などに暴露すると、その細胞内で種々の変化が起こる。それが細胞応答 (cellular response) といわれるものであるが、公式風にいうと、「ストレス (侵襲) に対する応答 (stress response) は正常蛋白群の合成抑制と特定蛋白群の合成促進から成る」ことになる。この特定蛋白群は熱ショックの研究から見出されたものであり熱ショック蛋白 (heat shock proteins, HSPs) と呼ばれる¹⁾。あるいはもう少し大きくとらえストレス蛋白 (stress proteins, SPs) と呼ばれることもある。HSPs や heat shock response の研究は、近年細胞生物学のひとつの大きなトピックとなっており、細胞がいかんして侵襲に耐え生きながらえるか、あるいは耐え切れず死の道を選ぶかという問題が、ストレスの種類、細胞の種類ごとに解明が進みつつある²⁾。

そしてこの問題は癌の温熱療法と HSPs の関係³⁾、近年 SLE など注目されている⁴⁾ ように種々の疾患と HSPs の関連性、胎生期に一過性に発現する HSPs の意義⁶⁾ などさまざまな角度からアプローチされはじめており、秀れた綜説もここ 4~5 年の間に次々に発表された^{2)7)~12)}。

しかしながらこの領域を眼科的立場で概観しているものはなく、このあたりで近年多少蓄積されてきた HSPs と眼組織、眼における細胞のストレス応答といった知識を整理してみるのも、眼組織、眼病理を従来とは異った側面から捉えなおすという意味において価値なしとしないであろう。本稿では HSP を中心にまずその研究の歴史をめぐったあと、その役割について考察する。ついで水晶体、網膜、視神経に関する研究をこれらの研究の将来の方向性を占いながら紹介し

てみたい。

II HSPs の発見とその種類

1962年 Ritossa¹³⁾ はショウジョウバエの幼虫の環境温度を一過性にわずかに上げることにより、唾液腺染色体のある部分が膨らむバフ形成が起こり、遺伝子活動が劇的に変化することを見つけた。この変化は温度上昇後 1 分以内に起こり、30~60 分でピークに達する。これが HSPs 発見のはじまりである。この発見から 12 年を経てこのバフ形成には特定の新しい蛋白質すなわち HSPs 合成が伴うことが示されたのである¹⁴⁾。

ショウジョウバエでは連続した 13 の heat shock 遺伝子が知られており、8 種の HSPs が報告されている⁹⁾。HSPs と遺伝子の関係は従って 1:1 の対応ではなく、複数の遺伝子によって規定される場合があると考えられる。ここで HSPs を分子量によって大別してみよう (表 1)¹⁰⁾¹¹⁾¹⁵⁾。主たる HSPs としては分子量 90 K 付近の HSP 90, 70K 付近の HSP 70, 22~30K 付近に分布する small HSPs があり、これらは各々単一の蛋白をさすのではなく、分子量も反応性もよく似たいくつかの蛋白群である。これに最近新たに加えられたユビキチンを含めたこの 4 群を major HSPs とよぶ。これらのほか HSP 47⁹⁾、SP 57¹⁶⁾ などいわゆる minor HSPs や "prompt" HSPs¹⁷⁾ などがいくつも報告されている。

さて 1970 年代後半になって HSPs はショウジョウバエ特有の蛋白ではないことがわかってきた。単細胞生物からヒトに至る種々の細胞に、ほぼ例外なく HSPs 合成能が存在する。ではそれらの HSPs は種によって異なるのであろうか。HSP 70 のアミノ酸配列を大腸菌、イースト菌、ショウジョウバエ、蛙およびヒトのものについて較べてみると、互いに非常に似て

表1 主な heat shock proteins (HSPs) もしくは stress proteins (SPs) とその特徴

種類	分子量	細胞骨格との関係	その他の特徴	眼組織との関係
HSP90 (SP90)	80,000 ~90,000	カルモデュリン, アクチンと結合 (34, 35)	ステロイドホルモン受容体やチロシンキナーゼと結びつく (2)	ミューラー細胞, 色素上皮細胞, 網膜ニューロンで同定 (本文参照)
HSP70 (SP70)	68,000 ~74,000	種々の細胞骨格蛋白との相互作用が推定されている (本文参照)	熱耐性との関係深い (本文参照)	SP74: 視神経内を遅い軸索輸送で運ばれる (74) SP68: ミューラー細胞, 網膜ニューロンで同定 (本文参照)
Small HSPs (small SPs)	22,000 ~30,000	中間径線維と共存 (36)	比較的種特異性がある (2)	アミノ酸配列がクリスタリンと似ている (本文参照)
ユビキチン	8,000	—————	熱ショック後の変性蛋白分解能を促進?	—————
HSP47	47,000	—————	ニワトリ胎児線維芽細胞で発見, コラーゲン, 血清アルブミンに結合 (3)	—————
SP57	57,000 ~61,000	—————	神経系に特異的な蛋白か?	ミューラー細胞, 網膜ニューロンで同定 (本文参照)

(): 主な参考文献

いて, ヒトの HSP 70 の配列は73%ショウジョウバエのそれに一致し, 50%大腸菌のそれに一致するという²⁾. またある種の HSP から作られた単クローン抗体は他の種の HSP と交叉反応する場合が多い¹⁾¹⁸⁾. このように HSPs は下等生物からヒトに至る系統発生上ずっと保持されてきたいわば原始的な蛋白といえ, それゆえ生命維持のための極めて重要な部分と関わっている蛋白にちがいないと考えられている.

冒頭にも触れたように, 高温に暴露されたときとよく似た細胞の反応は, 他の種々の侵襲によっても起こる (表2)²⁾¹⁰⁾. これらの細胞応答が互いに同一のものか否か結論するのは時期尚早であるが, 種々の角度から HSPs と同一もしくは非常に近い蛋白が産生されることは確実であり, このことが HSPs と呼称するよりもむしろ stress proteins (SPs) と一般化して呼ぶ方が妥当だと意見がある所以である. 熱ショックと他

の侵襲とでは細胞応答の仕方が厳密には違っているが, 「正常蛋白合成抑制と SPs を含む特定の蛋白の合成促進がみられる」という共通項でくれる応答様式は, 表2に示した以外の病的状態にも普遍化しようと思われ, 筆者も SPs の呼称を好んでいる.

III SPs の合成

SPs の合成系はまだ完全に明確になっているわけではないが, 種々の傍証から Tanguay⁹⁾がわかりやすい仮説を立て, シェーマにした. 以後の話の理解を助けるため, 氏のご好意でこの図を拝借することにする (図1).

何らかのストレスが細胞にかかる, 4つのステップの応答が細胞内で生ずる. まずストレスは標的蛋白を介して, 細胞骨格蛋白を正常型から活動型へ変える. これがストレス応答の起動 (ステップ1) である. 活動型の細胞骨格蛋白は, 核内の HSPs 遺伝子の転写を促進し, HSPs の遺伝子を転写したメッセンジャー RNA (mRNA) を核の外へ移動せしめる (ステップ2). 一方ストレスは細胞質内で正常蛋白の mRNA とリボソームを分離することにより, 正常蛋白の合成を阻害する (ステップ3). この時生じた不活化リボソームは, 核外へ出た HSP mRNA と結びついて翻訳し, HSP を合成して機能させる (ステップ4). SPs はどのような機能を有するか謎であるが, ステップ1~3を何らかの形で修飾しているらしい. SPs と細胞骨格の関係は第4章で, 具体的な SPs の機能については第5

表2 ストレス応答を惹起する物質, 状態として報告されているもの²⁾¹⁰⁾

エタノール	デオキシグルコース
亜ヒ酸塩	キレート剤
カドミウム	メチレンブルー
亜鉛	ビリドキシン
銅	カルシウムイオノフォア
水銀	低酸素
スルフィドリル	グルコース飢餓
グルココルチコイド	細菌感染
グルコサミン	ウイルス感染

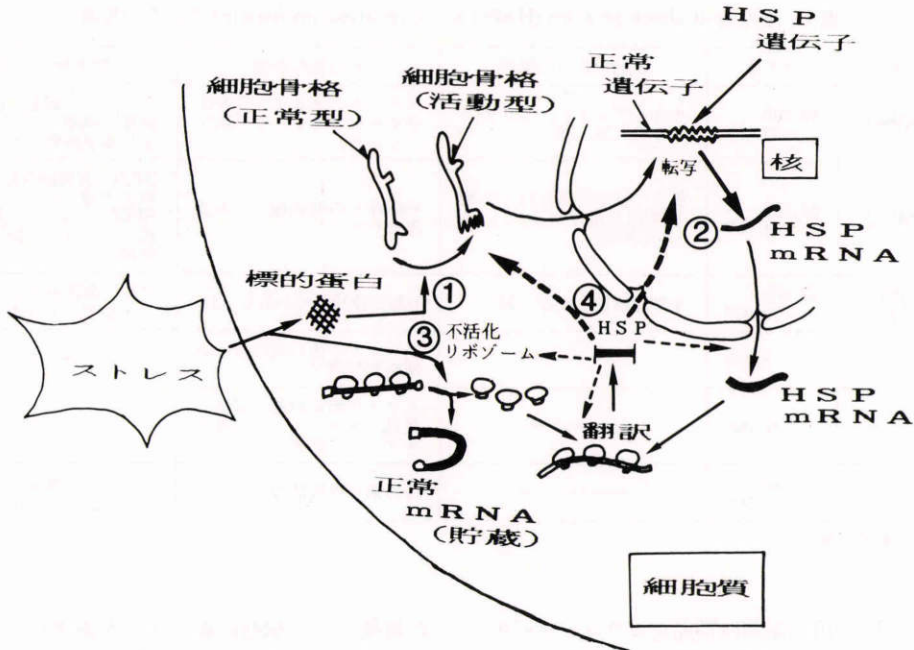


図1 HSPs合成系の仮説図(文献8を改変). ストレスの加わった細胞は、①~④に分けられる4つのステップで応答する. ①ストレス応答の起動, ②転写とmRNAの移動, ③正常蛋白の合成阻害, ④翻訳によるHSPs合成とその活動化

章でみてゆくことにする.

IV SPs と細胞骨格蛋白

SP 70 の遺伝子は定常状態では恒常的に転写されているが、翻訳の段階では抑制されている。つまりほとんど発現していないか、ごくわずかしか発現していないとみることができる²⁾。わずか発現した蛋白は通常細胞質内に留まる。図1でみたように細胞にストレスが加わると短時間(10分以内とされる)にSPsが核内とくに核小体に集合するといわれる。ミューラー細胞にストレスを与えた筆者らの実験でも¹⁹⁾²⁰⁾、SPは確かに核や核周辺に好んで局在した(図2)。このときSPsは細胞質の可溶性部分から核の非可溶性成分(細胞骨格成分)の部位に移動している。細胞や実験法により違いはあるが、SP 70の産生量の時間的経過をみると、ストレスを受けて数時間後にピークに達し²¹⁾、その後次第に減少し概ね24時間後には正常蛋白の合成も回復し、SPはみられなくなる²²⁾²³⁾。SPsははじめ核内に多く局在しているがストレスから回復するに従って細胞質に戻るという²⁴⁾。

SPsが核内に存在する意義については諸説がある。



図2 培養ミューラー細胞に4時間の熱ショック(42~43°C)を与えた後のSP 68の局在。間接蛍光法。核と核周辺に特に強い陽性部位がみられる(矢印), ×900

が^{25)~27)}、Welchら²⁶⁾の観察は興味深い。彼らはSP 72が核小体のリボソーム前駆体を含む顆粒と結びつき、ストレスから回復するにつれてそのSPは細胞質内のリボソームの部に移動するとした。この様子は、SPが

細胞の蛋白合成システムを保護しようとしているとも受け取れる。これとは多少ニュアンスが違う考え方として、核などに含まれるSPsなどストレス抵抗性蛋白がストレスに弱い蛋白の安定化作用をもつというMintonらの仮説がある²⁸⁾。もっともTanguayら⁸⁾²⁹⁾も指摘しているように、SPsが核内に存在するからといって、SPsが核内で積極的な活動を行っている、必ずしも見なす必要はないのかもしれない。

さてSP 70をはじめとするSPsは核骨格¹⁵⁾²⁵⁾³⁰⁾のみならず細胞骨格蛋白とも関係が深いという事実は一考に値しよう^{31)~36)}。たとえば、SP 68の酸性型は脳の微小管と共に精製される蛋白と区別がつかないし、かつ中間径線維の豊富な部分で見出される³¹⁾。SP 68は形態的にアクチン線維と類似性が高いという観察³²⁾、さらにSP 74が微小管および中間径線維と共に精製され、タウ蛋白(微小管関連蛋白の1つ)に対する抗体により沈降し、またカルモデュリンと結合するという性質をもつ³³⁾といった成績が示されている。こうみるとSP 70またはその関連蛋白は、核や細胞骨格(またはその蛋白)と共存しやすく、何らかの意味で共同作業を行っているらしいことが推定される。尚SP 90や、SP 100もカルモデュリンやアクチンと結合すること³⁴⁾³⁵⁾やsmall SPsと細胞骨格の関係も指摘されている³⁶⁾。細胞骨格蛋白とSPsの関係は表1に整理されている。

一方細胞骨格側からみても、細胞骨格自体がストレスに敏感に反応している事実も数多く例証されている。たとえば微小管蛋白自身が熱ショック時にdisassemblyを生ずる³⁷⁾、中間径線維のサブユニットであるビメンチンもしくはビメンチン類似蛋白が熱ショック後に細胞内局在を変化を生ずることが、ショウジョウバエKc cell³⁸⁾³⁹⁾や脊椎動物由来の細胞⁴⁰⁾⁴¹⁾で観察された。筆者らも第7章で述べる培養ミューラー細胞²⁰⁾や培養網膜色素上皮細胞⁴²⁾の熱ショック実験を行った際、中間径線維蛋白が興味深い挙動を示すことを発見した。すなわちいずれの細胞でもビメンチンはそれ自身熱耐性を持っており、他の中間径線維蛋白が熱ショックによって検知しにくくも依然として細胞内に同定された。さらに面白いことに、ビメンチンは熱ショック後早期にその局在を変え、核周辺に集積するperinuclear cappingと呼ばれる特異な現象をしばしば示した(図3)。

このようにストレスによってSPsが産生されると同時に、ビメンチンなどの細胞骨格蛋白にもストレス

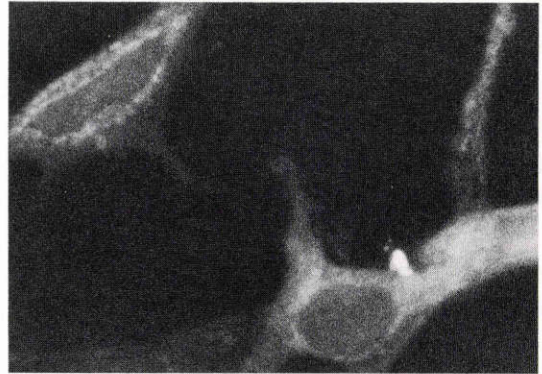


図3 培養ミューラー細胞に1.5時間の熱ショック(42~43°C)を与えた後のビメンチンの局在。間接蛍光法。核周辺に強い陽性部位がみられる(perinuclear capping)。×600

反応が生ずる。SPsが反応した細胞骨格蛋白と共同作業するらしいことは既に触れたが、いったいこの両者は具体的にどのような作用をしているのであろうか。Shlesingerらは低分子のSPsがクロマチンの安定化に関与するのに対し、高分子のSPsは細胞骨格を安定化させる作用があることを示唆した¹⁰⁾。Biessmannら³⁹⁾はもっと魅力的な説を提唱している。熱ショックに際しまず細胞骨格(ビメンチン類似蛋白)に変化が起これ、これがSPsの合成の制御に関わるというのである。Tanguayの示した説(図1)もこれによく似たものになっている。筆者らも細胞骨格蛋白の局在変化が極めて早く起こることから、これが細胞のストレス応答の起動のキーになっているという説に賛成であり、図3に示したperinuclear cappingは核と細胞質間のコミュニケーションをコントロールしている像ではないかと考えている²⁰⁾。

V SPsの役割

SPs産生システムが下等動物にも、ヒトを含めた高等動物にも存在するという事実から、SPsが生命維持、種の維持に大変重大な役割をもっているはずだと多くの人は信じている。そして前章でみたように、SPsが細胞骨格蛋白などと協力して細胞内の蛋白合成系破壊を防ごうとしているようである。ではこの機構が生体にいったいどのように寄与しているのか、その具体例はあるのだろうか。

最も明確な具体例は熱耐性である⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹⁷⁾²²⁾⁴³⁾⁴⁴⁾。死に至らない程度の高温度に置かれた細胞は一過性の熱

耐性を獲得し、ひき続く通常では死に至る高温刺激にも耐えることができる。この時の HSPs 合成と熱耐性の相関、HSPs 減少と熱耐性消失との相関が、多くの細胞で確かめられている。さらに近年 HSP 70 に対する抗体に暴露された細胞は熱耐性を失うという極めて重要な観察が示された⁴⁵⁾。

では熱耐性という生体の防御機構はすべて HSPs によって司られているのかということ、そうではない⁴⁶⁾。細胞それ自身の遺伝的性質にも左右されるのである。

さらに細胞に対し熱による前処理を行って得られる熱耐性のピークは HSPs 産生のピークより早くみられるという観察⁴³⁾⁴⁷⁾や、2 度目の熱ショック時には HSPs 産生増加はみられない²⁰⁾²¹⁾との観察など、HSPs そのものが熱耐性を直接発揮しているというよりは、細胞に熱耐性を獲得させるべく HSPs が稼動していると考えた方がわかりやすいデータが少なくない。なお HSP 70 は確かに熱耐性と深く関わっているが、他の SPs に関してはどの程度関わっているのかまだ結論的でない。

SPs の役割はまだ不明の点が多い。熱耐性のほかにも今後種々の具体例が明らかになるであろう。眼組織における役割は次章以降みてゆく積りであるが、SPs の機能をいつもホメオスタシスという方向からばかり見てゆくと、とんだ誤りをおこすかもしれない。SPs の種類、細胞の状態によっては細胞障害性に働く場合もあるかも知れないという視点も、筆者自身はなお捨て切ってはいない。

VI 水晶体と SPs

De Jong ら²¹⁾は水晶体に対するストレスの影響を調べることが大切である理由を次のように述べている。既に分化した水晶体線維細胞は決して壊れも置き変りもしないので、その構築と機能を生涯保つため種々の侵襲に対するしっかりとした防御機構を備えている必要がある筈である。また血流によるコントロールが効かない所に位置し侵襲を受け易い場にある。さらに、古い水晶体線維細胞は核もリボゾームも消失しており、それ自身では侵襲に対する応答機構を持ちえない。水晶体はこうした特殊な環境、性質を有しているので、そのストレスに対する防御機構の研究は重要だといえるのである。

水晶体と SPs の関係が注目されはじめたのは Ingolia と Craig⁴⁸⁾がショウジョウバエの 4 つの small SPs (SP 27, 26, 23, 22) のアミノ酸配列の 50% 以上が、

水晶体蛋白の概ね 35% を占めている α -crystallin のそれに相同であることを報告してからである。しかも熱ショック後のショウジョウバエ幼虫と培養細胞からの抽出物は α -crystallin に対する単クローン抗体に交叉反応を有することも明らかになった⁴⁹⁾。またヒト SP 27 が α -crystallin に特に相同性の高いこと⁵⁰⁾⁵¹⁾、 α -crystallin 自体が SPs と同様に系統発生的に保持されてきたことが指摘される⁵¹⁾など small SPs と crystallin の構造的、機能的近似性が強く示唆されている。 α -crystallin は蛋白合成能を消失している古い水晶体線維細胞においては SPs の代役をするのではないかという de Jong ら⁵¹⁾の推定は納得できるものである。

このほか SP24 に対する抗体が内因性水晶体蛋白 lens P 24 と免疫学的に交叉反応するというデータがある。しかもこの lens P 24 の近傍に β -crystallin も泳動してくることから両者の関連性も推定できるのである⁵²⁾。 γ -crystallin と SP 70 との近似性も報告されている。カエル由来の γ -I-crystallin とショウジョウバエの SP 70 との間に約 26% アミノ酸配列の相同性があるという⁵³⁾。

水晶体クリスタリンと SPs が相似の系統発生的、遺伝学的基盤を有し、構造的にもかなり似ているという事実は、おそらく非常に重要な発見である。なぜならばクリスタリンもしくは SPs が単独であるいは共同で、水晶体という血管のない組織を生涯維持するための重要な役割を果たしている可能性が推定できるからである。このシステムが病的状態、加齢に際し具体的にどのように働いているかは大変興味深い今後の課題である。

VII 網膜に対するストレスと SPs

網膜細胞にストレスが加わるとどのような変化が生ずるであろうか。ミュラー細胞が病的状態で増殖してくる可能性のあることは古くから指摘されてはいる⁵⁴⁾が、細胞レベルでその抗原性や酵素活性の変化が問題にされはじめたのはつい最近のことである。

免疫細胞化学的方法を用いたミュラー細胞の抗原性については、別稿⁵⁵⁾⁵⁶⁾で詳述したように中間径線維蛋白であるビメンチン、GFAP (glial fibrillary acidic protein)、S-100 蛋白、carbonic anhydrase-C、glutamine synthetase やいくつかの単クローン抗体が検討されている。この中で GFAP は正常な状態ではほとんど検知されないレベルにあるが、組織傷害⁵⁷⁾⁵⁸⁾、変

性^{59)~61)},あるいは網膜剥離⁶²⁾などに際して陽性化することが明らかになり,さらにミューラー細胞の培養系においても陽性化することが確認された⁵⁶⁾.

また酵素組織化学によって上野⁶³⁾はK⁺-independent paranitrophenol phosphatase (non K⁺-NPPase)およびGlucose-6-phosphatase (G6Pase)とがモルモットのミューラー細胞の小胞体に限局することを明らかにしてきた.そして光凝固⁶⁴⁾や眼内手術後⁶⁵⁾にG6Pase活性が変化することも指摘されている.

このようにいろいろな場面で,たとえ形態学的変化がないか軽微でも細胞内酵素,蛋白の合成や活性,局在に変化が生ずることも,ストレスに対する細胞応答

の一部とみなすことができよう.ここで前章までにみてきたSPsが,網膜細胞においても一定条件下で産生されうるのかどうかをみてみよう.筆者らは成熟家兎より得た純粋なミューラー細胞培養系⁵⁶⁾を用い,これに単純ヘルペスウイルス(HSV)を感染させる実験を行った.このHSVをはじめ^{17)32)66)~68)},アデノウイルス⁶⁹⁾,simian virus 40やpolyoma virus⁷⁰⁾などのDNAウイルス,Newcastle disease virus⁷¹⁾などRNAウイルスの感染が,熱ショック類似の細胞応答を誘発し,SPs産生が起こることが知られている.ミューラー細胞にも同様のSPs産生システムが存在するであろうかというのが我々のもつ問いである.表3に示すプロトコールに沿って実験は行われた¹⁹⁾.この結果感染6時間後には25~40%の培養ミューラー細胞で3つの単クローン抗体で定義されるSPs(SP 57,SP 68,SP 90)が陽性に標識され,感染後24時間では約50%の細胞が陽性化した(図4).これらのSPsは感染前にも15%前後の細胞に弱く標識されており,恒常的に発現していることを示しているものと考えられた.感染後のSPsの局在は核,核周辺および細胞質にビマン性に認められ,形態変化(cytopathic effect)が少ない細胞でもSPs発現が明らかなののみられた(図5).この間図4に示すようにGFAPは次第に検知されなくなったが,二重標識法でSP 57とGFAPが同時に陽性化するものも少なくなく,同一細胞で正常蛋白とSPsが同時に発現している時期があることが確認された.このことはSPsの機能が真に発揮されるのは,正常蛋白がまだ存在しているうちであるといわれているので²⁰⁾,甚だ重要な観察である.

表3 ミューラー細胞への単純ヘルペスウイルス感染実験プロトコール

- 1) 成熟家兎眼より網膜の非有髄部非血管部を得る
- 2) 網膜を細切し培養液へ
- 3) 1週後フィブロネクチン塗布カバーガラス上へ再培養
- 4) 得られた培養細胞中に単純ヘルペスウイルス1型を混入させ1時間静置
- 5) 洗浄
- 6) 感染6時間,24時間後および,コントロールとして非感染細胞をアセトン固定(-20°C)
- 7) SPsを定義する3つのモノクローナル抗体と抗GFAPポリクローナル抗体を用いて間接蛍光法
- 8) 定性的観察のほか150の細胞を数えこのうち何かが陽性かを調査

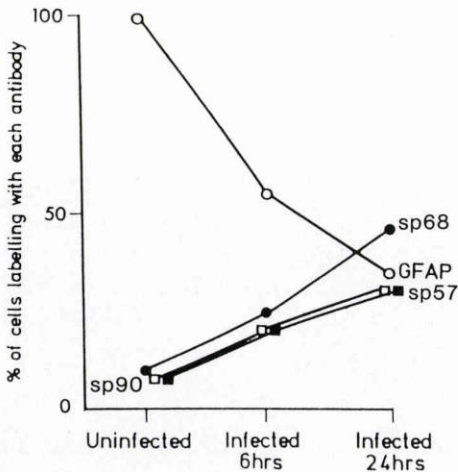


図4 培養ミューラー細胞に単純ヘルペスウイルスを感染させた前後のSPsおよびGFAP陽性細胞の頻度,3種のSPsが感染後陽性率上昇がみられるのに対しGFAPは低下する.

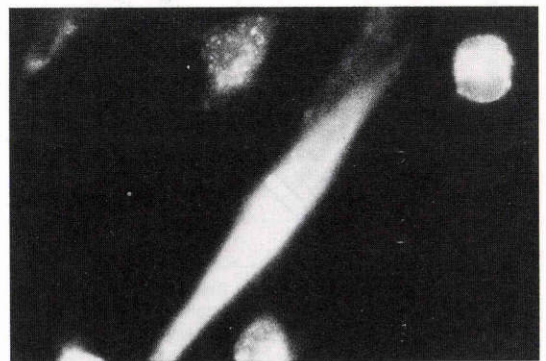


図5 単純ヘルペスウイルス感染後24時間の培養ミューラー細胞¹⁹⁾,SP 57が核を中心に標識されている(間接蛍光法).形態変化の少ない中央の細胞も陽性である.×220

これと酷似した細胞応答は熱ショックによってもみられた(図2)²⁰⁾。つまり全く同じ培養系を42~43℃下に1.5~4時間置き、全く同じ抗体を用いて調べると、先程の3つのSPsが産生され、一方GFAPやvimentinは抑制されたのである(図6)。ただし厳密にみると標識パターンや強弱がHSV感染の場合と異なる点があり、細胞応答には共通部分と侵襲の違いによる特異部分があるだろうことを伺わせた。以上のように網膜のミュラー細胞には確かにSPs産生システムが存在した。

次に上皮やグリアのように細胞分裂を行わないニューロンについても同様なシステムが存在するかについて検証してみよう。哺乳類の脳内で74KのSPが示された報告⁷²⁾⁷³⁾やヒト脊髄からの培養細胞でSP 57が証明された報告¹⁷⁾が中枢神経系の細胞でSPの存在を示すことができた主な研究である。一方同じ中枢神経系でも網膜ニューロンに関する研究はさらに乏しい。ClarkとBrown⁷⁴⁾は家兎にLSD(D-lysergic acid diethylamide)を投与して体温を上昇せしめ、脳内で発見された74KのSPが視神経のホモジェネート中

にも認められることを示し、さらにその時間と量の関係から、この蛋白が遅い軸索輸送に乗っていることを推定した。この成績はその後に示された74KのSPが細胞骨格蛋白と深い関係にあり³³⁾、一般に細胞骨格蛋白は遅い軸索輸送に集るので⁷⁵⁾⁷⁶⁾、SPが細胞骨格蛋白と結合してニューロン内を遅い軸索輸送で運ばれているとも考えることができる。しかしながらSPsが視神経内を軸索輸送されるからといってこの蛋白が網膜神経節細胞で産生されたものと早まってはならない。なぜならば網膜のグリアからニューロンへSPsが受け渡されている可能性が示されているからである⁷⁷⁾。

筆者らは幼若ラットからの培養網膜ニューロンを独自の方法で作製し⁷⁸⁾(図7)、これにHSVを感染させる実験を行った⁷⁹⁾⁸⁰⁾。抗ニューロフィラメントペプチド抗体で培養細胞が確かにニューロンであること、また抗HSV抗体で培養細胞にHSVが感染したこと

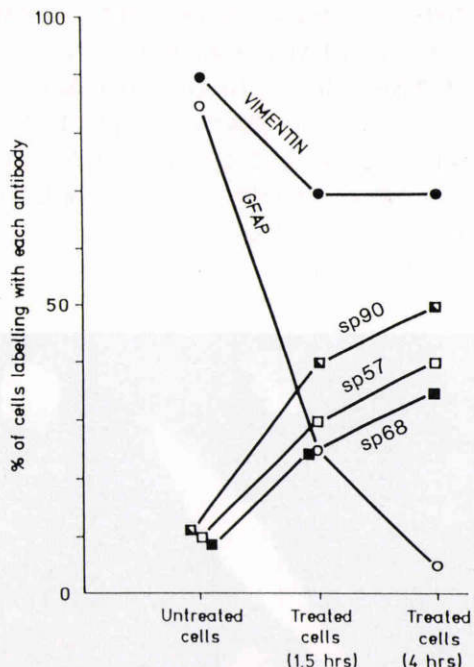


図6 培養ミュラー細胞に熱ショック(42~43℃)を与えた前後の3種のSPsと2種の中間径線維蛋白(GFAPとビメンチン)に強く標識された細胞の頻度。SPsは3種とも熱ショック後陽性率が上昇するが、中間径線維蛋白陽性細胞は低下する。

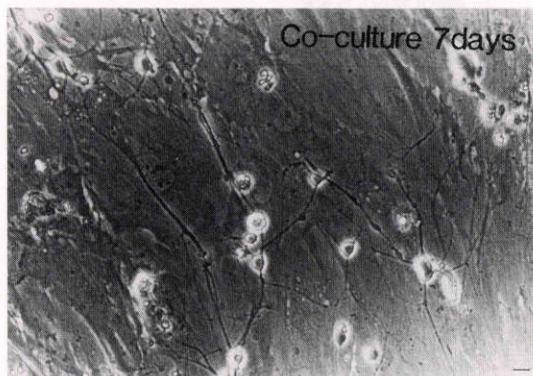


図7 ミュラー細胞との混合培養7日目に得られた、網膜ニューロン細胞群。ニューロンがネットワークを作っている。bar=2μm



図8 SP 57が陽性化した単純ヘルペスウイルス感染24時間後の培養網膜ニューロン。×450

をそれぞれ確認した上で、感染後 SP 57 の産生が促進されることを間接蛍光法によって明らかにした (図 8)。ニューロフィラメントの標識率は感染後顕著に低下したことを考え合わせると、網膜ニューロンにおいてもストレスによる「正常蛋白の合成阻害と SPs の産生促進」という公式に見合うシステムが存在することが確かめられた。

では HSV に感染した網膜ニューロンが産生する SPs は、いったい何をやっているのであろうかというのが次の問いである。高温による前処置が培養家兎角膜細胞の HSV による lytic infection を抑制し、latent infection にする可能性を指摘した興味深い成績がある⁸¹⁾。一方マウス角膜への HSV 感染後長期経過してから、角膜自体は臨床的に正常に復している時期に網膜から HSV が分離されたとの観察⁸²⁾は、眼表面への HSV 感染が網膜を含む眼組織に HSV の潜伏を惹起する可能性を示唆している。しかも HSV が視神経内を輸送されうことはよく知られた事実であり⁸³⁾⁸⁴⁾、これらのことを総合して筆者らは次のような観点をもつに至っている。すなわち SPs は HSV 感染の latency をコントロールする有力な要素であり、眼組織や中枢神経系に対する HSV による破壊を抑制しているのではないかということである⁷⁹⁾⁸⁰⁾。

第 4 章で見たように SPs の役割の 1 つとして熱耐性は最もよく研究されている領域である。培養ヒト網膜色素上皮に、培養家兎ミューラー細胞に熱ショックによって惹起されると同様な形態学的変化を起こさせるには、ミューラー細胞におけるより 3℃ 以上も高い、45~46℃ の熱ショックが必要である⁸⁵⁾。この網膜色素上皮の有する熱耐性は多分細胞が本来持っている性質で、SPs 産生システムとは無関係と思われる。これらの細胞を軽微な高温 (40℃) に暴露すると、細胞骨格蛋白であるケラチンやビメンチンにはほとんど変化を起こさないまま、SP 90 が産生亢進されることがわかった。そして引き続き 45~46℃ の環境下でも形態変化をほとんど起こさず、かつ SP 産生もしないという、さらに高度の熱耐性を獲得したわけである⁴²⁾⁸⁵⁾。つまり網膜色素上皮は本来高い熱耐性を持っている上、わずかな高温で SP を産生するという、熱に対して二重の防御機構を持っていると解釈できよう。網膜色素上皮細胞は光刺激に際して代謝活動が活発になり、また種々の病的状態で増殖することも知られている。網膜色素上皮細胞のこうした細胞反応と、熱に対する二重の防御機構は無関係ではなく、おそらく合目的なメ

カニズムとして存在しているものと想像される。

Barbe と Tytell はラットに光を暴露する前に高体温を経験させると、網膜の光に対する障害を阻止されることと、高体温に際し網膜外節と網膜層以外の部位に SP 70 が同定されることを結びつけて、SP 70 が光障害を防御する可能性を示した⁸⁶⁾。今後網膜における SP の役割の中に、光障害に対する耐性の獲得という観点がとり入れられ、研究が進展することになろう。

VIII ストレスによる細胞応答と臨床 (おわりにかえて)

以上概観してきたように、ストレスに対する細胞応答は多くの共通部分と多少の特異部分から成っており、SPs 産生システムはほとんどすべての細胞に具備されており眼組織もまた例外でないことがわかった。種々の SPs の役割、機能は多分各々異なっているであろうが、網膜細胞においては熱、光、感染などを含むストレスに対する抵抗性に SPs が深く関与しているであろうことは、まず間違いのないところである。ストレス細胞応答システムと臨床との関わりについての研究は、まだ端緒を開いたばかりで、見るべきものは少ない。しかしこの領域の研究は今後増加してゆくであろうし、そうあるべきである。そしてストレスの内容も、我々の知っている眼疾患や眼病理に普遍化され、眼科臨床にこうした新たな側面から光が当てられることが望まれる。これまで謎であった種々の現象、たとえば前章で触れたように HSV 感染が何故潜伏感染に移行するのかという疑問が、細胞のストレス応答や SPs の機能の概念を導入することで、謎解きの糸がほぐれるかもしれない。マウスを用いた実験的脱髄性視神経炎において不明の蛋白の軸索輸送が増加するが⁷⁶⁾⁸⁷⁾、この不明の蛋白の候補に SPs を挙げてみてはどうであろう。脱髄性視神経炎でよくみられる Uhthoff 現象は高温時増悪という謎の現象であるが、これと SPs は無関係なのだろうか。種々の神経毒に対し視神経はさまざまな変化を示す⁷⁶⁾が、この時 SPs は何か機能しているであろうか。筆者は本稿を書き乍らいろいろ想像を展開してみた。ストレス応答機構という捉え方は極めて深遠で魅力あるものらしいことが、読者に少しでもわかっていただければ幸いである。臨床、研究における謎解きに、細胞のもつこの魅力あるシステムの存在を思い起こしていただくのも、アイデアではなかろうかと思う次第である。

欄筆にあたり石川哲教授のご校閲に感謝致します。

文 献

- 1) **Schlesinger MJ, Ashburner M, Tissières A** : Heat Shock from Bacteria to Man. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- 2) **Lindquist S** : The heat shock response. *Ann Rev Biochem* 55 : 1151—1191, 1986.
- 3) 永田和宏 : トランスホーメーション感受性をもつ新しい熱ショック蛋白質. 蛋白質核酸酵素 32 : 1012—1018, 1987.
- 4) **Deguchi Y, Negoro S, Kishimoto S** : Heat-shock protein synthesis by human peripheral mononuclear cells from SLE patients. *Biochem Biophys Res Commun* 148 : 1063—1068, 1987.
- 5) **Minota S, Koyasu S, Yahara I, et al** : Autoantibodies to the heat-shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 81 : 106—109, 1988.
- 6) **Zimmerman JL, Petri W, Meselson M** : Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNAs in normal development without heat shock. *Cell* 32 : 1161—1170, 1983.
- 7) **Alahiotis SN** : Heat shock proteins. A new view on the temperature compensation. *Comp Brockem Physiol* 75B : 379—387, 1983.
- 8) **Tanguay RM** : Genetic regulation during heat shock and function of heat shock proteins : A review. *Can J Biochem Cell Biol* 61 : 387—394, 1983.
- 9) **Neidhardt FC, Van Bogelen RA, Vaughn V** : The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Ann Rev Genet* 18 : 295—329, 1984.
- 10) **Schlesinger MJ** : Heat shock proteins : The search for functions. *J Cell Biol* 103 : 321—325, 1986.
- 11) **Burdon RH** : Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem J* 240 : 313—324, 1986.
- 12) 矢原一郎, 小安重夫, 松本清治 : 高等動物における熱ショック蛋白質 HSP70 と HSP90 の機能. 蛋白質核酸酵素 33 : 29—41, 1988.
- 13) **Ritossa F** : A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18 : 571—573, 1962.
- 14) **Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM** : Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* : Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 85 : 389—398, 1974.
- 15) **Welch WJ, Feramisco JR** : Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J Biol Chem* 257 : 14949—14959, 1982.
- 16) **Kennedy PGE, LaThangue NB, Chan WL, et al** : Cultured human neural cells accumulate a heat-shock protein during acute herpes virus infection. *Neurosci Lett* 61 : 321—326, 1985.
- 17) **Reiter T, Penman S** : "Prompt" heat shock proteins : Translationally regulated synthesis of new proteins associated with the nuclear matrix-intermediate filaments as an early response to heat shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 4737—4741, 1983.
- 18) **Kelley PM, Schlesinger MJ** : Antibodies to two major chicken heat shock proteins cross-react with similar proteins in widely divergent species. *Mol Cell Biol* 2 : 267—274, 1982.
- 19) **Wakakura M, Kennedy PGE, Foulds WS, et al** : Stress proteins accumulate in cultured retinal glial cells during herpes viral infection. *Exp Eye Res* 45 : 557—567, 1987.
- 20) **Wakakura M, Foulds WS** : Response of cultured Müller cells to heat shock.—An immunocytochemical study of heat shock and intermediate filament proteins in response to temperature elevation. *Exp Eye Res* 48 : 337—350, 1989.
- 21) **de Jong WW, Hoekman WA, Mulders JWM, et al** : Heat shock response of the rat lens. *J Cell Biol* 102 : 104—111, 1986.
- 22) **Li GC, Werb Z** : Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 : 3218—3222, 1982.
- 23) **Li GC** : Elevated levels of 70,000 dalton heat shock protein in transiently thermotolerant chinese hamster fibroblasts and in their stable heat resistant variants. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11 : 165—177, 1985.
- 24) **Arrigo A-P, Fakan S, Tissières A** : Localization of the heat-induced proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. *Dev Biol* 78 : 86—103, 1980.
- 25) **Velazquez JM, DiDomenico BJ, Lindquist S** : Intracellular localization of heat shock proteins in *Drosophila*. *Cell* 20 : 679—689, 1980.
- 26) **Arrigo A-P** : Investigation of the function of the heat shock proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. *Mol Gen Genet* 178 : 517—524, 1980.
- 27) **Welch W, Suhan JP** : Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103 : 2035—2052, 1986.
- 28) **Minton KW, Karmin P, Hahn GM, et al** : Nonspecific stabilization of stress-susceptible proteins by stress-resistant proteins : A model for the biological role of heat shock proteins.

- Proc Natl Acad Sci USA 79: 7107-7111, 1982.
- 29) **Vincent T, Tanguay RM**: Different intracellular distributions of heat shock and arsenite-induced proteins in *Drosophila* Kc cells. *J Mol Biol* 162: 365-378, 1982.
 - 30) **Sinibaldi RM, Morris PW**: Putative function of *Drosophila melanogaster* heat shock proteins in the nucleoskeleton. *J Biol Chem* 256: 10735-10738, 1981.
 - 31) **Wang C, Gomer RH, Lazarides E**: Heat shock proteins are methylated in avian and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3531-3535, 1981.
 - 32) **LaThangue NB**: A major heat-shock protein defined by monoclonal antibodies. *EMBO J* 3: 1871-1879, 1984.
 - 33) **Clark BD, Brown IR**: A retinal heat shock protein is associated with elements of the cytoskeleton and binds to calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun* 139: 974-981, 1986.
 - 34) **Koyasu S, Nishida E, Kadowaki T, et al**: Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8054-8058, 1986.
 - 35) **Nishida E, Koyasu S, Saka H, et al**: Calmodulin-regulated binding of the 90-kDa heat shock protein to actin filaments. *J Biol Chem* 261: 16033-16036, 1986.
 - 36) **Leicht BG, Biessmann H, Palter KB, et al**: Small heat shock proteins of *Drosophila* associate with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 90-94, 1986.
 - 37) **Turi A, Li RC, Lin P-S**: Effect of heat on the microtubule disassembly and its relationship to body temperature. *Biochem Biophys Res Commun* 100: 584-590, 1981.
 - 38) **Falkner E-G, Saumweber H, Biessmann H**: Two *Drosophila melanogaster* proteins related to intermediate filament proteins of vertebrate cells. *J Cell Biol* 91: 175-183, 1981.
 - 39) **Biessmann H, Falkner F-G, Saumweber H, et al**: Disruption of the vimentin cytoskeleton may play a role in heat shock response. In Shlesinger MJ, Ashburner M, Tissière A (ed): *Heat Shock, from Bacteria to Man*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 275-281, 1982.
 - 40) **Thomas GP, Welch WJ, Mathews MB, et al**: Molecular and cellular effects of heat shock and related treatments of mammalian tissue-culture cells. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 46: 985-996, 1982.
 - 41) **Van Bergen En Henegouwen P, Jordi WJRM, Van Dongen G, et al**: Studies on a possible relationship between alterations in the cytoskeleton and induction of heat shock protein synthesis in mammalian cells. *Int J Hyperthermia* 1: 69-83, 1985.
 - 42) **Wakakura M, Foulds WS**: Heat shock response and thermal resistance in cultured human retinal pigment epithelium. *Ophthalmic Res* (in press).
 - 43) **Subjeck JR, Sciandra JJ, Johnson RJ**: Heat shock proteins and thermotolerance: A comparison of induction kinetics. *Br J Radiol* 55: 579-584, 1982.
 - 44) **Landry J, Bernier D, Chretien P, et al**: Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res* 42: 2457-2461, 1982.
 - 45) **Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ**: Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242: 433-436, 1988.
 - 46) **Laszlo A**: Evidence for two states of thermotolerance in mammalian cells. *Int J Hyperthermia* 4: 513-526, 1988.
 - 47) **Rice G, Laszlo A, Li G, et al**: Heat shock proteins within the mammalian cell cycle: Relationship to thermal sensitivity, thermal tolerance, and cell cycle progression. *J Cell Physiol* 126: 291-297, 1986.
 - 48) **Ingolia TD, Craig EA**: Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian α -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2360-2364, 1982.
 - 49) **Augusteyn RC, Boyd A, Kelly L**: Immunological comparison of heat-shock proteins and α -crystallin. *Curr Eye Res* 5: 759-762, 1986.
 - 50) **Hickey E, Brandon SE, Potter R, et al**: Sequence and organization of genes encoding the human 27kDa heat shock protein. *Nucl Acids Res* 14: 4127-4145, 1986.
 - 51) **de Jong WW, Leunissen JAM, Leenen PJM, et al**: Dogfish α -crystallin sequences. *J Biol Chem* 263: 5141-5149, 1988.
 - 52) **Collier NC, Schlesinger MJ**: Induction of heat-shock proteins in the embryonic chicken lens. *Exp Eye Res* 43: 103-117, 1986.
 - 53) **Tomarev SI, Krayev AS, Skryabin KG, et al**: The nucleotide sequence of a cloned cDNA corresponding to one of the α -crystallin from the eye lens of the frog *Rana temporaria*. *FEBS*

- Let 146: 315-318, 1982.
- 54) 宇賀茂三, 勝目紀久子: 人眼網膜 Müller 細胞の形態と機能. 第1報. 各種疾患における Müller 細胞の動態. 日眼 73: 1632-1642, 1969.
 - 55) 若倉雅登: グリアマーカー: 免疫細胞化学におけるミューラー細胞の同定. 神眼 4: 299-302, 1987.
 - 56) Wakakura M, Foulds WS: Immunocytochemical characteristics of Müller cells cultured from adult rabbit retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 892-900, 1988.
 - 57) Bignami A, Dahl D: The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury: An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. Exp Eye Res 28: 63-69, 1979.
 - 58) O'Dowd DK, Eng LF: Immunocytochemical localization of the glial fibrillary acidic (GFA) protein in the Müller cell of the human retina. Soc Neurosci Abs 5: 431, 1977.
 - 59) Shaw G, Weber K: The structure and development of the rat retina: An immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament protein. Eur J Cell Biol 30: 219-232, 1983.
 - 60) Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV: Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 1321-1328, 1984.
 - 61) Nork TM, Ghobrial MW, Peyman GA, et al: Massive retinal gliosis: A reactive proliferation of Müller cells. Arch Ophthalmol 104: 1383-1389, 1986.
 - 62) Erickson PA, Fisher SK, Guerin CJ, et al: Glial fibrillary acidic protein increases in Müller cells after retinal detachment. Exp Eye Res 44: 37-48, 1987.
 - 63) 上野聡樹: 宿題報告血液眼関門についての研究—機能と形態の接点, その研究法の開発—第2部. Müller 細胞組織細胞化学の barrier 研究への応用と単離された網膜色素上皮細胞の形態的・機能的細胞極性の研究. 日眼 92: 1961-2014, 1988.
 - 64) 石郷岡均, 上野聡樹: 眼科手術と眼組織—手術操作に対する細胞応答の基礎的研究. 日眼 92(臨増): 81, 1988.
 - 65) 石黒誠一: 硝子体手術に伴う細胞応答の研究. 日眼 92(臨増): 82, 1988.
 - 66) Notarianni EL, Preston CM: Activation of cellular stress protein genes by herpes simplex virus temperature sensitive mutants which overproduce immediate early polypeptides. Virol 123: 113-122, 1982.
 - 67) LaThangue NB, Shriver K, Dawson C, et al: Herpes simplex virus infection causes the accumulation of a heat-shock protein. EMBO J 3: 267-277, 1984.
 - 68) LaThangue NB, Lachman DS: Nuclear accumulation of a heat-shock 70-like protein during herpes simplex virus replication. Biosci Rep 7: 475-483, 1987.
 - 69) Nevins JR: Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. Cell 29: 913-919, 1982.
 - 70) Khandjian EW, Turler H: Simian virus and polya virus induce synthesis of heat shock proteins in permissive cells. Mol Cell Biol 3: 1-8, 1983.
 - 71) Collins, P.C., Hightower, L.E.: Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. J Virol 44: 703-707, 1982.
 - 72) Cosgrove JW, Clark BD, Brown IR: Effect of intravenous administration of D-lysergic acid diethylamide on subsequent protein synthesis in a cell-free system derived from brain. J Neurochem 36: 1037-1045, 1981.
 - 73) Inasi BS, Brown IR: Synthesis of a heat shock protein in the microvascular system of the rabbit brain following elevation of body temperature. Biochem Biophys Res Commun 106: 881-887, 1982.
 - 74) Clark BD, Brown IR: Axonal transport of a heat shock protein in the rabbit visual system. Proc Natl Acad Sci USA 82: 1281-1285, 1985.
 - 75) Lasek RJ, Garner JA, Brady ST: Axonal transport of the cytoplasmic matrix. J Cell Biol 97: 212s-221s, 1984.
 - 76) 若倉雅登: 軸索輸送—形態学的側面より. 眼科 Mook 35: 21-30, 1987.
 - 77) Tytell M, Greeberg SG, Lasek RJ: Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. Brain Res 363: 161-164, 1986.
 - 78) Wakakura M, Foulds WS: Laminin expressed by cultured Müller cells stimulates growth of retinal neurites. Exp Eye Res 48: 577-582, 1989.
 - 79) Wakakura M, Kennedy PGE, Foulds WS, et al: Herpes simplex virus type 1 infection upregulates expression of a stress protein in cultured retinal neurons. J Neurol Neurosurg Psychiatr (in press).
 - 80) 若倉雅登, Kennedy PGE, Clements GB, et al:

- 培養網膜神経細胞への単純ヘルペス感染とストレス蛋白の増加, 日眼 92(臨増): 131, 1988.
- 81) **Cook SD, Brown SM**: Herpes simplex virus type 1 persistence and latency in cultured rabbit corneal epithelial cells. *Brit J Ophthalmol* 70: 642—650, 1986.
- 82) **Openshaw HR**: Latency of herpes simplex virus in ocular tissue of mice. *Infection and Immunity* 39: 960—962, 1983.
- 83) **Johnson BL, Wisotzkey HM**; Neuroretinitis associated with herpes simplex encephalitis in an adult. *Am J Ophthalmol* 83: 481—489, 1977.
- 84) **Atherton SS, Streilein JW**: Two waves of virus following anterior chamber inoculation of HSV-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 571—579, 1987.
- 85) **Wakakura M, Foulds WS**: Thermal resistance and heat shock protein in cultured human retinal pigment epithelium. 29th Association for Eye Research Meeting, Albena, 1988.
- 86) **Barbe MF, Tytell M**: Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* 241: 1817—1820, 1988.
- 87) **Pessoa VF, Ikeda H**: Increase in axonal transport in demyelinating optic nerve fibres in the mouse infected with Semliki forest virus. *Brain* 107: 433—446, 1984.
-