

マウス角膜ヘルペスの再発に関する実験的研究

三井啓司

横浜市立大学医学部眼科学教室

要約

角膜ヘルペスの再発機序解明の一助としてマウスの実験的角膜ヘルペスが再発病変を起こすか否かを検討した。まず、単純ヘルペスウイルス (HSV) I型による初感染角膜炎を経過し透明治癒したマウス角膜に、再発性の上皮性病変が起こるか否かを調べた。その結果、C57BL/6マウスに HSV-I型天方株 (強毒性) を接種した群では、接種後50日目までに45匹90眼中、9匹10眼 (11%) に再発病変が認められた。ddy マウスに HSV-I型 Ska 株 (弱毒性) を接種した群では、接種後50日目までに58匹116眼中、15匹17眼 (15%) に再発病変が認められた。再発病変は点状ないし樹枝状 (不規則線状) であり、再発病変の持続期間は1日が最も多く最長7日間であった。次に、再発病変を起こした摘出眼球に蛍光抗体染色直接法を施し、ウイルス抗原を検索した。その結果、8眼中5眼 (63%) に陽性の所見を得た。特異蛍光はいずれも角膜上皮細胞層に局限したものであった。以上によりマウスの実験的角膜ヘルペスは再発病変を起こすことが明らかにされた。(日眼会誌 95: 530-537, 1991)

キーワード: 角膜ヘルペス, 再発, 動物モデル, マウス, 蛍光抗体法

Recurrent Herpetic Keratitis in Mice

Keiji Mitsui

Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

Abstract

In order to investigate the mechanism of recurrence in herpes simplex keratitis, it is very important to establish an animal model. As a first step, mice were examined with the slit-lamp biomicroscope to determine whether they spontaneously showed recurrent epithelial keratitis after healing of primary herpetic keratitis. Among 90 eyes of 45 inbred C57BL/6 mice, recurrent epithelial keratitis stained with fluorescein was observed in 10 eyes of 9 mice during the observation period up to 50 days after the primary corneal infection with herpes simplex virus (HSV) type I Amakata strain (virulent strain). Recurrent epithelial keratitis was observed in 17 eyes of 15 mice among 116 eyes of 58 ddy mice infected with HSV-I Ska strain (avirulent strain). The epithelial lesions showed punctate or dendritic patterns and continued for one to 7 days. HSV antigen was detected by the fluorescent antibody technique in the cornea of 5 out of 8 eyes which showed recurrent epithelial keratitis using another ddy mice group tested. It was limited in the epithelium of the cornea. These results show that mice herpetic keratitis recurs spontaneously. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 530-537, 1991)

Key words: Herpes simplex keratitis, Recurrence, Animal model, Mouse, Fluorescent antibody technique

別刷請求先: 232 横浜市南区浦舟町3-46 横浜市立大学医学部眼科学教室 三井 啓司
(平成2年3月23日受付, 平成2年11月14日改訂受理)

Reprint requests to: Keiji Mitsui, M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine.

3-46 Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama 232, Japan

(Received March 23, 1990 and accepted in revised form November 14, 1990)

I 緒 言

角膜ヘルペスは再発性の高い疾患^{1)~5)}であり、その感染病理の一つとしての再発機序を解明することは、本症を根治させるために極めて重要である。従来よりウサギが実験動物として使用されてきた^{6)~10)}が、再発機序の解析にあたり、宿主の免疫能、特に本症に大きなかわりをもつ細胞性免疫能について検討を加えるためには、マウスを角膜ヘルペス再発の動物モデルとして使用できれば極めて有用¹¹⁾¹²⁾である。

今回、その基礎的情報を得ることを目的として実験を行った。すなわち、マウス実験的角膜ヘルペスの初感染角膜病変が透明治癒したマウスを対象にして、角膜に再発病変が起こるか否かを、生体顕微鏡を用いて調べた。また、角膜に見られた再発病変について、蛍光抗体染色直接法によりウイルス抗原の検出を試みた。

II 実験方法

1. 実験1

マウス両眼角膜に単純ヘルペスウイルス (HSV) I 型を接種し、初感染角膜病変を観察した。接種14日目に、両眼角膜が透明治癒しかつ眼瞼炎などの皮膚病変を伴わないマウスを選別し、観察対象とした。以後36日間連日、生体顕微鏡を用い角膜に再発病変が起こるか否かを観察した。

1) 実験動物：C57BL/6マウス、9週齢雄104匹および ddy マウス、9週齢雄102匹を用いた。

2) ウイルス：HSV-I 型天方株および HSV-I 型 Ska 株を用いた。HSV-I 型天方株は角膜ヘルペス患者より分離され、発育鶏卵、Hela 細胞、Vero 細胞に継代されたもので、感染 Vero 細胞の培養液を3回凍結融解し遠沈した後、上清を角膜接種に用いた。感染力価は 4.0×10^7 PFU/ml であった。HSV-I 型 Ska 株は本学公衆衛生学教室より分与されたもので、Vero 細胞に何代にもわたり継代されてきた HSV-I 型の弱毒株であり、その感染力価は 2.0×10^7 PFU/ml であった。

なお、天方株と Ska 株の生体に及ぼす毒性を比較する目的で、両ウイルス液を各々10匹ずつの ddy マウス、9週齢雄の両眼角膜に接種した所、図1の様な結果を得た。すなわち、Ska 株を接種した ddy マウスは、14日目まで1匹も死亡しなかったのに対し、天方株を接種した ddy マウスは、6日目より死亡例が出現し14日目の生存率は30%であった。

3) ウイルス接種法：10%ペントバルビタール液(ネンブタール®)をマウス腹腔内に0.01ml/g 投与して麻醉し、生体顕微鏡下で30ゲージ注射針を用い、角膜に縦・横それぞれ三条のわずかに角膜実質にとどく程度の創をつくり、ウイルス液を滴下して接種した。この際、C57BL/6マウスには HSV-I 型天方株を、ddy マウスには HSV-I 型 Ska 株を各々接種した。

4) 角膜臨床所見の観察：1%フルオレセイン液で角膜を染色し、生体顕微鏡を用いて行った。病像の写真撮影に際しては、1%メチレンブルー液により角膜を染色した。

2. 実験2

ddy マウス、9週齢雄84匹の両眼角膜に創をつくり、HSV-I 型 Ska 株を接種した。全例に接種後2~3日目より樹枝状ないし地図状角膜潰瘍が発症し、5~11日目には治癒した。

接種14日目に、両眼角膜が透明治癒しかつ眼瞼炎などの皮膚病変を伴わない46匹を選別し、観察対象とした。以後36日間連日、生体顕微鏡を用い再発病変の有無を観察した。再発病変を認めた場合には、マウスを殺してその眼球を摘出した。摘出した眼球は、直ちにドライアイスとアセトン中に冷置した n-ヘキサン中に入れて急速に凍結させた後、 -70°C の冷凍庫中に保存した。

1~3カ月後、ドライアイス上で凍結した眼球から角膜を切り出し、10%ゼラチンで包埋し、コールドミクロトームで約 $10\mu\text{m}$ の厚さの連続切片をつくった。切片はアセトンで10分間固定した後、蛍光抗体染色直接法により染色した。FITC (Fluorescein isothiocyanate) 標識抗体は、HSV-I 型で高度に免疫したウサギの血清から、 γ -グロブリン分画を精製し、これに FITC を標識して作製した。蛍光抗体直接法用(デンカ生研社)を使用した。予備実験により得られた力価は、PBS 希釈液による二倍階段希釈で8倍まであり、本実験では4倍希釈を用いた。37°C で1時間反応させた後、標本を PBS 液で十分に洗浄し乾燥後、緩衝グリセリン液で封入し、蛍光顕微鏡にて鏡検した。なお阻止試験を行い、蛍光が抑制される特異性を確認した。

III 実験結果

1. 実験1

1) C57BL/6マウスに HSV-I 型天方株を接種した群では、全例ともウイルス接種後、1~3日目に樹枝状ないし地図状の初感染病変が起こり、6~12日目に

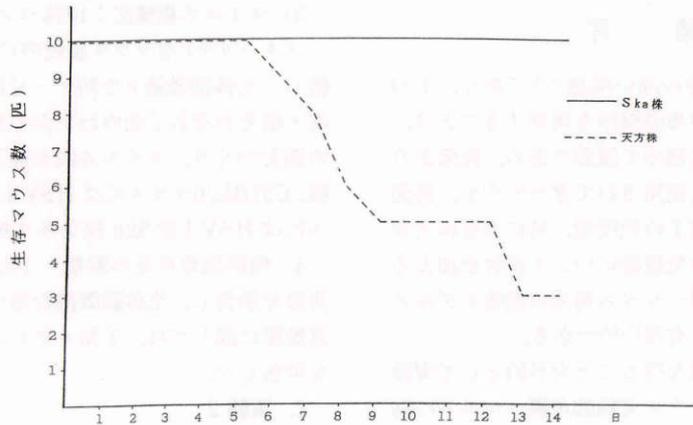


図1 HSV接種後の ddy マウス生存数の経時的変化.

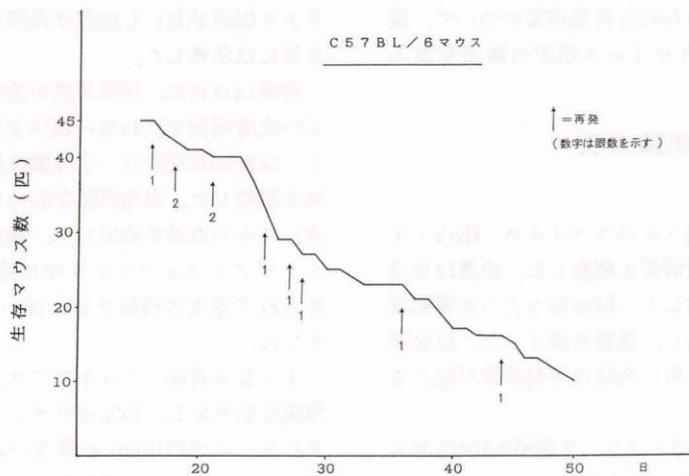


図2 C57BL/6マウス生存数の経時的変化と再発時期.

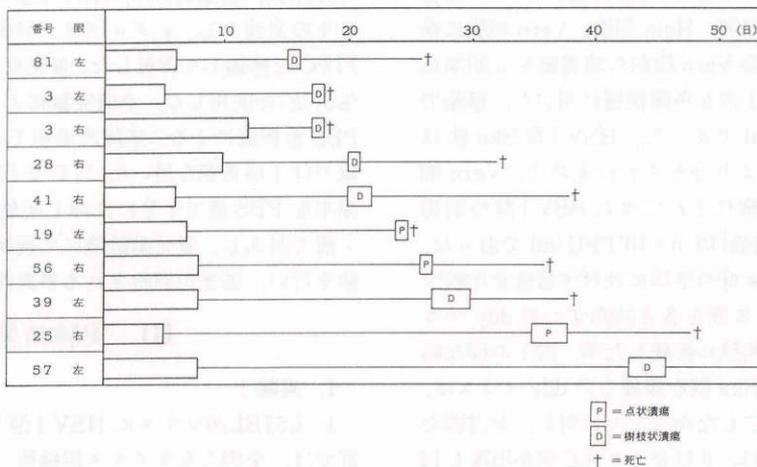


図3 C57BL/6マウスの初感染及び再発の様相.

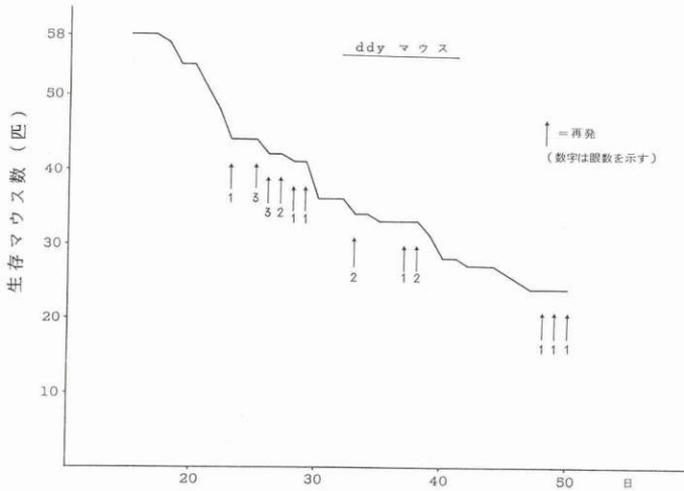


図4 ddy マウス生存数の経時的変化と再発時期.

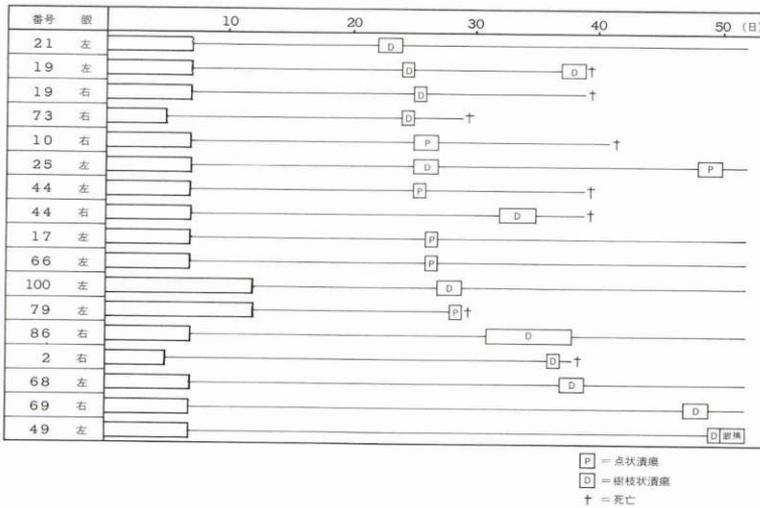


図5 ddy マウスの初感染及び再発の様相.

は治癒した。14日目に両眼角膜が透明治癒し、かつ眼瞼炎などの皮膚病変を伴わない45匹90眼を選別した。これを観察対象として以後36日間連日観察した結果、9匹10眼（11%）に再発病変を認めた。再発病日はウイルス接相後16~43日目であり、再発病変の持続期間は1~3日間であった。再発病像は点状3例、樹枝状（不規則線状）7例であった。なおマウスは経過中脳炎により死亡し、50日目の生存数は10匹（22%）であった（図2, 3）。

2) ddy マウスに HSV-I 型 Ska 株を接種した群では、全例ともウイルス接種後1~3日目に樹枝状ない

し地図状の初感染病変が起こり5~11日目には治癒した。14日目に両眼角膜が透明治癒しかつ眼瞼炎などの皮膚病変を伴わない58匹116眼を選別した。これを観察対象として以後36日間連日観察した結果、15匹17眼（15%）に再発病変を認めた。再発病日は23~49日目であり、再発病変の持続期間は1日が多く、最長7日間であった。同一眼に2度再発病変を起こしたものが2眼あり、再発病像は点状6例、樹枝状（不規則線状）13例であった。マウスは経過中脳炎により死亡し、50日目の生存数は24匹（41%）であった（図4, 5）。

なお、49日目に樹枝状の再発病変を示した No. 49マ

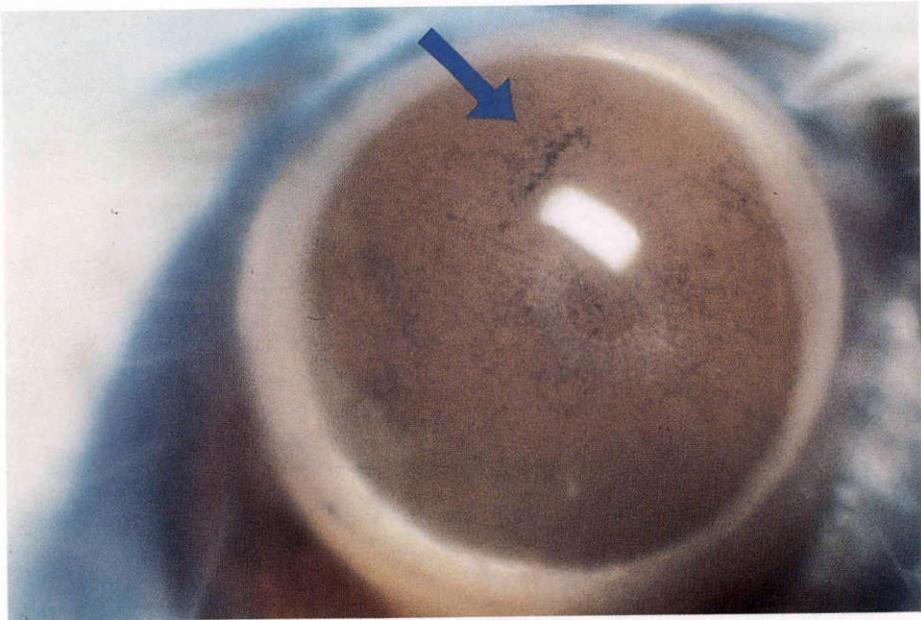


図6 ddy マウスに認められた樹枝状（不規則線状）の再発病変を矢印にて示した。
1%メチレンブルー液により角膜を染色した（×25）。

マウス番号	眼	10	20	30	40	50 (日)
40	右			D		
21	右			D		
43	左			D		
12	左			D		
31	左			D		
19	左			D		
24	右			D		
24	右			D		
36	右			D		
49	左			D		
70	右					D

D = 樹枝状潰瘍

図7 実験2の ddy マウス初感染及び再発の様相。

ウスの左眼は、眼球摘出し凍結標本とした後、ドライアイス上で角膜を切り出し、病変部の切片について蛍光抗体染色直接法によりウイルス抗原を検索した。この結果、角膜上皮内に蛍光陽性所見を見いだした。

2. 実験2

46匹92眼の対象マウスのうち、11眼（12%）に樹枝状（不規則線状）のフルオレセインに染まる上皮性病変を認めた（図6）。再発病日は23~46日目であった（図7）。11眼中無作為に選んだ8眼を対象にして、病変部の切片についてウイルス抗原を検索した結果、5眼

（63%）に蛍光陽性所見が得られた。蛍光は全例において角膜上皮内に限局して認められた。一部の切片における対照実験の結果、これらが特異的蛍光であることを確認した（図8）。

IV 考 按

単純ヘルペスウイルスによって起こる角膜ヘルペスは、角膜感染症の中でも最も重要な疾患の一つであり、その最大の特徴は再発を起こすことである。実際の臨床における再発率については、田中ら¹⁾は99例を対象



図8 角膜切片に蛍光抗体染色直接法を施した所見。角膜上皮細胞層に特異蛍光を認める(×500)。

にしたアンケート調査の結果、35例より返答が得られ、このうち27例すなわち77%に再発が認められたと報告している。内田²⁾は、既往を確かめ得た症例のみを選んで調査した結果、60%に再発が見られたと報告している。また北野³⁾は、5年以上経過観察している57例60眼を対象にして、はっきりとした既往歴を有するもの21眼、経過観察中に再発をみたもの19眼の合計40眼すなわち66.7%に再発が認められ、この40眼のうち17眼すなわち42.5%に観察期間中に再再発が起こったと報告している。諸外国の報告では、Thygeson⁴⁾は200例の対象中80例すなわち40%、Wilhelmus⁵⁾は5年間の観察期間中に152例中61例すなわち40%に再発を見たと報告している。これらの報告を見ても、角膜ヘルペスの再発率がいかに高頻度であるかがわかる。

しかし、角膜ヘルペスの再発機序は未だ不明であり、これを解明するために、適当な動物実験モデルを作製することは極めて重要である。ウサギの角膜にHSVを接種することにより、ヒトの角膜ヘルペスに類似した角膜炎が発症することは古くから知られていたが、1961年 Anderson⁶⁾はArthus型反応により、1966年 Laibson⁷⁾はエピネフリンの筋注により、ウサギにおいてHSVの再活性化が可能であることを報告した。1967年 Nesburn⁸⁾はウサギの実験的角膜ヘルペ

スにおいて、誘発の操作を加えなくても自然の再発が起こることを報告し、さらに1969年 Laibson⁹⁾も3年間にわたる長期観察を行い、ウサギの実験的角膜ヘルペスにおいてHSVの再活性化および再発が起こることを証明した。我が国においては、後藤¹⁰⁾がウサギの片眼角膜にHSV-I型を接種しその後56日間にわたり生体顕微鏡を用いて角膜を観察し、角膜ヘルペスの再発病変が起こることを病変部の切片に対し蛍光抗体染色直接法を行い確かめている。

近年になり、角膜ヘルペスの発症から治癒に至る過程には、宿主の免疫能、特に細胞性免疫が深く関与していることが、主にマウスによる動物実験の結果¹¹⁾¹²⁾明らかにされてきた。これはマウスでは近交系動物が容易に入手でき、その上各種の単クローン性抗体なども豊富に利用できることから、これらを活用した免疫学的実験成績に負うところが多い。再発の実験モデルにおいても、再発の機序解明にあたり免疫学的立場より解析を加えるには、マウスが再発の動物モデルになり得ればより有用であることは言をまたない。今回、その基礎的情報を得ることを目的としてマウスにおける再発実験を行った。

実験1では、より普遍的な実験モデルを得るために、感受性の異なる2系統のマウスと病原性の異なる2株

の HSV を用い、C57BL/6マウスに HSV-I 型天方株、ddy マウスに HSV-I 型 Ska 株を接種する二通りの組み合わせを試みた。その結果、いずれの場合にも、角膜に再発病変が認められた。病像は点状ないし樹枝状(不規則線状)で、比較的軽度であった。再発の時期に関しては一定の傾向はなく、再発病変の持続期間はどちらの組み合わせにおいても1日が多く、2日ないし3日間が各々数眼で、最長7日間持続したものが ddy マウスで1眼あった。また、期間中に2度再発病変を起こしたものが ddy マウスで2眼認められた。

C57BL/6マウスは近交系マウスの中でも HSV の感染に対して抵抗力があり、HSV 接種後角膜変性を起こしたり脳炎を併発して死亡する症例が少ない系統¹³⁾¹⁴⁾といわれている。確かに14日間の観察期間では死亡例はほとんどなかったが、それ以後50日目までの観察期間においては、脳炎を併発して死亡するものが多く、14日目の45匹のマウス中50日まで生存したものは10匹(22%)にすぎなかった。死亡例が多いということは再発の実験には不利であり、今後は、C57BL/6マウスに対しても接種ウイルスの濃度を低くしたり、毒性の弱いウイルスを接種してみる必要があろう。

実験2では、摘出した11眼中無作為に選んだ8眼を対象に角膜の連続切片をつくり蛍光抗体染色直接法を行った。この結果、5眼に陽性の所見を得た。特異蛍光はいずれも上皮内に限局したもので、実質内には特異蛍光は認められなかった。ウサギの再発性角膜病変を蛍光抗体染色直接法により検索した後藤の報告¹⁰⁾によると、3眼中2眼に陽性の結果を得、特異蛍光は小範囲の上皮細胞層に限局したものであったと述べている。これは、今回行ったマウスによる所見とほぼ一致したものである。しかし、すべての眼球に陽性の所見が得られなかったことに関しては、フルオレセインに染色される上皮性病変のすべてが角膜ヘルペスの再発病変ではなく、その他の上皮性病変が含まれている可能性は否定できない。

HSV は、神経線維内を逆行性軸索流に乗って、侵入組織を支配する神経領域の神経節内に潜伏感染すると考えられている。角膜に HSV を接種した時の潜伏部位としては、三叉神経節が一般的に支持されている¹⁵⁾¹⁶⁾が、その他に上顎部神経節があり¹⁷⁾¹⁸⁾、またマウスにおいて網膜内に HSV の潜伏を示唆した報告¹⁹⁾もある。Tullo ら¹⁸⁾は、マウスを使用し、角膜接種後の HSV の広がりや潜伏感染の分布を調べている。これによると、感染性のウイルスは、角膜接種後2日目に

は眼神経領域と同側の脳幹に出現し、4日目には上顎神経領域、5日目には下顎神経領域と対側の脳幹に出現する。また、角膜接種後23日目から115日目にマウスを殺して、潜伏感染を調べた結果、23日目から62日目に三叉神経節と上顎部神経節に潜伏 HSV を検出している。また山田¹³⁾は、マウスの角膜に HSV を接種し、その後の角膜の病像、組織像および蛍光抗体法によるウイルス抗原の局在を調べている。その結果、ウイルス接種7日後の潰瘍が治癒した部位では特異蛍光はみられなかった。今回の実験では、初感染後、角膜の上皮性病変が完全に治癒して実質炎もなく、かつ眼瞼炎など付属器の病変が外見上全く存在しないマウスを選び出して、ウイルス接種14日以後の角膜病変の再現を追跡した。したがって、臨床的な意味からは角膜ヘルペスの再発病変と考えられる。今後、本実験モデルを確立するためには、治癒期におけるウイルスの潜伏感染と再発病変における再活性化された感染性ウイルスを証明することが課題であろう。

角膜ヘルペスの再発の誘因として、臨床的には発熱、紫外線照射、ストレス、ステロイドホルモンの投与などが考えられている。動物実験モデルにおいても、免疫抑制剤の投与あるいは細胞性免疫や体液性免疫の選択的抑制などによって、再発機序の一端が解明できる可能性はある。今後、このような多角的実験操作を加える意味でも、脳炎による死亡例が少なく、再発率の高いマウスの実験モデルを作り上げることは有意義と思われる。

稿を終えるにあたり、ご校閲を賜りました大野重昭教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 田中直彦, 横山志津子, 石川凜子: 単純ヘルペス性角膜炎の臨床的観察, その1. 統計的検索. 日眼会誌 77: 460-463, 1973.
- 2) 内田幸男: 角膜ヘルペス—主として診断学的立場から. 日眼会誌 76: 1391-1413, 1972.
- 3) 北野周作, 山西政昭: 角膜ヘルペスの長期観察例における病態について. 眼紀 35: 1853-1861, 1984.
- 4) Thygeson P, Kimura SJ, Hogan MJ: Observations on herpetic keratitis and keratoconjunctivitis. Arch Ophthalmol 56: 375-388, 1956.
- 5) Wilhelmus KR, Coster DJ, Donovan HC, et al: Prognostic indicators of herpetic keratitis. Arch Ophthalmol 99: 1578-1582, 1981.
- 6) Anderson WA, Margruder B, Kilbourne ED: Induced reactivation of herpes simplex virus in

- healed rabbit corneal lesions. *Pro Soc Exp Biol Med* 107: 628—632, 1961.
- 7) **Laibson PR, Kibrick S**: Reactivation of herpetic keratitis by epinephrine in rabbit. *Arch Ophthalmol* 75: 254—260, 1966.
 - 8) **Nesburn AB, Elliott JH, Leibowitz HM**: Spontaneous reactivation of experimental herpes simplex keratitis in rabbits. *Arch Ophthalmol* 78: 523—529, 1967.
 - 9) **Laibson PR, Kibrick S**: Recurrence of herpes simplex virus in rabbit eyes: Results of a three-year study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 8: 346—350, 1969.
 - 10) 後藤英士: 角膜ヘルペスの再発に関する実験的研究. *日眼会誌* 83: 1060—1070, 1979.
 - 11) 佐々木隆敏, 斎藤春和, 井上みどり, 他: 近交系マウス角膜ヘルペスと免疫脾細胞による感染防御免疫の受身伝達について. *日眼会誌* 84: 1046—1050, 1980.
 - 12) 斎藤春和: 角膜ヘルペスの免疫学的研究—マウス単純ヘルペス角膜炎における免疫脾細胞とその感染抑制効果—. *日眼会誌* 87: 1010—1016, 1983.
 - 13) 山田利津子: マウスの角膜ヘルペスに関する実験的研究—C57BL/6 マウス角膜ヘルペスの臨床像, 組織像および角膜ウイルス抗原の局在—. *横浜医学* 37: 233—238, 1986.
 - 14) **Metcalf JF, Michaelis BA**: Herpetic keratitis in inbred mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1222—1225, 1986.
 - 15) **Nesburn AB, Cook ML, Stevens JG**: Latent herpes simplex virus. *Arch Ophthalmol* 88: 412—417, 1972.
 - 16) 林皓三郎, 内田幸雄: 角膜ヘルペスの研究—Virusの拡がり方と潜在感染について—. *日眼会誌* 84: 311—317, 1980.
 - 17) **Price RW, Barrett JK, Steven JG**: Latent infection of the peripheral ANS with herpes simplex virus. *Nature* 257: 686—688, 1975.
 - 18) **Tullo AB, Shimeld C, Blyth WA, et al**: Spread of virus and distribution of latent infection following ocular herpes simplex in the non-immune and immune mouse. *J Gen Virol* 63: 95—101, 1982.
 - 19) **Openshaw H**: Latency of herpes simplex virus in ocular tissue of mice. *Infect Immun* 39: 960—962, 1983.