

201231054A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

特発性角膜内皮炎の
診断および治療方針の確立に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲富 勉

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
特発性角膜内皮炎の診断および治療方針の確立に関する研究	-----	3
稲富 勉		
II. 分担研究報告		
1. プロスペクティブ研究による抗ウイルス治療の有効性の検討と標準的治療法の確立	-----	7
稲富 勉		
2. サイトメガロウイルス角膜内皮炎に対するガンシクロビルの治療効果判定	-----	11
大橋裕一		
3. サイトメガロウイルス角膜内皮感染による分子動態の解析	-----	14
井上幸次		
4. サイトメガロウイルス虹彩炎に対するガンシクロビル自家調整点眼薬の 治療効果に関する研究	-----	17
望月 學		
5. CMV角膜内皮炎における角膜移植後の再発に関する考察	-----	21
西田幸二		
6. サイトメガロウイルス角膜内皮炎の臨床的特徴と診断基準の作成	-----	24
小泉範子		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	31

班 員 構 成

研究者名		所属等	職名
研究代表者	稲富 勉	京都府立医科大学大学院 視覚機能再生外科学	助 教
研究分担者	大橋 裕一	愛媛大学大学院医学系研究科 感覚機能医学講座視機能外科学分野	教 授
	井上 幸次	鳥取大学医学部視覚病態学	教 授
	望月 學	東京医科歯科大学医歯学総合研究科 眼科学分野	教 授
	西田 幸二	大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学（眼科学）	教 授
	小泉 範子	同志社大学生命医科学部医工学科	教 授
研究協力者	丸山 和一	京都府立医科大学大学院 視覚機能再生外科学	病院助教
	福本 暁子	京都府立医科大学大学院 視覚機能再生外科学	大学院
	白石 敦	愛媛大学大学院医学系研究科 視機能再生学講座	准教授
	鈴木 崇	愛媛大学大学院医学系研究科 感覚機能医学講座視機能外科学分野	助 教
	宮崎 大	鳥取大学医学部附属病院眼科	講 師
	神鳥美智子	鳥取大学医学部附属病院眼科	医 員
	杉田 直	東京医科歯科大学医歯学総合研究科 眼科学分野（神戸理化学研究所）	講 師
	高瀬 博	東京医科歯科大学医歯学総合研究科 眼科学分野	助 教
	相馬 剛至	大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学（眼科学）	特任助教
	林 皓三郎	近畿大学医学部眼科	客員教授
	奥村 直毅	同志社大学生命医科学部医工学科	助 教

I. 総括研究報告

特発性角膜内皮炎の診断および治療方針の確立に関する研究

研究代表者 稲富 勉 京都府立医科大学眼科 助教

研究要旨 角膜内皮細胞に特異的な炎症を突然に生じる特発性角膜内皮炎は、重篤な視力障害を引き起こし、最終的には水疱性角膜症に陥る病態不明な疾患であるが、診断基準や治療方法も確立されていない。本研究では、日本における特発性角膜内皮炎、とくに近年その存在が明らかとなったサイトメガロウイルス角膜内皮炎（以下 CMV 角膜内皮炎）の診断および治療方針の確立を主たる目的として、CMV 角膜内皮炎の診断基準を作成し、治療方針の確立のための研究を行った。特に本年度はガンシクロビル、バルガンシクロビルの CMV 角膜内皮炎に対する治療効果の検討を行い、研究班で作成したプロトコールに従ったプロスペクティブスタディを実施した。また培養ヒト角膜内皮細胞を用いてヒトサイトメガロウイルスの *in vitro* での感染モデルを作成し、病態解明に関する基礎的研究を行った。これらの研究の結果から、CMV 角膜内皮炎の発症機序の解明、治療法の確立につながる成果が得られた。

研究分担者

大橋裕一（愛媛大学医学部・教授）
井上幸次（鳥取大学医学部・教授）
望月學（東京医科歯科大学医学部・教授）
西田幸二（大阪大学医学部・教授）
小泉範子（同志社大学生命医科学部・教授）

診断基準や治療方法も確立されていない。我々は、特発性角膜内皮炎の主要な原因疾患として注目されているサイトメガロウイルス角膜内皮炎（CMV 角膜内皮炎）に着目し、CMV 角膜内皮炎の診断および治療法の確立を目的とした研究を行った。

A. 研究目的

角膜内皮細胞に特異的な炎症を突然に生じる特発性角膜内皮炎は、角膜浮腫の発生により重篤な視力障害を引き起こし、水疱性角膜症に陥る病態の不明な疾患であり、

B. 研究方法

1) CMV 角膜内皮炎に対するガンシクロビルの治療効果の検討

各分担研究施設において、CMV 角膜内皮炎および CMV 虹彩炎患者に対するガンシ

クロビル（GCV）点滴および点眼治療を行い、角膜所見、角膜内皮細胞数、眼圧を指標として治療成績を評価した。また従来は予後が不良とされていた CMV 角膜内皮炎患者に対する角膜移植治療後に、GCV 点眼を併用した治療を行い、治療効果を検討した。さらに、研究班の施設での多施設プロスペクティブ研究を行って、ガンシクロビルの全身および局所治療による前房内ウイルス量を指標とした治療効果の評価を行った。

2) CMV 角膜内皮炎・前部ぶどう膜炎の診断と病態解明に関する研究

不死化ヒト角膜内皮細胞（hCEn）を用いてヒトヘルペスウイルスの臨床分離株が角膜内皮細胞に感染可能であるか、また感染が生じた際にどのような免疫反応を生じるかについて検討を行った。

3) CMV 角膜内皮炎の診断基準の作成

全国調査の結果を解析し、診断基準を作成した。

（倫理面への配慮）

本研究は厚生労働省による臨床研究に関する倫理指針および疫学研究に関する倫理指針に従い、各大学倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) CMV 角膜内皮炎に対するガンシクロビルの治療効果

CMV 角膜内皮炎に対する GCV の治療効果について、角膜内皮細胞数を評価項目と

して検討した。結論として GCV 治療により角膜内皮細胞数の減少率が停止または低下し、治療薬としての有効性が示された。CMV 虹彩炎に対するバルガンシクロビル内服投与および GCV 点眼投与の検討では、いずれの治療も良好な眼圧上昇抑制効果を示したが、内服薬のみの投与では内服量の漸減に伴い全例で再発を来した。一方、点眼薬を併用または単独投与の症例では再発は半数のみで生じた。GCV 自家調整点眼薬の投与はサイトメガロウイルス虹彩炎の眼圧上昇発作の再発を抑制できる可能性が示された。さらに、CMV 角膜内皮炎による角膜内皮機能不全に対する角膜移植術では、術後 GCV 投与が有効であることが明らかとなった。

また、プロスペクティブ研究では、CMV 角膜内皮炎に対して GCV 全身投与と局所投与の併用療法の有効性と安全性が示された。至的投与期間および投与量についてはさらに検討が必要と考えられた。

2) CMV 角膜内皮炎・前部ぶどう膜炎の診断と病態解明に関する研究

CMV 精製ウイルスは hCEn に感染可能であった。また、ウイルス感染において誘導される代表的なサイトカインである IL-6 の転写誘導はウイルス増殖よりも前に起こっていたことが明らかとなった。

D. 考察

CMV 角膜内皮炎は免疫機能正常の中高齢者に発症するサイトメガロウイルス感染

症であり、CMV 前部ぶどう膜炎と診断されている症例のなかに、CMV 角膜内皮炎症例が含まれる可能性がある。コインリージョンや拒絶反応線様の角膜後面沈着物を伴うことが特徴であるが、虹彩炎や眼圧上昇を伴う角膜内皮炎を認めた場合にも、前房水 PCR によるウイルス検索が必要である。治療には GCV あるいはバルガンシクロビルが有効である。CMV DNA の証明により行われる。生体角膜共焦点顕微鏡による Owl's Eye sign 所見の証明や real-time PCR によるウイルス DNA 量の定量は、診断および治療効果の判定、また病態の解明に有用である。角膜内皮障害が進行した症例では、角膜移植が唯一の治療法であるが、再発予防に留意する必要がある。

E. 結論

CMV 角膜内皮炎の発症状況に関する全国調査により本疾患の特徴と診断、治療の現状を明らかにし、診断基準を作成した。

本疾患に対しては GCV やバルガンシクロビル等の抗 CMV 薬による薬物治療が有用であるが、角膜内皮障害が進行した症例に対しては GCV 点眼を併用した角膜移植術が必要である。今後は本研究で確立した培養角膜内皮細胞を用いたヒトサイトメガロウイルス感染モデルを用いて、病態の解明並びに治療法に関する研究を進めることができるかと期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 24 年度）

論文発表

各分担の項および巻末に記載した。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

II. 分担研究報告

プロスペクティブ研究による抗ウイルス治療の有効性の検討と 標準的治療法の確立

研究分担者 稲富 勉 京都府立医科大学眼科 助教

研究要旨 角膜内皮細胞に特異的な炎症を突然に生じる特発性角膜内皮炎は、重篤な視力障害を引き起こし、最終的には水疱性角膜症に陥る病態不明な疾患であるが、診断基準や治療方法も確立されていない。中でもサイトメガロウイルス角膜内皮炎では角膜後面沈着物からなるコインリージョンを特徴とし、虹彩毛様体炎や続発緑内障の合併が知られている。治療に抵抗する症例では角膜内皮細胞障害より水疱性角膜症に至ることも珍しくない。本研究では、日本における特発性角膜内皮炎、とくに近年その存在が明らかとなったサイトメガロウイルス角膜内皮炎（以下 CMV 角膜内皮炎）に対して 0.5%ガンシクロビル点眼薬を併用した角膜移植後の治療成績をレトロスペクティブに検討し、その結果をもとにデザインした標準的治療の有効性について多施設での前向き研究を行った。本研究により標準的治療方針の決定と抗ウイルス治療の新しい知見が得られた。

研究協力者

丸山和一（京都府立医科大学医学部・助教）

福本暁子（京都府立医科大学大学院）

A. 研究目的

サイトメガロウイルス（CMV）角膜内皮炎は CMV により引き起こされる角膜内皮炎の一つである。近年の我々の研究によりガンシクロビル（GCV）の前身投与および局所点眼療法は前房水中の CMV の陰性化と角膜内皮炎の改善効果があることを報告

してきた。しかし、治療開始が遅れた症例や複数回の再発症例では最終的に角膜内皮細胞機能不全に至り水疱性角膜症となる。

これらの症例に対しては全層角膜移植（PKP）もしくは角膜内皮移植（DSAEK）の適応となるが、従来は CMV 角膜内皮炎の再発により予後不良とされてきた。今回、我々は GCV 点眼を術後に併用した角膜移植の治療成績をレトロスペクティブに検討した。さらに GCV の全身投与および局所点眼療法の標準的治療プロトコールを作成し、

多施設での前向き研究により有効性と安全性について検討した。

B. 研究方法

対象は前房水 PCR および臨床経過から CMV 角膜内皮炎と診断され、2005 年 7 月から 2011 年 8 月までに角膜移植術を行った 6 例 6 眼。平均年齢 74.3 歳、平均観察期間 26.7 ヶ月。術式は初回移植群 3 眼では PKP 1 眼と DSAEK 2 眼を選択し、再移植群 3 眼ではすべて PKP を行った。全例で術後に 0.5% GCV 点眼を併用した。再発率、角膜透明治癒率、角膜内皮細胞密度 (ECD) の推移、術後視力について検討した。

標準的プロトコールによる前向き研究による有効性と安全性の検討は CMV 角膜内皮炎と確定診断された対象として抗ウイルス治療を行った。エントリー期間は 2011 年 6 月 1 日から 2012 年 12 月 31 日までの 1 年 6 ヶ月。参加施設は当研究班の 6 施設。

標準的治療法は全身投与として GCV (デノシン[®]) 点滴 (5mg/kg x 1 日 2 回) x 14 日もしくは点滴治療が不可な症例に対してはバルガンシクロビル (バリキサ[®]) 内服 (1800mg/分 2/day) x 14 日を行う。内服療法は必要があれば症状に応じて延長する。

局所療法は 0.5% GCV 点眼 6 回/日から開始し、同日にステロイド点眼 (0.1%フルメトロン[®]) 4 回/日、抗菌薬点眼 (クラビット[®] etc) 4 回/日を併用した。

局所療法は症状の改善に応じて随時減量とした。

確定診断および治療中の抗ウイルス効果の判定には前房水 PCR を用い、確定診断時、全身投与終了時、全身投与終了時で陽性の場合には症状改善時に追加検査を行い陰性化するまでモニターした。また再発時においても前房水 PCR により再発を確認した。

有効性および安全性の評価には 1. 前房水 CMV DNA 量の変化、2. 角膜後面沈着物の変化、3. 矯正視力、4. 角膜内皮細胞数を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は厚生労働省による臨床研究に関する倫理指針および疫学研究に関する倫理指針に従い、各大学倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) CMV 角膜内皮炎に対する外科的治療

CMV 角膜内皮炎症例に対する抗ウイルス治療後に水疱性角膜症に至った症例に対する角膜移植は有用な治療法であったが、再発の予防が必要不可欠であり、GCV の点眼投与を併用することにより再発の予防および治療が可能であった。

CMV 角膜内皮炎と診断され、2005 年 7 月から 2011 年 8 月までに角膜移植術を行った 6 例 6 眼の再発率、角膜透明治癒率、角膜内皮細胞密度 (ECD) の推移、術後視力について検討した。

初回移植群 3 眼では術後に再発は認めず、全例で角膜透明治癒が可能であった。術後平均 ECD は、術後 6 ヶ月、1 年で 2381/mm²、

2057/mm²で推移した。平均術後最高視力は0.39であった。再移植群3眼の診断までに受けた角膜移植回数は平均2回。術後2眼にコインリージョン様の角膜後面沈着物を伴う内皮炎の再発を認めたが、GCV点眼回数増加により軽快した。術後平均ECDは、術後6ヶ月、1年で、2620/mm²、1550/mm²で推移し、平均術後最高視力は0.37であった。すべての症例でGCVによる副作用および拒絶反応を生じた症例はなく、全症例で移植片は透明治癒が維持できた。CMV角膜内皮炎による角膜内皮機能不全に対する角膜移植術では、術後GCV投与が有効であった。

2) プロスペクティブ研究による抗ウイルス治療の有効性の検討と標準的治療法の確立

対象はCMV内皮炎と確定診断され、多施設にて同一治療法をプロスペクティブに実施した8症例8眼。3施設よりエントリーがあった。治療開始時の視力は0.15から1.0に分布し、コインリージョンのみを認めた症例は3例、残りの5例は典型的な1型内皮炎の病型を認めた。角膜浮腫は8例中6例に認め、治療前の角膜内皮細胞密度は614から2245cells/mm²に分布した。続発緑内障の合併は7例、虹彩炎を1例に認めた。

抗ウイルス治療は7例でGCVの点滴治療を、入院治療のできなかつた1例でバルガンシクロビルの内服を選択した。局所点眼の投与期間は3ヶ月から17ヶ月であり、全症例で観察期間内すべてで継続治療されていた。

前房水中CMV量は平均4.38 x 10⁴コピー/ml (8.3 x 10²~1.55 x 10⁵)。2週間の全身治療後の前房水中CMVの陰性化率は75%で治療期間内にすべてが陰性化した。治療開始1ヶ月後に7例でコインリージョンの消失が得られ、最終観察時には全例で色素性の後面沈着物のみに改善した。

平均角膜内皮細胞密度 (cell/mm²) は治療前1160 ± 365、治療開始1ヶ月後1048 ± 440であり有意な減少はなく、最終観察時では4例で25%以上の減少を認め、移植眼では53.5%の減少率を認めた。再発は2例25%で認めた。重篤な有害事象は認めなかった。

すべての症例で視力の改善もしくは不変を認め、1ヶ月での視力低下例は0%であった。しかし観察期間内には白内障進行により視力低下を認めたが追加手術により全例で視力改善が観察された。

CMV角膜内皮炎に対してGCV全身投与と局所投与の併用療法の有効性と安全性が示された。至的投与期間および投与量についてはさらに検討が必要と考えられた。

D. 研究目的の達成度

今回の標準的治療レジメを用いたプロスペクティブ研究により、今後の推奨される医療にまで言及できた。標準治療でのウイルス定量を実施することで治療効果に対する科学的な裏付け結果を得ることが可能であった。

E. 臨床現場等への研究成果の活用

標準的治療の前向き研究により発症時の全身投与の有効性が示され、臨床現場に還元できた。また局所療法についても投与期間や方法についても推奨される投与方法が提言できた。

F. 研究発表（平成 24 年度）

論文発表 なし

学会発表

1. Inatomi T, Koizumi N, Yamamoto Y, Nakagawa H, Miyamoto K, Sotozono C, Kinoshita S: Effect of 0.5% Ganciclovir instillation for the graft survival of keratoplasty with cytomegalovirus endotheliitis. 3rd Asia Cornea Society Meeting, Philippine, 2012.11.28
2. 小泉範子, 稲富勉, 大橋裕一, 井上幸次,

望月學, 西田幸二: サイトメガロウイルス角膜内皮炎の臨床的特徴と診断基準の作成. 角膜カンファレンス2013 第37回日本角膜学会総会 第29回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.2.15

3. 稲富勉, 小泉範子, 大橋裕一, 井上幸次, 望月學, 西田幸二: サイトメガロウイルス角膜内皮炎に対する治療法の確立. 角膜カンファレンス2013 第37回日本角膜学会総会 第29回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.2.15

著書・総説 なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

サイトメガロウイルス角膜内皮炎に対する
ガンシクロビルの治療効果判定

研究分担者 大橋 裕一 愛媛大学眼科学 教授

研究要旨 特発性角膜内皮炎は重篤な内皮機能不全を引き起こす原因不明の疾患とされてきた。近年、サイトメガロウイルス（CMV）による角膜内皮炎がその原因の一つとして注目されている。しかしながら、その病態は依然不明であり、診断、治療方法についての一定の見解は得られていない。

本研究では、CMV 角膜内皮炎に対するガンシクロビルの治療効果について、角膜内皮細胞数を評価項目として検討した。結論としてガンシクロビル治療により角膜内皮細胞数の減少率が停止または低下し、治療薬としての有効性が示された。

研究協力者

白石敦（愛媛大学眼科・准教授）

鈴木崇（愛媛大学眼科・助教）

A. 研究目的

本研究は、CMV 角膜内皮炎治療において、角膜内皮細胞数を評価指標としてガンシクロビルの治療効果について検討する。

B. 研究方法

CMV 角膜内皮炎が疑われる患者に対し、細隙灯顕微鏡検査、前房水 PCR、生体角膜共焦点顕微鏡にて CMV 角膜内皮炎と診断された患者に対して、0.5%ガンシクロビル（GCV）点眼および GCV 点滴を行い臨床

経過について検討した。

（倫理面への配慮）

CMV 角膜内皮炎に対して、他に有効な治療法はなく、本研究は愛媛大学倫理委員会において承認されている。

C. 研究結果

本研究期間中に前房水 PCR にて CMV DNA 陽性であった CMV 角膜内皮炎確定診断症例は 11 症例であった。全例で 0.5% GCV 点眼を行い、8 例では GCV 点滴を併用した。1 年以上経過観察できた 8 例の、治療開始前から治療後 6 ヶ月、1 年での内皮細胞減少率はそれぞれ 16.7%、21.4%であった。GCV の点眼は経過観察期間中、全例

で継続して行った。再発は1例のみ認め、2度の再発に対し、それぞれ GCV 点滴を行った。再発による内皮減少はわずかであった。最終観察時において、11例全例で角膜の透明性が維持されていた。

D. 考察

GCV 治療開始前から治療後6ヶ月、1年での内皮細胞減少率はそれぞれ16.7%、21.4%であった。最終観察時において、11例全例で角膜の透明性が維持されていることより、角膜内皮減少率は停止または低下していると判断され、GCV 治療はCMV 角膜内皮炎に対して有効であったと推測される。

E. 結論

CMV 角膜内皮炎に対する GCV による抗ウイルス治療の有効性が示された。

F. 研究発表 (平成24年度)

論文発表

1. Toriyama K, Suzuki T, Hara Y, Ohashi Y: Cytomegalovirus retinitis after multiple ocular surgeries in an immunocompetent patient. Case Report Ophthalmol. 3(3): 356-359, 2012.
2. Zheng X, Inoue Y, Shiraishi A, Hara Y, Goto T, Ohashi Y: In vivo confocal microscopic and histological findings of unknown bullous keratopathy probably associated with pseudoexfoliation syndrome. BMC Ophthalmol.12: 17, 2012.

3. Joko T, Shiraishi A, Akune Y, Tokumaru S, Kobayashi T, Miyata K, Ohashi Y: Involvement of P38MAPK in human corneal endothelial cell migration induced by TGF- β_2 . Exp Eye Res. 108: 23-32, 2013.

学会発表

1. 鄭曉東, 白石敦, 鈴木崇, 坂根由梨, 原祐子, 山口昌彦, 宇野敏彦, 大橋裕一: 生体共焦点顕微鏡による角膜後面沈着物の観察: 感染性及び非感染性疾患鑑別の試み. 第116回日本眼科学会総会, 東京, 2012.4.5
2. 鳥山浩二, 鈴木崇, 鄭曉東, 原祐子, 山口昌彦, 白石敦, 宇野敏彦, 大橋裕一: 初診時に角膜内皮炎と診断されたアカントアメーバ角膜炎の2例. フォーサム2012 横浜 (第49回日本眼感染症学会), 横浜, 2012.7.14
3. 井上智之, 鈴木崇, 大橋裕一: グラフト拒絶反応治療抵抗例におけるヘルペス性角膜内皮炎. 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012.10.25-28
4. 小泉範子, 稲富勉, 大橋裕一, 井上幸次, 望月學, 西田幸二: サイトメガロウイルス角膜内皮炎の臨床的特徴と診断基準の作成. 角膜カンファレンス2013 第37回日本角膜学会総会 第29回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.2.15
5. 稲富勉, 小泉範子, 大橋裕一, 井上幸次, 望月學, 西田幸二: サイトメガロウイルス角膜内皮炎に対する治療法の確立.

角膜カンファランス 2013 第 37 回日本
角膜学会総会 第 29 回日本角膜移植学
会, 和歌山, 2013.2.15

著書・総説 なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

サイトメガロウイルス角膜内皮感染による分子動態の解析

研究分担者 井上 幸次 鳥取大学視覚病態学 教授

研究要旨 サイトメガロウイルス（CMV）は増殖が緩慢で分離培養が難しいため、CMV 内皮炎の従来報告では PCR によるウイルス DNA の有無だけで診断・治療が行われている。このため実際に CMV が角膜内皮細胞に感染可能であるかについては未だ確証を得られていない。そこで我々はヒトサイトメガロウイルスが不死化ヒト角膜内皮細胞（hCEn）に感染可能かどうか、また感染した場合にどのような免疫反応を生じるかについて検討した。

その結果、CMV 精製ウイルスは hCEn に感染可能であった。また、ウイルス感染において誘導される代表的なサイトカインである IL-6 の転写誘導はウイルス増殖よりも前に起こっていた。

今後は CMV 感染細胞の検体を用いてマイクロアレイなどを行うことが可能であり、更なる病態解明が期待できる。

研究協力者

宮崎大

（鳥取大学医学部附属病院眼科・講師）

神鳥美智子

（鳥取大学医学部附属病院眼科・医員）

報告では PCR によるウイルスの定性もしくは定量だけで診断・治療が行われているが、実際に CMV が角膜内皮細胞に感染しているかどうかについて検討した報告がない。そこで我々は不死化ヒト角膜内皮細胞（hCEn）を用いてヒト CMV の臨床分離株が感染可能であるか検討を行った。

A. 研究目的

サイトメガロウイルス（CMV）が網膜炎だけでなく前眼部炎症（内皮炎・虹彩炎）に関与していることが認知されつつある。

しかし、CMV は増殖速度が極めて緩慢であり、細胞外では生存できないため、分離培養による診断は行われていない。従来の

B. 研究方法

精製されたヒトサイトメガロウイルス臨床分離株（20040-4UAR 株）を hCEn に MOI（multiplicity of infection）0、0.01、0.05、0.1 で感染させた。上清は 6 時間、12 時間、24

時間、1 週間後に回収した。上清は一部サイトカインアレイを行った。感染細胞は RNA 抽出を行い、RT-PCR、対象分子の real-time PCR を行った。また、感染細胞の抗 glycoprotein B (gB) 抗体による染色も併せて行った。

(倫理面への配慮)

In vitro の研究であるため、この研究により患者に対する不利益は生じない。

C. 研究結果

ウイルス感染細胞の上清中の CMV-DNA は感染翌日と比較し 1 週間後で有意に増加した。この結果を踏まえ、CMV 増殖には 1 週間程度要すると考えられたため、感染 1 週間後の細胞を抗ヒトサイトメガロウイルス抗体で染色したところ、染色された細胞の巨細胞化と細胞内封入体を認め、この封入体が抗ヒトサイトメガロウイルス抗体で染色された。さらに隣接する細胞にも封入体が出現していることが確認された。代表的な CMV 遺伝子の転写は、前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子の順で経時的に誘導されていた。IL-6 の転写誘導は 6 時間後にピークを認め、タンパク産生はそれに引き続いて 12 時間、24 時間後に非感染細胞と比較し有意に増大していた。サイトカインアレイでは IL-6 を含む 20 種類のサイトカインが感染により誘導されていた。

D. 考察

CMV は多くの人で単球に潜伏感染して

おり、炎症を生じている部位では原因でなくても、潜伏しているものを検出してしまう可能性がある。しかし、今回の検討で CMV 感染に特徴的な細胞の巨細胞化と封入体を認め、さらに隣接する細胞に感染が波及していたことから、角膜内皮細胞への感染は成立すると考えられた。また、ウイルス遺伝子の転写誘導は経時的に起こるが、上清中にウイルス DNA が有意に増加するには 1 週間を要しており、増殖サイクルが極めて遅いことが示された。これとは対照的に、IL-6 の転写誘導は 6 時間ですでに起こっており、免疫反応はウイルス感染刺激によって誘導されていることがわかる。この他の免疫反応については今後の感染細胞サンプルのマイクロアレイの結果が待たれるところであるが、CMV による前眼部炎症の病態解明につながることを期待される。

E. 結論

CMV は角膜内皮細胞に感染することが可能であった。IL-6 の転写誘導はウイルス増殖と異なり、早期に生じていた。

F. 研究発表 (平成 24 年度)

論文発表

1. Inoue Y, Shimomura Y, Fukuda M, Miyazaki D, Ohashi Y, Sasaki H, Tagawa, Y, Shiota H, Inada N, Okamoto S, Araki-Sasaki K, Kimura T, Hatano H, Nakagawa, H, Nakamura S, Hirahara A, Tanaka K, Sakuma H: Multicenter clinical study of the herpes simplex virus

immunochromatographic assay kit for the diagnosis of herpetic epithelial keratitis.

Br J Ophthalmol Epub PMID:23087417

学会発表

1. 神鳥美智子, 宮崎大, 矢倉慶子, 小松直樹, 唐下千寿, 石倉涼子, 井上幸次: 前眼部炎症疾患における前房内サイトメガロウイルス DNA のロジスティック解析. 第 66 回日本臨床眼科学会, 京都, 2012.10.25
2. 神鳥美智子, 宮崎大, 矢倉慶子, 野口由美子, 山本由紀美, 井上幸次, 山上聡, 錫谷達夫: ヒト角膜内皮にサイトメガロウイルスは感染可能か? ~in vitro 分子解析~. 第 14 回島根県眼科冬季学術講演会 第 31 回島根大学眼科同窓会総会, 出雲, 2013.2.10
3. 神鳥美智子, 宮崎大, 矢倉慶子, 野口由美子, 山本由紀美, 井上幸次, 山上聡, 錫谷達夫: ヒト角膜内皮にサイトメガロウイルスは感染可能か? ~in vitro 分子解析~. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会 第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.2.14

4. 小泉範子, 稲富勉, 大橋裕一, 井上幸次, 望月學, 西田幸二: サイトメガロウイルス角膜内皮炎の臨床的特徴と診断基準の作成. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会 第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.2.15
5. 稲富勉, 小泉範子, 大橋裕一, 井上幸次, 望月學, 西田幸二: サイトメガロウイルス角膜内皮炎に対する治療法の確立. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会 第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.2.15

著書・総説

1. 井上幸次: 単純ヘルペス角膜炎, 帯状ヘルペス角膜炎. 専門医のための眼科診療クオリファイ 15 メディカルオプタルモロジー 眼薬物治療のすべて (村田敏規編). 77-82, 中山書店, 東京, 2012.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

サイトメガロウイルス虹彩炎に対するガンシクロビル自家調整点眼薬の 治療効果に関する研究

研究分担者 望月 學 東京医科歯科大学眼科学 教授

研究要旨 前房水からサイトメガロウイルス遺伝子が PCR 法により検出されたサイトメガロウイルス虹彩炎患者 7 例に対して、抗ウイルス薬であるバルガンシクロビル内服またはガンシクロビル自家調整点眼薬を投与した。その結果、いずれの治療も良好な眼圧上昇抑制効果を示したが、内服薬のみの投与では内服量の漸減に伴い全例で再発を来した。一方、点眼薬を併用または単独投与の症例では再発は半数のみで生じた。ガンシクロビル自家調整点眼薬の投与はサイトメガロウイルス虹彩炎の眼圧上昇発作の再発を抑制できる可能性がある。

研究協力者

杉田直（神戸理化学研究所）

高瀬博（東京医科歯科大学眼科学・講師）

A. 研究目的

眼内炎症を生じる原因には、感染性疾患と非感染性疾患がある。前眼部に炎症を生じる感染性疾患としては単純ヘルペスウイルスや水痘・帯状疱疹ウイルスが知られているが、近年では従来原因が不明であり特発性の角膜内皮炎や前部ぶどう膜炎と分類されていた病態の一部にサイトメガロウイルスが関与する事が明らかとなって来た。サイトメガロウイルスが原因となる虹彩炎（サイトメガロウイルス虹彩炎）の治療法

はこれまでに確立されておらず、有効な治療法の開発が望まれている。本研究は、サイトメガロウイルスに感受性を持つ薬剤として知られるガンシクロビルの自家調整点眼薬の、サイトメガロウイルス虹彩炎に対する治療効果を検討することを目的とする。

B. 研究方法

特発性前部ぶどう膜炎患者から、同意を得て前房水を採取し、病原微生物の遺伝子検索を行った。まず multiplex PCR 法を用いてヒトヘルペス属ウイルス 8 種類を含む 18 種類の病原微生物遺伝子と、細菌および真菌の共通保存領域を標的とした遺伝子の増幅を試みた。次に、multiplex PCR で陽性と

なった病原体遺伝子に対して real-time PCR 法を用いた定量検査を行った。これにより サイトメガロウイルスが前房水より検出され、同時に他の病原微生物の存在が否定された患者を「サイトメガロウイルス虹彩炎」と診断し、治療を開始した。治療には抗ウイルス薬であるバルガンシクロビルの内服（初期量 1800mg/日を 2 週間投与、その後 900mg/日を維持量とする）または自家調整 1%ガンシクロビル溶液の点眼を 1 日 6 回から 8 回行った。治療効果の評価には、前房炎症細胞、前房フレア値、眼圧などを用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は、東京医科歯科大学医学部附属病院治験等審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

サイトメガロウイルス虹彩炎 9 例が本研究の対象となった。男女比は 7:2、平均年齢は 56.4 歳、平均観察期間は 22 ヶ月で、全例が片眼性の病変だった。全例が本症診断の時点でベタメタゾン 0.1%と眼圧下降薬の点眼を行っていた。本症患者で眼底に病変を呈する症例は無く、全て免疫健全者だった。

抗ウイルス薬治療を受けた患者の内訳は、1) バルガンシクロビル内服のみ：5 例（55.6%）、2) ガンシクロビル自家調整点眼薬のみ：2 例（22.2%）、3) 内服・点眼の同時併用：2 例（22.2%）だった。

これらの患者について治療開始後の臨床

経過を検討した。前房炎症細胞と前房フレア値については、いずれの症例も治療開始時点では前房炎症はステロイド薬（サンベタゾン 0.1%）に良好に反応して消退していた。そのため、いずれの抗ウイルス薬治療プロトコールによっても有意な変動はみられなかった。しかし、眼圧はいずれの治療群も治療開始前には平均 30mmHg～40mmHg と高い値を示したが、治療開始 1 ヶ月後、2 ヶ月後、3 ヶ月後の測定で、いずれも 20mmHg 以下の正常値に下降した。しかし、治療開始 3 ヶ月以降では、9 例中 7 例で眼圧上昇の再発を生じた。内服治療のみを行った 5 例は、内服量の漸減に伴い全例で再発した。そのため、2 例で濾過手術を行った。点眼治療のみを行った 2 例では、1 例で再発を生じた。また、点眼と内服の併用治療を行った 2 例では、1 例で再発を生じ濾過手術を行った。

D. 考察

サイトメガロウイルス虹彩炎に対する治療は、海外ではこれまでにガンシクロビルの点滴治療やバルガンシクロビルの内服治療を行った報告があるが、いずれも治療終了後の数ヶ月の間に虹彩炎が高率に再発する事が報告されている（Chee SP et al. *Am J Ophthalmol.* 145: 834-840, 2008, de Schryver et al. *Br J Ophthalmol.* 90: 852-855, 2006）。本研究では、抗ウイルス薬の内服や点眼によって短期の眼圧下降効果が認められたが、長期的には多くの症例で再発した。しかし、