

遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究

— X線の遅発型および即時型皮膚反応に及ぼす影響 * —

金沢大学結核研究所病態生理部（主任：西東利男教授）

多 田 信 平

（受付：昭和41年2月1日）

緒 言

感染症以外に人工的に遅発型皮膚反応を顕現する手段が開発されてから^{1) 2) 3) 4) 5)}この反応について詳細な検討が行なわれるとともに即時型皮膚反応と比較対比され、両反応の発現機序および相互関係などをめぐって論議がかわされている。^{5) 13) 14) 15) 16)}今日遅発型皮膚反応は細胞抗体が、即時型皮膚反応は体液性抗体が関与する反応であると考えられていることは周知のことである。

一方X線の体液性抗体の産生への効果に関しては1908年 Benjamin & Sluka⁶⁾を嚆矢として数多くの研究者によって追究されており、なにかんづく Taliaferro et al.⁷⁾ および Dixon et al.⁸⁾ の詳細な報告がひととき注目値するようである。今日までのこの方面の成績を総括して述べると、抗体産生に対し

- 1) 抗原注射 12~24時間前のX線放射は強く抑制的であり、
- 2) 抗原注射 24~48時間後のX線放射は時に促進的であり、
- 3) 抗原注射直前あるいは4日以後のX線放射は無影響である

ということである。

しかるに遅発型皮膚反応に対するX線の効果について検討の行なわれはじめたのは比較的近年のことに属し、その数も少なく、しかも断片的である。^{9) 10)}これらの成績を一括すると体液性抗体産生を最も強く抑制する抗原注射1日前放射が遅発型皮膚反応には無影響であって、体液性抗体の産生が行なわれないため、かえって遅発型皮膚反応の単独発現の期間の延長をもたらすといえるようである。

しかしながらX線放射が抗原注射の前後いかなる時期に行なわれても遅発型皮膚反応の発現に影響を与えないものかどうかはなお未検討のまま残されており、この点の追究は両反応の発現機序の解明に資するところがあると考えられる。よって著者は抗原注射1日後X線放射、抗原注射1, 2, 3および7日前X線放射を行なって遅発型皮膚反応と即時型皮膚反応の発現状態を比較検討した。その結果遅発型皮膚反応の発現は試みられた注射放射間隔によってほとんど左右されないが、即時型皮膚反応の発現は顕著に異なる影響を受けることが観察された。以下はその成績の概要である。

実験材料および実験方法

I. 実験材料

a) 実験動物：一定期間一定条件下で飼育した体重400 gm 前後の健常モルモットを使用した。

b) 抗 原

(i) 免疫用抗原：Cole の緒方変法¹¹⁾により再結晶を繰り返して作製した精製結晶

* 本論文の要旨は第38回日本細菌学会において発表した。

製鶏卵白アルブミン (HEA) を用いた。

(ii) 皮膚反応用抗原

HEA および越沢ら²⁾の方法に準じて作った *o*-aminophenol azo-HEA (OM-HEA) および *p*-aminobenzoic acid azo-HEA (PABA-HEA) を用いた。

II. 実験方法

a) 免疫方法

1) Freund's type adjuvant (流動パラフィン 8.5, アーラセル A 1.5 の割に混合したもの, これに加熱結核死菌を最終濃度 10mg/ml になるよう入れたものを FCA, 入れないものを FIA と略記) に同量の 0.1% HEA 生食水溶液を加えて water-in-oil emulsion としたものの (HEA in FCA および HEA in FIA と略記) の 0.1 ml ずつを各動物の両後足蹠に注射した。

2) FCA に同量の生食水を加えて water-in-oil emulsion とし, その 0.1 ml ずつを両後足蹠には, 同時に 0.05% HEA 生食水溶液 0.1 ml ずつを両後膝部内側皮内に注射した, 以上の注射によって各動物は HEA 100 μg を受けている。

b) X線放射

島津製信愛号で二次電圧 200 KVP, 二次電流 15 mA, フィルター Cu 0.9 mm + Al 1.0 mm, 焦点皮膚間隔 80 cm として 200 r (20r/min) の全身放射を行なった。

c) 皮膚反応

1) 術式

1% 正常モルモット血清加生食水で 1 mg/ml の皮膚反応用抗原溶液をつくり, その 0.1 ml

を前日抜毛しておいた動物の背部皮内に注射し 2, 4, 6, 24 および 48 時間後に判定した。

2) 判定規準

即時型皮膚反応: 注射後 2 あるいは 4 時間でみられる浮腫, 中心部の出血あるいは壊死の程度で次のように区分した。

- 土軽度の浮腫
- + 明瞭な浮腫
- ++ 強い浮腫および軽度の出血
- +++ 強い浮腫, 出血および壊死

遅発型皮膚反応: 注射 4 時間以降に出現しはじめ 24~48 時間で最高となる発赤と硬結が主体である反応であって, これを大きさ (直径) により次のように区分した。

- 5 mm 以下
- ± 6~9 mm
- + 10~15 mm
- ++ 16~20 mm
- +++ 21~30 mm
- ++++ >30 mm

なお, 硬結の認められない場合も発赤の明瞭なものはこの規準に従って記載した。

3) 実験成績のところで記載方法

同一実験群はおのおの 5 ないし 7 匹の動物をもって構成し, (i) DHS および IHS に関してはその群中で陰性のものと, 最弱および最強の反応を示した各 1 匹をすて, 残りのものの平均値を各群の値とし, (ii) PCA および次降反応 (PPT) に関しては, その群中陽性のものがあれば (+) とした。

d) 沈降反応, 角膜反応および PCA は谷口¹³⁾の方法に準じて行なった。

実験成績

I HEA in FCA および HEA in FIA で感作された動物の皮膚反応の消長 (対照実験)

表 1 は HEA in FCA および HEA in FIA を注射したそれぞれの動物の HEA に対する皮膚反応, 角膜反応および血中抗体の出現経過を示したものである。すなわち, 両者においてともに DHS は感作 3 日後より, IHS は 8 日後より出現しはじめ, 血中抗体もほぼ IHS の出現と時

を同じくして証明されるにいたる。一方両者において異なる点は DHS の持続期間と角膜反応の有無であって, HEA in FIA 投与群では IHS 出現後は DHS が消褪し, 角膜反応は終始陰性にとどまるのに反し, HEA in FCA 投与群では IHS 発現後といえども DHS は存続し, IHS 出現前は角膜反応陰性であるが, IHS 出現後間もなく角膜反応陽性となることである。

×: 角膜反応陰性時認められる DHS を Jones-Mote type DHS (JM-DHS), 角膜反応陽性時の DHS を Tuberculin type DHS (T-DHS) と記載する。

II 感作1日後のX線放射の影響

表2はHEA in FCA および HEA in FIA を注射1日後にX線200rの全身放射を受けたそれぞれの動物群の皮膚反応と血中抗体の出現経過を示したものである。この表からみて両群ともX線放射を受けないそれぞれの対照実験群と比較して、JM-DHS および T-DHS の発現はほぼ同じであり、IHS および血中抗体の出現は1~2日遅れているかと思われる程度である。ただX線放射後ほぼ10日目より14日目ぐらいいかけて HEA in FCA 群では DHS および IHS とともに、HEA in FIA 群では IHS が観察されがたくなることがある。しかしこの時期に血中抗体は明らかに実証される。これらの現象から DHS あるいは IHS の一時的消失は抗体産生の障害の有無とは関係なく、そのほかの原因による反応性の低下によると考えられる。なおこの期間における動物の死亡はX線放射後4週間の全死亡の80%をしめる。上述のことから感作1日後X線放射を行なっても DHS および IHS じゃっ起因子の産生は抑制されないといえるようである。

III 感作前のX線放射の影響

1. 感作1日前X線放射群における成績

表3aはX線放射1日後 HEA in FCA および HEA in FIA の注射を受けたそれぞれの動物群の皮膚反応と血中抗体の出現経過を示したものである。ここで一見して認められる著明な所見は、DHS, IHS および血中抗体の出現のX線による被影響性の顕著な差である。すなわち対照群に比し、DHS の発現経過はほぼ同じであるのに反し、IHS および血中抗体は10日前後遅れて出現する。DHS は感作後10~14日の間中断されることがあるが、その原因は実験IIで述べたところと同一であろう。かくして IHS じゃっ起因子産生細胞と DHS じゃっ起産生細胞はX線感受性を異にすると推定される根拠が呈出された。

2. 感作3日前X線放射群における成績

表3bはX線放射3日後 HEA in FCA および HEA in FIA の注射を受けたそれぞれの動物群の皮膚反応と血中抗体の出現経過を示したものである。ここでは感作1日前X線放射群に比べて、IHS および血中抗体の出現がやや早くなってきているのが認められる。しかしながら対照実験群と比較するとまだ5~6日遅延している。一方 DHS の発現は対照群におけるかわりがない。

3. 感作7日前X線放射群における成績

表3cはX線放射7日後 HEA in FCA および HEA in FIA の注射を受けたそれぞれの動物群の皮膚反応と血中抗体の発現経過を示したものである。ここでは感作3日前X線放射群に比べてさらに IHS および血中抗体の出現が早期に認められ、対照群のそれに遅れること1~2日にすぎない。一方 DHS の出現は対照群とほぼ同じであるが、X線放射後10~14日の間で観察しがたくなことは他のX線放射群と同様である。

IV FCA を足臏内に HEA を大腿部に注射した動物における成績

HEA in FCA で感作された動物が感作後3日目ぐらいから JM-DHS 2週目ぐらいから T-DHS 発現することは、すでに述べたところであるが、HEA in FCA には HEA in FIA 効果も含まれていると考えられる。この効果を除外する目的で FCA と HEA を別々のところにはほぼ同時に注射しても、HEA in FCA 投与時とほとんどかわりなく JM-DHS 続いて T-DHS が発現することを谷口¹³⁾は実証している。このような動物の DHS および IHS 発現へのX線の影響をみた成績を表4に示した。これによると HEA in FCA 投与の場合の HEA in FIA 効果によらない JM-DHS の発現も X線放射によってほとんど影響を受けないように思われる。その他 IHS および DHS の発現の受ける影響は HEA in FCA 投与時のそれと全くかわりがない。

総括ならびに考案

抗原を Freund's type adjuvant とともにモルモットに注射すると注射 3~4 日後より DHS の発現が認められ、さらに数日の後 IHS が出現する。このような順序で常に人工的に DHS と IHS を発見させる手段の開発に成功¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾して以来、両反応の関連性の問題が主要な研究課題となった。すなわち両者は感作位相の差によって生ずる同一機序の異なった表現であって DHS は IHS への必須過程であるのか、あるいはまた両者は全く異なる機序によるものであるかが論議されてきた。

ところで DHS と IHS を論ずるにあたっての 1 つの問題点は IHS 出現後 DHS が存続しているのか否かの確たる判断がそれほど容易でないということである。越沢ら⁶⁾はこの点の解明を行ない、蛋白抗原に関してはアゾ蛋白を作製して皮膚反応に用いることにより IHS を軽減してそのあとに出現する DHS の確認を容易ならしめることを実証した。谷口⁷⁾はこの方法で DHS と IHS の発現経過を追求してみても問題は一層複雑であることを知った。すなわち抗原を FIA とともに投与すると、その 3~4 日後より JM-DHS (Cornea reaction (-)), 8~9 日以降 IHS が発現するが、IHS 発現後 DHS は認められなくなった。ところが抗原を FCA とともに注射すると、その 3~4 日後より JM-DHS、8~10 日後より IHS が発現し、IHS 発現後も T-DHS (Cornea reaction (+)) が長く持続するのをみた。Salvin et al.¹⁴⁾もほぼ時を同じくしてこの現象を認めている。このような現象が明らかにされると問題は単に DHS と IHS の関連性ということにとどまらないで JM-DHS と T-DHS との関係が新しい論点となるとともに、両者のそれぞれと IHS との相互関係がまた検討されなければならないこととなった。しかして谷口¹³⁾の以上の成績からみて JM-DHS は T-DHS への必須過程ではないといえるようである。

また Martin and Raffel¹⁷⁾も病理組織学的立場から、Salvin et al.⁵⁾は反応の細胞による

移行実験から両者は異なる機序によるものであろうとしている。

しからば DHS と IHS はどのような関係にあるのであろうか。

一方 X 線の生体に及ぼす影響に関してはその発見以来詳細にわたって検討が加えられてきている。すなわち X 線による影響の受け方 (X 線感受性) は動物の種類によって顕著な差があり、例えばモルモットでははなはだ強く、マウスではこれよりはるかに弱く、ヒトではモルモットに近いとされている。また同じ個体においてもその臓器あるいは細胞によって感受性の異なることも明らかにされている。ここに同一生体での X 線感受性の異なる反応は異なる機序によるものであろうと推定する根拠が呈出されている。

著者はこのような考え方に立って両 DHS のそれぞれと IHS の関連性を追求するため、これらの反応の X 線による被影響性の比較観察を試みた。その成績を要約すると次のようである。

すなわち HEA in FIA を用いると、非放射感作群の IHS の出現に比べて感作 1 日後あるいは感作 7 日前放射群では 1~2 日遅延するのみであるが、感作 1 日あるいは 3 日前放射群ではそれぞれ 10 日あるいは 6~7 日の遅延を示し、遅延度は放射後注射までの時間の短いほど強かった。しかるに JM-DHS の出現はこれらのいずれの処置群においても対照群のそれとかわりが認められなかった。この一連の成績は JM-DHS ジャック起因子産生細胞 (DHS-Cell) と IHS ジャック起因子産生細胞 (IHS-Cell) は X 線感受性の全く異なる細胞系に属しているのであって X 線が単に JM-DHS-Cell から IHS-Cell への分化過程を遅らせているからではないことを示唆していると考えたい。さらに HEA in FCA を用いた場合についてみると、まず JM-DHS、次いで IHS と T-DHS が出現するが、JM-DHS および T-DHS の発現は試みられた X 線放射方法によっては影響を

受けなかったが、IHSのそれはHEA in FIA投与時と全く同様な影響を受けた。またHEA in FCAにはHEA in FIA効果も含まれていると考えられるので、この効果を除外する目的で谷口¹³⁾になってFCAを足臏にHEAを大腿部に別々にほぼ同時に注射し、その前後のX線放射の影響を検討した。谷口¹³⁾がすでに報告したようにFCAとHEAの分離投与によってもHEA in FCA投与時と同じくJM—DHSおよびT—DHSの発現が認められ、これら反応のX線による被影響性もHEA in FCA投与によるそれと全く異なるところがなかった。

以上のようにX線によってJM—DHSと同じくT—DHSの発現も影響されないのに反して、IHSの出現は顕著な影響を受けることが実証され、IHSとT—DHSとは直接因果関係を有していないと推定されるのであって、T—DHS—CellもまたIHS—Cellとは別の系統に属すると考えたい。

Uhr et al.¹⁰⁾によるとDHSの発現がX線により抑制されないのにIHSが抑制されるのは、DHSとIHSは異なる機序によるのか、または両反応は同一機序によるがDHSの方が鋭敏な免疫反応であるのかのいずれかであるとしている。しかし反応の鋭敏度の差だけで感作前後のX線放射のIHS発現への影響性の差とDHSへの無影響性との関係を充分説明しえないと思われる。またSalvin et al.⁹⁾はmultipotent immunological primitive stem cellを仮定しての上のことであろうが、生体の免疫反応を3期に分ち、第1期は血中抗体のrateを決定するX線感性感期、第2期はDHSを決定する

X線耐性期、そして第3期は抗体産生細胞の増殖期で抗原注射18時間頃からはじまるとしている。かくてX線を第1期に受ければ血中抗体の出現が遅れ、第3期に受けても遅れないことを示唆しているのは理解されるが、その中間をDHSと関係づけている点の解釈が困難であって著者はDHSとIHSは異なる細胞系によるのであると考えたい。さらに同氏ら¹⁴⁾はHEAに対するJM—DHSの存するところへPABA—HEAを与えるとanti—PABAがanamnesic rateで出現するのに、HEAに対しIHS出現後PABA—HEAを与えてもanti—PABAはprimary rateでしか出現しない現象をみて、HEA-sensitized primitive cellはmultipotentであるとしDHS—CellのIHS—Cellへの分化を推定している。しかしながらJM—DHSの存するときすでにIHS—primitive cellがあつて、この状態のCellはPABA—HEAによって急速にanti—PABA産生細胞に分化しようとも考えられなくはない。

先にも述べたようにX線のDHSに及ぼす影響についての検討は、人工的DHS発現手段の開発が遅れたこともあって今日なお緒についたばかりといえよう。著者はほぼLD 40/4wのX線量のDHSおよびIHS発現への影響を比較観察して両者間に顕著な差の存することを知った。その成績に考察を加えた結果、それぞれの反応に関与する細胞系はX線放射時すでに独立して存在しているとの考え方に魅力を感じるとともに、その時の1つの細胞系から異なる機能を持ついくつかの細胞系に分化してゆくとする考え方には賛意を表しがたい次第である。

結 論

卵白アルブミン(HEA)をFreund's complete adjuvantあるいはFreund's incomplete adjuvantでwater-in-oil emulsionとして(それぞれHEA in FCAあるいはHEA in FIAと略記)モルモットに注射すると、数日の潜伏期を経て、DHSが発現し、さ

らに数日後IHSが出現する。HEA in FIA投与動物ではIHS出現後DHSは認められなくなるが、HEA in FCA投与動物ではIHS出現後もなおDHSが存続する。このようなDHSとIHSの発現に及ぼすX線(200r)全身放射の影響を観察したところ次のような成績がえら

れた。

1. HEA in FCA あるいは HEA in FIA で感作1日後X線放射を受けた動物における DHS の発現は非放射感作群(対照群)のそれとほとんどかわるところがなく、IHS の発現の遅延は軽度であった。
2. X線放射1日あるいは3日後 HEA in FCA あるいは HEA in FIA で感作され

た動物では対照群に比し、DHS の発現にはかわりがなかったが、IHS のそれは顕著に遅延を示し、その遅延度は放射感作間隔の短いほど強かった。

3. しかしX線放射7日後 HEA in FCA あるいは HEA in FIA で感作された動物における DHS および IHS の発現は対照群のそれとかわりがなかった。

文

- 1) Jones, T. D. and Mote, J. R. : cf. J. Exp. Med., 108, 823, 1958.
- 2) Uhr, J. W. et al. : J. Exp. Med., 105, 11, 1957.
- 3) Landsteiner, K. and Chase, M. W. : J. Exp. Med., 71, 237, 1940.
- 4) Freund, J. and McDermott, K. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 49, 548, 1942.
- 5) Salvin, S. B. : J. Exp. Med., 107, 109, 1958.
- 6) Benjamin, E. and Sluka, E. : cf. Mechanisms in Radiobiology, Academic Press, New York and London.
- 7) Taliaferro, W. H. et al. : J. Infect. Dis., 91, 105, 1952.
- 8) Dixon, F. J. et al. : J. Immunol., 68, 693,

献

- 1952.
- 9) Salvin, S. B. et al. : J. Exp. Med., 109, 325, 1959.
- 10) Uhr, J. W. et al. : J. Exp. Med., 112, 95, 1960.
- 11) 緒方富雄 : 血液学実験法,
- 12) 越沢みち子, 他 : 金大結研年報, 23(下), 143, 1966.
- 13) 谷口恭子 : 金大結研年報, 23(下), 149, 1966.
- 14) Salvin, S. B. et al. : J. Immunol., 93, 495, 1964.
- 15) Martin, A. B. and Raffel, S. : J. Immunol., 93, 973, 948, 1964.
- 16) Crowle, A. J. : J. Immunol., 94, 555, 1965.

Table 1. Development of DHS, IHS and circulating antibodies for HEA in animals sensitized with HEA

Days after sensitization	Sensitized with HEA emulsified with									
	FCA					FIA				
	DHS	IHS	PCA	PPT	CR	DHS	IHS	PCA	PPT	CR
3	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-
5	###	-	-	-	-	++	-	-	-	-
6	###	-	-	-	-	++	-	-	-	-
7	###	-	-	-	-	++	-	-	-	-
8	###	+	+	+	-	+	+	+	-	-
9	++	+	+	+	+	-	+	+	+	-
10	++	+	+	+	+	-	+	+	+	-
12	++	++	+	+	+	-	++	+	+	-
14	++	###	+	+	+	-	++	+	+	-
17	++	###	+	+	+	-	++	+	+	-
21	++	###	+	+	+	-	++	+	+	-
28	+	++	+	+	+	-	++	+	+	-

Table 2. Development of DHS, IHS and circulating antibodies for HEA in animals X-rayed 1 day after HEA-sensitization

Days after sensitization	Days after X-irradiation	Sensitized with HEA emulsified with					
		FCA			FIA		
		DHS	IHS	PCA	DHS	IHS	PCA
3	2	+	-	-	+	-	-
4	3	++	-	-	++	-	-
5	4	++	-	-	++	-	-
6	5	++	-	-	+	-	-
7	6	++	-	-	+	-	-
8	7	+	-	-	+	-	-
9	8	+	±	+	-	+	+
10	9	±	+	+	-	+	+
12	11	-	-	+	-	-	+
14	13	-	-	+	-	-	+
17	16	+	±	+	-	+	+
21	20	++	++	+	-	++	+
28	27	+	++	+	-	+	+

Table 3a. Development of DHS, IHS and circulating antibodies for HEA in animals X-rayed 1 day prior to HEA-sensitization

Days after X-irradiation	Days after sensitization	Sensitized with HEA emulsified with					
		FCA			FIA		
		DHS	IHS	PCA	DHS	IHS	PCA
4	3	+	-	-	+	-	-
5	4	++	-	-	++	-	-
6	5	++	-	-	++	-	-
7	6	++	-	-	++	-	-
8	7	+	-	-	+	-	-
9	8	+	-	-	-	-	-
10	9	-	-	-	-	-	-
11	10	-	-	-	-	-	-
13	12	-	-	-	-	-	-
15	14	+	-	-	-	+	+
18	17	+	+	+	-	++	+
22	21	++	++	+	-	++	+
29	28	+	++	+	-	+	+

Table 3b. Development of DHS, IHS and circulating antibodies for HEA in animals X-rayed 3 days prior to HEA-sensitization

Days after X-irradiation	Days after sensitization	Sensitized with HEA emulsified with					
		FCA			FIA		
		DHS	IHS	PCA	DHS	IHS	PCA
6	3	+	-	-	+	-	-
7	4	++	-	-	++	-	-
8	5	++	-	-	++	-	-
9	6	++	-	-	++	-	-
10	7	+	-	-	+	-	-
11	8	-	-	-	-	-	-
12	9	-	-	-	-	-	-
13	10	-	-	-	-	-	-
15	12	+	-	-	-	+	+
17	14	+	+	+	-	+	+
20	17	++	+	+	-	+	+
24	21	++	++	+	-	++	+
31	28	+	++	+	-	+	+

Table 3c. Development of DHS, IHS and circulating antibodies for HEA in animals X-rayed 7 days prior to HEA-sensitization

Days after X-irradiation	Days after sensitization	Sensitized with HEA emulsified with					
		FCA			FIA		
		DHS	IHS	PCA	DHS	IHS	PCA
9	2	-	-	-	-	-	-
10	3	+	-	-	+	-	-
11	4	+	-	-	+	-	-
12	5	-	-	-	-	-	-
13	6	-	-	-	-	-	-
14	7	-	-	-	-	-	-
15	8	+	-	-	-	-	-
16	9	+	±	+	-	±	+
17	10	+	+	+	-	+	+
19	12	++	+	+	-	+	+
21	14	++	++	+	-	+	+
24	17	++	++	+	-	++	+
28	21	+	++	+	-	+	+

Table 4. Development of DHS, IHS and circulating antibodies for HEA in animals X-rayed 1 day before or after injection of FCA into hind foot pads and of HEA into hind thighs

One day before S	Sensitization (S)	One day after S	Skin test						PCA
			Days after S	Animal No.	HEA		OM-HEA		
					DHS	IHS	DHS	IHS	
X-irradiation	FCA into hind foot pads and HEA into hind thighs	.	4	1	++	-	++	-	-
				2	++	-	+	-	-
				3	++	-	+	-	-
			7	4	+	-	±	-	-
				5	+	-	±	-	-
				6	±	-	±	-	-
			10	7	-	-	-	-	-
				8	-	-	-	-	-
				9	-	-	-	-	-
		14	10	+	-	+	-	+	
			11	+	-	+	-	+	
			12	+	-	±	-	+	
		17	13	+	+	+	-	+	
			14	+	+	+	-	+	
			15	+	+	+	±	+	
.	FCA into hind foot pads and HEA into hind thighs	X-irradiation	4	1	++	-	+	-	-
				2	++	-	+	-	-
				3	++	-	+	-	-
			7	4	++	-	++	-	-
				5	++	-	++	-	-
				6	++	-	++	-	-
			10	7	+	+	±	-	+
				8	±	+	-	-	+
				9	-	-	-	-	+
		14	10	-	-	-	-	+	
			11	+	-	+	-	+	
			12	+	-	±	-	+	
		17	13	+	+	+	±	+	
			14	+	+	+	-	+	
			15	+	+	+	±	+	