



Spread of HSV-1 to the suprachiasmatic nuclei and retina in T cell depleted BALB/c mice

松原, 令

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2208

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002208>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	まつばら 松原 令 (徳島県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1623号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成10年3月6日
学位論文題目	Spread of HSV-1 to the suprachiasmatic nuclei and retina in Tcell depleted BALB/c mice (T細胞欠損BALB/cマウスにおける視交叉上核および網膜への単純ヘルペスウイルスの感染)
審査委員	主査 教授 山本 節 教授 玉木 紀彦 教授 堀田 博

論文内容の要旨

1: 序 文

1型単純ヘルペスウイルスの一種であるKOS株を胸腺摘出術を行っていないBALB/cマウスの片眼の前房に接種するとウイルスは接種眼から脳内へと播種する。その経路は前房内より接種後第2日に毛様神経節, 第3日には接種側のEdinger-westphal神経核(以下EW核), 第5日に接種側の視交叉上核(以下SCN), そして視神経を経由して接種後7日目にはウイルスは非接種眼に網膜炎を起こす。非接種側のSCNは第7日にはウイルスに感染するが接種眼の視神経及び網膜には感染を起こさない。

それに対して胸腺摘出術を施行したBALB/cマウスにてCD4およびCD8 T細胞欠損マウスを作製し, ウイルス接種を行うと非接種眼のみならず接種眼にも視神経および網膜へのウイルス感染が認められる。このことよりT細胞が接種眼の網膜へのウイルス感染を抑制していることが示唆される。T細胞が関与している場所としては接種眼の網膜, あるいは脳内が疑われる。今回我々は前房内へのヘルペスウイルス接種後のT細胞の役割をあきらかにするために, 胸腺摘出術を施行したマウスでCD4 T細胞およびCD8 T細胞欠損マウスモデルを作製しウイルスの感染の時期と場所を固定した。

2: 実験方法

- ・動物: 生後5-6週のBALB/c系雌鼠をもちいた。
- ・ウイルス: 1型単純ヘルペスウイルスの一種であるKOS株, およびRH116株を用いた。
- ・前房内接種: マウスを麻酔の後 2×10^4 PFUのKOS株と 2×10^5 のRH116株の混合液を2 μ l前房内に接種した。
- ・胸腺摘出術: すべてのマウスに胸腺摘出術を施行した。ラット抗マウスL3T4(CD4)モノクローナル抗体, およびラット抗マウスLyt2.2(CD8)モノクローナル抗体をCD4およびCD8 T細胞を欠損させるために用いた。

・ β -ガラクトシダーゼによる染色：マウスから取り出された眼球および脳はOCTコンパウンド内に胞埋し、 $10\ \mu\text{m}$ の切片を作成した。それらの切片をスライドガラス上にとり、固定の後X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside) と反応させた。ヘルペスウイルスによる感染は青い点として観察される。

・実験計画：4群のマウス群（各群50匹）を作成した。すべてのマウスに実験開始2週間前に胸腺摘出術を施行し、ヘルペスウイルス接種2日前に、それぞれ抗CD4抗体を投与したものを1群、抗CD8抗体を投与したものを2群、抗CD4抗体および抗CD8抗体を投与したものを3群、そしてPBSを投与した群を4群とした。ヘルペスウイルスを前房内に接種した後第3、4、5、6、7日に各々の群10匹ずつ屠殺し眼球および脳を摘出した。その後上記した方法にて染色した。

3：結 果

網膜炎および視神経への感染：ヘルペスウイルス接種後全ての群の眼球を接種後第6日、7日に観察した。各群において非接種眼に第7日に網膜炎がほぼ全例に認められた。しかし、第3群（抗CD4抗体および抗CD8抗体を投与した群）においてのみ接種眼にも網膜炎が認められ、さらに視神経もウイルスによって感染していた。これはCD4 T細胞およびCD8 T細胞の欠損によりウイルスが接種眼の視神経に感染し、さらに網膜炎が引き起こされたと考えられる。

ウイルス感染の場所および時間：ウイルス非接種眼における視神経および網膜へのウイルス感染は接種側のSCNから引き起こされていると報告されている。また同様に非接種側のSCNよりウイルス接種眼にウイルスが伝播すると考えられる。ウイルス接種後第3日に接種側のEW核がウイルスに感染するが各群において差はなく、非接種側のEW核には実験期間を通じて感染は認められなかった。第4群（対照群）のマウスは接種側のEW核から接種側のSCNに第5日にウイルス感染をおこし、非接種側のSCNに第7日に感染を起こす。非接種側のSCNが感染するにもかかわらず、接種側の視神経、および網膜は感染をおこさない。今回の実験では感染する時期は第3群においてのみ他の群と異なっていた。この群では接種後第4日に接種側のSCNの70%が感染をおこしていた。これに対して、第1群および第2群では10%、第4群では0%の感染率だった。接種後第5日には非接種側のSCNは第3群で80%の感染率だが、他の3群では0%の感染率だった。第6日には第1群および第2群において非接種側のSCNに20%の感染を認め、第7日にはほとんどの非接種側のSCNはウイルス感染をおこしていた。

4：考 案

1型ヘルペスウイルスのKOS株を前房内に接種したモデルにおいて、なぜ接種眼の網膜は感染をおこさないのかが、この実験モデルが発見されてから討論されていた。今回の実験にて非接種側のSCNが早期に感染することにより接種眼の網膜感染が引き起こされることが示唆された。さらに抗CD4抗体および抗CD8抗体を投与した群において視神経と網膜の感染時期が一致していることから、ウイルスは接種された前房より直接網膜に感染するのではなく、脳内を経由して網膜に感染することが示唆された。T細胞がウイルスを抑制する場所としては接種側のEW核、接種側のSCN、そして非接種側のSCNが考えられる。しかし、EW核では各群において感染率に差がなかったことより否定的である。非接種側の網膜炎は接種側のSCNが感染をおこすことにより引き起こされるが、第3群の接種側のSCNが接種後第4日にウイルス感染が70%認められたこと、および全ての群の接種側のSCNが第5日には感染を起こしていることより、非接種側の網膜炎に関してはT細胞は関与し

ていないとも考えられる。

しかし、T細胞は接種側のSCNから非接種側のSCNにウイルスが伝播する時期に関与していると考えられる。第3群において非接種側のSCNが第5日に感染し、そのことにより第7日には接種眼に網膜炎が引き起こされている。過去の報告では非接種側のSCNは第7日に感染を起こすが、接種側の網膜炎は観察されなかったとされている。このことよりCD4 T細胞、CD8 T細胞、あるいはCD4およびCD8 T細胞によって接種側のSCNから非接種側のSCNへのウイルス感染が接種後第7日まで抑制されると推察されている。非接種側のSCNは接種側に比して2日感染が遅れる。このことにより接種眼の視神経および網膜が感染を受けないとしている。

通常のBALB/cマウスではヘルペスウイルスの前房内接種後にT細胞の遊走が接種側のSCNで第4日に、非接種側のSCNでは第5日に認められる。今回の実験よりCD4 T細胞およびCD8 T細胞の欠損が早期の接種側SCNの感染に関与していると推察される。これらのことより、SCN周辺に遊走してくるT細胞が、非接種側のSCNのウイルス感染を接種後第7日防御していると考えられる。このT細胞が遊走する機序は今のところ明らかでない。すくなくとも接種後第5日までにウイルスに対して防御機構が働くため、細胞障害性T細胞そのものの働きではなく、その機序としてウイルスの増殖や感染の速度を減じる作用のあるサイトカインの一種のインターフェロン、あるいは腫瘍壊死因子の関与が考えられる。また細胞接着因子は血管内皮のウイルス感染によって活性化される。通常のマウス、CD4 T細胞欠損マウス、そしてCD8 T細胞欠損マウスではこの接着因子の活性化によってT細胞がSCN周辺に遊走し、そのT細胞によってサイトカインが産出され、ウイルス感染を抑制すると考えられる。

5：結 論

今回の実験で非接種側の視交叉上核における1型単純ヘルペスウイルスの感染時期が接種眼の網膜炎の発症に関連していることが発見された。また前房内のヘルペスウイルス接種後にT細胞がウイルスの伝播を制御していることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【審査の内容】

桐沢型ぶどう膜炎は網膜動脈周囲炎，眼底周辺部の網膜剥離を伴う片眼性の急性汎ぶどう膜網膜炎である。水痘，帯状ヘルペスウイルス（VZV）あるいは，単純ヘルペスウイルス（HSV）の眼内局所感染によって発症するとされている。1型単純ヘルペスウイルスの一種であるKOS株を胸腺摘出術を行っていないBALB/cマウスの片眼の前房に接種すると接種後7日目にはウイルスは非接種眼に網膜炎を起こすが，接種眼の網膜には感染を起こさない。それに対して胸腺摘出術を施行したBALB/cマウスにてCD4およびCD8 T細胞欠損マウスを作製し，ウイルス接種を行うと非接種のみならず接種眼にも網膜へのウイルス感染が認められる。今回筆者は，胸腺摘出術を施行したマウスでCD4 T細胞およびCD8 T細胞欠損マウスモデルを作製しウイルスの感染の時期と場所を固定した。

【方 法】

生後5－6週のBALB/c系雌鼠を用い，4群のマウス群（各群50匹）を作成した。胸腺摘

出術を施行し、ヘルペスウイルス接種2日前に、それぞれ抗CD4抗体を投与したものを1群、抗CD8抗体を投与したものを2群、抗CD4抗体および抗CD8抗体を投与したものを3群、そして対照群を4群とした。1型単純ヘルペスウイルスの一種であるKOS株、およびRH116株の混合液を2 μ l前房内に接種した。ヘルペスウイルスを前房内に接種した後第3、4、5、6、7日に各々の群10匹ずつ屠殺し眼球および脳を摘出した。

【結 果】

各群において非接種眼に第7日に網膜炎がほぼ全例に認められた。しかし、第3群（抗CD4抗体および抗CD8抗体を投与した群）においては接種眼にも網膜炎が認められ、さらに視神経もウイルスによって感染していた。今回の実験では視交叉上核が感染する時期は第3群においてのみ他の群と異なっていた。この群では接種後第4日に接種側の視交叉上核の70%の感染率だが、第1群および第2群では10%、第4群では0%の感染率だった。接種後第5日には非接種側の視交叉上核は第3群で80%の感染率だが、他の3群では0%の感染率だった。

【結 論】

桐沢型ぶどう膜炎モデルのこの実験系において、なぜ接種眼に網膜炎が発症しないのかが、議論されていた。今回の実験にて非接種側の視交叉上核が早期に感染することにより接種眼の網膜感染が引き起こされることが示唆された。通常のBALB/cマウスではヘルペスウイルスの前房内接種後にT細胞の遊走が接種側の視交叉上核で第4日に、非接種側の視交叉上核では第5日に認められる。CD4 T細胞およびCD8 T細胞の欠損が早期の接種側視交叉上核の感染に関与していると推察される。これらのことより、視交叉上核周辺に遊走してくるT細胞、非接種側の視交叉上核のウイルス感染を抑制し、接種側の網膜炎の発症を防止していると考えられる。

今回の実験で非接種側の視交叉上核における1型単純ヘルペスウイルスの感染時期が接種眼の網膜炎の発症に関連していることが発見された。また前房内のヘルペスウイルス接種後にT細胞がウイルスの伝播を制御していることが示唆され、桐沢型ぶどう膜炎（急性網膜壊死）の発症の機序に関して重要な知見を得、価値ある研究と認める。よって、本研究者は博士（医学）として学位を得る資格があると認める。