

## 免疫不全宿主におけるマウスサイトメガロウイルス眼感染症の病理発生

諏訪 雄三<sup>1)</sup>, 井上 幸次<sup>2)</sup>, 大橋 裕一<sup>3)</sup>, 林 皓三郎<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>大阪府立羽曳野病院眼科, <sup>2)</sup>大阪大学医学部眼科学教室, <sup>3)</sup>愛媛大学医学部眼科学教室, <sup>4)</sup>神戸市環境保健研究所

### 要 約

サイトメガロウイルス網膜炎は、免疫不全患者における最も多い合併症の一つであるが、その病理発生については、なお不明の点が多い。我々は、Balb/cヌードマウスに唾液腺継代マウスサイトメガロウイルス Smith 株を腹腔内接種し、ウイルス感染 8 日目に眼球、その他の組織を摘出し、蛍光抗体法を用いてウイルスの広がりを病理学的に検索した。眼球では、結膜下組織、角膜実質、外眼筋、脈絡膜にウイルス抗原陽性所見を認めた。また、ウイルス抗原は脾臓、肝臓、唾液腺など様々な組織に分布していた。次に、ウイルス播種のキャリアーとしてマクロファージが関与しているか否かを調べる目的で、前処置としてウイルスを感染させる前日と 3 日前にマクロ

ファージの活性を抑えるシリカを腹腔内投与し、同様の実験を行ったが、ウイルス抗原の広がり是非投与群と差がなかった。摘出した組織の一部を用いてウイルス力価の検索を行ったところ、血球だけでなく血清からもウイルスが検出されたことを合わせて考えると、ウイルスの広がりには、フリーなウイルスが主に関与していると思われる。(日眼会誌 98:820-824, 1994)

キーワード：マウスサイトメガロウイルス, Balb/c ヌードマウス, マクロファージ, シリカ, フリーウイルス

## Ocular Murine Cytomegalovirus Infection in Immunocompromised Hosts

Yuzo Suwa<sup>1)</sup>, Yukitsugu Inoue<sup>2)</sup>, Yuichi Ohashi<sup>3)</sup> and Kozaburo Hayashi<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Osaka Prefectural Habikino Hospital

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

<sup>3)</sup>Department of Ophthalmology, Ehime University, School of Medicine

<sup>4)</sup>Public Health Research Institute of Kobe City, Kobe, Japan

### Abstract

Cytomegalovirus (CMV) chorioretinitis is one of the commonest complications in immunocompromised hosts. However, the entire scope of ocular involvement during generalized CMV infection in immunocompromised hosts is yet to be elucidated. Balb/c nude mice were inoculated intraperitoneally with Smith strain of salivary gland passaged murine cytomegalovirus. Eight days after infection, they were sacrificed and the pathological features of virus spread were studied by immunofluorescence method. Subconjunctival tissues, corneal stroma, outer ocular muscles and occasional choroidal tissue are the site of positive fluorescence in the eye. At the same time, viral antigens were detected in the various organs such as spleen, liver, salivary glands,

etc. Balb/c nude mice were injected intraperitoneally with silica three days and one day prior to virus infection to suppress their macrophages. The localization of viral antigens in the silica-treated mice was similar to that in untreated mice. When the peripheral blood obtained from the nude mice infected for 8 days was titrated for the virus, cell-free virus and blood-cell-associated virus was detected. These results indicate that cell-free virus is the major source of its spread. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 820-824, 1994)

Key words: Murine cytomegalovirus, Balb/c nude mice, Macrophage, Silica, Free virus

別刷請求先：583 大阪府羽曳野市はびきの 3-7-1 大阪府立羽曳野病院眼科 諏訪 雄三

(平成 5 年 11 月 9 日受付, 平成 6 年 5 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Yuzo Suwa, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka Prefectural Habikino Hospital,

3-7-1 Habikino, Habikino-shi, Osaka-fu 583, Japan

(Received November 9, 1993 and accepted in revised form May 11, 1994)

## I 緒 言

サイトメガロウイルス (CMV) の全身感染症は、免疫不全患者における最も多い合併症の一つで、眼合併症は初期病変として重要視されている。実際、CMV 網膜炎は後天性免疫不全症候群 (AIDS) 患者の 20~50% にみられている<sup>1)~8)</sup>。しかし、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は種特異性が強く、他の動物には感染しないため、こうした HCMV 感染症の病理発生については、なお不明の点が多い。HCMV に代わる動物モデルとしてはマウスサイトメガロウイルス (MCMV) が用いられているが、これまでの眼感染実験報告<sup>9)~16)</sup>の多くは眼内にウイルスを直接接種したものであり、免疫不全時の全身感染症の部分症として眼病変をみた報告はない。そこで、我々は免疫不全マウスに MCMV を全身感染させ、眼組織の検索を行った。

## II 方 法

### 1. 実験材料

#### 1) ウイルス

唾液腺継代 MCMV Smith 株 ( $1.3 \times 10^5$  PFU/ml) を用いた。

#### 2) 実験動物

雄、雌 7~8 週齢の Balb/c, Balb/c ヌード, SCID マウスを用いた。

#### 3) 蛍光抗体

マウスに MCMV Smith 株を高度免疫して得た抗体に、FITC をラベルした anti-MCMV 抗体を使用した。

### 2. 実験方法

#### 1) 実験 I

3 種類のマウス各 9 匹にそれぞれ MCMV を 0.3 ml 腹腔内接種し、感染 4 日目、6 日目、8 日目の 3 群に分けて、マウスを塩酸ケタミン (ケタラル®、50 mg/kg) 麻酔下で経心臓的に脱血した後、眼球その他の組織を摘出し、OCT コンパウンドで包埋し、クリオスタットで厚さ 5  $\mu$ m の凍結切片を作成した。アセトンで固定後、適量のラベル抗体を 4°C で 24 時間反応させ、PBS で洗浄後、ニコン社製蛍光顕微鏡でウイルス抗原の分布を観察した。また、組織の一部を用いてウイルス力価の検索を行った。ウイルス力価の測定は、ホモジナイズした組織の上清を 10 倍段階希釈し、単層培養した murine embryo fibroblast に接種して、5 日後にプラーク数を算定した。

#### 2) 実験 II

CMV の伝播のキャリアー (抗体陽性者) となる可能性のあるマクロファージ (M $\phi$ ) の活性を落とす目的で、前処置としてマウスにウイルスを接種する前日と 3 日前に長径 3  $\mu$ m 以下のシリカ (5 mg/匹) を腹腔内注射した後、ウイルスを感染させ、実験 I と同様の検索を行った。

## III 結 果

表 1 は MCMV 接種後、経時的にウイルス抗原の広がりをもとめたものである。MCMV 接種後 4 日では、眼組

表 1 マウスサイトメガロウイルス (MCMV) 感染後の眼組織における蛍光抗体法の結果

マウス	組 織	ウイルス抗原		
		4 日	6 日	8 日
Balb/c	眼瞼	-	-	-
	結膜	-	-	-
	角膜	-	-	-
	脈絡膜	-	-	-
	網膜	-	-	-
	外眼筋	-	-	+
	ハーダー腺	-	-	-
Balb/c nude	眼瞼	-	+	++
	結膜	-	+	++
	角膜	-	+	++
	脈絡膜	-	-	+
	網膜	-	-	±
	外眼筋	-	+	+
	ハーダー腺	-	+	+
SCID	眼瞼	-	-	+
	結膜	-	-	+
	角膜	-	-	+
	脈絡膜	-	-	-
	網膜	-	-	-
	外眼筋	-	-	+
	ハーダー腺	-	-	+

表 2 シリカで前処置を行ったマウスの MCMV 感染後 8 日目の眼組織における蛍光抗体法の結果

マウス	組 織	ウイルス抗原
Balb/c	眼瞼	-
	結膜	-
	角膜	-
	脈絡膜	-
	網膜	-
	外眼筋	-
	ハーダー腺	-
Balb/c nude	眼瞼	+
	結膜	++
	角膜	+
	脈絡膜	+
	網膜	-
	外眼筋	+
	ハーダー腺	+
SCID	眼瞼	+
	結膜	+
	角膜	+
	脈絡膜	-
	網膜	-
	外眼筋	+
	ハーダー腺	+

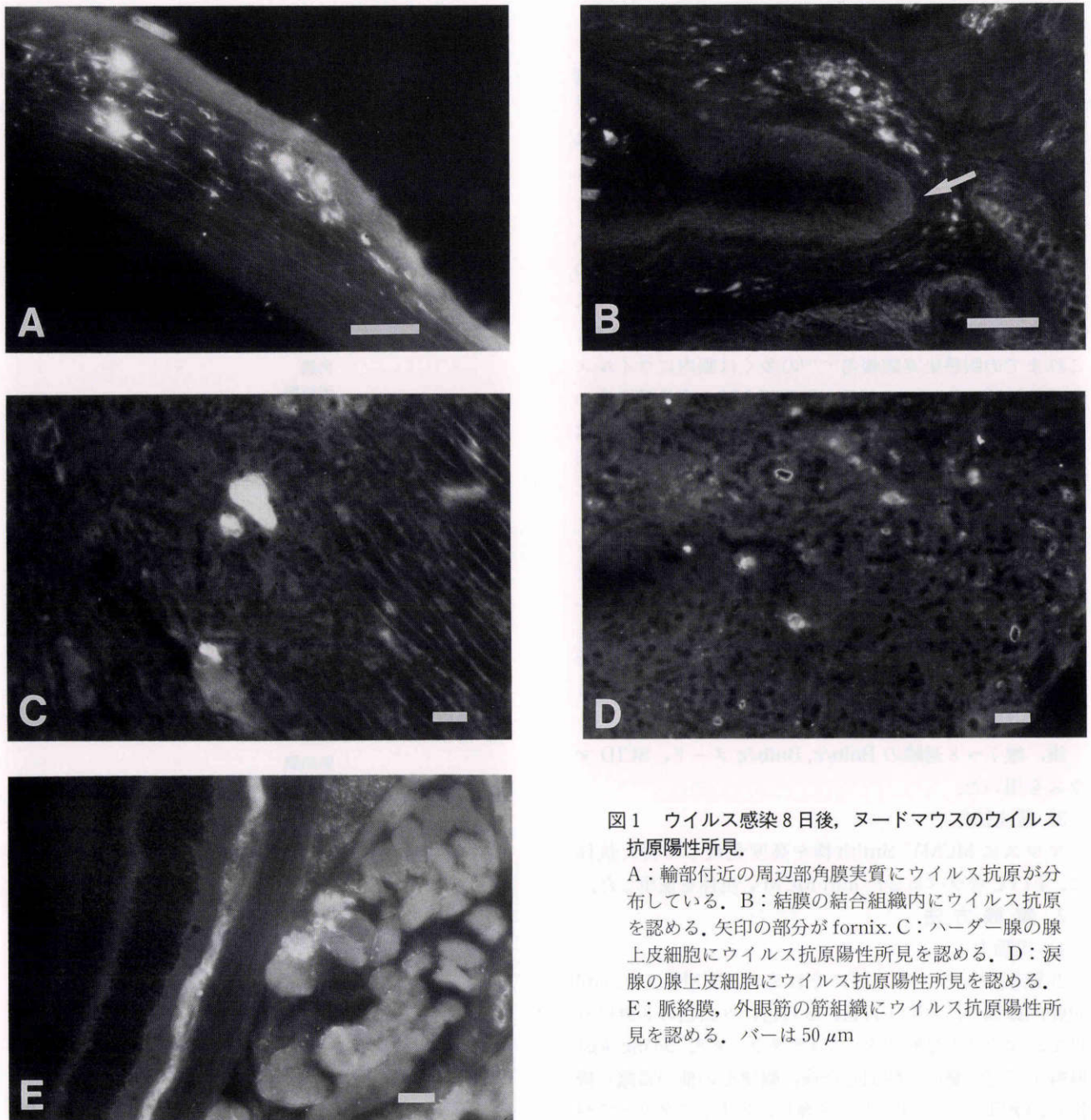


図1 ウイルス感染8日後、ヌードマウスのウイルス抗原陽性所見。

A: 輪部付近の周辺部角膜実質にウイルス抗原が分布している。B: 結膜の結合組織内にウイルス抗原を認める。矢印の部分が fornix。C: ハーダー腺の腺上皮細胞にウイルス抗原陽性所見を認める。D: 涙腺の腺上皮細胞にウイルス抗原陽性所見を認める。E: 脈絡膜、外眼筋の筋組織にウイルス抗原陽性所見を認める。バーは 50  $\mu$ m

織にウイルス抗原は認められなかったが、6日、8日と経時的に抗原が広がっていた。Balb/c マウスでは、ウイルス接種後8日でも眼球にウイルス抗原は分布しておらず、外眼筋に僅かにウイルス抗原が観察されるのみであった。一方、severe combined immunodeficiency (SCID) マウスでは、ウイルス抗原が眼瞼、結膜、角膜、外眼筋、ハーダー腺に分布していた。Balb/c ヌードマウスでは、それに加えて脈絡膜にもウイルス抗原を認めた(図1)。網膜については反応が弱く、陽性と判定できなかった。シリカの前投与を行った実験IIでも、ウイルス抗原の分布は実験Iと差がなかった(表2)。

ウイルス力価を調べた結果を表3にまとめた。Balb/c マウスを除き、Balb/c ヌード、SCID マウスの眼球から

ウイルスが検出された。また、血球のみならず血清からもウイルスが検出された。

#### IV 考 按

HCMV 感染は、先天性感染を除くと、そのほとんどが不顕性感染と考えられていて、臨床的にはあまり重要視されていなかった。しかし、近年になって AIDS や臓器移植後の免疫不全状態で HCMV の全身感染が頻発し、しばしば生命の予後に関係する。眼科領域においては、CMV 網膜炎が問題である。これまでの実験は、眼球内に直接 MCMV を接種していた。しかし、より臨床に近い状態として、免疫不全マウスを用い、全身性サイトメガロ症を発症させ、その部分症として眼組織に感染を成立

表3 MCMV 感染後8日目のウイルス力価

組 織	ウイルス力価(PFU)		
	Balb/c	Balb/c nude	SCID
眼球(/0.1 g)	0	$1.0 \pm 1.0 \times 10^2$	$3.0 \times 10$
ハーダー腺(/0.1 g)	0	0	0
血清(/0.1 ml)	$3.0 \times 10$	} $3.7 \pm 3.3 \times 10^3$	$1.0 \pm 0.7 \times 10^2$
血球(/0.1 ml)	$5.0 \pm 2.0 \times 10$		$3.0 \times 10$

SCID: severe combined immunodeficiency

させることが今回の実験で可能となった。このモデルでは、MCMV は急性感染を起こすが、免疫系の正常な Balb/c マウスでは感染後8日目でも眼球にウイルスが証明できなかった。これに対し、T cell が欠損しているヌードマウス、T cell, B cell とともに欠損している SCID マウスでは、角膜、結膜などの眼各組織に広くウイルス抗原が分布していた。さらに、ヌードマウスでは脈絡膜にもウイルス抗原が観察されており、眼組織だけでなく、脾臓、肝臓などの全身の各組織において、SCID マウスよりもウイルス抗原の広がりがむしろ強かった。このことは、液性免疫は感染防御にほとんど関与していないことを示唆している。これらの結果から、MCMV の広がりは、こうした免疫欠損ないし不全状態できわめて強く、かつ広く起こることが明らかとなった。

ウイルス価の測定から、ウイルスは血球のみならず、free のウイルスとして血清からも高力価に証明された。さらに、シリカを投与して  $M\phi$  の活性を落としてもウイルスの広がりに差がないことを合わせ考えると、MCMV の急性感染時では  $M\phi$  が MCMV の伝播のキャリアーとなっているとは考え難く、むしろ free なウイルスが主に MCMV 感染の広がりに関与していると考えられる。

臨床的には、CMV 感染では網膜炎が主症状なのに対して、我々の実験モデルで脈絡膜などにはウイルス抗原を認めたものの、網膜にウイルス抗原の存在を証明できなかったことについては2つの仮説が考えられる。第1には、ウイルス (MCMV と HCMV) の臓器親和性の差あるいは宿主の組織構築の差であり、第2として、臨床の場でみる CMV 網膜炎の多くは潜伏感染した HCMV が種々の原因による免疫不全状態で再活性化することによって起こるのに対して、今回の実験は MCMV 急性感染のモデルであり、その経過の差によって各組織におけるウイルスの増殖に差がある可能性がある。また、今回の急性感染のモデルでは、感染後9~10日頃にすべてのマウスが死亡してしまうために、ウイルスが網膜炎を起こす以前の状態しかみることができなかった可能性もある。

今後、CMV 再活性化に伴うウイルスおよび宿主側の因子との関係について研究を進める必要がある。

## 文 献

- 1) Rosenberg PR, Uliss AE, Friedland GH, Harris CA, Small CB, Klein RS: Acquired immunodeficiency syndrome. Ophthalmic manifestations in ambulatory patients. *Ophthalmology* 90: 874-878, 1983.
- 2) Khadem M, Kalish SB, Goldsmith J, Fetkenhour C, O'Grady RB, Phair JP, et al: Ophthalmologic findings in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Arch Ophthalmol* 102: 201-206, 1984.
- 3) Freeman WR, Lerner CW, Mines JA, Lash RS, Nadel AJ, Starr MB, et al: A prospective study of the ophthalmologic findings in the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 97: 133-142, 1984.
- 4) Pepose JS, Holland GN, Nestor MS, Cochran AJ, Foos RY: Acquired immune deficiency syndrome. Pathogenic mechanisms of ocular disease. *Ophthalmology* 92: 472-484, 1985.
- 5) Henderly DE, Freeman WR, Smith RE, Causey D, Rao NA: Cytomegalovirus retinitis as the initial manifestation of the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 103: 316-320, 1987.
- 6) Skolnik PR, Pomerantz RJ, de la Monte SM, Lee SF, Hsiung GD, Foos RY, et al: Dual infection of retina with human immunodeficiency virus type 1 and cytomegalovirus. *Am J Ophthalmol* 107: 361-372, 1989.
- 7) Miceli MV, Newsome DA, Novak LC, Beuerman RW: Cytomegalovirus replication in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Current Eye Res* 8: 835-839, 1989.
- 8) Faber DW, Wiley CA, Lynn GB, Gross JG, Freeman WR: Role of HIV and CMV in the pathogenesis of retinitis and retinal vasculopathy in AIDS patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2345-2353, 1992.
- 9) Schwartz JN, Daniels CA, Shivers JC, Klintworth GK: Experimental cytomegalovirus ophthalmitis. *Am J Pathol* 77: 477-492, 1974.
- 10) Bale JF Jr, O'Neil ME, Hogan RN, Kern ER: Experimental murine cytomegalovirus infection of ocular structures. *Arch Ophthalmol* 102: 1214-1219, 1984.
- 11) Hayashi K, Kurihara I, Uchida Y: Studies of ocular murine cytomegalovirus infection. *Invest*

- Ophthalmol Vis Sci 26 : 486—493, 1985.
- 12) **Bale JF Jr, O'Neil ME, Lyon B, Perlman S :** The pathogenesis of murine cytomegalovirus ocular infection. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 : 1575—1581, 1990.
  - 13) **Holland GN, Fang EN, Glasgow BJ, Zaragoza AM, Siegel LM, Graves MC, et al :** Necrotizing retinopathy after intraocular inoculation of murine cytomegalovirus in immunosuppressed adult mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 : 2326—2334, 1990.
  - 14) **Rabinovitch T, Oh JO, Minasi P :** *In vivo* reactivation of latent murine cytomegalovirus in the eye by immunosuppressive treatment. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 : 657—663, 1990.
  - 15) **Bale JF Jr, O'Neil ME, Folberg R :** Murine cytomegalovirus ocular infection in immunocompetent and cyclophosphamide-treated mice. Potentiation of ocular infection by cyclophosphamide. Invest Ophthalmol Vis Sci 32 : 1749—1756, 1991.
  - 16) **Inoue Y, Minasi P, Oh JO :** The role of natural killer cells in murine cytomegalovirus eye infection. Invest Ophthalmol Vis Sci 34 : 1954—1962, 1993.