

## POINT

- 自家調製シクロスポリン水溶性点眼液0.05%，自家調製タクロリムス眼軟膏0.02%を難治症例に使用している。
- 免疫抑制薬全身投与を行う際は血中薬物濃度の測定や、肝・腎機能をはじめとする定期的な採血検査が必要になる。

ーリン(蛋白脱リン酸化酵素)の活性を抑制することにより炎症性サイトカインの産生を阻害、同時にT細胞の機能、増殖を抑制し、免疫抑制効果を示す。T細胞に選択的に作用するが、その効果はステロイド薬に比べて緩徐な印象がある。術後長期間の、局所および全身投与がハイリスク患者のコントロールに有効であるとされているが<sup>8~10)</sup>、全身投与では、肝・腎障害をきたすことがあり、十分な全身管理とインフォームドコンセントが必要になる。

**局所投与：**眼科領域では現在、シクロスポリン点眼薬(パピロックミニ<sup>®</sup>点眼液0.1%)、タクロリムス点眼薬(タリムス<sup>®</sup>点眼液0.1%)が発売されている。しかし残念なことに春季カタルなどの重症アレルギー性結膜炎に限定した使用であるため、角膜移植術後に使用することはできない。現在筆者らは、自家調製シクロスポリン水溶性点眼液0.05%(表2)、自家調製タクロリムス眼軟膏0.02%(表3)を難治症例に使用している。

**全身投与：**最も使用されるのはシクロスポリン(サンディミュン<sup>®</sup>、ネオーラル<sup>®</sup>)である。サンディミュン<sup>®</sup>は吸収が不安定で血中濃度が一定しなかったが、ネオーラル<sup>®</sup>では血中濃度のコントロールが比較的容易になった。そのほかタクロリムス(プログラフ<sup>®</sup>)、アルキル化剤であるシクロホスファミド(エンドキサン<sup>®</sup>)などがあるが、いずれも血中薬物濃度の測定や、肝・腎機能をはじめとする定期的な採血検査が必要になる。

表2 シクロスポリン水溶性点眼液0.05%作製方法

### 材料

cyclosporin 50 mg  
 $\alpha$ -cyclodextrin 8 g  
NaCl 695 mg  
注射用蒸留水 100 mL

### 調製方法

- 1)  $\alpha$ -cyclodextrin を水浴で40℃程度に加温しながら蒸留水に溶解
- 2) 室温に戻しNaClを加え溶解
- 3) cyclosporin を加え4℃で1晩、攪拌溶解
- 4) 0.1N水酸化ナトリウム、および0.1N塩酸によりpH 7.0に調製
- 5) 精製水を加え総量100 mLに希釈
- 6) メンブレンフィルターで除菌

(文献11)より引用)

表3 タクロリムス眼軟膏0.02%作製方法

### 材料

0.1%プロトピック<sup>®</sup>軟膏 5 g  
0.3%タリビッド<sup>®</sup>眼軟膏 20 g

### 調製方法

- 1) 0.1%プロトピック<sup>®</sup>軟膏と0.3%タリビッド<sup>®</sup>眼軟膏を1対4の割合で混合
- 2)  $\alpha$ -cyclodextrin を水浴で40℃程度に加温しながら蒸留水に溶解
- 3) 軟膏調剤器で50秒間混合
- 4) 滅菌シリンジ5 mLに3gずつ分注し、ルアースリップチップキャップでキャップする

(文献12)より引用)

## POINT

- 拒絶反応軽症例では、ステロイド薬の点眼回数を増やし、結膜下注射を行う。
- 拒絶反応重症例では、ステロイド薬全身投与の追加、免疫抑制薬の併用を行う。

### ③抗 VEGF 抗体

血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) は、血管内皮細胞に対する増殖因子および血管透過性更新因子である。抗 VEGF 抗体 bevacizumab (アバスタチン®) は、マウス抗 VEGF モノクローナル抗体を遺伝子組換えによりヒト化したもので、もともとは大腸癌に対する抗腫瘍薬である。眼科領域では加齢黄斑変性症をはじめとする網脈絡膜新生血管に対し硝子体注射が絶大な効果を発揮すると報告されている<sup>13)</sup>。近年前眼部でもアバスタチン®5mg/0.2mL 水溶性点眼や結膜下注射により角膜内新生血管が抑制されたとの報告がある<sup>14,15)</sup>。前述したように、角膜内新生血管は角膜移植のリスクファクターの一つであるため、術前に新生血管のコントロールが可能になれば、リスクの軽減につながる事が期待される。

## 2. 拒絶反応発症時のプロトコール

### ①軽症例

前眼部に軽い細胞浮遊が認められる程度の軽症例ではステロイド点眼回数を増やし、ステロイド結膜下注射を行う。若年の移植例やリスクの高い患者に角膜抜糸などの処置を行う場合、拒絶反応のきっかけとなることがあるため、これに準じてあらかじめステロイド局所投与を増やすのもひとつの方法である。

#### 【処方例】

0.1%リンデロン®点眼 1時間毎 デカドロン®結膜下注射

### ②重症例

前房内炎症のみならず Khodadoust line や角膜後面沈着物、限局性あるいは角膜全面に及ぶ角膜浮腫、混濁を認める重症例では、ステロイド薬の全身投与も追加する。治療開始が発症後早ければ早いほど透明性が回復する可能性は高い。一般的な全層角膜移植の場合にはステロイド投与を中心に行い、炎症の程度をみて徐々に漸減する。しかし、輪部移植など長期間にわたり免疫抑制を行わなければならない症例や、ステロイドレスポンスなどでステロイド薬の使用がむずかしい症例では、免疫抑制薬も併用する。ステロイド頻回点眼のほか、重症例ではシクロスポリン水溶性点眼薬 0.05%、あるいはタクロリムス眼軟膏も消炎効果が期待できる。

#### 【処方例】

##### 1) 全身投与

ソル・メドロール®注 500mg の点滴投与を 3, 4 日間、その後炎症の程度をみて、炎症所見が残存している場合は 125mg に減量。初期治療で効果が認められた場合にはプレドニン®内服 20~30mg 内服に切り替え 1 週間を目安に徐々に漸減。あるいはリンデロン注®8mg 点滴投与から開始し、3, 4 日毎に 2mg ずつ漸減。その後上記と同様に内服に変更。

ネオーラル®内服 3~5mg/kg。トラフレベルを 100ng/mL 程度に維持する。肝機能・腎機能障害を起こすことがあるため、定期的なチェックが必要である。

##### 2) 局所投与

0.1%リンデロン®点眼 1時間毎

デカドロン®結膜下注射

0.05%シクロスポリン点眼液(院内調製) 6回/1日

0.02%タクロリムス眼軟膏(院内調製) 1~4回/1日

## POINT

- 術式選択、術後管理を適切に行うことが、拒絶反応の予防につながる。
- 術前に眼圧コントロールが不良な症例やステロイドレスポンダーの場合、事前に降圧手術を施行しておく。
- 鼻涙管閉塞や慢性涙嚢炎を起こしている場合にはその対策を講じておく必要がある。

### 3. 予防方法

拒絶反応は何の前触れもなく急に発症することがほとんどで、拒絶反応発症率をゼロにすることはできない。しかし、術前から症例のリスクを評価して、術前処置、手術方法を選択し、症例のリスクに応じた術後管理を行うことは、拒絶反応をできるかぎり回避するための唯一の手段である。

#### ①術前管理

**眼圧コントロール：**角膜移植を施行する症例は、術前より隅角癒着を生じているなど非常に眼圧が上がりやすい状態にあることが多い。また、角膜混濁により眼圧が正確に把握しにくい場合や、眼底が透見できない、視野検査が事前に行えないため、緑内障が見落とされやすい。加えて、術後はステロイド薬の投与が必須であり、拒絶反応を発症した場合にはさらに大量のステロイド投与が必要になる可能性がある。術前に眼圧コントロールが不良な症例やステロイドレスポンダーの場合、事前に降圧手術を施行しておくほうが安全な場合がある。ステロイドレスポンダーの場合はトラベクロトミーが奏功する。濾過胞を作製する術式を選択する場合は、濾過胞の位置を慎重に決定する必要がある。角膜移植手術時に眼内レンズ縫着を併施する場合や、眼表面疾患で結膜嚢が浅い場合、濾過胞の位置によって手術が困難になる場合があるためである。

**感染予防：**角膜移植術後はステロイドを使用するため易感染状態になる。そのため、術前より

鼻涙管閉塞や慢性涙嚢炎を起こしている場合にはその対策を講じておく必要がある。また、Stevens-Johnson症候群などの眼表面疾患ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、メチシリン耐性表皮ブドウ球菌(MRSE)を保菌している症例が多いことが報告されているため<sup>16)</sup>、手術を行う場合は事前に結膜嚢内培養を施行し、術後の抗菌薬選択を変更するなどの対策が重要である。術後感染を生じると、ステロイド薬の中止を余儀なくされることがあり、それが拒絶反応の引き金となることはよく経験することである。

**新生血管対策：**前述したように、アバスチン®による新生血管抑制効果が報告されている。今後は術前から点眼や結膜下注射を行い、積極的に新生血管のコントロールをすることで拒絶反応の抑制につながる可能性が考えられる。

#### ②術中管理

**術式：**全層角膜移植では、グラフトサイズにより拒絶反応のリスクが変わってくる。そのため、症例に応じたグラフトサイズの選択が重要になる。水疱性角膜症のようになるべく多くの内皮細胞を移植したい場合、グラフトサイズは大きくなるが、円錐角膜など光学部の形状の回復を目的とする場合にはそれほど大きなグラフトサイズは必要ない。また、パーツ移植を行うことにより移植する組織を限定することで拒絶反応のリスクは軽減するため、術式の選択も考慮すべきである。白内障手術を同時に行う場合には、できるかぎり水晶体嚢を温存し、眼内レ

## POINT

- 角膜移植術後管理において、拒絶反応と同等に重要なのが眼圧管理である。

ンズを囊内固定できるよう心がける。白内障手術を行う前に前部硝子体切除を行ったり、高浸透圧利尿薬点滴などで降圧することにより安全に白内障手術を行うことができる。また、虹彩癒着などを生じておりやむをえず虹彩に侵襲を加える場合にも、できるかぎり侵襲を少なくするよう心がける。

**消炎：**手術当日は術前からステロイド薬全身投与を行うことが望ましい。laser iridotomy (LI) に起因する水疱性角膜症で、術前に炎症所見がないにもかかわらず術中フィブリンが析出することを経験する。また、虹彩癒着がある症例などで癒着を解除する際に出血し、術直後より前房内に強い炎症が起こり、再癒着が生じる場合がある。術前からステロイド投与を行うことによりこれらのリスクを軽減することができる。

### ③術後管理

**ステロイド、免疫抑制薬：**角膜移植術直後は、ステロイド薬あるいは免疫抑制薬を使用するが、局所投与のみか、あるいは全身投与も行うのか、全身投与を行う場合の使用薬剤、投与量、投与期間などについては各施設間でばらつきがあり、ベストのプロトコールは存在しない。症例ごとのリスクを事前に評価し、それに応じた治療計画を立てることが重要である。

### ④リスクの低い患者の術直後プロトコール例

- 1) 全身投与  
術当日よりソル・メドロール®125mg点滴投与、3日間。あるいはリンデロン®注2mg点滴。その後プレドニン®内服20mgを1週間から10日かけて漸減。
- 2) 局所投与  
術直後にデカドロン®結膜下注射。術翌日より0.1%リンデロン®点眼4～6回。6ヵ月から1年後に0.1%フルメトロン®点眼に変更。

### ⑤リスクの高い患者の術後プロトコール例

- 1) 全身投与  
術当日よりソル・メドロール®125mg点滴投与、3日間。あるいはリンデロン®注2～4mgを点滴。その後プレドニン®内服20mgを2、3週間かけて漸減。ネオーラル®内服50～100mg/kg。リスクの高い患者では長期の服用が必要になることがある。2、3ヵ月を目安に投与するが、眼表面の炎症症状や全身状態によってそれ以上の投与が必要になる場合もある。
- 2) 局所投与  
術直後にデカドロン®結膜下注射。術翌日より0.1%リンデロン®点眼4～6回。眼圧上昇、感染、角膜上皮障害などの合併症が起こらない場合には基本的に継続。  
0.05%シクロスポリン点眼液(院内調製)6回/1日  
0.02%タクロリムス眼軟膏(院内調製)1～4回/1日  
いずれの場合も、一律に薬剤投与を行うのではなく、術後の状態を診察しながら薬剤の増減を行うべきである。

## VI 角膜移植術後の眼圧管理

角膜移植術後管理において、拒絶反応と同等に重要なのが眼圧管理である。拒絶反応により

## POINT

- 眼圧コントロールが不良で、視野、視神経乳頭所見にも変化が出てきた場合には速やかに降圧治療を開始すべきである。

眼圧は変動し、また眼圧上昇により拒絶反応のリスクは変化するため、眼圧管理は避けて通ることはできない。

### 1. 角膜移植術後の眼圧測定

角膜移植術後は、角膜乱視、角膜浮腫、上皮障害のため正確に眼圧を測定することはむずかしい。どの検査方法でも不正確な可能性があるため、視神経乳頭の観察と視野の評価を併せて管理することが大切である。

#### ① Goldmann 眼圧計

角膜浮腫などにより角膜が厚くなると眼圧は高くなり、薄いと低くなる(100  $\mu\text{m}$ で約5 mmHg)。また、角膜曲率が大きいと眼圧は高くなり(3Dで約1 mmHg)、乱視にも影響を受ける(4Dで約1 mmHg)。

#### ② トノペン、アイケア手持ち眼圧計

Goldmann 眼圧計に比べると圧平部の面積が小さいため、角膜表面に比較的影響されず測定できるとされている。しかし、低眼圧域では高く測定され、高眼圧域では低く測定される傾向が報告されており、誤差を認識したうえで数値を把握する必要がある。

### 2. 治療

眼圧コントロールが不良で、視野、視神経乳頭所見にも変化が出てきた場合には速やかに降圧治療を開始すべきである。

#### ① 薬物治療

治療の第一選択は降圧薬点眼である。近年緑内障点眼薬の選択肢が増えているが、各薬剤の特徴を把握したうえで選択する必要がある。

**$\beta$ 遮断薬**：喘息、心疾患などの全身合併症がなければ最も使用しやすい薬剤の一つである。表面麻酔作用による涙液減少が報告されているが、他の薬剤と比較すると角膜上皮障害は出現しにくい。

**プロスタグランジン関連薬**：降圧効果が高い薬剤であるが、まれに炎症を惹起することがあるため、術後早期の使用は注意を要する。また、無水晶体眼や人工水晶体眼では嚢胞性黄斑浮腫を引き起こす可能性がある。

**炭酸脱水酵素阻害薬**：房水産生を抑制する降圧点眼薬であるが、角膜内皮細胞のポンプ作用にも影響し、角膜浮腫を生じた症例が報告されており、注意を要する。内服薬の効果も高いが、長期間の内服は全身的な副作用も多いため、術後短期間に限定される。

**高浸透圧薬**：術直後の高眼圧に、高浸透圧薬の点滴投与は非常に有用である。

#### ② 手術治療

薬物により十分な降圧効果が得られない場合には手術の適応になる。また、緑内障点眼薬の継続により慢性的な角膜上皮障害を引き起こすこともあるため、手術を考慮せざるをえない場合もある。また、角膜移植術前より緑内障を合併している場合や、ステロイドレスポonderで術後眼圧が上昇する確率が高い場合には、角膜

## POINT

- 術後感染が発症すると、直接的に視機能に不可逆的な影響を残すだけでなく、感染を契機として拒絶反応を発症する可能性もある。

移植術前に緑内障手術を行うことを積極的に考慮すべきである。

**トラベクトミー**：眼圧下降効果が期待できる第一選択の術式である。角膜移植術前に施行する場合には、濾過胞の位置の選択が重要である。角膜移植術後に施行する場合には、内皮細胞の保護のため、浅前房を回避するよう心がける。強膜弁縫合はタイトに行い、術後レーザー切糸を慎重に行う。

**トラベクトミー**：ステロイド緑内障に奏功する。また、結膜嚢が浅く濾過胞が作製できない場合にも適応になる。

**毛様体破壊術**：毛様体破壊術はすべての薬物治療、手術治療が無効な場合に適応となる。半導体を用いた経強膜毛様体レーザー凝固は、従来の冷凍凝固に比較すると術後成績も良好とされているが、術後の慢性的な低眼圧は角膜の透明性にも影響しているため、最後の手段である。

## VII 角膜移植術後の感染症

角膜移植術は術後感染のリスクが高い手術である。術後使用するステロイド薬による免疫機能の変化、また角膜移植ならではのドナー由来の微生物の持ち込みや、縫合糸の存在、慢性的に使用される抗菌薬点眼による結膜嚢内細菌の耐性化などが原因としてあげられる。術後感染が発症すると、直接的に視機能に不可逆的な影響を残すだけでなく、感染を契機として拒絶反応を発症する可能性もある。

### 1. 縫合糸感染 (suture abscess)

角膜移植では多数の縫合を行い、それが長期間残存するため、感染の温床となる。緩んだ縫合糸に細菌、真菌が付着し、縫合糸を伝って実質内に侵入し膿瘍を形成する。これらの菌はバイオフィルムを形成することが多く、その場合は抗菌薬が効きにくい。基本的にはステロイド局所投与を続行、減量し、抗菌薬投与を行うが、難治な場合には一時的にステロイド局所投与を中断せざるをえない場合もある。このタイミングで拒絶反応が発症する可能性があるため、リスクの高い患者では局所投与の代わりにステロイド内服(プレドニン<sup>®</sup>5~10mg)を処方する。

### 2. 角膜ヘルペス

もともとの原因疾患が角膜ヘルペスであった症例に角膜移植術後ヘルペスが再度発症する場合があるが、ヘルペスの既往のない症例でも術後、上皮型、実質型、内皮型、各病態でヘルペスを発症する場合がある。上皮型ではステロイド局所投与を行っている場合、地図状の形態をとることがあり、上皮型拒絶反応との鑑別が困難なことがある。上皮欠損が移植片のみならずレシピエントにまで及ぶ場合や、上皮欠損の辺縁に樹枝状の形態を認めた場合は角膜ヘルペスを疑う。また、ヘルペス性角膜内皮炎では内皮型拒絶反応との鑑別がむずかしいが、角膜後面沈着物の付着範囲が移植片に局限していない場合はヘルペスをはじめとするウイルス性内皮炎を疑う。ただし、鑑別が困難な症例が多いこと

も確かであり、前房水のPCRでウイルスを検索、あるいは治療に対する反応で診断せざるをえない場合も多い。

上皮型ヘルペスの場合、基本的にはステロイドを中止しアシクロビル眼軟膏(ゾピラックス®眼軟膏)が原則であるが、角膜移植術後の場合には、ステロイドの完全な中止が高率に拒絶反応を引き起こす可能性があり(図9)、ステロイド薬は減量、あるいは局所投与を全身投与に切り替えることが推奨される。

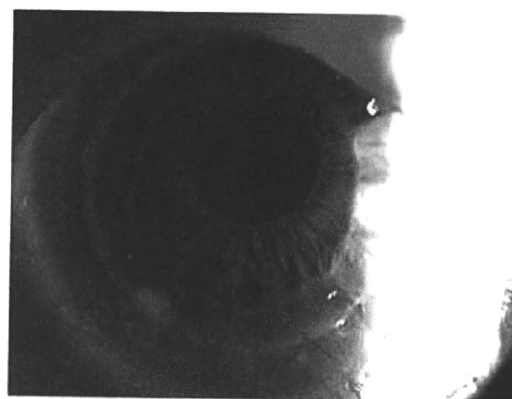


図9 縫合糸感染(suture abscess)  
この症例ではMRSAが検出された。

#### 参考文献

- 1) Ing JJ, Ing HH, Nelson LR et al : Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 105 : 1855-1865, 1998
- 2) Inoue K, Amano S, Oshika T et al : A 10-year review of penetrating keratoplasty. *Jpn J Ophthalmol* : 139-145, 2000
- 3) Wagoner MD, Ba-Abbad R, Sutphin JE et al : Corneal transplant survival after onset of severe endothelial rejection. *Ophthalmology* 114 : 1630-1636, 2007
- 4) Price MO, Thompson RW, Price FW et al : Risk factor for various causes of failure in initial corneal graft. *Arch Ophthalmol* 121 : 1087-1092, 2003
- 5) 山上 聡, 鈴木康之, 大矢智博ほか : 全層角膜移植術の拒絶反応発生因子の多変量解析による検討. *日眼会誌* 98 : 1097-1100, 1994
- 6) Allan BD, Terry MA, Price FW et al : Corneal transplant rejection rate and severity after endothelial keratoplasty. *Cornea* 26 : 1039-1042, 2007
- 7) Shiraishi A, Hara Y, Takahashi M et al : Demonstration of "owl's eye" morphology by confocal microscopy in a patient with presumed cytomegalovirus corneal endotheliitis. *Am J Ophthalmol* 143 : 715-717, 2007
- 8) Dhaliwal JS, Mason BF, Kaufman SC : Long-term use of topical Tacrolimus (FK506) in high-risk penetrating keratoplasty. *Cornea* 27 : 488-493, 2008
- 9) Rumelt S, Bersudsky V, Blum-Hareuveni T et al : Systemic cyclosporin A in high failure risk, repeated corneal transplantation. *Br J Ophthalmol* 86 : 988-992, 2002
- 10) 井上賢治, 天野史郎, 木村内子ほか : 全層角膜移植術に対するシクロスポリン点眼投与の長期予後. *日眼会誌* 103 : 306-310, 1999
- 11) 原 祐子, 岡本茂樹, 大橋裕一 : 難治性アレルギー結膜疾患に対する0.05%シク

- ロスポリン水溶性点眼薬の併用効果. あ  
たらしい眼科 17 : 1009-1012, 2000
- 12) Miyazaki D, Tominaga T, Kakimaru-  
Hasegawa A et al : Therapeutic effects of  
Tacrolimus ointment for refractory ocu-  
lar surface inflammatory disease. *Oph-  
thalmology* 115 : 988-992, 2008
- 13) Costa RA, Jorge R, Calucci D et al : Intra-  
vitreal bevacizumab for choroidal neo-  
vascularization caused by AMD (IbeNA  
Study) : resultz of phase I dose-escala-  
tion study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*  
47 : 4569-4578, 2006
- 14) Kim T, Kim SW, Kim S et al : Inhibition of  
experimental corneal neovascularization  
by using subconjunctival injection Beva-  
cizumab (Avastin). *Cornea* 27 : 349-  
352, 2008
- 15) Kim SW, Ha BJ, Kim EK et al : The effect  
of topical Bevacizumab on corneal neo-  
vascularization. *Ophthalmology* 115 :  
e33-38, 2008
- 16) Sotosono C, Inagaki K, Fujita A et al :  
Methicillin-resistant *Staphylococcus au-  
reus* and methicillin-resistant *Staphylo-  
coccus epidermidis* infections in the cor-  
nea. *Cornea* 21 : S94-101, 2002

# Induction of IL-6 in Transcriptional Networks in Corneal Epithelial Cells after Herpes Simplex Virus Type 1 Infection

Yuki Terasaka, Dai Miyazaki, Keiko Yakura, Tomoko Haruki, and Yoshitsugu Inoue

**PURPOSE.** To determine the transcriptional responses of human corneal epithelial cells (HCECs) after herpes simplex virus type (HSV)-1 infection and to identify the critical inflammatory element(s).

**METHOD.** Immortalized HCECs were infected with HSV-1, and the global transcriptional profile determined. Molecular signaling networks were constructed from the HSV-1-induced transcriptomes. The relationships of the identified networks were confirmed by real-time-PCR and ELISA. Contributions of the critical network nodes were further evaluated by protein array analyses as candidates for inflammatory element induction.

**RESULTS.** HSV-1 infection induced a global transcriptional response, with 412 genes significantly activated or suppressed compared with mock-infected HCECs ( $P < 0.05$ ,  $2 < \log_2$  or  $0.5 >$  threshold). Infection by UV-inactivated HSV-1 did not induce significant transcriptional activity. Network analysis showed that the HSV-1-induced transcriptomes were associated with JUN N-terminal kinase, p38, extracellular signal-regulated kinase, and nuclear factor  $\kappa$ -B signaling pathways. These findings indicate that interleukin (IL)-6 and vascular endothelial growth factor (VEGF) probably serve as critical nodes of signaling events. ELISA and protein array analyses verified the induction of the inflammatory elements by HSV infection. Blocking the induction of IL-6 significantly reduced the expression of 21 cytokines, including CCL7, CCL8, CXCL6, transforming growth factor- $\beta$ 2, platelet-derived growth factor, interferon- $\gamma$ , IL-2, and VEGF, thus confirming the critical role of IL-6.

**CONCLUSIONS.** HCECs respond to HSV-1 infection by initiating mitogen-activated protein kinase-related transcriptional events, and IL-6 may serve to induce expression of an array of inflammatory mediators. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:2441-2449) DOI:10.1167/iovs.09-4624

Infection of corneal epithelial cells (CECs) by herpes simplex virus type (HSV)-1 can progress to blindness. The prompt use of anti-HSV-1 medications effectively arrests the initial viral infection and replication; however, the disease can still progress to a vision-threatening stage via a secondary wave of inflammatory responses. These responses are mediated by anti-HSV-1 factors or autoimmune responses induced by molecular

mimicry.<sup>1-3</sup> Herpetic stromal keratitis (HSK) is exacerbated by frequent reactivation of latent HSV-1 in the trigeminal ganglia, which can eventually lead to severe corneal opacity that requires corneal transplantation.<sup>4-6</sup>

The CECs are the primary target of HSV infections, and they serve as an innate barrier to deeper invasion before the development of acquired immunity. The CECs respond immediately to HSV exposure by releasing inflammatory mediators that recruit leukocytes, including neutrophils and macrophages. The primary responses are needed to establish T-lymphocyte-based acquired immunity. Thus, understanding how CECs respond to HSV infection is important for understanding how the eye reacts to a viral invasion.

CECs react to HSV-1 infection by expressing proinflammatory cytokines, including interferon (IFN)- $\beta$ , interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and IL-8.<sup>7-9</sup> The expression of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-8 recruits neutrophils and mononuclear lymphocytes and activates their antiviral activity. This first wave, if uncontrolled, leads to corneal neovascularization, which further exacerbates the inflammatory responses and subsequently reduces vision.<sup>10-12</sup>

HSV-1 infections activate signal transduction, including the nuclear factor  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades.<sup>9,13-15</sup> These signaling events most likely result in the release of inflammatory mediators. However, the cellular inflammatory responses differ, depending on the type of host cells and species. HSV-1 infections alter the transcriptional responses of the host which leads to a global suppression of transcriptional events.<sup>3,16</sup>

Several hypothesis-based transcriptional analyses have been conducted that have provided considerable information. However, a global view of the responses of CECs as natural hosts to HSV-1 infection is lacking. Understanding how epithelial cells respond to HSV-1 in the perspective of the whole genome would help establish more efficacious antiviral therapy and management.

The purpose of this study was to gain insight into the complex intertwined biological events in CECs that follow an HSV-1 infection. A bioinformatics-based network analysis of global transcriptional responses was used along with a pathways database of molecular interactions.<sup>17</sup> Our data describe the critical roles of IL-6 in the HSV-1-induced MAPK cascade-related elements.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells

A human corneal epithelial cell (HCEC) line was kindly provided by Kaoru Araki-Sasaki<sup>18</sup> (RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan). The HCECs were propagated to confluence on 6- or 96-well plates in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Invitrogen-Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum and used at passages 4 to 6.

From the Division of Ophthalmology and Visual Science, Faculty of Medicine, Tottori University, Tottori, Japan.

Supported by Grand-in-Aid 20592076 for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Science, and Culture.

Submitted for publication September 10, 2009; revised October 30 and November 15, 2009; accepted November 29, 2009.

Disclosure: Y. Terasaka, None; D. Miyazaki, None; K. Yakura, None; T. Haruki, None; Y. Inoue, None

Corresponding author: Dai Miyazaki, Division of Ophthalmology and Visual Science, Tottori University Faculty of Medicine, 36-1 Nishicho, Yonago Tottori 683-8504, Japan; dm@grape.med.tottori-u.ac.jp.

## Viruses

Confluent monolayers of Vero cells were infected with HSV-1 (KOS strain; the generous gift of Kozaburo Hayashi, Immunology and Virology Section, Laboratory of Immunology, National Eye Institute, Bethesda, MD). The KOS strain was used, because it expresses VEGF, leading to corneal neovascularization, when inoculated onto the mouse eye.<sup>10</sup> After 1 hour of adsorption, the medium containing the virus was aspirated, and the monolayers were refed with fresh HSV-1-free medium. At maximum cytopathic effect, the medium was discarded, and the cells were frozen, thawed, and sonicated in a small amount of remaining medium. The supernatant, collected after centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes, was overlaid onto sucrose density gradient (10%–60% wt/vol) and centrifuged with a swing rotor (SW28; Beckman, Fullerton, CA) for 1 hour at 11,500 rpm. The resultant visible band at a lower part of the gradient containing HSV-1 was washed, with centrifugation at 14,000 rpm for 90 minutes, and resuspended in a small volume of serum-free DMEM. The virus was then aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The infectivity of the virus was determined by plaque titration assay, typically reaching up to  $1 \times 10^9$  PFU/mL.

For HSV-1 infection, the HCECs adsorbed the sucrose-density gradient-purified virus stock for 1 hour and then were refed with fresh medium.

## Microarray Procedures

HSV-infected HCECs were transcriptionally analyzed by using the whole human genome microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) corresponding to 41,000 human genes and transcripts. Mock-infected, UV-inactivated, HSV-infected HCECs were used as the control. Total RNA was isolated from the HSV-infected HCECs 12 hours post infection (PI) (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol.

Cyanine-3-labeled cRNA was prepared from 0.25  $\mu\text{g}$  of RNA (One-Color Low RNA Input Linear Amplification PLUS kit; Agilent). Fragmented cRNA was hybridized to the whole human genome oligo microarray (G4112F; Agilent) by using a hybridization kit (Gene Expression Hybridization kit, G2545A; Agilent) and was scanned with a microarray scanner (G2565BA; Agilent). The acquired data were bioinformatically analyzed (GeneSpring GX 10; Agilent), and ANOVA was used to extract the genes that were differentially induced or suppressed after HSV infection.

## Pathways Analysis

The set of extracted genes was analyzed for transcriptional networks of molecular events (Ingenuity Pathways Analysis 7.0, IPA; Ingenuity Systems, Redwood, CA, computer program based on the Ingenuity Pathways Knowledge Base). The resulting networks were evaluated by the significance scores, which were expressed as the negative logarithm of the probability. The obtained score indicates the likelihood that the assembly of a set of focus genes in a network can be explained by chance alone.

## Real-Time RT-PCR

Total RNA was isolated from the HSV-infected HCECs and reverse transcribed (QuantiTect Reverse Transcription Kit; Qiagen). The cDNAs were amplified and quantified on a thermocycler (LightCycler; Roche Applied Science, Mannheim, Germany, with the QuantiTect SYBR Green PCR kit; Qiagen).

The sequences of the real-time PCR primer pairs were: VEGF: forward 5'-GCAGCTTGAGTTAAACGAACG-3', reverse 5'-GGTTC-CCGAAACCCTGAG-3'; IL-6: forward 5'-GATGAGTACAAAAGTCCT-GATCCA-3', reverse 5'-CTGCAGCCACTGGTTCTGT-3'; IFN- $\alpha$ 1: forward 5'-GGAGTTTGATGGCAACCAAGT-3', reverse 5'-CTCTCCTCCT-GCATCACACA-3'; and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): forward 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3', reverse 5'-GCC-CAATACGACCAAAATCC-3'.

Equal loading and amplification were ensured by normalizing all products to the GAPDH transcript as an internal control.

## ELISA

The levels of secreted IL-6 and VEGF was determined by assaying supernatants collected from HSV-infected HCECs with commercial ELISA kits (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Anti-human IL-6 antibody (clone: MQ2-13A5, Biolegend, San Diego, CA) was used to neutralize IL-6 activity.

## Cytokine Array Analysis

For inflammatory cytokine profiling after HSV infection, supernatants were collected from HCECs 12 hours PI and assayed with a protein array system (Human Cytokine Antibody Array; RayBiotech, Norcross, GA). This system determines the level of expression of 80 cytokines. The intensity of the chemiluminescence signals was digitized (LAS-1000plus; Fujifilm, Tokyo, Japan, and MultiGauge software ver.2.0; Fujifilm) and normalized by using the positive control signals in each membrane.

## Statistical Analyses

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by using *t*-tests or ANOVA, as appropriate.

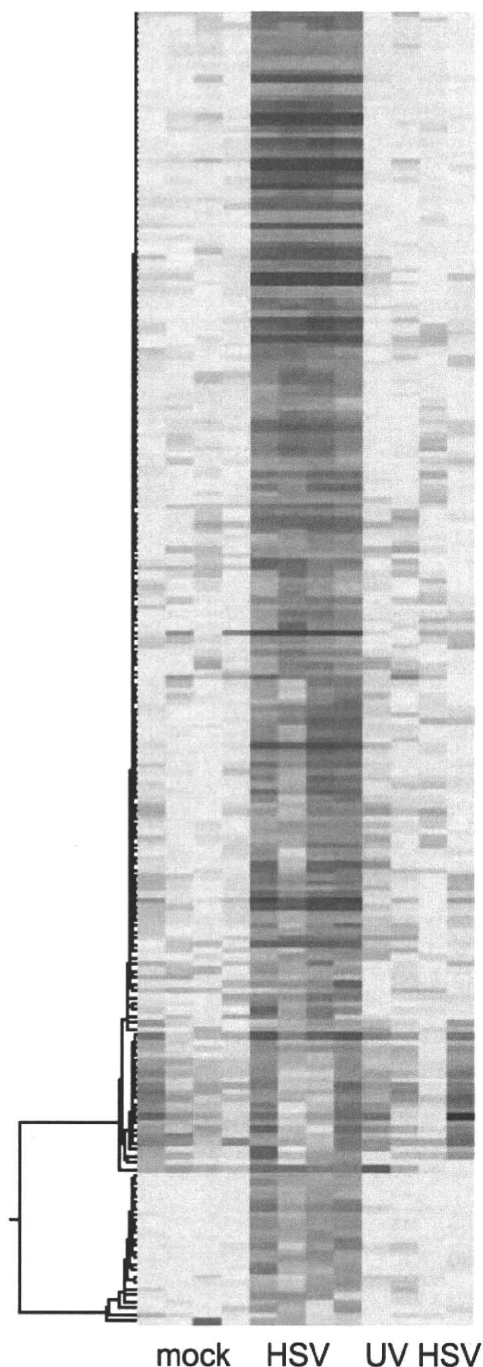
## RESULTS

### Microarray Analysis of HSV-Infected HCECs

To dissect the transcriptional responses of HCECs to HSV-1 infection, we first analyzed the IFN responses of HCECs by using real-time PCR. After HSV-1 infection, the level of IFN- $\alpha$ 1 transcript was significantly increased at 12 hours PI—that is, the IFN- $\alpha$ 1 expression relative to GAPDH was  $2.7 \pm 0.2$  (relative copies) at multiplicity of infection (MOI) 1 of HSV-1 and  $1.6 \pm 0.1$  (relative copies) for mock infection ( $P < 0.01$ ). The level was increased at 24 hours PI to  $31.3 \pm 7.7$  (relative copies) IFN- $\alpha$ 1/GAPDH at MOI 1 of HSV-1 and  $2.9 \pm 0.5$  (relative copies) for mock infection ( $P < 0.05$ ). At 6 hours PI, no appreciable increase was observed. These findings indicated that the response to the HSV infection occurred at 12 hours PI and increased thereafter.

Next, we conducted a global transcriptional profiling of HSV-infected HCECs by microarray analysis of HSV-infected, mock-infected, and UV-inactivated HSV-infected HCECs at the end of the inflammatory responses. We identified 13,594 genes that were differentially expressed in HSV-infected cells at 12 hours PI (ANOVA;  $P < 0.05$ ). To extract sets of virus-responsive genes, we then applied ANOVA with the threshold of twofold expression changes. This analysis resulted in the detection of 412 genes with significantly different expression in the three groups ( $P < 0.05$ ); 365 genes were upregulated and 47 were downregulated in the HSV-infected HCECs.

These genes were analyzed for hierarchical clustering. The resulting dendrograms showed that most of the genes were upregulated after HSV infection (Fig. 1). HSV-infected HCECs showed a distinctive expression profile, in contrast with barely discernible profiles in mock- or UV-inactivated HSV-treated HCECs. The upregulated genes at the highest ratio were *RAS*, dexamethasone-induced 1 (*RASD1*), family with sequence similarity 90, member A10 (*FAM90A10*), *LOC387763*, *FLJ00049*, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A (*MAFA*), and growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma (*GADD45G*), among the annotated network-eligible genes (Supplementary Table S1, <http://www.iovs.org/cgi/content/full/51/5/2441/DC1>). Of these, *RASD1*, *MAFA*, and *GADD45G* generally represent involvement of stress-induced pathways, including the MAPK cascade.



**FIGURE 1.** Clustering analysis of HSV-1 infection-induced transcriptome in an HCEC line. Four hundred twelve differentially expressed genes (ANOVA;  $P < 0.05$ ,  $2 < \text{or } 0.5 >$  threshold, 12 hours PI) were analyzed by using hierarchical clustering. Gene direction analysis showed that HSV-1 KOS strain infection, but not UV-inactivated HSV-1 infection, induced transcriptional alteration at 12 hours PI. The expression levels are color coded (red, activated; green, suppressed).  $n = 4/\text{group}$ .

The downregulated genes at the highest ratio were short-chain dehydrogenase/reductase family 42E, member 1 (HSPC105), zinc finger-BED-type containing 2 (ZBED2), and kelch-like 24 (KLHL24). In the HCECs exposed to UV-inactivated HSV, the transcriptional profile was almost identical with mock-infected HCECs, with the exception of 11 genes that were differentially expressed.

### Network Analysis of Altered Genes in HSV-Infected HCECs

To obtain a global view of the HSV infection-induced phenomenon and determine therapeutic candidate inflammatory mediator gene(s) for herpetic keratitis, we analyzed the 412 extracted genes for signaling interactions by using a systematic biological approach. We successfully generated five major biological networks with high significance scores ( $P < 10^{-26}$ ) using a database of known signaling networks (Ingenuity Pathways Knowledge Base; Ingenuity Systems; Table 1).

Network 1 was the most significant network of focus genes: *FOS*, *JUN*, *BCL2*-associated X protein (*BAX*), and zinc finger protein 36 (*ZFP36*). Network 1 included genes annotated as cell cycle, cell death, and neurologic diseases. Network 2 contained those annotated as cancer, cellular growth and proliferation, and respiratory diseases, and were represented by the focus genes *GADD45* and dual specificity phosphatase 1 (*DUSP1*), which are related to stressful *GADD*. These were classified as MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade by network analysis. In this network, the upstream inflammatory mediators *PDGF*, *CXCL1*, and insulin-like growth factor (IGF)-2 were also upregulated.

Network 3 contained genes annotated as skeletal and muscular system development and function, cancer, and cell-to-cell signaling and interaction, and involved the upregulation of the arachidonic acid cascade mediator, phospholipase A2 (*PLA2*), and a transcriptional activator downstream of  $\text{Ca}^{2+}$  or cyclic AMP (cAMP) responsive element binding protein (CREBBP). Network 4 included genes annotated as connective tissue disorders, genetic disorders, and immunologic diseases, with upregulation of the inflammatory cytokines *CCL5* and *CXCL2*, in addition to IL-6 induction.

Network 5 genes were annotated as cell cycle and skeletal and muscular system development and function and cancer, characterized by the induction of VEGF, endothelin 1 (EDN1), connective tissue growth factor (CTGF), heparin binding EGF-like growth factor (HBEGF), and cyclooxygenase (PTGS2).

Of the five signaling networks, we identified a proinflammatory focus gene, *IL-6* in network 4, as the most significant canonical inflammatory mediator in terms of the number of interactions in the signaling networks. Because IL-6 generally serves as a critical inflammatory coordinator downstream of the pattern recognition receptors, which serve as a first line of defense against pathogens, we then analyzed the HSV-induced transcriptional networks in relation to *IL-6*.

To understand the transcriptional roles of IL-6 in the constructed networks, we merged networks 1 to 5 to give an overview (Fig. 2). Because IL-6 was centrally positioned in this view of the networks, we next explored whether it orchestrates the induction of the inflammatory mediators. In the merged network, we observed VEGF as a crucial node. VEGF has gained the interest of researchers for its involvement in corneal neovascularization at the later stage of HSK, and the neovascularization is typically followed by the establishment of epithelial lesions.<sup>10</sup> Therefore, we hypothesized that there is a direct relationship of IL-6 and VEGF in the epithelial transcriptome.

### Inductive Effect of IL-6 on VEGF in HSV-Infected HCECs

We first determined whether IL-6 is expressed in HSV-infected HCECs by using real-time PCR. IL-6 was detected as early as 3 hours PI, and the level peaked at 12 hours (Fig. 3A). To confirm that IL-6 is translated, we used ELISA to assay the supernatants collected from the HSV-infected HCECs at 12 hours. Secreted IL-6 was elevated in HSV-infected HCECs in a dose-dependent manner, and the level increased until 24 hours PI (Fig. 3B). At

TABLE 1. Transcriptional Networks of HSV-Infected Corneal Epithelial Cells

Network	Focus Genes	Predicted Genes	Score = -log (P)	Functions
1	<i>ARF1, BAX, BCL2L11, Calpain, CAPN1, CCNG2, CD274, CDKN1C, CRABP1, EEF1D, FOS, GALNT11, GRASP, ID2, ING1, JUN, JUNB, MGEA5, MYCN, NFYA, OSBP2, PDCD1, PDCD4, SPRY4, VIM, ZFP36</i>	Caspase, Cyclin A, Cytochrome C, FGF, Hexokinase, Proteasome, Rb, Smad, Ubiquitin	46	Cell cycle, cell death, neurological disease
2	<i>ADM, CXCL1, DUSP1, DUSP4, DUSP6, IER2, GADD45, GADD45A, GADD45B, GADD45G, IGF2, JUN/JUNB/JUND, KLF2, MKP1/2/3/4, MXD1, THBD, Thyroid hormone receptor, PDGF-AB, PDGF-AA, PDGFA, PHLDA1, PNRC1, RASD1, VAV3</i>	ERK, GC-GCR dimer, JINK112, Laminin, N-cor, Notch, <i>Pak, Rar, Rxr, SWI-SNF, VitaminD3-VDR-RXR</i>	29	Cancer, cellular growth, and proliferation, respiratory disease
3	<i>ATAD4, BMF, Cbp/p300, CBX4, CREBBP, DLX2, EPHA4, GABARAPL1, MED26, MLL, MSX1, MYLK2, NOC2L, OSGIN1, PDXK, PLA2, PLA2G6, SENP3, WISP2</i>	Actin, Calmodulin, <i>Ck2, ERK112, FSH, Histone h3, Histone h4, Hsp70, MAPK, Pka, Pld, PP2A, RGS2, RNA polymerase II, STAT5a/b, Tubulin</i>	29	Skeletal and muscular system development and function, cancer, cell-to-cell signaling and interaction
4	<i>CARD9, CCL5, CDKN2C, CXCL2, Cyclooxygenase, DUSP2, IER3, IFN-<math>\beta</math>, IL6, IRF9, MUC2, ND2, PIM2 (includes EG:11040), RGS16, RSAD2, SELPLG, SOCS1, TLR, TLR1, TNFAIP3</i>	ALP, Hsp27, <i>IFN-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>, IgG, IL1, IL12, IRF, JAK, LDL, MHC Class I, NF-<math>\kappa</math>B, STAT, TGF-<math>\beta</math></i>	27	Connective tissue disorders, genetic disorder, immunological disease
5	<i>CTGF, CXCR4, DLL1, DUSP8, EDN1, EREG, ERN1 (includes EG:2081), MBTPS1, MYH3, Myosin, OASL, PTGS2, SNAI1, SP100, SYNJ1, THRA, VEGF</i>	ADCY, Calcineurin protein(s), G-protein- $\beta$ , <i>HBEGF, HCG, Ige, IKK, JNK, MeK, MMP, Nos, p38 MAPK, p70 S6k, Pkc(s), PLC, PLC-g, Tyrosine kinase</i>	26	Cell cycle, cancer, skeletal and muscular system development and function

Focus genes denote assigned input genes to the calculated networks. Predicted genes are genes predicted for involvement in the calculated networks.

12 hours PI, VEGF secretion was also significantly elevated in the HSV-infected HCECs (Fig. 4A). UV-inactivated HSV did not stimulate IL-6 and VEGF secretion (data not shown).

To examine the role played by IL-6, we evaluated HSV-infected HCECs for VEGF induction after blocking IL-6 with anti-IL-6 antibody (Fig. 4A) and found that a significantly lower level of VEGF was secreted from the infected HCECs. To determine whether the reduced VEGF level was due to a blockage of virus replication, we used real-time PCR<sup>19</sup> and a plaque assay to quantify the HSV-1 genome. Replication of the HSV-1 genome was not significantly affected by IL-6 blockade (cells control treated at MOI 0.1 yielded  $9.2 \pm 0.9 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L and anti-IL-6-treated at MOI 0.1 yielded  $1.0 \pm 0.2 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L,  $P > 0.05$ ). A plaque assay showed that the replication of the HSV-1 genome was not affected by the anti-IL-6 antibody (Fig. 4B). Thus, the decreased VEGF secretion induced by the IL-6 blockade appeared not to be the direct effect of altered HSV replication. In addition, when HCECs were exposed to recombinant IL-6 without HSV infection, they did not secrete VEGF (Fig. 4C). This finding indicates that activation of VEGF expression in HCECs requires both IL-6 and HSV-induced factors.

### Network Analysis of IL-6 and Related Inflammatory Cytokines in HSV-Infected HCECs

The outcome of these experiments (Figs. 3, 4) and the network analyses (Fig. 2) suggests that IL-6 plays a role in HSV-infected HCECs. In general, IL-6 is one of the major physiological mediators of acute phase reactions and is associated with or activates many inflammatory cytokines. Because IL-6 can orchestrate or modulate the inflammatory milieu of HCECs, we

next determined the cytokine species that are dependent on IL-6. HCECs were infected with HSV at MOI 1, allowed 1 hour for adsorption, and then fed control IgG or anti-IL-6 antibody, added to the DMEM. After 12 hours of incubation, the supernatants of HSV-1-infected HCECs were collected and assayed with a cytokine array. After the HSV-1 infection, the release of many inflammatory cytokines, both reported ones and unrecognized ones, was induced. IL-6 was among the top five induced genes after *GRO, CCL7, IL-6, CCL8, and IL-8*, in descending order. This result again supports our proposal that *IL-6* plays a critical role in the HSV-induced transcriptome.

When 55 HSV-induced cytokines (normalized relative intensity  $>1.0$ ) were analyzed for possible IL-6 dependency, we detected a significant reduction of 21 of them after anti-IL-6 treatment, including *CCL7, CCL8, CXCL6, TGF- $\beta$ 2, and PDGF* in descending order ( $P < 0.05$ ; Fig. 5). Consistent with the data in Figure 4, we confirmed an IL-6 dependence of VEGF.

To summarize the relationship of IL-6 and the IL-6-sensitive mediators, we further applied network analysis to them. When we used the representative network nodes with the significant edges identified in Figure 2, the interactions of IL-6 and the identified IL-6-sensitive cytokines (Fig. 5) were associated with to the MAPK cascade-related elements.

### DISCUSSION

We used a bioinformatics-based approach to analyze the response of HCECs to HSV-1 infection. Our results showed that HSV infection affected the expression of numerous genes, and most of the mRNAs were transcriptionally activated. This global transcriptional activation was also observed by Ka-

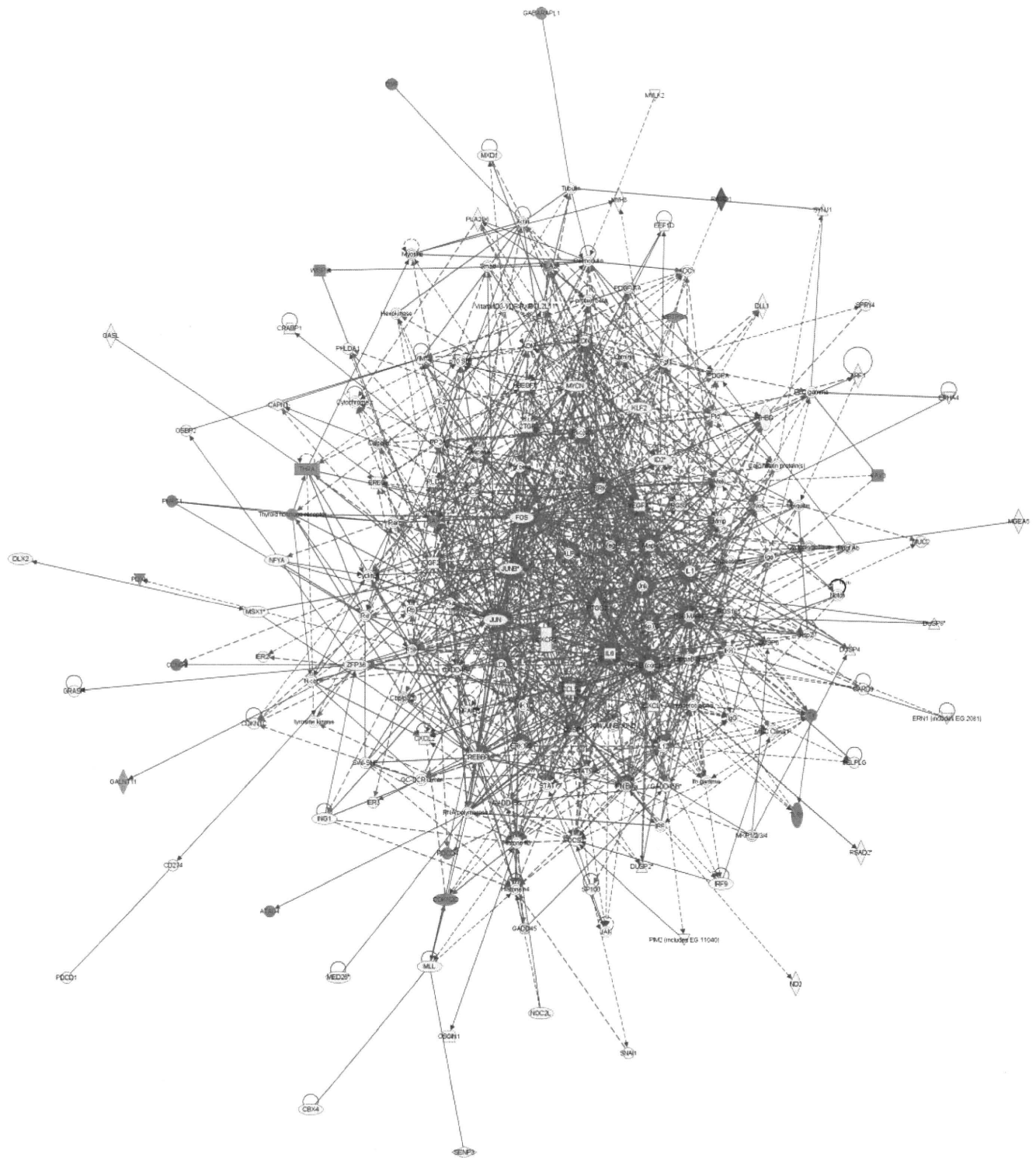
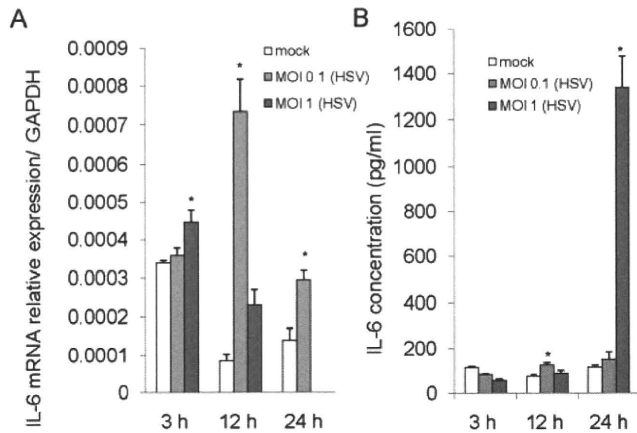


FIGURE 2. Pathway analysis of the biological processes underlying the HSV-1 infection-induced responses of HCECs. Networks 1 to 5 form the merged network. *Red*, activated; *green*, suppressed.

makura et al.,<sup>20</sup> who showed that most of the genes in the transcriptome of the HEP-2 epithelial cells were upregulated at 9 hours PI. Their results and our results are in striking contrast to the results of a microarray analyses of nonepithelial permissive cell lines (embryonic lung cells or HeLa),<sup>21–23</sup> which showed most of the cellular transcripts to be downregulated. These changes are considered to be mediated by transcrip-

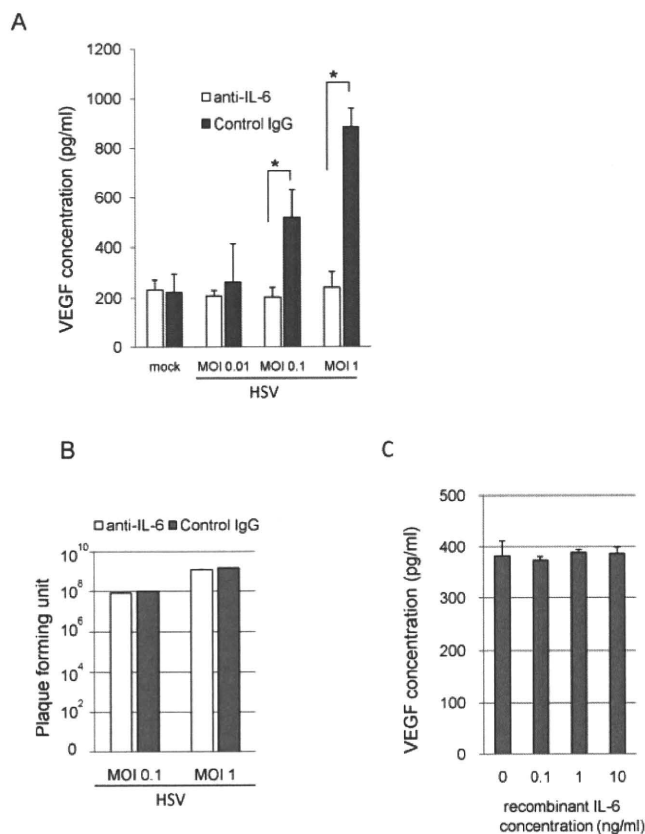
tional suppression of the host genes by viral proteins or immediate early genes.

In epithelial cells, including HCECs, our results and those of Kamakura et al.<sup>20</sup> showed a marked transcriptional upregulation, which may be related to or caused by epithelial-specific factors that act as a primary defense system and initiate the expression of an arsenal of proinflammatory mediators.

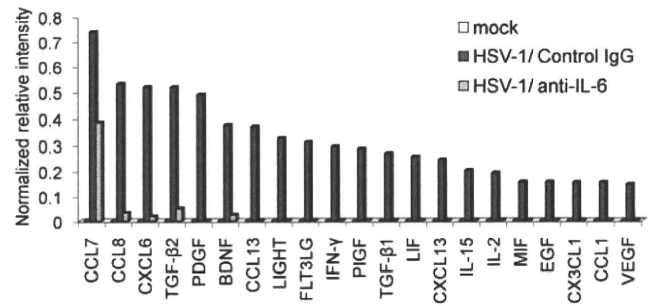


**FIGURE 3.** Kinetics of IL-6 induction in HCECs after HSV-1 infection. The mRNA of IL-6 is significantly induced at 3 hours PI and peaked at 12 hours PI, as determined by real-time RT-PCR (A). The IL-6 level in the infected supernatant was significantly elevated, as determined by ELISA (B). *n* = 6; \**P* < 0.05.

A global view of the HSV-induced host genes by network analysis clearly showed significant involvement of the JNK, p38, ERK, and NF- $\kappa$ B signaling pathways and related elements. Activation of NF- $\kappa$ B and JNK has been shown to be related to



**FIGURE 4.** Requirement of IL-6 and HSV-1 infection for VEGF induction in the HCECs. HSV-1 infection significantly induced VEGF at 12 hours PI which was suppressed by anti-IL-6 treatment (A). The supernatant of HSV-1-infected corneal epithelial cells was assayed for HSV-1 titration. There were no significant differences of virus titers in control IgG and anti-IL-6 treatment (B). Stimulation by recombinant IL-6 without HSV-1 infection failed to induce VEGF production by corneal epithelial cells (C). *n* = 4; \**P* < 0.01.



**FIGURE 5.** IL-6-sensitive induction profile of inflammatory cytokines by HSV-1-infected HCECs. HCECs adsorbed HSV-1 at MOI 1 for 1 hour and were reseeded with DMEM containing control IgG or anti-IL-6 antibody. After 12 hours of incubation, the supernatant of HSV-1-infected HCECs was assayed with a cytokine array. A panel of the inflammatory cytokines significantly suppressed by IL-6 blockade is shown. *n* = 4/group; *P* < 0.05.

the induction of inflammatory cytokines including IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ .<sup>9</sup> In our attempt to understand the molecular relationship of signaling molecules and inflammatory cytokines, network analyses identified IL-6 as the most significant element. Although IL-6 has been noted to be an important inflammatory mediator after HSV infection<sup>24</sup> of epithelial cells, our analyses showed a new role of IL-6 at the whole-genome level. IL-6 is a pleiotropic cytokine and mediates acute phase reaction that influences antigen-specific immune responses.<sup>25,26</sup> IL-6 is an important B-cell differentiation factor as well as a converter of T cells into cytotoxic T cells or Th17 lineage.<sup>27</sup> Considering the exacerbating role of IL-6 in the inflammatory response, the virulence of an HSV strain may be related to the inducibility of IL-6. For example, the MP strain has been reported to be a more potent inducer of IL-6 than the KOS strain<sup>8</sup> and is able to elicit more aberrant immune responses in the eye. Another important property of IL-6 is its neurotrophic function, which promotes neuronal survival.<sup>28</sup> The promotion of neuronal survival by IL-6 may induce ocular reactivation of latent HSV-1 in the trigeminal ganglion.<sup>29</sup>

In herpetic keratitis, IL-6 has been documented to be a factor that contributes to the massive neutrophil attraction to the corneal stroma.<sup>8,30,31</sup> Also, IL-6 has been reported to be related to corneal neovascularization via VEGF, another cardinal feature of herpetic keratitis.<sup>8,31,32</sup> The induction of VEGF in herpetic keratitis has been thought to be mediated in a paracrine manner by IL-6-producing bystander populations such as noninfected inflammatory cells.<sup>31</sup> However, the corneal epithelium has not been noted as an autocrine source of VEGF.

Our findings on HCECs' participation in an autoamplifying loop after infection provide a new and important perspective on epithelial function as a host defense mechanism. However, this effect has the potential to lead to HSK. Neovascularization is not usually observed in epithelial keratitis, but our findings suggest that the molecular background of HSK has already been set at an earlier stage of epithelial keratitis.

In the HSV-induced network (Fig. 2), IL-6 has been centrally placed in the transcriptional upregulation of CXCL1, FOS, JUNB, HBEGF, GADD45B, inhibitor of DNA binding 2 (ID2), and ZFP36.<sup>33-35</sup> Of these, FOS, JUNB, and GADD45 respond to environmental stresses by activating the MAPK pathways. FOS and JUN are especially critical transcription factors and are involved in numerous canonical pathways, including signaling by MAPK, acute phase responses, and signaling by the chemokines IL-2/IL-6/IL-17/PDGF, stress-activated protein kinase (SAPK)/JNK, TGF- $\beta$ , nuclear factor of activated T cells, and Toll-like receptor (TLR). FOS and JUN directly regulate the

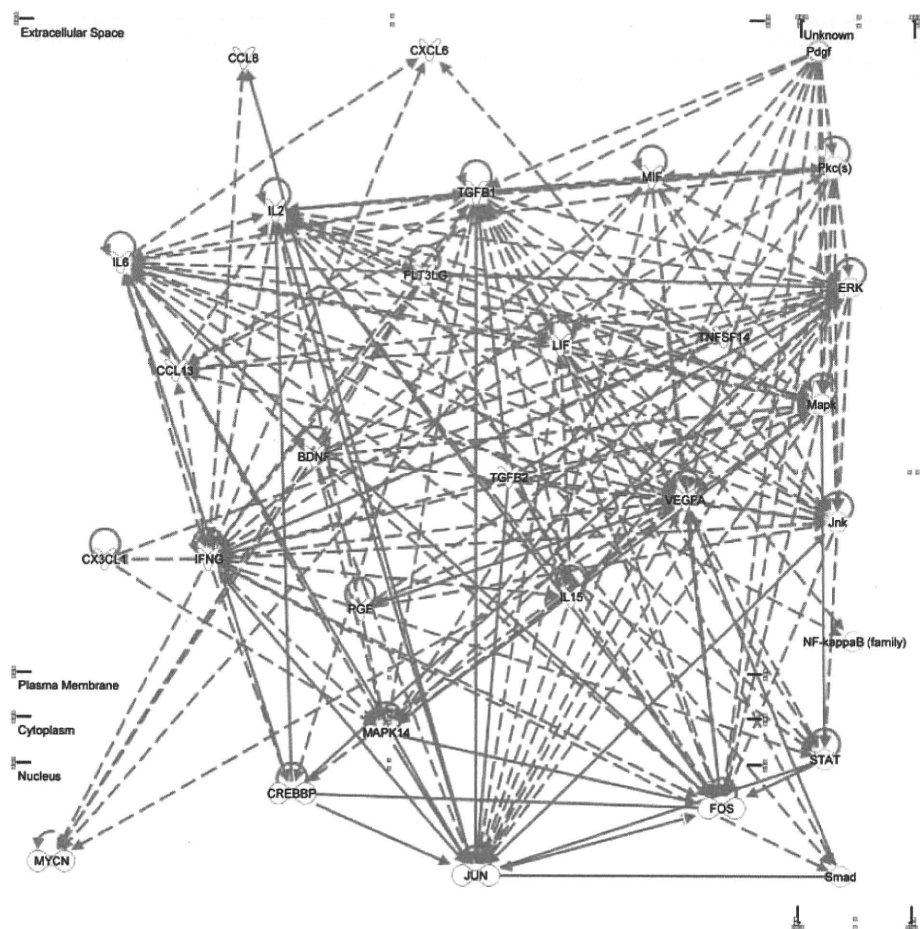


FIGURE 6. Pathway analysis of IL-6-sensitive inflammatory cytokine induction and canonical pathways underlying HSV-1-infection.

critical inflammatory mediators IL-6, VEGF, IL-2, IL-8, and cyclooxygenase (Fig. 2).<sup>33,36-42</sup> When we analyzed the cytokine profiling sensitive to the blockade of IL-6, we found numerous previously unrecognized IL-6-sensitive genes, including *TGF-β2*, *PDGF*, *BDNF*, *CCL13*, *LIGHT*, *FLT3LG*, *IFN-γ*, *PIGF*, *TGF-β1*, *IL-15*, *MIF*, and *CX3CL1*, together with previously reported genes, including *CXCL6*, *IL-2*, *CCL1*, *LIF*, *VEGF*, and *BDNF*.<sup>8,27,31,43-47</sup> These interactions were associated with IL-6, IL-2, IFN-γ, TGF-β1, and VEGF (Fig. 6) and appeared to intricately regulate each other by interacting with ERK, MAPK, JNK, FOS, JUN, and MAPK14 (Fig. 6).

The induction of IL-6 is generally dependent on the activation of the NF-κB and p38 pathways.<sup>48</sup> HSV infection stimulates transcriptional activation of the NF-κB, CRE, and activator protein (AP)-1 recognition sites in the *IL-6* gene as early as 1 hour to 2 hours PI.<sup>9,48,49</sup> and supports the suggestion that IL-6 induction at the very early stage of infection activates inflammatory mediators. However, the triggering mechanism of IL-6 has not been completely determined.

Keratocytes have been shown to express IL-6 after HSV infection in a TLR3- and TLR9-dependent manner without requiring transcriptionally competent HSV.<sup>8</sup> However, TLR9 stimulation requires very high levels of HSV DNA, far exceeding the concentration used in our study. In HSV-infected macrophages, IL-6 expression was shown to be mediated by RNA-activated protein kinase (PKR), which senses the accumulation of viral double-stranded RNA in the infected cells.<sup>48</sup> PKR-mediated IL-6 expression is independent of virion transacting protein 16 (VP16) or immediate early proteins, including infected cell protein (ICP)-0, -4, and -27, and requires transcriptionally competent HSV. This finding is consistent with our observation of defective transcriptional activation in UV-inac-

tivated HSV at the whole-genome level (Fig. 1). Induction of IL-6 expression in the presence of the HSV-induced transcriptome appears restricted to CECs or keratocytes as host cells.<sup>8,20,50-52</sup> A significant involvement of IL-6, which is characteristic of corneal cells or other host-derived factors, may specifically determine the transcriptional responses dependent on the functionality of the host cells.

Our microarray analysis detected a prominent upregulation of stress-related genes, including *RASD1*, *GADD45G*, and snail homolog 1 (*SNAIL1*). In addition, cancer formation-related genes, including *MAFA*, zinc finger protein 296 (*ZNF296*), *IGF-2*, and gastrulation brain homeobox 2 (*GBX2*), among the top activated genes, were upregulated (Supplementary Table S1, <http://www.iovs.org/cgi/content/full/51/5/2441/DC1>).<sup>20,49,51,53</sup> The expression of the *RASD1* and *GADD45* proteins ZNF296 and IGF-2 are generally observed after HSV infection in microarray analyses depending on the cell type and the strain. In contrast, a strong expression of *MAFA* appears characteristic of CECs. *MAFA* belongs to the AP-1 transcription factor family, as do JUN and FOS, and is activated by phosphorylation by the p38 MAPK pathway.<sup>54</sup> It has strong cell-transforming/transactivation capabilities and has recently gained interest in oncogenesis.<sup>55</sup>

To summarize, HSV-infection of HCECs induces an inflammatome relating to transcriptional events involving ERK, MAPK, JUNK, and NF-κB and uses IL-6 as a critical element to regulate proinflammatory cytokine induction.

### Acknowledgments

The authors thank Duco Hamasaki for editing the article.

## References

- Verjans GM, Remeijer L, Mooy CM, Osterhaus AD. Herpes simplex virus-specific T cells infiltrate the cornea of patients with herpetic stromal keratitis: no evidence for autoreactive T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2607-2612.
- Deshpande SP, Zheng M, Lee S, Rouse BT. Mechanisms of pathogenesis in herpetic immunoinflammatory ocular lesions. *Vet Microbiol.* 2002;86:17-26.
- Banerjee K, Biswas PS, Rouse BT. Elucidating the protective and pathologic T cell species in the virus-induced corneal immunoinflammatory condition herpetic stromal keratitis. *J Leukoc Biol.* 2005;77:24-32.
- Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea.* 2001;20:1-13.
- Branco BC, Gaudio PA, Margolis TP. Epidemiology and molecular analysis of herpes simplex keratitis requiring primary penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol.* 2004;88:1285-1288.
- Xie L, Song Z, Zhao J, Shi W, Wang F. Indications for penetrating keratoplasty in north China. *Cornea.* 2007;26:1070-1073.
- Miyazaki D, Inoue Y, Araki-Sasaki K, Shimomura Y, Tano Y, Hayashi K. Neutrophil chemotaxis induced by corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. *Curr Eye Res.* 1998;17:687-693.
- Hayashi K, Hooper LC, Chin MS, Nagineni CN, Detrick B, Hooks JJ. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) DNA and immune complex (HSV-1-human IgG) elicit vigorous interleukin 6 release from infected corneal cells via Toll-like receptors. *J Gen Virol.* 2006;87:2161-2169.
- Li H, Zhang J, Kumar A, Zheng M, Atherton SS, Yu FS. Herpes simplex virus 1 infection induces the expression of proinflammatory cytokines, interferons and TLR7 in human corneal epithelial cells. *Immunology.* 2006;117:167-176.
- Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol.* 2001;75:9828-9835.
- Zheng M, Klinman DM, Gierynska M, Rouse BT. DNA containing CpG motifs induces angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:8944-8949.
- Kim B, Tang Q, Biswas PS, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis. *Am J Pathol.* 2004;165:2177-2185.
- McLean TI, Bachenheimer SL. Activation of cJUN N-terminal kinase by herpes simplex virus type 1 enhances viral replication. *J Virol.* 1999;73:8415-8426.
- Zachos G, Clements B, Conner J. Herpes simplex virus type 1 infection stimulates p38/c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1. *J Biol Chem.* 1999;274:5097-5103.
- Amici C, Belardo G, Rossi A, Santoro MG. Activation of I kappa b kinase by herpes simplex virus type 1: a novel target for anti-herpetic therapy. *J Biol Chem.* 2001;276:28759-28766.
- Koelle DM, Reymond SN, Chen H, et al. Tegument-specific, virus-reactive CD4 T cells localize to the cornea in herpes simplex virus interstitial keratitis in humans. *J Virol.* 2000;74:10930-10938.
- Kuo CH, Miyazaki D, Yakura K, Araki-Sasaki K, Inoue Y. Role of periostin and interleukin-4 in recurrence of pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(1):139-143.
- Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:614-621.
- Kakimaru-Hasegawa A, Kuo CH, Komatsu N, Komatsu K, Miyazaki D, Inoue Y. Clinical application of real-time polymerase chain reaction for diagnosis of herpetic diseases of the anterior segment of the eye. *Jpn J Ophthalmol.* 2008;52:24-31.
- Kamakura M, Nawa A, Ushijima Y, et al. Microarray analysis of transcriptional responses to infection by herpes simplex virus types 1 and 2 and their US3-deficient mutants. *Microbes Infect.* 2008;10:405-413.
- Khodarev NN, Advani SJ, Gupta N, Roizman B, Weichselbaum RR. Accumulation of specific RNAs encoding transcriptional factors and stress response proteins against a background of severe depletion of cellular RNAs in cells infected with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:12062-12067.
- Stingley SW, Ramirez JJ, Aguilar SA, et al. Global analysis of herpes simplex virus type 1 transcription using an oligonucleotide-based DNA microarray. *J Virol.* 2000;74:9916-9927.
- Mossman KL, Macgregor PF, Rozmus JJ, Goryachev AB, Edwards AM, Smiley JR. Herpes simplex virus triggers and then disarms a host antiviral response. *J Virol.* 2001;75:750-758.
- Kanangat S, Babu JS, Knipe DM, Rouse BT. HSV-1-mediated modulation of cytokine gene expression in a permissive cell line: selective upregulation of IL-6 gene expression. *Virology.* 1996;219:295-300.
- Roberts ES, Burudi EM, Flynn C, et al. Acute SIV infection of the brain leads to upregulation of IL6 and interferon-regulated genes: expression patterns throughout disease progression and impact on neuroAIDS. *J Neuroimmunol.* 2004;157:81-92.
- Unsal E, Aksaray S, Koksall D, Sipit T. Potential role of interleukin 6 in reactive thrombocytosis and acute phase response in pulmonary tuberculosis. *Postgrad Med J.* 2005;81:604-607.
- Gao W, Thompson L, Zhou Q, et al. Treg versus Th17 lymphocyte lineages are cross-regulated by LIF versus IL-6. *Cell Cycle.* 2009;8:1444-1450.
- Galiano M, Liu ZQ, Kalla R, et al. Interleukin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *Eur J Neurosci.* 2001;14:327-341.
- Beyer CF, Hill JM, Reidy JJ, Beuerman RW. Corneal nerve disruption reactivates virus in rabbits latently infected with HSV-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:925-932.
- Fenton RR, Molesworth-Kenyon S, Oakes JE, Lausch RN. Linkage of IL-6 with neutrophil chemoattractant expression in virus-induced ocular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:737-743.
- Biswas PS, Banerjee K, Kinchington PR, Rouse BT. Involvement of IL-6 in the paracrine production of VEGF in ocular HSV-1 infection. *Exp Eye Res.* 2006;82:46-54.
- Hayashi K, Hooper LC, Detrick B, Hooks JJ. HSV immune complex (HSV-IgG: IC) and HSV-DNA elicit the production of angiogenic factor VEGF and MMP-9. *Arch Virol.* 2009;154:219-226.
- Suzuki R, Sakamoto H, Yasukawa H, et al. CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells. *Oncogene.* 1998;17:2271-2278.
- Brocke-Heidrich K, Kretschmar AK, Pfeifer G, et al. Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood.* 2004;103:242-251.
- Klein C, Wustefeld T, Assmus U, et al. The IL-6/gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J Clin Invest.* 2005;115:860-869.
- Williamson P, Merida I, Gaulton G. Protein and lipid kinase activation cascades in interleukin-2 receptor signalling. *Semin Immunol.* 1993;5:337-344.
- Pereda MP, Goldberg V, Chervin A, et al. Interleukin-2 (IL-2) and IL-6 regulate c-fos protooncogene expression in human pituitary adenoma explants. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;124:33-42.
- Herblot S, Chastagner P, Samady L, et al. IL-2-dependent expression of genes involved in cytoskeleton organization, oncogene regulation, and transcriptional control. *J Immunol.* 1999;162:3280-3288.
- Schmeck B, Moog K, Zahltan J, et al. Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1-dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res.* 2006;7:98.
- Wegrzyn P, Jura J, Kupiec T, et al. A search for genes modulated by interleukin-6 alone or with interleukin-1beta in HepG2 cells using differential display analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762:319-328.
- Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci.* 2008;99:1501-1506.

42. Syam AF, Sadikin M, Wanandi SI, Rani AA. Molecular mechanism on healing process of peptic ulcer. *Acta Med Indones.* 2009;41:95-98.
43. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87:2095-2147.
44. Wang J, Homer RJ, Chen Q, Elias JA. Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol.* 2000;165:4051-4061.
45. Banerjee K, Biswas PS, Kim B, Lee S, Rouse BT. CXCR2<sup>-/-</sup> mice show enhanced susceptibility to herpetic stromal keratitis: a role for IL-6-induced neovascularization. *J Immunol.* 2004;172:1237-1245.
46. Bieche I, Asselah T, Laurendeau I, et al. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology.* 2005;332:130-144.
47. Steinbrugger I, Haas A, Maier R, et al. Analysis of inflammation- and atherosclerosis-related gene polymorphisms in branch retinal vein occlusion. *Mol Vis.* 2009;15:609-618.
48. Paludan SR. Requirements for the induction of interleukin-6 by herpes simplex virus-infected leukocytes. *J Virol.* 2001;75:8008-8015.
49. Cai S, Brandt CR. Induction of interleukin-6 in human retinal epithelial cells by an attenuated Herpes simplex virus vector requires viral replication and NFkappaB activation. *Exp Eye Res.* 2008;86:178-188.
50. Taddeo B, Esclatine A, Roizman B. The patterns of accumulation of cellular RNAs in cells infected with a wild-type and a mutant herpes simplex virus 1 lacking the virion host shutoff gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:17031-17036.
51. Ray N, Enquist LW. Transcriptional response of a common permissive cell type to infection by two diverse alphaherpesviruses. *J Virol.* 2004;78:3489-3501.
52. Pasiaka TJ, Baas T, Carter VS, Proll SC, Katze MG, Leib DA. Functional genomic analysis of herpes simplex virus type 1 counteraction of the host innate response. *J Virol.* 2006;80:7600-7612.
53. Huang Z, Tunnacliffe A. Gene induction by desiccation stress in human cell cultures. *FEBS Lett.* 2005;579:4973-4977.
54. Sii-Felice K, Pouponnot C, Gillet S, et al. MafA transcription factor is phosphorylated by p38 MAP kinase. *FEBS Lett.* 2005;579:3547-3554.
55. Eychene A, Rocques N, Pouponnot C. A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:683-693.

## 1. 微生物検査が必要不可欠な眼感染症

### 3) ウイルス

鳥取大学医学部教授 視覚病態学教室  
井上幸次

#### はじめに

日常の眼科臨床におけるウイルス性眼感染症の患者の数は決して少なくないが、眼感染症においてウイルスの検査が行われることは細菌と比較して圧倒的に少ない。これは、ウイルスに関する検査が外注先の検査専門施設や眼科医自身によって行われることが多く、病院の検査室で行われることが少ないことに加えて、サンプル量が少なく検査しにくいこと、全身ウイルス感染と比較して抗体検査の価値が低いこと、なども関与していると思われる。病院の検査室ではなじみの薄い疾患となっている所以である。

本稿では、代表的なウイルス性眼感染症の臨床的特徴を解説するとともに、それに対して行われる臨床検査について述べたい。

#### アデノウイルス結膜炎 (adenovirus conjunctivitis)

##### 1) 臨床的特徴

アデノウイルスは非常に感染力の強いウイルスであり、眼科領域では流行性角結膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis, EKC)、咽頭結膜熱 (pharyngoconjunctival fever, PCF) の原因となる。本疾患は院内感染を非常に起こしやすいことから、社会問題化することもある。

##### (1) 流行性角結膜炎 (EKC)

アデノウイルス D 亜群 (8 型, 19 型, 37 型) による。潜伏期は 7~14 日、病期は 2~3 週間であり、耳前リンパ節腫脹・圧痛を伴う。眼以外の症状は伴わないが、眼所見は後述の PCF より重症

である。下の眼瞼結膜の充血・濾胞から始まり、次いで上の眼瞼結膜へ波及していく。その後、角膜にも小さい混濁を生じてくる (多発性角膜上皮浸潤) ために、視力低下を生じたり、羞明を訴えたりすることも多い。最近、日本で 8 型アデノウイルスによるといわれている EKC の多くが、実は新しい型 (54 型) によるものであることが判明して話題となっている。

##### (2) 咽頭結膜熱 (PCF)

アデノウイルス B 亜群 (3 型, 7 型, 11 型, 14 型) による。潜伏期は 5~7 日、病期は 1 週間で、小児に多く、眼以外の症状として咽頭炎・発熱・血尿・腹痛・下痢などを合併し、俗にプール熱といわれている。しかし、眼症状は比較的軽症で、下の眼瞼結膜の充血・濾胞が主体であり、上の眼瞼結膜や角膜にはあまり所見がない。

##### 2) 検査

現在、結膜ぬぐい液を用いた免疫クロマトグラフィー法 (キャピリアアデノ<sup>®</sup>、アデノチェック<sup>®</sup>) が、その迅速性・簡便性から広く使用されている。まず、患者の結膜ぬぐい液を採取し、これを金コロイド標識したマウス抗アデノウイルス抗体の入った液に入れて反応させる。これをウェルに滴下してメンブレン上で展開させ、メンブレン上に固定された抗アデノウイルス抗体のところまで流れていくと、そこで反応して赤紫のラインが形成される。10 分ほどで結果が出るので臨床の現場で使いやすく、特異性も 100% と非常に有用である。ただし、感度は 70% 程度とあまり高くないため、陰性の結果が出たからといってアデノウイルス性ではないと即断できない。免疫クロマトグラフィー

法は、簡便でその場で結果が出るため、検査室でなく眼科医の手で行われていることが多い。

ウイルスの分離や polymerase chain reaction (PCR)、ウイルス抗体価検査も行われるが、多くは疫学研究の一環として行われており、診療のためにルーチンに行われているわけではない。

なお、アデノウイルスの分離同定には時間を要し、数週間～1カ月程度かかる点が診療上は大きな欠点となる。また、PCRについては、nested PCRでアデノウイルス共通のヘキソン部分を含む領域を増幅し、3種類の制限酵素で切断したPCR産物の切断パターンをみる PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法や、PCRから直接シーケンスに持ち込む方法で血清型の同定を行うことができる。

### 3) 治療

アデノウイルスに対する直接の薬物治療は現在に至るもなく、混合感染の治療・予防のため抗菌薬点眼を使用し、初期の症状緩和と後期の多発性角膜上皮浸潤の軽減のために副腎皮質ステロイド点眼が使用されている。

## エンテロウイルス結膜炎 (enterovirus conjunctivitis)

### 1) 臨床的特徴

エンテロウイルス結膜炎は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属するエンテロウイルス70 (EV70) とコクサッキーウイルス A24 変異株 (CA24v) が原因ウイルスである。

エンテロウイルス結膜炎は、アデノウイルス結膜炎と同じ急性濾胞性結膜炎のかたちをとり、両眼性に急激に発症する充血・眼脂・流涙・異物感を主訴としている。他覚所見としては、眼瞼腫脹は必発である。球結膜下出血は必発ではないが、特徴的であり、多くの例で認められるので、一般的には急性出血性結膜炎 (acute hemorrhagic conjunctivitis, AHC) といわれている。その他に、結膜充血・結膜濾胞・点状表層角膜症・耳前リンパ節腫脹を認める。感染は接触感染であり、潜伏期は18～36時間と非常に短いのが大きな特徴であ

る。病期も1週間と、アデノウイルス結膜炎より短い。視力障害などの後遺症は残らないが、EV70では運動神経麻痺合併の報告がある。

### 2) 検査

ウイルス分離はむずかしく、とくにEV70については、最近ではウイルスが分離されなくなっている。EV70、CA24vの両ウイルスに関して、RT (reverse transcription)-PCRによってDNAは検出可能であり、分子疫学的研究として、capsid proteinをコードしているVP-1領域やVP-4領域を用いた系統解析がなされているが、臨床的にPCRを行うことはまずない。

血清中和抗体価を測定し、急性期と回復期のペア血清で4倍以上の上昇があれば診断できるが、これも実際にはあまり行われていない。

### 3) 治療

アデノウイルス同様、治療薬はなく、感染予防策を講じて、対症的に抗炎症薬、抗菌薬の点眼を処方するのみである。

## 角膜ヘルペス (herpetic keratitis)

### 1) 臨床的特徴

角膜は、表面側から上皮・実質・内皮の3層構造をとっており、無血管であるが縦横に神経が走っている。この神経は三叉神経の支配を受けており、角膜ヘルペスは三叉神経節に潜伏感染している単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus, HSV) が再活性化し、この神経に沿って角膜に至り、種々の炎症を起こす疾患である。HSVには1型と2型があり (HSV-1, HSV-2)、顔面の皮疹や口唇ヘルペスはHSV-1によるものが多く、性器ヘルペスはHSV-2によるものが多い。角膜ヘルペスはほとんどHSV-1によるものであり、HSV-2によるものはきわめてまれである。

角膜ヘルペスのもう一つの大きな特徴として、上皮でのウイルス増殖を主体とした上皮型とよばれる病態と、実質でのウイルスに対する免疫反応を主体とした実質型とよばれる病態があることがあげられる。それ以外に内皮を主体とした内皮型もあるが、病態はまだよくわかっていない。

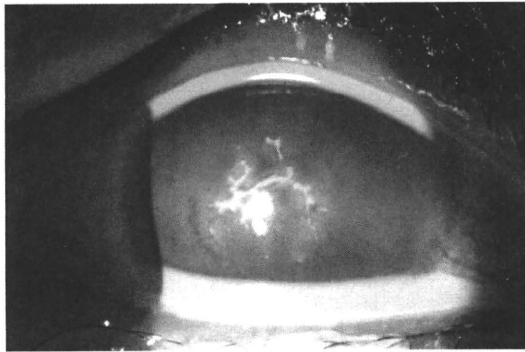


図 1 樹枝状角膜炎

涙液をフルオレセインの染色液で染め、ブルーのフィルターで観察すると、角膜上皮の欠損部が緑に染まって染色されるが、この写真では、HSV による角膜上皮病変として特徴的な形態を示す樹枝状角膜炎がきれいに描出されている。

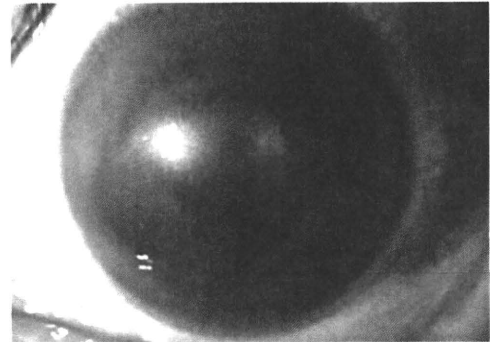


図 2 円板状角膜炎

瞳孔の鼻上側に円形の混濁を認める、それ以外の部位の角膜にも斑状の混濁を認め、角膜内での HSV に対する免疫反応の結果を示している。

### (1) 上皮型

木の枝分かれ状の特徴的な形に角膜上皮が脱落した病変を示し、樹枝状角膜炎 (dendritic keratitis) (図 1) といわれている。遷延化すると上皮欠損が拡大し、地図状角膜炎 (geographic keratitis) の形をとる。

### (2) 実質型

基本的な例では、周囲の結膜の充血とともに、角膜中央部に白色の角膜後面沈着物を伴った境界不鮮明な角膜浮腫と実質混濁を生じ、円板状角膜炎 (図 2) といわれている。再発を繰り返すうちに血管侵入を生じた場合は、好中球の浸潤によりさらに強い混濁を生じるようになり、壊死性角膜炎といわれている。

### 2) 検査

HSV については、潜伏しているウイルスが shedding といって病因にかかわらず散発性に眼表面に出てくることがあるので、生きたウイルスとして分離された場合以外は病因と断定することはできない。したがって、角膜ヘルペスの確定診断はウイルス分離によることになるが、後述するように実際の臨床現場ではウイルス分離は行われておらず、蛍光抗体法、PCR、血清抗体価測定が使用されている。各々について詳述する。

### (1) ウイルス分離

ウイルスは単独では増殖できないため、分離を行うには培養細胞を用意する必要があり、サンプルをその細胞に接種することになる。HSV の分離にはヒトの細胞である必要はなく、Vero 細胞 (ミドリザル腎細胞) など種々の細胞を用いることができる。

上皮型ヘルペスの場合は、上皮欠損部ではなく、その辺縁の上皮を擦過する。涙液を Schirmer 試験紙で吸い取り、これをサンプルとすることもできる。

ウイルス分離は特異度 100% であり、HSV の場合、診断のゴールドスタンダードであるが、結果が出るまでに時日を要し、感度も悪いため日常臨床で行う検査としては不向きである。

### (2) 蛍光抗体法

現在、単純ヘルペスについてはヘルペス (1・2) FA 試薬「生研」<sup>®</sup> (デンカ生研) などのキットが利用できる。具体的な手技としては、上皮擦過サンプルを所定のウェルに塗りつけ、風乾・アセトン固定後、モノクローナル抗体の試薬を滴下して反応させるだけである。角膜ヘルペスの場合は、樹枝状角膜炎の上皮擦過物が材料となる。採取された細胞の核内あるいは細胞全面に、緑に輝く点の集団を認めれば陽性である。蛍光抗体法は、蛍