

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791272
 研究課題名 (和文) 角膜ヘルペス患者涙液及び前房水中の単純ヘルペスウイルス由来タンパクの検出
 研究課題名 (英文) Detection of Herpes Simplex Virus-derived protein in the tear and the aqueous humor of the herpetic keratitis patients
 研究代表者
 山田 直之 (YAMADA NAOYUKI)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：70437630

研究成果の概要：

我々は、当該研究期間において、角膜ヘルペス患者涙液中及びヘルペス性ぶどう膜炎患者前房水からのヘルペスウイルス由来タンパク ICP0 の検出を試み、その検出に成功した。眼組織由来 ICP0 タンパクの発現を検討することは、ヘルペス性疾患の多い眼科領域においてヘルペス感染症の病態の把握及び発症機序の解明に寄与する可能性があると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：角膜，ヘルペス，ICP0

1. 研究開始当初の背景

角膜ヘルペスは、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) による角膜感染症である。三叉神経節に潜伏感染した HSV-1 がホストの条件により活性化し、三叉神経第 1 枝を遠心性に角膜へ移動し、上皮型及び実質型ヘルペス性角膜炎を発症し、時に不可逆性の角膜実質混濁の原因となったり、上皮細胞に感染し樹枝状潰瘍の様相を呈したりする。ヘルペス性角膜その診断は臨床所見やヘルペスウイルス抗原の検出などでおこなわれる。適切な診断のもと、適切に治療が行われなければ、ヘルペス性角膜炎は不可逆性の角膜混濁の原因となり、顕著な視力低下の原因となった場合

濁の原因となったり、上皮細胞に感染し樹枝状潰瘍の様相を呈したりする。ヘルペス性角膜その診断は臨床所見やヘルペスウイルス抗原の検出などでおこなわれる。適切な診断のもと、適切に治療が行われなければ、ヘルペス性角膜炎は不可逆性の角膜混濁の原因となり、顕著な視力低下の原因となった場合

には角膜移植などの治療を要することがある。

これまで、HSV-1 において発現するタンパクやその機能発現などが詳細に研究されてきた。ICP0 は、immediate early gene の一つであり、ウイルスの複製の始まりの時期に発現するとされている。ICP0 が特に注目されているのは、潜伏期から再活性化にいたる際に重要な役割を果たしていると考えられているためである。Naito らは、ヘルペス性角膜実質炎モデルにおいて、涙液中に ICP0 が分泌されていることを証明した。上皮型および実質型角膜ヘルペスやヘルペス性ぶどう膜炎もその発症の過程にヘルペスウイルスの再活性化が関与していると予想され、ヒト涙液中の ICP0 が検出できれば、疾患の進行度や重症度を予想・評価できる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

ヘルペスウイルスに感染した角膜から、ICP0 タンパクを検出することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

山口大学医学部附属病院眼科を受診しヘルペス感染症と診断された患者のうち、書面にて承諾の得られた患者男性 9 例女性 6 例（55～85 歳，平均 70 歳）を対象とし、患者から涙液または前房水を採取した。同様に、眼疾患を有さない XX 例から涙液または前房水を採取し、対照とした。涙液は、オキシブプロカイン塩酸塩点眼で局所麻酔を施行後、シルマー試験紙を用いて涙液を採取、1% SDS 入り PBS バッファー $100\mu\text{l}$ で涙液を溶出した。ヘルペス性ぶどう膜炎が疑われる患者のうち、前房水中のヘルペスウイルス DNA の PCR 検査施行目的で前房採取を行う際に、残存した前

房水を 1% SDS-PBS バッファー $100\mu\text{l}$ で希釈した。対象に用いた前房水は、白内障以外に眼疾患を有さない患者の白内障手術時に前房水を採取した。また、上皮型角膜ヘルペスで経過観察中の患者 3 名から承諾を得た後に、1 年間上皮型ヘルペスの再発の有無を観察し、涙液中の ICP0 の発現の有無を評価した。得られた検体中に ICP0 タンパクが存在するかは、Western blotting 法を用いて検出を試みた。

4. 研究成果

臨床的に上皮型角膜ヘルペスと診断した 7 例のうち、ICP0 タンパクが検出されたのは 4 例（陽性率 57%）であった。ヘルペス性ぶどう膜炎と診断した 5 例のうち、ICP0 タンパクが検出されたのは 2 例（陽性率 40%）であった。1 年間経過観察を行った 3 例は、上皮型ヘルペスの発症も ICP0 タンパクの発現も見られなかった。

本研究では、ヒト涙液中及び前房水中から ICP0 タンパクの検出が可能であることを証明できた。臨床的診断の精度の検討が必要ではあるが、ICP0 タンパクの性質から、そのタンパクの発現が確認された症例では、ヘルペスウイルスの活性化が起こっており、活動性の高い状態であることを示唆していると思われる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 9 件）

1. Chikamoto N, Chikama T, Yamada N, Nishida T, Ishimitsu T, Kamiya A: Prevention of superficial punctate keratopathy after cataract surgery in diabetic patients by peptides based on

- substance P and IGF-1. *Japanese journal of Ophthalmology*, *inpress*, 査読有り.
2. Morishige N, Yamada N, Teranishi S, Chikama T, Nishida T, Takahara A: Detection of Subepithelial Fibrosis Associated with Corneal Stromal Edema by Second Harmonic Generation Imaging Microscopy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *inpress*, 査読有り
 3. 能美典正, 近間泰一郎, 守田裕希子, 原田大輔, 山田直之, 柳井亮二, 森重直行, 西田輝夫: アカントアメーバ角膜炎の臨床像の推移. *臨床眼科*, 受理, 査読有り
 4. Yamada N, Kawamoto K, Morishige N, Chikama T, Nishida T, Nishioka M, Okayama N, Hinoda Y: Double mutation (R124H, N544S) of TGFBI in two sisters with combined expression of Avellino and lattice corneal dystrophies. *Molecular Vision* 15: 974-979, 2009, 査読有り
 5. Nomi N, Morishige N, Yamada N, Chikama T, Nishida T: Two cases of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis after Epi-LASIK. *Japanese journal of Ophthalmology* 52(6): 440-443, 2008, 査読有り
 6. Yamada N, Matsuda R, Morishige N, Yanai R, Chikama T, Nishida T, Ishimitsu T, Kamiya A: Open clinical study of eyedrops containing tetrapeptides derived from substance P and IGF-1 for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *British Journal of Ophthalmology* 92(7): 896-900, 2008, 査読有り
 7. 山田直之, 田中敦子, 原田大輔, 川本晃司, 森重直行, 近間泰一郎, 西田輝夫: 全層角膜移植後の拒絶反応についての検討. *臨床眼科*, 62(7): 1087-1092, 2008, 査読有り
 8. 松田理江, 山田直之, 原田大輔, 近間泰一郎, 相良 健, 西田輝夫: レーザー虹彩切開術後に発症した水疱性角膜症に対する全層角膜移植手術成績の検討. *臨床眼科* 62(6): 1001-1005, 2008
 9. Nishida T, Chikama T, Morishige N, Yanai R, Yamada N, Saito J: Persistent epithelial defects due to neurotrophic keratopathy treated with a substance P-derived peptide and insulin-like growth factor-1. *Japanese Journal of Ophthalmology* 51(6): 442-447, 2007, 査読有り
- [学会発表] (計 6 件)
1. 山田直之, 森重直行, 近間泰一郎, 西田輝夫, 岡山直子, 日野田裕治: TGFBI 遺伝子に R124H および P501T の double mutation を認めた角膜ジストロフィの 1 例. 第 62 回日本臨床眼科学会, 東京都, 2008/10/24
 2. Yamada N, Kawamoto K, Morishige N, Chikama T, Nishida T: Double Mutation (R124H, N544S) of TGFBI in an Individual With Clinical Manifestations of Avellino Corneal Dystrophy. ARVO2008 ANNUAL MEETING, USA, 2008/04/27
 3. 山田直之, 川本晃司, 森重直行, 近間泰一郎, 西田輝夫, 岡山直子, 日野田

裕治: TGFBI 遺伝子に R124H および N544S の double mutation を認めた角膜ジストロフィの 1 例. 第 32 回角膜カンファレンス・第 24 回日本角膜移植学会, 千葉県, 2008/2/29

4. 山田直之, 田中 敦子, 原田大輔, 川本晃司, 森重直行, 近間泰一郎, 西田輝夫: 全層角膜移植後の拒絶反応についての検討. 第 61 回日本臨床眼科学会, 京都府, 2007/10/11
5. Yamada N, Matsuda R, Harada D, Yanai R, Morishige N, Chikama T, Nishida T: Clinical efficacy of eyedrops containing the peptides FGLM-NH2 and SSSR versus those containing FGLM-NH2 and IGF-1 for treatment of persistent corneal epithelial defects. ARVO2007 Annual Meeting, USA, 2007/5/6
6. 山田直之, 松田理江, 原田大輔, 柳井亮二, 森重直行, 近間泰一郎, 西田輝夫: FGLM-NH2+SSSR と FGLM-NH2+IGF-1 点眼の治療成績の比較. 第 111 回日本眼科学会総会, 大阪府, 2007/4/20

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 直之 (YAMADA NAOYUKI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 70437630