

## 単純ヘルペス角膜炎の免疫学的研究

—感染マウスリンパ球サブセット移入の及ぼす影響について—

山代 浩人

広島大学医学部眼科学教室

### 要 約

HSV 角膜感染 6, 12日時に採取したマウス脾細胞に, *in vitro* で抗原刺激を行って得られた細胞群(抗体非処理群)と, その細胞群を抗 L3T4抗体あるいは抗 Lyt-2抗体で処理して各サブセットに分けた細胞群(抗 L3T4抗体処理群あるいは抗 Lyt-2抗体処理群)を, それぞれ HSV 角膜感染マウスの結膜下に移入して, おおのこの角膜炎に対する影響について検討した. HSV 角膜感染12日時に採取したリンパ球を移入した場合, 抗体非処理群と抗 L3T4抗体処理群の移入が角膜潰瘍の縮小に有効であったが, 抗 Lyt-2抗体処理群の移入では効果が認められなかった. HSV 角膜感染 6日時に採取したリンパ球を移入した場合は, どの群にも移入効果は認められなかった. HSV 角膜感染12日時には, 感染からの回復に CTL が有効に働いているものと思われる. (日眼会誌 94: 462—468, 1990)

キーワード: 単純ヘルペス角膜炎, モノクローナル抗体, 細胞移入, HSV 特異的 CTL

## Effects of T Cell Subsets on Mouse Herpetic Keratitis

Hiroto Yamashiro

*Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine*

### Abstract

Immune splenocytes were obtained from C3H/He mice, which had been inoculated with herpes simplex virus (HSV) type 1 by the corneal route 6 or 12 days previously, and restimulated by lipopolysaccharide-induced lymphoblasts infected with HSV. These cells were either not treated or treated with anti-L3T4 antibody plus complement/anti-Lyt-2 antibody plus complement, and were transferred to subconjunctiva of mice with HSV corneal infection. Adoptive transfer of non-treated cells diminished corneal ulcers, when the splenocytes were transferred from mice inoculated 12 days previously. This effect was reduced by depletion of Lyt-2 bearing cells, but not reduced by depletion of L3T4 bearing cells. Adoptive transfer of splenocytes from mice inoculated 6 days previously did not diminish corneal ulcers. These findings demonstrate that HSV specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) play an important role in the late phase of recovery from HSV corneal infection. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 94: 462—468, 1990)

**Key words:** Herpes simplex keratitis, Monoclonal antibody, Adoptive transfer, HSV specific cytotoxic T lymphocyte

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 山代 浩人

(平成元年 8 月 8 日受付, 平成元年 10 月 16 日改訂受理)

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

(Received August 8, 1989 and accepted in revised form October 16, 1989)

## I 緒 言

単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染からの回復に、細胞性免疫が重要な役割を果たしていることはよく知られている<sup>1)</sup>。しかし T リンパ球のうち、いかなるサブセットがより有効に働いているかについては一致した見解は得られていない。筆者は既報<sup>2)</sup>で、HSV 特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) を主体とする細胞群の移入により、HSV 感染によって生じた角膜潰瘍が速やかに縮小することを報告した。続いて前報<sup>3)</sup>では、マウスリンパ球の表面抗原に対する各種モノクローナル抗体でそれらの細胞群を処理した後、その CTL 活性を求め、CTL が Lyt-1<sup>+</sup>2<sup>+</sup>で表わされることを述べた。

今回は前報<sup>3)</sup>と同様に、HSV 角膜感染12日時のマウスから得られたリンパ球を *in vitro* で抗原刺激を行った後、モノクローナル抗体で処理して、CTL ならびにサブプレッサー T 細胞系サブセットと、遅延型過敏細胞 (T<sub>DH</sub>) ならびにヘルパー T 細胞系サブセットとに分け、それらを HSV 角膜感染マウスの結膜下に移入して、おのおのの角膜潰瘍に対する影響について検討したので報告する。

## II 実験方法

### 1. ウイルスとウイルス接種方法

ウイルスは、角膜ヘルペス患者から分離した HSVI 型 (Moto 株) を SIRC 細胞で継代培養したものを使用した。感染力価は  $10^{6.4}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。ウイルスの接種は、pentobarbital (Nembutal®) 0.01ml でマウスを麻酔した後、手術顕微鏡下に27G 針で両眼角膜を乱切して HSV 液を0.05ml 滴下し、眼球マッサージをすることによって行った。

### 2. 実験動物

6週齢、雄性 C3H/He マウスを使用した。

### 3. 移入細胞の作製

#### 1) Stimulator 細胞の調整

HSV 非感染マウスの脾臓を無菌的に摘出し、teasing を行い単離細胞とした。その後リンパ球比重分離液 M-SMF (日本抗体研究所) 上に重層し、得られた単核細胞を test medium (10%FCS, 100ug/ml streptomycin, 100U/ml penicillin, 25mM HEPES,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol を加えた RPMI 液) に浮遊させ、HSV を2時間感染させた。さらに、1,500rad のコバルト照射を行い、test medium で細胞数を  $4 \times 10^6$ /m に調整した。

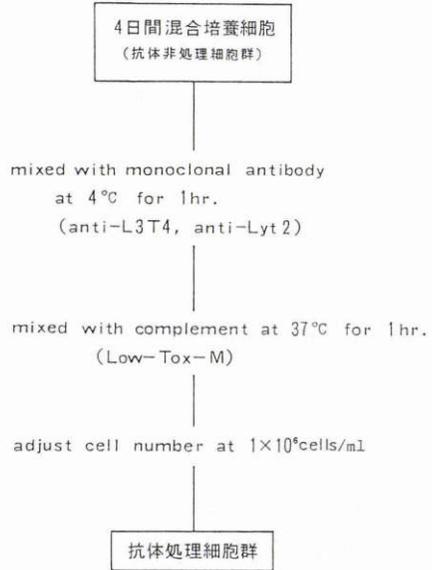


図1 モノクローナル抗体処理

#### 2) Responder 細胞の調整

HSV 角膜接種後12日時 (あるいは6日時) の感染マウスの脾単核細胞を無菌的に採取し、test medium で細胞数を  $2 \times 10^6$ /ml に調整した。

#### 3) 4日間混合培養群 (抗体非処理細胞群) の調整

Responder 細胞と stimulator 細胞を、細胞数比が 5 : 1 になるように 6 well plate に分注し、37°C の炭酸ガス培養器で4日間混合培養したものを  $3.5 \times 10^7$ /ml に調整した。

#### 4) モノクローナル抗体処理 (抗体処理細胞群の調整, 図1)

前述のように作製した4日間混合培養群に、マウスリンパ球の表面マーカーに対するモノクローナル抗体を用いて抗体処理を行った。使用したモノクローナル抗体は、抗 L3T4抗体 (Becton Dickinson, USA) あるいは抗 Lyt-2抗体 (Cedarlane, USA) で、これらを前報<sup>1)</sup>で求めた至適最終希釈である  $\times 10$  に希釈して、前述の4日間混合培養群 (抗体非処理細胞群) に加えて、4°C で60分間反応させた。つぎに最終希釈が  $\times 10$  になるように調整した補体、Low-Tox-M (Cedarlane, USA) を添加して、37°C で60分間反応させ、抗体処理細胞群 (抗 L3T4抗体処理群、抗 Lyt-2抗体処理群) を作製した。

#### 4. 細胞移入 (図2)

1) HSV 角膜感染12日時のマウスから得られた細胞群の移入

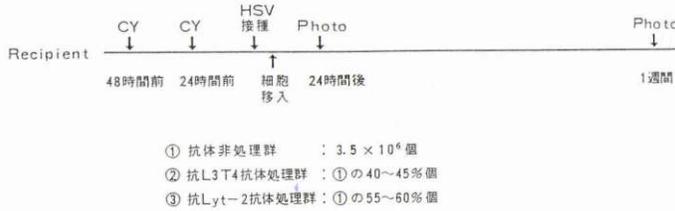


図2 移入のスケジュール

マウス本来の移入初期の免疫能を抑制するために、被移入マウスに HSV 角膜接種の24時間と48時間前に60mg/kgの cyclophosphamide (Endoxan®, CY, USA)を腹腔内に投与した。移入に用いた細胞は、前述の抗体非処理細胞群と抗体処理細胞群(抗L3T4抗体処理群あるいは抗Lyt-2抗体処理群)で、HSV角膜接種の2時間後に結膜下に細胞移入を行った。移入細胞は、 $3.5 \times 10^7$ /mlに調整した細胞を0.1ml結膜下に移入したため、抗体非処理細胞群では $3.5 \times 10^6$ 個となった。抗体処理細胞群では抗体処理によって細胞数が減少するため、抗L3T4抗体処理群では抗体非処理細胞群の40~45% ( $0.4 \sim 0.45 \times 3.5 \times 10^6$ 個)、抗Lyt-2抗体処理群では55~60% ( $0.55 \sim 0.6 \times 3.5 \times 10^6$ 個)の細胞数となったが、そのままをそれぞれ結膜下に移入した。

## 2) 移入細胞について

移入細胞数(HSV角膜感染12日時のマウスから得られた脾細胞)を変えることによって、角膜炎が影響を受けるかどうかを各群について検討した。抗体非処理細胞群では $1 \times 10^7$ 個、 $1 \times 10^6$ 個、 $5 \times 10^5$ 個と移入細胞数を変えた。抗体処理細胞群では、抗体非処理細胞群の各数値の細胞に対して、抗体で処理した後に残った細胞を移入した。

## 3) HSV角膜感染6日時のマウスから得られた細胞群の移入

HSV感染6日時のマウスから得られた脾細胞を1)と同様の操作をした後、得られた細胞をHSV角膜感染マウスの結膜下に移入した。移入細胞数は、1)と同様に抗体非処理群では $3.5 \times 10^6$ 個で行った。抗L3T4抗体処理群では抗体非処理細胞群の40~45% ( $0.4 \sim 0.45 \times 3.5 \times 10^6$ 個)、抗Lyt-2抗体では55~60% ( $0.55 \sim 0.6 \times 3.5 \times 10^6$ 個)の細胞数をそれぞれ結膜下に移入した。

## 5. 角膜スコア(表1)

移入後、毎日角膜の観察を行い、角膜所見の評価には角膜スコアを用いた。すなわち、角膜をフルオレセ

表1 角膜スコア

0.	角膜が全く染まらないもの
1.	角膜が点状に染まるもの
2.	角膜に1象限未満の樹枝状潰瘍が認められるもの
3.	角膜に1象限以上の樹枝状潰瘍が認められるもの
4.	角膜に地図状潰瘍が認められるもの

インで染色し、手術顕微鏡下に16倍で観察して、表1の角膜スコアに従って点数をつけて行った。なお、1) 2) 3)の実験項目すべてにおいて、細胞移入をまったく行わないHSV角膜感染マウスを対照としておいた。

また、マウスの角膜実質の厚さは薄く、実質病変の判定が困難であったため、実質病変については検討しなかった。

## III 結果

### 1. HSV角膜感染12日時のマウスから得られた細胞群の移入と角膜スコア(図3)

抗L3T4抗体処理群と抗体非処理群の角膜スコアは、移入後の各時点でほぼ同じ値を示した。この2群と細胞非移入群とを比べると、移入後3日時から前2群の角膜スコアが減少し始め(すなわち角膜炎が軽快し始め)、移入後6、7日時には有意の差が認められた( $p < 0.05$ )。抗Lyt-2抗体処理群では角膜スコアの減少が遅く、細胞非移入群との間には角膜スコアに有意の差はなかったものの、抗体非処理群と抗L3T4抗体処理群の間には移入後3日時以後で角膜スコアに有意の差が認められ( $p < 0.05$ )、4群の中で角膜炎の回復がもっとも遅れた。

### 2. 移入細胞数と角膜スコア

#### 1) 抗体非処理群(図4)

抗体非処理を移入した場合、移入細胞数が多いほど角膜スコアの減少が速やかな傾向があり、 $1 \times 10^7$ 個の移入では、移入後3日時以後で細胞非移入群との間に角膜スコアの有意の差が認められた( $p < 0.05$ )。

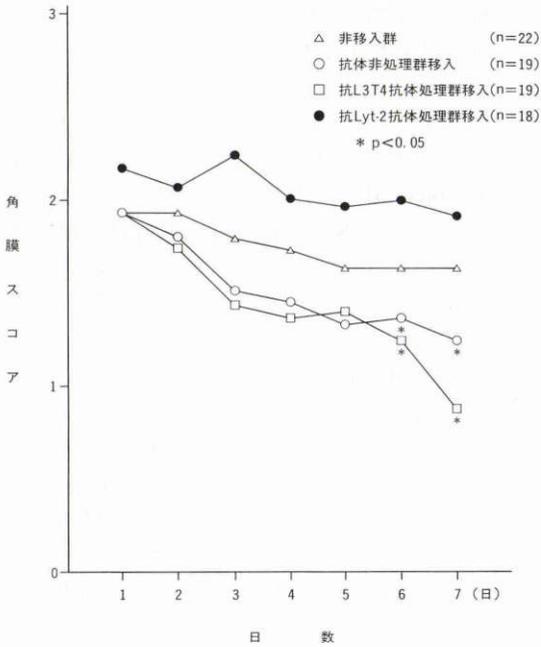


図 3 HSV 角膜感染12日時のマウスから得られた細胞の移入と角膜スコア

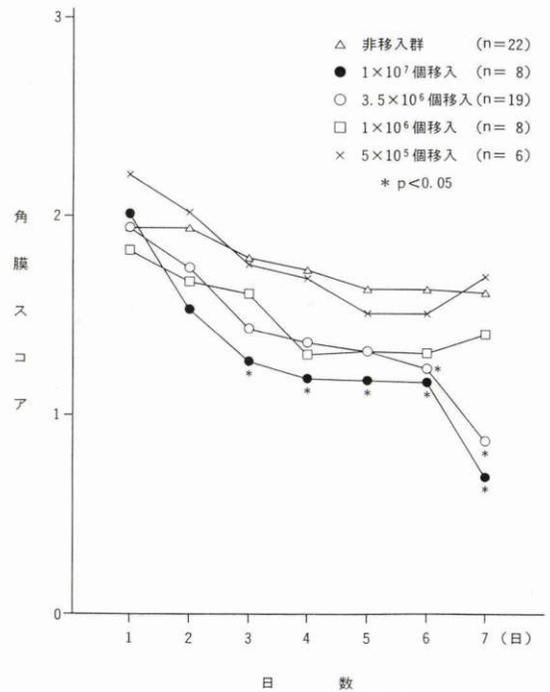


図 5 抗 L3T4 抗体処理細胞の移入細胞数とスコア

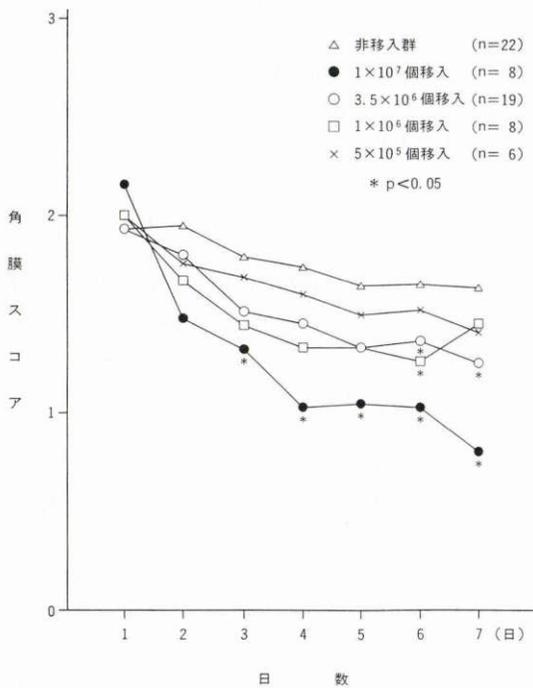


図 4 抗体非処理細胞の移入細胞数と角膜スコア

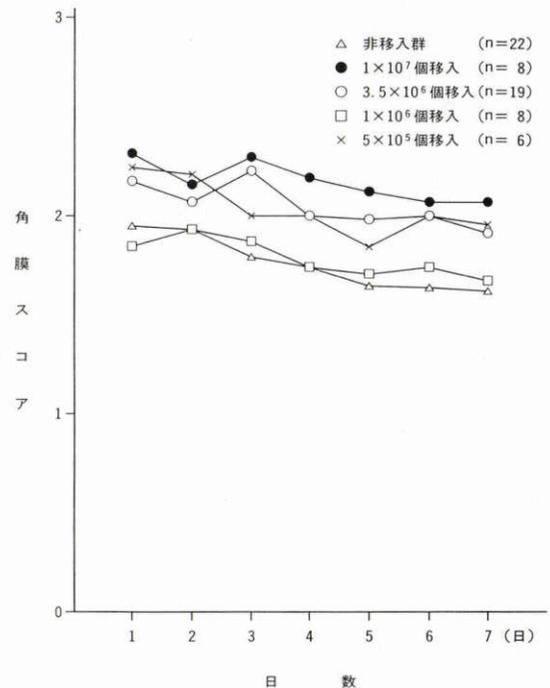


図 6 抗 Lyt-2 抗体処理細胞の移入細胞数と角膜スコア

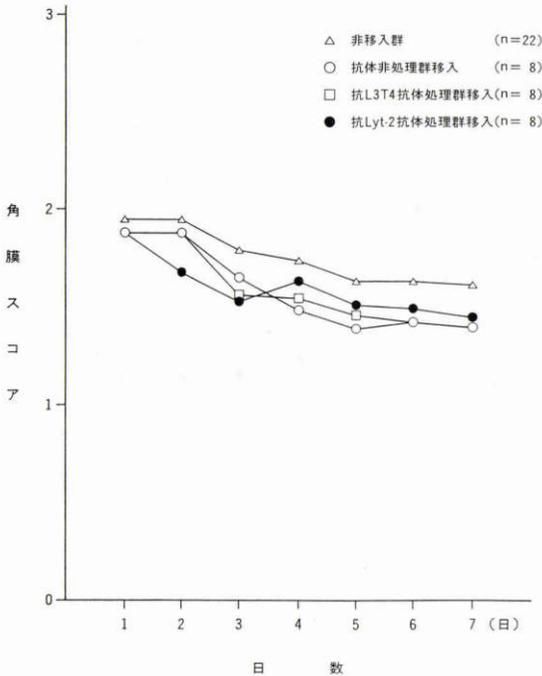


図7 HSV角膜感染6日時のマウスから得られた細胞の移入と角膜スコア

## 2) 抗L3T4抗体処理群 (図5)

抗L3T4抗体処理群では1)とほぼ同様の傾向が認められ、 $1 \times 10^7$ 個の移入では、移入後3日以後で細胞非移入群との間に角膜スコアの有意の差があった ( $p < 0.05$ ).

## 3) 抗Lyt-2抗体処理群 (図6)

抗Lyt-2抗体処理群では、どの細胞数の移入においても角膜スコアの減少が遅く、移入後5日以後では有意差が認められないものの、細胞非移入群の角膜スコアを下回るものはなかった。

## 3. HSV角膜感染6日時のマウスから得られた細胞群の移入と角膜スコア (図7)

HSV角膜感染12日時の場合と異なり感染6日時のマウス脾細胞では、全時点を通じて、抗体非処理群、抗L3T4抗体処理群、抗Lyt-2抗体処理群、細胞非移入群の角膜スコアに有意の差は認められなかった。

## IV 考 按

HSVの排除に直接関わっているTリンパ球サブセットのうち、より有効に働いているのはCTLであるのか、 $T_{DH}$ であるのか議論のあるところである。今回の筆者の実験結果では、HSV感染12日時の場合、抗体

非処理群と抗L3T4抗体処理群の角膜スコアが、細胞非移入群および抗Lyt-2抗体処理群のそれと比べて速やかに減少し、また、前2者の間で比べると、その角膜スコアは移入後の各時点でほぼ差がないというものであった。今回の実験では、いずれの群においてもcyclophosphamideで前処置をして免疫抑制状態をもたらしている。この場合、cyclophosphamideの免疫抑制作用がどのくらいの期間持続するかが問題となる。今回の実験で、細胞非移入群のHSVの角膜接種後3日以後の角膜スコアが徐々に減少していったこと、またcyclophosphamideは投与後2~4日位でその大半が尿中に排泄されるとされていること<sup>9)</sup>から、おそらくその作用期間は処置後3日程度と考えられる。したがって、本実験において、cyclophosphamideの処置後4日以後では、マウスが本来持つ免疫機構によって角膜炎が軽快している部分があると推定される。しかし、抗L3T4抗体処理細胞の移入マウスと細胞非移入マウスの角膜スコアの間には有意差があることから、抗L3T4抗体処理細胞の移入効果は明らかにあると思われる。

抗L3T4抗体はCTL前駆細胞を障害せずヘルパーT細胞と $T_{DH}$ を障害し、抗Lyt-2抗体はCTLとサブレッサーT細胞、それにLyt-1+2+3+で表わされるT細胞前駆細胞を障害する<sup>3)12)</sup>とされているので、今回用いた移入細胞の抗HSV作用の主体となっているのはCTLであると考えられる。CTLが優位に働くとするこれまでの報告の多くでは<sup>5)~7)</sup>、今回と同様にin vitroで抗原刺激をした感作リンパ球が移入細胞として用いられている。これに対して、in vitroでの抗原刺激を行っていない細胞中に含まれるCTLは、活性化していない、いわゆるCTL前駆細胞(CTL-P)の状態のものが多く<sup>6)~10)</sup>、移入効果もin vitroで抗原刺激をした細胞群に比べて弱いことが知られている<sup>2)7)</sup>。しかし、風見ら<sup>11)12)</sup>はHSVを結膜下に接種したマウスの局所リンパ節細胞をHSV角膜感染マウスに移入した場合には、in vitroでの抗原刺激を行わなくても、その中にCTLの抗HSV作用を認めたとしている。HSV感染において局所リンパ節中のCTLは、脾臓のそれと比べてその細胞数やCTL活性が高いことが報告されており<sup>8)</sup>、in vitroの抗原刺激がなくても、ある程度のHSV作用を持つものと考えられる。

一方、これまでに $T_{DH}$ (Lyt-1+あるいはL3T4+細胞)が有効であるとする報告は、全身的には、HSV感染リンパ球をHSVを耳介に接種したマウスに移入

し、耳介が厚くなったものほど感染4日時のウイルス量が少なかったことから、 $T_{DH}$ がHSVのクリアランスに有効であるとするNashら<sup>13)14)</sup>の報告がある。角膜では、Oakesら<sup>15)</sup>が足底部にHSVを接種したマウスから得られたLyt-1<sup>+</sup>細胞が、HSV角膜感染マウスの生存率に対して有効であったとしている。しかし、Lauschら<sup>16)</sup>はHSV角膜感染においては、 $T_{DH}$ は局所的にも全身的にも必要ないのではないかと述べている。その理由として、HSVを経静脈的に投与することにより、HSV特異的な $T_{DH}$ に対してトレランス状態にした(すなわち $T_{DH}$ の働きは失われている)マウス角膜にHSVを接種して実験したところ、 $T_{DH}$ をトレランスしていないマウスの方が角膜炎は悪化し、眼球、三叉神経節あるいは脳における各部のウイルス量も多かったことを挙げている。

また、CTLと $T_{DH}$ の両方とも有効であるとする報告もいくつかある<sup>11)12)17~19)</sup>。このうち、林ら<sup>19)</sup>は今回の筆者の実験と同様に、眼部にHSVを接種したマウスのリンパ球でしかもin vitroで抗原刺激をした細胞を使用している。その結果、彼らはLyt-2<sup>+</sup>細胞(CTL)も、L3T4<sup>+</sup>細胞( $T_{DH}$ )も、角膜でのHSV増殖阻止に有効であったとしている。この結果と筆者のそれとの違いは、HSV感染マウスからリンパ球を採取した時期の差に起因しているものと思われる。まずCTLに関して言えば、脾細胞中のCTLはHSV角膜感染後10日前後で出現するとされているのに対して<sup>20)21)</sup>、局所リンパ節中のCTLはそれより早く、感染5日時頃出現するとされている<sup>8)</sup>。したがって、感染7日時の局所リンパ節細胞を用いている林ら<sup>19)</sup>と、感染12日時の脾細胞を使用した筆者とで、ともにCTLの角膜炎に対する有効性が認められ、今回の実験の感染6日時の脾細胞の移入では効果がなかったのも当然であろう。これに対して、 $T_{DH}$ はHSV感染5日時頃からその活性が発現されるとされているが<sup>16)22)</sup>、Nashら<sup>22)</sup>はHSVの耳介接種後13日以上経過したマウスから得られたリンパ節細胞では、 $T_{DH}$ に特異的なサブレッサーT細胞の働きにより、 $T_{DH}$ の移入効果が消失すると述べている。これらの点を考え併せると、感染7日時の局所リンパ節細胞を使用した林ら<sup>19)</sup>が $T_{DH}$ の有効性を認め、筆者の実験でHSV感染後12日時では、抗Lyt-2抗体処理群の移入により角膜スコアの改善が見られなかったのは納得できる。しかし現在のところ、 $T_{DH}$ の活性は耳介の厚さを測定することによって行われており、CTL活性と違って厳密な数量化測定は困難な状況である。移入さ

れた細胞が真に $T_{DH}$ であるのかどうかは確定できない。

HSVの感染経路が異なると、優位に働くリンパ球サブセットも異なると考えられているが<sup>11)14)17)18)</sup>、これに加えて、同じHSV角膜感染でもリンパ球の採取部位、感染日数、また移入細胞の誘導の条件の違いにより実験結果が異なってくるのが分かる。言葉を換えて言えば、CTLも $T_{DH}$ もそれぞれ、ある条件下で有効に働いている可態性がある。今回の実験結果から、少くともHSV角膜感染12日時にはCTLがHSV感染からの回復に優位に働いているものと考えられる。

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。

本論文の要旨は、第93回日本眼科学会総会(講演)で発表した。

#### 文 献

- 1) 森 良一, 川名 尚: ヘルペスウイルス感染症. 東京, メディカルトリビューン, 24-34, 1986.
- 2) 山代浩人: 単純ヘルペス角膜炎の免疫学的研究—マウス脾 Cytotoxic T lymphocyte の結膜下移入の及ぼす影響について—. あたらしい眼科 5: 1052-1058, 1988.
- 3) 山代浩人: 単純ヘルペス角膜炎の免疫学的研究—感染マウス脾細胞のリンパ球サブセットと細胞障害性について—. あたらしい眼科 6: 1367-1372, 1989.
- 4) 久保文苗: 医療薬, 日本医薬品集. 東京, 薬業時報社, 380-381, 1985.
- 5) Sethi KK, Omata Y, Schneweis KE: Protection of mice fatal herpes simplex virus type 1 infection by adoptive transfer of cloned virus-specific and H-2-restricted cytotoxic T lymphocytes. J Gen Virol 64: 443-447, 1983.
- 6) Larsen HS, Russell RG, Rouse BT: Recovery from lethal herpes simplex virus type 1 infection is mediated by cytotoxic T lymphocytes. Intect Immun 41: 197-204, 1983.
- 7) 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, 1984.
- 8) 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—. 日眼会誌 91: 1296-1301, 1987.
- 9) 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.
- 10) **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.
  - 11) **風見宣生**: 単純ヘルペスウイルス I 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. *東女医大雑誌* 57: 281—285, 1987.
  - 12) **風見宣生**: 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. *日眼会誌* 92: 1461—1465, 1988.
  - 13) **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 Immun* 75: 348—355, 1983.
  - 14) **Nash AA, Ashford NPN**: Split T-cell tolerance in herpes simplex virus-infected mice and its implication for anti-viral immunity. *Immunology* 45: 761—767, 1982.
  - 15) **Oakes JE, Rector JT, Lausch RN**: Lyt-1<sup>+</sup> T cells participate in recovery from ocular herpes simplex virus type 1 infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 188—194, 1984.
  - 16) **Lausch RN, Kleinschrodt WR, Monteiro C, et al**: Resolution of HSV corneal infection in the absence of delayed-type hypersensitivity. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci* 26: 1509—1515, 1985.
  - 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.
  - 18) **Nash AA, Jayasuriya J, Phelan J, et al**: Different roles for L3T4<sup>+</sup> and Lyt-2<sup>+</sup> T cell subsets in the control of an acute herpes simplex virus infection of the skin and nervous system. *J Gen Virol* 68: 825—833, 1987.
  - 19) **林皓三郎, 風見宣生, 内田幸男**: 角膜ヘルペスに対する局所リンパ節免疫 T 細胞の誘導. *日眼会誌* 93(増刊号): 159, 1989.
  - 20) **平川裕二**: 単純ヘルペス角膜炎の免疫学的研究—マウス脾 cytotoxic T lymphocyte について—. *日眼会誌* 89: 208—213, 1985.
  - 21) **熊谷勝男**: 単純性疱疹ウイルス. *臨床とウイルス* 9: 5—11, 1981.
  - 22) **Nash AA, Field HJ, Quartey-Papafio R**: Cell-mediated immunity in herpes simplex virus-infected mice: Induction, characterization and antiviral effects of delayed type hypersensitivity. *J Gen Virol* 48: 351—357, 1980.
-