

マウス角膜ヘルペスにおける免疫学的検討

—主要組織適合抗原の発現, 浸潤細胞の動態—

宇野 敏彦¹⁾, 林 皓三郎²⁾, 大橋 裕一¹⁾¹⁾愛媛大学医学部眼科学教室, ²⁾神戸市環境保健研究所

要 約

単純ヘルペスウイルスⅠ型(HSV-1)を, Balb/c マウスの角膜に感染させ, 経時的に, ウイルス抗原の分布, 主要組織適合抗原(MHC抗原)の発現, 角膜浸潤細胞の同定を, 免疫組織学的手法を用いて行った. 結果は以下の通りである. (1) HSV-1 抗原は, 感染2日目までは角膜上皮のみに認められ, その後角膜実質に及んだ. (2) class I MHC 抗原(H-2^d)は角膜全層に恒常的に認められた. class II MHC 抗原(Ia^d)は非感染角膜には認められなかったが, 感染2日目から角膜実質に出現し, その後次第に増強した. (3) HSV-1 感染後の比較的早期から, L3T4陽性細胞(helper/inducer)が角膜周辺部より浸潤し始め, 5日後には中央部角膜にも認められた. 一方, Lyt2陽性細胞(suppressor/killer)は, L3T4細胞にやや遅れて周辺部角膜実質に出現した. 以上より, 角膜ヘルペス感染の急性期において, 実質でのclass II MHC抗原の誘導が起こり, L3T4細胞の浸潤とともに細胞性免疫の成立に重要な役割を果たしていると考えられる. (日眼会誌 97: 441—447, 1993)

キーワード: 角膜ヘルペス, 単純ヘルペスウイルスⅠ型, L3T4陽性細胞, Lyt2陽性細胞, 免疫組織化学

Expression of Major Histocompatibility Complex Antigens,
and Kinetics of Infiltrated Lymphocytes in Murine
Herpetic Keratitis

Toshihiko Uno¹⁾, Kozaburo Hayashi²⁾ and Yuichi Ohashi¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Ehime University School of Medicine²⁾Public Health Research Institute of Kobe City

Abstract

Immunohistochemical techniques were used to study expression of HSV-1 antigen, induction of class I and II major histocompatibility complex (MHC) antigens, and infiltration of L3T4⁺ and Lyt2⁺ cells were analyzed during the acute phase of herpetic keratitis. The results were as follows: 1) HSV-1 antigens were detectable in the corneal epithelium at 2 days post infection (p.i.), then localized in the stroma after 5 days p.i. 2) Class I MHC antigens (H-2^d) were evenly expressed in all layers of infected as well as uninfected corneas. On the other hand, class II MHC antigens (Ia^d) were induced in the superficial corneal stroma 2 days p.i., then gradually spread in the entire corneal stroma with increased intensity. 3) L3T4⁺ (helper/inducer) cells penetrated the stroma at 2 days p.i. These cells

別刷請求先: 791-02 愛媛県温泉郡重信町志津川 愛媛大学医学部眼科学教室 宇野 敏彦
(平成4年7月20日受付, 平成4年11月4日改訂受理)

Reprint requests to: Toshihiko Uno M.D. Department of Ophthalmology, Ehime University School of Medicine, Shizukawa, Shigenobu, Onsen-gun, Ehime 791-02, Japan

(Received July 20, 1992 and accepted in revised form November 4, 1992)

infiltrated the central stroma at 5 days p.i.. $\text{Lyt } 2^+$ (suppressor/killer) cells were first seen in the corneal stroma as late as at 5 days p.i.. These results imply that L3T4^+ cells play a role in the early immunological events concerning class II MHC antigens and viral antigens, both concomitantly expressed in the corneal stroma. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 441-447, 1993)

Key words: Herpetic Keratitis, Herpes simplex virus type 1, L3T4^+ cells, Lyt2^+ cells, Immunohistochemistry

I 緒 言

単純ヘルペスウイルス I 型 (herpes simplex virus type 1=HSV-1) の角膜感染では、抗体産生を中心とした液性免疫^{1)~3)}とともに、細胞性免疫が防御反応として重要であることがよく知られている⁴⁾⁵⁾。その主役を担っていると考えられているのが、細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte=CTL) と遅延型過敏反応 (delayed type hypersensitivity=DTH) に関与する T 細胞であるが^{6)~8)}、HSV-1 の角膜感染時にこれらの免疫担当細胞がどのように働いているかについては種々の議論があり、いまだ不明な点も多い。

一般に、細胞性免疫が有効に働くためには、免疫担当細胞は、標的細胞の表面にある外来抗原 (例えばウイルス抗原) と、標的細胞自身が持っている主要組織適合抗原 (MHC 抗原) を同時に認識する必要がある。従って、HSV-1 の角膜感染時における細胞性免疫反応を解明する上で、ウイルス抗原の分布とともに、MHC 抗原が角膜局所にどのように発現されるかを明らかにすることは非常に重要である。これまでにも、角膜移植時に採取した患者の角膜片を免疫組織学的に検討した報告はあるが^{9)~11)}、いずれもヘルペス性角膜炎としては鎮静期のものであり、情報としては断片的である。これまでに我々は実験的にマウス HSV-1 角膜感染におけるウイルス抗原、MHC 抗原の発現、実質浸潤細胞の同定を免疫蛍光抗体法を用いて行ったが¹²⁾、さらに peroxidase anti-peroxidase (PAP) 法を用いて、より詳細な細胞の同定、抗原陽性部位の確認を行った。

II 実験方法

1. 動物

8 週齢の Balb/c マウスを用いた。マウスに対する全ての実験操作は、塩酸ケタミン (ケタラル®) 2 mg (60~70 mg/kg)、キシラジン塩酸塩 (セラクタール®) 0.15 mg (5 mg/kg) の腹腔内注射による全身麻酔を用い、苦痛を与えない様に留意して行った。

2. ウイルスおよびウイルス接種

HSV-1 (CHR 3 株) を green monkey kidney (GMK) 細胞に接種後、ほぼ全面に細胞変性効果が出現した時点で凍結融解を 4 回繰り返して、3,000 rpm にて 10 分間遠心分離した上清をウイルス液とした。ブランク法によるウイルス液の力価は、 5×10^6 PFU/ml であった。

ウイルス接種は、全身麻酔を施行したマウスの両眼の角膜上皮を 30 G 針にて格子状に擦過し、ウイルス液を結膜嚢内に 0.01 ml 滴下することにより行った。

3. 前眼部所見の観察

HSV-1 感染マウスの前眼部を、実体顕微鏡 (OLYMPUS SZ 60) 下に、感染後 7 日目まで観察し、一部は写真記録した。上皮病変は 1% メチレンブルー液を点眼して観察した。

4. ウイルス抗原の同定

HSV-1 感染マウスの眼球を、経時的 (感染 1~7 日目) に摘出し、直ちに OCT compound 包埋した後、 -80°C の n-hexan 中で凍結した。次に、厚さ 5~8 μm の凍結切片を作製し、室温で 5 分間アセトン固定を行った。対照として、非感染マウスの眼球も同様に処理し、以後の免疫組織学的検索に供した。

Peroxidase anti peroxidase (PAP) 法により HSV-1 抗原を検出した。内因性 peroxidase 反応と非特異的反応を阻止するため、3% hydrogen peroxide と 5 分間、次いで、ブタ正常血清 (10 倍希釈、ダコ・ジャパン社) と 20 分間、それぞれ反応させた。次に、1 次抗体として、抗 HSV-1 ウサギ抗体 (100 倍希釈、ダコ・ジャパン社) を、2 次抗体として抗ウサギ immunoglobulin ブタ抗体 (100 倍希釈、ダコ・ジャパン社) をそれぞれ 20 分間反応させ、その後、peroxidase/抗 peroxidase ウサギ抗体複合体 (100 倍希釈、ダコ・ジャパン社) をさらに 20 分間反応させた。発色基質として 3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC) を用い、マイヤーヘマトキシリンにて対比染色した。なお各染色操作の間の洗浄液としては、0.05 M トリス緩衝液 (pH

7.6) を用いた。

5. MHC 抗原，角膜実質浸潤細胞の同定

上記により作成した角膜凍結切片において，Balb/c マウスの MHC class I 抗原 (H-2^d) および class II 抗原 (Ia^d)，T 細胞の表面 マーカーとして，L 3 T 4 (helper/inducer)，および Lyt 2 (suppressor/killer) を選択し，免疫組織化学的にそれらの分布を検索した。

凍結切片をまず，3 % hydrogen peroxide で 5 分間処理した後，1 次抗体として，それぞれ抗 H-2^d マウス IgG 抗体 (40 倍希釈，明治)，抗 Ia^d マウス IgG 抗体 (40 倍希釈，Bekton-Dickinson 社)，抗 L3T4 ラット IgG 抗体 (60 倍希釈，GK 1.5 monoclonal)，抗 Lyt2 マウス IgM 抗体 (60 倍希釈，monoclonal，Cederlane，Ontario Canada) を検出抗原に応じて，室温で 2 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後，2 次抗体として，peroxidase 結合抗マウス IgG，抗ラット IgG，抗マウス IgM の抗体をそれぞれ，1 次抗体に対応させ，同じ

く室温で 2 時間反応させた。発色基質としてはジアミノペンチジン (DAB) を用い，ヘマトキシリンーエオジン (H-E) で対比染色した。

III 結 果

1. 前眼部所見

感染 2 日目から 3 日目にかけて，全てのマウスに樹枝状角膜炎が生じた (図 1)。この時点では，角膜実質はほぼ正常で，明らかな実質混濁や浮腫を認めなかった。感染 5 日目から 7 日目になると上皮病変が治癒するとともに，角膜実質の混濁と浮腫が増強した。一部のマウスでは，角膜内に新生血管が侵入した (図 2)。

2. 免疫組織学的検討

感染 2 日目に，HSV-1 抗原陽性細胞は角膜上皮に局限して認められた (図 3)。感染 5 日目になると，角膜上皮内の HSV-1 抗原は消失し，角膜実質表層から中層に HSV-1 抗原陽性細胞が認められるようになった (図 4)。さらに感染 7 日目になると，HSV-1 抗原陽性細胞は実質深層に及んでいた。

MHC class I 抗原 (H-2^d) は，非感染マウスでも角膜上皮細胞，実質細胞，内皮細胞に認められた。HSV-1 感染後にも，H-2^d の発現形態には変化を認めなかった (図 5)。

MHC class II 抗原 (Ia^d) 陽性細胞は，感染 2 日目から，角膜実質表層部に出現し，感染 5 日目以降は，Ia^d 陽性部位はさらに拡大する傾向を示した。全経過を

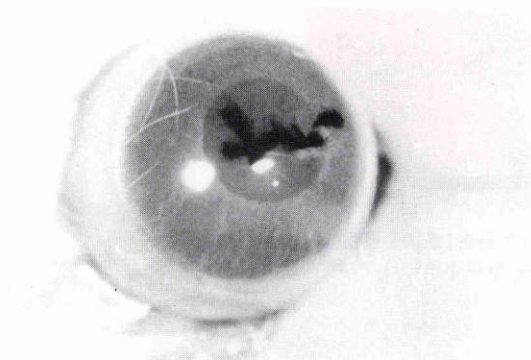


図 1 マウス角膜に単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) を点眼接種 2 日目の前眼部所見。

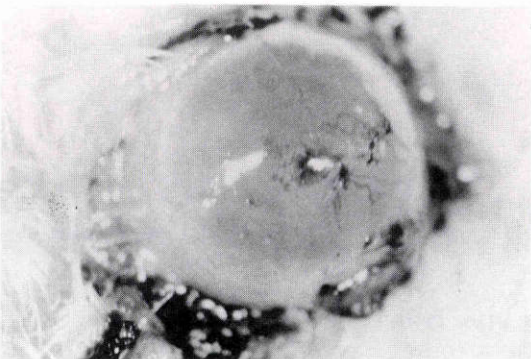


図 2 点眼接種 7 日目の前眼部所見。

表 1 マウス角膜ヘルペス感染における HSV 抗原，MHC class I，class II 抗原の発現状態

HSV 感染後日数		0	1	3	5	7 (日)
上皮	HSV	—	+	+	—	—
	class 1 MHC	+	+	+	+	+
	class 2 MHC	—	—	—	—	—
実質	HSV	—	—	+	++	++
	class 1 MHC	+	+	+	+	+
	class 2 MHC	—	+	++	++	++

感染後 0 日とは HSV-1 非感染状態と意味している。

表 2 角膜浸潤細胞の動態 (L 3 T 4，Lyt 2 陽性細胞)

HSV 感染後日数		0	1	3	5	7
上皮		—	—	—	—	—
実質	L 3 T 4 ⁺	—	—	+	++	+++
	Lyt 2 ⁺	—	—	+	+	+

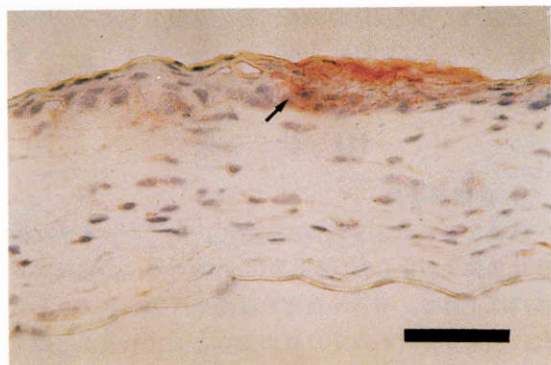


図3 HSV-1 抗原(陽性細胞)の分布(感染2日目).
角膜上皮に限局して HSV-1 抗原が認められる(矢印). (バーは 100 μ m)

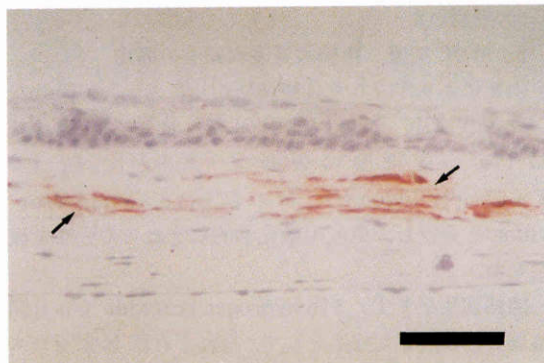


図4 HSV-1 抗原の分布(感染5日目).
角膜実質内に HSV-1 抗原を認める(矢印). (バーは 100 μ m)

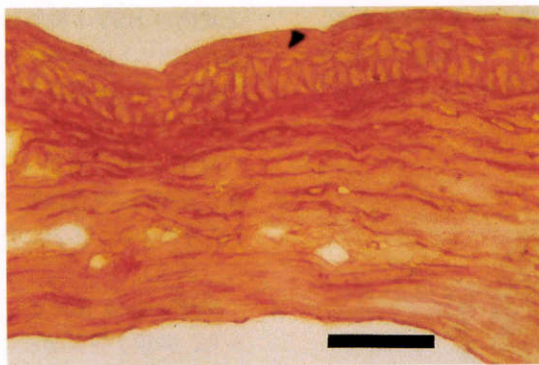
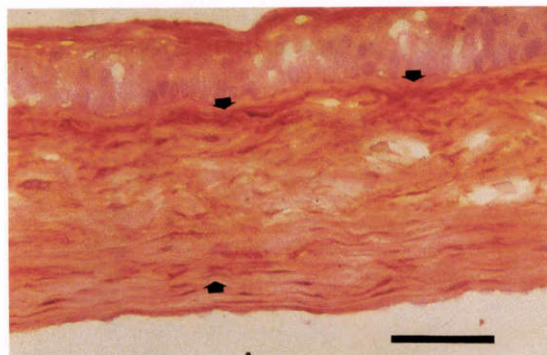


図5 MHC class I 抗原(H-2^d)の分布(感染5日目).
角膜上皮, 実質, 内皮ともに陽性所見を示した. (バーは 100 μ m)



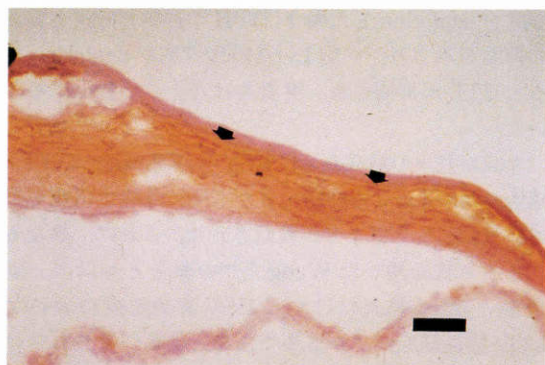
a



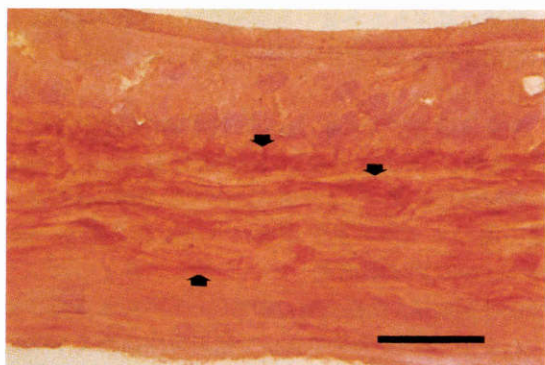
b

図6 MHC class II 抗原(Ia^d)の分布.

- a: 感染2日目, 角膜周辺部の実質表層に Ia^d抗原を認める(矢印).
b: 感染5日目, Ia^d抗原は次第に増強し, 角膜実質全層に広がっている(矢印). (バーは 100 μ m)



a



b

図 7 L3T4 陽性細胞 (helper/inducer) の分布.

- a: 感染 2 日目, 周辺部角膜実質表層を中心として L3T4 陽性細胞が認められる (矢印).
b: 感染 5 日目, 角膜実質全層に L3T4 陽性細胞が認められる (矢印). (バーは 100 μ m)

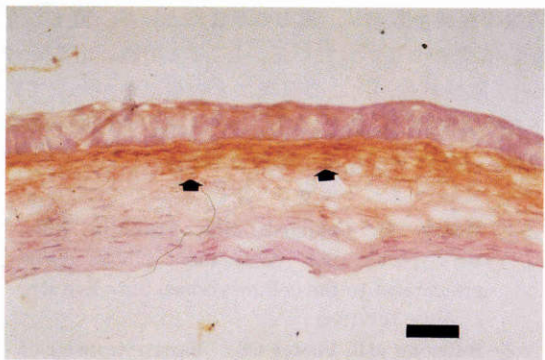


図 8 Lyt2 陽性細胞 (suppressor/killer) の分布 (感染 5 日目).

角膜実質表層に局所的な浸潤を認める (矢印). (バーは 100 μ m)

通じて, 角膜上皮は Ia^d陰性であり, また, 非感染マウスでは, 角膜のどの部位にも Ia^d陽性細胞は検出されなかった (図 6). HSV-1 抗原, MHC class I, および class II 抗原の, 発現経過をまとめると表 1 のようになる.

L3T4 陽性細胞 (helper/inducer) は, 感染 2 日目より周辺部角膜実質内に出現し, 感染 5 日目には中央部角膜にも認められる様になった (図 7). これらの L3T4 陽性細胞は実質内に限って浸潤し, 角膜上皮層や内皮には認められなかった. 一方, Lyt2 陽性細胞 (suppressor/killer) は, 感染 5 日目になり, 角膜実質表層に局所的に認められるようになった (図 8). ただ

し, L3T4 陽性細胞と比較すると Lyt2 陽性細胞の浸潤頻度はかなり低く, L3T4 陽性細胞と同様に, 上皮層および内皮への浸潤はなかった. L3T4, および Lyt2 陽性細胞の動態をまとめると表 2 のようになる.

IV 考 按

HSV-1 が角膜に感染すると, さまざまなエフェクター細胞が局所に浸潤し, 細胞性免疫が誘導される⁴⁾. 細胞性免疫を担う T 細胞が感作され, かつエフェクターとして働くには HSV 抗原と細胞表面に発現される MHC 抗原が同時に T 細胞に認識されることが必要である. MHC 抗原には, 全ての有核細胞に認められ, 免疫反応に広く関与している class I 抗原 (Balb/C マウスでは H-2^d) と, B リンパ球, マクロファージ, 活性化 T リンパ球などの免疫担当細胞に認められ, これらの細胞間の相互作用に重要な働きを持つ class II 抗原 (I-E^d) とがある¹³⁾. 正常角膜では, class I 抗原が上皮, 実質, 内皮のいずれにも認められるのに対して, class II 抗原は周辺部角膜にごく稀に認められるのみとされている¹⁴⁾.

我々の報告から明らかなように, class II 抗原は HSV 感染後, 早期から角膜実質表層に発現し, その後も経時的に増強し実質全層に広がった. 炎症性細胞の浸潤が殆どない感染初期 (感染 2, 3 日目) から発現してくることと, その局在から class II 抗原陽性細胞は少なくとも感染初期においては主に keratocyte であろうと思われる. したがって, 感染 3 日目以降に角

膜実質に見られる多数の炎症細胞は、これら class II 抗原陽性細胞と密接な相互作用をもって浸潤してくると思われる。

感染早期に出現する class II 抗原陽性細胞に HSV-1 が感染しているのか否かは重要な問題である。今後、二重染色法によってより明らかにする必要があるが、感染後のウイルス抗原の広がり方を見る限り、keratocyte に両者が発現していることが考えられる。class I 抗原は、角膜全層の細胞に正常時にも発現されているが、HSV 感染によって発現状態はあまり変化しなかった。したがってエフェクター T 細胞の標的抗原としての意義はあるが、HSV 感染に対する免疫反応誘導という点に関する限り、class II 抗原に比べ、その役割は二次的なものと考えられる。

我々と同様の結果は、角膜ヘルペス患者の角膜移植時に得られた組織片を、免疫組織学的に検索した報告にも認められる。例えば、Mcbride ら¹¹⁾は、正常角膜においては、class I 抗原が角膜上皮、実質、内皮ともに陽性で、class II 抗原がいずれの層にも陰性であったのに対し、ヘルペス性角膜炎においては、角膜実質の keratocyte が class II 抗原陽性を示したと述べている。

角膜ヘルペス感染の防御に、T 細胞のどの subset が重要であるかという点について、マウスを用いた実験が多数報告されている。特に、CTL と DTH のどちらがより重要かという命題は、ここ 10 年にわたって大きな問題とされてきているが、いまだ結論は出ていない。例えば、細胞移入の手法を用いて、HSV 角膜感染後に所属リンパ節および脾臓において CTL 細胞が増加することを示した報告⁶⁾⁷⁾や、DTH を抑制しても HSV 感染に対する個体の抵抗性は変化しないとする報告⁸⁾などは、CTL の重要性を裏付けるものである。Nash ら¹⁵⁾は、中枢神経系では、防御反応に Lyt 2 陽性細胞が重要であるが、末梢組織（皮膚、粘膜）では、むしろ L3T4 陽性細胞の方が重要であるという、T 細胞 subset の組織による働きの差を報告している。しかし、角膜における HSV の増殖を十分に抑制するためには、L3T4 陽性細胞と Lyt 2 陽性細胞の両者が必要であるという細胞移入を用いた風見ら¹⁶⁾の報告もあり、Lyt 2 陽性細胞の意義についても完全に否定されたわけではない。最近では、特異抗体を静脈内に投与し、T 細胞 subset の negative selection を行い、L3T4 陽性細胞と Lyt 2 陽性細胞のそれぞれの役割を検討している報告がある¹⁷⁾。これによると、L3T4 陽性

細胞を depletion した場合、DTH の抑制と角膜実質炎の抑制がみられ、一方 Lyt 2 陽性細胞を depletion すると CTL が抑制され、実質炎はかえって悪化するという。

今回の我々の結果から、HSV 角膜感染後、L3T4 陽性細胞が Lyt 2 陽性細胞よりも早い時期に角膜実質内に浸潤してくることが確認された。これは、異なるウイルス株を用いた Wang ら¹⁸⁾の報告ともほぼ一致する。今回の結果だけから HSV 感染防御において L3T4 陽性細胞がより重要であると結論づけることは早急であるが、感染初期において、L3T4 陽性細胞が免疫反応の成立、あるいは角膜実質における炎症発現に深く関与していることは確実であろう。

細胞性免疫の働きを角膜ヘルペス感染に限って考えてみると、ウイルスの増殖抑制、ウイルス感染細胞の排除という合目的な細胞免疫反応の作用が、かえって角膜の混濁を惹起し、視力の予後にとって、望ましくない結果につながっている。L3T4 細胞、あるいは Lyt 2 陽性細胞が、この過程にどの様にかかわっているかをより詳しく明らかにし、その過程の抑制への道を検討することが今後の課題であろう。

文 献

- 1) Malaty R, Gebhardt BM, Franklin RM: HSV-specific IgA from tears blocks virus attachment to the cell membrane. *Curr Eye Res* 7: 313-320, 1988.
- 2) Raizman MB, Foster CS: Passive transfer of anti-HSV-1 IgG protects against stromal keratitis in mice. *Curr Eye Res* 7: 823-829, 1988.
- 3) Lausch RN, Oakes JE, Metcalf JF, Scimeca JM, Smith LA, Robertson SM: Quantitation of purified monoclonal antibody needed to prevent HSV-1 induced stromal keratitis in mice. *Curr Eye Res* 8: 499-506, 1988.
- 4) 齊藤春和: 角膜ヘルペスの免疫学的研究. *日眼会誌* 87: 1010-1016, 1983.
- 5) 木村泰朗, 山口達夫, 村田弥恵子: Herpes Simplex virus type-1 角膜炎の免疫組織学的解析. *日眼会誌* 93: 124-131, 1989.
- 6) 梶原 良: 実験的解膜ヘルペスの免疫学的研究. *日眼会誌* 91: 1296-1301, 1987.
- 7) 平川裕二: 単純ヘルペス角膜炎の免疫学的研究. *日眼会誌* 89: 208-213, 1985.
- 8) Lausch RN, Kleinschrodt WR, Monteiro C, Kayes SG, Oakes JE: Resolution of HSV Corneal Infection in the Absence of Delayed-Type hypersensitivity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1509-1515, 1985.

- 9) **Pepose JS, Gardner KM, Nestor MS, Foos RY, Pettit TH**: Detection of HLA Class I and II Antigens in Rejected Human Corneal Allografts. *Ophthalmology* 92: 1480—1482, 1985.
 - 10) **Whitsett CF, Stulting RD**: The Distribution of HLA Antigens on Human Corneal Tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 519—524, 1984.
 - 11) **Mcbride BW, McGill JI, Smith JL**: MHC class I and class II antigen expression in normal human corneas and in corneas from cases of herpetic keratitis. *Immunology* 65: 583—587, 1988.
 - 12) **Hayashi K, Uno T, Ohashi Y, Kazami N, Manabe R**: An analysis of the subpopulations in draining lymph node cells and MHC antigen induction in murine herpetic keratitis. *Curr Eye Res* 10 (Suppl): 55—62, 1991.
 - 13) 小出幸夫: HLA クラスII抗原の発現機構. *臨床免疫* 23: 718—730, 1991.
 - 14) **Baudouin C, Fredj-Reygrobellet D, Gastaud P, Lapalus P**: HLA DR and DQ distribution in normal human ocular structures. *Curr Eye Res* 7: 903—911, 1988.
 - 15) **Nash AA, Jayasuriya A, Phelan J, Cobbold SP, Waldmann H, Prospero T**: Different roles for L3T4⁺ 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.
 - 16) 風見宣生, 林皓三郎, 内田幸男: 免疫局所リンパ節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.
 - 17) **Newell CK, Martin S, Sendele D, Mercadal CM, Rouse BT**: Herpes Simplex Virus-Induced Stomal Keratitis: Role of T-lymphocyte Subsets in Immunopathology. *J Virol* 63: 769—775, 1989.
 - 18) **Wang H, Sheu M, Stulting RD, Kaplan HJ**: Immunohistochemical evaluation of murine HSV-1 keratouveitis. *Curr Eye Res* 8: 37—46, 1989.
-