

マウス三叉神経節における単純ヘルペスウイルスの急性感染の検討

谷 英紀, 内藤 毅, 塩田 洋, 三村 康男

徳島大学医学部眼科学教室

要 約

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) を角膜に局所感染させた後, 三叉神経節での潜伏感染への移行の様子と防御反応を検討した. BALB/c マウスの角膜に HSV-1 を接種し, 接種後経時的に三叉神経節を摘出し, 蛍光抗体法でリンパ球を観察し, 以下の結果を得た. ① 接種後 3 日目から HSV-1 陽性神経節細胞が認められた. 14 日目には陽性細胞は認められなくなった. ② リンパ球は 3 日目には T 細胞の割合が多かったが, 5 日目に B 細胞が増加し, 7 日目から再度 T 細胞の割合が増加した. ③ T 細胞のサブセットでは 3 日目には CD 4 陽性細胞と CD 8 陽性細胞の割合はほぼ同じであったが, 以後, CD 4 陽性

細胞が優位になり, 14 日目には CD 8 陽性細胞は認められなくなった. 以上の結果から, 角膜から軸索輸送によって三叉神経節に到達した HSV-1 は, 神経節細胞に感染して増殖し, 時間の経過とともに潜伏感染へと移行していく. HSV-1 の増殖を抑える防御反応としては, 主として細胞性免疫 (特に CD 4 陽性細胞の働き) が関与しているものと考えた. (日眼会誌 100 : 496—500, 1996)

キーワード: 単純ヘルペスウイルス 1 型, 三叉神経節, CD 4 陽性細胞, CD 8 陽性細胞

A Study of Acute Infection of Herpes Simplex Virus in Mouse Trigeminal Ganglia

Hideki Tani, Takeshi Naito, Hiroshi Shiota and Yasuo Mimura

Department of Ophthalmology, The University of Tokushima School of Medicine

Abstract

We investigated the shift to latency and protective reaction in mice trigeminal ganglia after inoculation of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) onto the cornea. BALB/c mice were inoculated and the trigeminal ganglia were removed periodically. Lymphocytes in the ganglia were observed using immunocytochemical techniques. The results obtained were as follows: ① HSV-1 positive neuronal cells were recognized at 3 days after inoculation but not at 14 days. ② The relative proportion of T cells in lymphocytes was greater than that of B cells at 3 days, but B cells were more numerous at 5 days. Then T cells become more numerous again at 7 days. ③ Among the subsets in T cells, the ratio of

CD4+ and CD8+ cells was almost equal at 3 days, but then CD4+ cells increased and CD8+ cells had disappeared at 14 days after inoculation. These results show that HSV-1 that reached the trigeminal ganglion from the cornea by axonal transport infected neuronal cells, multiplied there and then disappeared resulting in latency. Cellular immunity, especially the function of CD4+ cells, played a main role in this protective reaction by suppressing the viral growth. (J Jpn Ophthalmol Soc 100 : 496—500, 1996)

Key words: HSV-1, Trigeminal ganglion, CD4+ cells, CD8+ cells

I 緒 言

単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) は角膜に初感染した場合, 角膜上皮で増殖したウイルス粒子は軸索輸送によって三叉神経節に到

達することがよく知られている. 角膜局所での防御反応は, 抗体産生を中心とした液性免疫とともに細胞性免疫が重要であることが報告^{1)~3)}されている. しかし, 角膜に HSV-1 が初感染し, ウイルスが三叉神経節に到達してからの I 枝領域でのリンパ球の分布状態についての報告⁴⁾

別刷請求先: 770 徳島県徳島市蔵本町 2—50 徳島大学医学部眼科学教室 谷 英紀

(平成 7 年 8 月 25 日受付, 平成 8 年 2 月 20 日改訂受理)

Reprint requests to: Hideki Tani, M.D. Department of Ophthalmology, The University of Tokushima School of Medicine, 2-50 Kuramoto-cho, Tokushima-shi, Tokushima-ken 770, Japan

(Received August 25, 1995 and accepted in revised form February 20, 1996)

はほとんど知られていない。今回我々は、三叉神経節に到達した HSV-1 が潜伏感染へ移行する様子、その時の B 細胞と T 細胞の関与を免疫組織学的に検討した。

III 実験方法

1. ウイルス接種

動物は BALB/c マウス(雌, 8 週齢)を用い, ウイルスは HSV-1 の McKrae 株を用いた。マウスを塩酸ケタミン(ケタラル®[®], 35 mg/kg)とキシラジン塩酸塩(セラクター®[®], 10 mg/kg)の等量混合液の筋肉注射により全身麻酔した後, 両眼角膜を 27 G 針を用いて縦横 5 条の格子状の傷を付け, ウイルス液(1.0×10^7 PFU/ml)を 10 μ l 滴下し, 10 分間静置した。3 日後に細隙灯顕微鏡を用い, ローゼベンガル染色で角膜を観察した結果, すべてのマウスに樹枝状角膜炎が認められた。

2. 三叉神経節の摘出

ウイルス接種後, 3, 5, 7, 10, 14 日目に各々 5 匹のマウスの三叉神経節を摘出した。まず, ペントバルビタールナトリウム(ネプタール®[®])の過剰麻酔によりマウスを屠殺し, 4% パラフォルムアルデヒドで全身灌流固定した後, 両側の三叉神経節を摘出した。

3. 凍結切片の作製

摘出した三叉神経節は 4°C, 4% パラフォルムアルデヒドで 24 時間固定した。さらに, 4°C, 30% ショ糖リン酸緩衝生食液中に 24 時間保存した後, 液体窒素で OCT compound (Miles, USA) を用いて凍結包埋した。その後, クライオスタットで 6 μ の厚さの連続切片を作製した。

4. ウイルス陽性細胞の検出

得られた連続凍結切片から 5 切片毎に 1 切片の割合で, 切片を抜き出して抗 HSV-1 抗体を用いて染色(1 個の神経節に対して合計 16 切片)し, ウイルス陽性神経節細胞を検出した。用いた抗体は fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 HSV-1 抗体(DAKOPATTS, Denmark)で, 蛍光抗体直接法により染色した。染色後, 蛍光顕微鏡で観察し, ウイルス陽性神経節細胞の有無を判定した。

5. 蛍光抗体二重染色法

ウイルス陽性神経節細胞(前項 4 で検出した)を含む組織切片を蛍光抗体二重染色法により染色し, 蛍光顕微鏡で観察した。

1) 三叉神経節での pan T cell と pan B cell の経時的変化

用いた一次抗体は pan T cell のマーカーとしてラット抗マウス CD 3 抗体(Serotec Ltd, UK)を用い, 二次抗体はビオチン化ウサギ抗ラット抗体(Vector Laboratories Inc, USA)を用い, さらに, rhodamine isothiocyanate (RITC) 標識アビジン(Vector Laboratories Inc, USA)を用いた。二重染色は pan B cell のマーカー

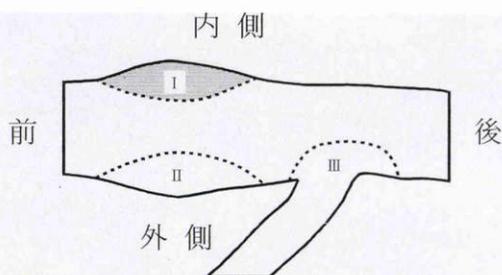


図1 マウスの三叉神経節。

I, II, III 枝領域が明確に区別されている。単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は I 枝領域にのみ感染する。

として FITC 標識ラット抗マウス CD 45 R 抗体(Caltag Laboratories Inc, USA)を組み合わせて行った。組織切片をリン酸緩衝生食水(PBS)で 10 分間洗浄した後, 正常ウサギ血清と Triton-X-100 をそれぞれ 3% と 0.3% の濃度を加えた PBS で 90 分間ブロックした。次に, 一次抗体(ラット抗マウス CD 3 抗体(1 : 10))を用いて 4°C で 12 時間反応させた後, 正常ウサギ血清を 1% 添加した PBS で 1 回洗浄した。次いで, ビオチン化ウサギ抗ラット抗体と室温で 45 分間反応させた後, PBS で 45 分間洗浄した。さらに, RITC 標識アビジン(1 : 500)を用いて室温で 30 分間反応させた後, PBS で 45 分間洗浄した。最後に FITC 標識ラット抗マウス CD 45 R 抗体(1 : 1)を用いて室温で 45 分間反応させた後, 45 分間洗浄し, グリセリンを滴下しカバーガラスをかけ, 三叉神経節の明らかに I 枝領域(図 1)と判定できる場所を蛍光顕微鏡で観察した。蛍光顕微鏡のフィルター(green, blue)を切り替えることによって同一組織切片の, RITC で標識された抗体と FITC で標識された抗体の局在を観察することができた。

1 個の三叉神経節から HSV-1 陽性細胞を含み, 重複を避けた連続切片 4 枚のそれぞれにつき I 枝領域すべての T cell と B cell の細胞数をカウントし, 比率を計算し平均して 1 個の三叉神経節の値とした。両側の神経節でカウントした場合は, その平均を個体値とした。そして接種後, 各日数での各個体値をさらに平均してその日数での比率とした。なお, 14 日目は HSV-1 陽性細胞が認められなかったため, 神経線維が染まっている切片でカウントした。

2) 三叉神経節での CD 4 抗体陽性 T 細胞と CD 8 抗体陽性 T 細胞の経時的変化

一次抗体は helper/inducer T cell のマーカーとしてラット抗マウス CD 4 抗体(Caltag Laboratories Inc, USA)を用い, 二次抗体はビオチン化ウサギ抗ラット抗体(Vector Laboratories Inc, USA)を用い, さらに RITC 標識アビジンを用いた。二重染色は cytotoxic/suppressor T cell のマーカーとして FITC 標識ラット抗マウス CD 8 a 抗体(Caltag Laboratories Inc, USA)

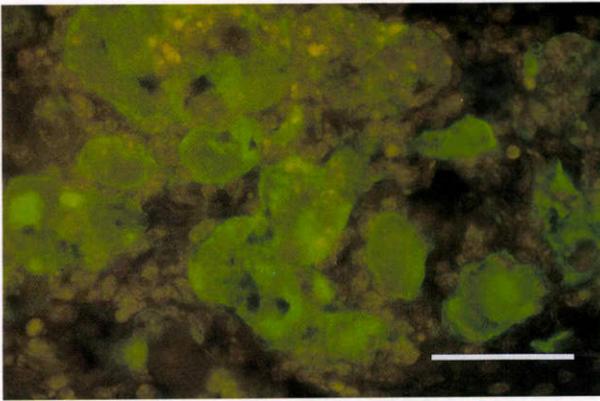


図2 抗 HSV-1 抗体による三叉神経節の染色(ウイルス接種後5日目).
神経節細胞全体がアップルグリーンの蛍光を発している.バーは 50 μm

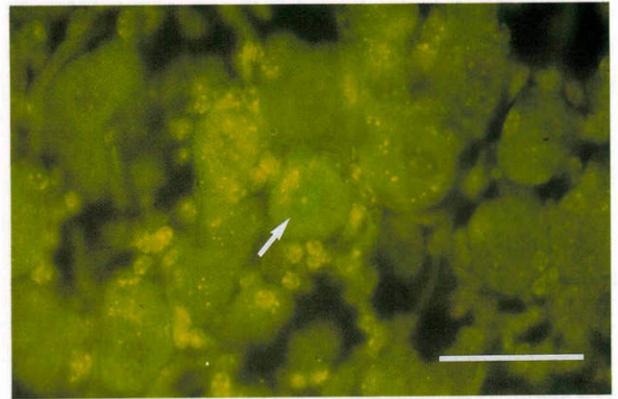


図3 抗 HSV-1 抗体による三叉神経節の染色(ウイルス接種後7日目).
蛍光は神経節細胞の核に集中している(矢印).バーは 50 μm

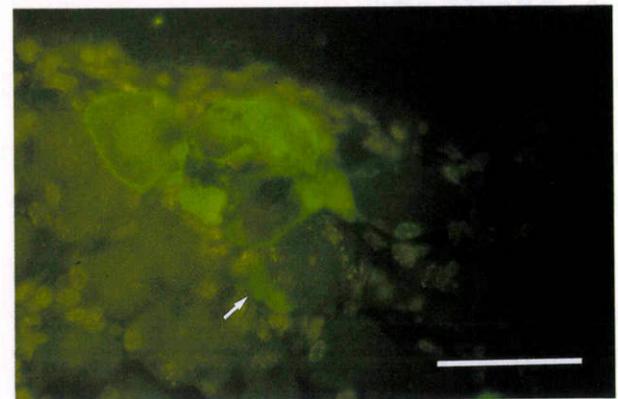
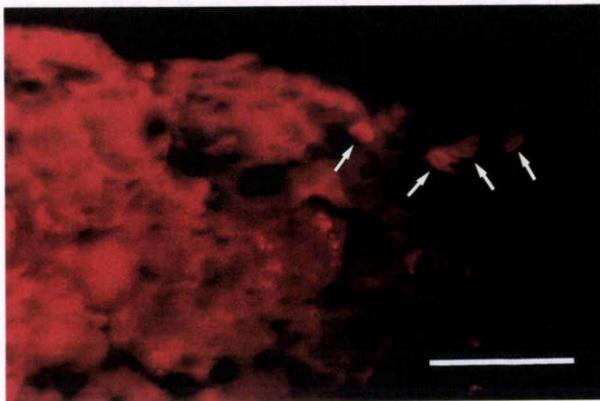


図4 抗 pan T (CD 3) 抗体, 抗 pan B (CD 45 R) 抗体による染色所見.

左図: 抗 pan T 抗体陽性細胞(矢印)を示す.バーは 50 μm. 右図: 抗 pan B 抗体陽性細胞(矢印)を示す.なお,図では抗 HSV-1 抗体による染色も併用している.バーは 50 μm

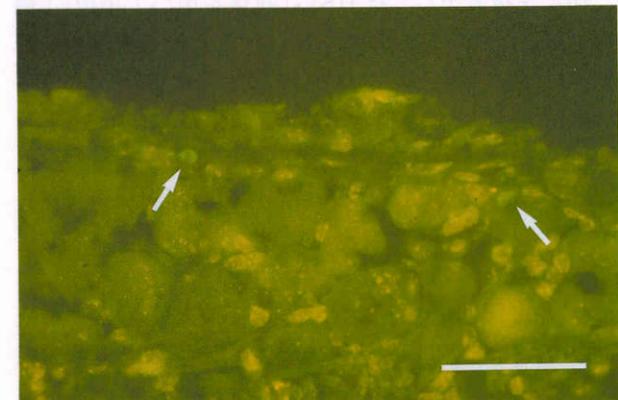
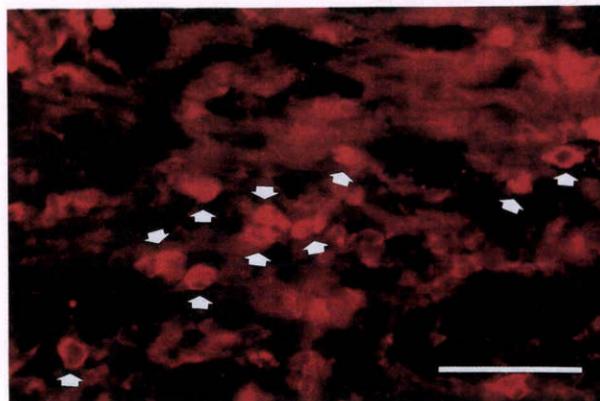


図5 CD 4 抗体, CD 8 抗体による染色所見.

左図: CD 4 抗体陽性 T 細胞(矢印)を示す.バーは 50 μm. 右図: CD 8 抗体陽性 T 細胞(矢印)を示す.バーは 50 μm

と組み合わせて行った.その後,同様に I 枝領域を観察し,各日数での helper/inducer T cell と cytotoxic/suppressor T cell の比率を計算した.

III 結 果

1. 三叉神経節での HSV-1 の経時的変化

HSV-1 接種後, 3 日目の BALB/c マウスの角膜をロ

表1 三叉神経節 I 枝領域における T 細胞と B 細胞の比率

	PI-3	PI-5	PI-7	PI-10	PI-14
CD 3 (Pan T)	77.8±11.3 n=2	52.0±5.9% n=4	60.4±12.8% n=4	91.5±5.6% n=2	96.6±2.9% n=4
CD 45 R (Pan B)	22.2±11.3 n=2	48.0±5.9% n=4	39.6±12.8% n=4	8.5±5.6% n=2	3.4±2.9% n=4

PI: post inoculation n: マウス数

表2 三叉神経節 I 枝領域における CD 4, CD 8 抗体陽性 T 細胞の比率

	PI-3	PI-5	PI-7	PI-10	PI-14
CD 4	47.1±30.5% n=2	86.4±7.2% n=4	96.5±1.8% n=5	99.1±0.9% n=2	100.0±0.0% n=4
CD 8	52.9±30.5% n=2	13.6±7.2% n=4	3.5±1.8% n=5	0.9±0.9% n=2	0.0±0.0% n=4

ーズベンガルを用いて染色して、細隙灯顕微鏡で観察した結果、全例で樹枝状角膜炎を認めた。なお、今回の実験下でのマウスの致死率は20~30%であった。

摘出した三叉神経節では HSV-1 陽性細胞は3日目から認められ、3日目より5日目にはその数が増加していた。3日目、5日目の陽性細胞は細胞全体が蛍光を発していたが(図2)、7日目には蛍光は核に集中するようになり(図3)、10日目には蛍光は減弱傾向を示した。14日目には陽性細胞は認められなくなった。三叉神経節における感染細胞の比率はピークの5日目、7日目で I 枝領域の神経節細胞の約30%であった。

2. T 細胞と B 細胞の比率(表1)

接種後の全期間を通じて T 細胞が優位であった。B 細胞は3日目から5日目にかけてその割合が増加したが、その後、B 細胞は減少傾向を示した。図4は CD 3(pan T)陽性細胞、CD 45 R(pan B)陽性細胞を示す。

3. CD 4 抗体陽性 T 細胞と CD 8 抗体陽性 T 細胞の経時的変化(表2)

感染初期の3日目には CD 8 陽性細胞が CD 4 陽性細胞に比較して増加していたが、以下日が経つにつれて減少していき、14日目には CD 8 陽性細胞は認められなくなった。図5は CD 4 陽性細胞、CD 8 陽性細胞を示す。

IV 考 按

角膜に初感染した HSV-1 は角膜に分布している三叉神経の軸索流に乗って逆行性に移動し、三叉神経節にたどりつく。三叉神経はその名の通り眼神経、上顎神経、下顎神経の3分枝を出す。神経節もそれぞれに対応し3つの領域に明確に分かれている。角膜からの軸索輸送によって移動した HSV-1 は I 枝領域に到達し、増殖する(図1)。その後、神経節細胞で細胞から細胞へと感染し⁵⁾、遺伝子レベルで組み込まれる。この状態を Stevens⁶⁾⁷⁾は co-cultivation 法の研究により次のように定義した。「摘出された神経節からは感染力を有するウイルス粒子を検出することが出来ないが、その神経節を組織培養

すると感染力を有するウイルス粒子が出現する」。今回の実験では、最初に三叉神経節に到達した HSV-1 がどのように潜伏感染へと移行していくかを検討した。

今回の実験結果から、角膜への接種後3日目には三叉神経節に到達している。HSV-1 に対する蛍光抗体法の観察所見から、陽性所見はまず神経節細胞とともにサテライト細胞に現れ、時間的経過とともに神経節細胞に移行し、細胞全体が蛍光を発するようになる(図2)。3日目より5日目の方が陽性細胞が多いことから、この間に感染した神経節細胞でウイルスが増殖し、細胞から細胞への感染が起こっているものと思われる。神経節細胞に感染した HSV-1 は増殖のため細胞核に近づき DNA 情報だけを組み込むが、今回7日目に観察された核に集中する蛍光(図3)はその状態を反映したものと考えられる。その後、14日目までに蛍光抗体法では検出不能となったが、これは HSV-1 が生物学的反応を呈する糖蛋白などを捨て去り検出不可能な潜伏感染の状態となったためと考えられる。現在、どのような状態で潜伏感染が持続しているのかは解明されていない。今回の実験では再活性化については行っていないが、過去の自験データからは1か月の co-cultivation で90%再活性化でき、潜伏感染率は90%以上であった。

HSV-1 の角膜感染では、液性免疫とともに細胞性免疫が防御反応として重要といわれている^{1)~3)}が、三叉神経節局所における報告⁴⁾はほとんどない。そこで、三叉神経節においても B 細胞、T 細胞の動態を今回検討した(図4)が、経過観察した全期間を通して T 細胞主体の細胞性免疫が優位に働いていることがわかった。また、今回は IgG、IgM などの免疫グロブリンを個別に検討していないので厳密には液性免疫とはいえないが、B 細胞は接種後5日目にピークがあり、以後減弱傾向を示した(表1)。

角膜、結膜といった眼球表面を構成する組織には、直接外界と接するという解剖学的部位の特徴から、侵入する病原体や異物から生体を防御する機構がある。眼球表面において角膜輪部から結膜、特に上皮中にはランゲルハ

ンス細胞が広く分布していて、抗原提示細胞としての働きを司っている。正常の角膜にはみられないが、角膜にHSVなどの感染が起こるとランゲルハンス細胞がみられるようになり、抗原提示細胞として機能していると考えられる⁸⁾。三叉神経節への感染が起こった場合も抗原提示細胞として何らかの機能が働いていると思われる。

宇野ら⁹⁾は角膜における細胞性免疫について検討しているが、それによると感染後1日で上皮に、3日で実質にHSV-1が出現し、L3T4(CD4)陽性細胞およびLyt2(CD8)陽性細胞は感染後3日目から角膜実質に認められている。両者の割合はLyt2(CD8)陽性細胞がほぼ横ばいであるのに対して、L3T4(CD4)陽性細胞が3日目に出現してから7日目にかけて増加傾向にある。しかし、どちらも角膜上皮層や内皮には認められなかったと報告している。Gebhardtら⁴⁾はウサギに角膜初感染を起こさせ、経時的に角膜と三叉神経節のT細胞とHSV-1の存在を調べている。その結果、感染性ウイルスとウイルス抗原を表現する細胞は感染の急性期(0~14日)には角膜と三叉神経節に存在した。また、三叉神経節のT細胞浸潤は神経線維の間に細胞がまばらに散布された状態で血管周囲への浸潤として存在し、これは組織のウイルス感染の特徴であるとしている。

今回の実験では三叉神経節におけるTリンパ球(CD4陽性細胞、CD8陽性細胞)を調査した(図5)が、接種後3日目にHSV-1が三叉神経節に到達した時点ではCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の割合はほぼ同じであり、その後、日が経つにつれてCD4陽性細胞の割合が増加していき、14日目にはすべてCD4陽性細胞という結果になった(表2)。この結果から、HSV-1が三叉神経節に感染した場合、ヘルパーT細胞が優位となり種々のサイトカインを生産し¹⁰⁾、抗体産生を促すとともに細胞障害性T細胞、NK細胞¹¹⁾、マクロファージの細胞障害性を増強することでHSV-1を除去し、HSV-1に抵抗しようとしていると考えられる。Hendricksら¹²⁾はHSV-1の株の違いにより角膜におけるCD4とCD8の活性化が異なることを報告しているため、今後これらの種々の働き

や株による相違の検討が必要であろう。

文 献

- 1) 木村泰朗, 山口達夫, 村田弥恵子, 奥村 康: Herpes simplex virus type-1 角膜炎の免疫組織学的解析—T及び非Tリンパ球系の関与について—. 日眼会誌 93: 124—131, 1989.
- 2) 齊藤春和: 角膜ヘルペスの免疫学的研究—マウス単純ヘルペス角膜炎における免疫脾細胞とその感染抑制効果—. 日眼会誌 87: 1010—1016, 1983.
- 3) Hayashi K, Uno T, Ohashi Y, Kazami N, Manabe R: An analysis of the subpopulations in draining lymph node cells and MHC antigen induction in murine herpetic keratitis. *Curr Eye Res* 10: 55—62, 1991.
- 4) Gebhardt BM, Hill JM: T lymphocyte in the trigeminal ganglia of rabbits during corneal HSV infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1683—1691, 1988.
- 5) 林皓三郎: Virus感染と免疫反応. 眼科 22: 133—143, 1980.
- 6) Stevens JG, Cook ML: Latent herpes simplex in spinal ganglia of mice. *Science* 173: 843—845, 1971.
- 7) Stevens JG, Nesburn AB, Cook ML: Latent herpes simplex virus from trigeminal ganglia of rabbits with recurrent eye infection. *Nature New Biol* 235: 216—217, 1972.
- 8) 田川義継: ランゲルハンス細胞. 眼科 34: 37—43, 1992.
- 9) 宇野敏彦, 林皓三郎, 大橋裕一: マウス角膜ヘルペスにおける免疫学的検討—主要組織適合抗原の発現, 浸潤細胞の動態—. 日眼会誌 97: 441—447, 1993.
- 10) 小安重夫: T細胞のイムノバイオロジー: 実験医学バイオサイエンス9. 羊土社, 東京, 114—132, 1993.
- 11) Brandt CR, Salkowski CA: Activation of NK cells in mice following corneal infection with herpes simplex virus type-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 113—120, 1992.
- 12) Hendricks RL, Tumpey TM: Contribution and immune factors to herpes simplex virus type 1-induced corneal pathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1929—1939, 1990.