

単純ヘルペスウイルスの角膜内潜伏感染について

下村 嘉一*, 森 康子**, 井上 幸次**, 切通 彰**, 大橋 裕一**, 真鍋 禮三**

*大阪労災病院眼科, **大阪大学医学部眼科学教室

要 約

今回我々は実質型角膜ヘルペス患者における鎮静期症例の全層角膜移植時に採取できた母角膜より潜伏感染 HSV-1の検出を試みた。対象症例は、昭和59年8月から昭和63年7月までに、実質型角膜ヘルペスと診断し、活動性病変を認めない時期（鎮静期）に全層角膜移植術を施行した8症例（男3例，女5例：平均年齢42.3歳）である。磨砕後の遠心上清からウイルス（感染性ウイルス）は全く検出されず、小切後の培養上清からウイルス（潜伏感染ウイルス）が、8例中4例に検出された。角膜ヘルペスの再発に関しては、従来から **ganglion trigger theory** が支持されてきたが、上記結果から、末梢組織である角膜の HSV-1増殖が契機になって、その刺激が神経節に働く可能性もあることが示唆された（**ganglion and skin trigger theory**）。本論文は、角膜に HSV-1が潜伏感染していることをはじめて証明したものである。（日眼会誌 94：731—735, 1990）

キーワード：単純ヘルペスウイルス，潜伏感染，角膜，角膜ヘルペス，再発

Herpes Simplex Virus Latency In the Cornea

Yoshikazu Shimomura*, Yasuko Mori**, Yoshitsugu Inoue**,
Akira Kiritooshi**, Yuichi Ohashi** and Reizo Manabe**

*Eye clinic, Osaka Rosai Hospital

**Department. of Ophthalmology, Osaka University Medical School

Abstract

We tried to identify herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency in the cornea obtained at the time of penetrating keratoplasty from patients with herpetic stromal keratitis in the non-active (subsided) stage. The subject consisted of 8 patients (3 males and 5 females; average age 42.3 years) who were diagnosed as having herpetic stromal keratitis and underwent penetrating keratoplasty during a period without active lesions (subsided stage) between August, 1984 and July, 1988. No infective virus was detected in the centrifugation supernatant following each corneal homogenization. Latent virus was detected from the culture supernatant of sections of the corneas in 4 of the 8 patients. Although the ganglion trigger theory of Hill et al. has been conventionally supported as the mechanism(s) of herpetic keratitis recurrence, our results suggest that HSV-1 proliferation from latency in the cornea (peripheral tissue) might stimulate the ganglion (ganglion and skin trigger theory). The present study is the first to demonstrate HSV-1 latency in the cornea. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 731—735, 1990)

Key words: Herpes simplex virus, Latency, Cornea, Herpetic keratitis, Recurrence

別刷請求先：591 堺市長曾根町1179—3 大阪労災病院眼科 下村 嘉一
(平成元年9月27日受付，平成2年1月17日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshikazu Shimomura, M.D. Eye Clinic, Osaka Rosai Hospital
1179-3 Nagasone-cho, Sakai 591, Japan

(Received September 27, 1989 and accepted in revised form January 17, 1990)

I 緒 言

角膜ヘルペスが難治である主因の一つに、その再発性が挙げられる。一般的に角膜ヘルペスの再発の機序は、三叉神経節内に潜伏感染している HSV-1 (単純ヘルペスウイルス I 型) が何らかの誘因 (感冒, ストレス, 発熱, 紫外線など) によって再活性化し、三叉神経の軸索流に乗って角膜に到達し、角膜ヘルペスが再発すると考えられている¹⁾。

角膜ヘルペスの再発においては、Hill ら²⁾が提唱した Ganglion trigger theory が一般的には支持されているが、近年彼ら³⁾は Ganglion and skin trigger theory を唱え、本説が Ganglion trigger theory に比し、よりヘルペス再発の臨床経過を説明するのに適していると提言している。

何れの説が角膜ヘルペスの再発機序を的確に説明できるかを知る目的で、今回我々は鎮静期にある実質型角膜ヘルペス患者を全層角膜移植した時に採取できた母角膜より潜伏感染している HSV-1 の検出を試みた。

II 対象症例と方法

1. 対象症例

昭和59年8月から昭和63年7月までに、大阪大学あるいは大阪労災病院眼科において、実質型角膜ヘルペスと診断し、活動性病変を認めない時期 (鎮静期) に全層角膜移植術を施行した8症例 (男3例, 女5例: 平均年齢42.3歳) を対象とした。

2. 角膜内潜伏ウイルスの検出方法

全層角膜移植術時に得られた母角膜片より、以下の方法で感染性ウイルスおよび潜伏感染ウイルスを検出した。

1) 感受性細胞

60mm dish に単層培養した VERO 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞由来) を使用した。

2) 母角膜の処置

得られた母角膜片の混濁病変を等分するように、清潔尖刃にて母角膜片を2分割した。

一片の角膜をホモゲナイザーにて磨砕し、乳化した角膜片に MEM (minimum essential medium) を1ml 添加し、遠心分離 (1,500rpm, 15分) を行った。遠心上清0.5ml を感受性細胞に1時間吸着培養した後、5% fetal calf serum 添加 MEM を4.5ml 添加し、10日間培養した (感染性ウイルスの検出)。

他片の角膜は小切し、5% fetal calf serum を添加

した MEM 2ml を挿入した12well 中に、この小切角膜を設置した。4日、7日、10日、14日に培養上清を交換し、各上清0.5ml を感受性細胞に1時間吸着培養した後、5% fetal calf serum 添加 MEM を4.5ml 添加し、10日間培養した (in vitro reactivation, 潜伏感染ウイルスの検出)。

3) 細胞変性効果の観察

10日間の培養中、経時的に実体顕微鏡にて HSV-1 特異的細胞変性効果 (図1) を観察し、細胞変性効果が50%に到達した時点で、 -80°C にて凍結保存した。

4) HSV-1 の同定方法

凍結保存した細胞を融解後、抗 HSV-1 マウスモノクローナル抗体と FITC-conjugated 抗マウス IgG (Cappel Laboratories) を用いた間接蛍抗体法にて HSV-1 と同定した (図2)。

3. 症例

以下に代表的な症例を呈示する。

症例: 43歳, 女性。

初診: 昭和58年7月14日

主訴: 左眼視力障害。

病歴: 昭和52年、近医にて角膜ヘルペスと診断された。1年に数回のヘルペス再発を経験し、精査の目的で、大阪大学眼科を紹介された。上皮型 (樹枝状角膜炎) + 実質型角膜ヘルペスと診断され、ACV 眼軟膏、抗生剤で上皮病変を治癒させた後、ステロイド剤の点眼を追加して、4週後実質病変も治癒した。その後、経過を観察していたが、視力が回復しないので、昭和59年12月13日全層角膜移植術を施行した。なお、角膜移植術時、投与薬剤はなかった。術後視力は1.0まで回復した (術後1年)。

既往歴: 口唇ヘルペス。

家族歴: 特記すべき事なし。

角膜移植術を受ける鎮静時における所見 (昭和59年10月3日): 右視力1.0, 左視力0.05 (n.c.), 右眼圧15mmHg, 左眼圧16mmHg。角膜知覚はクッシュ・ボーンの角膜知覚計にて右60mm, 左30mm と左角膜知覚が低下していた。前眼部所見は図3に示すように、輪部より血管侵入を伴うものの、角質実質浮腫を認めず、壊死性角膜炎の鎮静期状態であった。眼底および眼球運動などには異常所見を認めなかった。

角膜移植時に切除した母角膜を用いて、上記方法によりウイルス検索した結果、感染性ウイルスは検出されず、潜伏感染ウイルスは検出された (表1)。

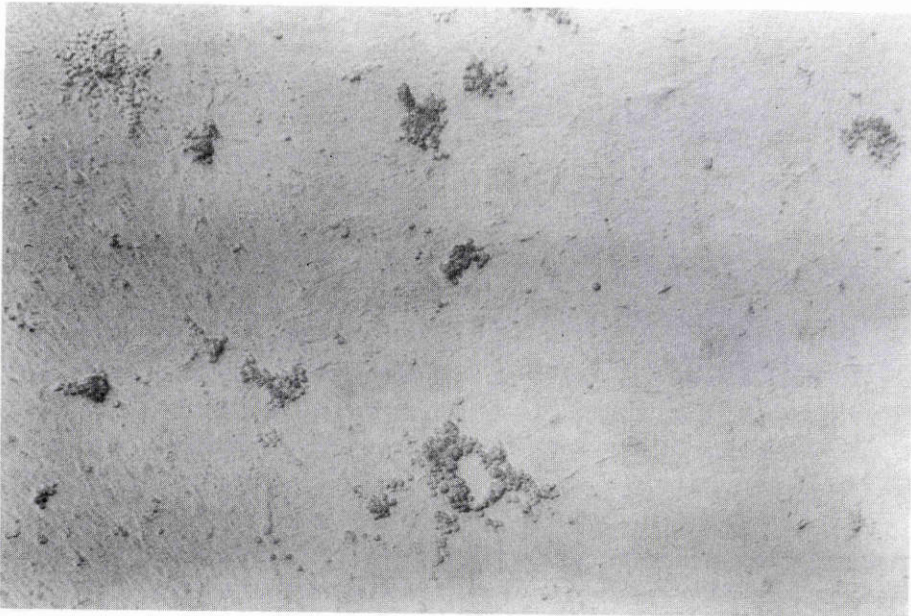


図1 感受性細胞は VERO 細胞, 拡大凝集化している細胞群が HSV-1の特異的細胞変性効果である。(×100)

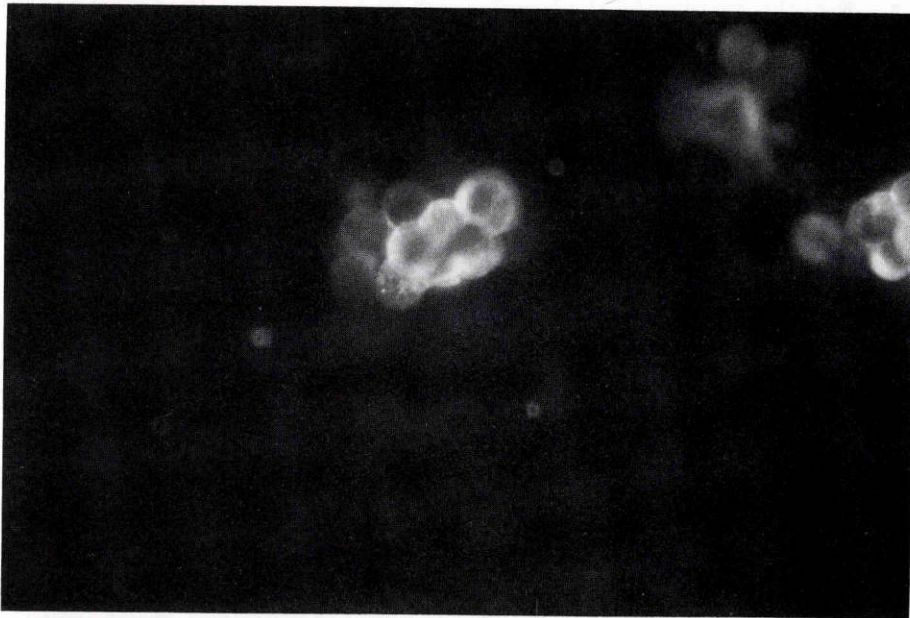


図2 凍結保存した細胞を融解後, 抗 HSV-1マウスモノクローナル抗体と FITC-conjugated 抗マウス IgG を用いた間接蛍光抗体法によって HSV-1と同定した。(×400)

III 結果

今回の結果を表1にまとめた。全例、大阪大学ある

いは大阪労災病院眼科にて樹枝状角膜炎を観察したか、ウイルス分離により角膜ヘルペスと診断し得た症例で、全例壊死性角膜炎の鎮静期であった。

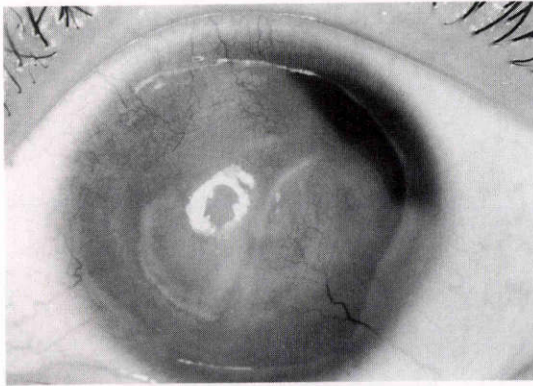


図3 呈示症例の前眼部写真。輪部より血管侵入を伴うものの、角膜実質浮腫を認めず、壊死性角膜炎の鎮静期状態であった。

表1 鎮静期実質型角膜ヘルペス症例における母角膜からのウイルス分離について

| 症例 | 年齢 | 性 | 最後の再発から | 磨砕後の遠心上清 | 小切後の培養上清 | 培養上清の陽性日 |
|----|----|---|---------|----------|----------|----------|
| 1 | 43 | 女 | 17カ月 | - | + | 10 |
| 2 | 10 | 女 | 46 | - | + | 7 |
| 3 | 64 | 女 | 35 | - | - | |
| 4 | 70 | 女 | 31 | - | - | |
| 5 | 40 | 男 | 30 | - | - | |
| 6 | 39 | 女 | 18 | - | + | 10 |
| 7 | 40 | 男 | 28 | - | + | 7 10 |
| 8 | 32 | 男 | 25 | - | - | |

最後の実質型角膜ヘルペスの再発から角膜移植までの平均期間は29カ月（17～46カ月）であった。

磨砕後の遠心上清からウイルス（感染性ウイルス）は全く検出されず、小切後の培養上清からウイルス（潜伏感染ウイルス）は、8例中4例に検出された（表1）。検出例と非検出例における最後の角膜ヘルペスの再発から角膜移植までの平均期間は、各々27.3カ月と30.3カ月で両者の間に差を認めなかった。

ウイルスが分離できた培養上清の角膜小切後の作成日時は、症例1、6が10日目、症例2が7日目、症例7が7及び10日目であった（表1）。なお、HSV-1特異的細胞変性効果が50%認められた培養後の日数は症例1、2および症例7の7日目の標本が4日目、症例6が6日目、症例7の10日目の標本が5日目であった。

IV 考 按

未だ、HSV-1の潜伏感染に関する明確な病態は解明

されていないが、ヘルペスウイルスの潜伏感染の定義として、Stevens⁹⁾は「急性ウイルス感染症の鎮静期において、通常のウイルス学的手法ではウイルスを検出できない状態で、この期間ウイルスはある種の非増殖型として生体内に存在する」と提唱しており、さらに、実験学的には以下のように一般的に定義されている⁹⁾。

潜伏部位と推定される組織をホモゲナイズして、HSV-1に対する高感受性を有する細胞に接種してもウイルスが検出されないが、組織を摘出して、感受性細胞と長時間（2時間以上）共生培養すると、ウイルスが検出される。換言すれば、ウイルスの検出が組織のhomogenateでは陰性で、explantでは陽性であるという2つの条件を満たせば、当該組織にHSV-1が潜伏していることになる。

今回、共生培養を施行せずに、採取組織を培養し、経時的に培養上清を採取し、上清からウイルスを分離したが、このin vitro reactivation法は共生培養と同様の意義があると考えられている。

さて、上記定義（homogenateでは陰性で、explantで陽性）に基づけば、移植時に得られた母角膜より、HSV-1の分離を試みてみているBristolの一派^{6)~8)}は角膜より真に潜伏HSV-1を証明したことにはならない。なぜなら、彼らの場合、採取角膜より感染性ウイルスが存在していないことを確認していないからである。Eastyら⁸⁾は34例の角膜ヘルペス患者の移植片から10例（29.4%）においてウイルスを分離しているが、移植片から感染性ウイルスの検出を試みていない。

今回、鎮静期における実質型角膜ヘルペスの角膜より、感染性ウイルスは検出されず、潜伏HSV-1を分離し得た。即ち、臨床的に角膜より潜伏HSV-1を証明したのは、本報告がはじめてである。

従来、実質型角膜ヘルペスよりウイルスが分離できたという報告⁹⁾¹⁰⁾が見られるが、Bristolの一派^{6)~8)}の報告以外、残りはすべて急性期における実質型角膜ヘルペスの涙液より分離されている⁹⁾¹⁰⁾ので、これらはすべて感染性ウイルスである。

今回の報告と同様に、移植時に採取した角膜よりのHSV-1の分離の試みはHoganら¹¹⁾やDawsonら¹²⁾によって試みられている。Hoganら¹¹⁾は感受性細胞として、家兎角膜や卵黄囊を用いて19例の母角膜についてウイルス分離を試みているが、ウイルスは分離不能であった。培養条件などの詳しいデータが記載されていないが、恐らくin vitro reactivationが不十分であっ

た為かと思われる。Dawson ら¹²⁾は16例中4例の母角膜に、電顕にてウイルス粒子を確認しているが、対象例全例が角膜移植時ステロイドを投与しなければならぬ程の炎症期の実質型角膜ヘルペスであり、鎮静期の症例については検討されていない。

従来、角膜ヘルペスにおいて、HSV-1の潜伏感染部位として、三叉神経節¹³⁾¹⁴⁾、上頸部交感神経節¹⁵⁾、迷走神経節¹⁵⁾、中脳¹⁶⁾などが挙げられてきたが、今回はじめて、眼科領域では末梢組織である角膜においてHSV-1が潜伏感染していることが証明された。

角膜ヘルペスの再発に関して、従来からHill ら²⁾が提唱しているganglion trigger theoryが支持されてきたが、今回の結果から、末梢に潜伏しているHSV-1の増殖が契機になって、その刺激が神経節に働く可能性もあることが示唆された(ganglion and skin trigger theory³⁾)。事実、HSV-1が角膜内に潜伏感染していると仮定して、潜伏感染角膜を角膜移植によって、新しい非潜伏感染角膜に交換することにより、その後のヘルペス再発が抑制されることが判明している¹⁷⁾。さらに、家兎を用いた実験で、眼局所のエピネフリンの薬剤効果を増強することにより、涙液中HSV-1再活性化能を高めることが証明されており¹⁸⁾、これら事象を考え併せると、角膜ヘルペス再発において、ganglion and skin trigger theoryが支持されるのではないかと考える³⁾。

文 献

- 1) 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.
- 2) Hill TJ, Blyth WA: An alternative theory of herpes simplex recurrence and a possible role for prostaglandins. *Lancet* i: 397—399, 1976.
- 3) Hill TJ: Mechanisms involved in recurrent herpes simplex, In Nahmias AJ, Dowdle WR, Schinazi RF (eds): *The Human Herpesviruses: An Interdisciplinary Perspective*, New York, Elsevier/North-Holland, 241—244, 1981.
- 4) Stevens JG: Latent characteristics of selected herpesviruses. *Adv Cancer Res* 26: 227—256, 1977.
- 5) 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.
- 6) Shimeld C, Tullo AB, Easty DL, et al: Isolation of herpes simplex virus from the cornea in chronic stromal keratitis. *Br J Ophthalmol* 66: 643—647, 1982.
- 7) Tullo AB, Easty DL, Shimeld C, et al: Isolation of herpes simplex virus from corneal discs of patients with chronic stromal keratitis. *Trans Ophthalmol Soc UK* 104: 159—165, 1985.
- 8) Easty DL, Shimeld C, Claoue CMP, et al: Herpes simplex virus isolation in chronic stromal keratitis: Human and laboratory studies. *Curr Eye Res* 6: 69—74, 1987.
- 9) Hanna L, Jawetz E, Coleman VR: Studies on herpes simplex. VIII. The significance of isolating herpes simplex virus from the eye. *Am J Ophthalmol* 43: 126—131, 1957.
- 10) Sanitato JJ, Asbell PA, Varnell ED, et al: Acyclovir in the treatment of herpetic stromal disease. *Am J Ophthalmol* 98: 537—547, 1984.
- 11) Hogan MJ, Kimura SJ, Thygeson P: Pathology of herpes simplex kerato-iritis. *Am J Ophthalmol* 57: 551—564, 1964.
- 12) Dawson C, Togni B, Moore TE: Structural changes in chronic herpetic keratitis. *Arch Ophthalmol* 79: 740—747, 1968.
- 13) Bastian FO, Rabson AS, Yee GL, et al: Herpesvirus hominis: Isolation from human trigeminal ganglia. *Science* 178: 306—307, 1972.
- 14) Baringer JR, Swoveland PS: Recovery of herpes simplex virus from human trigeminal ganglions. *N Engl J Med* 288: 648—650, 1973.
- 15) Warren KG, Brown SM, Wroblewska Z, et al: Isolation of latent herpes simplex virus from the superior cervical and vagus ganglions of human beings. *N Eng J Med* 298: 1068—1069, 1978.
- 16) Warren KG, Marusyk RG, Lewis ME, et al: Recovery of latent herpes simplex virus from human trigeminal nerve roots. *Arch Virol* 73: 85—89, 1982.
- 17) 下村嘉一: ヘルペス性角膜炎の病態と治療。臨床とウイルス 14(増刊): S37—S41, 1986.
- 18) Shimomura Y, Gangarosa LPSr, Kataoka M, et al: HSV-1 shedding by iontophoresis of 6-hydroxydopamine followed by topical epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1588—1594, 1983.