

機関番号：34419
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592084
 研究課題名（和文） 角膜内潜伏感染ヘルペスウイルスの動態
 研究課題名（英文）
 Latently Infected HSV in the Cornea
 研究代表者
 下村 嘉一（SHIMOMURA YOSHIKAZU）
 近畿大学・医学部・教授
 研究者番号：20162737

研究成果の概要（和文）：

我々は、全層角膜移植時に得られた 28 レシピエント角膜 28 眼中、HSV-1 DNA は 10 眼 (35.7%)、HSV-2 DNA は 1 眼 (3.6%)、VZV DNA は 9 眼(32.1%)、CMV DNA は 2 眼 (7.1%)、AdV DNA は 0 眼 (0%)で検出された。

そして、HSV DNA の涙液中での検出率を調べた。正常眼は 12 眼中 1 眼、8.3 %、ドライアイは 11 眼中 3 眼、27.3 %、結膜炎は 15 眼中 4 眼、26.7 %であった。

また、HSV-1 潜伏感染再活性化マウスモデルにおいて、薬物が再活性化抑制に効果を認めるか調べ、ブロムフェナック Na 点眼、AMP 筋肉注射、ゲルダナマイシン腹腔下注射は、有意な HSV-1 再活性化抑制効果を認めた。

研究成果の概要（英文）：

We detected herpes simplex virus types 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2), varicella zoster virus (VZV), and cytomegalovirus (CMV) DNAs in recipient corneal buttons taken at the time of penetrating keratoplasty. HSV-1, HSV-2, VZV, and CMV DNAs were detected in 10, 1, 9, and 2 of the 27 recipient corneal buttons, respectively.

The rates of HSV DNA positivity were 1/12 (8.3 %), 3/11 (27.3 %), and 4/15 (26.7 %) in normal eye, dry eye, and conjunctivitis, respectively.

Seven medications were investigated for their efficacy in suppressing HSV-1 reactivation in mouse model. Bromfenac Na eye drop, intramuscular AMP, and intraperitoneal geldanamycin suppressed the HSV-1 reactivation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：眼科、感染症

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 眼科学

キーワード：ウイルス、感染症、細胞、組織、角膜ヘルペス、PCR、DNA

1. 研究開始当初の背景

ウイルス性眼疾患の代表である角膜ヘルペスにおいて、現在、角膜内にヘルペスウイルスが潜伏感染していることが支持されてい

る。しかしながら、角膜内のどの部位に潜伏感染しているかは未だ不明である。さらに、近年、ドナー角膜内に潜伏感染しているヘルペスウイルスにより、ホスト角膜（ヘルペス

ウイルス既感染症例)に異なる株のヘルペスウイルスが再感染することが報告されている。本研究は、移植角膜ヘルペス患者を対象として、移植時得られたホスト角膜を使用して、どの部位にヘルペスウイルスが潜伏感染しているか否かを調査し、かつ全角膜ヘルペス患者を対象として、経時的にウイルスDNAを涙液中から検出して、そのDNA可変領域を解析後、検出ウイルスの異動を調査し、かつウイルス量を測定してドナー角膜からホスト角膜への感染および移植非経験症例における通常のヘルペスウイルス感染の動態を究明する。

2. 研究の目的

(1) 角膜移植時に得られた患者角膜を PCR 法、real time PCR 法に供し、HSV-1 DNA, HSV-2 DNA, VZV DN, CMV DNA、アデノウイルス DNA の有無及びその量を調べる。

(2) HSV DNA の涙液中での検出率を調べる。正常眼、ドライアイ、結膜炎で比較する。

(3) HSV-1 潜伏感染再活性化マウスモデルにおいて、どのような薬物が再活性化抑制効果を認めるか調べる。

3. 研究の方法

(1) 全層角膜移植時に得られた 28 レシピエント角膜を、nested PCR 法、real time PCR 法に供した。この方法で、HSV-1 DNA, HSV-2 DNA, VZV DN, CMV DNA、アデノウイルス DNA の有無及びその量を調べた。

(2) HSV DNA の涙液中での検出率を調べるために、正常眼は 12 眼、ドライアイは 11 眼、結膜炎 15 眼から涙液を集め、real time PCR を施行した。これにより、ヘルペス以外の眼疾患により、ウイルス DNA の無症候性排泄が高まるかどうか検討した。

(3) ヘルペス性角膜炎再発抑制の有用な方法を見出すために、HSV-1 潜伏感染再活性化マウスモデルにおいて、7 種類の薬物が再活性化抑制に効果を認めるか調べた。7 種類の薬物は、エトドラク (COX-2 阻害薬) 内服、ブロムフェナック Na (COX-2 阻害薬) 点眼、プラノプロフェン (COX 阻害薬) 点眼、アスコルビン酸 (ビタミン C) 内服、亜鉛内服、AMP 筋肉注射、ゲルダナマイシン (熱ショック阻害薬) 腹腔下注射であった。

4. 研究成果

(1) 移植角膜ヘルペス患者を対象として、移植時得られたホスト角膜を使用して、ヘルペスウイルス DNA の角膜における存在を調査した 28 眼中、HSV-1 DNA は 10 眼

(35.7%)、HSV-2 DNA は 1 眼 (3.6%)、VZV DNA は 9 眼 (32.1%)、CMV DNA は 2 眼 (7.1%)、AdV DNA は 0 眼 (0%) で検出された。CMV DNA がヒト角膜から検出されることを、世界で初めて報告した。

	HSV-1	HSV-2	VZV	CMV
No.	Nested PCR	Nested PCR	Nested PCR	Nested PCR
1	+	—	—	—
2	+	—	—	+
3	+	—	—	+
4	+	—	—	—
5	+	—	—	—
6	+	—	—	—
7	+	—	—	—
8	+	—	—	—
9	+	—	—	—
10	+	—	+	—
11	—	+	+	—
12	—	—	+	—
13	—	—	+	—
14	—	—	+	—
15	—	—	+	—
16	—	—	+	—
17	—	—	+	—
18	—	—	+	—
19	—	—	—	—
26	—	—	—	—
21	—	—	—	—
25	—	—	—	—
23	—	—	—	—
24	—	—	—	—

25	—	—	—	—
26	—	—	—	—
27	—	—	—	—
28	—	—	—	—

Nested PCR 陽性であったものに関しては、real time PCR 法で、DNA 量を調べた。

(2) HSV DNA の涙液中での検出率を調べた。正常眼は 12 眼中 1 眼、8.3%、ドライアイは 11 眼中 3 眼、27.3%、結膜炎は 15 眼中 4 眼、26.7% であった。ヘルペス以外の眼疾患により、ウイルス DNA の無症候性排泄が高まることを見出した。

(3) プラックアッセイにおける陽性眼 (率)

	生食 点眼	エトド ラク 内服	ブロム フェナ ク点眼	プラノ プロフ エン 点眼
再 活 性 化	16/22 (72.7%)	5/10 (50.0%)	*10/24 (41.7%)	17/25 (68.0%)
再 活 性 化 な し	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/4 (0%)

*ブロムフェナク点眼はコントロールの生食点眼と比較して、有意差を認めた。

再活性化時の三叉神経節でのプラックアッセイにおける陽性眼 (率)

DMSO 腹注	ゲルダナマイ シン
11/24 (46%)	* 3/22 (14%)

*: ゲルダナマイシンは有意差を認めた。

再活性化時の三叉神経節における HSV DNA コピー数

生食 筋注	AMP 筋注
2.30 ± 3.16 × 10 ³ (n=21)	*8.39 ± 27.2 × 10 ² (n=20)
2.55 ± 4.45 × 10 ¹ (n=22)	4.50 ± 17.4 × 10 ⁻¹ (n=22)

*: AMP は有意差を認めた。

再活性化時の三叉神経節における HSV DNA コピー数

DMSO 腹注	IKK2 阻害薬 腹注
2.37 ± 3.66 × 10 ³ (n=40)	* 5.56 ± 10.6 × 10 ² (n=40)
4.73 ± 13.3 × 10 ¹ (n=34)	3.26 ± 8.68 × 10 ¹ (n=41)

*: IKK2 阻害薬は有意差を認めた。

ヘルペス性角膜炎再発抑制の有用な方法を見出すために、HSV-1 潜伏感染再活性化マウスモデルにおいて、7 種類の薬物が再活性化抑制に効果を認めるか調べた。7 種類の薬物は、エトドラク (COX-2 阻害薬) 内服、ブロムフェナク Na (COX-2 阻害薬) 点眼、プラノプロフェン (COX 阻害薬) 点眼、アスコ

ルビン酸（ビタミンC）内服、亜鉛内服、AMP 筋肉注射、ゲルダナマイシン（熱ショック阻害薬）腹腔下注射であった。これらのうち、ブロムフェナック Na 点眼、AMP 筋肉注射、ゲルダナマイシン腹腔下注射は、有意な HSV-1 再活性化抑制効果を認めた。

今後、家兎での検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

- ① Shimomura Y, Higaki S, Watanabe K. Suppression of Herpes Simplex Virus 1 reactivation in a Mouse Eye Model by Cyclooxygenase Inhibitor, Heat Shock Protein Inhibitor, and Adenosine Monophosphate. 査読あり. Jpn J Ophthalmol. 2010;54:187-90.
- ② Kaneko H, Higaki S, Fukuda M, Shimomura Y, Ishioka K, Fukushima E, Sato Y, Suzutani T. The quantitative detection of herpes simplex virus, varicella zoster virus, and cytomegalovirus DNAs in recipient corneal buttons. 査読あり. Cornea. 2010;29:1436-9.
- ③ Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, Shimomura Y. Detection and quantification of pathogenic bacteria and fungi using real-time polymerase chain reaction by cycling probe in patients with corneal ulcer. 査読あり. Arch Ophthalmol. 2010;128:535-40.

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Shimomura Y., <Key Note Lecture> The Kinetics of Herpesvirus on Ocular Surface and Suppression of its Reactivation, The 16th Annual Meeting of the Kyoto Cornea Club, December 3rd-4th. 2010, Kyoto, Japan
- ② 下村嘉一, [角膜専門教育プログラムセミナー] 角膜感染症その 1（ウイルス、アメーバ）, 3i 角膜塾, 2010 年 8 月 8 日, 京都
- ③ 下村嘉一, [特別講演] ヘルペス性眼疾患のトピックス, 岐阜県眼科医会総会・講習会, 2010 年 7 月 25 日, 岐阜

- ④ 下村嘉一, [イブニングセミナー] 角膜ヘルペス - 温故知新 -, 第 53 回日本コンタクトレンズ学会総会, 2010 年 7 月 9 日, 東京

〔図書〕（計 13 件）

- ① 下村嘉一, 金芳堂, 眼の感染症, 2010 年, 総ページ 275
他 12 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下村嘉一 (SHIMOMURA YOSHIKAZU)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：20162737

(2) 研究分担者

福田昌彦 (FUKUDA MASAHIKO)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：40218938

阿部考助 (ABE KOUSUKE)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：00222646

檜垣史郎 (HIGAKI SHIRO)
近畿大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：90238262

菅原大輔 (SUGAHARA DAISUKE)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：30309314

杉岡孝二 (SUGIOKA KOUJI)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：50399119

(3) 連携研究者

()

研究者番号：