

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—(図5)

梶 原 良 (広島大学医学部眼科学教室)

Immunological Studies on Corneal Herpes Infection
—The Effect of Dexamethasone Eyedrops on The Cytotoxic
T Lymphocyte Activity in The 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、種々の濃度のデキサメサゾン点眼を行ない、角膜病変および頸部リンパ節の CTL に及ぼす効果について検討した。角膜病変は、ステロイド濃度に応じた治癒の遷延化を示した。頸部リンパ節における細胞数、CTL 誘導後の生存細胞数、それに CTL 活性は、0.05%以上の濃度のデキサメサゾン点眼により、コントロール群に比べて有意に低下していた。以上の結果からステロイド点眼は、眼局所だけでなく局所リンパ節の CTL を含めた免疫防御反応をも抑制することが示唆された。(日眼 92:676—681, 1988)

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

Abstract

The present investigation was undertaken to evaluate the influence of topical ocular application of dexamethasone in four different concentrations on cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity in the cervical lymph nodes in experimental murine herpetic keratitis, and to estimate the degree of keratitis. There was a correlation between the concentration of dexamethasone used and the duration required for healing of keratitis. In the group receiving topical application of dexamethasone solution in 0.05% or 0.1% concentration, the number of cervical lymph node cells, the percent of viable cells after in vitro CTL induction, and CTL activity were significantly lower than those in the control group which had no dexamethasone application. These results suggest that dexamethasone eyedrops suppress immunological reactions, including CTL, not only in ocular sites but also in the cervical lymph nodes. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 92: 676—681, 1988)

Key words: Herpes simplex keratitis, Cell-mediated immunity, Cytotoxic T lymphocyte, Cervical lymph nodes, 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62年11月24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 November 24, 1987)

I 緒 言

さきに教室の末広¹⁾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) の活性が、*in vitro*においてステロイドにより抑制されることを示した。今回、マウスの実験的角膜ヘルペスにステロイド剤の点眼を行なった時、局所リンパ節のCTL活性がどのような影響を受けるか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

生理食塩液で10倍に稀釈したベントバルビタール (ネプターール[®]) 0.15ml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. デキサメサゾン点眼

ステロイドは0.1%デキサメサゾン点眼液(デカドロン[®])を生理食塩液で各種必要濃度に希釈したものをを使用した。HSV角膜接種後マウスを4つの実験群に分けて、第1病日から第7病日まで昼間3時間ごとに1日4回、それぞれの群に0.1%、0.05%、0.01%、0.001%の各濃度のデキサメサゾン点眼を1回約0.005mlずつ行なった。なお、コントロールとして生理食塩液を点眼したものをを使用した。

5. 角膜の観察

角膜病変は、HSV接種後7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、マウス角膜は小さく実質病変の観察は困難であったので、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、前報²⁾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、つぎにコバルト照射を行ない細胞数を 4×10^6 /mlに調整したものをを用いた。また、HSV接種後7日時に種々の濃度のデキサメサゾン点眼を行なったマウスから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。なお、実験に必要なresponder細胞数(1×10^7)は、0.001%と0.01%のデキサメサゾン点眼群では1匹のマウスから得ることができたが、0.05%と0.01%のデキサメサゾン点眼群では少数の細胞数しか採取できなかったために、それぞれ2~3匹、4~5匹のマウスから得られた細胞を合わせて使用した。次に、stimulator細胞とresponder細胞を6well culture plateに5mlずつ分注し、37℃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。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。

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

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

なお、ステロイド剤の各濃度の点眼において、角膜病変の観察は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。

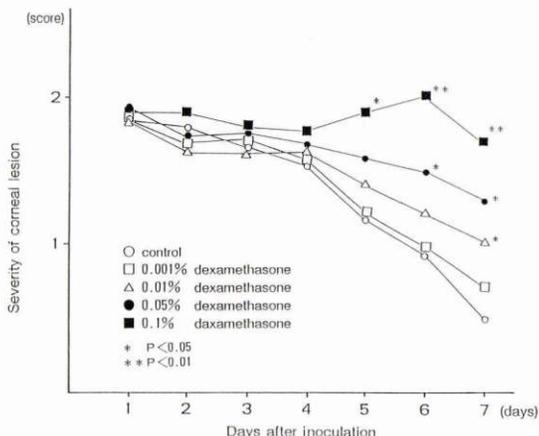


図1 角膜病変の経時的変化

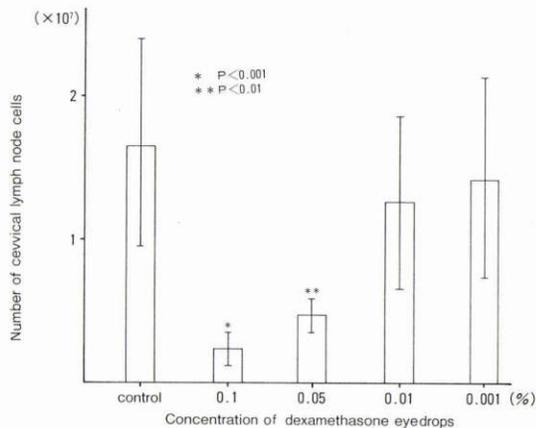


図2 頸部リンパ節の単核細胞数

III. 結果

1. 角膜所見 (図1)

図1は、角膜病変の経時的変化を示している。コントロール群を含め各群ともに第1病日には、ほとんどのマウスに樹枝状潰瘍を認め、第4病日まで病変は持続したが、第5病日からコントロール群では治癒傾向を示した。一方、デキサメサゾン点眼群では0.1%のものが第5病日から、0.05%のものが第6病日から治癒の遷延化を認め、第7病日には0.01%デキサメサゾン点眼群においてもコントロール群に比べて有意差 ($p < 0.05$)を認めた。0.001%デキサメサゾン点眼群では遷延化を認めなかった。

2. 単核細胞数 (図2)

図2は、第7病日に採取された頸部リンパ節の単核細胞数 ($\times 10^7$)を示している。コントロール群では 1.64 ± 0.68 であったが、デキサメサゾン点眼群ではそれぞれ0.1%は 0.24 ± 0.12 、0.05%は 0.48 ± 0.12 、0.01%は 1.26 ± 0.62 、0.001%は 1.42 ± 0.74 であった。これらの結果は、デキサメサゾン濃度に比例して細胞数が減少する傾向を示しており、0.05%以上の濃度ではコントロール群に比べて有意 (0.1%は $p < 0.001$ 、0.05%は $p < 0.01$)に減少していた。

3. CTL 誘導後の細胞生存率 (図3)

図3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。コントロール群では 56.3 ± 15.0 であったが、デキサメサゾン点眼群ではそれぞれ0.1%は 25.0 ± 8.9 、0.05%は 30.0 ± 6.0 、0.01%は 45.0 ± 7.6 、0.001%は 49.2 ± 9.8 であった。これらの結果も、頸部

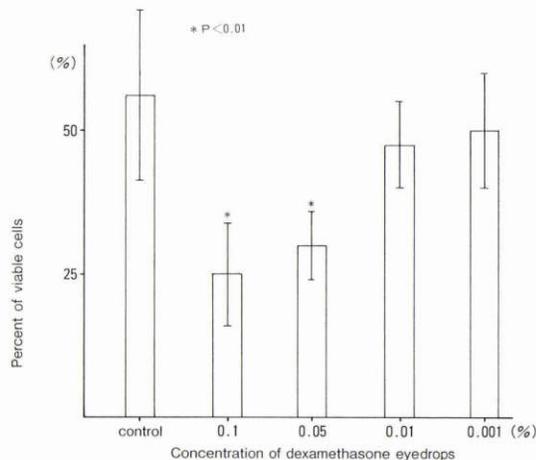


図3 CTL 誘導後の細胞生存率

リンパ節の単核細胞数と同様に、デキサメサゾン濃度に比例して細胞生存率が減少する傾向を示しており、0.05%以上の濃度ではコントロール群に比べて細胞生存率が有意 ($p < 0.01$)に減少していた。

4. CTL 活性 (図4)

図4は、CTL 活性 (%)を示している。コントロール群では 38.1 ± 6.3 であったが、デキサメサゾン点眼群ではそれぞれ0.1%は 13.1 ± 6.3 、0.05%は 18.8 ± 5.9 、0.01%は 45.4 ± 15.9 、0.001%は 40.4 ± 7.5 であった。有意差検定をすると、0.05%以上の濃度では、CTL 活性はコントロール群に比べて有意 ($p < 0.01$)に低下していたが、0.01%以下の濃度では、コントロール群との間に有意差を認めなかった。

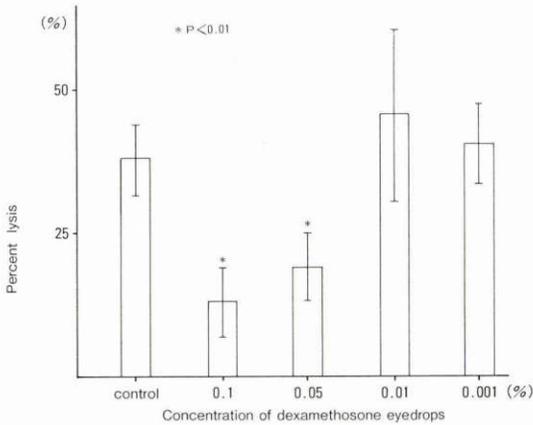


図4 CTL活性

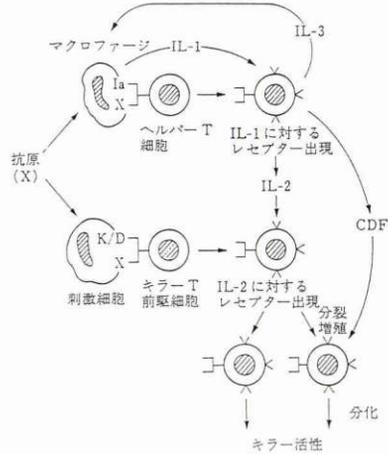


図5 マウスにおけるCTL誘導機構(文献7から引用)

IV 考 按

免疫系への作用の発現に要するステロイド剤の濃度については、全身投与の場合、ヒトにおいて $10^{-8}M$ 前後の血中濃度でマクロファージやT細胞の体内再分布が起り、また、細胞性免疫と液性免疫の抑制が認められることがこれまでに知られている³⁾⁴⁾。一方、in vitro においては、 $10^{-7} \sim 10^{-9}M$ の濃度でマクロファージ、T細胞、あるいはB細胞の種々の機能を抑制することが示されている⁵⁾。T細胞のうちCTLに関しては、教室の末広¹⁾が、マウス角膜にHSVを接種し、感染10日時の脾細胞を用いて検討している。すなわち、今回と同様の実験手技を用いて in vitro におけるHSV特異的CTL誘導系において、CTLの培養開始時に各種濃度のデキサメサゾンを追加したところ、CTL活性は $10^{-8}M$ 濃度から有意に抑制が認められ、 $10^{-6}M$ では著明に抑制されたと報告している。

ステロイド剤の点眼における眼組織移行濃度については、Yamauchiら⁶⁾は、家兎に0.1%のデキサメサゾンを一回点眼した場合、球結膜、角膜ともに点眼5分後に、それぞれモル濃度に換算して約 $2 \times 10^{-5}M$ 、 $1 \times 10^{-6}M$ の最高濃度に達し、点眼3時間後においても、それぞれ約 $1 \times 10^{-6}M$ 、 $2 \times 10^{-6}M$ の濃度を維持していたと報告している。Yamauchiらの正常家兎のデータを、そのまま今回の実験のマウス角膜にあてはめることはできない。しかし、今回のマウス角膜は、乱切をおこなった上、HSVを感染させているので、種が違うとはいえ、Yamauchiらの報告した正常角膜の濃度よりも高くなっている可能性がある。

今回の実験結果では、角膜病変は0.01%以上の濃度のステロイド剤点眼によりコントロール群に比較して治癒の遷延化を有意に認めたが、0.001%では全期間を通じて有意差を認めなかった。一方、頸部リンパ節の単核細胞数、CTL誘導後の細胞生存率、それにCTL活性は0.05%以上の濃度でコントロール群に比較して有意に減少あるいは抑制されていたが、0.01%以下では有意差は認められず、角膜病変に直接さらされる角膜・結膜と、点眼後、一度体内に吸収されたステロイド剤にリンパ行性あるいは血行性にさらされる頸部リンパ節という解剖学的な違いに求められるかもしれない。いずれにせよ、頸部リンパ節でCTL活性を抑制した0.05%以上のステロイド剤は、眼局所で働いているCTLによる感染防御応答をより強く抑制していることが十分に想像される。なお、今回は、角膜治癒の遷延化の原因としてCTLだけをとりあげて検討しているが、ステロイドは、その他の免疫担当細胞を抑制しウイルス増殖をひきおこしている可能性もあり、また、コラーゲン繊維やムコ多糖類の代謝にも影響を与えることがわかっているので⁷⁾⁸⁾、これらの点についても角膜治癒の遷延化の原因として考慮しておく必要がある。

マウスにおけるCTL誘導機構は、山下⁹⁾の説明を引用すると図5に示すようになる。すなわち抗原(ここではHSV抗原)を取り込んだIa抗原陽性のマクロファージ(角膜輪部・結膜上皮ではランゲルハンス細胞)は、Lyt-1⁺のヘルパーT細胞に抗原を提示し、ヘルパーT細胞は抗原+Ia抗原の形で抗原を認識し、その

結果としてインターロイキン1 (IL-1)に対するレセプターを出現させる。このような状態のヘルパーT細胞にマクロファージ由来のIL-1が作用すると、ヘルパーT細胞の活性化が起こりインターロイキン2 (IL-2)を産生するようになる。一方、Lyt-2⁺のCTL前駆細胞(CTL-P)は、刺激細胞(ここではHSV感染細胞)からH-2K/Dの産物+抗原の形で抗原情報を受取り、IL-2に対するレセプターを出現させる。このような状態のCTL-Pは、ヘルパーT細胞由来のIL-2の作用を受けて活性化され、増殖・分化して成熟した細胞障害性をもつCTLとなる。また、CTLの誘導にはIL-1、IL-2以外に他の誘導因子(図5の中ではCDF)が必要と考えられており¹⁰⁾、さらに、 γ -インターフェロンがIL-2とともに相加的に働くと考えられている¹¹⁾¹²⁾。

ここで、ステロイドがCTL活性を抑制する機序としては、主に以下の2つが考えられる。

- 1) ステロイドがIL-2産生を抑制する。
- 2) ステロイドが直接CTLを抑制する。

1)については、末広は、マウス角膜にHSVを接種し、感染10日時の脾細胞を用いて、*in vitro*で今回と同様のHSV特異的CTL誘導系の培養開始時にデキサメサゾンを追加し、培養4日時の培養液に含まれるIL-2産生量とCTL活性を比較している。その結果、デキサメサゾン濃度に相関してIL-2産生量とCTL活性が抑制され¹³⁾、また、IL-2を添加することによりCTL活性の抑制が改善された¹⁴⁾と報告している。また、Gillisら¹⁵⁾も、マウスあるいはヒトでのallogeneic mixed lymphocyte culturesにおいて末広と同様な結果を得ている。マクロファージ系に対するステロイドの効果としては、Snyderら¹⁶⁾は、マウス腹腔内マクロファージのIa抗原の出現を抑制することにより抗原提示能が低下し、また、IL-1の産生を抑制することを報告している。また、田川ら¹⁷⁾は、正常マウスに0.1%ベタメサゾンを一週5回4日間点眼することにより角膜輪部・結膜上皮のIa陽性ランゲルハンス細胞がほぼ消失し、また、0.01%濃度でも正常の約20%まで減少したと報告している。ヘルパーT細胞に対するステロイドの効果としては、Palaciosら¹⁸⁾は、ヒトでのautologous mixed lymphocyte reactionにおいてIL-1に対する反応を抑制すると報告している。以上の報告を統合すると、ステロイドはマクロファージに対してはIa抗原の出現の抑制による抗原提示能の低下とIL-1産生を抑制し、またヘルパーT細胞に対してはIL-1に対する反応性を抑制することにより、CTLを

誘導するのに必要な補助細胞の種々の段階に作用して最終的にIL-2の産生を抑制していることが推察できる。2)については、ステロイドは成熟した細胞障害性をもつCTLに対してはほとんど抑制を示さない¹¹⁾¹⁵⁾とされているが、CTL-Pを抑制する可能性は残っており、今後の検討が必要である。

ステロイド点眼は臨床的に種々の疾患に使用され、角膜ヘルペスの実質型に対しても繁用されるが、今回の実験結果から、その影響は眼局所だけでなく、局所リンパ節である頸部リンパ節における免疫防御反応をも抑制する可能性があることをその使用にあたっては理解しておく必要がある。

稿を終えるにあたり、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。

本論文要旨は、第24回日本眼感染症学会で発表した。

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) 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と脾臓における cytotoxic T lymphocyte 活性について—。日眼 91: 1296—1301, 1987.
- 3) Hahn BH, MacDermott RP, Jacobs SB, et al: Immunosuppressive effects of low doses of glucocorticoids: Effects on autologous and allogeneic mixed leukocyte reactions. J Immunol 124: 2812—2817, 1980.
- 4) Fauci AS, Dale DC, Balow JE: Glucocorticoid therapy: Mechanisms of action and clinical considerations. Ann Intern Med 84: 304—315, 1976.
- 5) 市川陽一：副腎皮質ステロイドの免疫抑制作用。免疫薬理 2: 487—492, 1984.
- 6) Yamauchi H, Kito H, Uda K: Studies on intraocular penetration and metabolism of fluorometholone in rabbits: A comparison between dexamethasone and prednisolone acetate. Jap J Ophthalmol 19: 339—346, 1975.
- 7) Uitto J, Mustakallio KK: Effect of hydrocortisone acetate, fluocinolone acetonide, flucinolone acetonide, betamethasone-17-valerate and fluprednylidene-21-acetate on collagen biosynthesis. Biochem Pharmacol 20: 2495—2503, 1977.
- 8) Anseth A: Glycosaminoglycans in corneal regeneration. Exp Eye Res 1: 122—129, 1961.

- 9) 山下優毅: キラーT細胞活性発現の調節. 新免疫学叢書10, キラーT細胞, 畔柳武雄, 大高裕一, 松橋直編, 医学書院, 東京, 1983, 57-79.
 - 10) **Raulet DH, Behan MJ**: A differentiation factor required for the expression of cytotoxic T-cell function. *Nature* 296: 754-757, 1982.
 - 11) **Farrar WL, Benjamin WR**: The biochemistry, biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cells and antibody-forming B cell responses. *Immunol Rev* 63: 129-166, 1982.
 - 12) 熊谷勝男: IL-2とインター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.
 - 13) 末広龍憲: 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 活性におよぼす影響—. *日眼* 91: 636-642, 1987.
 - 14) 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マウス cytotoxic T lymphocyte の誘導に対する増強効果について—. *日眼* 91: 747-755, 1987.
 - 15) **Gillis S, Crabtree GR, Smith KA**: Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. II. The effect on the in vitro generation of cytolytic T cells. *J Immunol* 123: 1632-1638, 1979.
 - 16) **Snyder DS, Unanue ER**: Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production. *J Immunol* 129: 1803-1805, 1982.
 - 17) 田川義継, 竹内 勉, 斉藤 学他: 角膜結膜ランゲルハンス細胞の Ia 抗原に対するステロイド剤の影響. *日眼* 87: 927-934, 1983.
 - 18) **Palacios R, Sugawara I**: Hydrocortisone abrogates proliferation of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction by rendering the interleukin-2 producer T cells unresponsive to interleukin-1 and unable to synthesize the T-cell growth factor. *Scand J Immunol* 15: 25-31, 1982.
-