

## 単純ヘルペスウイルスによる実験的網膜炎,

## 第3報 視神経の検索

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

HSV-1を家兎の左眼硝子体内に接種して、視神経の病変とウイルスの局在を酵素抗体法(ABC法)にて検索した。ABC法はパラフィン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った。接種3日には視神経に何ら変化を認めなかったが、4日には左眼視神経の篩状板後方より視交叉にわたり、視神経の長軸方向に沿う連続的な抗原陽性部位をみとめ、その周囲に炎症細胞浸潤が散在し、8日には抗原陽性部位が更に増強してびまん性に存在した。感染細胞は乏突起膠細胞と星状膠細胞と思われた。以上のことから網膜を経て視神経に侵入したウイルス粒子は、軸索内輸送によって脳に向かって視神経内を求心性に移動する途中、膠細胞に吸着、侵入し、新たに増殖したウイルスは隣接する膠細胞へ cell to cell の型で感染が伝搬すると同時に軸索に沿って脳に移動すると思われた。(日眼会誌 94:715-722, 1990)

キーワード: 単純ヘルペスウイルス1型, 視神経炎, アビシン・ビオチン法, 軸索内輸送, ウイルス局在

## Optic Nerve Finding in 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

We reported histological changes and viral localization of HSV-1 in the optic nerve by the ABC-method and electron microscopy, after intravitreal inoculation. There was neither histological change nor antigen deposition on the specimen of 3 days after inoculation. Some series of antigen-positive sites were successively found along the nerve fiber from the lamina cribrosa to the optic chiasma in the optic nerve on 4 days after inoculation. Round cell infiltration were also found around these sites, and these changes increased on the 8th day. Antigen-positive cells were mainly considered to be oligodendroglia and astrocytes. These results suggested that HSV-1 infected the optic nerve fiber via the retina. On the way to be the brain by axonal transport, they would infiltrate to the glial cells, where they could replicate and spread to neighbouring glial cells. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 715-722, 1990)

Key words: HSV-1, Optic neuritis, Avidin-Biotin method, Axonal transport, Viral localization

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17日受付, 平成2年2月1日改訂受理)

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

(Received October 17, 1989 and accepted in revised form February 1, 1990)

## I 緒 言

単純ヘルペスウイルス1型(以下 HSV-1)によって壊死性網膜炎が発生する過程を明らかにする目的で我々は実験を進めてきた。今までの実験<sup>1)2)</sup>で、硝子体内接種された HSV-1は、硝子体内から網膜の表面に吸着したのちに Müller 細胞の基底部に侵入し、ついで内顆粒層に移行して、内顆粒層の細胞で主に初期のウイルス増殖が行われ、次に神経節細胞、外顆粒層に移行して、各々の部位で増殖し、神経節細胞にて増殖したウイルスは軸索に移行することがわかった。その中で眼内炎を起こした一部の動物に脳炎様症状即ち痙攣、不随意運動を来し、死に至るものがあった。臨床的には HSV による眼内炎はヘルペス性脳炎に合併して起こることがほとんどで<sup>3)~9)</sup>実験的にも大脳に HSV-1を接種して眼内炎を発症させた報告は多くあり<sup>7)8)</sup>、また逆に眼に HSV-1を接種して脳炎が発症した実験報告<sup>9)~12)</sup>もある。そしてウイルスの伝搬経路に関しては血行伝搬<sup>5)</sup>、視神経經由<sup>6)~8)13)</sup>、後毛様神経經由<sup>14)</sup>がいられているが未だ確定的なものはない。今回は特に網膜炎を起こした後に視神経に移行する機序を明らかにする目的で視神経の観察を行った。

## II 実験方法

実験の材料及び方法は前報<sup>2)</sup>で発表したものと同様である。即ち HSV-1 Miyama 株を材料として、特に Vero 細胞に顕著な細胞変性効果を示す株を分離して、 $1.5 \times 10^8$  pfu/ml (plaque-forming unit) のウイルス浮遊液を 0.1ml、体重 2kg の雄性白色家兎 (10頭10眼) の左眼硝子体内に接種し、接種後 3日から8日までの各日に臨床的観察の上、眼球及び視交叉を含む視神経を摘出し、10%中性ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋した。また全く操作を加えなかった家兎を対照群とした (3頭3眼)。

前報<sup>2)</sup>に詳しく述べたと同様の方法、即ちトリプシン消化法を加えた Avidin-Biotin 法 (以下 ABC 法) を採用した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片をスライド上に伸展しキシロロールで脱パラフィンした後、トリプシン溶液で消化した。次いで内源性ペロキナーゼの阻止操作、非感作血清で非特異反応を除去し、一次抗体 (抗 HSV-1マウス血清) と湿室中で反応させ、二次抗体 (ビオチン化した抗マウス・ウマ血清) と反応させた。そしてペロキナーゼ標識したアビジンと反応させた後 Diaminobenzidine (DAB) 過酸化水素溶

液で発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行い、エタノールで脱水、キシロロールで透徹後、封入して顕微鏡にて観察した。

## III 結 果

### 1. 臨床的所見

接種2日より乳頭充血を認めた。接種後1~2日で毛様充血、滲出性虹彩炎が発症したが、角膜潰瘍は生じなかった。硝子体混濁が2~4日後から出現し、2~6日で網膜表層に壊死による滲出斑が観察された。

### 2. 病理組織学的所見

#### 1) 顕微鏡的観察 (免疫染色)

対照群を ABC 法及びヘマトキシリン染色の二重染色によって視神経を観察すると、髄膜と視神経内の血管は褐色に染まり、神経線維に沿って線状に配列する細胞の核がヘマトキシリンで染色されていた (図1)。

感染させた眼の視神経を観察すると接種3日には、視神経の全長に何ら変化をみなかった (図2)。4日の左視神経では、視神経の長軸方向に沿って楕円形の核内に DAB の沈着部位が多数みられ、その範囲は篩状板後方より視交叉まで存在した (図3, 4)。線状配列を取らない、円形の核を持つ細胞が抗原陽性細胞の近傍によくみられ、又抗原陽性細胞を中心に円形の核の細胞が同心円の病巣状に集まっている所が散見された (図5)。

接種6日、核内に抗原陽性反応を示す細胞、円形の核を持つ細胞が多くなり、左側の視神経の全長にびまん性にみられた。又抗原陽性細胞の大ききの不揃いがみられた。

接種8日には左視神経内に全般に抗原陽性細胞が更に増強し、円形核細胞の浸潤も強くみられた (図6)。

## IV 考 按

我々の今回の実験は、ヘルペスウイルスを家兎硝子体内に接種した後、視神経にヘルペスウイルス抗原を酵素抗体法により証明したものである。その結果、我々は眼球から脳へのヘルペスウイルスの伝搬経路は視神経經由と考えた。ヘルペスウイルスは視神経の軸索を軸索内輸送で、膠細胞を cell to cell で伝搬したと思われる。

視神経は神経節細胞の軸索である神経線維を主成分として、網膜から篩状板を通過すると髄鞘で包まれる。但しウサギでは眼内の髄鞘部からすでに有髄であり、視交叉で全部の神経線維が交差して対側へ行き、視覚

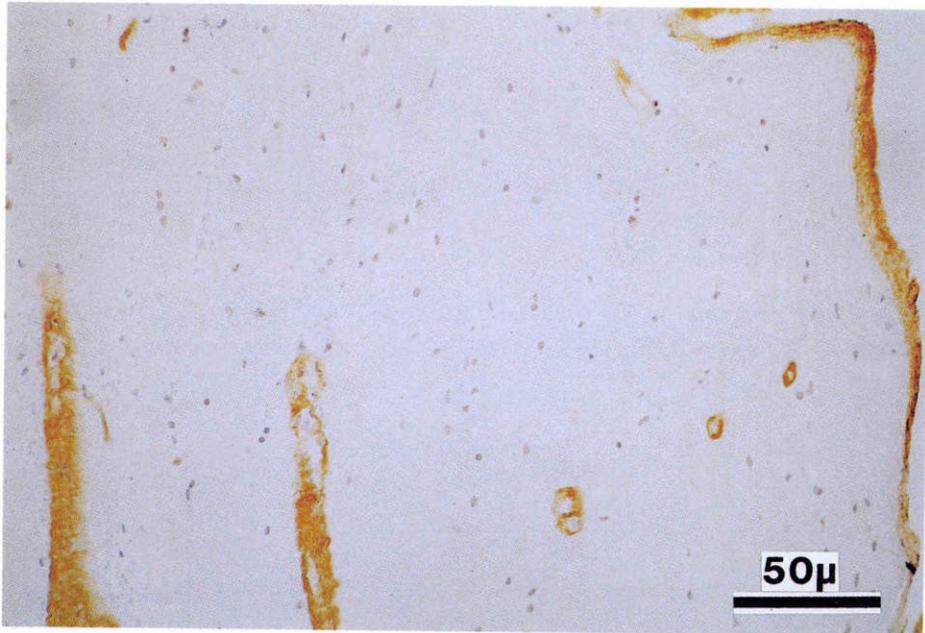


図1 対照群，図の上方が眼球側，下方が中枢側．髄膜と視神経内の血管は褐色に染まり，水平方向に走る神経線維に沿って線状に配列する細胞の核がヘマトキシリンで染色されていた．（ABC法及びヘマトキシリン染色×400）



図2 接種3日，視神経の全長に何ら変化をみなかった．（ABC法及びヘマトキシリン染色×400）

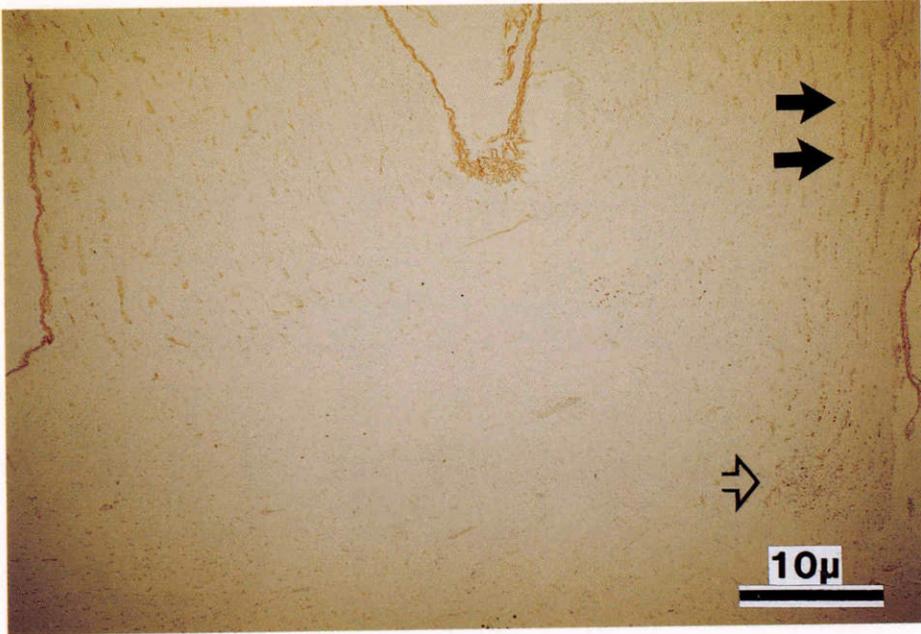


図3 接種4日, 中央が視交叉, 右上方が接種側視神経(左視神経), 左上側が非接種側の視神経(右視神経), 全体的には抗原陰性部位が多いが, 接種側視神経(図の右方)に神経の長軸方向(縦方向)に沿ってDABの沈着部位すなわち抗原陽性部位(矢印, 白抜矢印)が篩状板後方より視交叉の所まで存在した(矢印は視神経, 白抜矢印は視交叉). (ABC法及びヘマトキシリン染色×80)

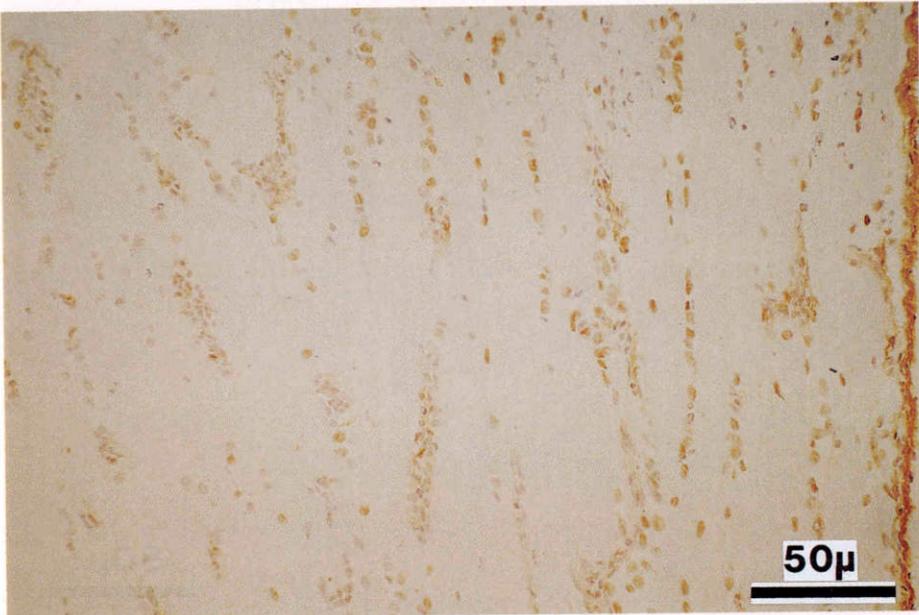


図4 図3矢印の強拡大, 神経線維の走行(縦方向)に沿って配列する細胞の核に, DABが良く沈着していた. (ABC法及びヘマトキシリン染色×400)

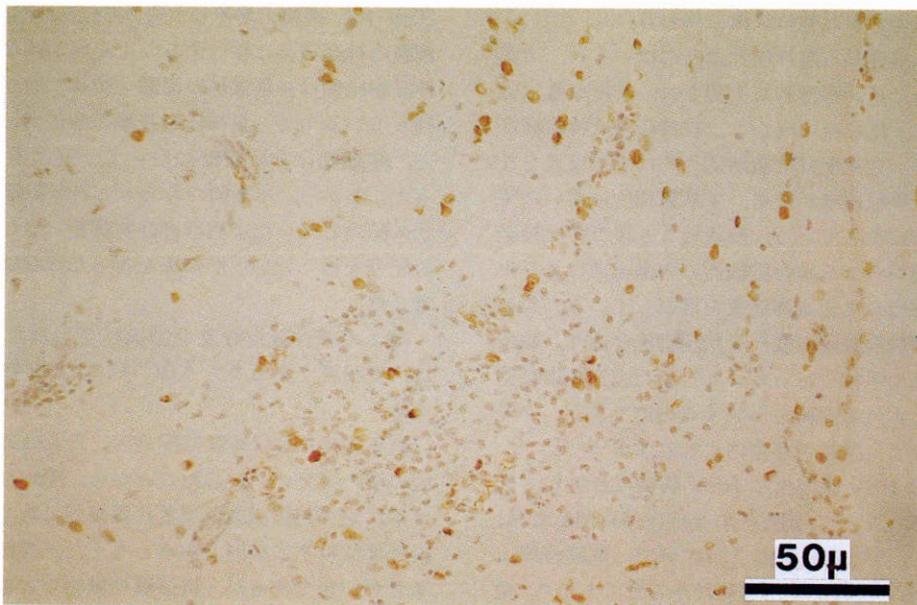


図5 図3白抜矢印の強拡大。線状配列を取らない、円形の核を持つ細胞が抗原陽性細胞の近傍によくみられ、又抗原陽性細胞を中心に円形核細胞が同心円の病巣状に集まっている所が散見された。(ABC法及びヘマトキシリン染色×400)

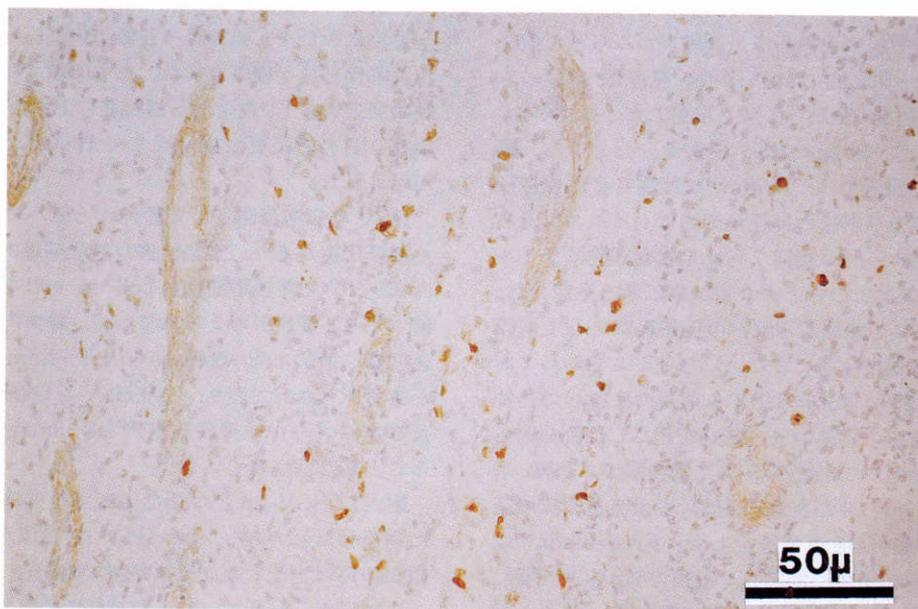


図6 接種8日、抗原陽性細胞、円形核細胞が多くなり、接種側の視神経の全長にびまん性にみられ、又抗原陽性細胞の大きさの不揃いがみられた。(ABC法及びヘマトキシリン染色×400)

路の一次中枢である外側膝状体に終わる。

視神経線維は眼球から視神経乳頭内にはいると、次第に柱状に並んだ星状膠細胞に支持され、神経線維は線維束を形成し、篩状板に向かう。視神経の支持組織は星状膠細胞で、柱状配列で横断切片では管状構造をなし、その中を神経線維が走る。星状膠細胞は互いに突起を出して結びあっている。篩状板より後方では神経線維は、軟膜からでる結合組織性の中隔組織により束状になり、平行して走る神経束を形成している。この中隔組織及び神経線維の間に星状膠細胞があり、軸索の支持と栄養の供給を行っている。また乏突起膠細胞は中枢神経における髄鞘を形成する細胞であり、中隔組織内にはなく、常に神経束内に存在する<sup>14)~17)</sup>。

臨床的には HSV 眼内炎は HSV 脳炎に合併して起こる症例がほとんどで、網膜炎の発症機序に関しては、Cogan<sup>3)</sup>は新生児の網脈絡膜炎の症例で、網脈絡膜より封入体、HSV 抗体が検出されなかったことから、免疫反応説を主張した。Minckler<sup>4)</sup>は脳炎と網膜炎の同時発症例で HSV-1 を視神経内のマクロファージ内、その他脳、網膜に検出したが、伝搬経路は不明と報告した。Cibis<sup>5)</sup>は脳炎発症の 9 日後に網膜炎を来した幼児の視神経に、HSV も炎症細胞もみられず、また網膜病巣は血管付近にあること、封入体が網膜血管内皮にみられたことなどから血行伝搬を主張した。Johnson<sup>6)</sup>は脳炎発症の 5 日後に視神経炎、網膜炎がみられた症例の病理検索で、電顕的に HSV が脳、視神経、網膜にみられ、視神経経路で脳から眼球へ伝搬したと推定した。

実験的にマウスの脳に HSV を接種したところ、眼内炎を生じた報告では、Peiffer<sup>7)</sup>は接種 6 日に視神経の星状膠細胞及び網膜の神経節細胞にウイルスを認めており、Anderson<sup>8)</sup>は接種 7 日に星状膠細胞にウイルスを認め、両者はこのことより視神経伝搬と推定した。また逆に HSV の眼球から脳への伝搬経路として角膜接種によって脳炎を起こすことは以前より知られており<sup>9)</sup>、Kimura<sup>10)</sup>は家兎に HSV を前房内接種して非接種眼の発症をみる実験中に、脳炎を起こした例を報告しており、Pettit<sup>11)</sup>は同様の実験で接種眼側の網膜、毛様体、後毛様神経、中枢神経の HSV を蛍光抗体法で証明し、後毛様神経経路を推定した。Kristensson<sup>13)</sup>は HSV-2 を家兎硝子体に接種し、電顕で HSV-2 を網膜、視神経の軸索、星状膠細胞、乏突起膠細胞、視索、対側の外側膝状体に経時的に証明し、HSV-2 の視神経伝搬を報告した。

前回までの我々の実験<sup>12)</sup>で硝子体内接種された

HSV-1 は、網膜で増殖した後、神経節細胞にて増殖し、網膜の神経線維に移行することが明かになっている。神経膠細胞は神経線維の周囲を輪状に取り巻く様に配列しているので、視神経の長軸方向に切って観察すると、膠細胞は神経線維に沿って一列に並んでみられる<sup>14)</sup>ことから、本実験でみられた神経線維に沿って線状に配列していた細胞は神経膠細胞と思われた。一定の配列を取らない円形の核を持った細胞は炎症細胞と考えた。

図 1 の視神経血管及び髄膜に見られた褐色の色調は、対照群であるので ABC 法による非特異的反応である。

抗原陽性部位は線状に配列し、それは対照群の膠細胞の核の配列に一致したことから、HSV-1 の感染部位は主に乏突起膠細胞及び星状膠細胞であり、かつ抗原陽性部位は主に核内であると考えた。膠細胞は本来大きさが一定であるが、抗原陽性細胞の大きさに不揃いが認められたのは、組織障害に対し、敏感に素早く反応して腫脹した星状膠細胞<sup>17)</sup>が ABC 法で染色されたためであると考えた。

我々の実験では、硝子体内接種して網膜に病変が発症したのは接種 4 日からであり<sup>12)</sup>、本実験に於ても接種 3 日後までは免疫染色で視神経に抗原が検出されず、接種 4 日に視神経の篩状板後方より視交叉までの全部位において、視神経の長軸方向に沿って連続的に抗原陽性部位が観察された。即ち接種 4 日に眼内の網膜に病変を生じ、網膜から視神経に HSV-1 が侵入し、接種 4 日の間に更に視交叉まで HSV-1 が達することが示された。

HSV の伝搬経路として眼球から脳へは血行伝搬<sup>18)</sup>と神経伝搬があり、神経伝搬は神経線維内を通る軸索内輸送<sup>13)19)</sup>と神経膠細胞を cell to cell で移行する経路<sup>13)20)</sup>の 2 種類が考えられている。軸索内輸送の移動速度は一般的に 50~500mm/日と 1~2mm/日の 2 種類がある<sup>21)</sup>とされており、一方 HSV-1 は実験的にマウス及びラットの中中枢神経線維内を 3~5mm/時で移動することが証明されている<sup>22)</sup>。

眼内の HSV-1 はどの様な機序で視神経内の膠細胞に到達したのであろうか。HSV-1 の眼球から脳への神経伝搬経路は上記したように軸索内輸送と cell to cell の 2 種類がいわれている。視神経での感染病巣の拡がり方を観察すると、接種 4 日において、視神経の横断面方向への拡がり部分が部分的であったのに対し、視神経の長軸方向には篩状板から視交叉に至る全長にまです

で抗原陽性であった。このことは視神経の長軸方向にウイルスが伝わりやすいことを示している。ウイルスは接種3日には視神経内にみられなかったにもかかわらず、4日には視神経の篩状板から視交叉にまでウイルスが移動したのでウイルス粒子は軸索内輸送で伝搬したと考えられた。

HSV-1が軸索内輸送で視神経内を移動したとすると、ウイルス粒子は単に視神経を軸索内輸送に乗って通過するだけであり、視神経内でウイルスの増殖は起らず、ごく微量なのでABC法によっても証明は難しく、また視神経内に炎症反応は起こらない。一方接種4日にも視神経内に病巣性に円形細胞が浸潤があり、接種6日以後になると強い炎症がおきているのが観察された。軸索から膠細胞に侵入する機序は不明であるが、軸索内輸送によって視神経内の各所に移動したウイルスはその近隣の膠細胞に侵入し、膠細胞にて増殖し、炎症を起こした。また膠細胞で増殖した後、放出されたHSV-1はcell to cellで隣接する膠細胞に移行するものと思われた。

Kristensson<sup>13)</sup>はHSV-2の眼球から脳への伝搬を軸索内輸送と膠細胞のcell to cell経由と報告している。我々の実験からは、硝子体接種されたHSV-1は接種4日に網膜で初期増殖をした後に、神経節細胞から網膜の神経線維に入り、その軸索内輸送によって視神経に侵入し、視交叉まで達する。その伝搬経路は軸索内輸送によって中枢側(脳)へ向かって移動し、途中隣接する神経膠細胞に吸着、侵入し、その核内でウイルスの増殖が行われる。膠細胞で増殖したウイルスはcell to cellの伝搬でもって隣接の神経膠細胞に伝搬する。このようにして網膜から直接来たウイルス、或は神経膠細胞から新たに放出されたウイルスは接種眼の視神経、そして視交叉に到達するのであろう。

本稿の要旨は第54回中部眼科学会総会(1988.12.3京都)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(奨励研究A61771386)の補助を受けた、ここに深謝致します。

#### 文 献

- 1) 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.
- 2) 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2報. 感染初期の酵素抗体法による検索. 日眼会誌 94: 705-714, 1990.
- 3) Cogan DG, Kuwabata T, Young GF, et al:

- Herpes simplex retinopathy in an infant. Arch Ophthalmol 72: 641-645, 1964.
- 4) Minckler DS, Edward B, McLean EB, et al: Herpesvirus hominis encephalitis and retinitis. Arch Ophthalmol 94: 89-95, 1976.
- 5) Cibis GW, Flynn JT, Davis ED: Herpes simplex retinitis. Arch Ophthalmol 96: 299-302, 1978.
- 6) Johnson BL, Wisotzkey HM: Neuroretinitis associated with herpes simplex encephalitis in an adult. Am J Ophthalmol 83: 481-489, 1977.
- 7) 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.
- 8) Anderson JR, Field HJ: The development of retinitis in mice with nonfatal herpes simplex encephalitis. Neurophthal Appl Neurobiol 8: 277-287, 1982.
- 9) Doerr R: Sitzungsberichte Gesellschaft der Schweizerischen Augenärzte Diskussion. Klin Monatsbl Augenheilkd 65: 104, 1920 cited in Scott, T.F. McN., Viral and Rickettsial Infections of Man, 2nd. Ed., 491-502, Lippincott, 1952.
- 10) Kimura SJ: Herpes simplex uveitis. Trans Am Ophthalmol Soc 60: 440-470, 1962.
- 11) Pettit TH, Kimura SJ, Uchida Y, et al: Herpes simplex uveitis: An experimental study with the fluorescein-labelled antibody technique. Invest Ophthalmol Vis Sci 4: 349-357, 1965.
- 12) 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. IV. 他眼の発病. 眼紀 32: 1371-1377, 1981.
- 13) Kristensson K, Ghetti B, Wisniewsky H: Study on the propagation of herpes simplex virus (type 2) into the brain after intraocular injection. Brain Res 69: 189-201, 1974.
- 14) 岡村良一: 視神経の解剖・組織. 三島濟一, 他編. 眼科 Mook, 30, 視神経とその疾患, 東京, 金原出版, 1-29, 1986.
- 15) Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: Histology of the Human Eye. 523-606, Saunders Comp. Philadelphia, 1971.
- 16) 千原悦夫: 視神経の軸索輸送. 三島濟一, 他編. 眼科 Mook, 30, 視神経とその疾患, 東京, 金原出版, 30-38, 1986.
- 17) 平野朝雄: 神経病理を学ぶ人のために(第2版). 140, 医学書院, 東京, 1986.
- 18) Johnson RT: Viral Infections of the Nerve System. 43-48, Raven Press Books Ltd., New

York 1982.

- 19) **Johnson RT**: Viral Infections of the Nerve System. 39-40, 111-120, Raven Press Books Ltd, New York, 1982.
- 20) **Howe JW, Narang HK, Codd AA**: Herpes simplex virus uveitis and optic neuropathy. An experimental investigation. *Trans Ophthalmol*

*Soc UK* 99: 111-116, 1979.

- 21) 月田承一郎: 神経. 橋本一成, 山元寅男(編). 人体組織学. 東京, 朝倉書店, 25-32, 1984.
- 22) **Lycke E, Kristensson K, Svennerholm B**: Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *J Gen Virol* 65: 55-64, 1984.
-