

1 型単純ヘルペス実質性角膜炎の実験  
モデルによる免疫病理学的解析と治療  
の研究

研究課題番号 61570815

昭和63年度科学研究費補助金（一般研究C）  
研究成果報告書

平成元年3月



研究代表者 内田 幸男  
(東京女子医科大学 眼科学教室)

## はしがき

### 研究組織

研究代表者：内 田 幸 男（眼科学・教授）

研究分担者：林 皓三郎（ ” ・講師）

” : 風 見 宣 生（ ” ・助手）

” : 中 川 尚（ ” ・助手）

### 研究経費

昭和61年度 1,000千円

62年度 600千円

63年度 800千円

計 2,400千円

## 研究発表

### ア. 学会誌

1. 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. 東京女子医大雑誌57 281-285 1987
2. 風見宣生・林皓三郎・内田幸男：免疫局所リンパ節細胞はマウス単純ヘルペス角膜炎感染防御に有効である. 日本眼科学会雑誌92 1461-1465 1988
3. 林皓三郎：単純ヘルペスウイルス（HSV）眼感染と免疫反応—最近のトピックスから—. 日本眼科紀要38巻 763-774 1987

### イ. 口頭発表

1. 風見宣生・林皓三郎・内田幸男：各種単純ヘルペスウイルス1型株によるマウス角膜病変の比較. 第10回角膜カンファレンス 1986. 2
2. 風見宣生・林皓三郎・内田幸男：単純ヘルペス1型眼感染症に対する局所感染リンパ細胞の効果. 第90回日本眼科学会 1986. 5
3. 風見宣生・林皓三郎・内田幸男：単純ヘルペス1型角膜感染症に対するT細胞サブセットの働き. 第91回日本眼科学会 1987. 5
4. K. Hayashi, N. Kazami, Y. Uchida, : The role of local T cell subsets in recovery from a corneal herpes virus infection. VI International Congress of Virology 1987. 8
5. 林皓三郎・風見宣生・内田幸男：局所リンパ節T細胞サブセットの角膜ヘルペスにおける働き—in vitro培養による誘導効果について—. 第92回日本眼科学会 1988. 5
6. K. Hayashi, N. Kazami, Y. Uchida: Effect of in vitro cultivation of immune local lymph node cells for protection against corneal herpes infection. 13th International Herpes Virus Workshop, 1988. 8
7. 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T細胞の役割—in vitro培養の効果について. 第36回日本ウイルス学会総会 1988. 10

## 研究成果

- I. 各種の単純ヘルペス1型 (HSV-1) をマウス角膜に接種して病変形成を比較した。使用株は標準株としてCHR3、F株、弱毒株KOS、Ska、巨細胞形成株MP株である。8週齢、Balb/cマウス角膜に接種后经時的に細隙灯顕微鏡下に観察し、角膜病変の出現頻度をみた。また接種后7日目の眼球、涙腺、三叉神経節のウイルス価をしらべた。その結果、①CHR3株がもっとも実質混濁を伴う角膜ヘルペスの出現頻度が高かった。②弱毒KOS株、Ska株では、角膜病変がおこりにくかった。③Ska株を部分精製し感染価を $10^8$ PFU/ml以上にして接種しても同様に角膜病変はおこりにくかった。
- II. 角膜ヘルペス感染時の細胞性免疫の役割は1型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) の拡がりを阻止するという防御効果と共に、T細胞による反応があるがゆえに実質の混濁が進行するという2面を挙げることが出来る。角膜実質炎はDTH、又は、Tcによる標的細胞抗原に対する反応とそれにひきつづく活性化Mφの浸潤を主体とする炎症反応 (=DTH) にともなう組織障害によっておこることが明らかにされている。HSV抗原が長期にわたり角膜実質細胞に存続し、それに対してDTHがおこることが実質炎の病理発生にかかわることは、ヌードマウスに免疫脾細胞を移入した時に、はじめて実質障害がおきることから証明されている。又、静脈内にHSV-1を投与しDTH tolerantにしたマウスでは実質炎がおこらないという報告もある。Iの結果からCHR3株 (HSV-1) を用いBalb/cマウス角膜に感染させて角膜ヘルペスに伴う細胞性免疫反応の研究を行った。我々は、局所リンパ節免疫T細胞が防御反応を実質炎にそれぞれどのように関与するか、T細胞サブセットの働きについてさらに解析をすすめた。
- その結果①Balb/cマウス角膜ヘルペス感染7日後の局所リンパ節には、脾に比して約10倍の活性をもつCTLが誘導される。②これらCTLを抗L3T4抗体+補体、抗Lyt2抗体+補体処理によりsubsetに分けBalb/cマウスに移入すると、L3T4、Lyt2+細胞の両者が存在するときに、角膜、涙腺および三叉神経節へのウイルスの拡がりに対してもっとも防御的に働くことが明らかになった。一般にHSVに対するCTLはin vivoでsuppressor T細胞が誘導されるため、3-4日間のin vitroでの培養なしには検出されにくいとされている。我々は①で得た局所リンパ節T細胞に、a. IL2+UV不活化HSVウイルスを加える b. IL2+Liveウイルスを加える c.

Balb/cマウス胎児線維芽細胞にHSVを24-48時間感染し、 $\gamma$ 線照射又はマイトマイシンC処理によってkillしたものをstimulatorとして加える、という3種類の系をつくり5日間培養した。これらT細胞を抗L3T4抗体+補体、抗Lyt2+補体によってsubsetにわけ、Balb/cヌードマウスに移入した。これらヌードマウス角膜にHSV-1を感染し、それぞれの系の防御能を検討した。

その結果、①aのUV化ウイルスを用いたものではL3T4細胞のみが強い防御活性を示したが、Lyt2+細胞は全く防御活性を示さなかった。②bではL3T4、Lyt2細胞ともに防御活性が検出されなかった。③cではL3T4細胞の他、Lyt2細胞にも防御活性がみられたが、これはin vitroでの培養なしに免疫局所リンパ節T細胞をヌードマウスに移入した場合のT細胞の活性がL3T4細胞、Lyt2細胞の両方にみられたのと同様である。

又、cの系で i HSV-1感染24時間のstimulator細胞を $\gamma$ 線照射後Anti-Ia<sup>d</sup>抗体で処理すると、L3T4細胞の活性が誘導されない ii Anti-H-2<sup>d</sup>抗体でStimulator細胞を処理するとL3T4細胞のみならず、Lyt2細胞も防御活性を示さない iii Stimulator細胞を作成するとき、クロロキン加培養液で培養し、HSV-1を感染して24時間後のものを $\gamma$ 線処理を行うと、L3T4細胞、Lyt2細胞ともに防御活性が誘導されないことがわかった。

i~iiiの結果は、L3T4細胞の誘導には、class II MHCとHSV-1ウイルス抗原のassociationが(Anti-Ia<sup>d</sup>抗体の効果)、Lyt2細胞の誘導には、class I MHCとウイルス抗原のassociationが必要で(Anti-H-2<sup>d</sup>抗体の効果)かつウイルス抗原が、こうした細胞膜MHCとassociationするためには、感染によるウイルス増殖過程を通してウイルス抗原が細胞膜にくみ込まれていることが必要なことを示している(クロロキンの効果)。

これらの結果からin vitroで培養中の抗原提示の仕方によって誘導される(活性化)T細胞subsetが異なることが明らかになった。さらに、in vitroでのこれらT細胞サブセットが単独で生体内にあるときに、ウイルス感染細胞や抗原提示細胞によるprocessed Ag. に対して防御活性が誘導されるか否かを検討した。正常Balb/cマウス局所(耳前、及び頸下)リンパ節細胞をとり、抗L3T4抗体+補体、抗Lyt2+補体によって抗L3T4抗体+補体、抗Lyt2細胞にわけたのち+補体Balb/cヌードマウスに移入した。これらヌードマウスにHSV-1を感染したあと、Tリンパ球subsetを回収し

て、別のヌードマウスに移入した。角膜にHSV-1を感染させて防御能を調べた結果 ①L3T4細胞又はLyt2細胞が単独に存在する場合には、いずれも十分な抗HSV活性は誘導されなかった ②L3T4細胞、Lyt2細胞が、共に存在する場合には十分な抗HSV-1活性を誘導することが出来る。

## その結果

- ①感染防御に働くT細胞サブセットL3T4、Lyt2細胞の誘導の条件をそれぞれについて明らかにすることができた。
- ②L3T4、Lyt2両細胞の相互作用が誘導の段階から存在することがもっとも強い防御効果をもたらすことができる。
- ③L3T4マーカーはDTHに関与するTDH細胞のマーカーでもあるが、同じpopulation中にCTLとして働くものが存在すると考えられる。

## 今後の目標

- ①実質混濁の主因であるDTHに関するTDHとCTLとしてのL3T4及び、Lyt2細胞とを別々誘導し働くような工夫（たとえば静脈内にウイルス抗原を接種してDTHに対するsuppressor Tを誘導しておいて、L3T4を感作する）ができるか、又それがどれほど有効か否か ②角膜における実質混濁のもう一つの原因であるimmune complexの役割を検討する必要がある。