

涙液中再活性化単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) の由来組織の検討

下村 嘉一, 渡辺 仁, 切通 彰, 井上 幸次, 眞鍋 禮三

大阪大学医学部眼科学教室

要 約

単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) 潜伏感染家兎において, 化学的交感神経切断術後のエピネフリン点眼による涙液中再活性化 HSV-1 の由来組織について検討した。感染35日目に化学的交感神経切断術を行い, エピネフリン点眼開始2日目に家兎の組織を摘出した。角膜からは感染性ウイルスが50% (10眼中5眼) 検出できたが, 結膜, 涙腺からは検出できなかった。三叉神経節からは20% (10眼中2眼) 同定し得た。なお, 涙液中 HSV-1 の再活性化率は50% (10眼中5眼) で, 涙液中のウイルス

再活性化と感染性ウイルスが角膜から同時に検出できた家兎眼は4眼で, 涙液中ウイルス再活性化と感染性ウイルスが三叉神経節から同時に検出できた家兎眼は1眼のみであった。以上の結果から, 化学的交感神経切断術による再活性化ウイルスは主として角膜から由来していることが示唆された。(日眼会誌 98: 419-422, 1994)

キーワード: 単純ヘルペスウイルス, 角膜ヘルペス, 化学的交感神経切断, 再活性化, 潜伏感染

Tissue of Origin of Herpes Simplex Virus Type 1 Reactivated in Tear Film

Yoshikazu Shimomura, Hitoshi Watanabe, Akira Kiritoshi,
Yoshitsugu Inoue and Reizo Manabe

Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

Abstract

In the present study, we tried to detect the tissue of origin of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivated in tear film after artificial reactivation. The combined treatment consisted of iontophoresis on postinoculation day 35, followed by topical epinephrine on 2 days, after which the rabbits were killed. The ocular tissues and trigeminal ganglia were immediately dissected. Their cell-free supernatants were inoculated on CV-1 (African green monkey kidney cell) monolayers for infectious HSV-1 detection. The percentage of recovery from the cell-free supernatants was 50% (5 out of 10 samples) from the cornea, 0% from conjunctivas or lacrimal glands, and 20% (2 out of 10 samples) from trigeminal ganglia. The percentage of HSV-1

reactivation in the tear film was 50%. No infectious virus was detected from tissues or tear film in the control group. Four eyes showed HSV-1 reactivation simultaneously from the cornea and tear film, but only one eye from the trigeminal ganglion and tear film. These results demonstrate that the cornea might be the tissue of origin of HSV-1 reactivated in tear film. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 419-422, 1994)

Key words: Herpes simplex virus, Herpetic keratitis, Chemical sympathectomy, Reactivation, Latency

I 緒 言

角膜ヘルペスの再発機序を解明する一つの手段として, 単純ヘルペスウイルス (HSV) 再活性化動物モデルの作成は重要である。Shimomura¹⁾は化学的交感神経切断術 (角膜上での 6-Hydroxydopamine のイオント

フォレーシス施行) 後, エピネフリンの局所投与により, HSV 1 型 (HSV-1) 潜伏感染家兎涙液中に HSV-1 を6日以内に 100% 再活性化できる動物モデルを開発した。従来, 涙液中の再活性化 HSV-1 の由来は三叉神経節であるとされていた^{2)~4)}が, 近年著者らは, 本動物モデルを用いて, 涙液以外の眼局所においても感染性ウイルスが

別刷請求先: 565 大阪府吹田市山田丘 2-2 大阪大学医学部眼科学教室 下村 嘉一
(平成5年9月24日受付, 平成5年12月26日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshikazu Shimomura, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School, 2-2 Yamadaoka, Suita-shi Osaka-fu 565, Japan
(Received September 24, 1993 and accepted in revised form December 26, 1993)

高率に検出されることを証明した⁵⁾。今回の実験では、本動物モデルにおける涙液中再活性化 HSV-1 の由来組織を検討したので報告する。

II 材料と方法 (表1)

1. ウイルス・細胞・動物

ウイルスは HSV-1 Oda 株, 感受性細胞として, アフリカミドリザル腎由来の CV-1 細胞を用いた。感染群, 対照群ともに雄の日本白色家兎 (2.0 kg) 5 匹を実験に供し, 観察を容易に行う目的で家兎瞬膜を実験前に切除した。

2. 急性感染成立の確認

角膜上皮欠損をトレパンで作った後, HSV-1 Oda 株 (4×10^5 PFU/眼) を角膜に点眼接種した。感染 3 日目にフルオレセインを点眼して, 樹枝状角膜炎を手持ち細隙灯顕微鏡下で観察し, すべての感染家兎眼に急性感染成立の確認を行った。対照群に対しては, phosphate buffer saline (pH: 7.2, 0.01 モル) を点眼した。

3. 涙液中の感染性ウイルスの検出⁵⁾

イオントフォレーシス施行前 3 日間および施行後 2 日間, 清潔綿棒で家兎涙液を採取した。採取方法は綿棒を上円蓋部に挿入し, 角膜を軽く擦過しながら, 下円蓋部に 5 秒間設置した⁶⁾。採取後, 綿棒を用意して置いた CV-1 細胞を含む培養試験管 (1 ml の 10% fetal calf serum + Eagle's minimum essential medium 含有) 内に挿入した。試験管を 24 時間, 37°C, 5% CO₂ 下で培養し, その後, 綿棒を取り出し, CV-1 細胞の HSV-1 特異的細胞変性効果 (CPE) を実体顕微鏡下で 14 日間観察した。

4. HSV-1 再活性化法 (化学的交感神経切断術)

感染 5 週後に以下に示すイオントフォレーシスを施行した。蒸留水で 1% 6-hydroxydopamine (6-HD) を作成し, 1 ml の 6-HD を家兎角膜上に置いたアイカップに注入し, イオントフォレーサーの (+) 極をアイカップの溶液に浸し, (-) 極を家兎の耳に接続し, 角膜上で 0.75 mA の直流電流を 3 分間通電施行した。イオントフォレーシス終了直後およびその翌日に 1.25% のエピネフリンを計 2 回点眼した。

対照 (5 匹 10 眼) として, 1 ml の生理食塩水を用いたイオントフォレーシスを同様の条件で行い, 生理食塩水の点眼を施行した。

5. 組織内の感染性ウイルスの検出

感染後 37 日目に家兎を屠殺し, 眼組織 (角膜, 結膜, 涙腺) と三叉神経節 (図 1) を採取した。各組織を homogenizer で乳化し, 1 ml の 10% fetal calf serum + eagle's minimum essential medium (MEM) を追加し, その遠心上清を単層培養 CV-1 細胞に接種した。14 日間 CV-1 細胞の CPE を観察し, 感染性ウイルスを検索した。

表 1 実験方法

動物: 雄の日本白色家兎 (2.0 kg)	
単純ヘルペスウイルス 1 型: Oda 株 (4×10^5 PFU/眼)	
(HSV-1)	
感染後日数	
0	HSV-1 を角膜接種
3	細隙灯顕微鏡で樹枝状潰瘍を確認 (急性感染成立)
33~34	涙液採取 (1 回)
35	涙液採取 (1 回) 6-HD のイオントフォレーゼ エピネフリン点眼 (1 回)
36	涙液採取・エピネフリン点眼 (1 回) (2 回)
37	涙液採取・組織摘出

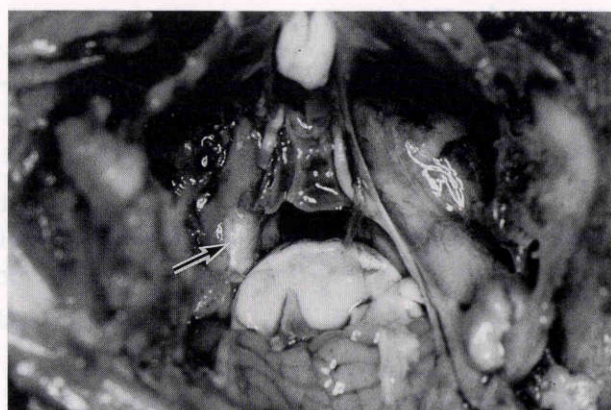


図 1 家兎の左三叉神経節 (矢印) を露出している。

6. HSV-1 の同定

HSV-1 の同定には後日, 家兎高度 HSV-1 免疫血清による中和試験を施行した⁷⁾。CPE が観察し得た標本はすべて中和試験によって HSV-1 であることが確認できた。

III 結果

人工的 HSV-1 再活性化法による涙液中 HSV-1 の再活性化の結果を表 2 に示す。イオントフォレーシス施行前 3 日間は, HSV-1 は涙液から検出されなかった。24 時間後, 潜伏感染家兎から HSV-1 は涙液中に全く誘導されなかったが, 48 時間後では HSV-1 が 50% (5/10) 涙液中に誘導できた。対照群では HSV-1 は全く検出できず, 48 時間後の HSV-1 検出率と対照群の検出率の間で統計学的に有意の差を認めた ($p < 0.01$, χ^2 test)。人工的 HSV-1 再活性化法開始後, 涙液中にウイルスが検出し得た家兎は 10 眼中 5 眼で対照群との間で有意の差を認めた ($p < 0.01$, χ^2 test)。なお, 細隙灯顕微鏡検査で臨床的にヘルペス感染を確認し得る所見 (樹枝状角膜炎など) は認められなかった。

感染後 37 日目に検討した眼局所および神経組織からの HSV-1 再活性化の結果を表 3 に示す。感染性ウイルスは, 角膜から 50% (5/10), 結膜, 涙腺から 0%, 三叉

表 2 涙液中 HSV-1 の再活性化

家兎番号	眼	-2	-1	0 ↓ ↓	1 ↓ ↓	2	組織摘出**
1	OD	-	-	-	-	+	
	OS	-	-	-	-	+	
2	OD	-	-	-	-	-	
	OS	-	-	-	-	-	
3	OD	-	-	-	-	-	
	OS	-	-	-	-	-	
4	OD	-	-	-	-	+	
	OS	-	-	-	-	-	
5	OD	-	-	-	-	+	
	OS	-	-	-	-	+	
再活性化率		0% 50%*					

白矢印：6-HD のイオントフォレーゼ

矢印：1.25% エピネフリン点眼

+：HSV-1 検出 -：HSV-1 検出不能

*：対照群との間に統計学的に有意の差を認めた ($p < 0.01$)。

**：三叉神経節、角膜、結膜、涙腺を摘出した。

OD：右眼 OS：左眼

表 3 眼局所および神経組織からの HSV-1 再活性化

家兎番号	眼	涙液中 HSV-1	三叉 神経節	角膜	結膜	涙腺
1	OD	+	-	+	-	-
	OS	+	-	+	-	-
2	OD	-	+	+	-	-
	OS	-	-	-	-	-
3	OD	-	-	-	-	-
	OS	-	-	-	-	-
4	OD	+	+	+	-	-
	OS	-	-	-	-	-
5	OD	+	-	-	-	-
	OS	+	-	+	-	-
再活性化率		50%	20%	50%*	0%	0%

+：HSV-1 検出 -：HSV-1 検出不能

*：対照群との間に統計学的に有意の差を認めた ($p < 0.01$)。

OD：右眼 OS：左眼

神経節から 20% (2/10) 同定し得た。対照群では、全組織から感染性ウイルスは同定できず、検出率において角膜においてのみ対照群との間に統計学的に有意の差を認めた ($p < 0.01$, χ^2 test)。

涙液中 HSV-1 再活性化と角膜から HSV-1 が同時に再活性化できた家兎眼は 4 眼 (No. 1 の OD, OS・No. 4 の OD・No. 5 の OS) であった。涙液中 HSV-1 再活性化と三叉神経節から HSV-1 が同時に再活性化できた家兎眼は 1 眼 (No. 4 の OD) のみであった。

IV 考 按

現在、角膜ヘルペスの再発病態は以下のように一般的にいわれている。幼小児期に HSV が結膜あるいは口腔内に感染し、その後、三叉神経軸索流に乗って上行性に神経節に到達し、潜伏感染の状態となる。成人になった

後、神経節内潜伏感染 HSV は何らかの trigger で再活性化し、再活性化ウイルスは再度三叉神経第 1 枝の軸索流に乗って角膜に到達し、角膜ヘルペスが発症する²⁾。しかしながら、角膜ヘルペスの詳細な再発機序については未だ不明である⁴⁾⁸⁾。

人工的 HSV-1 再活性化法によって、HSV-1 潜伏感染家兎から 2 日目に HSV-1 が涙液中に 50% 再活性化することが判明した (表 2)。Shimomura ら¹⁾の報告では HSV-1 再活性化法施行後、2 日以内に 17 眼中 14 眼 (82%) に HSV-1 が再活性化しているが、今回の報告では異なる種類の家兎およびウイルス株を使用したため、ウイルス再活性化率が低下したと考えられる。この結果は前回の同じ種類の家兎、ウイルス株を使用した実験⁵⁾と一致している。なお、今回の実験では感染 35 日目に再活性化法を施行しているが、仮に 3 あるいは 6 か月後といった長期的間隔を置いて同様の再活性化法を施行した場合、ウイルス再活性化率は低下する¹⁾。

従来、人工的再活性化法を施行しても、ウイルス検出率は角膜では 7 眼中 2 眼 (29%) で、三叉神経節では 7 眼中 5 眼 (71%) で、角膜より神経節の方が検出率は高かった³⁾。その理由として、組織摘出の時期が異なることが挙げられる。彼らは人工的再活性化法を施行後 4 日で組織を摘出しているが、今回の報告では再活性化法を施行後 2 日目に組織を摘出しており、その結果、角膜に再活性化 HSV-1 が高率に検出できたと考えられる。

涙液中 HSV-1 再活性化と角膜から HSV-1 が同時に再活性化できた家兎眼は 4 眼 (No. 1 の OD, OS・No. 4 の OD・No. 5 の OS) であり (表 3)、涙液中 HSV-1 再活性化と三叉神経節から HSV-1 が同時に再活性化できた家兎眼は 1 眼 (No. 4 の OD) であったが、この眼の角膜からも HSV-1 が検出されている。したがって、本 HSV-1 再活性化法による涙液中 HSV-1 の由来組織は三叉神経節ではなく、主として角膜であると推察する。

人工的再活性化法により、涙液中に再活性化される HSV-1 は三叉神経節内の再活性化ウイルスが軸索流に乗って眼局所へ到達したものと考えられていた¹⁾³⁾が、今回の結果から、角膜内潜伏感染ウイルスが再活性化した結果であるという可能性も考慮する必要がある。ウイルスの再活性化までの時間と神経節から角膜への axoplasmic flow の時間⁹⁾を考慮すると、本再活性化法により涙液中に再活性化される HSV-1 は三叉神経節内潜伏感染ウイルスよりも角膜内潜伏感染ウイルスが再活性化されたと考える方が合理的である。実際、近年、ヒト角膜内に HSV-1 が潜伏感染していることが証明されつつある^{10)~12)}。

ヘルペス再発の機序に関して、本再活性化モデルの場合、角膜内に潜伏している HSV-1 を再活性化して、その刺激が神経節に潜伏感染している HSV-1 を再活性化して涙液 HSV-1 を放出し続けている¹⁾と推論できる。角膜

ヘルペスの再発については、従来から Hill ら¹³⁾が提唱している ganglion trigger theory が支持されてきたが、今回の結果と上記角膜内潜伏感染 HSV-1 の存在^{10)~12)}から、角膜ヘルペスの再発に関して、ganglion and skin trigger theory¹⁴⁾がよりその病態に近いのではないかと思われる。

文 献

- 1) Shimomura Y, Gangarosa LPSr, Kataoka M, Hill JM: HSV-1 shedding by iontophoresis of 6-hydroxydopamine followed by topical epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1588—1594, 1983.
- 2) Nesburn AB, Dickinson R, Radnoti M: The effect to trigeminal nerve and ganglion manipulation on recurrence of ocular herpes simplex in rabbits. *Invest Ophthalmol* 15: 726—731, 1976.
- 3) Hill JM, Kwon BS, Shimomura Y, Colborn GL, Yaghamai F, Gangarosa LP: Herpes simplex virus recovery in neural tissues after ocular HSV shedding induced by epinephrine iontophoresis to the rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 243—247, 1983.
- 4) 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.
- 5) 下村嘉一, 渡辺 仁, 井上幸次, 眞鍋禮三, 和田 透, 佐藤孝三郎: 眼および神経組織における単純ヘルペスウイルス 1 型の再活性化について. *眼紀* 42: 826—830, 1991.
- 6) Pavan-Langston D, Nesburn AB: The chronology of primary herpes simplex infection of the eye and adnexal glands. *Arch Ophthalmol* 80: 258—264, 1968.
- 7) Knotts FB, Cook ML, Stevens JG: Latent herpes simplex virus in the central nervous system of rabbits and mice. *J Exp Med* 138: 740—744, 1973.
- 8) 下村嘉一: 角膜ヘルペスと再発. *眼科* 32: 47—52, 1990.
- 9) Yamamoto Y, Hill JM: HSV-1 recovery from ocular tissues after viral inoculation into the superior cervical ganglion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1447—1452, 1986.
- 10) Easty DL, Shimeld C, Claoue CMP, Menage M: Herpes simplex virus isolation in chronic stromal keratitis: Human and laboratory studies. *Curr Eye Res* 6: 69—74, 1987.
- 11) Shimomura Y, Mori Y, Inoue Y, Kiritooshi A, Ohashi Y, Manabe R: Herpes simplex virus latency in human cornea. *Jpn J Ophthalmol* 37: 318—324, 1993.
- 12) Kaye SB, Lynas C, Patterson A, Risk JM, McCarthy K, Hart CA: Evidence for herpes simplex viral latency in the human cornea. *Br J Ophthalmol* 75: 195—200, 1991.
- 13) Hill TJ, Blyth WA: An alternative theory of herpes simplex recurrence and a possible role for prostaglandins. *Lancet* i: 397—399, 1976.
- 14) Hill TJ: Mechanisms involved in recurrent herpes simplex. In: Nahmias AJ, et al (Eds): *The Human Herpesviruses: An Interdisciplinary Perspective*, New York, Elsevier/North-Holland, 241—244, 1981.