

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の cytotoxic T lymphocyte に及ぼす

インターロイキン2点眼の効果について—(図5)

梶原 良 (広島大学医学部眼科学教室)

The Effect of Interleukin-2 Eyedrops on The Cytotoxic T Lymphocyte Activity in The Cervical Lymph Nodes of Mice with Corneal Herpes Infection

Ryo Kajiwara

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

要 約

マウス角膜に単純ヘルペスウイルス(HSV)を接種した後、生理食塩液を点眼したコントロール群、インターロイキン2 (IL-2) 点眼群、デキサメサゾン (DMS) 点眼群、DMS・IL-2点眼群の4群について角膜病変とHSV特異的キラーT細胞(CTL)活性を比較検討した。DMS点眼を行っていない正常免疫状態では、コントロール群とIL-2点眼群を比較した場合、IL-2点眼群はコントロール群に比べて角膜病変の早期軽減とCTL活性の早期出現を認めた。DMS点眼による局所免疫抑制状態においては、DMS点眼群とDMS・IL-2点眼群を比較した場合、DMS・IL-2点眼群はDMS点眼群に比べて第10病日におけるCTL活性の上昇を認めた。この場合、両者の角膜病変の間には有意の差は認めなかった。以上の結果から実験的角膜ヘルペスの初感染においては、IL-2点眼、CTL活性および角膜病変の3者の間にかなり密接な関係がある可能性が示唆された。(日眼 92:1675-1681, 1988)

キーワード：ヘルペス性角膜炎、頸部リンパ節、キラーT細胞、インターロイキン2、ステロイド

Abstract

The present investigation was undertaken to evaluate the influence of topical ocular application of interleukin-2 (IL-2) on cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity in the cervical lymph nodes in experimental murine herpetic keratitis, and to estimate the degree of Keratitis. In the group receiving IL-2, the degree of keratitis was milder, and CTL activity was higher on day 4 than in the control group. In dexamethasone-treated mice, CTL activity in the group receiving IL-2 was higher on day 10 than in the group which received no IL-2. These results suggest that there is a relatively close relation between IL-2 application, CTL activity, and the degree of keratitis. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1675-1681, 1988)

Key words: Herpes simplex keratitis, Cytotoxic T lymphocyte, Cervical lymph nodes, Interleukin-2, Steroid

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 (昭和63年6月28日受付)

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

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

(Accepted for publication June 28, 1988)

I 緒 言

さきに教室の平川¹⁾は、インターロイキン2 (IL-2) が *in vitro* における単純ヘルペスウイルス (HSV) 特異的キラーT細胞 (CTL) の増強を促進することを示した。また、教室の末広²⁾³⁾は、HSV 特異的 CTL 活性が、*in vitro* においてステロイドにより抑制され、インターロイキン2 (IL-2) の添加により軽減されることを示した。今回、HSV 角膜感染マウスに対して、ステロイドと IL-2 の点眼を行ない、角膜病変、*in vivo* における頸部リンパ節細胞数および HSV 特異的 CTL 活性に及ぼす影響について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を用いた。感染価は $10^{6.4}$ TCID₅₀/ml であった。

2. 実験動物

6週齢、雄性 C3H/He マウスを使用した。

3. ウイルス接種方法

生理食塩水で10倍に稀化したペントバルビタール (ネプタール[®]) 0.15ml (7.5mg) を腹腔内に注射した後、27ゲージ針で両眼の角膜を乱切した。その後、HSV 液0.005ml を滴下し、眼球マッサージを行ない感染させた。

4. ステロイド点眼と IL-2点眼 (図1)

点眼には、ステロイドは0.05%デキサメサゾン点眼液 (DMS, デカドロン[®]) を、IL-2はシオノギ製薬のヒト・リコンビナント IL-2 (1万単位/バイアル) を生理食塩液5ml に溶解し力価2000U/ml としたものをを使用した。また、コントロールとしては生理食塩液を使用した。なお、点眼の種類により、a) コントロール群、

b) IL-2点眼群、c) DMS 点眼群、d) DMS・IL-2点眼群の4群にわたった。以上の4群のそれぞれについて第1病日から第10病日まで0.005ml の各点眼液を昼間3時間ごとに1日4回の点眼をおこなった。

なお、予備実験で1回/日、2回/日の IL-2点眼2群についても検討したが、コントロール群との間に角膜病変に有意差を認めなかったため4回/日を用いた。また、前報¹⁵⁾で、0.05%以上の濃度 DMS を4回/日の点眼をすると、頸部リンパ節における CTL 活性を抑制することがわかったため、0.05% DMS 濃度を今回の実験に用いた。

5. 角膜の観察

角膜病変は、HSV 接種後10日まで毎日角膜をフルオレセインで染色した後、手術顕微鏡下で観察を行ない、下記に示すように5段階に分けて評価した。なお、マウス角膜の厚さは薄く実質病変の観察が困難であったので、判定には上皮病変だけをとりあげた。

スコア0：フルオレセインによってまったく染まらないもの。

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. CTL 誘導

HSV 特異的 CTL の誘導は、既報⁴⁾に従い、stimulator 細胞としては、非感染マウスの脾単核細胞を lipopolysaccharide で3日間幼弱化させた後、Percoll 不連続密度勾配液を用いて幼弱化細胞を分離し、さらに HSV を2時間感染させ、つぎに1,500rad のコバルト照射を行ない細胞数を 4×10^5 /ml に調整したものをを用いた。また、HSV 接種後4, 7, 10日時に各種点眼群のマウスからそれぞれ頸部リンパ節を採取し、単核細胞を分離した後、細胞数を 2×10^6 /ml に調整したものを responder 細胞とした。

次に、stimulator 細胞と responder 細胞を6 well culture plate に5ml ずつ分注し、37°C で4日間培養して CTL を誘導した。培養終了後、trypan blue 法で生存細胞数を数えた後、標的細胞数に応じた必要な細胞数に調整したものを effector 細胞とした。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。

7. 細胞障害試験

細胞障害試験には、標的細胞として³H-proline で標識し、HSV を感染させた L929細胞を使用した。

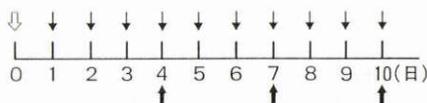
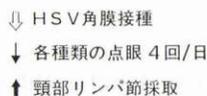


図1 HSV 接種、各種点眼投与および頸部リンパ節抽出の時期

Effector 細胞と標的細胞を4時間混合培養した後、上清に放出された³H放射能活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。なお effector 細胞数と標的細胞数の比は40:1とした。

細胞障害率は percent lysis で示し、次式から求めた。

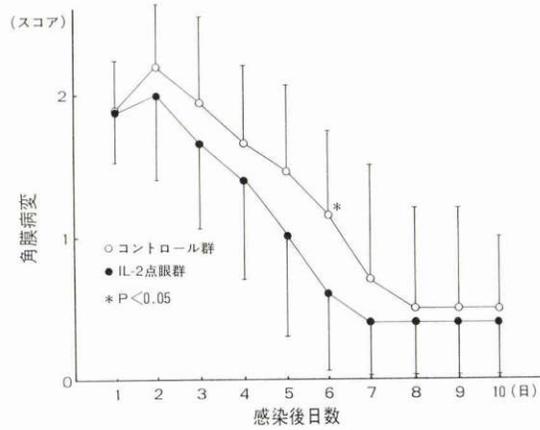
Percent lysis = (A - C) / (B / 2 - C)

A: 標的細胞と effector 細胞を混合培養した培養液の100μ中に含まれる³H放射能活性。

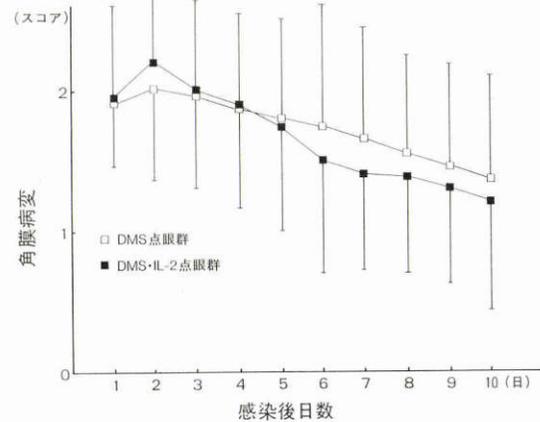
B: 5 × 10³個の標的細胞に標識された³H放射能活性。

C: 標的細胞のみ培養した培養液の上清100μl中に含まれる³H放射能活性。

なお、各種点眼群についてそれぞれ、角膜病変の観



a) IL-2点眼群とコントロール群の比較



b) DMS・IL-2点眼群とDMS点眼群の比較

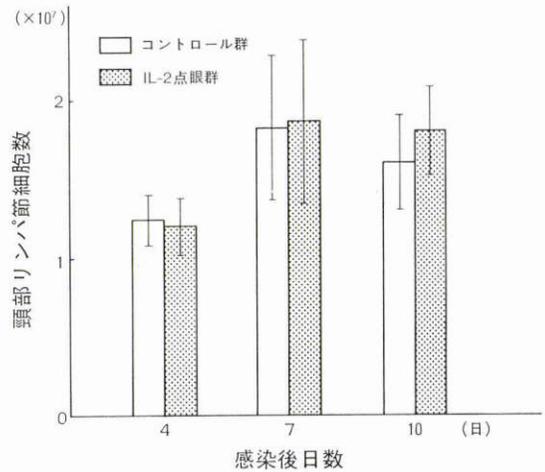
図2 角膜病変の経時的変化

察は10匹20眼について行ない、CTL誘導および細胞障害試験は6回の実験を行ない、それぞれの平均値を比較検討した。

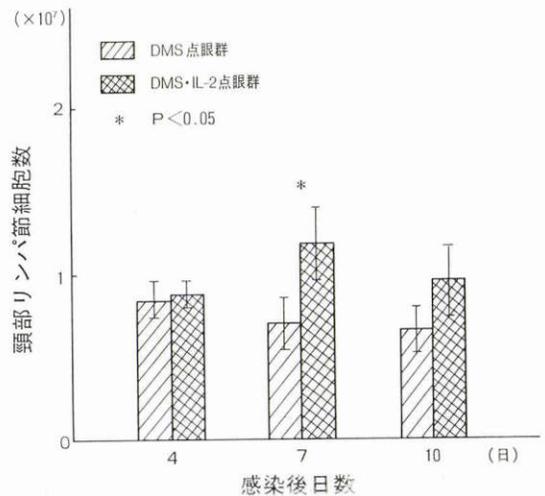
III 結果

1. 角膜所見 (図2)

図2は、角膜病変の経時的変化を示している。図2aは、コントロール群とIL-2点眼群の、図2bは、DMS点眼群とDMS・IL-2点眼群の結果を表わしている。各群ともに第1病日には、ほとんどのマウスにおいて樹枝状潰瘍がみられた。IL-2点眼群では、コントロール群



a) IL-2点眼群とコントロール群の比較



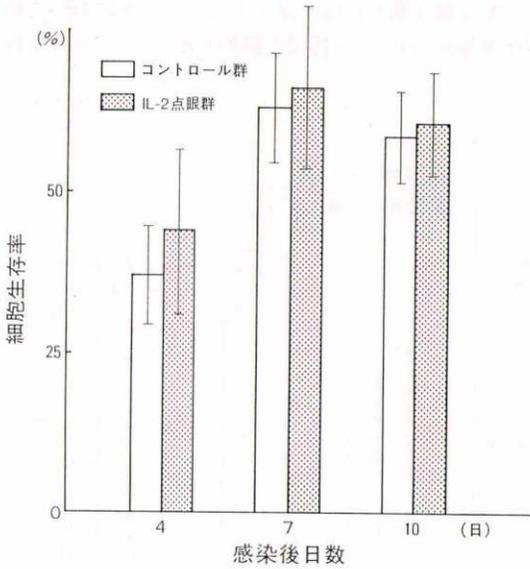
b) DMS・IL-2点眼群とDMS点眼群の比較

図3 頸部リンパ節細胞数

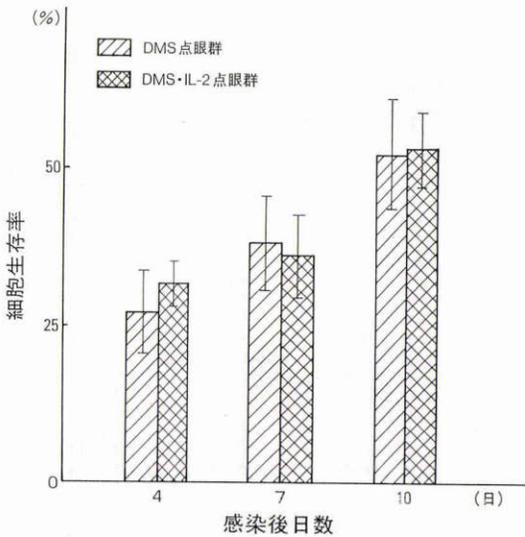
に比べて第1病日を除いて角膜病変は軽度であり、第6病日では統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認め、早期治癒の傾向がみられた。DMS・IL-2点眼群では、DMS点眼群に比べて角膜病変の経過に有意差はなく、両群ともにコントロール群、IL-2点眼群に比べて角膜病変の治癒の遷延化を認めた。

2. 単核細胞数 (図3)

図3は、マウスから採取された頸部リンパ節細胞数



a) IL-2点眼群とコントロール群の比較



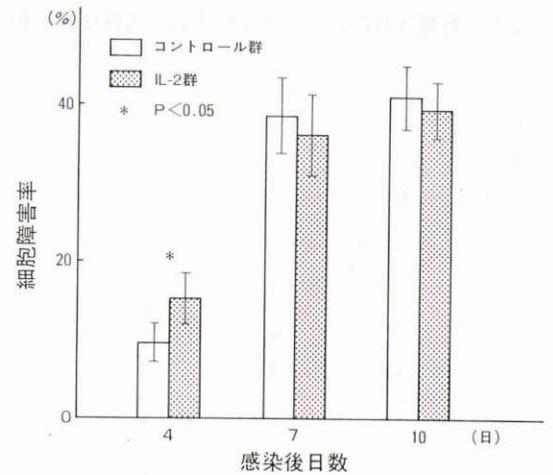
b) DMS・IL-2点眼群とDMS点眼群の比較

図4 CTL誘導後の細胞生存率

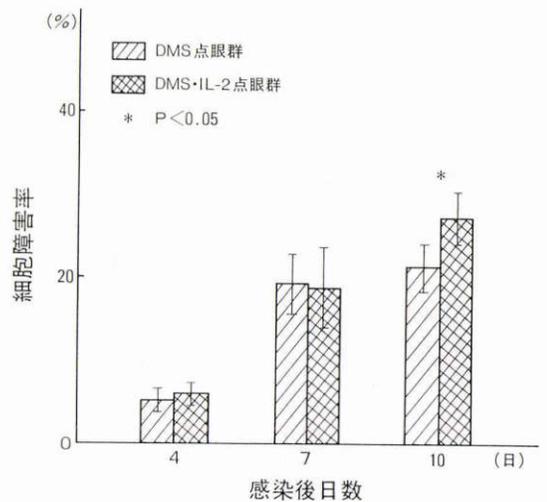
を示している。図3aは、コントロール群とIL-2点眼群の、図3bは、DMS点眼群とDMS・IL-2点眼群の結果を表わしている。コントロール群とIL-2点眼群の間には全経過を通して有意の差を認めなかった。DMS・IL-2点眼群はDMS点眼群に比べて第7病日と第10病日において細胞数が増加しており、第7病日には有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

3. CTL誘導後の細胞生存率 (図4)

図4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。図4aは、コントロール群とIL-2点眼群の、図4bは、DMS点眼群とDMS・IL-2点眼群の結果



a) IL-2点眼群とコントロール群の比較



b) DMS・IL-2点眼群とDMS点眼群の比較

図5 CTL活性

を示している。IL-2点眼群とコントロール群との間および、DMS・IL-2点眼群とDMS点眼群の間には全経過を通して細胞生存率には有意の差を認めなかった。

4. CTL 活性 (図5)

図5は、HSV 特異的 CTL 活性を示している。図5aは、コントロール群とIL-2点眼群の、図5bは、DMS点眼群とDMS・IL-2点眼群の結果を表わしている。IL-2点眼群では、コントロール群と比べて第7病日と第10病日には差を認めなかったが、CTL 活性が出現し始める第4病日には有意 ($p < 0.05$) の CTL 活性の上昇を認めた。DMS・IL-2点眼群では、DMS点眼群と比べて第4病日と第7病日には CTL 活性には差を認めなかったが、第10病日には有意 ($p < 0.05$) の CTL 活性の上昇を認めた。

IV 考 案

IL-2は、主としてヘルパーT細胞が特異抗原あるいはマイトジェンの刺激により産生するリンホカインであり、*in vitro*での生物学的活性としてT細胞の分化増殖⁵⁾、CTLの機能発現⁵⁾、NK細胞(natural killer)の活性化⁶⁾、T細胞からのIFN- γ 誘導⁷⁾などに関与することが知られている。また、最近ではB細胞の増殖⁸⁾、分化⁹⁾を誘導することが明かにされている。IL-2の*in vivo*投与においてもウイルス¹⁰⁻¹²⁾、細菌感染防御に対する効果¹³⁾や免疫細胞の併用投与による抗腫瘍効果¹⁴⁾が報告されている。実験的角膜ヘルペスに対するIL-2点眼の効果を検討した報告は当教室の平川¹⁰⁾の報告がある。平川は今回の実験とほぼ同様な方法で角膜病変と脾臓におけるCTL活性を検討しているが、その結果はIL-2点眼により角膜病変の早期治癒を認めたが、脾臓におけるCTL活性はコントロール群と比較して有意差がなかったと報告している。しかしながら、すでに報告⁹⁾したように、実験的角膜ヘルペスにおいては感染の主场である眼部に近い局所リンパ節すなわち頸部リンパ節の方が脾臓に比べて早期にCTL活性が出現しており、眼部における免疫反応をより強く反映していることがわかったので、今回、マウス角膜のHSV初感染に及ぼすIL-2点眼の効果を検討する目的で、頸部リンパ節細胞数と頸部リンパ節におけるCTL活性および角膜病変について経時的变化を調べた。さらに、DMS点眼をおこなった局所免疫抑制状態とDMS点眼をおこなっていない正常免疫状態の2種の状態においてIL-2点眼の効果を検討した。

DMS点眼を行っていない正常免疫状態では、IL-2点眼群ではコントロール群に比べて頸部リンパ節細胞数の増加は認められなかったが、角膜病変の早期軽減化を認めた。CTL活性については、CTL活性の最大値を示す感染7、10日時には有意差を認めなかったが、CTL活性が出現し始める感染4日時においては有意の上昇を示し、CTL活性の早期上昇を認めた。これらのことは、角膜病変の早期軽減に、IL-2によって活性化されたCTLがある一定の役割を果たしていることを示唆している。しかし、その他に角膜病変の早期軽減に関わっている因子は、いくつかあるものと思われる。Weinbergら¹²⁾はHSV type 2 (HSV-2)を用いたモルモットの性器ヘルペスの初感染モデルにIL-2の皮下投与を行ない、臨床症状の軽減化と脾細胞中のNK細胞活性の上昇および血中のIFN- γ の上昇を認めたと報告し、感染早期におけるNK細胞とIFN- γ の重要性を指摘している。一方、マウス角膜ヘルペス初感染においてもマクロファージとともに早期の非特異的感染防御の一端を担っているNK細胞活性が感染3日時に脾細胞に上昇することが示されている¹⁷⁾。これらの報告から、IL-2点眼により眼局所におけるNK細胞活性やIFN- γ の上昇がもたらされ、その結果、早期にウイルスが排除されて角膜病変の軽減化が導かれた可能性も考慮しておく必要がある。さらに、IFN- γ はCTL活性を増強させることが知られており¹¹⁾、IL-2点眼によって引き起こされ上昇した内因性のIFN- γ が、点眼によってもたらされたIL-2とともに、CTLの早期出現を誘導した可能性がある。また、感染7、10日時におけるCTL活性がコントロール群のそれに比べて有意差が認められなかった理由として、次のように考えられる。すなわち、感染早期における内因性のIL-2産生が少ない時期には外因性のIL-2を加えることによりCTL活性の早期出現が得られるが、感染7、10日時においてはすでに内因性のIL-2が十分に産生されていたためにCTL活性には差を認めなかったのかも知れない。

DMS点眼を行なって局所免疫抑制状態をもたらしたマウスでは、全経過を通じて角膜病変の程度にはDMS・IL-2点眼群とDMS点眼群の間には有意差を認めなかったが、DMS・IL-2点眼群の方が感染7日時において頸部リンパ節細胞数が有意に増加し、また、感染10日時においてCTL活性が有意に上昇した。この点は、DMSを点眼しない正常な免疫状態では感染4日時にIL-2点眼群と非点眼群との間にCTL活性に有

意の差が認められており、DMS点眼をしたマウスではより遅くCTLが上昇したことになる。しかし、現在のところ、この両者の時期の差がなぜ生じるのかは不明である。DMS・IL-2点眼群とDMS点眼群との間に角膜病変に差を認めなかった理由として、ステロイド剤がその薬理学的作用によって角膜に影響を与えていた可能性も考えておく必要がある。たとえば、家兎を用いた正常角膜に対するステロイド点眼においても散在性に表層細胞の壊死が¹⁸⁾、さらに、ステロイドはコラーゲン繊維やムコ多糖類代謝にも影響を与えることが¹⁹⁾²⁰⁾知られている。しかしながら、ステロイド剤による免疫系に対する作用も大きな役割を果たしているものと推察される。すなわち、今回使用したIL-2の点眼濃度と点眼回数では、ステロイド剤による限局所における免疫系への抑制を解除できなかった可能性がある。末広³⁾は、*in vitro*でのHSV特異的CTL誘導系においては、各種濃度のDMSによってCTL活性が抑制されるが、 10^{-8} M濃度のDMSでは培養液中に50 U/mlのIL-2を添加することにより、その抑制が完全に解除されるのに対して、 10^{-7} M、 10^{-6} MとDMSの濃度を上げていくとCTL活性は対照のレベルまでには達しなかったと報告している。今回使用した0.05% DMS点眼液はモル濃度に換算すると約 1.2×10^{-3} Mに相当することや、今回の実験が*in vivo*であることを考慮すると、ステロイドによる免疫系の抑制うち、少なくともCTLへの抑制をIL-2の添加(2000U/ml)によって解除されなかったことは十分に予想される。

最後に、IL-2の投与方法については、マウスに静注投与したときの半減期は3~4分にすぎず、腹腔あるいは皮下に投与した場合でも、4~6時間で血中からほとんど消失することが知られており²¹⁾、IL-2は投与した局所でしか作用しないと推測されるために、局所に頻回に投与するほうが効果的と思われる。

稿を終るにあたり、ご校閲下さい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。

本論文の要旨は第92回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) 平川裕二：単純ヘルペス角膜炎の免疫学的研究—マウス cytotoxic T lymphocyte に対するインターロイキン2の効果について—。あたらしい眼科 2: 703—708, 1985.
- 2) 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.
- 3) 末広龍憲：単純ヘルペス角膜炎の免疫薬理学的研究—インターロイキン2のステロイド存在下における cytotoxic T lymphocyte の誘導に対する増強効果について—。日眼 91: 747—755, 1987.
- 4) 梶原 良：実験的角膜ヘルペスの疫学的研究—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—。日眼 91: 1296—1301, 1987.
- 5) Gillis S, Mochizuki DY, Conlon PJ, et al: Molecular characterization of interleukin 2. Immunol Rev 63: 168—209, 1982.
- 6) Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, et al: Interleukin-2 augments natural killer cell activity. Nature 219: 335—338, 1981.
- 7) Farrar WL, Johnson HM, Farrar JJ: Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. J Immunol 126: 1120—1125, 1981.
- 8) Jung LK, Hara T, Fu SM: Detection and functional studies of p60—p65 (Tac antigen) on activated human B cells. J Exp Med 160: 1597—1602, 1984.
- 9) Ralph P, Jeong G, Welte K, et al: Stimulation of immunoglobulin secretion in human B lymphocytes as a direct effect of high concentration of IL-2. J Immunol 133: 2442—2445, 1984.
- 10) 平川裕二：単純ヘルペス角膜炎の免疫学的研究—実験的マウス角膜ヘルペスに対するインターロイキン2の効果について—。広島大学医学雑誌 33: 947—951, 1985.
- 11) 熊谷勝男：IL-2とインタフェロンによるキラー細胞の増強。医学のあゆみ 126: 401—408, 1983.
- 12) Weinberg A, Rasmussen L, Merigan TC: Acute genital infection in guinea pigs: Effect of recombinant interleukin-2 on herpes simplex virus type 1. J Infect Dis 154: 134—140, 1986.
- 13) Weyand C, Goronzy J, Fathman CG, et al: Administration *in vivo* of recombinant interleukin 2 protects mice against septic death. J Clin Invest 79: 1756—1763, 1987.
- 14) 石川 隆, 井廻道夫, 大西 真他：IL-2による癌の免疫療法—LAK細胞注入療法—。Medical Immunology 12: 767—773, 1986.
- 15) 梶原 良：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における cytotoxic T lymphocyte に及ぼすステロイド点眼の効果について—。日眼 92: 676—681, 1988.
- 16) Weinberg A, Basham TY, Merigan TC: Regulation of guinea-pig immune functions by interleukin 2: Critical role of natural killer activity

- in acute HSV-2 genital infectin. *J Immunol* 137: 3310—3317, 1986.
- 17) 近藤英明：実験的単純ヘルペス性角膜炎の免疫学的研究。第3報。マウス脾 Natural Killer Cell 活性について。日眼 88: 759—763, 1984.
- 18) 高島玲子, 榎山達夫, 三井幸彦：Steroidと抗生物質点眼の家兎角膜に及ぼす影響—走査型電子顕微鏡による研究—。日眼 79: 639—651, 1975.
- 19) **Uitto J, Mustakallio KK**: Effect of hydrocortisone acetate, fluocinolone acetonide, fluclo-
olone acetonide, betamethasone-17-valerate and fluprednyliden-21-acetate on collagen biosynthesis. *Biochem Pharmacol* 20: 2495—2503, 1977.
- 20) **Anseth A**: Glycosaminoglycans in corneal regeneration. *Exp Eye Res* 1: 122—129, 1961.
- 21) **Donohue JH, Rosenberg SA**: The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *J Immunol* 130: 2203—2208, 1983.
- (第92回日眼総会原著)
-