

単純ヘルペス角膜炎の免疫薬理学的研究

—ステロイドのマウス cytotoxic T lymphocyte 誘導過程に産生される
IL-2 活性に及ぼす影響—(図12)

末 広 龍 憲 (広島大学医学部眼科学教室)

—Effect of corticosteroid on IL-2 production from
spleen cells of mice with corneas infected
by herpes simplex virus

Tatsunori Suehiro

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

要 約

単純ヘルペスウイルス (HSV) の感染時に誘導される cytotoxic T lymphocyte (CTL) の活性がコルチコステロイドにより抑制される機序を検討するために、角膜に HSV を接種したマウスの脾細胞から誘導される CTL 活性とインターロイキン 2 (IL-2) 産生量に対するコルチコステロイドの影響について検討した。C3H/He マウスの角膜に HSV を接種後10日目に、脾臓を取った。この脾細胞をリポポリサッカライドで幼若化したマウス脾細胞に HSV を感染させたもので刺激し、培養開始時よりデキサメサゾンを追加し培養した。培養終了後、上清中に含まれる IL-2 の量は、CTLL-2 (IL-2 依存性細胞株) の³H-thymidine の取り込みを指標として求めた。このようにして求めた 2 日および 4 日目の IL-2 活性は、デキサメサゾンの濃度が 10^{-8} M 以上で対照のデキサメサゾン無添加の場合と比べ、有意に低下していた。また、この IL-2 産生と³H-proline releasing assay にて求められた CTL 活性との間に正の相関を認めた。以上の成績より、デキサメサゾンによる CTL 活性の抑制は、IL-2 産生の抑制を介して生じている可能性が考えられる。(日眼91: 636—642, 1987)

キーワード：ヘルペス性角膜炎、細胞性免疫、コルチコステロイド、インターロイキン 2、細胞傷害性 T 細胞

Abstract

The effect of dexamethasone on cytotoxic T lymphocytes (CTL) was evaluated in mice in which the corneas were infected by herpes simplex virus (HSV). Ten days after the corneas of the mice (C3H/He) had been inoculated with HSV, the mouse spleens were removed. Mouse splenocytes were restimulated by lipopolysaccharide-induced lymphoblasts (LPS-blasts) infected with HSV, and dexamethasone was added in varying accounts at the initiation of test cultures and not added in control cultures. After culture, IL-2 production in the supernatant of the culture was measured by a sensitive microassay based upon the ³H-thymidine incorporation of CTLL-2 (IL-2-dependent murine cytotoxic T cell lines). The IL-2 productions 2 and 4 days after culture were significantly lower when over 10^{-8} M of dexamethasone was added, than when it was not added. Also, direct correlation was observed between IL-2 production and the CTL activity measured by ³H-proline releasing assay. These results suggest that the inhibitive effect of dexamethasone on CTL results from the inhibition of IL-2 production. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 636—642, 1987)

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 末広 龍憲

Reprint requests to: Tatsunori Suehiro, M.D. Dept. of Ophthalmol., Hiroshima Univ. School of Med.
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(昭和61年12月30日受付) (Accepted December 30, 1986)

Key words : Herpes simplex keratitis, Cell-mediated immunity, Corticosteroid, Interleukin 2, Cytotoxic T lymphocyte

I 緒 言

既に著者は、単純ヘルペスウイルス (HSV) の感染防御に重要と考えられているキラー-T細胞 (CTL) に対するコルチコステロイドの抑制作用について報告した¹⁾。

コルチコステロイドの CTL 活性に対する抑制作用の機序の一つに、インターロイキン 2 (IL-2) の産生抑制が考えられている²⁾。今回、マウス CTL 誘導の系にコルチコステロイドを加え、その培養上清中の IL-2 の産生量がどのように変化するかを検討したので、その結果を報告する。

II 実験方法

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) を用いた。

3. ウイルス接種方法

左眼角膜を乱切した後、HSV 液 0.05ml を滴下し、眼球マッサージを行ない感染させた。

4. stimulator 細胞の準備 (Fig. 1)

既に報告した様に¹⁾、熊谷らの方法²⁾に準じて行なった。すなわち、非感染マウスの脾臓から得られた単核細胞を lipopolysaccharide (LPS, DIFCO) で幼若化させた後、HSV を 2 時間感染させ、さらに 1500rad のコバルト照射を行ない、10% fetal calf serum (FCS), 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 25mM HEPES および 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol を含む RPMI 1640 液 (GIBCO) (以下 test medium と呼ぶ) で細胞数を 4×10^6 /ml に調整したものを stimulator 細胞とした。

5. responder 細胞の準備 (Fig. 1)

HSV の角膜接種後 10 日時の感染マウスの脾単核細胞を分離し、test medium に浮遊し細胞数を 2×10^6 /ml に調整したものを responder 細胞とした。使用したマウスは HSV 角膜接種後に角膜炎の発症を確認したものをを選び使用した。角膜炎の状態は、程度に差が見られたが、樹枝状および地図状潰瘍を呈していた。(脾摘したマウスの数は 40 匹であった。)

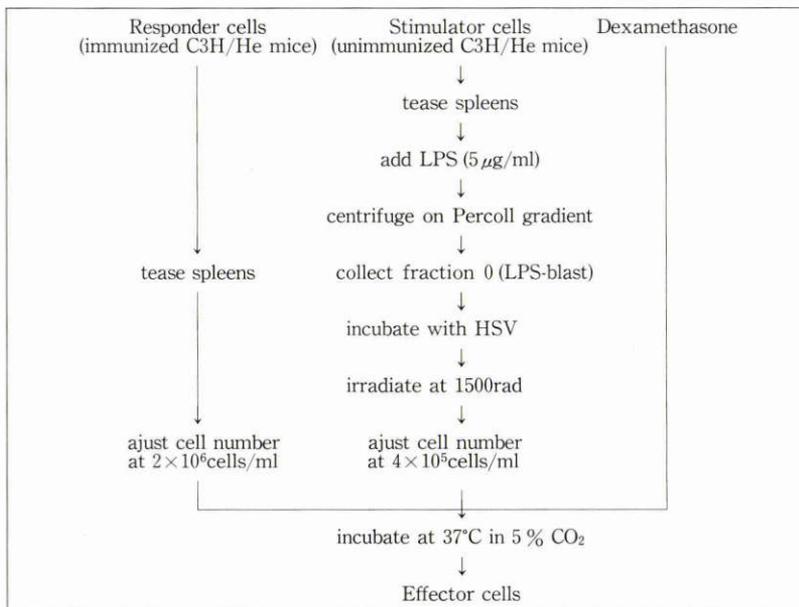


Fig. 1 Preparation of effector cells

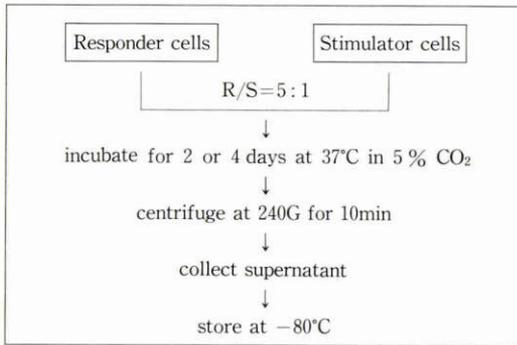


Fig. 2 Method for IL-2 production

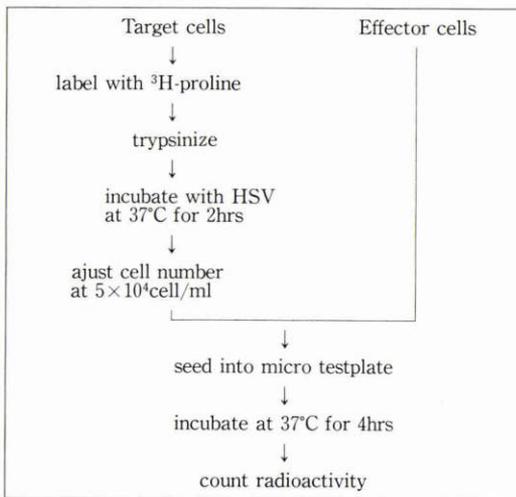


Fig. 3 Cytotoxic assay

6. 細胞傷害性試験の effector 細胞の誘導 (Fig. 1) および IL-2 産生量測定のための検体の作製 (Fig. 2)

6 well culture plate に responder 細胞数と stimulator 細胞数の比が 5 : 1 となるように分注した後、最終濃度が 10^{-6} から 10^{-10} M になるように調整した各種濃度の dexamethasone を加え、 37°C の 5% CO_2 incubator 中で培養した。ついで、2400回転で10分間遠沈した後の上清を IL-2 産生量測定用の検体とした。遠沈後、沈渣中の生細胞を trypan blue 法にて算定し、細胞数を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整したものを細胞傷害性試験の effector 細胞とした。

7. 標的細胞の作製 (Fig. 3)

標的細胞の L929 細胞 (H-2^k) を $20\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H -proline と 10% FCS を含む Eagle's MEM (L-proline は含まず) で 2 日間培養し標識した。ついでトリプシ

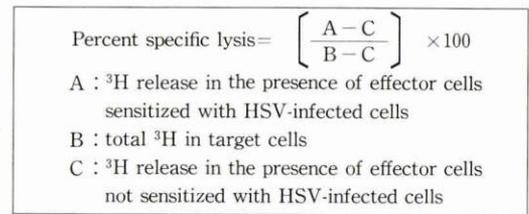


Fig. 4 Calculation of percent specific lysis

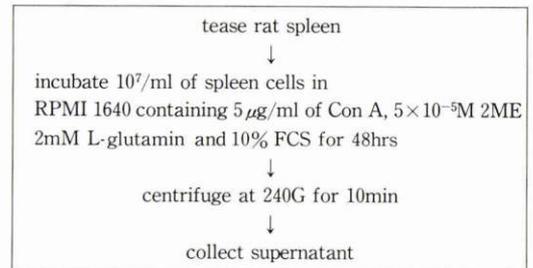


Fig. 5 Preparation of control IL-2

ン処理し、HSV (3 m.o.i.) で 2 時間感染させた後、test medium に浮遊し細胞数を $5 \times 10^4/\text{ml}$ に調整した。

8. 細胞傷害性試験

上記のように調整した標的細胞と effector 細胞浮遊液を丸底の 96 well micro testplate に $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、1200回転で 5 分間遠沈した後、 37°C の 5% CO_2 incubator 中で 4 時間培養した。培養後、培養上清中の放射能活性を測定した (Fig. 3)。なお Fig. 4 に示した式から percent specific lysis を求めて細胞傷害性の程度を算出した。

9. スタンダード IL-2 の作製 (Fig. 5)

ウイスター系ラットの脾細胞を test medium に浮遊し、細胞数を $1 \times 10^7/\text{ml}$ に調整し、concanavalin A ($5\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) で 48 時間刺激培養した後、培養上清を集め、スタンダード IL-2 とした。

10. 培養上清中の IL-2 の測定 (Fig. 6)

IL-2 産生能の測定は、Gillis らの生物学的測定法³⁾に準じた。すなわち、IL-2 依存性マウス cytotoxic T 細胞株 (CTLL-2)⁴⁾⁵⁾ の増殖能を指標として測定した。スタンダード IL-2 および sample を平底 96 well micro testplate (NUNC) 中で Click's medium により倍々希釈した後、 4×10^3 個の CTLL-2 細胞を各 well に加えて 37°C の 5% CO_2 incubator 中で 20 時間培養した。ついで、 $0.4\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H -thymidine (^3H -TdR) を各 well に加えて、さらに 4 時間培養した。培養終了後、

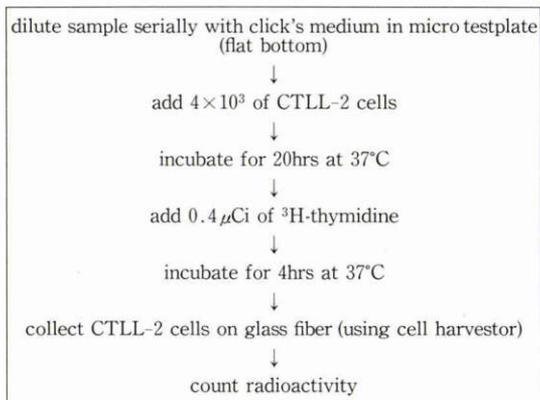


Fig. 6 Method for IL-2 activity

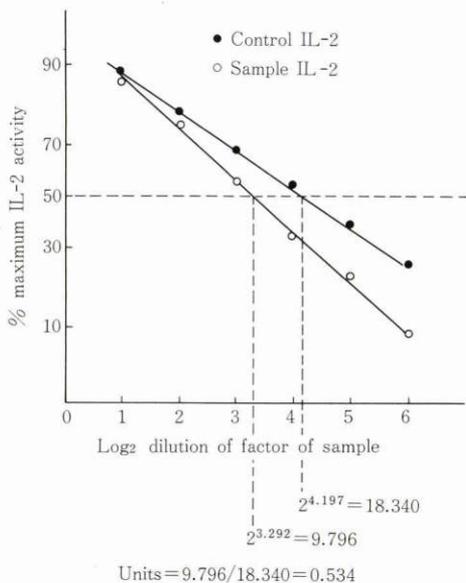


Fig. 7 Determination of units of IL-2 activity

液体シンチレーションカウンターでCTLL-2細胞に取りこまれた³H-TdRの放射能活性を測定した。IL-2活性は、プロビッド分析の技法を用いて、ユニットとして求めた。すなわち、Fig. 7に示したユニットの計算例のように、まず、スタンダードIL-2を用いた場合のCTLL-2細胞への³H-TdRの取込みの最大値の50%になる希釈倍数を求め、同様に、sampleの培養上清を何倍に希釈すればスタンダードIL-2を用いた場合の最大値の50%になるかを求め、これをスタンダードの希釈倍数で割ることによりユニット(U)として求めた。

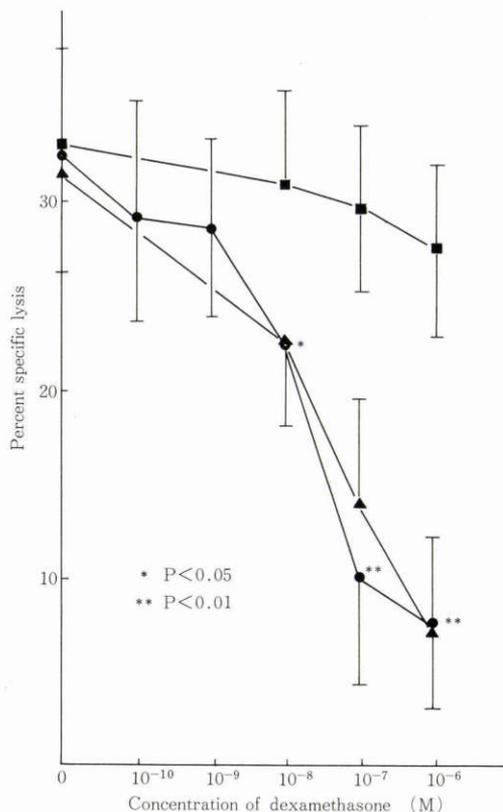


Fig. 8 Effect of dexamethasone on cytotoxic activity

(●) Dexamethasone was added on day 0, (▲) Dexamethasone was added on day 0 and it was removed on day 2, (■) Dexamethasone was added on day 2

III 結果

1. DexamethasoneのCTL活性に対する影響 (Fig. 8)

培養開始と同時にdexamethasoneを添加し、4日間培養後に誘導されたCTL活性 (percent specific lysis)は、dexamethasoneの濃度が 10^{-10} Mでは $29.2 \pm 5.5\%$ 、 10^{-9} Mでは $28.7 \pm 4.8\%$ 、 10^{-8} Mでは $22.7 \pm 4.5\%$ 、 10^{-7} Mでは $10.2 \pm 5.7\%$ 、 10^{-6} Mでは $7.8 \pm 3.9\%$ で、対照のdexamethasone無添加の場合のCTL活性の $32.5 \pm 6.0\%$ に比べて、dexamethasoneの濃度が 10^{-8} M濃度以上では、有意に低下していた。次に、培養と同時にdexamethasoneを添加し、48時間培養後にdexamethasoneを含まないtest mediumと交換した後、さらに48時間培養後に誘導されたCTL活

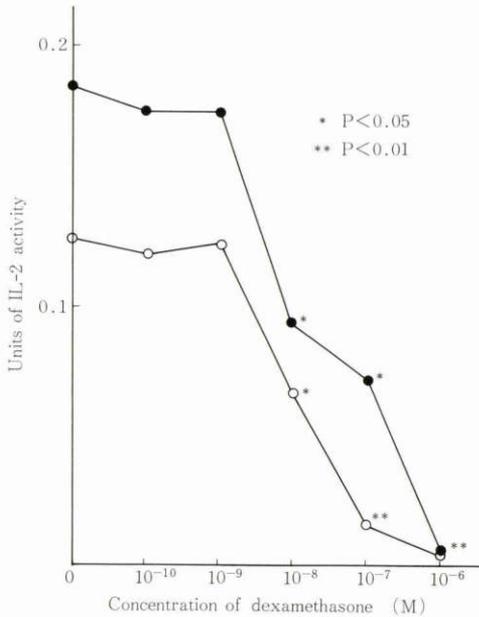


Fig. 9 Effect of dexamethasone on production of IL-2 from spleen cells of HSV-infected mice
Dexamethasone was added on day 0, (●) Length of culture was 2 days, (○) Length of culture was 4 days

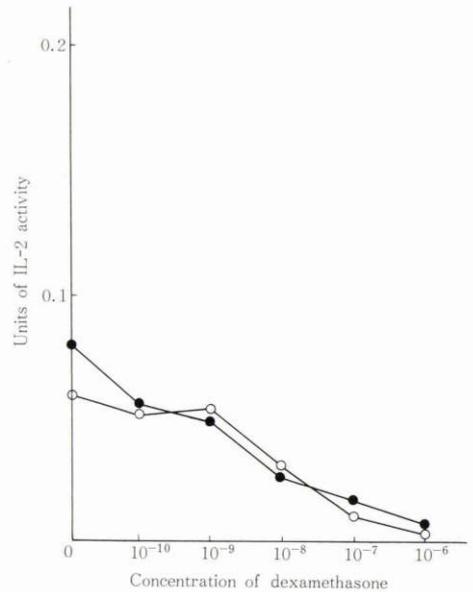


Fig. 10 Effect of dexamethasone on production of IL-2 from spleen cells of HSV-infected mice
(●) Dexamethasone was added on day 0 and it was removed on day 2, (○) Dexamethasone was added on day 0. Length of culture was 4 days

性 (percent specific lysis) は, dexamethasone の濃度が 10⁻⁸M では 22.8 ± 5.3%, 10⁻⁷M では 14.2 ± 5.5%, 10⁻⁶M では 7.3 ± 5.1% で, 培養と同時に dexamethasone を添加した場合と比べ, CTL 活性に差はなかった。

また, 培養開始の48時間後に初めて dexamethasone を添加し, さらに48時間培養後に誘導された CTL 活性 (percent specific lysis) は, dexamethasone の濃度が 10⁻⁸M では 31.0 ± 5.3%, 10⁻⁷M では 29.8 ± 4.3%, 10⁻⁶M では 27.8 ± 5.3% で, 培養と同時に dexamethasone を添加した場合に比べ, CTL 活性は有意に高い値を示していた。これらの結果は, 既に報告した¹⁾結果と同様であった。

2. 培養開始と同時に dexamethasone を添加した場合の IL-2 産生量 (Fig. 9)

培養と同時に dexamethasone を添加し, 48時間培養後に産生された IL-2 量は, dexamethasone の濃度が 10⁻¹⁰M では 0.171 ± 0.016U, 10⁻⁹M では 0.172 ± 0.019U, 10⁻⁸M では 0.092 ± 0.014U (p < 0.05), 10⁻⁷M では 0.071 ± 0.014U (p < 0.05), 10⁻⁶M では 0.006 ± 0.004U (p < 0.01) で, 対照の dexamethasone 無添加

の IL-2 産生量の 0.181 ± 0.019U と比べ, dexamethasone の濃度が 10⁻⁸M 以上では有意に低下していた。培養と同時に dexamethasone を添加し, 培養4日時の培養上清中の IL-2 産生量は, dexamethasone の濃度が 10⁻¹⁰M では 0.119 ± 0.018U, 10⁻⁹M では 0.123 ± 0.017U, 10⁻⁸M では 0.065 ± 0.071U (p < 0.05), 10⁻⁷M では 0.015 ± 0.007U (p < 0.01), 10⁻⁶M では 0.005 ± 0.001U (p < 0.01) で, 対照の dexamethasone 無添加の IL-2 産生量の 0.125 ± 0.008U と比べて, dexamethasone の濃度が 10⁻⁸M 以上では有意に低下していた。

3. 培養と同時に dexamethasone を添加し, 48時間経過時に dexamethasone を除去して, さらに48時間培養後の IL-2 産生量 (Fig. 10)

培養と同時に dexamethasone を添加し, 48時間培養後に培養液を dexamethasone を含まない test medium と交換し, さらに48時間培養後に産生された IL-2 量は, dexamethasone の濃度が 10⁻¹⁰M では 0.072 ± 0.013U, 10⁻⁹M では 0.076 ± 0.014U, 10⁻⁸M では 0.055 ± 0.007U (p < 0.05), 10⁻⁷M では 0.016 ± 0.006U (p < 0.01), 10⁻⁶M では 0.007 ± 0.002U (p < 0.01) で, dexamethasone 無添加の対照の 0.088 ± 0.015U に比べて, dexamethasone の濃度が 10⁻⁸M 以上では有

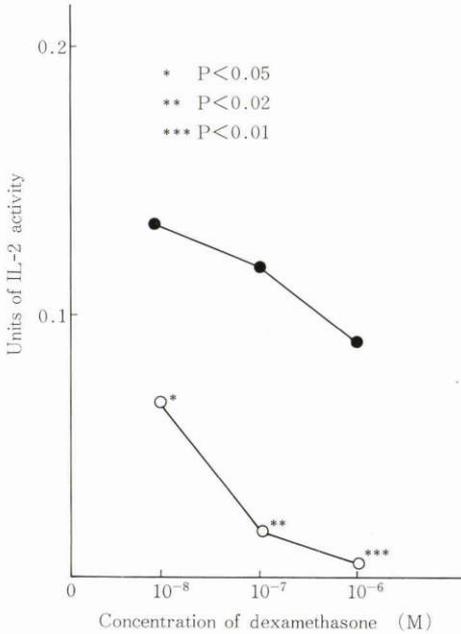


Fig. 11 Effect of dexamethasone on production of IL-2 from spleen cells of HSV-infected mice (●) Dexamethasone was added on day 2, (○) Dexamethasone was added on day 0. Length of culture was 4 days

意に低下していた。すなわち、培養と同時に dexamethasone を添加した場合の IL-2 産生量と同様の傾向を示した。

4. 培養 2 日時に dexamethasone を添加した場合の IL-2 産生量 (Fig. 11)

IL-2 産生量の減少を認めた dexamethasone 濃度、すなわち $10^{-8}M \sim 10^{-6}M$ 濃度において検討した。

培養 2 日時に dexamethasone を添加した場合の IL-2 産生量は、dexamethasone の濃度が $10^{-8}M$ では $0.132 \pm 0.013U$ で、 $10^{-7}M$ では $0.116 \pm 0.015U$ で、 $10^{-6}M$ では $0.088 \pm 0.004U$ であり、培養と同時に dexamethasone を添加した場合の IL-2 産生量は、dexamethasone の濃度が $10^{-8}M$ では $0.065 \pm 0.007U$ で、 $10^{-7}M$ では $0.015 \pm 0.007U$ で、 $10^{-6}M$ では $0.005 \pm 0.001U$ であったのに比べて、有意に高かった。

5. CTL 活性と IL-2 産生量の関係 (Fig. 12)

IL-2 産生量が最大値を示した培養 2 日時の IL-2 産生量と培養 4 日時の CTL 活性との関係について検討した。すなわち、Fig. 12 に示すように、各種濃度の dexamethasone 添加群および dexamethasone 無添加群の各々について、培養 2 日時の IL-2 産生量を縦軸

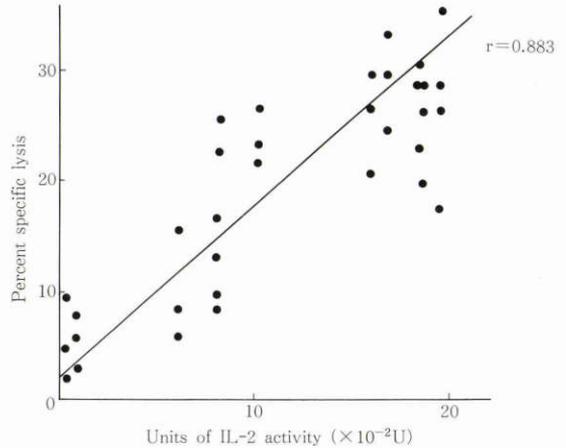


Fig. 12 Correlation between CTL activity and production of IL-2
Units of IL-2 activity was measured on day 2
Percent specific lysis was measured on day 4

に、培養 4 日時の CTL 活性を横軸に表示してみると、相関係数は 0.883 で両者の間に正の相関を認めた。

IV 考 按

IL-2 は、主としてヘルパー T 細胞が産生するリンホカインで、CTL の誘導に関与しているとされている。つまり、この IL-2 が、IL-2 レセプターを発現した preCTL に結合し、CTL が誘導されると考えられている。

既に著者は、コルチコステロイドにより CTL 活性が抑制されることを報告した¹⁾が、一方、コルチコステロイドによって IL-2 産生が抑制されるとする報告⁶⁾⁷⁾⁸⁾がなされており、CTL 活性の抑制と IL-2 産生抑制との関係を知ることは重要なことと考えられる。

現在最も広く用いられているものは、IL-2 活性の測定法として、Gillis ら³⁾が確立した、IL-2 依存性株を用いたマイクロアッセイ法である。彼等は IL-2 依存性細胞として、マウス腫瘍特異的 CTL (CTLL) を用い、検体は、マウスの脾リンパ球を mitogen あるいはマウスやラットの脾リンパ球で刺激した培養上清を用いている。一方著者は、stimulator cell として LPS で幼若化した脾リンパ球に HSV を感染させたものを使用した。このような条件においては、Gillis らの報告に比べて、IL-2 産生量は低い値であったが、これは使用した stimulant が特異的であるか非特異的であるかによる可能性がある。

今回用いた CTLL-2 は、IL-2 を含む培養液で培養すると、その doubling time は10—12時間であり、IL-2 を含まない培養液に浮遊させると CTLL-2 は2時間以内に増殖を停止し、24時間以内にはほとんど死滅するとされている⁹⁾。今回の実験において、培養上清中には IL-2 以外の他の成分が含まれている可能性は十分考えられるが、その旺盛な増殖能からみて、CTLL-2 は IL-2 に反応して増殖したと考えられる。Gillis らは、dexamethasone の T cell growth factor (TCGF: 現在では IL-2 と考えられている) の産生量について検討している⁶⁾。Dexamethasone の濃度が 10^{-9} M から 10^{-6} M では、濃度が高くなるにつれて TCGF 産生量は減少する傾向を示したと報告している。著者の成績によると、dexamethasone の濃度が 10^{-8} M 以上で IL-2 産生量の低下を認め、Gillis らの成績に比べて TCGF 産生量の低下をきたす dexamethasone の濃度が高いのは stimulant の違いによる可能性がある。

著者の成績より、CTL 活性と IL-2 活性との間に正の相関を認めたことと、培養2日時に dexamethasone を添加した場合には、CTL 活性および IL-2 活性の抑制がみられないことから、dexamethasone による CTL 活性の抑制は、IL-2 産生の抑制を介して生じていると推定されるが、dexamethasone がヘルパーT細胞に作用しているのか、あるいはその前駆細胞に作用しているのかは不明である。

HSV 感染においては、一般的に細胞性免疫が低下することが知られている。齊藤¹⁰⁾は、HSV を角膜に感染させたマウスの脾細胞を、HSV を角膜に感染させた別のマウスに移入し、HSV 感染防御効果を認めたと報告している。また彼は、抗 Thyl 血清および補体を用いて、この脾細胞の主体は T 細胞であると述べている。また、Rouse ら¹¹⁾は、マウスを使って Lyt2⁺ T リンパ球の移入実験を行なって、Lyt2⁺ T リンパ球が HSV 感染防御に有効であり、また IL-2 の投与により感染防御効果が増強したとして、CTL と IL-2 の HSV 感染防御における重要性を指摘している。さらに、IL-2 の産生が suppressor cell によって抑制されることが、細胞性免疫能の低下を招くという仮説を立てている。著者の成績から、ステロイド剤を臨床上使用した場合には、局所のリンパの IL-2 産生量が低下することが推定される。これは、感染防御の観点からすると、

不利なことである。

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、検査部の高石雅敏講師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

- 1) 末広龍憲: 単純ヘルペス角膜炎の免疫薬理学的研究—マウス脾 cytotoxic T lymphocyte に対するコルチコステロイドの抑制作用について—。日眼 90: 1714—1722, 1986。
- 2) 伊東恭悟, 倉根一郎, 齊藤史郎, 川上一岳, 小坂志郎, 熊谷勝男: CCA の IFN 誘導能と免疫調節作用。臨床免疫 15: 242—252, 1983。
- 3) Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA: T cell growth factor: Parameters of productin and aqantitative microassay for activity. J Immunol 120: 2027—2032, 1978。
- 4) Baker PE, Gillis S, Ferm MM, Smith KA: The effect of T cell growth-factor on the generation of cytolytic T cells. J Immunol 121: 2168—2173, 1978。
- 5) Gillis S, Smith KA: Long term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. Nature 268: 154—156, 1977。
- 6) Gillis S, Crabtree GR, Smith KA: 1. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. J Immunol 123: 1624—1632, 1979。
- 7) Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC: Dexamethasone-mediated inhibition of human cell growth factor and interferon messenger RNA. Immunology 133: 273—280, 1984。
- 8) Randazzo B, Hirschberg T, Hirschberg H: Inhibition of the antigen-activated T cell response by methyprednisolone is caused by inhibition of interleukin-2 production. Int J Immunopharmacol 6: 419—429, 1984。
- 9) Yamakido Y, Yanagida J, Ishioka S, Matsuzaka S, Hozawa S, Akiyama M, Kobuke K, Inamizu T, Nishimoto Y: Production of interkeukin 2 in human peripheral blood lymphocytes: Optimal condition for its culture. Hiroshima J Med Sci 34: 43—51, 1985。
- 10) 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 87: 1010—1016, 1983。
- 11) Larson HS, Russell RG, Rouse BT: Recovery from lethal herpes simplex virus type 1 infection is mediated by cytotoxic T lymphocytes. Infect Immun 41: 197—204, 1983。