

遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究：  
マウスにおけるハプテン化脾細胞投与による接触性  
皮膚炎発現の抑制

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8926">http://hdl.handle.net/2297/8926</a>

## 遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究

—マウスにおけるハプテン化脾細胞投与による  
接触性皮膚炎発現の抑制—

富山医科薬科大学医学部細菌学・免疫学教室

小 西 健 一  
山 岸 高 由  
桜 井 信 也

(昭和56年6月19日受付)

本論文の要旨の一部は、昭和54年10月、第16回日本細菌学会中部支部総会において発表した。

**Key word** 接触性皮膚炎, 遅発型過敏症, ハプテン化細胞, 免疫抑制

Diens & Schoenheit<sup>1)</sup>に始まった遅発型皮膚反応(DHS)の発現機序に関する研究は近年急速な進歩をとげたことは周知のところである。なかでも重要な知見の一つは Freund's complete adjuvant(FCA)の同時投与によって発現する DHS が同一抗原の前投与によって抑制される—immune deviation—という事実<sup>2)-4)</sup>であり、私達も同人らとともにこれに関する一連の研究を行った結果、DHS 発現が FCA 処置と抗原投与の位置関係に左右されるという事実から DHS の発現とその抑制は抗原前投与による抑制因子の生成と FCA 処置による発現準備因子の産生との競合によるのではなからうかと推論した<sup>5)-9)</sup>。

このようにツベルクリン型皮膚反応の発現には時期の差はあれ、抗原と adjuvant の併用を要するが、接触性皮膚炎(CD)は DHS の一型でありながら小分子量の抗原の経皮的投与によって惹起される点で特長があり、しかも adjuvant の併用を必要としない<sup>10)-13)</sup>。この点から CD における immune deviation 類似の現象を観察することによってその発現機序を解析しツベルクリン型反応のそれと比較検討することは adjuvant の作用、ハプテンおよびその担体の認識機構を知る上で有用であると考えられる。

そこで私達は本報において、まずハプテン化脾細胞

を前投与することによりピクリン酸誘起の CD が抑制されるか否かを観察し、抑制の機作について若干の検討を加えた。以下はその成績の概要である。

## 材料および方法

- 1) 動物: 4~6週令, DDN および ICR マウスの雄を用いた。
- 2) 抗原: 和光純薬製 Picryl chloride(2-4-6-trinitro-1-chlorobenzene, 以下 PC)およびその誘導体である Trinitrobenzene sulfonate(TNBS)を使用した。
- 3) 培養液: 組織培養液は日水製薬製 RPMI 1640 を、仔ウシ血清(FCS)は Flow laboratory 社販売のものを用いた。
- 4) RI: RI 標識には New England Nuclear 社製 <sup>3</sup>H-ウリジン(30 ci/m mol)を、シンチラントには Amersham 社製 AC S=II を使用した。
- 5) 代謝阻害剤: 共和醸酵製 mitomycin C (MMC)および半井化学製 5-fluorouracil (5FU)を用いた。
- 6) PC による感作: 前日除毛したマウスの腹壁に 5% PC, 0.1 ml を塗布することによって感作した。
- 7) CD の惹起とその測定: 1% PC in oleum, 20  $\mu$ l を耳介に塗布し、塗布前および 24 時間後の耳介の厚

Studies on the development of Delayed Hypersensitivity —Suppression of the Development of Contact Dermatitis by Transfer with Haptenated Spleen Cells in Mice—.

**Kenichi Konishi, Takayoshi Yamagishi & Shinya Sakurai**, Department of Bacteriology and Immunology, School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama.

みを尾崎製作所製 dial gauge "Peacock"にて計測した。

8) ハブテン化脾細胞 (TN-SC) の作製: 頸椎脱臼後, 頸部を切断して可及的脱血させたマウスより脾臓をとり出し, RPMI 1640 液中に圧出して, 型のごとく脾細胞浮遊液を得た。これを 1,150 rpm, 5 分間遠心し, 得られた沈殿を軽く振って解きほぐし, 0.83% 塩化アンモニウム液 5~8 ml を加え, 室温に 5 分間おいて溶血させ, 更に 1,150 rpm, 3 分間遠心した。その沈殿に RPMI 液を加えて 2 回遠心洗浄し,  $2 \times 10^8$  個/ml となるように調整した。これに MMC 100  $\mu$ g および 5 FU 200  $\mu$ g/ml を含む RPMI 液を等量に混和し, 37°C に 30 分間おき, RPMI 液で 2 回洗浄した後,  $2 \times 10^8$  個/ml に調整し, TNBS 600  $\mu$ g/ml に含む RPMI 液と等量に混和し, 37°C で 30 分間感作した。これを 2 回洗浄

してハブテン化脾細胞 (TN-SC) を得た。この細胞液を生体内に投与するときには生食水に, 培養する場合には 5% 仔ウシ血清加 RPMI 液中に浮遊して用に供した。

9) ハブテン感作細胞の作製: 前述の TN-SC を無処置マウスの静脈内に投与し, その脾臓をとり出して RPMI 液中に圧出し, 遠心洗浄して TNBS 感作細胞 ("TN-SC"-SC) を得た。又 PC を腹壁に塗布されたマウスの脾臓から同様にして PC 感作細胞 (PC-SC) を得た。

10) プラスチック付着細胞と非付着細胞の作製: 径 10 cm のファルコン社製プラスチック・シャーレ中の RPMI 液 20 ml に 1 脾臓を圧出し, 8) と同様に処理して脾細胞浮遊液を作製し, 37°C, 45 分間培養後, 非付着細胞を洗い落とし, 更に 37°C, 30 分間培養してシャー

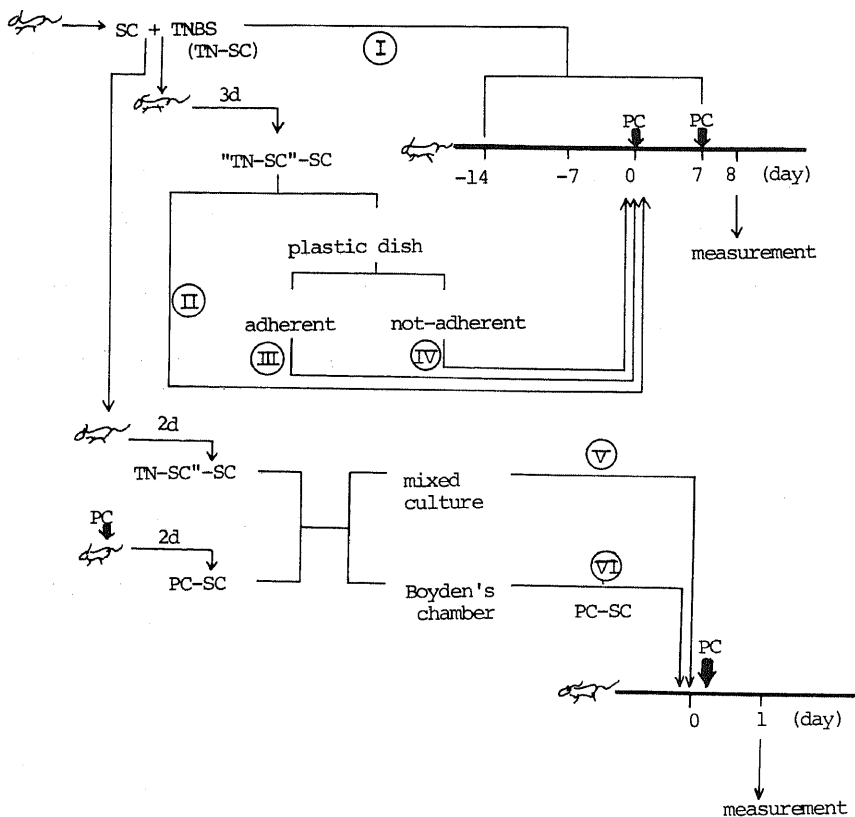


Fig. 1. The outline of the experiments.

TNBS: Trinitrobenzene sulfonate.

PC: Picryl chloride (Trinitrochlorobenzene).

SC: spleen cells.

TN-SC: SC coupled with TNBS.

"TN-SC"-SC: SC from mice which received TN-SC.

PC-SC: SC from mice treated with PC on the skin.

レに付着した細胞を集め、付着細胞とした。前述の45分間培養後シャーレに付着せず浮遊する細胞を新しいシャーレ中で更に37°C, 30分間培養し、浮遊するものを集めて非付着細胞とした。

11) ハプテン化脾細胞の生体内分布の測定: 10% FCS加RPMI液で $3 \sim 5 \times 10^8$ コ/mlのTN-SC浮遊液を作り、径3cmのファルコン社製滅菌シャーレに1.9mlづつ分注し、50 $\mu$ Ci/mlの<sup>3</sup>H-ウリジン0.1ml(5 $\mu$ Ci)を加え、18時間培養した。こうして得られたRI標識ハプテン化脾細胞の $2 \times 10^7$ コを尾静脈内に注射し、1, 5, 24, 72時間および7日後に頸椎脱臼させたのち、肺、肝、脾、腎、胸腺および末梢リンパ節群(ソケイ部、腋窩部および傍大動脈リンパ節)を採取し

た。各臓器は細切してシンチラントに浮遊し、アロカ社製シンチレーション・カウンターLSC-671にて計測した。対照として無処置マウスの脾細胞を上記同様にRI標識したものについても観察した。

12) 実験の概要: 上記のTN-SC, "TN-SC"-SCおよびPC-SC投与によるPC-CD発現に及ぼす影響の観察に関する実験の概要は図1のとおりである。

成 績

1. PC接触性皮膚炎の発現に及ぼすハプテン化脾細胞投与の影響

DDNマウスを用いてPC感作前14,7,5,4,2日,直前,感作後1,2,3,4,5および7日にTN-SC $2 \times 10^7$ コを

Table 1. Effect of the treatment with haptenated-spleen cells on the development of contact dermatitis in mice

Treatment	Sensitization	No. of animals tested	Increase of ear thickness (mm $\times 10^{-2}$ )	% of suppression	Significance
Days after sensitization			mean $\pm$ S.D.		
-14		10	0.35 $\pm$ 0.53	93.7	p<0.01
-7		6	0.33 $\pm$ 0.41	96.4	p<0.01
-5		8	1.50 $\pm$ 0.38	73.0	p<0.01
-4		8	1.38 $\pm$ 0.52	75.2	p<0.01
-2		8	1.38 $\pm$ 0.69	75.2	p<0.01
0		14	0.57 $\pm$ 0.55	89.7	p<0.01
1	+	8	2.06 $\pm$ 0.50	62.9	p<0.01
2		6	1.50 $\pm$ 1.14	73.0	p<0.01
3		6	2.00 $\pm$ 0.45	63.6	p<0.01
4		6	2.00 $\pm$ 0	63.6	p<0.01
5		6	3.67 $\pm$ 0.93	34.0	p<0.01
7		6	2.75 $\pm$ 0.27	50.5	p<0.01
none		8	5.56 $\pm$ 0.56		
	-	8	0.63 $\pm$ 0.54		

Hapten: Trinitrobenzene sulfonate (TNBS).

S.D.: Standard deviation.

Haptenated spleen cells (TN-SC): Spleen cells from mice were treated with TNBS in vitro as shown in the materials and methods in this paper.

DDN mice were injected intravenously with  $2 \times 10^7$  of TN-SC on the indicated day before and after the sensitization. All mice, containing the control mice, were sensitized by the application of 5% picryl chloride (PC) to the abdominal skin, and 7 days later were challenged by 20 $\mu$ l of 1% PC to the ear skin. Another control mice, not pretreated and not sensitized, were also challenged in the same way. Each value shows the mean $\pm$ S.D. of ear thickness (mm $^{-2}$ ) 24 hr after the challenge.

静脈内に投与し、CD発現に及ぼす影響を観察した(図1のI)。感作は5%PC, 0.1mlの腹壁塗布により行い、感作7日後に1%PC20 $\mu$ lを耳介に塗布し、その24時間後の耳介の腫脹を計測した。その結果は表1に示すごとく、無処置—感作マウスの腫脹が $5.56 \pm 0.56 \text{mm}^{-2}$ であったのに対して、TN-SC投与群では $0.33 \pm 0.41 \sim 3.67 \pm 0.93 \text{mm}^{-2}$ であって、その抑制度は96.4~34.0%であり、いずれも危険率1%以下で有意の差が認められた。TN-SC投与群における細胞投与と感作の時間的関係をみると、感作前TN-SC投与群において抑制が強く、ことに感作14日および7日前投与では90%以上という顕著な抑制が認められた。

2. ハプテン化脾細胞処置マウスの脾細胞投与による接触性皮膚炎発現の抑制  
前項の実験結果からTN-SCを投与することにより

CDの発現を抑制することが明らかとなった。この抑制が脾細胞にconjugateされたハプテンそのものによるものか、あるいは細胞のハプテン認識機構によるのかを検討するため、下記の実験を行った。すなわち、TN-SCの投与を受けたマウスから、末梢の免疫担当臓器の1つである脾臓を摘出し、その有核細胞("TN-SC"-SC)を集め、これを無処置マウスに投与することによるCD発現への影響を観察した(図1のII)。

まずDDNマウスにTN-SC  $2 \times 10^7$ コを静脈内注射し、3日後にこのマウスの脾細胞を採取し、塩化アンモニウム法により有核細胞を集め、その $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ コを無処置マウスの静脈内に投与し、ただちに5%PCによる感作を行い、その7日後にPCによるchallengeを行った。その成績は表2に示すごとく、"TN-SC"-SCの $2 \times 10^6$ コ前投与によって最も強い抑制がみられ、 $5 \times 10^5$

Table 2. Effect of the pretreatment by "TN-SC"-SC transfer on the development of contact dermatitis in mice

Strain of mice	Dose of "TN-SC"-SC	No. of animals tested	Increase of ear thickness (mm $\times 10^{-2}$ )	% of suppression	Significance
			Mean $\pm$ S.D.		
DDN strain	$2 \times 10^7$	8	$5.06 \pm 0.18$	-1.3	
	$1 \times 10^7$	8	$5.13 \pm 0.35$	-2.5	
	$5 \times 10^6$	8	$4.88 \pm 0.23$	2.5	
	$3 \times 10^6$	6	$4.03 \pm 0.50$	18.2	p<0.01
	$2 \times 10^6$	8	$2.67 \pm 0.41$	46.6	p<0.01
	$1 \times 10^6$	6	$3.67 \pm 0.52$	26.7	p<0.01
	$5 \times 10^5$	8	$3.88 \pm 0.69$	22.5	p<0.01
	none	6	$5.0 \pm 0$		
ICR strain	$1 \times 10^7$	6	$12.43 \pm 1.93$	-4.6	
	$5 \times 10^6$	6	$11.83 \pm 1.97$	8.0	
	$2 \times 10^6$	8	$5.50 \pm 0.66$	57.1	p<0.01
	$1 \times 10^6$	7	$6.50 \pm 1.66$	49.5	p<0.01
	$5 \times 10^5$	6	$8.00 \pm 1.05$	37.7	p<0.01
	$2 \times 10^5$	6	$13.58 \pm 0.74$	-5.8	
	none	6	$12.83 \pm 1.63$		

Hapten, TN-SC, increase of ear thickness and S.D.: shown in Table 1.

"TN-SC"-treated spleen cells ("TN-SC"-SC) were harvested from the spleen of mice pretreated with syngeneic TN-SC as shown in Table 1.

The experimental mice were transferred with different dose of "TN-SC"-SC immediately before the sensitization. The sensitization, challenge and reading of contact dermatitis (CD) were performed in the same way as shown in Table 1.

~3×10<sup>6</sup>コの前投与によって有意の差を示す抑制が認められたが、5×10<sup>6</sup>コ以上の前投与によってはCD発現に対する抑制は観察されなかった。

このように“TN-SC”-SCの前投与による抑制効果が投与細胞数に左右されることは興味ある知見である。これがマウスの系によるか否かを確かめるため、ICRマウスを用いて同様の検索を行った。その結果、5×10<sup>6</sup>~2×10<sup>6</sup>コの前投与によっては抑制されるが、それ以下の2×10<sup>6</sup>コおよび5×10<sup>6</sup>コ以上では抑制されないという、DDNにおけるほぼ同様の成績が得られた(表2)。

次にCDの発現における“TN-SC”-SCの抑制効果を細胞生物学的に解析するため、プラスチック・シャーレへの付着性の有無から付着細胞と非付着細胞に分け、それぞれの投与後ただちにPC感作を行い、7日後にchallengeしてCDの発現を観察した(図1のIIIおよびIV)。表3にみられるように、10<sup>6</sup>コの付着細胞投与による抑制が最も顕著であり、5×10<sup>6</sup>~3×10<sup>6</sup>コの付着細胞および5×10<sup>6</sup>コの非付着細胞の投与によって抑制が認められたが、両細胞系ともそれより多くても少なくとも抑制はみられなかった。

### 3. PC感作細胞による接触性皮膚炎の発現における“TN-SC”-SCの抑制機序の解析

“TN-SC”-SCによるCDの発現抑制がどのような認識機構を介して行われるか、すなわち、“TN-SC”-SCが直接PC-SCと接触することが必要であるか、あるいはハプテンの遊離ないしは液性の抑制因子を放出することによってPC-SCのPCへの反応性を抑制するのかを明らかにするため、以下の実験を行った。DDNマウスを用いてTN-SCの2×10<sup>7</sup>コ静脈内投与2日後に得られた“TN-SC”-SCと5%PC感作2日後に得られたPC-SCを、一方は混合培養、他方は0.2μm孔フィルター膜により境界を作製したBoyden's chamber内で、いずれも24時間培養したのち、前者は両細胞とともに、後者はPC-SCのみを無処置マウスに投与し、ただちに20μlの1%PCを耳介に塗布し、24時間後の耳介の腫脹を計測した(図1のVおよびVI)。

その結果は表4に示すごとく、10<sup>8</sup>コのPC-SCと2×10<sup>7</sup>コの“TN-SC”-SCを混合培養して投与した場合にCD発現の抑制がみられたが、他の量の“TN-SC”-SCと10<sup>8</sup>コのPC-SCを混合培養したものでは対照と差は

Table 3. Effect of pretreatment with adherent and non-adherent “TN-SC”-SC on the development of contact dermatitis in mice

Adherency of “TN-SC”-SC	Dose of “TN-SC”-SC	No. of animals tested	Increase of ear thickness (mm×10 <sup>-2</sup> )	% of suppression	Significance
			Mean±S.D.		
adherent	5×10 <sup>6</sup>	10	6.25±0.26	3.2	
	3×10 <sup>6</sup>	10	5.30±0.59	17.8	p<0.01
	2×10 <sup>6</sup>	10	4.97±0.43	23.0	p<0.01
	1×10 <sup>6</sup>	10	3.10±0.39	51.9	p<0.01
	5×10 <sup>5</sup>	8	5.44±0.50	15.7	p<0.01
	2×10 <sup>5</sup>	10	6.80±0.42	-5.4	
non-adherent	5×10 <sup>6</sup>	10	5.90±0.21	8.53	
	2×10 <sup>6</sup>	10	6.40±0.52	0.77	
	5×10 <sup>5</sup>	10	4.60±0.52	28.68	p<0.01
	2×10 <sup>5</sup>	10	6.80±0.35	-5.34	
not treated		10	6.50±0.30		

Hapten, “TN-SC”-SC, increase of ear thickness and S.D.: shown in Tables 1 and 2.

Each group of mice was transferred intravenously with different dose of “TN-SC”-SC, which was adherent or not-adherent to plastic dishes, immediately before the sensitization. The sensitization, challenge and reading of CD were performed in the same way as shown in Table 1.

なかった。Boyden's chamber 内培養後の PC-SC 投与によっては "TN-SC"-SC の量にかわりなく軽度の発現増強を示す成績が得られた。これらの結果は PC-CD の発現抑制に "TN-SC"-SC の PC-SC への直接の接触が必要であることを示唆しているといえよう。

#### 4. 静脈内投与されたハプテン化脾細胞の生体内分布

投与された TN-SC がどのような臓器で処理されるかを知るために、 $^3\text{H}$ -ウリジンで標識された TN-SC の  $2 \times 10^7$  を静脈内に注射し、1 および 5 時間、ならびに 1, 3 および 7 日後のマウスより肺、肝、腎、脾、胸腺および末梢リンパ節を採取し、細切したのち、液体シンチレーション法により各臓器への  $^3\text{H}$ -ウリジンのとりこみを測定した。被検臓器 1g 当りのとりこみを 4~5 匹のマウスの平均で示したのが図 2 である。肺、肝、腎、脾の間にはとりこみに差はみられず、胸腺および末梢リンパ節のそれはやや低かった。経時的に観察すると肝および脾では投与 3 日後にとりこみの低下が認められたが、他の 4 臓器ではこのような低下はみられな

かった。肝および脾における投与 3 日後の低下が何らかの免疫学的機能の特性に由来するか否かを検討するため、ハプテン化されなかった脾細胞を標識して同様の観察を行ったが、ハプテン化細胞と異なる傾向は認められなかった。このことは投与 3 日後における肝および脾のとりこみの低下が免疫学的特性によるものではなく、臓器の生物学的性状に由来していることを示しているものと考えられる。

#### 考 察

私達は同人らとともに行った DHS の発現機序に関する一連の研究から、1) DHS の発現には抗原と FCA を emulsify する必要はなく、2) FCA の投与によって形成された "DHS 発現準備状態" が抗原によって活性化され、3) 抗原+FCA に先立つ抗原の前投与は DHS 発現阻止因子を誘起し、従って、4) DHS 発現は "準備状態" の形成と阻止因子の誘起との競合関係に左右されるのではなかろうかと推論し、その機能を抗原および FCA の投与部位の所属リンパ節の傍皮質部に求め

Table 4. Effect of interaction of PC-SC and "TN-SC"-SC on the development of contact dermatitis in mice

Cultivation	Dose of "TN-SC"-SC	Dose of PC-SC	No. of animals tested	Increase of ear thickness	% of suppression	Significance
				(mm $\times 10^{-2}$ )		
				Mean $\pm$ S.D.		
mixed culture	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	16	4.84 $\pm$ 0.63	18.60	p < 0.01
	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	20	5.95 $\pm$ 0.46	0	
	$2 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	18	5.69 $\pm$ 0.30	4.30	
culture in Boyden's chamber	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	18	6.30 $\pm$ 0.44	-7.38	p < 0.01
	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	15	6.50 $\pm$ 0.37	-9.20	p < 0.01
	$2 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	20	6.33 $\pm$ 0.73	-6.30	p < 0.05
control	none	$1 \times 10^8$	20	5.95 $\pm$ 0.43		
	$1 \times 10^8$	none	9	0.44 $\pm$ 0.46		

Hapten, "TN-SC"-SC, increase of ear thickness and S.D.: shown in Tables 1 and 2.

PC-treated spleen cells (PC-SC) were harvested from the spleens of mice pretreated with PC on the abdominal skin.

One group of mice was transferred with the both of PC-SC and "TN-SC"-SC which were cultivated together in a tube at 37°C for 24 hr. The other group of mice was transferred with PC-SC alone which was cultivated separately with "TN-SC"-SC in Boyden's chamber partitioned by filter membrane at 37°C for 24 hr. Control mice were transferred with PC-SC and "TN-SC"-SC, respectively. All the mice were challenged immediately after the injection of cells, and CD was observed 24 hr later as shown in Table 1.

た<sup>5)-9)</sup>。一方、CDの発現においては抗原の分子量が小さく、かつその投与経路が特殊である<sup>10)-13)</sup>ことから、他のDHSとは異なる作用機序を示しており<sup>14)-16)</sup>、両者を比較することは遅発型過敏症の発現機序解明の上できわめて興味深い。これらの観点から私達はまずCDにおけるハプテンの認識機構を検索するため、ハプテン化細胞およびハプテン認識細胞の前投与が感作後のCD発現に及ぼす影響を観察し、かつ若干の解析を試みた。

ハプテンの前投与によってCDの発現が抑制されることに関しては既に諸家の報告<sup>10)14)-16)</sup>があり、Phanuphakらは2,4-dinitro-1-fluorobenzene(DNFB)を皮膚投与する7日前に2,4-dinitrobenzene sulfonateを静脈内投与することにより、マウスにおいてDNFBに対するtoleranceを誘導し得たと述べている<sup>15)16)</sup>。彼らは

このtoleranceがsuppressor-T細胞によるものであり、DNFB感作細胞のDNA合成を阻害せず、あらかじめDNFBで感作された動物にこのsuppressor-T細胞を投与してもCDの発現を抑制しないことから、afferent limbにおける抑制が生じたものであると推論している。しかしながら、大量のハプテンを前投与することにより細胞のハプテン結合receptorあるいはその関連部分にblockadeを生ぜしめたとも考えられる。そこで、ハプテンを生体内高分子物質又は細胞に結合させて投与することはblockadeの生成を妨げ、それ以外の抑制機序の解明に有用であろう。私達の実験ではDDNマウスの脾細胞を集め、その分化を止めるとともに活性化する処置を行ったのち、ハプテンとしてTNBSを作用させてハプテン化細胞を得、PC感作の前、同時および後にこのTN-SCを投与してCD発現に及ぼす影響を観察

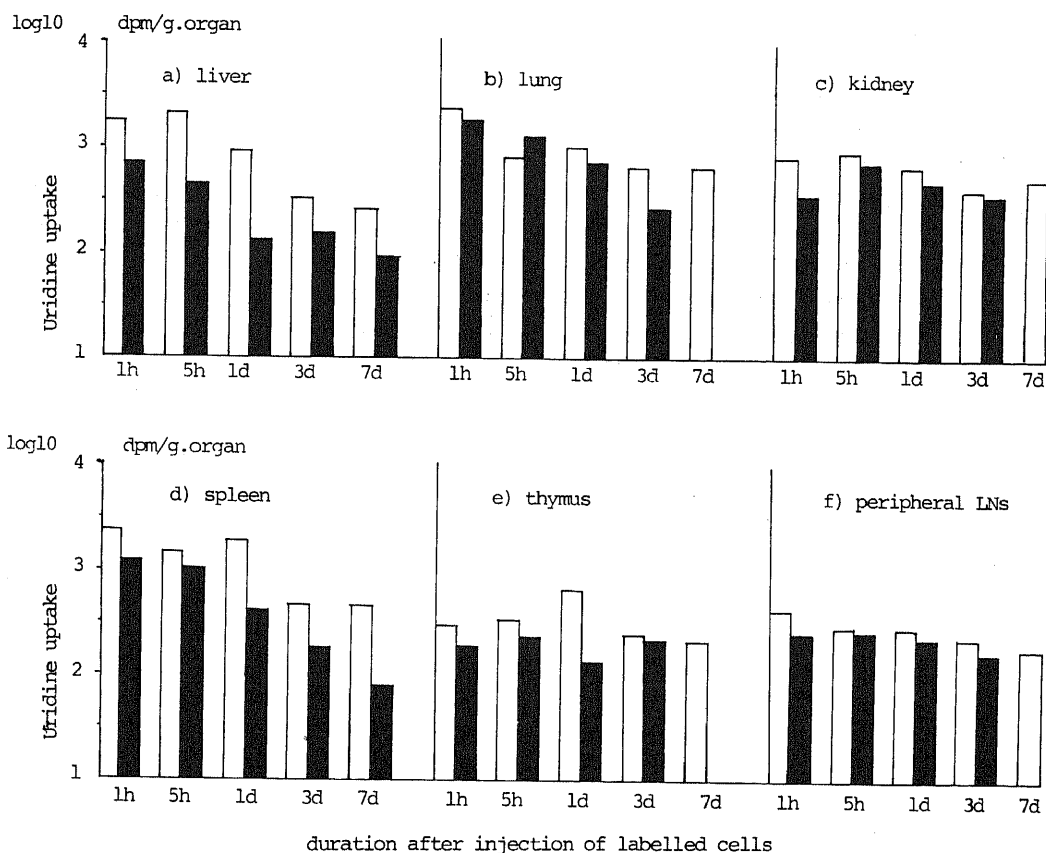


Fig. 2. <sup>3</sup>H-uridine uptake of 1 gram of each organ in mice which were injected by haptened or not-haptened spleen cells.

□=haptened spleen cells.  
 ■=not-haptened spleen cells.  
 h: hr (s). d: day (s). LNs: lymph nodes.



した。その結果、PC感作14日前から7日後の間に $2 \times 10^7$ コのTN-SCを投与することによって明らかな抑制が認められ、その抑制度は96.4~34.0%であった(表1)。TN-SC投与とPC感作の時間的關係をみると、感作前および同時投与によるCD発現の抑制は感作後投与のそれより大であり、感作の7~14日前にTN-SCを投与された群では90%以上の抑制が観察された。ハプテン化細胞の静脈内投与によるCD発現の抑制はDNFB<sup>17,18)</sup>およびTNFB<sup>19)</sup>を用いて観察されており、Millerらは感作と同時およびそれ以後にハプテン化細胞を投与しても抑制がみられることから、efferent limbのT細胞による抑制であるとしている<sup>17)</sup>。

ハプテン化細胞の投与ではハプテンそのものによる前処置に比して量的にはきわめて少ないとはいえ、なおTN-SCから遊離したハプテンによるblockadeを否定する必要がある。又PC感作前のTN-SC投与による抑制が感作後のそれより顕著であったことは細胞投与と感作との時間的關係がT細胞のサブポピュレーション<sup>20)</sup>に変化をもたらす可能性についても検討しなければならぬであろう。前述のごとく私達は抗原前処置と抗原+FCA感作に関する実験においてDHSの発現とその抑制が異った機能をもつ細胞群の競合關係に左右されるのではなかろうかという知見を得ている<sup>5)-9)</sup>。そこでTN-SCの投与を受けたマウスの脾細胞をとり、そのCD発現に対する抑制効果を観察した。DDNマウスに同系のTN-SC $2 \times 10^7$ コを投与し、3日後そのマウスの脾細胞をとり、これを同系マウスに移入させたのち、PC感作を行った。その結果 $5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ コの“TN-SC”-SC前投与によりCDの発現抑制が観察されたが、 $5 \times 10^6$ コ以上では抑制は認められなかった(表2)。ICRマウスを用いた実験でもほぼ同様の成績が得られた(表2)。両実験とも $2 \times 10^6$ コの“TN-SC”-SC投与によって最も強いCD発現の抑制がみられた。このように“TN-SC”-SCのCD発現抑制効果はマウスの系に關係なく認められる可能性を示唆するとともに、投与細胞数に左右されるということは興味ある知見といえよう。すなわち、“TN-SC”-SCは単一ではなく、suppressor-T細胞およびhelper-Tないしeffector-T細胞が混在していて後者の量が大となるとsuppressor-T細胞による抑制効果が現れないとも考えられる。ハプテン化細胞の投与を受けたマウスの脾細胞の移入によるCD発現抑制に関する報告はまだなく、上記のT細胞のサブポピュレーションの割合とCD発現抑制効果との關係についてなお検討中である。

この抑制に関与する細胞が“TN-SC”-SC中のどのような細胞群に属するかを検索するため、プラスチック附着性の有無から2群に分けて検討した。その結果、

$5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ コのプラスチック附着細胞投与によりCD発現の抑制がみられ、それより多くても少くても抑制は認められなかった。一方非附着細胞では $5 \times 10^5$ コ投与によってのみ抑制がみられた(表3)。これらの成績は1) 抑制に働く細胞は主としてプラスチック附着性であり、2) プラスチック附着細胞にもなお抑制に働く細胞と拮抗するものが含まれており、更に3) 非附着性細胞には抑制に働く細胞が少いか、あるいは抑制細胞に拮抗する細胞が多いという可能性があることを示唆しているのではなかろうかと考えられる。免疫反応に関与する細胞のうち、貪食細胞がガラス附着性を有していることは衆知のところである。また貪食細胞、B細胞およびT細胞の一部、特にsuppressor-T細胞はナイロン・ファイバーやプラスチック附着性を有しているとされている<sup>21)-23)</sup>。近年貪食細胞においてもT細胞と同様にサブポピュレーションによる附着性の相違が報告されており<sup>24)</sup>、機能的にもリンパ球の反応性を抑制する貪食細胞の存在が指摘されるに至っている<sup>25)</sup>。私達の成績からはプラスチック附着性の貪食細胞およびsuppressor-T細胞がCD発現抑制の主役を担っているのではないかと考えられるが、今後なお詳細に検討したい。

次に“TN-SC”-SCによるCD発現抑制の機序に関して、この細胞が直接PC-SCに接触することによって“抑制因子”の転移ないしは伝達が起こるのか、あるいは液性の“抑制因子”が存在するのかを検討するため、両細胞を一つは混合培養し、他はBoyden's chamber内でフィルターを界して培養し、これをマウスに投与してその後のCD発現を観察したところ、 $2 \times 10^7$ コの“TN-SC”-SCと $10^8$ コのPC-SCを混合培養したときに抑制が認められ、それより多い“TN-SC”-SCとの混合培養およびBoyden's chamber内培養では抑制効果はみられなかった(表4)。この成績はCD発現の抑制には“TN-SC”-SCのPC-SCへの直接の接触が必要であり、その効果は“TN-SC”-SCの量に左右される可能性があり、かつ液性の“抑制因子”の存在は認められないことを示している。又ハプテン放出によるblockadeは考えられず、“TN-SC”-SCは直接efferent limbを抑制しているのではないかとと思われる。しかし、混合培養ではPC-SCと“TN-SC”-SCを分離できないままに投与したため、両細胞間あるいは両細胞と他の生体細胞が相互に作用することも考えられる。またBoyden's chamber内培養ではCD発現の促進効果が若干認められており、液性の促進因子の存在を含めて、上記の点とともに現在検索中である。

ところで本実験に用いられたTN-SCの生体内運命を知るため、<sup>3</sup>H-ウリジンで標識したTN-SCを静脈内に

注射し、各種臓器を経時的に採取して分布とその変動を検索した結果、被検臓器 1g 当りの RI 分布は、肺、肝、腎、脾の間に差がみられず、胸腺および末梢リンパ節のそれはやや低いという成績が得られた(図2)。すなわち、TN-SC は脾、胸腺、リンパ節などのリンパ系臓器に特に集中するというのではなく、観察された臓器に一樣に捕捉されたと考えられる。経時的にみると、肝および脾では投与3日後に RI とりこみの低下が観察されたが、ハプテン化されない RI 標識脾細胞の投与によっても同様の傾向が認められたことから、この低下は臓器の免疫学的特性とは関係がなく、その生物学的性状によるものであると考えられる。

以上を総括するとハプテン化細胞投与による CD 発現の低下は、本報で用いた“TN-SC”-SC の投与によってもみられることから CD に応答する細胞の消失とは考えられず、又“TN-SC”-SC をよく洗浄した後投与しても抑制効果がみられることから、TN-SC より遊離した TNBS と PC との競合やハプテンによる blockade が起っているとも思われず、混合培養の成績などから“TN-SC”-SC 中の CD 発現抑制細胞によるものと考えられる。“TN-SC”-SC 投与による *in vivo* の成績でも、“TN-SC”-SC と PC-SC との混合培養という *in vitro* の結果でも CD 発現の抑制がみられることから、抑制細胞の作用機序は efferent limb の抑制によるのではなからうか。しかしながら抑制細胞それ自身が抑制能をもつのか、“TN-SC”-SC 中の抑制細胞内に細胞間伝達性の抑制因子を生成しているのか、あるいは液性でないことは確かであるとしても生成された抑制因子が単に細胞に固着していることによって抑制細胞の機能を発揮するのか等について検討する必要がある。今日、免疫学的不応状態における immunological tolerance と immunological paralysis の成立機序における異同はなお明らかではなく<sup>18)26)</sup>、これらとの関連についても検索を進めたい。

## 結 論

ハプテン化脾細胞投与による PC 接触性皮膚炎に及ぼす影響を観察し、以下の結果を得た。

- 1) ハプテン化脾細胞を PC 感作 14 日前より 7 日後の間に同系マウスに投与したところ、PC-CD 発現の抑制が認められた。抑制は感作と同時におよびそれ以前に TN-SC の投与を受けたマウスにおいて顕著であった。
- 2) TN-SC 投与マウスの脾細胞を無置マウスに投与して CD 発現に対する抑制効果を観察したが、DDN および ICR 両系とも  $2 \times 10^6$  コ前後の“TN-SC”-SC 投与により CD 発現の抑制が認められた。この抑制効果を示す細胞は主としてプラスチック付着性であった。

3) CD 発現抑制効果における“TN-SC”-SC の作用機序は液性の抑制因子の放出によるのではなく、CD 惹起細胞への直接の接触による何らかの認識の伝達が必要であると推定された。

4) RI 標識により TN-SC の生体内分布について検索したが、観察各臓器間に著差はみられず、免疫学的特性をもつ臓器に集中するという傾向は認められなかった。

## 文 献

- 1) Diens, L. & Schoenheit: Local hypersensitivity. I. Sensitization of tuberculous guinea pigs with egg-white and timothy pollen. *J. Immunol.*, **14**, 9-51 (1927).
- 2) Asherson, G.L. & Stone, S.H.: Selective and specific inhibition of 24 hour skin reactions in the guinea-pigs. I. Immune deviation: Description of the phenomenon and the effect of splenectomy. *Immunol.*, **9**, 205-217 (1965).
- 3) Dvorak, H.F., Billote, J.B., McCarthy, J.S. & Flax, M.H.: Immunologic unresponsiveness in the adult guinea pigs. I. Suppression of delayed hypersensitivity and antibody formation to protein antigens. *J. Immunol.*, **94**, 966,975 (1965).
- 4) Loewi, G., Halborow, E.J. & Temple, A.: Inhibition of delayed hypersensitivity by pre-immunization without complete adjuvant. *Immunol.*, **10**, 339-347 (1966).
- 5) 村本 卓郎: 遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究——抗原と Freund's complete adjuvant の分離投与による解析——。金大がん研年報, **2**, 62-74 (1968).
- 6) 越沢みちこ: 遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究——抗原前処置部位と遅発型皮膚反応発現の抑制——。金大がん研年報, **2**, 75-86 (1968).
- 7) Saito, T., Koshizawa, M., Satoh, T., Muramoto, T. & Konishi, K.: On the development of delayed skin hypersensitivity following separate injection of antigen and Freund's complete adjuvant——Preliminary report——. *Jap. J. Tuberc. & Chest Dis.*, **16**, 44-51 (1970).
- 8) Saito, T., Koshizawa, M., Satoh, T. & Konishi, K.: On the development of delayed skin hypersensitivity following separate injection of antigen and Freund's complete adjuvant——With special reference to the site and time interval of the two injections——. *Jap. J. Tuberc. & Chest Dis.*, **16**, 52-56 (1970).

- 9) 桜井信也:遅延型皮膚反応の発現機序に関する研究。各種免疫動物についての *in vivo* および *in vitro* 免疫反応の比較。十全医会誌, 85, 346-355 (1976)。
- 10) Asherson, G.L. & Ptek, W.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitization and passive transfer. *Immunol.*, 15, 405-416 (1968).
- 11) Dietrich, F.M. & Hess, R.: Hypersensitivity in mice. I. Induction of contact sensitivity to oxazolone and inhibition by various chemical compounds. *Int. Arch. Allergy*, 38, 246-759 (1970).
- 12) Asherson, G.L. & Zembala, M.: Contact sensitivity in mouse. IV. The role of lymphocytes and macrophages in passive transfer and the mechanism of their interaction. *J. Exp. Med.*, 132, 1-15 (1970).
- 13) Catalona, W.J., Taylor, P.T., Rabson, A.S. & Chretien, P.B.: A method for Dinitrochlorobenzene contact sensitization. A clinicopathological studies. *New Eng. J. Med.*, 286, 399-402 (1972).
- 14) Zembala, M. & Asherson, G.L.: Depression of the T cell phenomenon of contact sensitivity by T cells from unresponsive mice. *Nature*, 244, 227-228 (1973).
- 15) Phanuphak, P., Moorhead, J.W. & Claman, H.N.: Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. I. *In vivo* detection by ear swelling and correlation with *in vitro* cell stimulation. *J. Immunol.*, 112, 115-123 (1974).
- 16) Phanuphak, P., Moorhead, J.W. & Claman, H.N.: Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. III. Transfer of tolerance with "suppressor T cells". *J. Immunol.*, 113, 1230-1236 (1974).
- 17) Miller, S.D., Man-Sun Sy & Claman, H.N.: Suppressor T cell mechanisms in contact sensitivity. I. Efferent Blockade by syninduced suppressor T cells. *J. Immunol.*, 121, 265-273 (1978).
- 18) Miller, S.D.: Suppressor T cell mechanisms in contact sensitivity. III. Apparent non-major histocompatibility complex restriction is a result of multiple sets of major histocompatibility complex-specific suppressor T cells induced by syngeneic 2, 4-dinitrophenyl-modified lymphoid cells. *J. Exp. Med.*, 150, 676-692 (1972).
- 19) Pierres, A., Bromberg, J.S., Man-Sun Sy, Benacerraf, B. & Green, M.I.: Mechanisms of regulation of cell-mediated immunity. VI. Antigen density dependence of the induction of genetically restricted suppressor cells. *J. Immunol.*, 124, 343-348 (1980).
- 20) Cantor, H. & Weissman, I.: Development and function of subpopulation of thymocytes and lymphocytes. *Prog. Allergy*, 20, 1-64 (1976).
- 21) Rosenthal, A.S., Davie, J.M., Rosenstreich, D.L. & Blake, J.T.: Depletion of antibody-forming cells and their precursors from complex lymphoid cell population. *J. Immunol.*, 108, 279-291 (1972).
- 22) Hogg, N.M. & Greaves, M.F.: Antigen-binding thymus-derived lymphocytes. I. Rapid method for isolation of theta-positive antigen-stimulated cells. *Immunol.*, 22, 959-965 (1972).
- 23) Julius, M.H., Simpson, E. & Herzenberg, L.A.: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 3, 645-649 (1973).
- 24) 横地高志, 中島 泉, 加藤延夫: マクロファージの分化, 増殖とそれに及ぼす肺炎桿菌莢膜多糖体(CPS-K)の影響: 日本免疫学会総会記録, 6, 78-79 (1976).
- 25) Ansfield, M.J., Kaltreider, H.B., Caldwell, J.L. & Herskowitz, F.N.: Hyporesponsiveness of canine bronchoalveolar lymphocytes to mitogens; Inhibition of lymphocyte proliferation by alveolar macrophages. *J. Immunol.*, 122, 542-548 (1979).
- 26) Konishi, K., Yamagishi, T., Takakura, Y. & Yoshida, T.: Induction of immunological paralysis to protein in adult rabbits. *Memoirs. Kanazawa Univ. Paramed.*, 1, 141-143 (1977).

**Studies on the development of Delayed Hypersensitivity —Suppression of the Development of Contact Dermatitis by Transfer with Haptenated Spleen Cells in Mice—** Kenichi Konishi, Takayoshi Yamagishi and Shinya Sakurai, Department of Bacteriology and Immunology, School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, 930-01 — J. Juzen Med. Soc., **90**, 587—597 (1981)

#### Abstract

In this paper, experiments were carried out to observe the effect of haptenated cells on the development of contact dermatitis (CD) and its mechanisms in order to compare them with those of delayed skin hypersensitivity. Mice received an injection of syngeneic spleen cells treated with trinitrobenzene sulfonate (TN-SC) and sensitized with picryl chloride (PC) on abdominal skin. Reading of CD was performed by the measurement of ear thickness 24 hr after the challenge. Next, spleen cells from mice treated with TN-SC ("TN-SC"-SC) were transferred into not-treated mice for the pretreatment, and the development of CD was observed after the sensitization with PC.

The results obtained were as follows:

- 1) The development of CD was obviously suppressed in the mice treated with TN-SC between 14 days before and 7 days after the sensitization.
- 2) The suppression of CD was demonstrated in the mice pretreated with approximately  $2 \times 10^6$  of "TN-SC"-SC. The suppressive effect was observed in both strains of DDN and ICR mice, and responded to the dose of the cells transferred. When "TN-SC"-SC was divided into two groups by the adherency to plastic dish, a greater effectiveness for the suppression of CD was observed in the mice pretreated with the adherent cells than those with the non-adherent cells.
- 3) It was considered that the suppression of the development of CD was caused by direct contact of "TN-SC"-SC to PC-SC but not by release of soluble "suppressive factor(s)" from "TN-SC"-SC.
- 4) No difference was found among the organs tested, *i.e.*, lung, liver, spleen, kidney, thymus and peripheral lymph nodes, in the distribution of  $^3\text{H}$ -uridine labelled TN-SC injected intravenously.