

## 原 著

## 実質型角膜ヘルペスの免疫遺伝学的解析

牧野 創

山口大学医学部眼科学教室 宇部市小串1144 (〒755-8505)

Key words : 実質型角膜ヘルペス, HLA, アリルタイピング

## 緒 言

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus, HSV) はヒト組織のうち外胚葉由来の組織に親和性が強く, 皮膚や粘膜など体表面の組織に感染し体内に侵入する。健康人では初感染時に臨床症状を呈することは稀であるが, 多くの場合は潜伏感染を成立してヒト体内に存続し, 年余にわたって再発というかたちで種々の疾患を引き起こす。HSVの主な標的器官は皮膚や中枢神経系などであるが, 外胚葉由来の細胞に富む眼球もしばしば標的器官となる。眼科的には結膜炎をはじめ, 網膜炎やブドウ膜炎など種々の眼ヘルペス感染症があるが, 角膜に発症する角膜ヘルペスは適切な治療を行わなければ角膜穿孔や重度の角膜混濁を生じ失明の原因ともなる重篤な眼疾患である。

角膜ヘルペスは主として単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) による角膜感染症であるが, その病態および臨床所見の違いから上皮型と実質型とに分類される。上皮型角膜ヘルペスは, 三叉神経節細胞内に潜伏感染していたHSV-1が紫外線やストレスなどの種々の刺激により再活性化し, 末梢器官である角膜の上皮細胞内で増殖して角膜上皮性病変を生じるものである。一方, 実質型角膜ヘルペスは角膜実質細胞などの細胞表面に提示されたHSV-1抗原に対する生体の免疫反応がその本態であり, CD8<sup>+</sup> T cellを介した細胞性免疫が主たる病態であると考えられて

いる。

HSV-1はヒトに対する親和性が強く, 多くの個体が成人するまでにHSV-1による感染をうけることが知られている<sup>1,2)</sup>。わが国をはじめ先進諸国においては社会の衛生状態の改善とともにHSV-1の初感染年齢が高くなりつつあるが, 若年者におけるHSV-1中和抗体価の上昇は依然として高率であり, 15歳から25歳においてその約60%に中和抗体価の上昇が認められている<sup>3)</sup>。しかしながら, 実際の臨床においてはHSV-1による角膜感染症を発症する個体は少数であり, とりわけ実質型角膜ヘルペスは上皮型角膜ヘルペスと比較しても限られた個体にしか発症せず<sup>4)</sup>, しかも罹病期間中もしくは年余にわたって同一個体に再燃あるいは再発する傾向を有する。実質型角膜ヘルペスに認められるこのような臨床疫学的特徴は, その発症病態に個体特異的な免疫遺伝学的因子が関与していることを示唆していると考えられる。

Human leukocyte antigen (HLA) はアロ抗原として自己・非自己の識別ならびに異物侵入に対する生体免疫システムの中心的役割を担っており, その多様性によって個々の生体における免疫応答の特異性を決定づけている。HLAはその分子構造ならびに生体免疫システムにおける役割の違いから, 主としてHLAクラスI抗原とHLAクラスII抗原に大別されており, さらにクラスI抗原はHLA-A抗原, B抗原, C抗原に, クラスII抗原はHLA-DP抗原, DQ抗原, DR抗原にそれぞれ分類されている。クラスI抗原は主としてCD8<sup>+</sup> T cellを介した細胞性免疫に, クラスII抗原はCD4<sup>+</sup> T cellを介した細胞性免疫および液性

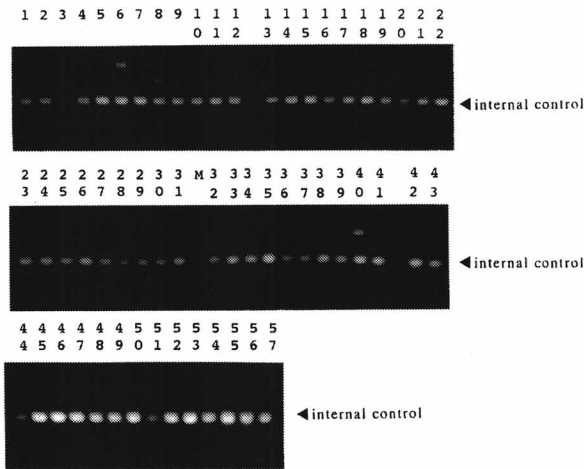


図1. PCR-ARMS法によるHLAクラスI (HLA-A\*, -B\*) アリルタイピング  
このサンプル (NIS-118) ではHLA-A\*24 (lane 6, 25), HLA-A\*26 (lane 8, 9), HLA-B\*51 (lane 40, 47) およびHLA-B\*40 (lane 43) に特異的バンドの出現が認められる。M: 分子量マーカー

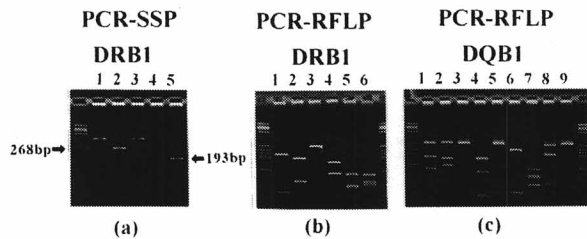


図2. PCR-SSP法およびPCR-RFLP法によるHLAクラスII (HLA-DRB1\*, -DQB1\*) アリルタイピング (NIS-118)

- 2-(a): PCR-SSP法によるHLA-DRB1\* group typing  
DR4 (lane 2: 268bp) およびDR9 (lane 5: 193bp) に特異的バンドの出現が認められる。lane 1およびlane 3に認められるバンドはinternal control。
- 2-(b): PCR-RFLP法によるHLA-DRB1\*0901 / \*0405アリルタイプのバンドパターン
- 2-(c): PCR-RFLP法によるHLA-DQB1\*0303 / \*0401アリルタイプのバンドパターン

免疫にそれぞれ関与している<sup>5,7)</sup>。また近年においては、強直性脊椎炎やナルコレプシーをはじめとする全身疾患のみならず、ベーチェット病やVogt-小柳-原田病など種々の眼疾患においてもHLAとの相関が報告されている<sup>8-12)</sup>。HLAとの相関を明らかにすることは、多くの疾患の病態を解明していく上で臨床的にも重要な意義をもつものと考えられる。

今回われわれは、実質型角膜ヘルペスの臨床疫学的特徴からその発症にHSV-1抗原に対する生体免疫

表1. 実質型角膜ヘルペス症例群でのHLAクラスI アリルタイプ頻度

HLA alleles	症例群 N=26 52 alleles		対照群 N=100 200 alleles		G値	P値	
	n	AF	n	AF			
A*02	12	0.231	63	0.315	1.454	0.228	
A*11	5	0.096	20	0.100	0.007	0.934	
A*24	16	0.308	68	0.340	0.196	0.658	
A*26	8	0.157	27	0.135	0.120	0.729	
A*31	7	0.135	14	0.070	2.023	0.155	
A*33	4	0.077	5	0.025	2.688	0.101	
計						$G_A=6.488$	
						$P_A=0.262$	(d.f.=5)
B*07	2	0.038	16	0.080	1.226	0.268	
B*13	1	0.019	3	0.015	0.045	0.832	
B*15	6	0.115	20	0.100	0.103	0.748	
B*35	4	0.076	28	0.140	1.640	0.200	
B*39	1	0.019	8	0.040	0.594	0.441	
B*40	15	0.288	37	0.185	2.540	0.111	
B*44	2	0.038	12	0.060	0.395	0.529	
B*46	1	0.019	7	0.035	0.374	0.541	
B*51	11	0.211	20	0.100	4.241	0.040	
B*52	3	0.057	23	0.115	1.653	0.199	
B*54	2	0.038	10	0.050	0.127	0.721	
B*55	2	0.038	4	0.020	0.538	0.463	
B*56	1	0.019	2	0.010	0.265	0.607	
B*58	1	0.019	1	0.005	0.854	0.355	
計						$G_B=14.595$	
						$P_B=0.333$	(d.f.=13)

AF: アリル頻度  
 $G_A$ : HLA-A各アリルにおけるG値の合計値  
 $G_B$ : HLA-B各アリルにおけるG値の合計値  
 d.f.: 自由度  
 $P_A$ :  $G_A=6.488$ におけるP値  
 $P_B$ :  $G_B=14.595$ におけるP値

応答の個体差が関与していると考え、疾患の背景にある免疫遺伝学的傾向を明らかにするため実質型角膜ヘルペス症例についてHLA対立遺伝子型 (アリルタイプ) 頻度の解析を行った。

方法と症例

試薬

Ficoll-Paque Plus<sup>®</sup>はAmersham Pharmacia Biotec (Buckinghamshire, England) より購入した。HLA class I SSP ARMS-PCR typing kit<sup>®</sup>は12th International Histocompatibility Workshop で用いられたものを使用した。Amplitaq DNA polymerase<sup>®</sup>はRoche Diagnostic Systems (Branchburg, NJ, USA) より、DNA extraction kit EX-R&D<sup>®</sup>, Smitest HLA-DR DNA typing kit<sup>®</sup>, Smitest HLA-DRB1 DNA typing kit<sup>®</sup>およびSmitest HLA-DQB1 DNA typing kit<sup>®</sup>は住友金属工業株式会社 (東京) より購入した。Biotest Elpha DQB Typing<sup>®</sup>はBiotest (Dreieich, Germany) より購入した。

表2. 実質型角膜ヘルペス症例群でのHLAクラスIIアレルタイプ頻度

HLA alleles	症例群 N=26 52 alleles		対照群 N=100 200 alleles		G値	P値
	n	AF	n	AF		
DRB1*0101	3	0.058	13	0.065	0.038	0.846
DRB1*0405	9	0.173	31	0.155	0.099	0.753
DRB1*0406	1	0.019	6	0.030	0.193	0.660
DRB1*0410	2	0.038	9	0.045	0.044	0.835
DRB1*0802	2	0.038	10	0.050	0.127	0.721
DRB1*0803	2	0.038	10	0.050	0.127	0.721
DRB1*0804	1	0.019	1	0.005	0.854	0.355
DRB1*0901	12	0.231	36	0.180	0.665	0.415
DRB1*1101	2	0.038	5	0.025	0.256	0.613
DRB1*1201	1	0.019	4	0.020	0.001	0.972
DRB1*1202	3	0.058	4	0.020	1.818	0.177
DRB1*1302	3	0.058	8	0.040	0.289	0.591
DRB1*1401	1	0.019	9	0.045	0.843	0.359
DRB1*1403	1	0.019	5	0.025	0.062	0.803
DRB1*1405	4	0.077	2	0.010	6.104	0.014
DRB1*1501	1	0.019	11	0.055	1.353	0.245
DRB1*1502	3	0.058	23	0.115	1.635	0.199
DRB1*1602	1	0.019	1	0.005	0.854	0.355
計					$G_{DR}=15.362$	
					$P_{DR}=0.569$	(d.f.=17)
DQB1*0301	7	0.135	21	0.105	0.352	0.553
DQB1*0302	4	0.077	15	0.075	0.002	0.963
DQB1*03032	13	0.250	37	0.185	1.050	0.305
DQB1*0401	9	0.173	34	0.170	0.003	0.958
DQB1*0402	1	0.019	12	0.060	1.724	0.189
DQB1*0501	3	0.058	15	0.075	0.196	0.658
DQB1*05031	5	0.096	7	0.035	2.881	0.090
DQB1*0601	5	0.096	29	0.145	0.358	0.904
DQB1*0602	1	0.019	13	0.065	2.051	0.152
DQB1*0604	4	0.077	8	0.040	1.106	0.293
計					$G_{DQ}=9.723$	
					$P_{DQ}=0.723$	(d.f.=9)

AF: アレル頻度

$G_{DR}$ : HLA-DRB1各アレルにおけるG値の合計値

$G_{DQ}$ : HLA-DQB1各アレルにおけるG値の合計値

d.f.: 自由度

$P_{DR}$ :  $G_{DR}=0.569$ におけるP値

$P_{DQ}$ :  $G_{DQ}=0.723$ におけるP値

### 対象

山口大学医学部附属病院眼科において実質型角膜ヘルペスと診断された26症例を対象とし、これを症例群とした。実質型角膜ヘルペスの診断は、細隙灯顕微鏡による前眼部所見を主体に行った。結膜炎、毛様充血、円板状ならびにびまん性角膜実質浮腫、豚脂様角膜後面沈着物や、前房内細胞およびフレアなどの活動性所見のほか、治癒過程における角膜実質の菲薄化や混濁などの癒痕化所見ならびに角膜知覚の低下なども参考にして総合的に臨床的診断を行った。山口県在住の健常人100例を対照群とした。

対照群の全例において、遺伝的疾患の素因ならびに特記すべき内科的全身疾患や過去における角膜ヘルペスの既往がないことを確認した。症例群ならびに対照群に対して、研究の目的、予想される危険、任意の参加であることなどのインフォームドコンセントを行い、書面による同意を得た。

### HLAタイピング

症例群および対照群より約20mlの末梢静脈血をヘパリン加注射筒に採血し、Ficoll-Paque Plus<sup>®</sup>を用いた密度勾配遠心法によりリンパ球の分離を行った<sup>13,14)</sup>。分離したリンパ球は液体窒素容器内に凍結保存し、HLAタイピングを行う前に融解して用いた<sup>15)</sup>。

血清学的タイピングは、補体依存性リンパ球細胞障害試験により行い<sup>16)</sup>、日本人に認められるHLA抗原を中心に検索を行った。クラスI抗原については16種類のHLA-A抗原、23種類のB抗原および7種類のC抗原に対してタイピングを行った。クラスII抗原については15種類のHLA-DR抗原ならびに7種類のDQ抗原に対して検索を行った。ただし、HLA-C抗原については抗原と抗体の反応が弱く、判定が困難な症例が多かったため解析の対象から除外した。

アレルタイピングには、凍結保存リンパ球から抽出した染色体DNAを用いた。染色体DNAの抽出は、DNA extraction kit EX-R&D<sup>®</sup>を用いたguanidine HCL method<sup>17)</sup>により行った。すべての染色体DNAサンプルは、濃度を100-150ng/mlに調整したうえでPolymerase chain reaction (PCR) 法により増幅したのちアレルタイピングに用いた。PCRには耐熱性DNAポリメラーゼを使用し、DNA増幅装置はGeneAmp<sup>™</sup> PCR System 9600およびGeneAmp PCR System 2400-R (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)を用いた。

HLAクラスIアレルタイピングにはAmplification Refractory Mutation System (ARMS)<sup>18,19)</sup> (図1)を

表3. 実質型角膜ヘルペス症例群および対照群におけるHLA-A\*31と-A\*33ならびにHLA-B\*51と-B\*40のcombined frequency

	症例群 N=26		対照群 N=100		RR	G値	P値
	n		n				
A*31+A*33	11 (42.3%)		19 (19.0%)		3.1	5.646	0.018
B*51+B*40	18 (69.2%)		49 (49.0%)		2.3	3.479	0.062

RR: 相対危険率

用いて39種類のHLA-Aアレルタイプおよび58種類のHLA-Bアレルタイプについて検索を行った。HLAクラスII DRB1アレルタイプピングは、まず polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) 法を用いてHLA-DRアレルのgroup typingを行ったのち<sup>20)</sup>、polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法<sup>21)</sup>にて43種類のHLA-DRB1アレルタイプを決定した(図2-(a), 2-(b))。HLAクラスII DQB1アレルタイプピングはPCR-RFLP法<sup>22)</sup>およびenzyme-linked probe hybridization assay (Elpha) 法<sup>23,24)</sup>を用いて25種類のHLA-DQB1アレルタイプについて検索を行った(図2-(c))。なお、HLAクラスIアレルタイプピングで施行したARMS法およびHLAクラスIIのgroup typingで施行したPCR-SSP法において用いたプライマーは、いずれも過去において報告され使用されたものを用いた<sup>19,25,26)</sup>。

#### 統計学的解析

すべてのサンプルについて上記のHLAタイプピングを施行したのち、症例群と対照群とのあいだで各HLAアレルタイプ頻度の比較検討を行った。統計学的解析にはG test<sup>27,28)</sup>を用い、P値が0.05未満の場合を統計学的に有意差ありとした。

## 結 果

#### HLAクラスI

表1に症例群と対照群における各クラスIアレルタイプ(HLA-A\*およびHLA-B\*)の頻度ならびに統計学的解析の結果を示す。HLA-Aアレルでは二群間でいずれのアレルタイプにおいても統計学的に頻度の有意差は認められなかったが、症例群ではHLA-A\*31とHLA-A\*33の増加傾向が認められた。HLA-Bアレルでは対照群と比較して症例群においてHLA-B\*51の頻度が増加しており、二群間で統計学的な有意差が認められた( $P=0.040$ )。また、統計学的な有意差は認められなかったが、症例群においてHLA-B\*40の頻度が増加傾向を示した。

#### HLAクラスII

表2に症例群と対照群におけるクラスIIアレルタイプ(HLA-DRB1\*およびHLA-DQB1\*)の頻度なら

びに統計学的解析の結果を示す。HLA-DRB1アレルでは、症例群においてHLA-DRB1\*1405の頻度が増加しており、対照群とのあいだに統計学的な有意差を認めた( $P=0.014$ )。HLA-DQB1アレルでは二群間において統計学的に頻度の有意差を認めるアレルは存在しなかった。しかしながら、症例群においてHLA-DQB1\*05031の増加傾向が認められた。

## 考 察

今回の研究では実質型角膜ヘルペスの既往がある症例群において、HLAクラスIアレルではHLA-A\*31, -A\*33, -B\*40およびHLA-B\*51の4種類のアレルタイプが、HLAクラスIIアレルではHLA-DRB1\*1405およびHLA-DQB1\*05031の2種類のアレルタイプがそれぞれ対照群と比較して頻度の増加を認めており、実質型角膜ヘルペスの発症に特異的なHLAが関与している可能性が示唆された。

角膜ヘルペスとHLAの相関に関しては過去にもいくつかの研究が報告されている<sup>29-32)</sup>。Zimmermanらは再発性の上皮型角膜ヘルペス症例においてHLA-B5の頻度が有意に増加していると報告している<sup>29)</sup>。またDamgaard-Jensenらは、実質型と上皮型の明確な区別はしていないが、角膜ヘルペス症例においてHLA-B5の頻度が有意に増加していることを報告している<sup>30)</sup>。現在HLA-B5にはHLA-B51(HLA-B\*51アレル)とHLA-B52(HLA-B\*52アレル)が属していると考えられているが、ZimmermanおよびDamgaard-Jensenらの報告ではHLA-B51およびHLA-B52単独での頻度解析は行われていない。しかしながら、これらの研究が行われた各地域におけるHLA-B51およびHLA-B52のアレル頻度は、Zimmermanらのアメリカ合衆国ではHLA-B51=3.7%およびHLA-B52=1.2%であり、またDamgaard-JensenらのデンマークにおいてはHLA-B51=5.7%およびHLA-B52=0.7%となっており<sup>30)</sup>、いずれの地域においてもHLA-B51の頻度がHLA-B52の頻度に比べ約3~8倍と高い。したがって、これらの報告におけるHLA-B5はHLA-B51優位である可能性が高いと考えられる。今回われわれの結果では、実質型角膜ヘルペス症例群においてHLA-B\*51アレル頻度が有意に増加しており、角膜ヘルペス感染症とHLAとの相関に関してこれら過去の報告とほぼ同

様の結果を示したと考えられる。ただし、これら過去の報告では、HLA-B5を保有していた角膜ヘルペス症例に実質型角膜ヘルペスの既往があったか否かについては明記されていないため、実質型角膜ヘルペスとHLA-B5との相関については不明である。一方、Meyers-Elliottらは再発性の実質型角膜ヘルペスとHLAとの相関について報告している<sup>30)</sup>。彼らの報告では実質型角膜ヘルペス症例においてHLA-Aw30 (A30) と-DRw3 (DR3) の頻度が有意に増加しているが、HLA-B5の頻度は対照群とのあいだに差を認めておらず、今回のわれわれの研究とは異なる結果が出ている。その原因の一つとして、地域におけるHLA出現頻度の違いが考えられる。HLA-A30およびHLA-DR3アリルはMeyers-Elliottらが対象としたアメリカ合衆国白人集団では比較的高い頻度で認められるのに対し (HLA-A30=2.6%, HLA-DR3=10.1%), 日本人集団においてはもともと出現頻度が低い (HLA-A30=0.4%, HLA-DR3=0.2%)。一方 HLA-B5アリルは日本人集団では高い頻度で認められるのに対し (20.0%), アメリカ合衆国白人集団では比較的出现頻度が低い (4.9%)<sup>30)</sup>。集団においてももともと出現頻度の低いHLAは疾患との相関において対照群とのあいだに有意な差が出にくいと考えられ、民族的に異なる各集団の背景にあるHLA出現頻度の違いが結果に影響していると考えられる。また、Jensenらは実質型角膜ヘルペスとHLA-B5との相関について、自らの研究を含む4つの研究の集計を統計学的に処理した結果を報告している<sup>31)</sup>。この報告では、実質型角膜ヘルペス症例群においてHLA-B5の頻度が統計学的に有意な増加を示しており、大きな母集団においては実質型角膜ヘルペスとHLA-B5とのあいだに有意な相関が認められることを示している。

今回の研究では対照群と比較して症例群においてHLA-B\*51の頻度が有意に増加しており、実質型角膜ヘルペスの発症との有意な相関が認められたが、その他のクラスIアリルではHLA-A\*31とHLA-A\*33が、それぞれ症例群において高い頻度を示した (表1)。これら二つのアリルタイプはそれぞれ単独では対照群とのあいだに統計学的な有意差を認めなかったが、二つを合わせたアリルタイプ頻度を解析したところ対照群とのあいだに統計学的な有意差が認められた (表3)。A31およびA33の二つのHLA抗原

分子には、ともに、抗原ペプチド内のアンカーアミノ酸がLeu-Arg, Val-Arg, Try-Arg, Phe-Argといった共通のアミノ酸配列 (アンカーモチーフ) を有するペプチドが結合すると考えられており<sup>32)</sup>、これら二つのHLA抗原は同じHSV抗原ペプチドをT cellに提示している可能性がある。したがってこの結果は、特異的なHLA / HSV抗原ペプチド複合体に対するT cellの反応が実質型角膜ヘルペスの発症病態に関与している可能性を示唆するものと考えられる。

HLA-Bアリルでは対照群とのあいだに統計学的な有意差の認められたHLA-B\*51以外に、HLA-B\*40の頻度が症例群において増加していた。HLA-B40は症例群で増加傾向のみられたHLA-A31, -A33およびHLA-B51のいずれの抗原とも共通のアンカーモチーフを有していない<sup>33)</sup>。しかしながら、表3に示すように、HLA-B\*51と合わせたアリルタイプ頻度は症例群の70%近くに達しており、対照群とのあいだに統計学的な有意差こそ認められないものの ( $P=0.062$ ) この二つのアリルタイプを合わせた相対危険率は2.3と高値を示している。このことはHLA-B51とHLA-B40とのあいだに免疫システムに関与するなんらかの共通因子が存在し、実質型角膜ヘルペスの発症に関わっている可能性を示唆していると考えられる。

ヒトの場合、HLA抗原蛋白をコードする複数の遺伝子座は第6染色体短腕上に約3500kbpの領域にわたって存在しているが、通常これらのHLA遺伝子群は一塊となって次世代へと継承される。その結果、地理的あるいは民族的に隔離された集団においては、ある特定のクラスIアリルタイプとクラスIIアリルタイプとの組み合わせが高頻度に出現する傾向が存在する (連鎖不平衡)。このクラスIおよびクラスIIアリルタイプの連鎖はhaplotype linkageとよばれ、人種や民族あるいは生活地域の違いによって出現頻度の高いhaplotype linkageのパターンは異なる。今回クラスIIアリルタイプについては実質型角膜ヘルペスの症例群においてHLA-DRB1\*1405とHLA-DQB1\*05031の増加が認められた。HLA-DRB1\*1405を有する症例は26症例中4症例であったが、そのすべての症例においてHLA-DQB1\*05031との連鎖が認められ、さらにこのDRB1\*1405とDQB1\*05031の連鎖を有する4症例のすべてにHLA-B\*40との連鎖が認められた。HLA-B\*40、-

DRB1\*1405およびHLA-DQB1\*05031の連鎖は日本人において比較的高頻度に認められるhaplotypeであり<sup>35)</sup>, HLA-DRB1\*1405とHLA-DQB1\*05031の増加はHLA-B\*40とのhaplotype linkageによる可能性が高いと考えられた。

実質型角膜ヘルペス症例群において統計学的に有意な頻度の増加が認められたHLA-B\*51はベーチェット病と強い相関があることが知られている<sup>36)</sup>。しかしながら、現在のところHLA-A\*31, -A\*33, -B\*40とベーチェット病との相関は報告されていない。今回の研究では、実質型角膜ヘルペス症例群において、HLA-B\*51とともにHLA-A\*31, -A\*33, -B\*40で頻度の増加傾向が認められた。さらに最近の報告ではHLA-B遺伝子座の近傍にMICA geneの存在が確認され、その中のMICA6 geneはベーチェット病とのあいだにHLA-B51よりも強い相関があることが示唆されている<sup>36)</sup>。MICA 6 geneはHLA-B\*44, -B\*51およびHLA-B\*52の3種類のアリルタイプと各々linkしていることが知られているが<sup>36)</sup>、今回われわれがHLA-B\*44, -B\*51およびHLA -B\*52を合わせたアリルタイプ頻度を症例群と対照群とで比較したところ二群間に有意な差は認められず、実質型角膜ヘルペスとMICA 6 geneとの相関は示唆されなかった。したがって、今回の結果は実質型角膜ヘルペスに特有なものと考えられる。

現在、実質型角膜ヘルペスの発症病態には異なった二つの細胞性免疫機構が関与していると考えられている。一つはCD4<sup>+</sup> T cellがHLAクラスII抗原を認識することにより引き起こされる遅延型過敏反応であり、もう一つはCD8<sup>+</sup> T cellがHLAクラスI抗原を認識することにより生じる抗原特異的な細胞障害反応である<sup>37-40)</sup>。今回の結果では、症例群と対照群とを比較した場合のHLA-A, -B, -DRB1および-DQB1の各アリル全体のP値 ( $P_A$ ,  $P_B$ ,  $P_{DR}$ および $P_{DQ}$ ) は  $P_A = 0.262$ ,  $P_B = 0.333$ ,  $P_{DR} = 0.569$ ,  $P_{DQ} = 0.723$ であり (表1, 2), 実質型角膜ヘルペスの発症にはHLAクラスI抗原の関与がより重要であることを示唆している。このことはウイルスなどの内在性抗原の提示がHLAクラスI分子によってなされることと矛盾しておらず、実質型角膜ヘルペスの発症病態においてHLAクラスI抗原およびCD8<sup>+</sup> T cellを介した抗原特異的細胞性免疫が重要な役割をはたしていると考えられる。

実質型角膜ヘルペスの発症に特定のHLAが関与していることが示された。このことは、特定の個体にのみ再発を繰り返すという実質型角膜ヘルペスの臨床疫学的特徴が、個体の免疫遺伝学的特異性に依存していることを示唆している。さらに、実質型角膜ヘルペスの病態である免疫反応には、ある特定のHLAクラスI抗原分子によって提示されるHSV-1抗原ペプチドが重要な役割を果たしていると考えられ、臨床的な免疫病態を引き起こす抗原ペプチドの選択がHLA抗原分子のアンカーモチーフによって拘束されている可能性も示唆された。今後、抗原ペプチドを認識するT cellのエピトープや角膜組織中の自己抗原を解析することにより、実質型角膜ヘルペスの病態の解明や新たな治療法あるいは予防法の確立に貢献し得ると考えられる。

## 謝 辞

本研究は、鹿児島大学医学部ウイルス学教室との共同研究として行われた。長年にわたる御指導と本論文の御校閲を賜りました園田俊郎教授 (鹿児島大学医学部ウイルス学教室) ならびに西田輝夫教授 (山口大学医学部眼科学教室) に心より深謝いたします。また、HLAタイピングに関して御指導および御協力をいただきました屋敷伸治先生、桑山昌洋先生、平井慎一郎氏 (鹿児島大学医学部ウイルス学教室) に感謝の意を表するとともに、本研究の全般にわたり御協力をいただいた山口大学医学部眼科学教室員の方々に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Buddingh GJ, Schrum DI, Lanier JC, Guidry DJ. Studies of the natural history of herpes simplex infections. *Pediatrics*. 1953; **11**: 595-610.
- 2) Duke-Elder S. The herpes virus. In: Duke-Elder S, ed. *Diseases of the Outer Eye. System of Ophthalmology*, VIII, part I. Henry Kimpton: London; 1965: 307-334.
- 3) Holland EJ, Mozayani RM, Schwartz GS. Herpes simplex keratitis. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds. *Cornea*, vol.II. Mosby-Year Book:

- St Louis (MO) ; 1977 ; 1191-1223.
- 4) Liesegang TJ, Melton III LJ, Daly PJ, Ilstrup DM. Epidemiology of ocular herpes simplex -Incidence in Rochester, Minn, 1950 through 1982-. *Arch Ophthalmol.* 1989 ; **107** : 1155-1159.
  - 5) Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Ann Rev Immunol.* 1989 ; **7** : 601-624.
  - 6) Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 1994 ; **76** : 287-299.
  5. Baringer JR, Swoveland P. Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. *N Engl J Med.* 1973 ; **29** : 648-650.
  - 7) Hill A, Ploegh H. Getting the inside out: the transporter associated with antigen processing (TAP) and the presentation of viral antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 ; **92** : 341-343.
  - 8) Ebringer A, Baines M, Ptaszynska T. Spondyloarthritis, uveitis, HLA-B27 and Klebsiella. *Immunol Rev.* 1985 ; **86** : 101-116.
  - 9) Neely S, Rosenberg R, Spire JP, Antel J, Arnason BGW. HLA antigens in narcolepsy. *Neurology.* 1987 ; **37** : 1858-1860.
  - 10) Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology.* 1998 ; **50**(Suppl 1) : S16-S22.
  - 11) Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M. Close Association of HLA-Bw51 with Behcet's disease. *Arch Ophthalmol.* 1982 ; **100** : 1455-1458.
  - 12) Islam SM, Numaga J, Matsuki K, Fujino Y, Maeda H, Masuda K. Influence of HLA-DRB1 gene variation on the clinical course of Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994 ; **35** : 752-756.
  - 13) Harris R, Ukaejiofo EO. Tissue typing using a routine one-step lymphocyte separation procedure. *Br J Haematol.* 1970 ; **18** : 229-235.
  - 14) Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol.* 1976 ; **5**(suppl.) : 9-15.
  - 15) Katahira Y, Yashiki S, Fujiyoshi T, Nomura K, Tara M, Mori M, Setoyama M, Kanzaki T, Shida H, Sonoda S. In vitro induction of cytotoxic T lymphocytes against HTLV-1-infected T cells from adult T cell leukemia patients, asymptomatic HTLV-1 carriers and seronegative healthy donors. *Jpn J Cancer Res.* 1995 ; **86** : 21-27.
  - 16) Terasaki PI, Bernoco D, Park MS, Ozturk G, Iwaki Y. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. *Am J Clin Pathol.* 1978 ; **69** : 103-120.
  - 17) Bowtell DD. Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal Biochem.* 1987 ; **162** : 463-465.
  - 18) Marsh SGE, Bunce M, Moses JH, Krausa P, Sadler AM, Petronzelli F, Bodmer JG. Class I DNA typing study. In: Charron D, ed. *Genetic Diversity of HLA Functional and Medical Implication.* Medical and Scientific International Publisher: Paris; 1997 ; **199** : 215.
  - 19) Sadler AM, Petronzelli F, Krausa P, Marsh SGE, Guttridge MG, Browning MJ, Bodmer JG. Low-resolution DNA typing for HLA-B using sequence-specific primers in allele- or group-specific ARMS/PCR. *Tissue Antigens.* 1994 ; **44** : 148-154.
  - 20) Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens.* 1992 ; **39** : 225-235.
  - 21) Ota M, Seki T, Fukushima H, Tsuji K, Inoko H. HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens.* 1992 ; **39** : 187-202.
  - 22) Nomura N, Ota M, Tsuji K, Inoko H. HLA-DQB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens.* 1991 ; **38** : 53-59.
  - 23) Ballas M, Dzwonkowski M, Grabert A, Lenhard V. A novel DRB SSO-typing system for routine HLA DNA testing. In: Sonoda S, Yashiki S, Fujiyoshi T, eds. *MHC & IRS supplement to volume 1.* Nihon igakukan: Tokyo Japan ; 1994 : 169-171.
  - 24) Miyamoto M, Tokunaga K, Akaza T, Juji T.

- Evaluation of applicability of Biotest DRB SSO-typing kit. In: Sonoda S, Yashiki S, Fujiyoshi T, eds. *MHC & IRS* supplement to volume 1. Nihon Igakukan: Tokyo Japan ; 1994 : 172-174.
- 25) 12th International Histocompatibility Workshop HLA Class I SSP ARMS-PCR typing kit Reference manual. Imperial Cancer Reserch Fund: London.
- 26) Onishi H, Iida J, Tanaka H, Inoko H. SMITEST HLA DNA typing system -HLA class II typing with PCR-RFLP method-. In: Sonoda S, Yashiki S, Fujiyoshi T, eds. *MHC & IRS* supplement to volume 1. Nihon igakukan: Tokyo Japan ; 1994 : 73-95.
- 27) Sokal RR, Rohlf FJ. The principles and practice of statistics in biological research. In: Biometry, 2nd ed. Freeman: San Francisco; 1981.
- 28) Apple JA, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature Genetics*. 1994 ; **6** : 157-162.
- 29) Zimmerman TJ, McNeill JI, Richman A, Kaufman HE, Waltman SR. HLA types and recurrent corneal herpes simplex infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977 ; **16** : 756-757.
- 30) Damgaard-Jensen L, Ehlers N, Kissmeyer-Nielsen F. HLA types in corneal diseases. *Acta Ophthalmol*. 1979 ; **57** : 982-985.
- 31) Meyers-Elliott RH, Elliott JH, Maxwell WA, Pettit TH, O'Day DM, Terasaki PI, Bernoco D. HLA antigens in recurrent stromal herpes simplex virus keratitis. *Am J Ophthalmol*. 1980 ; **89** : 54-57.
- 32) Jensen KB, Nissen SH, Svejgaard A, Jersild C, Klauber A. Recurrent herpetic keratitis and HLA antigens. *Acta Ophthalmol*. 1984 ; **62** : 61-68.
- 33) Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, eds. *HLA 1991 Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference*, vol. I. Oxford University Press ; 1992 : 1065-1220.
- 34) Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 1995 ; **41** : 178-228.
- 35) Akaza T, Imanishi T, Fujiwara K, Tokunaga K, Yashiki S, Fujiyoshi T, Sonoda S, Juji T. HLA alleles and haplotypes of Japanese population. In: Sonoda S, Yashiki S, Fujiyoshi T, eds. *MHC & IRS* supplement to volume 1. Nihon Igakukan: Tokyo Japan ; 1994 : 219-226.
- 36) Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 ; **94** : 1298-1303.
- 37) Lawman MJP, Rouse BT, Courtney RJ, Walker RD. Cell-mediated immunity against herpes simplex induction of cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun*. 1980 ; **27** : 133-139.
- 38) Carter VC, Schaffer PA, Tevethia SS. The involvement of herpes simplex virus type 1 glycoproteins in cell-mediated immunity. *J Immunol*. 1981 ; **126** : 1655-1660.
- 39) Hendricks RL, Epstein RJ, Tumpey T. The effect of cellular immune tolerance to HSV-1 antigens on the immunopathology of HSV-1 keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989 ; **30** : 105-115.
- 40) Hendricks RL, Tao MSP, Glorioso JC. Alteration in the antigenic structure of two major HSV-1 glycoproteins, gC and gB, influence immune regulation and susceptibility to murine herpes keratitis. *J Immunol*. 1989 ; **142** : 263-269.



# Immunogenetic Analysis of Stromal Herpetic Keratitis

Hajimu MAKINO

*Department of Ophthalmology,  
Yamaguchi University School of Medicine, 1144 Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

## SUMMARY

Almost everyone has experienced subclinical herpes simplex virus (HSV) infection by adulthood, however, only a limited number of individuals develop recurring stromal herpetic keratitis (SHK). It has been believed that the immune mechanisms participate in the etiology of SHK. The clinicoepidemiological characterization of SHK suggests that the sensitivity to HSV antigen in the cornea might vary among individuals. To clarify the etiological factor(s) in SHK, we investigated immunological background of the SHK patients based on their immunogenetic features.

Immunogenetic background of the SHK patients and healthy control population was determined by HLA alleletypes using peripheral blood lymphocytes.

Frequency of HLA-B\*51 and -DRB1\*1405 in the SHK group were significantly increased as compared with those in the control group. The frequency of HLA-A\*31, -A\*33, -B\*40 and HLA-DQB1\*05031 seemed to be increased in the SHK group, though statistically not significant.

Increased frequency of HLA-DRB1\*1405 and HLA-DQB1\*05031 among SHK patients seemed to result from the haplotype linkage with HLA-B\*40. The clinicoepidemiological features of SHK were characterized by specific HLA class I alleles (HLA-A\*31, -A\*33, -B\*40 and HLA-B\*51), suggesting that the antigen peptide specific immune mechanism mediated by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes might participate in the etiology of SHK.