

表 9 1 枚の CL 使用期間(1 日ディスプレイ用 CL)

| | 症例数 | % |
|----------------|-----|------|
| 1 日 | 12 | 46.2 |
| 2~3 日 | 6 | 23.1 |
| 4~7 日 | 1 | 3.8 |
| 1 週間を超え 2 週間以内 | 1 | 3.8 |
| 2 週間を超え 1 か月以内 | 3 | 11.5 |
| 1 か月を超える | 2 | 7.7 |
| 無回答 | 1 | 3.8 |

表 10 1 枚の CL 使用期間(2 週間 FRS-CL)

| | 症例数 | % |
|----------------|-----|------|
| 2 週間以内 | 74 | 37.8 |
| 2 週間を超え 3 週間以内 | 56 | 28.6 |
| 3 週間を超え 1 か月以内 | 26 | 13.3 |
| 1 か月を超える | 21 | 10.7 |
| 無回答 | 19 | 9.7 |

表 11 1 枚の CL 使用期間(定期交換 SCL)

| | 症例数 | % |
|----------------------------------|-----|------|
| 決められた使用期間以内 | 32 | 57.1 |
| 決められた使用期間を超過した期間が 1 週間以内 | 6 | 10.7 |
| 決められた使用期間を超過した期間が 1 週間を超え 2 週間以内 | 7 | 12.5 |
| 決められた使用期間を超過した期間が 2 週間を超え 1 か月以内 | 3 | 5.4 |
| 決められた使用期間を超過した期間が 1 か月を超える | 6 | 10.7 |
| 無回答 | 2 | 3.6 |

のも 15 例(4.3%)認められた。CL 購入先も眼科施設に併設する販売店、CL 量販店が多くを占めていた。

IV 考 按

1980 年代、本邦における角膜炎感染症のうち CL に関連するものは 10% あるいはそれ以下であるとする報告が散見される^{6)~8)}が、2003 年の 1 年間で調査が行われた感染性角膜炎全国サーベイランス¹⁾では 41.8% の症例が CL 装用者であった。CL 自体の普及、カラー CL など視力補正以外の目的での使用、CL 販売の多様化などにより今後も CL 関連角膜炎感染症の増加傾向は続くものと考えられる。

本調査は CL 関連角膜炎感染症のなかでも、入院加療を必要とする重篤な症例に限って行ったものである。本疾患の多くは外来通院で加療されることが多く、これらも網羅する形での調査が理想的である。しかし、比較的軽症な症例において問診を含めた詳細な調査が困難である点を鑑み、十分に時間をかけて問診ができる入院症例に

表 12 CL 装用方法の遵守

| | 症例数 | % |
|--------------|-----|------|
| 守っていた | 66 | 18.9 |
| ほぼ守っていた | 122 | 34.9 |
| ほとんど守っていなかった | 73 | 20.9 |
| 全く守っていなかった | 12 | 3.4 |
| 無回答 | 77 | 22.0 |

表 13 CL 処方施設

| | 症例数 | % |
|------------------|-----|------|
| 一般眼科診療所 | 137 | 39.1 |
| CL 量販店に隣接する眼科診療所 | 112 | 32.0 |
| 眼鏡店内の眼科診療所 | 34 | 9.7 |
| 一般病院(大学病院を除く) | 10 | 2.9 |
| 大学病院 | 1 | 0.3 |
| 医師の処方を受けなかった | 15 | 4.3 |
| その他 | 9 | 2.6 |
| 無回答 | 32 | 9.1 |

表 14 CL 購入先

| | 症例数 | % |
|--------------|-----|------|
| 眼科施設に併設する販売店 | 172 | 49.1 |
| CL 量販店 | 89 | 25.4 |
| 眼鏡店 | 28 | 8.0 |
| インターネット販売 | 16 | 4.6 |
| 通信販売 | 3 | 0.9 |
| 薬局 | 2 | 0.6 |
| 外国で購入 | 2 | 0.6 |
| 譲渡 | 1 | 0.3 |
| その他 | 11 | 3.1 |
| 無回答 | 26 | 7.4 |

限定した調査となった。もちろん入院するか否かの判断は病状の重篤性の他、通院の便、治療のコンプライアンスも含めた総合的なものあり、本調査を解釈するうえで注意を要するところであると考えられる。さらに今回の調査は医師が回答する部分と患者が回答する部分に分かれており、CL 装用に関するデータなどは患者の申告をそのまま採用していることにも留意する必要がある。CL の消毒やこすり洗いに対する理解も症例によって大きく異なっており、CL の処方を受けた施設の種類を正確に判断してもらうことも困難なことであろう。患者アンケートに関しては正確性に一定の限界があることを理解したうえで結果の解釈を行っていく必要がある。

CL 関連角膜炎感染症が他の角膜炎感染症と大きく異なっている点として、両眼発症症例が 1 割程度と多いことがまず挙げられる。先の感染性角膜炎全国サーベイランス¹⁾において CL を装用していた 109 例のうち両眼発症が 10 例あったとされており、今回の調査でも同様の傾向であることが確認できた。両眼発症症例が高率に認め

られる原因の詳細は不明であるが、装着している CL が両眼とも高度に汚染されているためと考えるのが妥当であろう。さらに片眼発症症例であっても条件によって両眼発症する危険性を持っていたといった推測も可能である。初診時矯正視力が著しく低下している症例が多く、若年者の視機能を脅かす社会的にも重大な疾患であることが認識された。

細菌学的検査において、角膜病巣由来の検体からアカントアメーバと緑膿菌が検出されていた症例が多かった。アカントアメーバ角膜炎はきわめて難治で長期間の加療を要し、治療目的あるいは視力回復を目的とした角膜移植が必要となることも多い疾患である。国内では石橋らの報告⁹⁾にはじまり、まれな疾患として扱われることが多かったが、近年症例数の増加が指摘されている²⁰⁾。本調査においても緑膿菌に次いで多い検出菌となっていたことは疾患の重篤性を鑑みるときわめて重大な問題であろう。一方、緑膿菌は従来から CL 関連角膜感染症の主要起炎菌として注目されていた細菌である。緑膿菌はセラチアなどのグラム陰性桿菌の一種であり、これらは水回りなどから検出されることが多い環境菌である。本調査における分離培養においても CL あるいは CL ケースから多数のグラム陰性桿菌が検出されており、過去の Bourcier らの報告¹⁰⁾と同様の結果であった。CL が環境菌に汚染されやすく、これを反映した結果、緑膿菌が多く症例の角膜擦過物から検出されたものと思われる。ただし、CL ケースなどからは多種類のグラム陰性桿菌が検出されているものの角膜から分離された菌としては緑膿菌が突出していた。緑膿菌は大腸菌などと比較し角膜上皮への接着性が強いという報告もあり¹¹⁾、この菌固有の特性が大きく関与しているものと推察された。感染性角膜炎全国サーベイランスの報告¹²⁾において、FRSCL などレンズケアを必要とする SCL 装用者における感染性角膜炎の起炎菌にはグラム陰性桿菌が多いことが指摘されている。我々の今回の調査では 1 日ディスポーザブル CL などの使い捨てレンズを再装用することなく正しく使用していた症例が少なかったため、CL の種類と検出菌のプロファイルの違いについては検討することができなかった。

CL は FRSCL、さらには 1 日ディスポーザブル CL と昨今選択肢が豊富となった。特に 1 日ディスポーザブル CL を正しく使用していれば装用する CL の細菌汚染のリスクは大幅に軽減するはずであり、角膜感染症を回避する有力な手段であろう。全国の CL 装用推定人口 1,866 万人のうち、1 日ディスポーザブル CL 装用者は 660 万人 (35.4%) 程度とされる¹²⁾。しかし、今回の調査において 1 日ディスポーザブル CL を装用していた症例は 26 例と調査対象の 7.4% にとどまっていたことは、このタイプの CL の安全性を示唆するものと考えられる。さらに CL の種類と感染症のリスクを考察するうえで、個々

の装用者がどのような装用方法を実際行っているのかに注目する必要がある。今回対象となった 1 日ディスポーザブル CL 装用者のなかで規定どおり 1 日の使用を遵守していた症例は 46.2% にとどまっており、1 週間以上、なかには 1 か月を超えて 1 日ディスポーザブル CL を装用するような例があったことは注目する必要がある。

CL のケア (管理) および装用方法についてはかなりさまざまな実態が浮き彫りとなった。終日装用の CL を連続装用していたものが全体の 22% を占めていた。CL の洗浄・消毒・こすり洗いについても「毎日消毒していた」が全体の約 1/3、「毎日こすり洗いしていた」が全体の約 1/5 の症例にとどまっていたことは注目に値する。もちろん 1 日ディスポーザブル CL や 1 週間連続装用ディスポーザブル CL 装用者ではレンズケアがないため、これらを再装用せずに正しく使用していた症例を除いた検討が適切である。しかし調査対象となった全 350 例中、これに該当する症例は多くないため全体的な傾向として大きな変動はないものと考えられた。2009 年 12 月 16 日国民生活センターが「ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒性能」という報告を行った。このなかで 18 歳～29 歳の 2 週間頻回交換型ソフトコンタクトレンズを装用している学生 385 名 (平均年齢 21.2 歳) を調査対象として CL のケアの実態を含めた調査が行われた。この調査は角膜感染症を起こしていない健常者と考えられ、CL ケアに関してはほぼ同じ内容のアンケートが実施されており、比較検討することが可能である。この国民生活センターの調査によると CL のこすり洗いについて、「毎日こすり洗いたした」が全体の 50.4% を占める一方、「時々こすり洗いたした」7.0%、「ほとんどこすり洗いしなかった」4.9%、「まったくこすり洗いしなかった」7.3% にとどまっており、今回の CL 関連角膜感染症全国調査におけるデータと比較して良好な結果であった。同様のことは CL の消毒、CL ケースの交換頻度にも当てはまり、1 枚の CL を使用する期間についても 3 週間を超えたもの (決められた使用期間を 1 週間以上超過したもの) は 5.5% にとどまっていた。調査方法が異なる二つの調査を厳密に比較することはできないが、重症角膜感染症を発症し全国調査の対象となった症例は健常者と比較し CL ケアが正しく行われていない傾向が確認できた。しかしその一方、ケアを規定どおり行っていたとされる症例でも角膜感染症が発症している事実も忘れてはならない。

CL の消毒方法として以前は煮沸消毒が中心であったが、その後過酸化水素によるケアが普及し、最近では MPS を用いるものがその簡便性もあり主流となっている。今回の調査においてもほとんどの症例で MPS が使用されていたことが確認できた。過酸化水素など、他の方法を用いた例が極端に少ないため、消毒薬の違いによる検討は不可能であったが、MPS の消毒効果が十分で

あるかについても注目していく必要がある。MPS の消毒効果は国際標準化機構(International Organization for Standardization : ISO)14729 の stand alone test がよりどころとなっている。これは 3 種類の細菌(*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*)および 2 種類の真菌(*Candida albicans*, *Fusarium solani*)の滅菌効果の結果が一定基準を満たしていることが要求されている。しかし、この stand alone test では菌の浮遊液に対する MPS の効果のみをみているため、実際の SCL ケアの状況と大きく異なっていることに注目すべきであろう。SCL に付着した菌に対して MPS が十分に効果を発揮するののかについて今後の検討が待たれる。2005 年から 2006 年に米国、東南アジアの SCL 装用者でフザリウム菌による角膜炎感染症が多発した¹³⁾が、その原因として特定の MPS の濃縮が原因である可能性が指摘された¹⁴⁾。正しい MPS の使用方法では濃縮が起こる可能性は考えにくい。SCL ケースの蓋をしなない、SCL ケース内の MPS を捨てずに再使用する、新しい MPS を継ぎ足すといったコンプライアンスの低い状況では MPS 本来の消毒効果が発揮できないことが報告されている¹⁵⁾。

CL 装用者の角膜炎感染症をいかに回避していくか、我々は大変困難な課題に直面している。今回の全国調査の結果を眼科医のみならず、CL ケアの指導にあたる医療スタッフ、CL や各種消毒薬を販売するすべての企業、さらに保健行政に携わる方々に認識していただくことがまず必要であろう。CL 装用者への啓発活動はもちろんのこと、CL に関連する合併症を熟知した眼科医が定期的に CL 装用者の検査ができる環境の整備も必要であろう。CL を装用するにあたり、その安全性を確保するための最低限の責務を義務づけるシステムの構築も必要かもしれない。一方、CL に関連するメーカーには感染症予防の観点からより安全な製品の開発を今後も継続していただくことを改めて要望したい。

本調査は厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)H20—新興—一般—016 の助成を受けた。

利益相反：利益相反公表基準に該当なし

文 献

- 1) 感染性角膜炎全国サーベイランス・スタディグループ：感染性角膜炎全国サーベイランス—分離菌・患

- 者背景・治療の現況—。日眼会誌 110 : 961—972, 2006.
- 2) Thebpatiphat N, Hammersmith KM, Rocha FN, Rapuano CJ, Ayres BD, Laibson PR, et al : *Acanthamoeba* keratitis : a parasite on the rise. *Cornea* 26 : 701—706, 2007.
- 3) 篠崎友治, 宇野敏彦, 原 祐子, 山口昌彦, 白石敦, 大橋裕一 : 最近 11 年間に経験したアcantアメーバ角膜炎 28 例の臨床的検討。あたらしい眼科 27 : 680—686, 2010.
- 4) Liesegang TJ : Contact lens-related microbial keratitis : Part II : Pathophysiology. *Cornea* 16 : 265—273, 1997.
- 5) 福田昌彦 : コンタクトレンズ関連角膜炎感染症の実態と疫学。日本の眼科 80 : 693—698, 2009.
- 6) 北川和子, 都築晴美, 佐々木一之 : 細菌性角膜炎感染症の検討。眼紀 37 : 435—439, 1986.
- 7) 杉田美由紀, 田中直彦, 磯部 裕, 平原敦子, 三井啓司 : 細菌(真菌)性角膜炎の最近 7 年間の統計。臨眼 41 : 629—633, 1987.
- 8) 兼松誠二, 楠島康平, 内藤 毅, 新田敦子, 塩田洋, 三村康男 : 最近 7 年間における細菌性角膜炎の検討。眼紀 39 : 1743—1747, 1988.
- 9) 石橋康久, 松本雄二郎, 渡辺亮子, 本村幸子, 安羅岡一男, 石井圭一 : *Acanthamoeba* keratitis の 1 例—臨床像, 病原体検査法および治療についての検討。日眼会誌 92 : 963—972, 1988.
- 10) Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chaumeil C, Laroche L : Bacterial keratitis : predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *Br J Ophthalmol* 87 : 834—838, 2003.
- 11) Panjwani N, Clark B, Cohen M, Barza M, Baum J : Differential binding of *P. aeruginosa* and *S. aureus* to corneal epithelium in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 696—701, 1990.
- 12) 稲葉昌丸, 井上幸次, 植田喜一, 宇野敏彦, 江口洋, 大橋裕一, 他 : 重症コンタクトレンズ関連角膜炎感染症調査からみた危険因子の解析。日本コンタクトレンズ学会誌 52 : 25—30, 2010.
- 13) Khor WB, Aung T, Saw SM, Wong TY, Tambyah PA, Tan AL, et al : An outbreak of *Fusarium* keratitis associated with contact lens wear in Singapore. *JAMA* 295 : 2867—2873, 2006.
- 14) Levy B, Heiler D, Norton S : Report on testing from an investigation of *Fusarium* keratitis in contact lens wearers. *Eye & Contact Lens* 32 : 256—261, 2006.
- 15) 今安正樹, 宇野敏彦, 森 理, 大橋裕一 : コンプライアンスの低い使用環境における多目的用剤の消毒効果試験。日本コンタクトレンズ学会誌 51 : 36—41, 2009.

眼のかすみを起こす疾患 (I)

角膜疾患

Diseases with Blurred Vision (I) : Corneal Diseases

井上幸次*

はじめに

角膜は眼球のレンズの役割を果たしていることから、その異常は見え方の質に多かれ少なかれ影響する。したがって眼の「かすみ」を起こす疾患イコールすべての角膜疾患といっても過言ではない。ただ、円錐角膜のような角膜形状異常による症状は「かすみ」ではなくやはり歪みであるし、角膜周辺部が障害される疾患では「かすみ」よりも異物感などの他の症状が主体となる。やはり、「かすみ」を生じる大きな原因は角膜中央の浮腫あるいは混濁であるので、角膜中央の浮腫や混濁を生じる疾患について、その診断や治療のトピックをまじえて解説する。一応軽度と重度に分けて解説するが、軽度で述べた疾患が重度の「かすみ」を生じることもあれば、重度で述べた疾患が軽度の「かすみ」ですむ場合もあることはいうまでもない。

I 軽度の「かすみ」を生じる角膜疾患

1. 中央の上皮障害をきたす疾患

a. 重症ドライアイ

ドライアイの症状は乾燥感、異物感、眼精疲労、充血などさまざまであるが、もともと自覚症状の強い疾患であり、当然、視力低下もその症状の一つであって、たとえ角膜中央の上皮に問題がなくても見え方の質は低下する。ただ、この場合は涙液層の不安定性に起因するものであり、「かすみ」ではなく「ぼやけ」という表現のほうがあてはまるであろう。「かすみ」になるのはやはり、

重症となり、中央に強い点状表層角膜症 (superficial punctate keratopathy : SPK) や糸状角膜炎を生じてきた場合であろう。このレベルのドライアイでは治療として涙点プラグを考慮することになるが、軽症の人に涙点プラグを行うと逆に涙液が溜まりすぎてよけいにぼやけることもあるので注意が必要である。

b. 薬剤毒性角膜症

薬剤毒性角膜症による SPK は「かすみ」原因となるが、ドライアイや眼精疲労の患者ではこの「かすみ」が、本人が点眼の種類や回数を増加する契機となる。そのため、よけいに「かすみ」が強くなり、不安になった患者はさらに点眼を増やして悪循環につながる。「かすみ」という症状そのものが疾患の悪化につながるという特異なケースである。

c. その他の SPK を起こす疾患

春季カタルでは、落屑様 SPK を起こすが、患者は「かすみ」よりも、掻痒・羞明・眼脂・涙液・眼痛・異物感などを訴えることが多い。また、マイボーム腺炎角膜上皮症ではフリクテン以外に血管侵入を伴った SPK を生じる。コンタクトレンズによる低酸素状態・機械的障害・ドライアイも SPK につながる。いずれも重症化すると「かすみ」につながる。

d. 樹枝状病変を生じる疾患

樹枝状病変も瞳孔領にかかると「かすみ」につながる。上皮型角膜ヘルペスが代表的だが、偽樹枝状病変を起こすアcantアメラ角膜炎初期、再発性角膜びらん

* Yoshitsugu Inoue : 鳥取大学医学部視覚病態学
(別刷請求先) 井上幸次 : 〒683-8504 米子市西町 86 番地 鳥取大学医学部視覚病態学

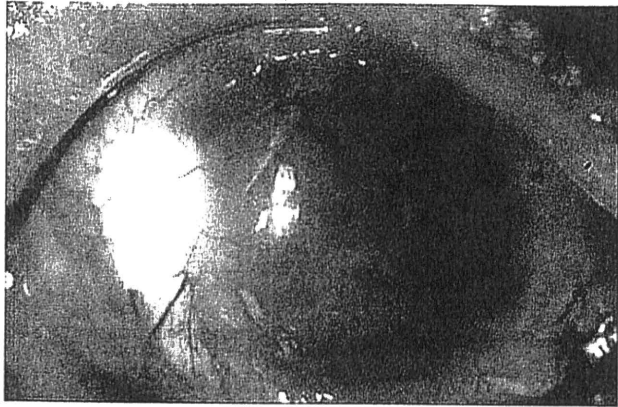


図1 CIN (conjunctival and corneal intraepithelial neoplasia) 異型上皮・腫瘍性の上皮は混濁しているため、瞳孔領にかかると「かすみ」の原因となる。

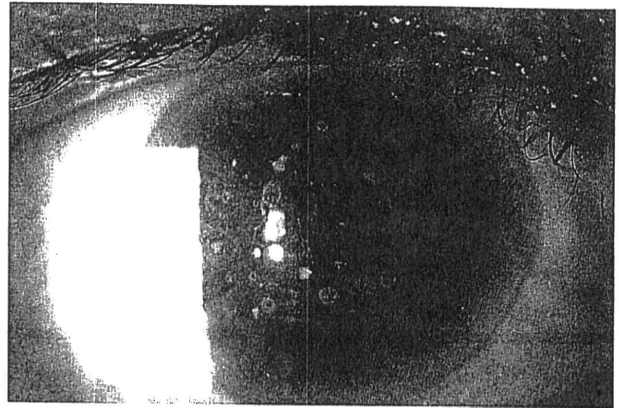


図2 アベリノ角膜ジストロフィ
実質表層の境界明瞭な混濁を生じるが、瞳孔領で融合傾向を認めると「かすみ」を訴える。

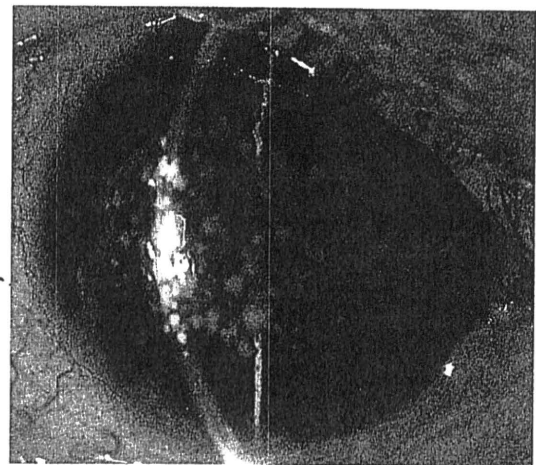


図3 アベリノ角膜ジストロフィ
このような金平糖様の白い混濁は実質のやや深いところに認められるのでPTKで効果が得にくい。

治癒期、重症薬剤毒性角膜症で認められる epithelial crack line などがある。いずれも「かすみ」だけでなく、異物感や充血などを必ず伴う。

2. 中央の角膜混濁をきたす疾患

a. 上皮の混濁をきたす疾患

角結膜上皮の異型性や腫瘍性変化を起こす CIN (conjunctival and corneal intraepithelial neoplasia) が伸展して瞳孔領にかかると「かすみ」を訴える(図1)。この疾患は炎症性疾患ではないが、症状としては異物感や充血を伴うことが多い。Fabry 病や全身投与薬の副作用(アミオダロンなど)として認められる上皮混濁 (epithelial opacity) も「かすみ」の原因となることがあるが、この場合は異物感や充血は伴わない。

b. 流行性角結膜炎による多発性角膜上皮浸潤

アデノウイルスによる流行性角結膜炎の後に生じる多発性角膜上皮浸潤は、数が少なければ無症状であるが、多くなると羞明を感じるようになり、さらに多くなり融合したもので出てくるようになると「かすみ」の原因となる。多発性角膜上皮浸潤の病態としては、結膜炎を生じた際に角膜実質表層にアデノウイルスの抗原が蓄積し、それに対する遅延型過敏反応を生じてくると考えられているが、感染後半年以上たつて症状が出てくる例や数年たつても鎮静化しない例もあり、単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus : HSV) のような潜

伏感染があるのではないかという考えもある。治療としてはステロイド点眼を使用することになるが、漸減しながらかなり長期にわたって使用しないと、中止によってまた再燃する。なお、アデノウイルスについては最近54型が同定され¹⁾、しかも現在日本で8型といわれているもののほとんどが、54型によるものであることが明らかにされた。

c. 顆粒状角膜ジストロフィ(アベリノ角膜ジストロフィ)

このジストロフィによる混濁は、境界明瞭であり、混濁のない部分は透明であるため、初期は無症状であるが、やがて羞明を訴えるようになり、やがて混濁が大き

く濃くなるとともに融合する状態となって「かすみ」を訴えるようになる。現在治療の第一選択はエキシマレーザーによるPTK (phototherapeutic keratectomy) であるが、最もよい適応は浅い層の混濁が瞳孔領で融合して認められるケースである(図2)。混濁が多くてもこれが深く融合傾向のない場合(図3)は混濁も十分とれないばかりか、レーザー後の遠視化のために、かえって患者は見にくくなったと感じる場合もあるので、注意が必要である。なお、顆粒状角膜ジストロフィはTGFBI遺伝子の異常によって起こるが、日本ではより顆粒の大きさが細かい狭義の顆粒状角膜ジストロフィ(R555W)は少なく、多くはR124Hタイプのアペリノ角膜ジストロフィである。

d. 帯状角膜変性

帯状角膜変性は基礎疾患としてぶどう膜炎、角膜炎、緑内障などがあり、二次的にBowman膜レベルにカルシウムが沈着して生じる。瞼裂部の周辺から生じて中央へ向かって進行し、瞳孔領に及ぶと「かすみ」ようになる。帯状角膜変性の場合もエキシマレーザーによるPTKは非常に有効だが、沈着の状態が部位によって異なり、凹凸不整を生じて、異物感を主訴とするケースでは、非常に硬いところはレーザーによってうまく削れないため、むしろmanualでのkeratectomyのほうが有効である。

3. 中央の角膜浮腫をきたす疾患

サイトメガロウイルス角膜内皮炎

角膜内皮炎の原因として、HSV、水痘帯状疱疹ウイルス(varicella-zoster virus: VZV)、ムンプスウイルスなどが知られていたが、最近サイトメガロウイルス(CMV)によるものがあることが判明し、話題となっている。HSVによる角膜内皮炎と比較して角膜浮腫が軽度のものが多く、浮腫を起こした部位にcoin lesionとよばれる輪状の角膜後面沈着物を認めるのが特徴である²⁾。内皮にCMV感染を示唆するOwl's Eyeを認めた³⁾との報告もある。CMVによる虹彩炎も注目されており、おそらくCMV虹彩炎と内皮炎は一連の疾患である可能性があり、CMVは免疫不全者で感染を起こすという概念が崩れてきている。診断にあたっては前房水の

PCR (polymerase chain reaction) でCMVを証明する必要がある。治療は抗CMV薬のガンシクロビルやバラガンシクロビルを投与することになるが、投与経路や投与期間をどうすればよいかということについてはまだevidenceが少なく個々の施設で独自に行われている。

II 重度の「かすみ」を生じる疾患

I. 中央の上皮障害をきたす疾患

a. 癩痕性角結膜上皮疾患

Stevens-Johnson症候群、graft-versus-host disease (GVHD)、眼類天疱瘡などの癩痕性角結膜上皮疾患は重度の上皮障害と角膜血管侵入、角膜混濁とドライアイを合併しており、さまざまな眼症状を生じてくる。「かすみ」はその症状の一部にすぎない。ある程度の視力が確保されている例ではドライアイ、炎症、感染を点眼治療などでコントロールして保存的に見ていくが、重症例では輪部移植、さらには培養角膜上皮移植など先進的な治療が必要となる。

なお、Stevens-Johnson症候群については発症したときの局所のステロイド治療が予後に大きく影響すること⁴⁾、種々の遺伝子の多型がその発症に関与していること⁵⁾、methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の感染が非常に多く認められることなど、多くの新知見があるが、その治療は依然としてむずかしい。

b. 栄養障害性角膜潰瘍

角膜ヘルペス後、聴神経腫瘍、糖尿病など三叉神経が障害され角膜知覚が低下する疾患で、角膜上皮の創傷治療が遅延化して生じる。典型例では上皮欠損は楕円形を示し、辺縁上皮は灰白色に丸くもりあがり、実質からやや浮いたような所見を示すのが特徴である。治療としては治療用ソフトコンタクトレンズ装着、フィブロネチン点眼、瞼板縫合など種々の治療が行われているが、現在その特効薬としてinsulin-like growth factor-1 (IGF-1) と substance P の各々のペプチドであるSSSRとFGLM-NH₂を組み合わせた点眼⁶⁾の治験が行われている。

2. 中央の実質混濁をきたす疾患

a. 細菌性角膜炎

細菌性角膜炎は瞳孔縁にかかると重度の視力低下を招くが、もちろんそれだけでなく、異物感、眼痛、眼脂、流涙、充血などの症状を伴う。視力低下に比べてこれらの症状のほうが初期の抗菌薬による治療の効果があつたかどうかの判定の目安にしやすい。たとえば、治療を開始した翌日、患者が「痛みが楽になった」といえば、まだ他覚所見があまり改善していなくても、一応この治療で継続すればよいのではないかとということがわかる。「かすみ」については、最終的には改善するものの治療効果の判定にはあまり参考にならず、また、治療が終了しても、癍痕が残れば「かすみ」は残る。

現在は細菌性角膜炎の主体が異物飛入によるものから、コンタクトレンズ (CL) 関連のものに移り、特に20~30代での感染が主体である⁷⁾。CLについては単にその種類だけでなく、商品名、装用方法、装用日数・時間、誤用の有無とその内容、CLの管理方法 (特にこすり洗いやレンズケースの定期交換、CL装用時に手洗いをしていただどうか、消毒の種類と multipurpose solution の商品名、水道水使用の有無) などを詳細に問診する必要がある。使い捨て CL の場合、眼表面の常在菌であるグラム陽性球菌による感染を起こしやすく、定期交換 CL の場合は保存ケースで増殖しやすい環境菌である緑膿菌やセラチアなどのグラム陰性桿菌の感染を起こしやすい。

b. 角膜真菌症

角膜真菌症はステロイド点眼薬の使用によって、その頻度が増加したが、特に病原性の低いものほど診断がむずかしく、なかにはほとんど炎症を起こさず角膜表面でコロニーを形成するものもある (図4)。その場合は、炎症に伴う症状はほとんどなく、「かすみ」のみが症状ということもある。角膜真菌症という用語が用いられるのは炎症を伴う通常の真菌性角膜炎だけでなく、そのような炎症があまりないものも時に認められるからである。

角膜真菌症の治療は種々のアゾール系の薬剤やキャンディン系のミカファンギンなど選択肢が増えたが、やはり治療には時間がかかる。角膜真菌症で最も病原性が強いフザリウムについてはピマリシン点眼・眼軟膏が使用

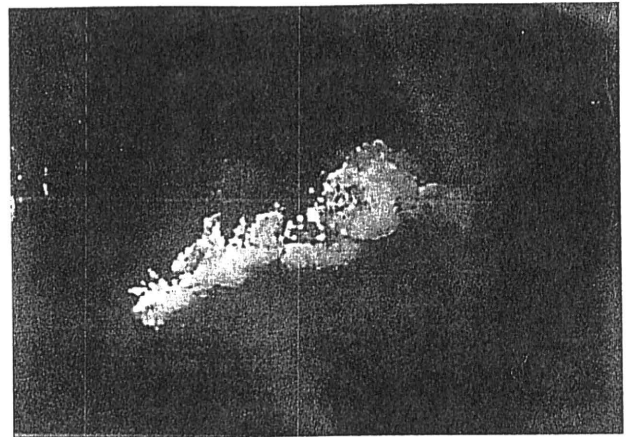


図4 角膜真菌症

カンジダが角膜に付着するようにコロニーを形成し、ほとんど炎症所見を認めなかった症例。このように真菌の場合、炎症所見が非常に弱い例が時にあり、一見沈着物のように見えるため診断がむずかしい。

できるが、角膜内への移行が悪いのが欠点である。一方、アゾール系の新しい薬剤であるポリコナゾールは水溶性にすぐれ、1%点眼を自家作製して用いることができ⁸⁾、深層のフザリウムでも治療できる可能性がある。

c. 実質型角膜ヘルペス

角膜ヘルペスも円板状角膜や壊死性角膜炎のように実質型で再発すると、充血を伴った強い「かすみ」となる。異物感、眼痛は生じない。再発性の疾患であるため、患者は症状から再発したと自分でわかることが多いが、それが逆に自己治療をかってに行う原因となり、アシクロビル眼軟膏なしにステロイド点眼を使用したり、ステロイド点眼なしにアシクロビル眼軟膏を使用したり、良くなったのでかってに突然点眼を打ち切ったりすることにつながる。自己治療をすとかえって再発を起こしやすい状況をつくってしまうことや、使用する薬剤の意味合い (ステロイド点眼だけでは逆にウイルスが増えてしまうことなど) を十分説明しておくことが重要である。

d. アカントアメーバ角膜炎

近年、症例数が増加し、コンタクトレンズ関連角膜感染症の重症例として緑膿菌とならぶ存在となっている⁹⁾。「かすみ」よりも眼痛・異物感・充血などの炎症に伴う症状が強いのが特徴であるが、ステロイド点眼が使用さ

れてしまうと、これがマスクされてしまい、わかりにくくなる。初期には点状・斑状・線状の上皮・上皮下混濁や偽樹枝状角膜炎、放射状角膜神経炎などが認められる。この時期は前述した炎症に伴う症状が強いが、「かすみ」は比較的軽度である。完成期には円板状浸潤・潰瘍、輪状浸潤・潰瘍の状態となり、「かすみ」は重症となる。治療としては特効薬がないため、掻爬が重要な治療手段となる。薬物治療に抵抗する場合は治療的角膜移植をせざるをえないこともある。

e. 角膜実質炎（梅毒性、結核性など）

梅毒・結核・Hansen病などに合併して角膜実質炎を生じると、炎症に伴う症状に加えて「かすみ」を訴えるが、現在、その新鮮例に遭遇することはきわめてまれである。先天梅毒による癒痕期の患者にはときどき遭遇するが、こういう患者の訴える「かすみ」は加齢に伴う白内障の進行によるもので、角膜の混濁の悪化を認める例はあまりない。ただ、角膜実質炎が深層にも及んでいるケースでは内皮の数が少ないため、加齢とともにこれがさらに減って水疱性角膜症に移行してきた場合は「かすみ」を訴えるようになる。

f. 格子状角膜ジストロフィ

アペリノ角膜ジストロフィ同様 *TGFBI* 遺伝子の異常によって発症する常染色体優性遺伝の疾患である。初期は上皮の接着不良による再発性角膜びらんを起こすのが特徴であり、症状は眼痛・異物感・充血である。しか

し、しだいに中央の角膜混濁が増加して「かすみ」が強くなる。進行した格子状角膜ジストロフィでは中央の混濁が強いために格子状の病変がわかりにくい。この場合、細隙灯顕微鏡で周辺の角膜をよく観察すると、そこに格子状の病変を発見できる（図5）。なお、このように角膜混濁が強くなってくるのは格子状角膜ジストロフィのI型であり、III A型は発症年齢も高く、混濁も少ない。

g. 斑状角膜ジストロフィ

CHST6 遺伝子の異常による常染色体劣性遺伝の疾患である。*CHST6*は硫酸の転移酵素をコードしており、その異常によって、低硫酸化ケラタン硫酸プロテオグリカンが実質に沈着して、角膜全体が混濁する。そのため、「かすみ」は強く、角膜移植の適応となる。内皮は障害されないので、deep anterior lamellar keratoplasty (DALK)が可能であるが、実質が異常なケラタン硫酸によって粘稠となるため、実質を層間分離しにくく手術に時間がかかる。

h. 膠様滴状角膜ジストロフィ

MISI (tumor-associated calcium signal transducer 2: *TACSTD2*) 遺伝子の異常による常染色体劣性遺伝の疾患であり、欧米ではきわめてまれで、日本に特有な疾患である。角膜上皮のバリア機能が障害され、透過性が亢進し、実質浅層に涙液中のラクトフェリンが蓄積してアミロイドとなる。単に濁るだけでなく、上皮が凹凸不整となり、血管侵入も伴うため、その症状は多彩であり、「かすみ」だけでなく、異物感・羞明・充血など種々の症状をきたす。治療用CLの装用が進行を防止することから、最近では進行した例は減少している。

3. 中央の角膜浮腫をきたす疾患

a. ヘルペス性角膜内皮炎

ヘルペスの病型としては上皮型、実質型に加えて内皮型があるが、純粋に内皮炎だけを生じているものは意外に少なく、そのような症例ではむしろCMVによるもののほうがより可能性が高いであろう。ヘルペスの場合、多くの症例で実質型に合併して内皮炎を生じているため、本当に内皮に病変の主座があるのか、単に実質の炎症に伴う二次的なものかは判断がむずかしい。欧米では

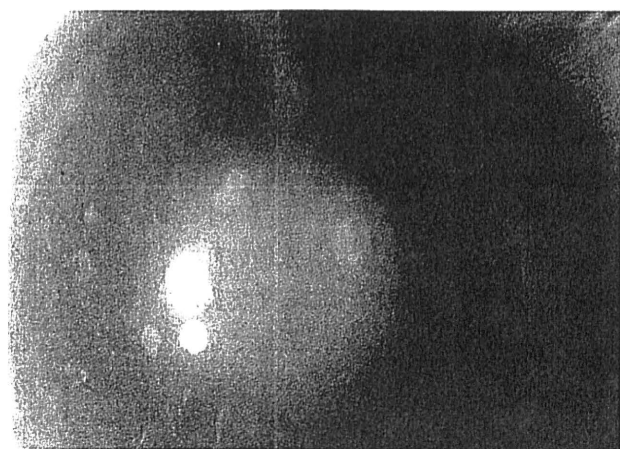


図5 格子状角膜ジストロフィI型
中央の混濁部よりも周辺で格子状のラインの存在がわかる。

円板状角膜炎を内皮型に分類しているが、これには少なからず違和感がある。円板状角膜炎のなかで浮腫が強く実質の混濁が少ないタイプが確かにあるが、実質にも炎症があるにもかかわらず、内皮型に分類するのはどうかと思われる。やはりこれは実質型と内皮型の合併とみるべきであろう（上皮型と実質型の合併もよくあるので、実質型と内皮型の合併があっても何ら不思議はない）。ヘルペス性角膜内皮炎は実質炎同様にアシクロビルとステロイドの併用で治療されることが多いが、その妥当性に関する evidence はない。

b. Fuchs 角膜内皮ジストロフィ

VIII 型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖をコードする COL8A2 遺伝子の異常で起こるという報告があるものの、13 番染色体、18 番染色体上の locus も報告されており、今に至るも原因遺伝子が十分解明されていない。角膜内皮に guttata と pigment dusting を認め、若年で水疱性角膜炎に移行する。Fuchs 角膜内皮ジストロフィは欧米ではかなりよく認められるジストロフィであり、全層角膜移植のかなりの部分をこの疾患が占めていた。しかし、最近では内皮側のみを移植する Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) が広く行われるようになり、急速に術式が変化している。

c. 後部多形性角膜ジストロフィ (posterior polymorphous dystrophy : PPD)

常染色体優性遺伝、両眼性の疾患で、原因遺伝子は 20 番染色体にあるとされているが、正確な原因遺伝子はまだ不明である。Fuchs 角膜内皮ジストロフィ同様日本人には少ない。角膜内皮面に嚢胞状病変、posterior collagenous layerなどを伴う。病態としては内皮が分化異常を起こして、上皮様変化（微絨毛多数、ケラチン陽性）を生じているとされている。通常は無症状で、水疱性角膜炎への進展があれば「かすみ」を訴えるようになる。なお、片眼の孤発例を posterior corneal vesicle (PCV) というが、これと PPD の関係は不明である。PCV で水疱性角膜炎に移行することはまずない。

d. アルゴンレーザー虹彩切開術 (ALI) 後水疱性角膜炎

日本人ではこのタイプの水疱性角膜炎が多い¹⁰⁾が、欧米では珍しい。人種的なもの以外に、日本ではレーザー虹彩切開術にアルゴンレーザーが主に使用されてきた

が、欧米では主に YAG が使用されていることなどが関係しているとされている。しかし本当の原因は不明である。前房が浅い例が多く、そのままでは DSAEK は困難で、先にあるいは同時に白内障手術を行って DSAEK をすることが推奨されている。最近ではシャンデリア照明を使用した白内障手術が可能となり、かなりの角膜浮腫があっても PEA (水晶体乳化吸引術)+IOL (眼内レンズ) が可能である¹¹⁾。

e. 眼内レンズ性水疱性角膜炎

最もよい DSAEK の適応となる。日本では Fuchs 角膜内皮ジストロフィは少なく、上記の ALI 後やこの白内障術後の水疱性角膜炎が多いので、Descemet 膜をとる必要が必ずしもなく、Descemet 膜を剥がない non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (nDSAEK) が行われるようになってきている¹²⁾。

f. ICE (iridocorneal endothelial) 症候群

片眼性に角膜内皮・線維柱帯・虹彩が障害される疾患で、Chandler 症候群、Cogan-Reese 症候群、progressive essential iris atrophy を包含する。片眼性であるため、原因として遺伝は考えにくく、ウイルス説なども言われているが、いまだに原因は不明である。緑内障の合併が多く、水疱性角膜炎に移行すると「かすみ」を訴えるようになる。

g. 角膜移植後拒絶反応

角膜移植後の 3 大合併症は拒絶反応、感染、緑内障であるが、移植後に「かすみ」と充血を伴ってきた場合は角膜移植後拒絶反応の可能性が高く、これに眼痛・異物感が加わると感染の可能性が高い。緑内障は症状もなく最も厄介な合併症であり、移植眼の失明はほとんどが緑内障によるものであるといってもよい。

h. 急性角膜水腫

円錐角膜で突然の重度の「かすみ」を訴えた場合は、Descemet 膜破裂に伴う急性水腫の可能性もある。多くの症例で Descemet 膜のみならず実質にまで亀裂が生じている (stromal cleft) が、それでも自然修復する。自然修復して浮腫が引けば再びハードコンタクトレンズが装着可能となる例も多く、急性角膜水腫を生じたら移植になるというものではない。

用語解説欄

マイボーム腺炎角膜上皮症：重度のマイボーム腺炎に伴い、フリクテン角膜炎や血管侵入を伴った点状表層角膜炎 (SPK) を認める。若い女性に多く、その原因はマイボーム腺内のアクネ菌といわれている。再発をくり返すケースではマクロライド系の内服が有効である。

Epithelial crack line：薬剤毒性角膜炎によって生じる分岐のあるひび割れ状のラインである。その特徴として、角膜中央やや下方に水平方向に生じ、混濁を必ず伴っており、時に盛り上がり認める。また、周囲に必ず著明な SPK を認める。

Fabry 病： α ガラクトシダーゼの先天的な欠損による全身性代謝異常で、心血管、腎臓、皮膚の異常を呈する。角膜上皮内に ceramide trihexoside が沈着して特徴的な渦巻き状の混濁を生じる (渦状角膜)。

アミオダロン：古くから使用されている抗不整脈薬だが、角膜の中央や下に車軸上、猫ひげ様の上皮混濁が生じるので有名である。ただ、視力障害につながるほどの混濁になる例は少ない。

Owl's Eye：サイトメガロウイルスが感染した細胞に核内封入体ができるとまるでフクロウの目のように見えることから、サイトメガロウイルス感染細胞に特徴的な所見として知られている。

Multipurpose solution (MPS)：CL の洗浄・消毒・保存・すすぎが一つの溶液ですべて可能 (多目的というのはそういう意味である) な製剤で、その簡便性から、現在、

定期交換 SCL の使用者の間で広く使用されているが、一方で抗菌力の弱さが問題となっており、現在の CL 関連角膜感染症増加の一因となっている。

Deep anterior lamellar keratoplasty (DALK)：Descemet 膜と内皮を残して実質をすべてとって行う表層角膜移植。全層と同等の透明性が得られ、かつ内皮型拒絶反応が生じない理想的な手術だが、手術自体は全層移植よりもむずかしい。なお、従来は deep lamellar keratoplasty (DLK, DLKP) といわれていたが、最近特に欧米で内皮移植と対比させてこの名称がよく使用されている。

Guttata：角膜内皮が障害されてくると Descemet 膜にコラーゲン様物質が瘤状に付加され、スベキュラーマイクロスコプや細隙灯顕微鏡の鏡面法により観察すると黒い丸として観察される。周辺部に加齢とともに認められるものは Hassall-Henle 小体、中央部に病的所見として認められるものは guttata といわれている。

Pigment dusting：Guttata を多数認める角膜では角膜内皮面に小さい pigment を多数認める。この pigment は角膜後面沈着物が色素塊となったものではなく、病的な内皮に貪食された pigment である。したがって時間が経過しても消失しない。

Posterior collagenous layer (PCL)：内皮細胞が Descemet 膜後面にコラーゲン様物質を産生し膜状となったもの。内皮が異常なストレスにさらされた時にできる。

文 献

- 1) Ishiko H, Shimada Y, Konno T et al: Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol* 46: 2002-2008, 2008
- 2) Koizumi N, Yamasaki K, Kawasaki S et al: Cytomegalovirus in aqueous humor from an eye with corneal endotheliitis. *Am J Ophthalmol* 141: 564-565, 2006
- 3) Shiraiishi 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
- 4) Sotozono C, Ueta M, Koizumi N et al: Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology* 116: 685-690, 2009
- 5) Ueta M, Sotozono C, Inatomi T et al: Association of combined IL-13/IL-4R signaling pathway gene polymorphism with Stevens-Johnson syndrome accompanied by ocular surface complications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 1809-1813, 2008
- 6) Yamada N, Matsuda R, Morishige N et al: Open clinical study of eye-drops containing tetrapeptides derived from

substance P and insulin-like growth factor-1 for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *Br J Ophthalmol* 92: 896-900, 2008

- 7) 感染性角膜炎全国サーベイランス・スタディグループ：感染性角膜炎全国サーベイランス一分離菌・患者背景・治療の現況一。日眼会誌 110: 961-972, 2006
- 8) 小松直樹, 堅野比呂子, 宮崎 大ほか：ポリコナゾール点眼が奏効した *Fusarium solani* による非定型的な角膜真菌症の 1 例。あたらしい眼科 24: 499-501, 2007
- 9) 福田昌彦：コンタクトレンズ関連角膜感染症の実態と疫学。日本の眼科 80: 693-698, 2009
- 10) Shimazaki J, Amano S, Uno T et al: The Japan Bullous Keratopathy Study Group: National survey on bullous keratopathy in Japan. *Cornea* 26: 274-278, 2007
- 11) Oshima Y, Shima C, Maeda N et al: Chandelier retroillumination-assisted torsional oscillation for cataract surgery in patients with severe corneal opacity. *J Cataract Refract Surg* 33: 2018-2022, 2007
- 12) Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K: Non-Descemet stripping automated endothelial keratoplasty for endothelial dysfunction secondary to argon laser iridotomy. *Am J Ophthalmol* 146: 543-549, 2008

国民生活センターのソフトコンタクトレンズ用 消毒剤の消毒性能調査について

鳥取大学医学部視覚病態学 井上幸次

はじめに

筆者は角膜感染症を専門としている関係で、コンタクトレンズ（以下 CL）関連角膜感染症の患者には多く関わっているが、大学にずっといるためCLの処方を行って行くこともなく、multipurpose solution（以下 MPS）を含めたCLケア用品に関して詳細な知識を持ち合わせているわけではない。筆者にとってのCLケア用品は感染を起こした人のレンズケースの中にある汚れた液体のイメージであり、いささか偏向したものである。

そういうことで、今回この「CLケア教室」の原稿依頼をいただき、MPSのことについて書いてくれといわれて少し戸惑いがあるが、最近、日本コンタクトレンズ学会と日本眼感染症学会が協力して、CL関連角膜感染症の対策についての様々な取り組みをしているなかで、昨年、国民生活センターと協力してソフトCL（以下 SCL）用消毒剤の消毒性能調査が行われた。その調査に少しかわりをもつことができ、神奈川県相模原市にある国民生活センターへはるばる出かける機会などもあったので、今回はその調査の概要と、それが発表されたときの反応について書いてみたい。

国民生活センターの調査の概要

1. SCL用消毒剤のアカントアメーバに関する消毒効果

MPS 8 銘柄（コンプリート[®] アミノモイスト、バイオクレン[®]ゼロ、シードゥソフトケア、フレッシュルックケア10ミニッツ、オプティ・フリー[®]プラス、レニュー マルチプラス、エピカコールド[®]、ロートCキューブソフトワン[®]モイストi）と過酸化水素タイプ2 銘柄（コンセプトワンステップ、エーオーセプト）、ポビドンヨードタイプ1 銘柄（バイオクレン[®]エファール）を対象として、 5×10^6 ml のアカントアメーバ懸濁液（栄養体および2 週齢シスト）に100倍量になるように各消毒薬を加え、25℃で2、4、8、24時間静置した後にアカントアメーバがどの程度減少したかを調べた。

栄養体については、過酸化水素タイプ、ポビドンヨード

タイプでは2時間をこえる静置で1/1,000以下にアカントアメーバが減少した。MPS 8 銘柄は、銘柄間で消毒効果に差があったが、表示された最短消毒時間で過酸化水素タイプ、ポビドンヨードタイプと同じ程度の消毒効果が得られたのは1銘柄のみであった。また、夜間消毒することから8時間静置する使用者が多いと考えられるが、MPS 8 銘柄中4銘柄は8時間静置後もアカントアメーバの減少が1/10に及ばず、8時間静置後に過酸化水素タイプ、ポビドンヨードタイプと同程度の効果を示したのは2銘柄のみであった。

2 週齢シストについては、いずれの銘柄も栄養体に対する効果に比べて大幅に低かった。ただし、ポビドンヨードタイプはMPSや過酸化水素タイプに比べて消毒効果が高く、4時間静置後で1/400程度減少した。

レンズケースに消毒剤を注ぎ足して使用した場合を想定したテスト、すなわち 10^6 /ml のアカントアメーバ懸濁液に10倍量の各消毒薬を加え、24時間で完全に死滅したのかを確認するテストでは、すべての銘柄でアカントアメーバが残存していた。

2. SCLの衛生状態調査

18~29歳の2週間頻回交換型SCLを装着している学生385名を調査対象とした。通常どおりの方法で2週間装着し、装着最終日も通常どおりのケアを行ったレンズをレンズケース内のケア用品に浸漬したままの状態回収し、衛生状態を調べた。また、レンズのケア方法や目のトラブルの経験についてのアンケート調査もあわせて行った。

アカントアメーバについては、培養とreal-time polymerase chain reaction（以下 PCR）を行った。培養の結果、2名からアカントアメーバが検出された。また、real-time PCRでは、培養でアカントアメーバが検出された2名を含む40名（10.4%）からアカントアメーバのDNAが検出された。DNAが検出された例ではそのアカントアメーバがレンズケースの中で生きていたのかどうかは不明だが、ケースがアメーバで汚染されている実態が明らかとなった。

アカントアメーバに汚染された40名ではそのうち70.0%で細菌が検出され、汚染が確認されなかった症例の58.3%

より高かった。

ポビドンヨードタイプのケア用品を使用している7名ではアcantアメーバ汚染は確認されず、ポビドンヨードタイプがほかの消毒剤に比べてアcantアメーバに対する効果が高いことを反映している可能性が考えられた。

細菌については230名(59.7%)から細菌が検出され、緑膿菌は79名、大腸菌は27名から検出された。消毒薬の種類別でみると、MPS使用者の細菌検出率は61.5%、緑膿菌検出率は21.8%で、過酸化水素タイプの検出率(細菌検出率が45.9%、緑膿菌検出率が8.1%)より有意に高かった。レンズの種別では低含水・非イオン性のグループIのレンズを使用していた人からの細菌検出率(74.7%)はほかのレンズ使用者よりも有意に高く、含水率に反比例するレンズへの細菌接着の影響が考えられた。

レンズケアの方法と衛生状態との関連を調べた。レンズケアにあたって、石けんでの手洗い、レンズのこすり洗いを必ず行い、レンズケースを3カ月以内に交換するという三つの注意点を守ってケアを行っていた人(こちらは32名と人数が少ない)は、守っていなかった人(353名)に比べてアcantアメーバ汚染率、細菌検出率ともに低かった。ただ、正しい方法でケアを行っている人でもアcantアメーバ・細菌が検出されることは、現在のケア用品の限界を示している。

ケア前の手洗いについては、毎回石けんで手洗いをしている人は34.5%であり、手洗いを毎回行っていない、もしくは全くしていない人が3割程度を占めていた。また、こすり洗いについては、毎回行っている人は全体の約半数であり、ほとんどあるいは全くしない人が12.2%いた。また、レンズケースを3カ月以内に交換している人は約3割で、ほとんどあるいは全くしない人が10.7%いた。ケア用品の添付文書などを読んでいない人も8.1%あった。

CLに関する目のトラブルのアンケートでは49.1%の人が異物感・充血など目の調子が悪くなった経験があり、29.1%が医師の診察を受けていた。一方で3カ月に1回以上の定期検査を受けている人は38.4%にとどまった。

3. 結果を受けての提言

これらの結果を受けて以下のような提言がなされた。

1) 消毒者へのアドバイス

- (1) こすり洗いを行わないと消毒剤の消毒効果だけではアcantアメーバを完全に消毒することはできない。消毒剤の種類にかかわらず、石けんでの手洗いやレンズのこすり洗いを毎日行い、レンズケースを定期的に交換するなど、正しい方法でケアを行うようにしよう。
- (2) 定期的に専門医のいる医療機関で検査を受け、目とレンズの状態をチェックしてもらうようにしよう。

2) 業界への要望

- (1) SCL用消毒剤そのもののアメーバに対する消毒効果は限界があると考えられることから、商品にアcantアメーバ角膜炎を防ぐための注意喚起表示を徹底するよう要望する。また、アcantアメーバ除去に有効なこすり洗いの方法や消毒効果を向上させるような成分の組成を検討するよう要望する。
- (2) 装用者に対し、CLの適切な使用方法の教育・啓発を更に徹底するよう要望する。

3) 行政への要望

- (1) SCL用消毒剤そのもののアcantアメーバに対する消毒効果は限界があると考えられることから、商品にアcantアメーバ角膜炎を防ぐための注意喚起表示を徹底させるように要望する。また、アcantアメーバ除去に有効なこすり洗いの方法やアcantアメーバに対する消毒効果の試験方法などについて専門家による検討を開始するよう要望する。
- (2) 装用者に対し、CLの適切な使用方法の教育・啓発を更に徹底するよう医師および業界への指導を要望する。

国民生活センターの調査の発表の影響

以上のような報告が2009年12月16日に記者発表された。その日は筆者のところにまでマスコミから問い合わせの電話があったくらいである。当然、国民生活センターもその週はひっきりなしにかかってくる電話への対応に追われたとのことで、かなり大きな反響であったと思われるが、翌日の新聞では、MPSの銘柄によってアcantアメーバによる消毒効果に差があるという部分が強調されて報道されてしまった。更にほかの銘柄よりよかったとされた企業から「うちのは大丈夫である」ととれる文書が出され、宣伝に利用するような動きがあったりして、本来ケア用品による消毒には限界があるので、皆で色々な対策をとろうと提言した国民生活センターの意図からずれてしまったのは残念である。マスコミには強い力があるのでうまく利用すれば大きな効果が得られるが、マスコミの好みによるバイアスというものがあるため、それがゆがんだ効果になる危険性もはらんでいることを強く感じた。ただ、この発表後には厚生労働省からも反応があり、企業にも改善策を模索する積極的な機運が生まれたことは歓迎すべきことであり、少しづれたとはいいながら、ある程度の効果があったのは幸いである。最近、どこの施設の先生方に聞いてもアcantアメーバ角膜炎の症例が一時に比べて減ったように思うとの答えが返ってくる。このように大々的な発表を行ったことの効果がそのような形で出てきているのであればそれでよいのだが、こういうことはコンスタントに啓発していかないと徐々にそのインパクトを減じていく可能性

が高い。一時の騒ぎに終わらせないよう、今後も日本コンタクトレンズ学会を中心として、我々眼科医が果たしていかなければならない役割は大きいであろう。

参 考 文 献

- 1) ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒性能—使用実態調査も踏まえて—。平成21年12月16日。独立行政法人 国民生活センター。

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 ($P < 0.05$, $2<$ 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 κ -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- β 2, platelet-derived growth factor, interferon- γ , 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.¹⁻³ 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.⁴⁻⁶

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)- β , interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and IL-8.⁷⁻⁹ The expression of IL-6, TNF- α , 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.¹⁰⁻¹²

HSV-1 infections activate signal transduction, including the nuclear factor κ -B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades.^{9,13-15} 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.^{3,16}

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.¹⁷ 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-Sasaki¹⁸ (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.¹⁰ 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°C until use. The infectivity of the virus was determined by plaque titration assay, typically reaching up to 1×10^9 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 μg 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'-GATGAGTACAAAAGTCC-CTGATCCA-3', reverse 5'-CTGCAGCCACTGGTTCTGT-3'; IFN- α 1: forward 5'-GGAGTTTGATGGCAACCAGT-3', reverse 5'-CTCTCCTCCTGCATCACACA-3'; and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): forward 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3', reverse 5'-GCC-CAATACGACCAATCC-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- α 1 transcript was significantly increased at 12 hours PI—that is, the IFN- α 1 expression relative to GAPDH was 2.7 ± 0.2 (relative copies) at multiplicity of infection (MOI) 1 of HSV-1 and 1.6 ± 0.1 (relative copies) for mock infection ($P < 0.01$). The level was increased at 24 hours PI to 31.3 ± 7.7 (relative copies) IFN- α 1/GAPDH at MOI 1 of HSV-1 and 2.9 ± 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.

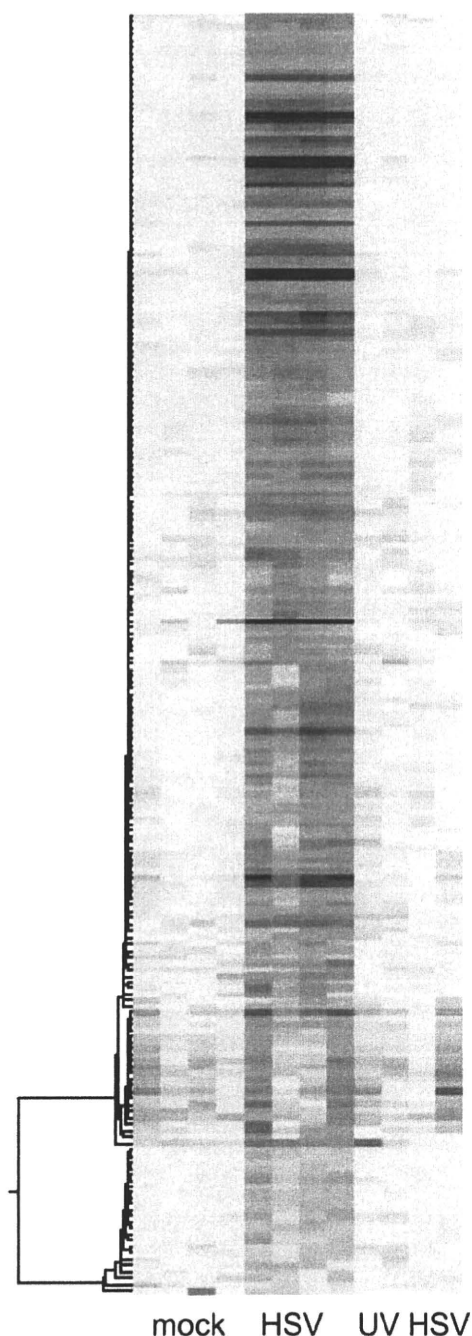


FIGURE 1. Clustering analysis of HSV-1 infection-induced transcriptome in an HCEC line. Four hundred twelve differentially expressed genes (ANOVA; $P < 0.05$, $2 < \text{or } 0.5 >$ threshold, 12 hours PI) were analyzed by using hierarchical clustering. Gene direction analysis showed that HSV-1 KOS strain 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 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.¹⁰ 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, INGI, 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, PNR1, RASD1, VAV3</i> | ERK, GC-GCR dimer, JINK1/2, Laminin, N-cor, Notch, Pak, Rar, Rxr, SWI-SNF, VitaminD3-VDR-RXR | 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, Ck2, ERK1/2, FSH, Histone h3, Histone h4, Hsp70, MAPK, Pka, Pld, PP2A, RGS2, RNA polymerase II, STAT5a/b, Tubulin | 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-β, IL6, IRF9, MUC2, ND2, PIM2 (includes EG:11040), RGS16, RSAD2, SELPLG, SOCS1, TLR, TLR1, TNFAIP3</i> | ALP, Hsp27, IFN- α , IFN- γ , IgG, IL1, IL12, IRF, JAK, LDL, MHC Class I, NF- κ B, STAT, TGF- β | 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- β , HBEGF, HCG, Ige, IKK, JNK, Mek, MMP, Nos, p38 MAPK, p70 S6k, Pkc(s), PLC, PLC-g, Tyrosine kinase | 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 PCR¹⁹ 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/ μ L and anti-IL-6-treated at MOI 0.1 yielded $1.0 \pm 0.2 \times 10^3$ copies/ μ 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- β 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 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-

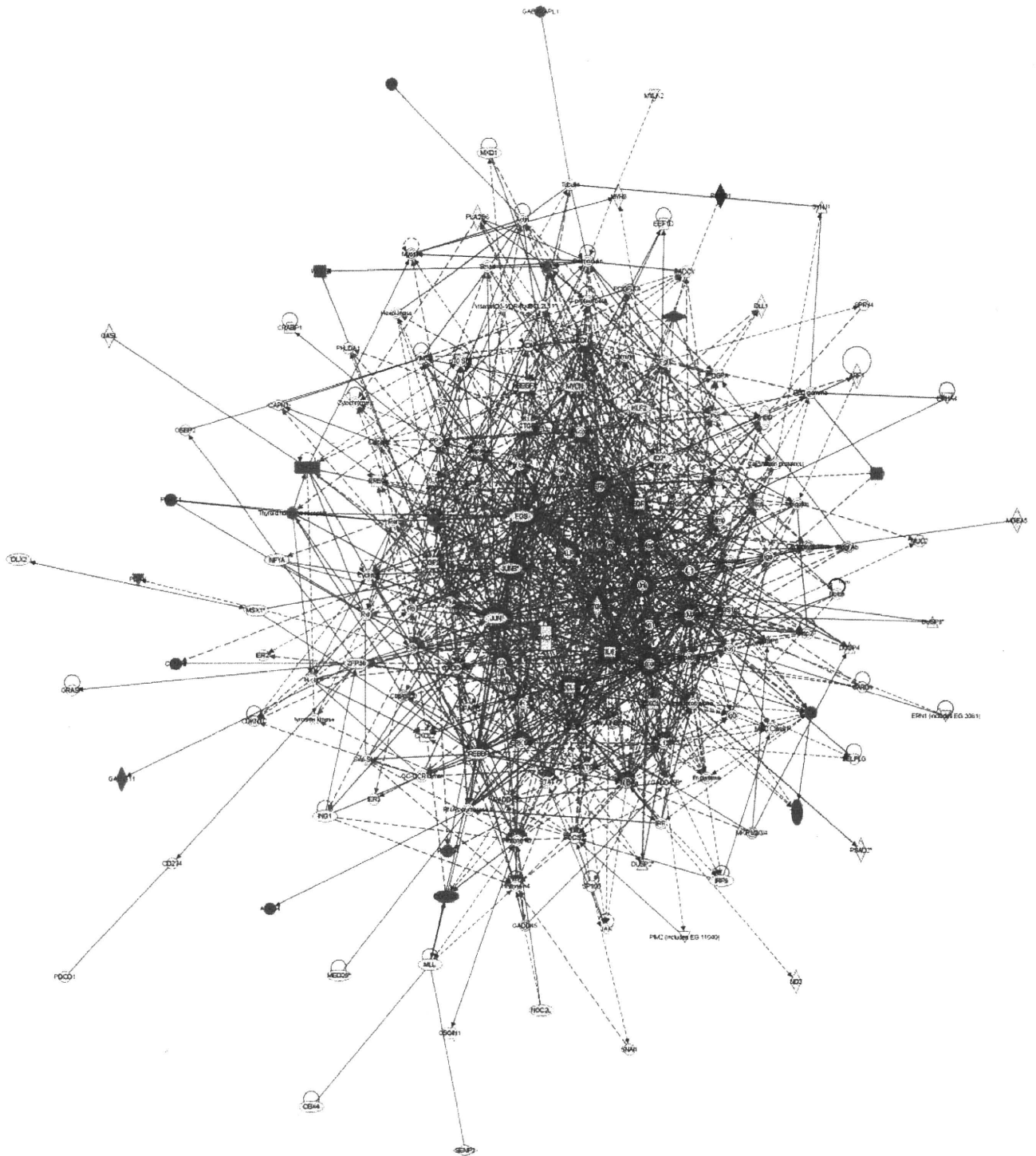


FIGURE 2. Pathway analysis of the biological processes underlying the HSV-1 infection-induced responses of HCECs. Networks 1 to 5 form the merged network. *Red*, activated; *green*, suppressed.

makura et al.,²⁰ 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),²¹⁻²³ which showed most of the cellular transcripts to be downregulated. These changes are considered to be mediated by transcrip-

ditional 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.²⁰ 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.

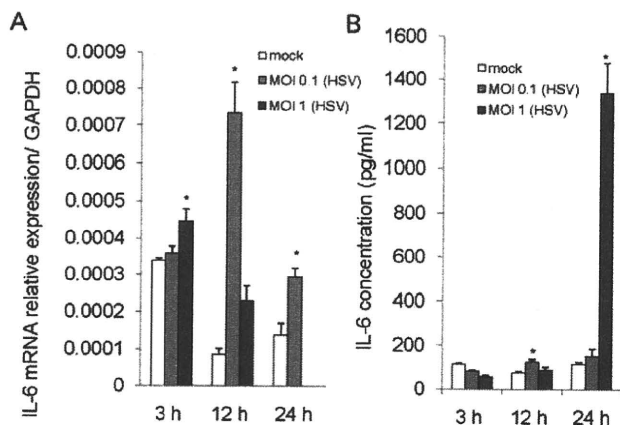


FIGURE 3. Kinetics of IL-6 induction in HCECs after HSV-1 infection. The mRNA of IL-6 is significantly induced at 3 hours PI and peaked at 12 hours PI, as determined by real-time RT-PCR (A). The IL-6 level in the infected supernatant was significantly elevated, as determined by ELISA (B). *n* = 6; **P* < 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-κB signaling pathways and related elements. Activation of NF-κB and JNK has been shown to be related to

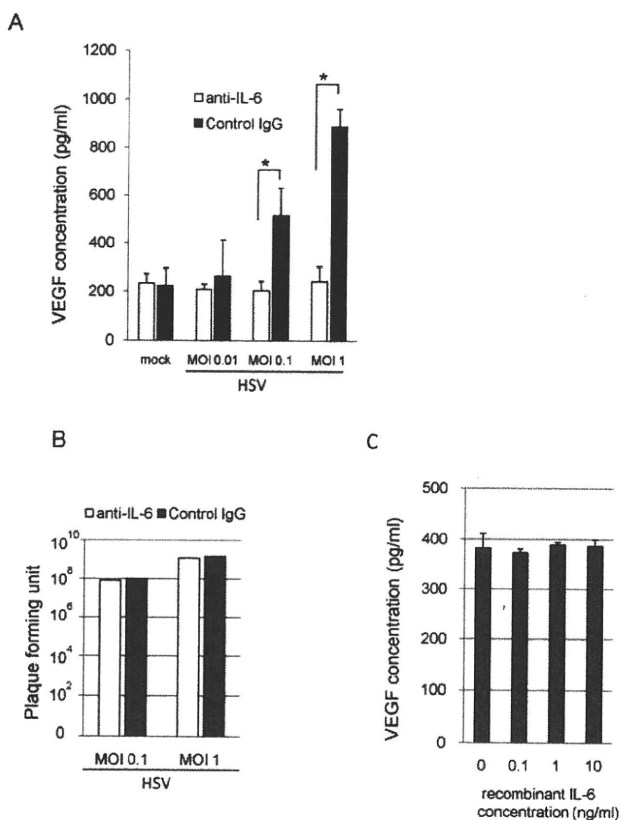


FIGURE 4. Requirement of IL-6 and HSV-1 infection for VEGF induction in the HCECs. HSV-1 infection significantly induced VEGF at 12 hours PI which was suppressed by anti-IL-6 treatment (A). The supernatant of HSV-1-infected corneal epithelial cells was assayed for HSV-1 titration. There were no significant 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.

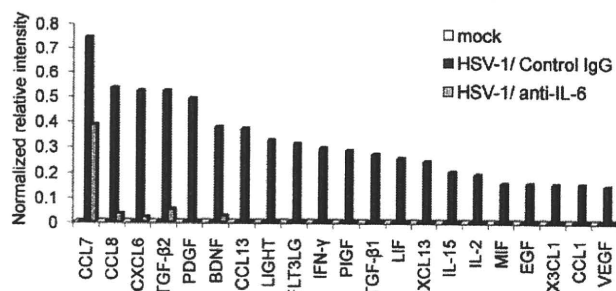


FIGURE 5. IL-6-sensitive induction profile of inflammatory cytokines by HSV-1-infected HCECs. HCECs adsorbed HSV-1 at MOI 1 for 1 hour and were reseeded with DMEM containing control IgG or anti-IL-6 antibody. After 12 hours of incubation, the supernatant of HSV-1-infected HCECs was assayed with a cytokine 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-α.⁹ 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 infection²⁴ 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.^{25,26} IL-6 is an important B-cell differentiation factor as well as a converter of T cells into cytotoxic T cells or Th17 lineage.²⁷ 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 strain⁸ 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.²⁸ The promotion of neuronal survival by IL-6 may induce ocular reactivation of latent HSV-1 in the trigeminal ganglion.²⁹

In herpetic keratitis, IL-6 has been documented to be a factor that contributes to the massive neutrophil attraction to the corneal stroma.^{8,30,31} Also, IL-6 has been reported to be related to corneal neovascularization via VEGF, another cardinal feature of herpetic keratitis.^{8,31,32} 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.³¹ 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 ZFP36.³³⁻³⁵ 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-β, nuclear factor of activated T cells, and Toll-like receptor (TLR). FOS and JUN directly regulate the

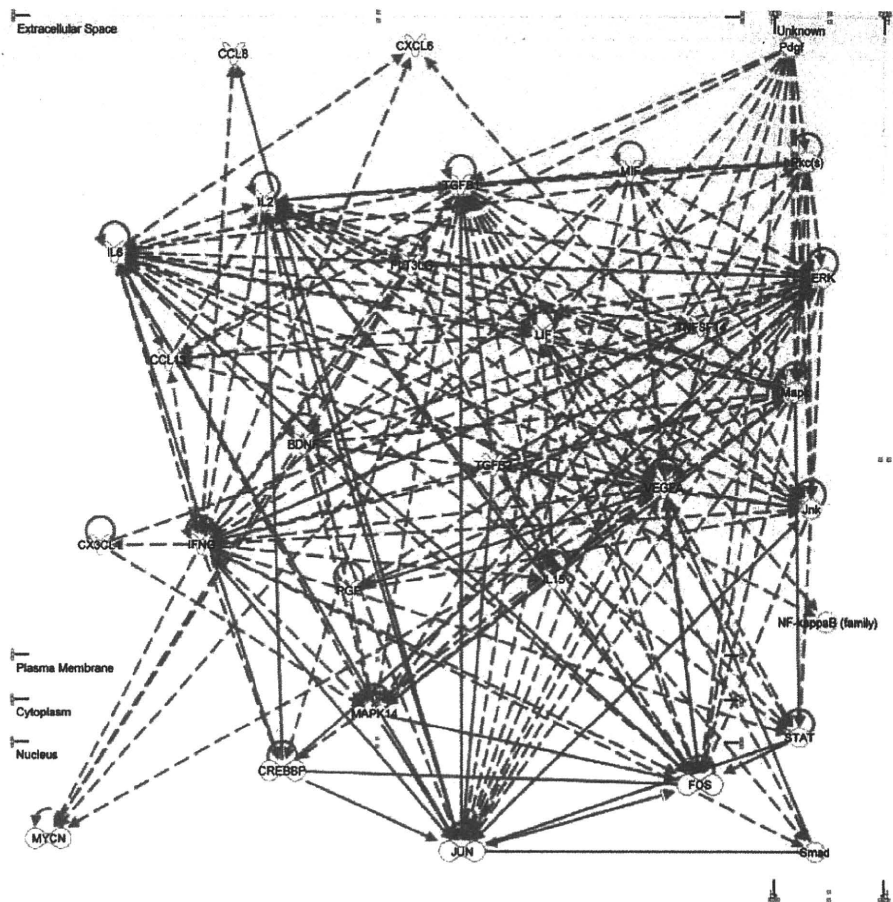


FIGURE 6. Pathway analysis of IL-6-sensitive inflammatory cytokine induction and canonical pathways underlying HSV-1-infection.

critical inflammatory mediators IL-6, VEGF, IL-2, IL-8, and cyclooxygenase (Fig. 2).^{33,36-42} When we analyzed the cytokine profiling sensitive to the blockade of IL-6, we found numerous previously unrecognized IL-6-sensitive genes, including *TGF-B2*, *PDGF*, *BDNF*, *CCL13*, *LIGHT*, *FLT3LG*, *IFN-G*, *PIGF*, *TGF-B1*, *IL-15*, *MIF*, and *CX3CL1*, together with previously reported genes, including *CXCL6*, *IL-2*, *CCL1*, *LIF*, *VEGF*, and *BDNF*.^{8,27,31,43-47} These interactions were associated with IL-6, IL-2, IFN- γ , TGF- β 1, 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- κ B and p38 pathways.⁴⁸ HSV infection stimulates transcriptional activation of the NF- κ B, CRE, and activator protein (AP)-1 recognition sites in the *IL-6* gene as early as 1 hour to 2 hours PI^{9,48,49} 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.⁸ 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.⁴⁸ 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.^{8,20,50-52} 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 (*SNAIL*). 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>).^{20,49,51,53} 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.⁵⁴ It has strong cell-transforming/transactivation capabilities and has recently gained interest in oncogenesis.⁵⁵

To summarize, HSV-infection of HCECs induces an inflammatory response relating to transcriptional events involving ERK, MAPK, JNK, and NF- κ B and uses IL-6 as a critical element to regulate proinflammatory cytokine induction.

Acknowledgments

The authors thank Duco Hamasaki for editing the article.