

実験的ヘルペスウイルス性網脈絡膜炎の眼内液 抗体価の検索 (第 2 報)

— 2 種類の抗原感作による抗体率の比較 — (図 3, 表 3)

頼 徳治・高村健太郎 (東京医科大学眼科学教室)
市側 稔博・臼井 正彦

要 約

眼内炎症によって破綻された血液眼関門により体循環から眼内に移行したと考えられる血清抗体が眼内の抗体価や算出される抗体率にどのような影響を与えるかを検討するために以下の実験を行った。眼内接種 3 週前に予め、二種の病原体 (単純ヘルペス I 型ウイルスとトキソプラズマ) を抗原として全身感作した家兎に、同じヘルペスウイルスを硝子体内に注入して実験的ウイルス性網脈絡膜炎を作り、2 週後に血清、眼内液を採取して、これら二種の病原体に対する眼内液および血清の抗体価を測定し、抗体率を求め、以下の結果を得た。病因ウイルスであるヘルペスウイルスの抗体率は 2.4~20.1 で平均値は 9.7 であった。一方、血清抗体が眼内に移行したと思われるトキソプラズマの抗体率は 0.52~4.8 で平均値は 1.9 であった。この結果より抗体率 6 以上を示す場合、眼内でその病原体による感染を意味し、2 以下ではその可能性は極めて低く、眼内の抗体は血中よりの移行によると思われた。また 2~6 ではこれら双方とも可能性があり、さらに詳細な検索が必要と思われた。(日眼会誌 93: 625-630, 1989)

キーワード: 抗体価, 抗体率, 前房水, 硝子体, 実験的ヘルペスウイルス性網脈絡膜炎

Intraocular Fluid Antibody Quotients following Inoculation with Two different Antigens in Experimental Herpes Simplex Virus Retinochoroiditis

Tokuji Rai, Kentarou Takamura, Toshihiro Ichikawa and Masahiko Usui

Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College

Abstract

Viral retinochoroiditis was induced experimentally by inoculation of herpes simplex virus into the vitreous body in rabbits.

The animals were sensitized systemically using 2 pathogens as antigens (herpes simplex virus and toxoplasma gondii) 3 weeks prior to intraocular inoculation. Serum and intraocular fluid were collected 2 weeks after inoculation. The intraocular fluid antibody titers and quotients for these 2 pathogens were then measured to determine the effects of serum antibodies, which are thought to enter the eyes as a result of destruction of the blood-ocular barrier. Experimental criteria for antibody quotients were also determined.

Antibody quotients for the etiological virus (herpes simplex virus) ranged from 2 to 20, with an

別刷請求先: 160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学眼科学教室 頼 徳治
(平成元年 3 月 20 日受付, 平成元年 4 月 26 日改訂受理)

Reprint requests to: Tokuji Rai, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tokyo Medical College
6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(Received March 20, 1989 and accepted in revised form April 26, 1989)

average of 9.7. Those for toxoplasma gondii, the antibody of which is thought to enter the eye from the blood, were all less than 5 with average of 1.9. From these results, it would seem that when the antibody quotient of a pathogen in more than 6 in the intraocular fluid, it is likely to be an etiological organism, while the possibility of infection is very low when the quotient is under 2. More precise studies are required to identify an etiological pathogen when the quotient is 2-6. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 625-630, 1989)

Key words: Antibody, Quotient, Aqueous humor, Vitreous humor, Experimental herpes simplex retinochoroiditis

I 緒言

最近ヘルペス群ウイルスによる急性網膜壊死が注目され、その診断に対して眼内液ウイルス抗体価の測定と抗体率の算出が有用であると報告されている¹⁾²⁾。

著者らは既報にて単純ヘルペスウイルス(以下HSVと略す)を家兎眼に接種し実験的ウイルス性網脈絡膜炎を作り、経時的に血清と眼内液のウイルス抗体価及びIgG量を測定し、抗体率を求め、病因ウイルスとこれらの関連を病理組織学およびウイルス学にも検索し報告した³⁾。

今回著者らは、眼内接種前に予め二種の病原体を抗原として家兎に全身感作したのち、その内の一つであるHSVを硝子体内に接種し、ヘルペスウイルス性網脈絡膜炎を作り、血清と眼内液におけるそれぞれの抗体価、IgG量を測定し、抗体率を求めた。そして、血液眼関門の破綻より眼内に移行したと考えられる血清抗体が眼内の抗体価や抗体率にどのような影響を与え、またどのような値を取り得るのかを検索し、実験的に抗体率の評価基準値を求めたところ、若干の知見が得られたので報告する。

II 実験方法

1. ウイルス

第1報と同じHSV(type-1), Miyama株を用いた。

ウイルスの培養及び精製: アフリカミドリザル腎由来の株化細胞(Vero細胞)を用いて前報³⁾と同じ方法で培養し、ショ糖密度勾配法を用いてウイルスを精製した。

2. 実験動物

ニュージーランドホワイトラビット(雌), 体重2~3kgを5羽用いた。

3. 全身感作

眼内接種予定日3週間前に、精製HSVをフロイン

ドの完全アジュバンドとともに 10^6 50% Tissue culture infectious doses(TCID₅₀)/mlに調整し、1.0mlを背部皮内に接種した。さらに同日、Toxoplasma gondii抗原 $2.0\mu\text{g}/\text{ml}$ をフロインドの完全アジュバンド共に1.0ml背部皮内に接種した。

4. 硝子体内接種

全身感作3週間後、眼内に病変のないことを確認し、あらかじめ0.1~0.2ml前房穿刺しておいた左眼に精製HSV 10^6 TCID₅₀/mlを0.1ml 30G針で毛様体扁平部より直接硝子体内に接種した。接種前に得た前房水は、HSV及びトキソプラズマに対する抗体価が上昇していないことを確認するために用いた。

5. 接種後の観察

接種後、細隙灯顕微鏡、倒像眼底鏡を用いて前眼部及び眼底の観察を眼球摘出時まで毎日行った。

6. 血清、眼内液の抗体価及びIgG量の測定

眼内接種2週間後に血清および前房水を採取し、眼球摘出を行った。摘出した眼球は輪部より3mm後方の強膜で全周切開し、前眼部と眼杯にわけ、後者より硝子体液を採取した。得られた血清、前房水、硝子体液は、免疫蛍光抗体法間接法によって、HSV及びトキソプラズマに対する抗体価を測定した。また、それぞれに含有されるIgG量の測定は放射状免疫拡散法を用

表1 眼内接種前の抗体価

No.	血清抗体価 (FA)		前房水抗体価 (FA)	
	HSV	TOXO	HSV	TOXO
1	40	80	<10	<20
2	80	80	<10	<20
3	80	80	<10	<20
4	20	320	<10	<20
5	20	320	<10	<20

HSV: 単純ヘルペスウイルス (初期希釈10倍)

TOXO: トキソプラズマ (初期希釈20倍)

FA: 蛍光抗体法

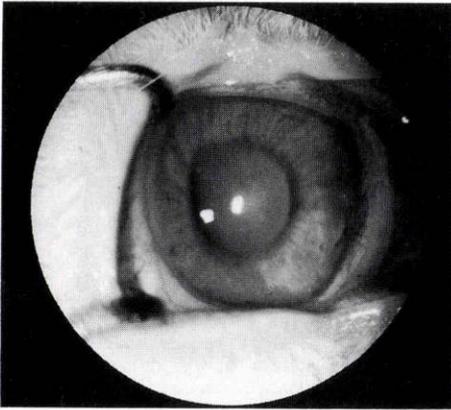


図1 接種後7日目の前眼部写真, 虹彩の充血, 浮腫を認める.

いて測定した.

III 結 果

1. 眼内接種前の抗体価

HSV とトキソプラズマによる全身感作後に採取した前房水には, これら二種の抗原に対する抗体価の上

昇は全く認められなかった(表1).

2. 接種後の観察

眼内 HSV 接種後2~3日に毛様充血, 虹彩の充血, 前房中の炎症細胞の遊出等を有する強い虹彩炎が発症し, 3~4日に乳頭の充血, 浮腫, 血管の拡張蛇行, 及びその周囲の出血, 硝子体混濁などの網脈絡膜炎症状が認められた. これらの炎症は接種後7日目頃に最高に達し, 眼球摘出する2週目ごろには軽快する傾向を示した(図1, 2).

なお, 非接種眼(右眼)にはまったく炎症症状はみられなかった.

3. 抗体価, IgG 量および抗体率

採取した血清および左眼の眼内液(前房水, 硝子体液)の HSV とトキソプラズマに対する抗体価と IgG 量より, HSV とトキソプラズマそれぞれについて下記の式に基づき, 抗体率(Q値)を求めた.

HSV の抗体率 (Q_{HSV}) =

$$\frac{\text{眼内液の HSV 抗体価}}{\text{血清中の HSV 抗体価}} \times \frac{\text{血清中の IgG 量}}{\text{眼内液の IgG 量}}$$

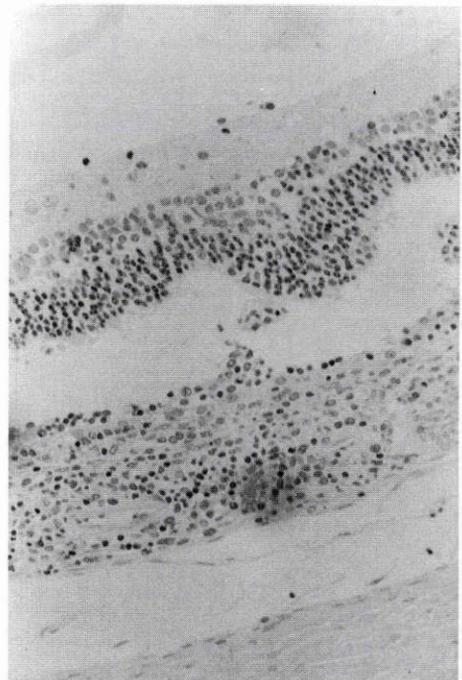
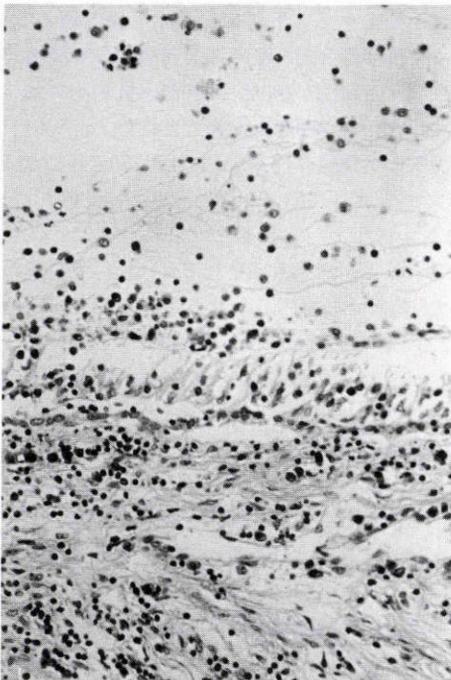


図2 摘出眼の組織所見

左: 毛様体扁平部と硝子体腔に多数の炎症細胞の浸潤を認める。(H.E.染色, $\times 200$).

右: 網膜, 脈絡膜の炎症性細胞浸潤と網膜の破壊像を認める。(H.E.染色, $\times 200$)

表2 血清, 前房水の HSV 及びトキソプラズマに対する抗体価, 抗体率

No.	血 清			前 房 水			抗 体 率 Q	
	抗体価 (FA)		IgG 量 (mg/dl)	抗体価 (FA)		IgG 量 (mg/dl)	HSV の Q	TOXO の Q
	HSV	TOXO		HSV	TOXO			
1	640	320	1,433	640	320	491	2.91	2.91
2	160	320	1,513	1,280	320	603	20.1	2.51
3	160	320	1,503	1,280	80	613	19.6	0.61
4	160	320	2,067	320	320	853	4.85	2.42
5	160	1,280	2,141	640	320	758	11.3	0.71

表3 血清, 硝子体液の HSV 及びトキソプラズマに対する抗体価, 抗体率

No.	血 清			硝 子 体 液			抗 体 率 Q	
	抗体価 (FA)		IgG 量 (mg/dl)	抗体価 (FA)		IgG 量 (mg/dl)	HSV の Q	TOXO の Q
	HSV	TOXO		HSV	TOXO			
1	640	320	1,433	1,280	1,280	1,198	2.4	4.8
2	160	320	1,513	640	320	811	7.5	1.9
3	160	320	1,503	1,280	80	724	16.6	0.52
4	160	320	2,067	160	320	860	2.4	2.4
5	160	1,280	2,141	640	320	936	9.1	0.57

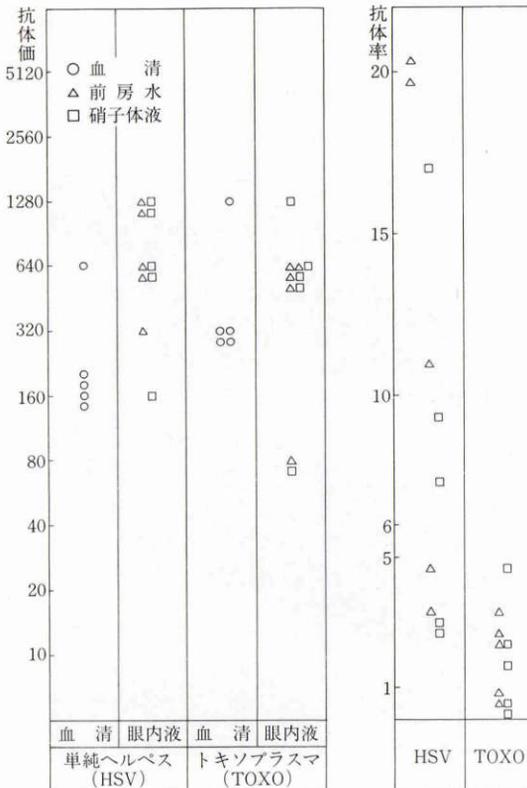


図3 ヘルペスウイルス及びトキソプラズマの抗体価, 抗体率

トキソプラズマの抗体率 (Q_{Toxo}) = $\frac{\text{眼内液のトキソプラズマ抗体価}}{\text{血清中のトキソプラズマ抗体価}} \times \frac{\text{血清中の IgG 量}}{\text{眼内液の IgG 量}}$
 血清の抗体価は皮内接種後5週間, 眼内接種後2週間で抗 HSV IgG が160倍~640倍, 抗トキソプラズマ IgG が320倍~1,280倍と上昇していた。

前房水の抗体価は抗 HSV IgG が320倍~1280倍, 抗トキソプラズマ IgG が80倍~320倍と上昇していた(表2)。

HSV, トキソプラズマそれぞれについて前述の式を用いて, 前房水の抗体率を求めたところ, HSV の抗体率は2.9~20.1の間にあり, 平均11.8であった。一方, トキソプラズマの抗体率は最小0.6~最高2.9平均1.8であった(表2)。

硝子体液の抗体価は HSV が160倍~1,280倍, トキソプラズマが80倍~1,280倍と上昇していた(表3)。

硝子体液についても前房水と同様に HSV とトキソプラズマそれぞれの抗体率を求めたところ HSV の抗体率は2.4~16.6平均7.6であったが, トキソプラズマの抗体率は0.5~4.8平均2.0と低値であった(表3)。

また, 非接種眼(右眼)の前房水および硝子体液の抗体価はすべて HSV が10倍以下, トキソプラズマが20倍以下であった。

これらの結果をまとめて図3に示すと, 血清, 眼内

液の抗体価はHSV, トキソプラズマともに高値を示した。しかし, 抗体率では, 眼内感染の病原体であるHSVで高値を示し平均9.7であったのに対し, 血清中の抗体が眼内に移行したと思われるトキソプラズマでは5以下の値を示し平均1.9であった。

IV 考 按

一般に感染性疾患の病原体を診断する方法には, 直接病原体を培養などの方法により証明する方法と, 血清学的に抗体価から間接的に割り出す方法とがある。前回第1報³⁾において著者らは, HSVを用いた実験的ウイルス性網脈絡膜炎において, 経時的に試料を得て, ウイルスの直接的証明(ウイルスの培養, ウイルス抗原の検索, 電顕によるウイルス粒子の証明)及び間接的な証明方法である抗体価の測定を行った。その結果, 眼内感染においてウイルスを直接的に証明することは, 抗体価のあまり上昇していない感染初期を除いて, 非常に難しいことが示された。またウイルスの培養など直接的にウイルスを証明する方法は手技も煩雑であり, 特殊な設備や試薬を必要とし, 実際の臨床の場でウイルスを直接証明するには, 極めて困難である。従って, ヘルペス群ウイルスをはじめウイルス性疾患などでは, ペア血清を用いて抗体価から病原体を診断することが有用であり, 広く臨床で用いられている。しかし, 眼内感染では, 血液眼関門の存在など眼組織の特殊性から特に不顕性感染の多いトキソプラズマやヘルペス群ウイルスなどの感染において, 血清抗体価のみでは, 正しく病原体を割り出すことが通常困難である。そこで, これらの病原体による眼内感染では, 眼内液と血清の抗体価から抗体率を求め, 病原体をみつけ出す方法が以前より数多く報告されている。著者らもすでに第1報において, 実験的ヘルペスウイルス性網脈絡膜炎の眼内液(前房水, 硝子体液)の抗体価, 抗体率を求め, 直接的ウイルス学的検査法による結果と比較したところ, この検査がウイルス感染を診断することができる有用な方法であることを実験的に確認した。

眼内液の抗体価が上昇する機序としては, 眼内局所における病原体に対する抗体産生の亢進と, 炎症などで, 血液眼関門の透過性亢進による血中抗体の移行が考えられる。このなかから眼内感染に関連する病原体の抗体を証明するには, 眼内局所における抗体産生をとらえることが不可欠であり, 眼内液ならびに血清中の抗体価と免疫グロブリン量を測定し比較して求めら

れる抗体率を算出しなければならない。通常ある抗原(病原体)に対する抗体率が1以上であれば理論的には眼内で病原体に対する特異抗体の産生が行われているとみなされる。また1以下では眼内での抗体産生がなされておらず, 血中抗体が移行したことを示すとされている。しかし, 実際の臨床例では, 複数のウイルスの眼内液の抗体率が1以上を示すことがあり, 血中より眼内への抗体の移行でも抗体率が1以上の値を示すことがあると思われる。第1報においても, コントロールで抗体率が2を示すものが認められた。

このような誤差が生じる原因として, 抗体価の測定が階段希釈で行われているため, 1管の判定の違いにより容易に抗体価は2倍の差が出てしまうため, 公式にあてはめた場合, 血清, 眼内液それぞれ1管の違いから抗体率は容易に4倍の値の差を生じる可能性がある。従って Desmoutsら⁵⁾は, 多くの眼トキソプラズマの臨床例を検討し判定基準を作った結果, 2以下を血中からの抗体の移行, 2~8を局所抗体の産生があるとしながらも感染の疑いとし, 8以上を感染陽性としている。

今回, われわれはあらかじめトキソプラズマ抗原を用いて感作し, 血中に高いトキソプラズマ抗体価をもつ家兎にHSVを硝子体内接種し, 実験的ヘルペスウイルス性網脈絡膜炎を作り, 病因ウイルスであるHSVに対する抗体価, 抗体率と血中より抗体が眼内に移行したと思われるトキソプラズマの抗体価, 抗体率を比較し, 実際に眼内感染を起した病原体とそうでない病原体の抗体率を実験的に検討した。その結果, 病因ウイルスであるHSVに対する眼内液の抗体価と血中抗体価が高値を示す実験動物では, トキソプラズマの眼内液抗体価が最高1,280倍を示していたにもかかわらず, これらに対する抗体率は, HSVで2.4~20.1であり, トキソプラズマでは0.6~4.8であった。よって, 眼内には抗原はなく抗体産生が行われていないトキソプラズマにおいてもその抗体率は1~5の値をとることが判明した。

実験動物No. 2, 3, 5では, 前房水, 硝子体液ともにHSVの抗体率は7.5以上の高値をとり, トキソプラズマの抗体率は, 全て低値であった。このことから, この3例においては, 血液眼関門の破綻による血液成分の眼内への移行はむしろ少なく, 眼内局所の抗体産生により, 前房水, 硝子体液のHSV抗体価が上昇したものと思われた。

これに対しNo. 1, 4の眼球では, HSVに対する

抗体率とトキソプラズマに対する抗体率は前房水、硝子体液ともに2～5の値をとり有意な差は認められなかった。このことから、この2例においては、血液眼関門の破綻により眼内に多量の血清抗体が移行し、眼内のトキソプラズマ抗体価が上昇するとともに、眼内のHSV抗体価は眼局所における抗体産生があったにもかかわらず血中抗体価とほぼ等しくなり、抗体率は低値を示したものと思われた。

トキソプラズマの眼内液抗体率の平均値(MN)は1.9、標準偏差(SD)は1.4であり、 $MN+2SD=4.7$ であった。またHSVの眼内液抗体率の平均値は9.7、標準偏差7.0であり、最小値は2.4で2以下を示すものはなかった。血中の抗体が移行したトキソプラズマの抗体率の $MN+2SD$ が4.7であることから血中抗体移行による抗体率の上限は5程度と考えられ、抗体率6以上では眼内における抗体産生は確実と思われる。また、トキソプラズマの抗体率の平均値が1.9であり、HSVの抗体率で2以下を示すものがなかったことより、抗体率2以下では眼内での抗体産生の可能性は非常に少なく、血中抗体の移行を示すと思われる。これら今回の実験結果及び第1報の結果より、実験的ぶどう膜炎における抗体率の判定基準を以下のようにまとめた。すなわち、

①前房水、硝子体液を問わず、抗体率6以上を示した場合、眼内で病原体に対する抗体産生がほぼ確実に進行しており、眼内でその病原体による感染が生じているか、または起っていたと考えられる。

②抗体率が2～6未満を示した時には、病原体の眼内感染で眼内の抗体産生による抗体率が算出される場

合と、血中より抗体が移行して抗体率が上昇した場合とがあり、病因診断にあたってはさらに詳細な検索や経過観察が必要と思われる。

③眼内液の抗体率が2以下の場合、眼内の抗体は血中よりの移行によると考えられ、感染の可能性は極めて低いと思われた。

この実験的に得られた新しい判定基準は、沖津⁹⁾の報告している臨床上の評価基準値を支持するものであり、今後種々の病原体による眼内感染において、病因を決める上で有用なものになると考えられた。

(恩師松尾治亘教授の御校閲に深謝致します。)

文 献

- 1) 白井正彦, 大西由子, 高野 繁他: 桐沢型ぶどう膜炎の病因に関する研究. 眼紀 36: 249-256, 1985.
- 2) 杉浦寅男, 宮澤裕之, 浅井利通他: 硝子体中の水痘, 帯状ヘルペスウイルス抗体価高値を示した非定型的桐沢型ぶどう膜炎の1例. 臨眼 42: 937-940, 1988.
- 3) 頼 徳治, 高村健太郎, 長谷見通子他: 実験的ヘルペスウイルス性網脈絡膜炎の眼内液抗体価の検索 1. 日眼 92: 1048-1056, 1988.
- 4) Witmer R: Clinical implications of aqueous humor studies in uveitis. Am J Ophthalmol 86: 39-45, 1978.
- 5) Desmots G: Definitive serological diagnosis of ocular toxoplasmosis. Arch Ophthalmol 76: 839-851, 1966.
- 6) 沖津由子: 各種眼疾患における眼内液ヘルペス群ウイルス抗体価及び抗体率の検索. 臨眼 42: 801-805, 1988.