

免疫局所リンパ節細胞はマウス単純ヘルペス角膜炎の 感染防御に有効である (表5)

風見 宣生*・林 皓三郎** (*東京女子医科大学眼科
内田 幸男* (**郡山免疫医学研究所ウイルス免疫部)

Immune Local Lymph Node Cells Inhibit Viral Propagation in Murine Herpetic Keratitis

Norio Kazami, Kozaburo Hayashi*, Yukio Uchida

Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical College

**Laboratory of Viral Immunology, The Koriyama Institute of Medical Immunology*

要 約

HSV-1角膜感染ヌードマウスに免疫局所リンパ節細胞を養子移入して、HSV-1角膜感染症での免疫細胞のウイルス増殖抑制効果を調べた。免疫局所リンパ節細胞は HSV-1角膜接種後のウイルス増殖を抑制した。しかし、L3T4陽性細胞あるいはLyt 2.3陽性細胞だけを養子移入した場合には十分なウイルス増殖抑制は得られず、両方のサブセットが存在するときはじめてウイルスの増殖が効果的に阻止されることが示唆された。(日眼92: 1461—1465, 1988)

キーワード：マウス HSV-1角膜炎，免疫局所リンパ節細胞，免疫細胞養子移入，Lyt 2.3陽性細胞，L3T4陽性細胞

Abstract

Immune preauricular and submandibular lymph node cells were obtained from BALB/c mice, which had been sensitized with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) subconjunctivally. These immune cells were treated with anti-Lyt 2.3 antibody plus complement, anti-L3T4 antibody plus complement or complement alone and were transferred to syngeneic BALB/c nude mice by an intravenous route. Two hours later, HSV-1 was inoculated in the scratched corneas of the nude mice. On the 7th day post-inoculation, eye balls and trigeminal ganglia were removed from the nude mice, and assayed for the virus. Adoptive transfer of the immune local lymph node cells inhibited the virus proliferation in the eye balls and prevented viral spread to the trigeminal ganglia. The inhibitory effects against viral replication was reduced by the depletion of Lyt 2.3 bearing cells or L3T4 bearing cells. These findings demonstrate that both Lyt 2.3 bearing cells and L3T4 bearing cells play a role in preventing viral propagation in murine HSV-1 keratitis. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1461—1465, 1988)

Key words: Murine HSV-1 keratitis, Immune local lymph node cells, Adoptive transfer. Lyt 2.3 bearing cells, L3T4 bearing cells

別刷請求先：162 東京都新宿区河田町8—1 東京女子医科大学眼科学教室 風見 宣生
(昭和63年4月13日受付)

Reprint requests to: Norio Kazami, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tokyo Women's Medical College
10 Kawada-cho, Ichigaya, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

(Accepted for publication April 13, 1988)

I 緒 言

単純ヘルペスウイルス感染症とその防御機構に関する研究は、主としてマウスを用いて、皮内接種、腹腔内接種などの方法で行われている^{1)~4)}。単純ヘルペスウイルス1型(以下 HSV-1と略)が角膜に接種されたとき、角膜は無血管組織という特異性からウイルス感染時の防御機構も他の組織の場合とは異なった様相を呈することも予想される。著者は、HSV-1角膜感染症でのウイルスの拡がりに対して免疫局所リンパ節細胞が抑制効果をもつことを示し、抗 Lyt 1.2単クローン抗体と抗 Lyt 2.2単クローン抗体を用いて T 細胞サブセットの働きについて検討を加えた⁵⁾。そこで今回は、Helper/inducer T cell に特異的とされる抗 L3T4抗体を使用して HSV-1角膜感染症の際に働く T 細胞サブセットの解析を行なったのでここに報告する。

II 実験方法

1. ウイルスと動物：GMK 細胞で継代した HSV-1, CHR-3株を用いた。使用時のウイルス価は 4.3×10^6 plaque forming unit (以下 pfu と略)/ml であった。マウスは雌雄の BALB/c CrSlc (以下マウスと略) 6~8 週齢、雄の BALB/c nu/nuSlc (以下ヌードマウスと略) 8 週齢を用いた。

2. 抗体と補体：抗 Lyt 2.2単クローン抗体 (Cedarlane Lab., Ontario, Canada), 抗 Thy 1.2単クローン抗体 (Cedarlane Lab., Ontario, Canada), ウサギ低毒性補体 (Cedarlane Lab., Ontario, Canada) を用いた。抗 L3T4単クローン抗体は東京大学医科学研究所の成内秀雄先生より譲り受けた。

3. 免疫局所リンパ節細胞浮遊液の調整：マウスの両眼球結膜下に 6.6×10^4 pfu の HSV-1 を接種した。7 日後、マウスを屠殺し耳前リンパ節、顎下リンパ節を無菌的に摘出した。摘出したリンパ節をステンレスメッシュをとおして個々の細胞とし、10%胎児ウシ血清加 RPMI1640液 (以下 RPMI1640液と略) に浮遊させた。0.83%NH₄Cl 液を加えて赤血球を溶解した後、RPMI1640液に再浮遊させた。ついで、ルー瓶中で 37℃, 40分間保温し、ガラス壁に付着した細胞を除き、免疫局所リンパ節細胞を得た。

4. 免疫細胞の抗体処理：免疫局所リンパ節細胞浮遊液を 10^7 /ml に調整し、200倍に希釈した抗 Lyt 2.2抗体を加え、4℃, 60分間反応させた。RPMI1640液で洗浄した後、同液に浮遊させた。再びこの浮遊液を

RPMI1640液を用いて 10^7 /ml に調整し、10倍に希釈した低毒性ウサギ補体を加えて 37℃, 60分間反応させた。再度 RPMI1640液に浮遊させ Trypan blue で染色し、生細胞の数を数えた。そして、生細胞が 10^8 /ml となるように RPMI1640液に浮遊させた。

10^7 /ml に調整した免疫局所リンパ節細胞浮遊液に、10倍に希釈した抗 L3T4抗体を加えて、室温で30分間反応させた後、RPMI1640液で洗浄、再浮遊させた。上述と同様に低毒性ウサギ補体と反応させて、生細胞が 10^8 /ml となるように RPMI1640液に浮遊させた。

5. ヌードマウスへの細胞移入：ヌードマウスを4群にわけ、1群につき6匹とした。それぞれの群で、ヌードマウス1個体につき 10^7 の細胞を尾静脈より移入した。細胞移入を受けないものを対照群とした。

6. ヌードマウスへのウイルス接種：細胞移入の2時間後、ヌードマウスをエーテルで麻酔した。両眼角膜を27ゲージ針にて角膜実質に達するように乱切り、 $3.3\text{--}6.6 \times 10^3$ pfu の HSV-1 CHR₃株を滴下した。

7. ウイルス価の測定：ウイルスの角膜接種から7日後、すべてのヌードマウスを屠殺し、眼球、三叉神経節を無菌的に摘出した。これらを各群ごとに集めて乳化し、GMK 細胞を用いてブランク法によってウイルス価を測定した。

以上を実験1とした。同様の実験を6~8週齢のヌードマウスを用いて行ない、実験2とした。実験2ではヌードマウスを1群7匹とした。また、実験2では抗 Thy 1.2単クローン抗体と補体で免疫細胞を処理し、養子移入を行なった群も加えた。

III 結 果

実験1：ウイルス接種7日後、ヌードマウスはすべて生存していた。眼球のウイルス価は対照群では 9.7×10^4 pfu/0.1g tissue weight (以下 pfu/0.1g t.w.と略)、抗体処理を受けておらず補体のみで処理された免疫細胞を移入した群 (以下これを非抗体処理細胞移入群とする) では 3.3 pfu/0.1g t.w., 抗 Lyt 2.2抗体処理細胞移入群では 3.0×10^4 pfu/0.1g t.w., 抗 L3T4抗体処理細胞移入群では 1.7×10^3 pfu/0.1g t.w.であった (表1)。三叉神経節のウイルス価は対照群では 4.7×10^4 pfu/0.1g t.w., 非抗体処理細胞移入群では 5.5×10^2 pfu/0.1g t.w., 抗 Lyt 2.2抗体処理細胞移入群では 3.3×10^2 pfu/0.1g t.w., 抗 L3T4抗体処理細胞移入群では 2.5×10^2 pfu/0.1g t.w.であった (表2)。眼球でのウイルス増殖は、Lyt 2.3陽性細胞が L3T4陽性細胞に比べより

表 1 HSV-1 角膜接種 7 日後の眼球のウイルス価
(実験 1)

	ウイルス価 (pfu/0.1g 組織重量)	マウス数 (匹)
非抗体処理細胞移入群	3.3	6
抗 Lyt2・2 抗体処理細胞移入群	3.0×10^4	6
抗 L3T4 抗体処理細胞移入群	1.7×10^3	6
対 照 群	9.7×10^4	6

表 4 HSV-1 角膜接種 7 日後の眼球のウイルス価
(実験 2)

	ウイルス価 (pfu/0.1g 組織重量)	マウス数 (匹)
非抗体処理細胞移入群	2.0×10^2	7
抗 Lyt2・2 抗体処理細胞移入群	2.3×10^3	7
抗 L3T4 抗体処理細胞移入群	2.3×10^3	6
抗 Thy1・2 抗体処理細胞移入群	4.8×10^3	4
対 照 群	2.0×10^4	1

表 2 HSV-1 角膜接種 7 日後の三叉神経節の
ウイルス価 (実験 1)

	ウイルス価 (pfu/0.1g 組織重量)	マウス数 (匹)
非抗体処理細胞移入群	5.5×10^2	6
抗 Lyt2・2 抗体処理細胞移入群	3.3×10^2	6
抗 L3T4 抗体処理細胞移入群	2.5×10^2	6
対 照 群	4.7×10^4	6

表 5 HSV-1 角膜接種 7 日後の三叉神経節の
ウイルス価 (実験 2)

	ウイルス価 (pfu/0.1g 組織重量)	マウス数 (匹)
非抗体処理細胞移入群	4.3×10^2	7
抗 Lyt2・2 抗体処理細胞移入群	9.4×10^2	7
抗 L3T4 抗体処理細胞移入群	4.3×10^2	6
抗 Thy1・2 抗体処理細胞移入群	4.0×10^3	4
対 照 群	4.7×10^4	1

表 3 HSV-1 角膜接種 7 日後のマウス生存数
(実験 2)

	マウス数 (匹)	生存数 (匹)	生存率 (%)
非抗体処理細胞移入群	7	7	100
抗 Lyt2・2 抗体処理細胞移入群	7	7	100
抗 L3T4 抗体処理細胞移入群	7	6	86
抗 Thy1・2 抗体処理細胞移入群	7	4	57
対 照 群	7	1	14

Lyt 2.2 抗体処理細胞移入群, 抗 L3T4 抗体処理細胞移入群では 10^2 代と, それぞれ似たようなウイルス価を示した (表 5).

非抗体処理免疫細胞は, 眼球, 三叉神経節ともウイルス増殖を抑制した. ヌードマウスの生存率でみると, L3T4 陽性細胞のほうが Lyt 2.3 陽性細胞に比べてウイルスの感染防御に有効であるような結果となった. しかし, 組織のウイルス価では, 両方の細胞にウイルス増殖抑制効果の差は見られなかった.

IV 考 按

HSV 感染症の感染防御には, 非特異的免疫機構や液性免疫, 細胞性免疫が働いており, これらの関与について in vivo, in vitro の実験で多くが報告され, なかでも HSV 急性感染で細胞性免疫が重要な役割を果たしていることが知られている^{8)~9)}. 細胞性免疫の担当細胞には, 遅延型過敏症反応 T 細胞 (T_{DH} と略) と細胞障害性 T 細胞 (T_c と略) があり, マウスでは T_{DH} は H-2 Ia 拘束性で, Lyt 1, L3T4 の表面抗原をもち, T_c は H-2 K あるいは D 拘束性で, Lyt 2.3 の表面抗原をもっている.

従来より HSV 感染症の感染防御に働く細胞性免疫の T 細胞サブセットについて様々な報告がなされている. 一方では Lyt 1 陽性細胞が担当細胞として働くという実験結果が示され, Oakes らは HSV-1 角膜感染

効果的に抑制した. 三叉神経節では両方の細胞ともに, ウイルス増殖に対し有効に働いた.

実験 2: HSV-1 角膜接種 7 日後, 非抗体処理細胞移入群, 抗 Lyt 2.2 抗体処理細胞移入群ではすべてのヌードマウスは生存していたが, 抗 L3T4 抗体処理細胞移入群では 1 匹, 抗 Thy 1.2 抗体処理細胞移入群では 3 匹, 対照群では 6 匹が死亡した (表 3).

眼球のウイルス価は, 対照群では 2.0×10^4 pfu/0.1g t.w. であった. 非抗体処理細胞移入群では 2.0×10^2 pfu/0.1g t.w. とウイルス価は抑えられていた. 抗 Lyt 2.2 抗体処理細胞移入群, 抗 L3T4 抗体処理細胞移入群, 抗 Thy 1.2 抗体処理細胞移入群では 10^3 代と対照群と非抗体処理細胞移入群の中間のウイルス価を示した (表 4).

三叉神経節では, 対照群で 4.7×10^4 pfu/0.1g t.w., 抗 Thy 1.2 抗体処理細胞移入群で 4.0×10^3 pfu/0.1g t.w. のウイルス価であった. 非抗体処理細胞移入群, 抗

症についても同様の結果を報告している¹³⁾。しかし、Larsen らは抗 Lyt 1.2抗体と補体で処理した HSV-1 感作脾細胞よりも、抗 Lyt 2.2抗体と補体で処理したときのほうが HSV-1に対する防御効果が減弱することで、Lyt 2.3陽性細胞の有効性を指摘している¹⁴⁾¹⁵⁾。そして角膜感染症の場合においても、Lyt 2.3陽性細胞が感染防御に効果的に働いているという結果が得られている¹⁶⁾。

HSV は接種ルートによって、すなわち抗原が呈示される場所により免疫機構の対応が異なり、誘導される T 細胞サブセットの働きにも違いがあることが知られている¹⁷⁾。著者は、マウスの HSV-1角膜感染症で、球結膜下にウイルスを接種して得られた免疫局所リンパ節細胞がウイルス増殖を効果的に抑えることを示した⁵⁾。

そこで今回、抗 Lyt 2.2抗体と、 T_{DH} に特異性の高い抗 L3T4抗体と補体で免疫細胞を処理することで、HSV-1角膜感染症の防御に働く T 細胞サブセットの解析を行なった。HSV-1球結膜下接種 7 日後に得た耳前リンパ節および顎下リンパ節細胞は HSV-1角膜感染時のウイルス増殖を抑制する効果をもつことが示された。ウイルス角膜接種 7 日後の眼球のウイルス価をみると実験 1 では抗 Lyt 2.2抗体と補体で処理した細胞を移入したときのほうが、抗 L3T4抗体と補体で処理した細胞を移入したときと比べて低いウイルス価を示した。従って、実験 1 からは L3T4陽性細胞のほうが有効に働くように思われた。実験 2 では抗 Lyt 2.2、抗 L3T4抗体処理細胞移入群とも同じウイルス価を示し、またマウスの生存率は抗 Lyt 2.2抗体処理細胞移入群のほうが高かった。従って実験 1 と 2 を考えあわせると、どちらか一方の細胞が特に強いウイルス増殖抑制効果をもつといった結果は得られなかった。

しかし、実験 1 と 2 で共通してみられるように、抗 Lyt 2.2抗体あるいは抗 L3T4抗体と補体で細胞を処理すると補体のみで処理した場合と比べ、ウイルス増殖抑制効果が著しく減弱することが示された。さらに実験 2 で、これらの抗体で細胞を処理すると、抗 Thy 1.2抗体で細胞を処理したときとほぼ同等のウイルス価を示す実験結果を得た。これは、L3T4陽性細胞、Lyt 2.3陽性細胞のどちらかを抗体処理してしまうと T 細胞全体を処理した場合と同程度のウイルス増殖抑制効果の減弱がみられることを示している。これらのことから、L3T4陽性細胞と Lyt 2.3陽性細胞のどちらか一方がウイルス増殖抑制を担当しているのではなく、両

方の細胞が同時に存在するときはじめて有効なウイルス増殖抑制効果が生じると推察される。

三叉神経節へのウイルスの拡がり実験 1, 2 ではほぼ同様の傾向がみられ、眼球のウイルス価を反映する価をとっていない。これは、神経節内のウイルスに対して防御機構が働きにくいこと、HSV-1角膜接種後の三叉神経節でのウイルス価のピークが接種後 5 日前後であること（未発表）などがあり、実験結果に影響を与えていると思われる。従って、三叉神経節へのウイルス伝播の抑制を検討する場合には実験系の一部を変更する必要がある。

この実験で HSV-1角膜感染症の感染防御には L3T4陽性細胞と Lyt 2.3陽性細胞の両方の存在が必要であることが示唆されたが、両者間の相互作用や役割分担については明確ではない。これらの点を明らかにし、HSV-1角膜感染症における防御機構をより詳細に検討すべく、今後実験をかさねていく予定である。

文 献

- 1) Sydiskis RJ, Schultz I: Herpes simplex skin infection in mice. *J Infect Dis* 115: 237—246, 1965.
- 2) Simmons A, Nash AA: Zosteriform spread of herpes simplex virus as a model of reactivation, and its use to investigate the role of immune cells in preventing recurrent disease. *J Virol* 52: 816—821, 1984.
- 3) Lopez C: Genetic of natural resistance to herpes virus infection in mice. *Nature* 258: 152—153, 1975.
- 4) Kino Y, Hayashi Y, Hayashida I, et al: Dissemination of herpes simplex virus in nude mice after intracutaneous inoculation and effect of antibody on the course of infection. *J Gen Virol* 63: 475—479, 1982.
- 5) 風見宣生: 単純ヘルペスウイルス 1 型角膜感染症に対する免疫局所リンパ節細胞の効果と T 細胞サブセットの役割. *東女医大誌* 57: 281—285, 1987.
- 6) Nash AA, Quartey-Papafio 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.
- 7) Metcalf JF, Hamilton DS, Reichert RW: Herpetic keratitis in athymic (nude) mice. *Infect Immun* 26: 1164—1171, 1979.
- 8) 佐々木隆敏, 斎藤春和, 井上みどり他: 近交系マウ

- ス角膜ヘルペスと免疫脾細胞による感染防御免疫の受身伝達について. 日眼会誌 84: 1046—1050, 1980.
- 9) 斉藤春和: 角膜ヘルペスの免疫学的研究. 日眼会誌 87: 1010—1016, 1983.
- 10) Nash AA, Phelan J, Wiled P: Cell-mediated immunity in herpes simplex virus-infected mice. J Immunol 126: 1260—1262, 1981.
- 11) Nagafuchi S, Hayashida I, Higa K, et al: Role of Lyt-1 positive immune T cells in recovery from herpes virus infection in mice. Microbiol Immunol 26: 359—362, 1982.
- 12) Nash AA, Gell PGH: Membrane phenotype of murine effector and suppressor T cells involved in delayed hypersensitivity and protective immunity to herpes simplex virus. Cell Immunol 75: 348—355, 1983.
- 13) Oakes JE, Rector JT, Laush RN: Lty-1⁺ cells participate in recovery from ocular herpes simplex virus type 1 infection. Ophthalmol Vis Sci 25: 188—194, 1984.
- 14) Larsen 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.
- 15) Larsen HS, Feng MF, Horohov DW, et al: Role of T-lymphocyte subsets in recovery from herpes simplex virus infection. J Virol 50: 56—59.
- 16) 風見宣生: 1型単純ヘルペスウイルス角膜感染における抗体および細胞性免疫の効果. 日眼会誌 89: 56—59, 1984.
- 17) 林皓三郎, 風見宣生, 内田幸男: 角膜ヘルペスウイルス感染に対するT細胞Subsetの役割. 日眼会誌 89(増刊号): 114, 1985.
-