

116  
Epstein-Barrウイルスの眼感染・発症に関する研究

(06807138)

平成6年度科学研究費補助金（一般研究（C））

研究成果報告書



平成9年3月



研究代表者 亀井裕子

（東京女子医科大学医学部眼科講師）

## はしがき

ヒトヘルペスウイルス科のなかで、Epstein-Barrウイルス（EBV）は眼への感染についていまだにほとんど解明されていない。近年、ある種のぶどう膜炎などにEBVの関与があるのではないかと考えられるようになってきたが、EBVの眼感染の動物モデルは確立されておらず、現時点で眼感染のメカニズムは不明である。

我々はすでに、EBVをウサギ眼硝子体に注入することにより、EBV関連抗原に対する血清抗体が陽性となり、その抗体価の上昇が16週間以上継続することを報告した（あたらしい眼科9, 111, 1992）。また、EBVを硝子体に注入したウサギの中には血清抗体価が注入後8ヶ月を経ても陽性を示したものがあり、種特異性があるといわれるEBVがウサギにも感染する可能性を示唆した結果であった。

本研究では、ウサギ眼硝子体に注入されたEBVの眼内での局在と消長についてPCR法を用いて検討するとともに、注入眼摘出後の抗体の推移について検討することを目的とした。

さらに、ウサギのリンパ球にEBVが感染するか否かについて、*in vitro* で検討した。

## 研究組織

研究代表者 亀井裕子（東京女子医科大学 眼科 講師）  
研究分担者 宮永嘉隆（東京女子医科大学 眼科 教授）  
渡理英二（日本医科大学 微生物免疫学教室 助手）

## 研究経費

平成6年度	1, 200 (千円)
平成7年度	500 (千円)
計	1, 700 (千円)

## 研究成果

### 1. EBVウサギ硝子体注入後のEBVの注入眼における局在について

#### 【材料と方法】

##### 1) ウイルス液の調整

EBV感染B95-8細胞（国立予防衛生研究所より分与）を、10%ウシ胎児血清添加RPMI培地を用いて培養し、その上清を4,000×g、10分間遠心し、bacitracin（100 $\mu$ g/ml）を加え、さらに50,000×g、90分間遠心、この沈差をウイルス濃縮液（10<sup>5</sup>Tu/ml）として緩衝液（PH7.4）に溶解、-80℃に保存した。

##### 2) EBV硝子体注入

白色ウサギ4匹（1、2、3、4）の右眼を0.4%オキシブプロカイン（ベノキシール）にて表面麻酔し、10分後生理食塩水にて洗浄。27G針にて前房水約0.1ml採取した後、ウイルス液0.2mlを硝子体中に27G針にて注入した（上直筋附着部から約2mm、上直筋下）。

##### 3) 注入眼の摘出

EBVを注入したウサギの右眼をウサギ1、2、3、4の順に注入後1日、2日、4日、6日にネンブタール麻酔下（0.5mg/kg、静脈麻酔）に各々摘出した。摘出眼球は肉眼的に前房水、角膜、虹彩、水晶体、硝子体、網膜、脈絡膜、視神経、強膜に分けてサンプルとし、-80℃で一時凍結保存した。

##### 4) 採血

ウサギ1、2、3、4それぞれEBV注入前、および眼球摘出時に耳動脈から採血を行い、血液から血球成分のみを分離して血液サンプルとした。

##### 5) DNAの抽出

IsoQuick DNA抽出用キット(Microprobe Corporation)でサンプル組織の細胞からDNAを抽出し、bisbenzimidazole(Hechst 33258)によりDNAの濃度を測定した。

##### 6) PCRの施行

Gene Ampキット (Perkin Elmen Cetus) で調整した反応液をDNA Thermal Cycler (Perkin Elmen Cetus) で94℃1分、51℃2分、72℃3分の条件で25cycle 回し、DNAを増幅した。使用したプライマーのsequenceを図1に示す。

#### 7) EBV・DNAの検出

6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PCR product のサイズを確認した。

#### 【結果ならびに考案】

EBV注入眼から得たのサンプルの中で、硝子体サンプル（注入後2日目、および4日目摘出眼）から、EBV・DNAを示すバンドを検出できた（図2 a, b）。そのほかのサンプルからはいずれも検出できなかった。

この結果より、硝子体に注入されたEBVは注入後4日までは硝子体中に存在し得ることが示唆された。しかし、眼組織におけるEBVの局在の詳細については今回の検討では明確にするに至らなかった。今後はin situ hybridization、免疫染色などを用いた局在の検討や、EBV receptor の検索など、他の手法を用いることで詳細に検討したいと考えている。

## 2. EBV注入眼摘出後の抗体の推移について

#### 【材料と方法】

##### 1) ウイルス液の調整

EBV感染B95-8細胞（国立予防衛生研究所より分与）を、10%ウシ胎児血清添加RPMI培地を用いて培養し、その上清を4,000×g、10分間遠心し、bacitracin (100 μg/ml) を加え、さらに50,000×g、90分間遠心、この沈差をウイルス濃縮液 (10<sup>5</sup>Tu/ml) として緩衝液 (PH7.4) に溶解、-80℃に保存した。

##### 2) EBV硝子体注入

白色ウサギ2匹（5、6）の右眼を0.4%オキシブプロカイン（ベノキシール）にて表面麻酔し、10分後生理食塩水にて洗浄。27G針にて前房水約0.1ml採取した後、ウイルス液0.2mlを硝子体中に27G針にて注入した（上直筋附着部から約2mm、上直筋下）。

### 3) 注入眼の摘出

EBVを注入したウサギの右眼をウサギ5は注入後1日目に、ウサギ6は注入後5日目にネンブタール麻酔下（0.5mg/kg、静脈麻酔）に各々摘出した。

### 4) 採血

EBV注入前、注入後1日、5日、6日、7日、14日、28日目に耳動脈から採血を行い、血清を分離した。

### 5) 抗体価の測定

抗原スライド（VCAスライド、EAスライド（科薬））および抗ウサギIgG、IgM（CAPPEL）を用い、間接蛍光抗体法を用いてVCA・IgM、IgGおよびEA-DR・IgGを測定した。

## 【結果ならびに考案】

EBV注入眼を注入後1日、5日目に摘出したウサギいずれも、抗体価（VCA・IgM、IgGおよびEA-DR・IgG）が上昇した（図3-a, b）。注入後1日（24時間）で注入眼を摘出しても抗体が上昇したことから、注入された抗原はかなり早期に抗体産生系に取り込まれたと考えられる。今後は硝子体内のantigen presentation cellの存在や、抗体産生系への取り込みのメカニズムについてさらに検討を加える必要がある。

## 3. ウサギ末梢血リンパ球に対するEBV感染実験

### 【材料と方法】

#### 1) ウイルス液の調整

EBV感染B95-8細胞（国立予防衛生研究所より分与）を、10%ウシ胎児血清添加RPMI培地を用いて培養し、その上清を4,000×g、10分間

遠心し、bacitracin (100  $\mu$ g/ml) を加え、さらに50,000 $\times$ g、90分間遠心、この沈差をウイルス濃縮液 (10<sup>5</sup>Tu/ml) として緩衝液 (PH7.4) に溶解、-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

#### 2) 末梢血リンパ球に対するウイルスの感染

ウサギ末梢血単球 (1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml) にConA (2.5  $\mu$ g/ml) を加え24時間放置した後、遠心、洗浄。ここに1) のウイルス液を5 $\times$ 10<sup>3</sup>Tu/mlとなるよう調整した液を1ml加え、1時間吸着させ、遠心、洗浄。これを37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>下で培養した。

#### 3) PCRの施行

培養後1日、3日の細胞を用いてGene Ampキット (Perkin Elmen Cetus) で調整した反応液をDNA Thermal Cycler (Perkin Elmen Cetus) で94 $^{\circ}$ C1分、51 $^{\circ}$ C2分、72 $^{\circ}$ C3分の条件で25cycle 回し、DNAを増幅した。

#### 4) EBV・DNAの検出

6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PCR product のサイズを確認した。

#### 【結果ならびに考案】

培養細胞サンプルから、いずれもEBV・DNAを示すバンドを検出できなかった。

この結果より、ウサギ末梢血単球にはEBVは感染しないことが示された。しかし、ヒトでは末梢血以外にも上咽頭の上皮細胞などにEBVが感染することが知られており、ウサギにおいて末梢血以外の細胞を介した感染の可能性は否定できない。今後は角・結膜上皮培養細胞などを用いた感染実験を行い、これらの細胞にEBV receptor が存在するか、receptor が存在しなくても補体系を介した感染が成立しうるかについて検討したいと考えている。

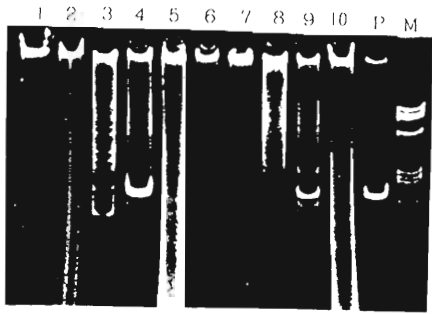
5'—ACA—ACC—ACT—CAT—GAT—GCC—A—(C)—3'

5'—ACC—GTG—GTT—CTG—GAC—TAT—C—(T)—3'

☒ 1



PCR法によるEBV DNAの検出

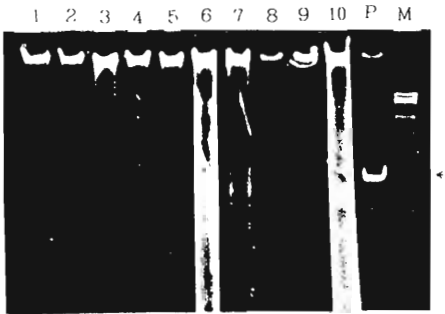


- ← : 特異バンド  
 M : マーカー  
 P : positive control (B95-8細胞)  
 1 : 網膜 (ウサギ1)  
 2 : 視神経 (ウサギ1)  
 3 : 前房水 (ウサギ1)  
 4 : 硝子体 (ウサギ1)  
 5 : 脈絡膜 (ウサギ1)  
 6 : 網膜 (ウサギ3)  
 7 : 視神経 (ウサギ3)  
 8 : 前房水 (ウサギ3)  
 9 : 硝子体 (ウサギ3)  
 10 : 脈絡膜 (ウサギ3)

ウサギ1 : EBV注入眼を注入後1日目に摘出  
 ウサギ3 : EBV注入眼を注入後4日目に摘出

図 2-a

PCR法によるEBV DNAの検出



- ← : 特異バンド  
 M : マーカー  
 P : positive control (B95-8細胞)  
 1 : 網膜 (ウサギ2)  
 2 : 視神経 (ウサギ2)  
 3 : 前房水 (ウサギ2)  
 4 : 硝子体 (ウサギ2)  
 5 : 脈絡膜 (ウサギ2)  
 6 : 網膜 (ウサギ4)  
 7 : 視神経 (ウサギ4)  
 8 : 前房水 (ウサギ4)  
 9 : 硝子体 (ウサギ4)  
 10 : 脈絡膜 (ウサギ4)

ウサギ2 : EBV注入眼を注入後2日目に摘出  
 ウサギ4 : EBV注入眼を注入後6日目に摘出

図 2-b

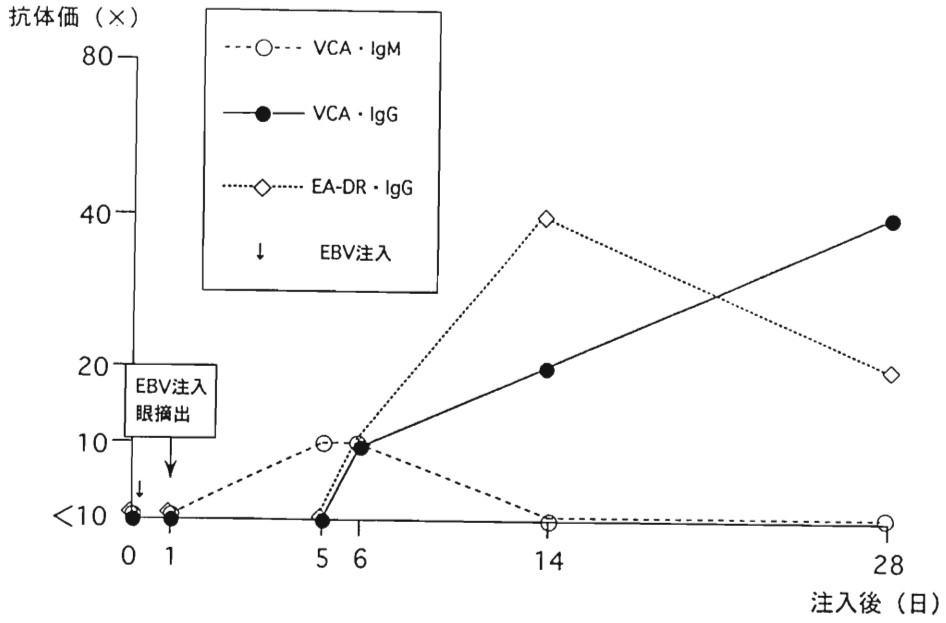


図3-a (ウサギ5)

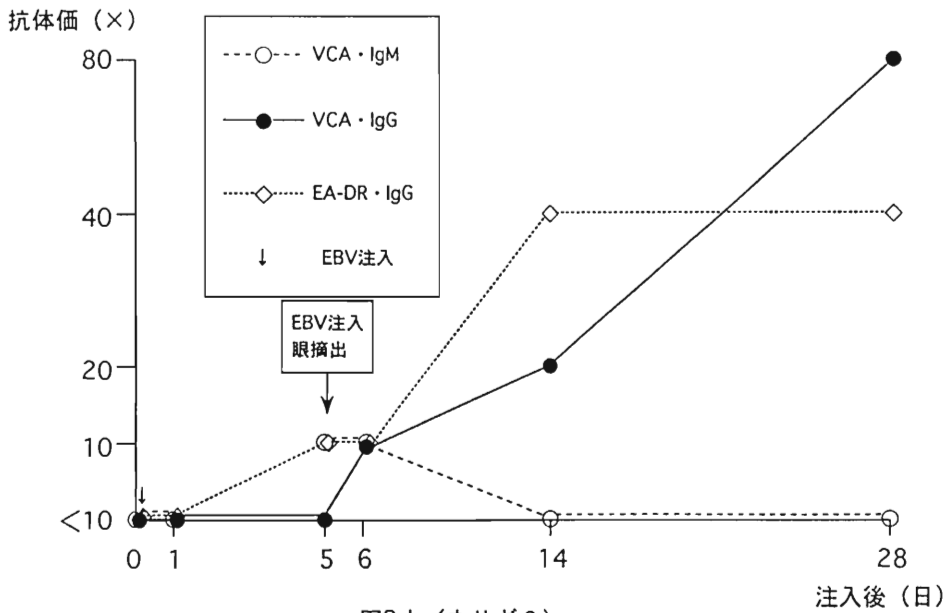


図3-b (ウサギ6)