

単純ヘルペスウイルスによる実験的網膜炎,

第2報 感染初期の酵素抗体法による検索

吉岡 正樹*, 大熊 紘*, 宇山 昌延*, 螺良 愛郎**, 大山 昭夫***

*関西医科大学眼科学教室, **同 第2病理学教室, ***同 微生物学教室

要 約

単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)を家兎眼に硝子体内接種し、発生した壊死性網膜炎の感染初期の過程を酵素抗体法のアビジン-ビオチン法(ABC法)を用いて、経時的に観察した。酵素抗体法はパラフィン包埋切片を脱パラフィンし、トリプシン消化を行った以外は常法に従いジアミノベンチジン(DAB)にて発色を行った。接種3日、細胞の変性はこの時期にはまだみられなかったが、内境界膜、神経線維層のMüller細胞基底部にDABが沈着しており、ウイルス抗原が陽性であることが示された。感染4~5日になると網膜に大小の変性病巣が出現し、病変の軽い部分では内顆粒層の神経細胞の核内にDAB沈着がみられ、病変の強い部分ではDAB沈着範囲は網膜深層及び表層へと拡大した。以上のことより硝子体内に接種されたHSV-1は、まずMüller細胞基底部から侵入し、内顆粒層に達して神経細胞内で増殖し、時間の経過と共に外顆粒層や神経節細胞に移行すると思われた。(日眼会誌 94:705-714, 1990)

キーワード: 酵素抗体法, アビジン-ビオチン法, 単純ヘルペスウイルス1型, 壊死性網膜炎, ヘルペス性網膜炎

An Immunoperoxidase Study of Early Phase Experimental
Retinitis Induced by Herpes Simplex Virus

Masaki Yoshioka*, Hiroshi Ohkuma*, Masanobu Uyama*, Airou Tsubura and Akio Ohyama

*Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

**Department of Pathology, Kansai Medical University

***Department of Microbiology, Kansai Medical University

Abstract

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) was intravitreally inoculated in domesticated rabbits, and retinitis was observed with the ABC-method using peroxidase-conjugated antibody. Trypsin digestion was used for antigen visualization. Three days after inoculation, although cell degeneration was not found in the retina, DAB was deposited on the inner limiting membrane and the nerve fiber layer, which corresponded to the basal side of Müller cells. These findings indicated that viral antigen was already present in the retina at this early stage. Four or five days after inoculation, numerous variously sized exudative retinal lesions were seen. In the small exudative foci, DAB deposition was restricted to only in the nuclei of the nerve cells of the inner nuclear layer, while it extended to the outer and inner retinal layer in the large exudative foci. These results suggested that when HSV-1 was

別刷請求先: 570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 吉岡 正樹
(平成元年10月6日受付, 平成2年1月8日受理)

Reprint requests to: Masaki Yoshioka, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kasai Medical Univ.
1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(Received October 6, 1989 and accepted January 8, 1990)

injected intravitreally it invaded from the basal side of Müller cells to the inner nuclear layer, where it replicated. The virus spread to the outer nuclear layer and ganglion cells as infection proceeded. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 705-714, 1990)

Key words: Immunoperoxidase method, Avidin-biotin method, HSV-1, Necrotizing retinitis, Herpetic retinitis

I 緒 言

単純ヘルペスウイルス1型(以下HSV-1と略す)が激しい壊死性網膜炎を発症させることは良く知られているが、壊死性網膜炎に至るまでにまず網膜のどの部位で増殖して他の部分に広がるか等の詳細な過程は不明であった。

網膜内のHSV-1の局在についての今までの報告は、臨床報告ではMinckler¹⁾がヘルペス性脳炎と網膜炎の同時発症例で、眼球網膜の色素上皮や変性した細胞残渣内にHSV-1を認めたと報告したのを始め、最近ではPepose(1984)²⁾がperoxidase antiperoxidase法(PAP法)でAIDS患者の網膜全層から証明し、また彼(1985)³⁾はABC法でも網膜炎の2週間後にヘルペス性脳炎を合併した患者から網膜全層にHSV-1を検出したと報告しているが、いずれも感染の後期であった。

HSV-1を接種して経時的に観察した実験報告では、家兎に硝子体内接種した実験では林⁴⁾が蛍光抗体法で接種7日に神経節細胞、内顆粒層、外顆粒層にウイルス抗原を証明した。Anderson⁵⁾はマウスの脳内に接種して感染7日にまず網膜内顆粒層に、次いで網膜全層に拡大したのを電顕で検索し、Peiffer⁶⁾はマウスに脳内接種して感染9~14日に内顆粒層、色素上皮に検出している。Holland⁷⁾はマウスの前房に接種し、やはり網膜内顆粒層、神経節細胞、後期に外顆粒層、色素上皮に検出している。

我々は第1報⁸⁾では光顕、電顕によって通常の形態学的検索を行い、HSV-1をまず網膜内顆粒層に認め、次いで網膜色素上皮、Müller細胞、神経節細胞、神経線維層に認めた。本報では更に免疫組織化学的方法としてperoxidase標識酵素抗体法のアビジン-ビオチン法⁹⁾(avidin biotinylated horseradish peroxidase complex method. 以下ABC法と略)を用い、網脈絡膜の広い範囲にわたってウイルス抗原の検出を経時的に行い、網膜内におけるウイルスの局在を検索した。

II 方 法

実験の材料及びHSV-1の硝子体内接種方法は前報⁸⁾と同様である。即ちHSV-1 Miyama株を材料とし、特にVero細胞に顕著な細胞変性効果を示す株を分離して、 1.5×10^3 pfu/mlのウイルス浮遊液0.1mlを、体重約2kgの雄性有色家兎20頭20眼の硝子体に、26G注射針を用いて接種した。接種後3日から6日まで、眼球摘出の上、2.5%グルタルアルデヒドを含むカルノフスキー固定液にて固定し、エタノール系列で脱水後パラフィン包埋し、光顕用の切片を作製した。また電顕標本に関しては、摘出眼球を12時間カルノフスキー液で前固定した後、0.1M-磷酸緩衝液(pH7.2)にて洗浄後、眼内各組織を細切し、1%オスミウム酸磷酸緩衝液(pH7.4)で後固定した。エタノール系列にて脱水し、Luftの方法に従ってEPON812に包埋した。LKB8800型超ミクロトームIIIにて超薄切片を作り、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を行い、日立HU-500型電子顕微鏡にて加圧電圧100KVで観察した。

パラフィン包埋組織の免疫染色方法(ABC法)

1. パラフィン切片(厚さ3~4 μ m)をスライドグラス上にのせ十分伸展。
2. 100%キシロール及び100%エタノールにそれぞれ5分間3回浸漬して脱パラフィンした。
3. 0.3%過酸化水素加100%メタノール溶液に30分浸漬して内在性ペロキシダーゼの阻止処理を行った。
4. 0.25%トリプシン溶液(磷酸緩衝液; PBS pH7.2)で1~3時間37°Cで反応した。
5. トリス塩酸緩衝液(0.05M Tris-HCL Buffer pH7.2)で5分間3回洗浄。
6. 2%非感作ウマ血清に20分間反応させて非特異反応を除去。
7. 1次抗体(抗HSV-1マウス血清)(Cappel社製品をpH7.2 PBSで100倍に希釈)と湿室中で4°Cで24時間反応させた。
8. トリス塩酸緩衝液で5分間3回洗浄。
9. 2次抗体(ビオチン化した抗マウスウマ血清)と

30分間反応させた。

10. トリス塩酸緩衝液で5分間3回洗浄。

11. ペロキシダーゼ標識アビジンと湿室中で60分間反応させた。

12. トリス塩酸緩衝液で5分間4回洗浄。

13. Diaminobenzidine (DAB) 加過酸化水素溶液(20%溶液)(同仁化学研究所)で数分間反応させた。

14. トリス塩酸緩衝液に10分浸漬して反応を止めた。

15. ヘマトキシリンで核染色を行った。

16. 100%エタノール及び100%キシロールにそれぞれ5分間3回浸漬して脱水透徹後、封入して光顕にて検鏡。

(尚、6, 9, 11はVectastain社のABC染色キットを使用した。)

III 結 果

1. 臨床所見

HSV-1を硝子体内に直接接種した後1~2日で全動物に毛様充血, 20眼中16眼(80%)に渗出性虹彩炎が発症し, 症状の激しいものでは瞳孔縁に渗出物が付着し, 虹彩後癒着が生じた。10眼中10眼で瞳孔は中等度散大し, 対光反射は消失した。虹彩炎の強い時期に角膜浮腫をきたしたものが20眼中3眼(15%)あったが角膜潰瘍はみられなかった。硝子体混濁は20眼中18眼(90%)で接種後2~4日に増強した後消退した。

15眼中5眼(33%)に網膜血管の拡張と斑状出血が見られた。20眼中19眼(95%)に乳頭充血が接種後2日よりみられ1週後に消失した。11眼中9眼(82%)に接種後4~6日で細かい多数の網膜の点状渗出斑が現れ, 次第に融合して大きい渗出斑を形成した。

2. 酵素抗体法による検索

接種3日, 半切した眼球を実体顕微鏡下に観察すると, 網膜, 有髄神経髄翼上に出血斑をみた。光顕の観察では6眼中6眼に, 乳頭付近の有髄神経線維, 血管周囲に炎症細胞浸潤がみられた。そのほかには変化はみられなかった。

同部位をABC法及びヘマトキシリン染色の二重染色で観察すると, 6眼中2眼(33%)において内境界膜のすぐ下, 神経線維層にDABの沈着がみられ(図1), ヘマトキシリン染色を施さないでABC法のみで観察するとDAB沈着が一層明瞭であった(図2)。

接種4日後, 5眼中5眼に網膜の壊死による灰白色の点状渗出斑がみられ, 光顕標本ではその部位は内顆

粒層の細胞の著しい膨化と核の拡大及び染色性低下がみられた。外顆粒層の配列の乱れがみられたが, 色素上皮には異常をみなかった(図3)。

同部位をABC法で観察すると, 5眼中5眼に図4のように内顆粒層の核が拡大し, 染色性の低下したものに明瞭なDABの沈着がみられた。しかも核膜にそって主にDABが沈着していた。この時期には内境界膜, 神経線維層にはDABの沈着はみられなかった。5眼中4眼(80%)の外顆粒層の核に, 所々DABの沈着をみた。

接種5日, 6日には点状であった渗出病巣は互いに融合して大きい病巣になった。免疫染色では, 9眼中9眼で内顆粒層の核は殆どの核内にDABの沈着がみられ, 外顆粒層の核内にもDABの沈着が多数みられた(図5)。また9眼中8眼(89%)の神経節細胞にもDABが沈着していた(図6)。大きい渗出斑の観察では(図7), 内顆粒層及び外顆粒層の核内にきわめて強いDAB沈着を認めた。

電顕で接種6日の網膜渗出斑の外顆粒層を観察すると, 4眼中2眼(50%)で一様な電子密度の核内に直径70~100nmの低電子密度の円形構造物が数カ所見られた(図8, 9)。

IV 考 按

蛍光抗体法がCoonsら¹⁰⁾によって組織内の抗原抗体の検出方法として提唱されて以来, 抗原或は抗体の標識物質としてフェリチン, 重金属, 放射性同位元素が考案され, Nakaneら¹¹⁾により酵素(horseradish peroxidase, HRP)を化学的に抗体に結合させる酵素抗体法が提唱され, Sternberg¹²⁾はPAP法を, そしてHsuら⁹⁾によってABC法が開発された。これら酵素抗体法は最近, 光学顕微鏡で観察できるので, 対比染色, 例えばH・E染色等を施せば抗原と組織内の局在がより詳細に観察可能なこと, 染色した標本の半永久保存ができること, 感度が高いこと, 電顕に應用が可能なこと等の利点から注目を集めている。

固定方法に関しては, 蛍光抗体法の場合, 専ら新鮮材料の凍結切片に限られていたが, Huang(1975)¹³⁾がホルマリン固定したパラフィン包埋組織でもプロナーゼで消化を加えれば蛍光抗体法でも抗原が検出できることを報告し, ホルマリン固定でも蛍光抗体法に十分検出できる量の抗原性が保たれていることが明らかにされた。しかし結果が一定せずまた常に背景蛍光が問題となった。

そこで彼(1976)¹⁴⁾は更に消化を制御しやすいトリプシンで消化を行った。これら蛋白分解酵素で消化する意義は、ホルマリンで固定する際にホルマリンと蛋白質が反応して作られる分子内の crosslinking methylene bridge を開離 (open up) して抗原基を外部に露出させることにあると言われている¹⁵⁾。

Curran¹⁶⁾はトリプシン消化の後、蛍光抗体法の代わりに、酵素抗体法の PAP 法を用いて染色することを考案した。以後、ホルマリン固定組織を酵素抗体法で観察する方法は今日までよく利用されている。この方法で網膜の染色を行うと、抗原陽性部位は DAB 沈着として示された。

図 4, 6, 7 に見られる内境界膜付近の薄いびまん性の褐色の色調は非特異的反応である。非特異反応の染まり方は均一な染まり方で、特異反応は細かい褐色顆粒の集合として観察され、特異的反応と非特異的反応は明確に区別できた。網膜色素上皮は胞体内のメラニン色素に被われて DAB 沈着の有無は判定できなかった。

接種 3 日, ABC 法で染色して観察すると網膜内境界膜のすぐ下, 神経線維層に DAB の沈着がみられ, これらの部にウイルス抗原が陽性であることが示された。この時期にはこれ以外の部位には DAB 陽性の部位はなかった。Müller 細胞は網膜の内境界膜から外境界膜までの全層にわたって突起を伸ばしている細長い細胞で、特に内方に基底膜を介して硝子体腔と接しており¹⁷⁾, 更に Müller 細胞には異物の細胞内への取り込み作用が知られている¹⁸⁾¹⁹⁾。我々は前報でウイルス増殖はまず内顆粒層であることを明らかにしたが、このことから推定して網膜への最初の侵入部位は Müller 細胞基底部と思われた。すなわち網膜内に HSV-1 が侵入しているが、いまだ細胞変性は起こしていない接種 3 日でも、免疫染色によって内境界膜のすぐ下にウイルスの存在が明らかとなったことから、HSV-1 の網膜への最初の侵入部位は Müller 細胞基底部と思われた。Holland⁷⁾も光顕的観察結果より Müller 細胞が最初に感染するのだらうと推察している。

接種 4 日になると炎症が著しくなり、滲出斑がみられ、網膜の壊死病巣が出現した。滲出斑では、網膜内顆粒層の細胞の壊死がみられたが、免疫染色で観察すると、この部に多数の DAB 沈着がみられた。DAB は主として核膜にそって沈着していた。前報⁸⁾で示した如く、電顕で観察すると内顆粒層の細胞の核膜の周囲にウイルス粒子の集合が多数みられ⁸⁾, ウイルスの局

在は電顕写真と免疫写真で一致していた。

感染が進行した部位を観察すると、内顆粒層に DAB の沈着が多数みられ、更に外顆粒層にも DAB の沈着がみられた。

外顆粒層の電顕観察では、一様な電子密度の核内に直径 70~100nm の低電子密度の円形構造物が数カ所見られた。前報で HSV-1 を電顕で観察すると、低電子密度の中心部に高電子密度領域を持つ比較的電子密度の低い約直径 100nm 程の二重構造物として認めた⁸⁾。このような円形構造物はその存在部位が核内であり、この構造物は一つの核に多いときは十数個観察され、対照群にはみられなかった。更に免疫染色で外顆粒層の核内に HSV-1 が存在することが証明されたことから、この構造物がウイルス粒子に関連する構造蛋白である可能性が非常に高い。HSV は成熟するまでの過程において電顕的に様々の形態をとると言われている^{20)~22)}。Holland⁷⁾も HSV-1 は内顆粒層に多く外顆粒層に少ないと報告していることから、外顆粒層におけるウイルスの成熟過程すなわち未成熟ウイルスであるために、鮮明な二重構造物がでなかったと思われた。前報にて外顆粒層にウイルス粒子が見いだせなかったものも同様の原因であると思われた。

したがって硝子体内接種された HSV-1 は、硝子体内で拡散して網膜の表面に吸着した後に Müller 細胞の基底部に侵入し、次いで内顆粒層の神経細胞に移行して、その核内で主に初期のウイルス増殖が行われると思われた。次いで周囲の内顆粒層の細胞にウイルスが移行して増殖すると同時に神経節細胞にも移行、外顆粒層にも移行して各々の部位で増殖すると思われた。

前報では電顕にてまず内顆粒層、次いで神経節細胞に HSV-1 が局在することを証明し、今回の実験では外顆粒層の細胞もウイルスに感染することがわかり、HSV-1 は Müller 細胞、内顆粒層、ついで外顆粒層及び神経節細胞の順に伝搬することを明らかにし得た。

また電顕的観察で、神経節細胞では、核内で旺盛なウイルス増殖を認めたが、著しく変性した細胞は見つからなかった。すなわち、ウイルスは増殖したが、細胞は壊死には至らなかった。これは一つの細胞から長い時間多くのウイルスを増殖放出できることになり、網膜に HSV-1 が潜伏していたという報告もあり²³⁾, 神経節細胞が持続感染に関与している可能性が示唆された。

本稿の要旨は第 91 回日本眼科学会総会(1987, 5, 14 京都)において吉岡が報告した。尚、本研究には文部省科学研究費

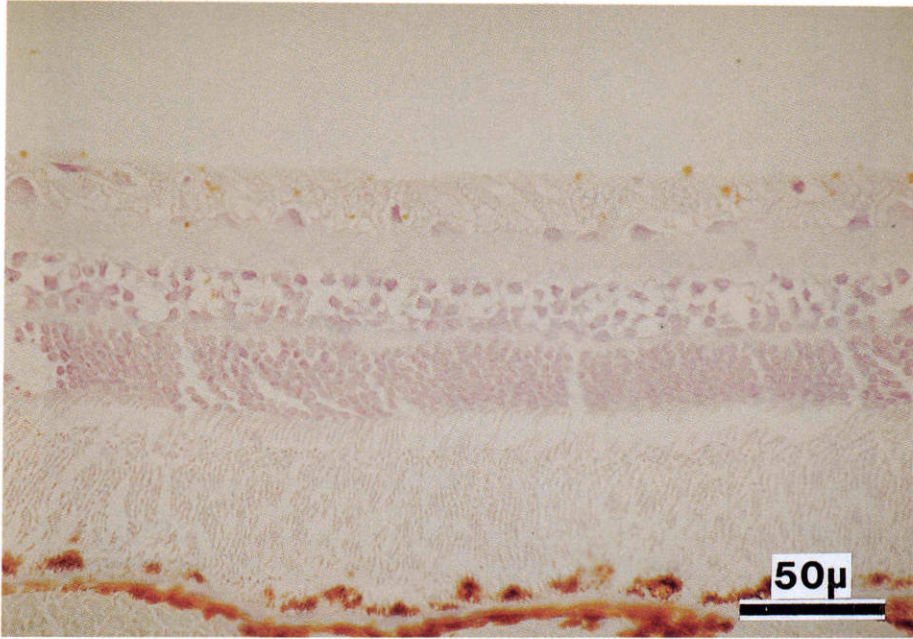


図1 接種3日, 内境界膜のすぐ下, 神経線維層にDABの沈着がみられる(光顕: ABC法及びヘマトキシリン染色, $\times 400$)

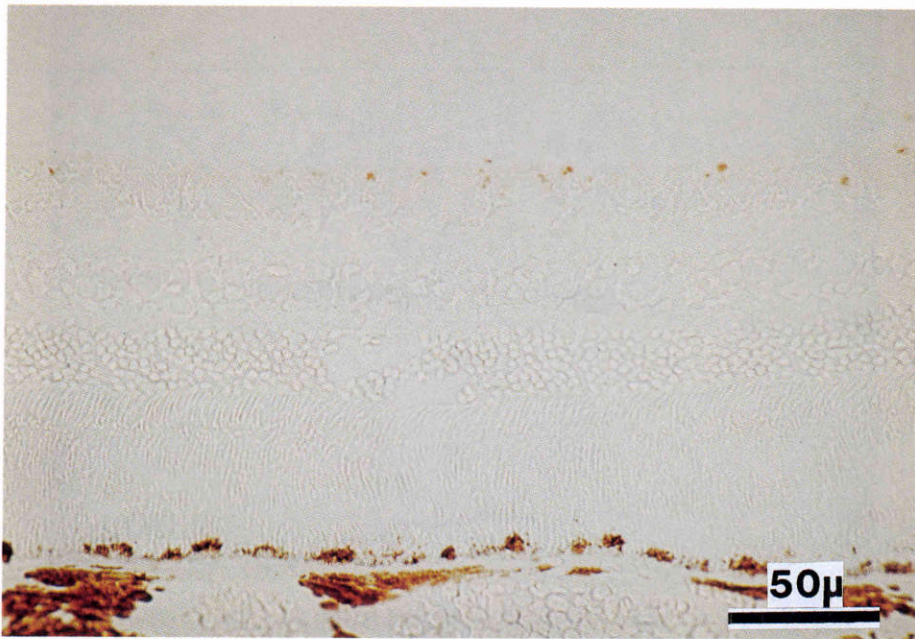


図2 接種3日, 内境界膜のすぐ下, 神経線維層のDAB沈着が一層明瞭。(光顕: ABC染色, $\times 400$)

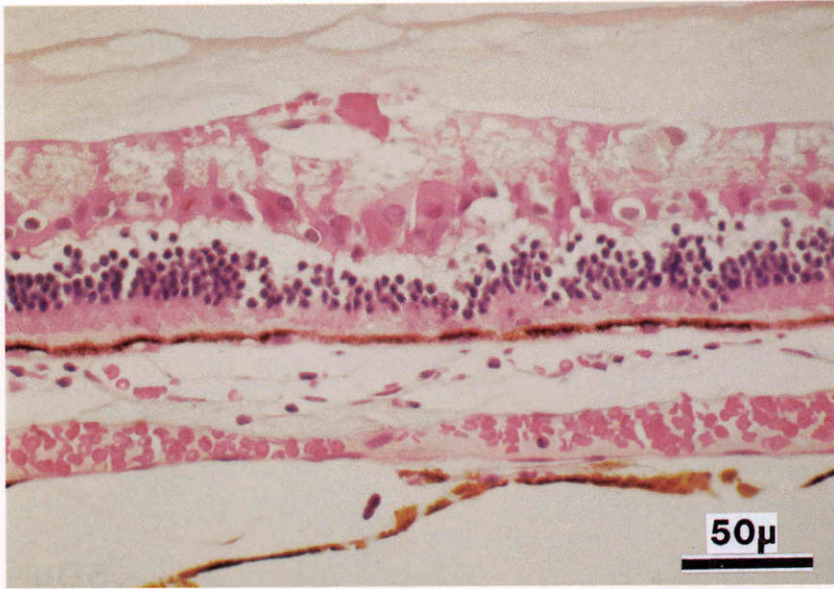


図3 接種4日後，網膜の点状滲出斑：内顆粒層の細胞の著しい膨化と核の拡大及び染色性低下がみられ，外顆粒層の配列の乱れがみられる．色素上皮には異常をみない．（光顕：H・E染色，×400）

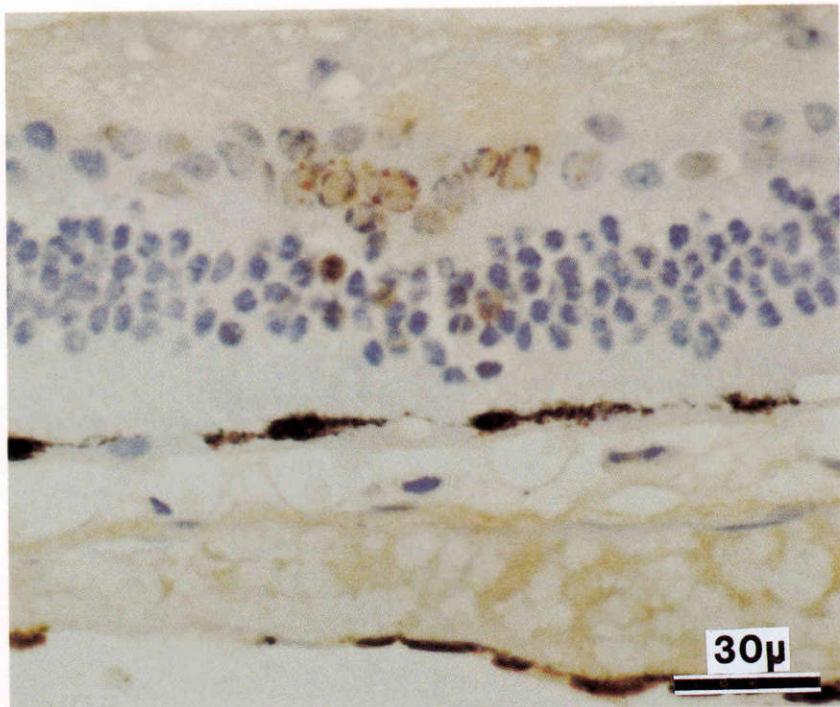


図4 接種4日後，網膜の点状滲出斑：内顆粒層の核が拡大し，染色性の低下したものに明瞭なDABの沈着がみられる．主に核膜に沿ってDABがよく沈着している．内境界膜，神経線維層にはDABの沈着はみられない．外顆粒層にもDABの沈着をみる．（光顕：ABC法及びヘマトキシリン染色，×1,200）

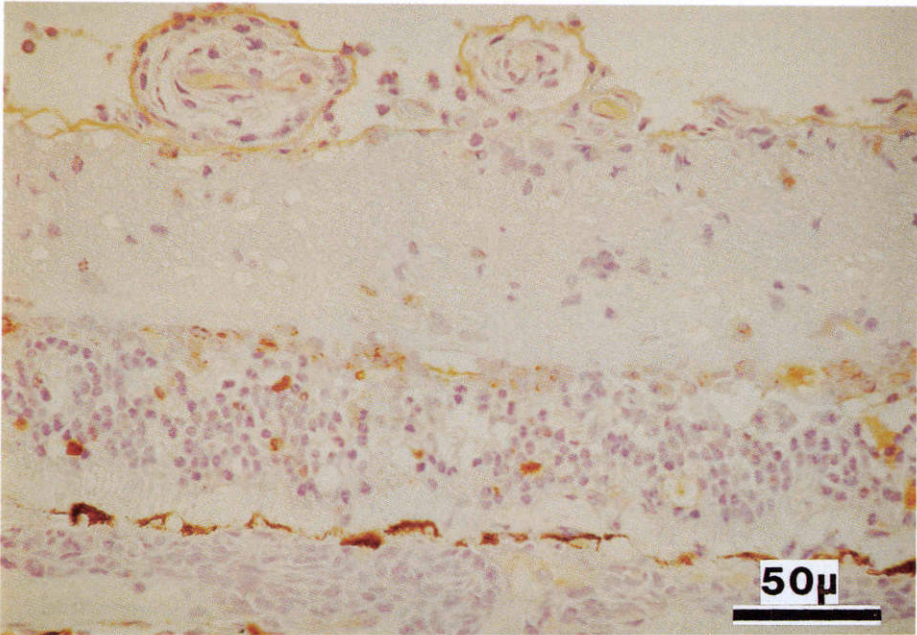


図5 接種5日，内顆粒層の核に著しいDABの沈着がみられ，外顆粒層の核内にもDABの沈着がみられる。（光顕：ABC法及びヘマトキシリン染色，×400）

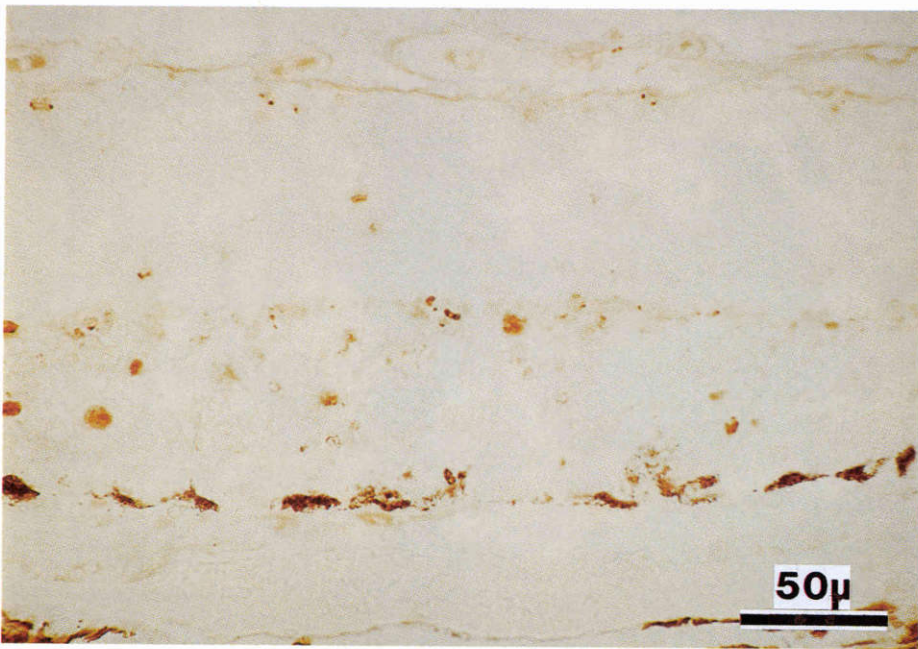


図6 接種5日，神経節細胞にもDABが沈着している。（光顕：ABC染色，×400）

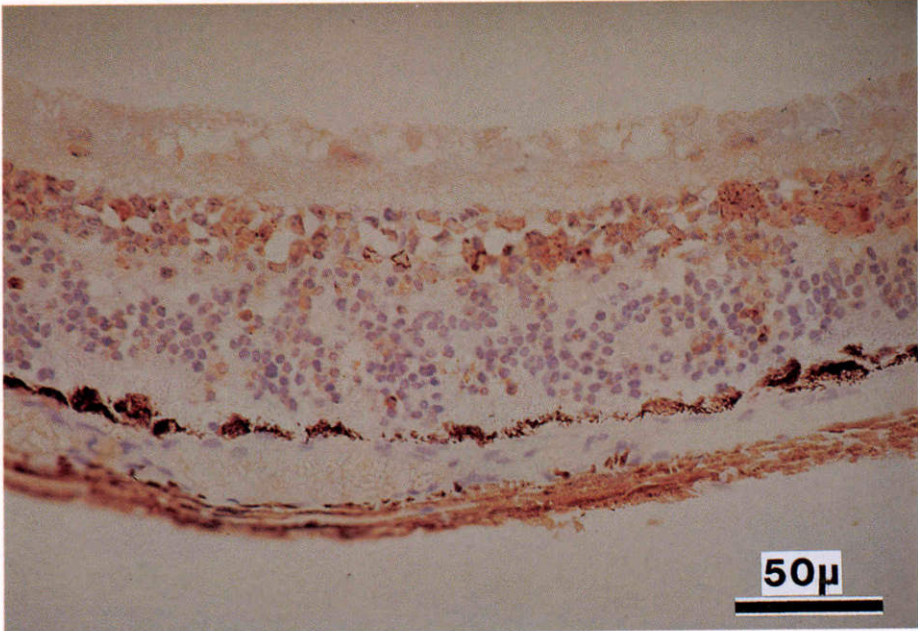


図7 接種6日，網膜の大きい滲出斑：内顆粒層及び外顆粒層の核内に強いDAB沈着を認める．（光顕：ABC法及びヘマトキシリン染色， $\times 400$ ）

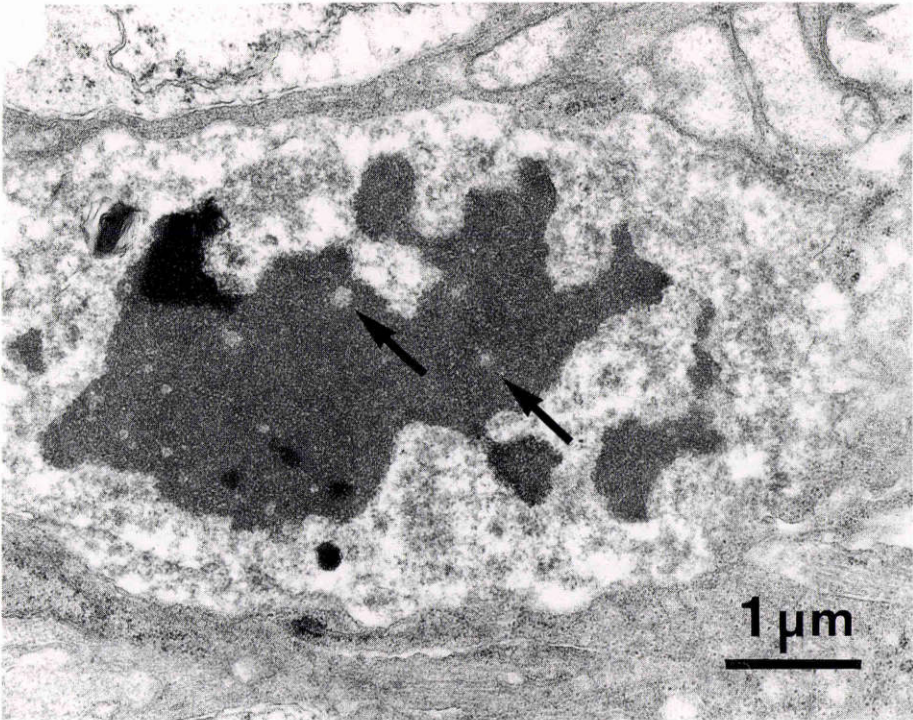


図8 接種6日，外顆粒層：一様な電子密度の核内に直径70～100nmの低電子密度の円形構造物が数カ所見られる（ $\times 23,000$ ）

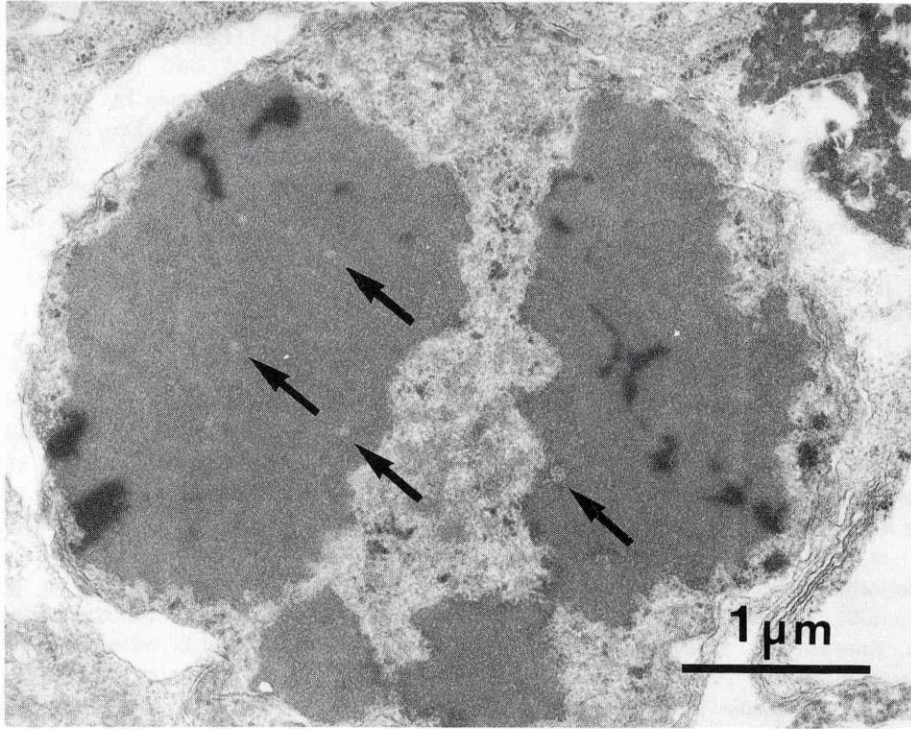


図9 接種6日, 外顆粒層: 一様な電子密度の核内に直径70~100nmの低電子密度の円形構造物が数カ所見られる。(×30,000)

(奨励研究 A61771386)の補助を受けた,ここに深謝致します。

文 献

- 1) Minckler DS, Edward B, McLean EB, et al: Herpesvirus hominis encephalitis and retinitis. Arch Ophthalmol 94: 89-95, 1976.
- 2) Pepose JS, Hilborne LH, Cancilla PA, et al: Concurrent herpes simplex and cytomegalovirus retinitis and encephalitis in the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Ophthalmology 91: 1669-1676, 1984.
- 3) Pepose JS, Kreiger AE, Tomiyasu U, et al: Immunocytologic localization of herpes simplex type 1 viral antigens in herpetic retinitis and encephalitis in an adult. Ophthalmology 92: 160-166, 1985.
- 4) 林 重伸: 単純ヘルペスウイルスによる実験的網膜炎の研究. 第1報. 硝子体腔内接種実験. 日眼会誌 84: 1715-1722, 1980.
- 5) Anderson JR, Field HJ: The development of retinitis in mice with nonfatal herpes simplex encephalitis. Neurophthal Appl Neurobiol 8: 277-287, 1982.
- 6) Peiffer RL, Dekker CD, Siegel FL: Ocular lesions in mice following intracerebral injection of herpes simplex type 1. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1070-1078, 1983.
- 7) Holland GN, Tongi, BI, Briones OC, et al: A microscopic study of herpes simplex virus retinopathy in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 1181-1190, 1987.
- 8) 吉岡正樹, 大熊 紘, 宇山昌延, 他: 単純ヘルペスウイルスによる実験的網膜炎. 第1報. 感染初期の変化. 日眼会誌 94: 367-376, 1990.
- 9) Hsu S-M, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PVP) procedures. J Histochem Cytochem 29: 577-580, 1981.
- 10) Coons AH, Leduc EH, Connolly JM: Studies on antibody production. 1. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbits. J Exp Med 102: 49-59,

- 1955.
- 11) **Nakane PK, Pierce GB**: Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol* 33: 307—318, 1967.
 - 12) **Sternberg LA, Hardy PH, Cuculis JJ**, et al: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigenantibody complex (horse-radish peroxidase—Antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315—333, 1970.
 - 13) **Huang S-N**: Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab Invest* 33: 88—95, 1975.
 - 14) **Huang S-N, Minassian H, More JD**: Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest* 35: 383—390, 1976.
 - 15) **Hed J, Enestrom S**: Detection of immune deposits in glomeruli: The masking effect on antigenicity of formalin in the presence of proteins. *J Immune Methods* 41: 57—62, 1981.
 - 16) **Curran RC, Gregory J**: The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin. *Experientia* 33: 1400—1401, 1977.
 - 17) **Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE**: *Histology of the Human Eye*. 233—256, Saunders Comp. Philadelphia, 1971.
 - 18) **柳 珍馨, 李 松熙**: 家兎眼鉄錆網膜における Müller 細胞の機能. *日眼会誌* 79: 762—771, 1975.
 - 19) **生井 浩**: グリア細胞系を中心とした網膜の病理. *日眼会誌* 78: 1245—1263, 1974.
 - 20) **Morgan C, Ellison SA, Rose HM**, et al: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. I. Herpes simplex virus. *J Exp Med* 100: 195—202, 1954.
 - 21) **Morgan C, Rose HM, Holden M**, et al: Electron microscopic observation on the development of herpes simplex virus. *J Exp Med* 110: 643—656, 1959.
 - 22) **Epstein MA**: Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells. *J Cell Biol* 12: 589—597, 1962.
 - 23) **Openshaw H**: Latency of herpes simplex virus in ocular tissue of mice. *Infect Immun* 39: 960—962, 1983.
-