

実験的角膜ヘルペスの免疫学的研究

—マウス頸部リンパ節と脾臓における cytotoxic T lymphocyte

活性について—(図8, 表1)

梶 原 良 (広島大学医学部眼科学教室)

Immunological Studies on Corneal Herpes Infection
—Induction of Cytotoxic T Lymphocyte Activity in Spleen
and Cervical Lymph Nodes of Mice—

Ryo Kajiwara

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

要 約

マウス角膜に HSV を接種した後, *in vitro* で脾臓および頸部リンパ節から, CTL を誘導し, 接種後 2 週時までの経時的な CTL 活性および³H-thymidine の取り込みについて比較検討した. CTL 誘導後の細胞生存率, CTL 活性, ³H-thymidine の取り込みのいずれにおいても, 脾臓では, 7 日時から増加あるいは出現し 10 日以後一定に達したが, 頸部リンパ節では, 脾臓よりも 2 日早く 5 日時から増加あるいは出現し 7 日以後一定に達した. CTL 誘導後の細胞生存率と³H-thymidine の取り込みは, 5 日以後, 頸部リンパ節の方が脾臓に比べて有意に増加していたが, 10 日以降の CTL 活性には有意差を認めなかった. これらの結果から, 角膜の単純ヘルペスウイルス感染においては, 局所リンパ節である頸部リンパ節細胞のほうが脾細胞よりも, CTL を主体とした感染防御反応を強く反映していることが示唆された. (日眼 91: 1296—1301, 1987)

キーワード: ヘルペス性角膜炎, 細胞性免疫, キラーT細胞, 脾臓, 頸部リンパ節

Abstract

After inoculating the cornea of C3H/He mice with herpes simplex virus (HSV), cytotoxic T-lymphocyte (CTL) activity and ³H-thymidine uptake of lymphocytes in cervical lymph nodes and spleen were assayed at various time points. In the cervical lymph nodes, CTL activity and ³H-thymidine uptake were detected earlier than in the spleen. CTL activity in the spleen was at the same level with that in the cervical lymph nodes at days 10 and 14, but ³H-thymidine uptake in the cervical lymph nodes was significantly increased compared with that of the spleen. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 1296—1301, 1987)

Key words: Herpes simplex keratitis, Cell-mediated immunity, Cytotoxic T lymphocyte, Cervical lymph nodes, Spleen

I 緒 言

単純ヘルペスウイルス (HSV) の感染からの回復や

再感染の防御には, T細胞が主に働いていると考えられている¹⁾. また, HSV は cell to cell の伝搬を主体とする感染様式をとるため²⁾³⁾, T細胞の中でも感染細胞

別刷請求先: 734 広島市南区霞 1-2-3 広島大学医学部眼科学教室 梶原 良

Reprint requests to: Ryo Kajiwara, M.D. Dept. of Ophthalmol., Hiroshima Univ. School of Med.

1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(昭和62年7月23日受付) (Accepted July 23, 1987)

の除去に働くキラーT細胞(CTL)が有効に働いているとされ、細胞移入実験においても、その効果が実証されている⁴⁾。HSV特異的CTLの誘導については、Pfizenmairら⁵⁾が最初に報告して以来、HSVの皮下および腹腔内接種についての報告が数多くみられるが^{4)~9)}、HSVの角膜接種については、当教室の平川¹⁰⁾が脾臓から誘導した報告を見るのみであり、局所リンパ節である頸部リンパ節から誘導した報告は私の調べた範囲内ではない。今回、平川¹⁰⁾と同様な方法を用いて、HSVを角膜に接種した後、頸部リンパ節から経時的にCTLを誘導し、また³H-thymidineの取り込みを合せて行ない、脾臓のそれと比較検討したので報告する。

II 実験材料と方法

1. ウイルス

角膜ヘルペス患者から分離したMoto株をSIRC細胞で継代培養したものを使用した。感染価は $10^{7.0}$ TCID₅₀/mlであった。

2. 実験動物

6週齢、雄性C3H/He(H-2^K)を使用した。また、H-2 restrictionには、BALB/c(H-2^d)を併用した。

3. ウイルス接種方法

生理食塩液で10倍に希釈したpentobarbital(nembutal®)0.15mlの腹腔内注射による麻酔下で、27ゲージ針で手術顕微鏡下にマウスの両眼角膜を乱切した後、HSV液0.005mlを滴下し、眼球マッサージをおこない感染させた。

4. 実験期間

HSV接種前(接種後0日)と接種後3, 5, 7, 10, 14日の各時期において、角膜の観察と免疫に関する実験を行なった。なお、各時期ともに6匹ずつのマウスを使用した。

5. 角膜の観察

上述の各時期において、角膜をフルオレスセインで染色した後、125倍拡大の手術顕微鏡下で下記のスコアに従って病変の程度を判定した。

スコア0：フルオレスセインによって全く染まらないもの。

スコア1：点状に染まるもの。

スコア2：小さな樹枝状潰瘍。

スコア3：大きな樹枝状潰瘍。

スコア4：地図状潰瘍。

6. Stimulator細胞の準備(図1)

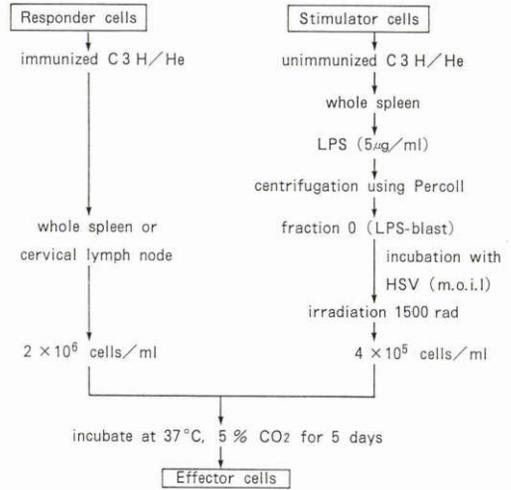


図1 Effector細胞の準備

非感染マウスを頸椎脱臼死させた後、脾臓を摘出し、2.5% fetal calf serum (FCS, GIBCO)を含むHanks' balanced salt solution (HBSS, 日水) 5ml中で、teasingを行ない単離細胞とした。HBSSで洗浄後、3mlのリンパ球比重分離液M-SMF(日本抗体研究所)上に重層し、2,600回転、20分間遠沈し単核細胞を得た。次に、HBSSで、2回洗浄を行ない、10%FCS, 100U/ml penicillin, 25mM HEPES, および 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanolを加えたRPMI 1640液(GIBCO)に細胞数が 2×10^6 /mlとなるように浮遊させ、6well culture plate (FAL CON)に5mlずつ分注した。これに、lipopolysaccharide(LPS, DIFCO)を最終濃度が $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、37°Cで3日間炭酸ガス培養した。培養後、HBSSで2回洗浄し熊谷ら¹¹⁾の方法に準じて作製したpercoll不連続密度勾配液に重層し、最上層のfraction-0を回収した。HBSSで洗浄後、HSVを、37°Cで2時間感染させ(約1m.o.i.)さらにHBSSで2回洗浄した。その後、1,500radのコバルト照射をおこない、RPMI1640液で細胞数を 4×10^5 /mlに調整した。

7. Responder細胞の準備およびeffector細胞の誘導(図1)

Stimulator細胞と同様の方法で、感染各時期のマウスの脾臓と頸部リンパ節の単核細胞をそれぞれ分離し、RPMI1640液で細胞数を 2×10^6 /mlに調整し responder細胞とした。6well culture plateへ、responder細胞数とstimulatr細胞数が5:1となるように分注し、37°Cに保った炭酸ガス培養器内で5日間培

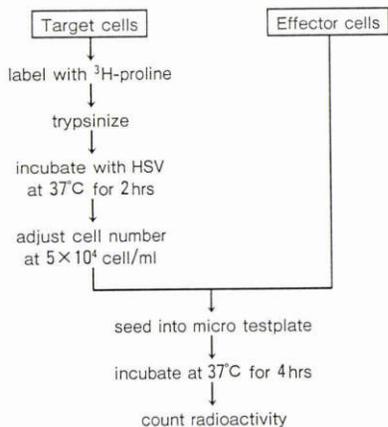


図2 Cytotoxic assay

養した。培養終了後、HBSSで2回洗浄し、さらに trypan blue 法で生存細胞数を算定した後、RPMI1640 液で生存細胞だけを取り上げて細胞数を 1×10^6 /ml に調整したものを effector 細胞として用いた。また、生存細胞数の培養開始時の細胞数に対する比率 (%) から細胞生存率を算定した。

8. 標的細胞の作成 (図2)

細胞障害試験の標的細胞には L929細胞 (H-2^k) を用いた。これらの細胞液を培養フラスコ (CORING) に培養し、非必須アミノ酸を含まない Eagle's MEM で $20 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ に希釈した ³H-Proline を加え2日間培養した。培養終了後、トリプシンと EDTA で細胞を単離させ、HBSSで2回洗浄した。つぎに HSV (3m.o.i.) で2時間感染させた後、HBSSで2回洗浄し、RPMI1640 液で細胞数を 5×10^4 /ml に調整した。

9. 細胞障害試験

Effector 細胞と標的細胞の浮遊液を96well microplate (NUNC) に $100 \mu\text{l}$ ずつ加えたものを1,200回転で5分間遠沈した後、炭酸ガス培養器内で4時間培養した。培養終了後、上清を $100 \mu\text{l}$ 採取し、濾紙に吸収させた。濾紙を乾燥させた後、液体シンチレーションカウンターで放射能活性を測定した。effector 細胞数と標的細胞数の比は20:1とした。

Percent lysis は次式から求めた。

$$\text{Percent lysis} = (A - C) / (B / 2 - C)$$

A: 標的細胞と effector 細胞を混合培養した培養液の $100 \mu\text{l}$ 中に含まれる ³H 放射能活性。

B: 5×10^3 個の標的細胞に標識された ³H 放射能活性。

C: 標的細胞のみ培養した培養液の上清 $100 \mu\text{l}$ 中に

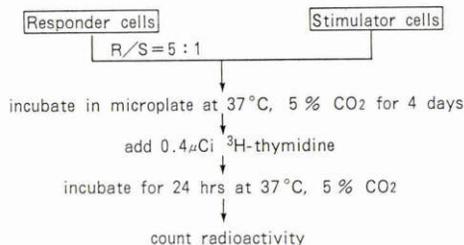


図3 ³H-thymidine 取り込みの測定方法

含まれる ³H 放射能活性。

10. Stimulator 細胞に対する responder 細胞の反応の測定方法 (図3)

Stimulator 細胞に対する responder 細胞の増殖に及ぼす影響を ³H-thymidine の取り込みを指標として判定した。すなわち、96well microplate に responder 細胞数と stimulator 細胞数を 5:1 の割合で $100 \mu\text{l}$ 分注し、 37°C で5日間培養した。培養終了24時間まえに $0.4 \mu\text{Ci}$ の ³H-thymidine を各 well に加え、培養終了後、液体シンチレーションカウンターで細胞に取り込まれた ³H-thymidine の放射能活性を測定した。

11. H-2 restriction

HSV 接種10日時の C3H/He マウス (H-2^k) と BALB/c マウス (H-2^d) から誘導した effector 細胞を使用した。

III 結 果

1. 角膜所見 (図4)

図4は、HSV 接種後の角膜病変の経時的变化を示している。感染7日時から角膜病変は著明に軽減し、10~14日時には治癒した。

2. 単核細胞数 (図5)

図5は、局所リンパ節と脾臓のそれぞれから採取された単核細胞数の HSV 接種後の経時的变化を示している。脾臓では、感染7日時と10日時にばらつきを認めるが細胞数はほぼ一定であった。これに対し頸部リンパ節では、感染3日時には非感染時の3.5倍に増加し、7日時と10日時には5~6倍と最も増加したが、14日時にはやや減少し、3日時と同程度になった。

3. CTL 誘導後の細胞生存率 (図6)

図6は、CTL 誘導のための培養終了時の細胞生存率を示している。脾臓では、感染7日時から増加し、10日時以後にはほぼ一定になった。頸部リンパ節では、5日時から著明な増加がみられ、7日以後は一定になった。すなわち、頸部リンパ節は脾臓に比べて、生存細胞

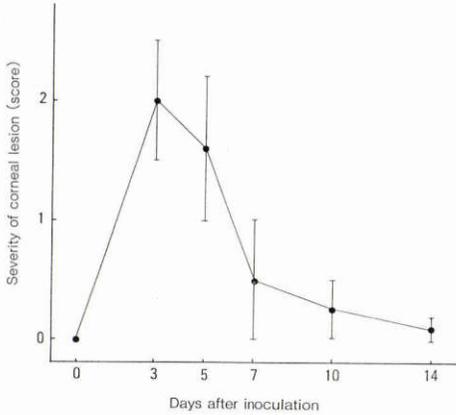


図4 角膜病変の経時的変化

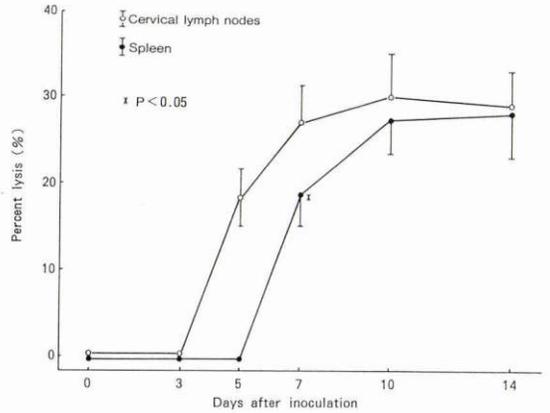


図7 CTL活性の経時的変化

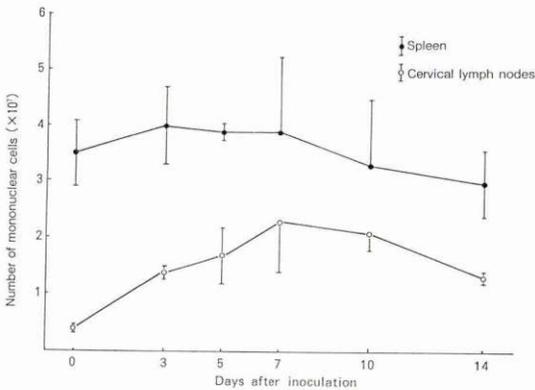


図5 単核細胞数の経時的変化

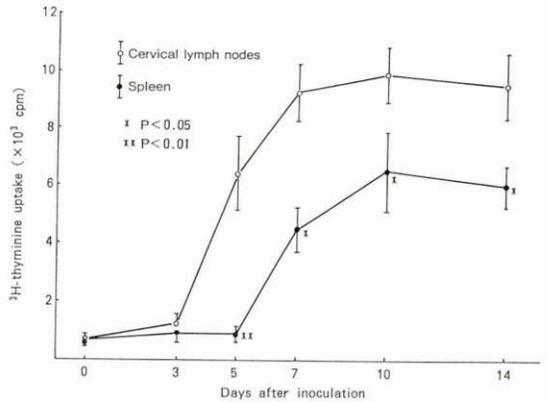


図8 ³H-thymidineの取り込みの経時的変化

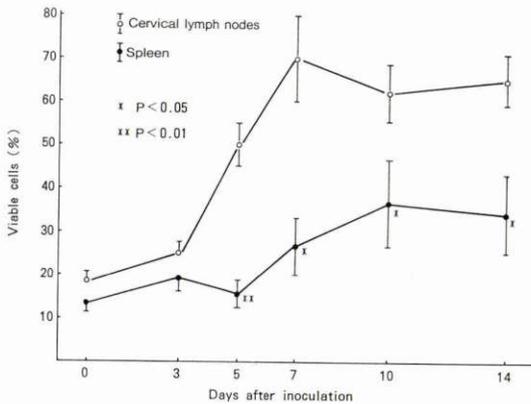


図6 CTL誘導後の細胞生存率

胞数の増加を2日早く認め、また、5日以後の細胞生存率は有意(p<0.05)に上昇していた。

4. CTL活性 (図7)

図7は、HSV接種後の細胞障害性の経時的変化を

示している。脾臓では、感染7日時から細胞障害性が認められ、10日時以後はほぼ一定に達した。頸部リンパ節では、5日時から細胞障害が認められ、7日以後はほぼ一定に達した。すなわち、頸部リンパ節は脾臓に比べて、細胞障害性は2日早く出現するが、10日以後の細胞障害性には有意差は認められなかった。

5. ³H-thymidineの取り込み (図8)

図8は、HSV接種後の³H-thymidineの取り込みの経時的変化を示している。脾臓では、感染7日時から増加し、10日以後は一定に達した。頸部リンパ節では、5日時から増加し、7日時以後に一定に達した。すなわち、頸部リンパ節は脾臓に比べて、2日早く増加し、おたがいの最大値は有意(p<0.05)の差があった。

6. H-2restriction (表1)

C3H/He マウス (H-2^b) から誘導された effector 細胞は、HSV 感染 L929細胞 (H-2^b) に対して強い細胞性を示した一方、BALB/c (H-2^d) から誘導された

表1 Effector 細胞と標的細胞の H-2 restriction

Mice		Percent lysis	
		L929 (H-2 ^k)+HSV	L929 (H-2 ^k)
C3H/He (H-2 ^k)	Spleen	28.3±4.8	1.5±0.6
	Cervical lymph nodes	31.2±5.1	1.3±0.4
BALB/C (H-2 ^d)	Spleen	2.0±1.0	1.3±0.5
	Cervical lymph nodes	2.2±1.2	1.5±0.4

effector 細胞は、HSV 感染 L929細胞(H-2^k)には細胞障害性を示さず、effector 細胞と標的細胞との間に H-2 restriction があることがわかった。

IV 考 按

採取された単核細胞数の HSV 接種後の経時的変化については、頸部リンパ節では、角膜所見の最も高度な3～5日時には非感染時の3.5～4倍と上昇し、角膜所見が軽減した7日時には5～6倍とピークに達した後、角膜所見が治癒した14日時には3.5倍と減少した。すなわち、局所リンパ節である頸部リンパ節の単核細胞数は、角膜所見の消長に数日遅れたパターンとなり、ほとんど変動のない脾臓のそれに比べて眼局所における炎症反応をよく反映していると思われる。

CTL 活性の出現と³H-thymidine の取り込みの時期については、眼局所の感染部位に近い頸部リンパ節では、脾臓よりも2日早く出現し、感染5日時に認められた。この早期出現の理由として以下の2つが考えられる。

1) 眼局所で増殖したウイルスがまず頸部リンパ節に到達した後、それに遅れてウイルスが脾臓に到達し、それぞれの部位においてウイルス抗原に反応してCTLが誘導された。

2) 眼局所で誘導されたCTLが、最初に頸部リンパ節に達して増殖した後、全身的に移行し脾臓に達した。

1)については、ハムスターの角膜にHSVを接種した後、脾臓を含む全身臓器にウイルス抗原が認められたという報告があるため¹²⁾、可能性として十分に考えられることであるが、今回は、頸部リンパ節と脾臓におけるウイルスの存在を調べていないので断定はできない。また、2)についても、ある部位に存在するCTLがどの部位の細胞から誘導されるかを決定するのは手技的に困難であるので、現在のところ1)と2)の可能性が共に考えられる。

平川⁹⁾は、マウスを使用してHSVの角膜接種時と腹腔内接種時の脾臓細胞におけるCTL活性の出現時期を

比較し、活性の出現は脾臓に近い腹腔内接種のほうが角膜接種よりも2日早かったと報告している。また、Meyers-Elliott¹³⁾は、家兎を使用してHSV角膜接種後に、頸部リンパ節細胞と、脾臓細胞におけるHSV抗原に対する³H-thymidine の取り込みを観察し、頸部リンパ節では脾臓より9日も早く、接種後5日時に上昇したとしている。すなわち、どちらの報告も、今回の私の結果と同様に、感染部位からの距離に近いリンパ節(あるいは脾臓)ほど細胞性免疫が早期に認められることを述べている。皮下にHSVを接種した後、経時的に局所リンパ節からCTLを誘導した報告^{6,8)}では、2～4日時になって始めて軽度のCTL活性を認めたとしており、今回のHSV角膜接種に比較して1～3日早い結果となっている。おそらく、これはHSVの接種部位の違いによるものと考えられる。すなわち、皮下接種では、十分なウイルス量を確実に局所に投与することが可能である上に、皮下組織は血管が豊富に存在するために、早期からウイルス抗原と免疫担当細胞の接触が可能である。一方、角膜接種では、角膜乱切部位に取り込まれるウイルス量は接種量のうちのごく一部であり、さらに、無血管組織である角膜では、免疫担当細胞がウイルス抗原に接触してこれを認識するのに多少の時間を要すると思われる。皮下接種に比べてCTL活性の出現時期が遅れて出てくる可能性が考えられる。

頸部リンパ節と脾臓のそれぞれのCTL活性の強さは、ともに活性の最大値を示す感染10日時に降では、両者の間に有意の差を認めなかった。しかしながら、頸部リンパ節では脾臓に比べて、effector 細胞であるCTL誘導後の細胞生存率が約2倍ほど高いこと、および、³H-thymidine の取り込みが有意に増加していることを考え合せると、頸部リンパ節の方が脾臓よりもHSV抗原に反応する単核細胞の出現頻度が高く、したがって、CTLの絶対数は多い可能性がある。

ここで、なぜ、同数の細胞から同じ誘導法を用いたにもかかわらず、CTL誘導後の細胞生存率が頸部リンパ節の方が脾臓よりも約2倍高いかが問題になる。一般的に、CTLはCTL-precursor(CTL-P)から分化してくると考えられている。Rouse^{14,15)}は、限界希釈法を用いて、マウスの局所リンパ節と脾臓におけるHSV特異的CTL-Pの出現頻度を測定し、脾臓では、HSVの腹腔内投与後に採取された単核細胞中、CTL-Pは1/3,500～1/15,670の頻度で認められるのに対して、局所リンパ節では、HSVの足蹠皮下接種により1/

1,200~1/4,750の頻度でCTL-Pが存在するとしている。HSVの接種部位がRouseらの腹腔と皮下、私の角膜と異なるため、単純には比較できないが、今回のCTL誘導後の細胞生存率が頸部リンパ節の方が脾臓に比べて高かったのは、頸部リンパ節と脾臓との間でCTL-Pの出現頻度に差があるためかも知れない。

HSV感染においては、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス¹⁶⁾やインフルエンザウイルス¹⁷⁾などのウイルス感染とは異なり、*in vivo*においてCTL活性は低く¹⁴⁾、cyclophosphamideに感受性のある suppressor 細胞によりCTL-PからCTLへの分化が抑制されているためとされている⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。しかし、*in vivo*でのCTL活性が低いのは、あくまでも感染部位そのものではなく、そこから離れた局所リンパ節と脾臓のデータであり、感染の主場である眼局所でCTL-Pのままで存在するかどうかは不明である。ただ、細胞移入実験において、*in vitro*での誘導をせずHSV感染マウスから取り出したままの脾細胞でも、ある程度の感染防御効果を示す⁹⁾ことから考えて、*in vitro*でCTL-PがstimulateされCTLへと誘導されるように、局所リンパ節あるいは脾臓に存在するCTL-Pが眼局所に移動し、多数のウイルス抗原や分化に必要なマクロファージ、helper T lymphocytesに接した時、*in vivo*においてもCTLに分化していく可能性はある。

稿を終えるにあたり、ご校閲いただきました調枝寛治教授に深謝いたします。終始ご指導いただきました坂田広志講師に深謝いたします。また、第2内科の山木戸道郎助教、検査部の高石雅敏博士のご指導に深謝いたします。

本論文の要旨は、第52回日本中部眼科学会(講演)にて発表した。

文 献

- 熊谷勝男：単純性疱疹ウイルス。臨床とウイルス 9: 5—12, 1981.
- Lodmell DL, Notkins AL: Cellular immunity to herpes simplex virus mediated by interferon. *J Exp Med* 140: 746—778, 1974.
- 林皓三郎：Virus感染と免疫反応。眼科 22: 133—143, 1980.
- Larsen HS, Russel RG, Rouse BT: Recovery from lethal herpes simplex virus type 1 infection is mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun* 41: 197—214, 1983.
- Pfizenmaier K, Starzinski-Powitz A, Röllinghoff M, et al: T-cell-mediated cytotoxicity against herpes simplex virus-infected target cells. *Nature* 265: 630—632, 1977.
- Pfizenmaier K, Jung H, Starzinski-Powitz A, et al: The role of T cells in anti-herpes simplex virus immunity. I. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 119: 939—944, 1977.
- Röllinghoff M, Pfizenmaier K, Falke D, et al: T cell-mediated cytotoxic immune response to HSV infection and its modification due to antimetabolites. *Adv Ophthalmol* 38: 247—254, 1979.
- Nash AA, Quartey-Parafio R, Wildy P: Cell mediated immunity in herpes simplex virus-infected mice: Functional analysis of lymph node cells during periods of acute and latent infection, with reference to cytotoxic and memory cells. *J Gen Virol* 49: 309—317, 1980.
- Lawman MJP, Rouse BT, Courtney RJ, et al: Cell-mediated immunity against herpes simplex induction of cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun* 27: 133—139, 1980.
- 平川裕二：単純ヘルペス性角膜炎の免疫学的研究—マウス脾 cytotoxic T lymphocyte について—。日眼 89: 208—213, 1985.
- 伊藤恭悟, 鈴木隆二, 川上一岳他：NK細胞の分離と形態学的同定。免疫実験操作法 X, 3305, 日本免疫学会, 金沢, 1981.
- 林皓三郎, 内田幸男：角膜ヘルペスの研究—Virusの拡がり方と潜在感染について—。日眼 84: 311—317, 1980.
- Meyers-Elliot RH, Chitjian PA: Induction of cell-mediated immunity in herpes simplex virus keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 920—929, 1980.
- Rouse BT, Wagner H: Frequency of herpes simplex virus-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in lymph node cells of infected mice. *Immunology* 51: 57—64, 1984.
- Rouse BT, Larsen HS, Wagner H: Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors to herpes simplex virus type 1 as determined by limiting dilution analysis. *Infect Immun* 39: 785—792, 1983.
- Doherty PC, Zinkernagel RM: T-cell mediated immunopathology in viral infections. *Transplant Rev* 19: 89—120, 1974.
- Ennis FA, Martin WJ, Vervonitz MW, et al: Specificity studies on cytotoxic thymus derived lymphocytes reactive with influenza infected cells: Evidence for dual recognition of H-2 and viral hemagglutinin antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3006—3010, 1977.
- Sethi KK, Wolff MH: The nature of host-cell herpes-simplex virus interaction (S) that renders cells susceptible to virus-specific cytotoxic T cells. *Immunobiology* 157: 365—378, 1980.
- Prymowicz D, Moore RN, Rouse BT: Frequency of HSV-specific helper T lymphocyte precursors in the lymph node cells of infected mice. *J Immunol* 134: 2683—2688, 1985.