



Title	ウサギにおけるOxazolone接触性皮膚過敏症
Author(s)	奥山, 春枝; 武田, 純子; 三村, 信輔; 小西, 美智代; 森川, 和雄
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 38, 59-65
Issue Date	1978-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26511
Type	bulletin (article)
File Information	38_P59-65.pdf



[Instructions for use](#)

ウサギにおける Oxazolone 接触性皮膚過敏症

奥山 春枝 武田 純子 三村 信輔

小西 美智代 森川 和雄

(北海道大学免疫科学研究所病理部門)

(昭和52年11月21日受付)

化学物質による実験的な接触性皮膚過敏症の誘発は、主として picryl chloride, dinitrochlorobenzene (DNCB), dinitrofluorobenzene (DNFB) を用いて行なわれているが、さらに Gell¹⁾によって、ペニシリンの合成中に作られた 2-phenyl-4-ethoxy-methylene-oxazolone (oxazolone) が、モルモットの耳に塗布すると強い接触性皮膚過敏感作原性を示すことがみつげられた。これらにはマウスとモルモットが実験動物として用いられており、また人体における試みもすでに20年以上も前になされて^{2,3)}、最近では臨牀的に人体の T-細胞機能の判定に広く利用されている。しかしウサギを用いた報告はほとんどなく、Eisen⁴⁾は、接触性皮膚過敏症はウサギではおこらないと記載している。最近 Gibbins⁵⁾が、DNFB を結核菌と結合させてウサギの皮下に注射して、接触性過敏症の誘発に成功したと報告している。

Oxazolone を用いた実験は、主としてイギリス学派によりなされており、Asherson^{6,7)}らによる一連の仕事^{6,7,8,9)}は、初期はマウスを、その後モルモットを用いて精力的に行なわれている。他の研究者^{10,11)}も同様にマウス及びモルモットを用いた仕事で、ウサギに oxazolone の皮膚塗布感作による接触性皮膚過敏症をおこさせた報告がないので、われわれはその可能性をしらべると共に、マウスと同様に、ウサギにおいても胸腺由来細胞が接触性過敏症の主役をなすかどうかを追及した。

実験材料及び実験方法

1. 動物

主として当研究所において繁殖した白ウサギを用い、一部は生後6カ月までの市販のものを使用した。

2. 抗原

Oxazolone は当研究所化学部門、関川博士により合成されたものである。化学構造式は図-1の通りである。

3. 感作方法

Oxazolone を加熱しながら10%の割合にエタノールに溶解し、その0.2 ml を綿棒につけて、あらかじめ剃

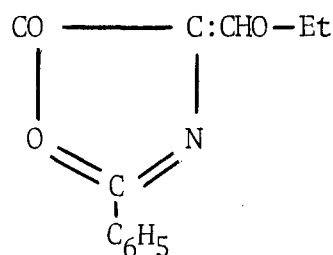


図-1 2-phenyl-4-ethoxy-methylene oxazolone

毛した項背部に塗布した。通常は1回塗布で感作したが、別に記載した数回感作例では1週間おきに同部に再塗布した。塗布部は、1回感作では普通何の変化もないが、時に5ないし6日頃になり赤く腫脹することがあった。再塗布の場合は翌日から強い発赤、腫脹がみとめられた。

4. 皮膚反応

感作後6ないし8日目に、oxazolone の1% エタノール溶液0.2 ml を、背部の剃毛部に綿棒で軽く塗布した。この濃度は、正常ウサギ皮膚では何の変化もおこさないことをあらかじめ確かめた。抗原塗布後、6, 24, 48時間後に、塗布部の発赤の強さと、つまみ上げた皮膚の厚さ(皮膚の2倍の厚さ)を測定して硬結の強さとした。強さの表現法は表-1に示した。

5. 胸腺摘出法

生下時の胸腺摘出は、生後24時間以内に、エーテル麻酔下で胸骨上部より吸引により胸腺を摘出した。また生後1ないし2カ月の動物の胸腺摘出は、胸骨上部に約5 mm の切開を入れて視野を広くして、ピンセットを用いて摘出した。全例について、屠殺時に胸腺の残存がないかどうかをたしかめた。

6. X-線照射

生下時胸腺摘出ウサギの一部には、術後2週目に450 rad の X-線全身照射した。(25 mA, 180 kVp, filter 0.5 mm Cu, 0.5 mm Al)。X-線に対する虫垂シールド法は、ネンブタール麻酔下で腹部中央線をあげ、虫垂をひ

っぱり出して1.2 mmの厚さの鉛板でおおい、前腹壁にぬいつけて動かないように固定して、450 rad 全身照射した。骨髄のシールドは、両側膝窩リンパ節を摘出後、同じく1.2 mmの鉛板で両側後肢をおおい、動かないように糊帯で固定してX線照射した。

7. X線照射動物への自家胸腺移植実験

1ないし2カ月の動物の胸腺を摘出したあとX線650 rad 照射した。摘出胸腺は冷 Hanks 液に浸しておき、照射後直ちに4個に分割して腹腔内へ自家移植した。

8. 羊赤血球 (SRBC) に対する plaque-forming cell (PFC) の産生

正常及び生下時胸腺摘出動物の、生後2週目より経過を追ってSRBC に対する PFC の産生能力をたしかめた。50% SRBC 浮遊液を、体重により0.3ないし0.5 ml づつ後肢足趾に注射し、5日後屠殺して膝窩リンパ節と脾の PFC 数を、Jerne-Nordin 法¹²⁾の直接法で19s 抗体産生細胞数を測定した。

成 績

1. Oxazolone 1回感作

10% oxazolone 溶液の1回塗布感作で、大半のウサギは皮膚過敏性を獲得した。反応の強さは、発赤の程度と硬結の強さを組合わせて、表-1に示したように分類した。27匹中3匹は塗布したへりのみが赤くなったり、ごくうすい発赤のみであったが、残りはすべて硬結を伴な

表-1 Oxazolone 1回塗布による皮膚過敏症の誘導

Skin reaction at 24 hours

Intensity of reaction	Animal number of positive reaction (%)	
-	0/27 (0)	
±	3/27 (11.1)	Faint pink or marginal redness
+	10/27 (37.0)	Redness with induration (under 5 mm)
++	10/27 (37.0)	Redness with induration (6~19 mm)
+++	4/27 (14.8)	Redness with induration (over 20 mm)

Induration: Folded thickness of skin in reacted site-that in normal site.

Sensitization: 0.2 ml of 10% Oxazolone ethanol solution.

Skin reaction: 0.2 ml of 1% Oxazolone ethanol solution.

う明らかな発赤を示した。特に4匹には強い硬結がみられた。

この反応の時間経過をみると、6時間目は陰性か、あるいは弱い発赤を示すのが大部分で、ごく少数例に明らかな発赤を示すものがあった。24時間でピークの反応に達し、48時間後も同程度の強さを維持して、72時間後にやや減退を示した。平均的な反応の時間的経過を図-2に示した。

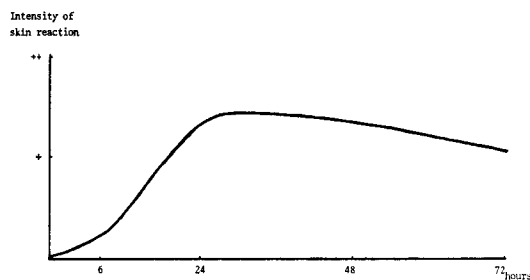


図-2 Oxazolone に対する皮膚反応の時間的経過

2. 感作回数と反応の時間的経過

1回感作群は前述のように、24時間をピークとする反応が48時間まで持続する遅延型の経過を示したが、1週間において2回感作した例では、6時間後から強い反応を

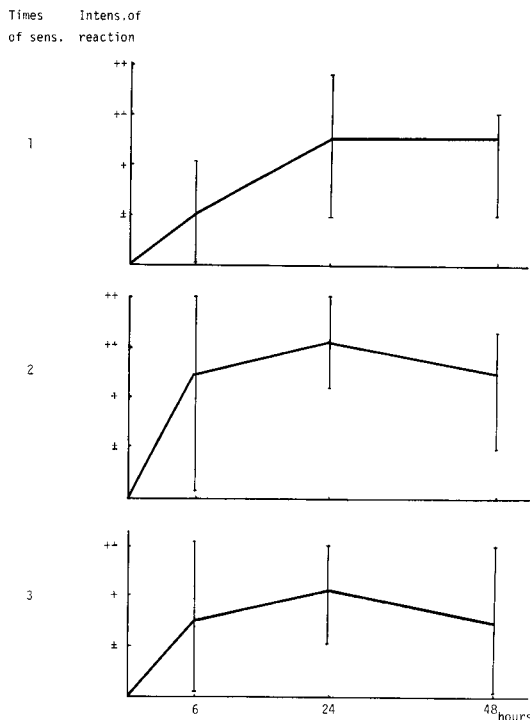


図-3 皮膚感作塗布回数と皮膚反応の時間的経過の関係

示すものが多く、48時間は低下の傾向を示した。すなわち Arthus 型反応も同時におこっていることを示している。3回感作群は、2回感作群と同様な時間経過を示すが、全体として反応の強さが減弱した。

3. 過敏性発現に及ぼす胸腺摘出の影響

生下時胸腺摘出動物の、oxazolone 感作に対する過敏性の出現を表-2に示した。生後2週目から週を追って感作し、6日後に皮膚反応を検索した。正常ウサギでは生後3週以後には確実に硬結を伴う陽性反応がみとめられた。一方胸腺摘出群では、4週でもまだ陰性ないし弱い発赤のみを示すものが約1/3の例にみられた。すな

わち胸腺摘出は、過敏性の成立を明らかに遅延させた。

4. X-線照射ウサギにおける胸腺移植の影響

成熟ウサギの胸腺を摘出したあと、X-線を650 rad 全身照射し、そのあと自家胸腺を腹腔内に移植した群では、照射後6日頃より、感作 oxazolone に対し過敏性を誘導することができたが、胸腺移植をしなかった群は、10日後もまだ感作に対する応答がみとめられなかった。なお腹腔内に挿入した胸腺は、表面がフィブリンでおおわれ、一部壊死におち入っているが、大半はよく染色性が保たれ、細胞が生存していることがみとめられた。

表-2 Oxazolone 皮膚過敏症誘導に対する生下時胸腺摘出の影響

(%)

After birth wks	Untreated					Neonatal thymectomy				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
2	2/3 (66.7)		1/3 (33.3)			2/3 (66.7)	1/3 (33.3)			
3			5/5 (100.0)			4/6 (66.7)	2/6 (33.3)			
4			1/4 (25.0)	2/4 (50.0)	1/4 (25.0)	1/8 (12.5)	1/8 (12.5)	3/8 (37.5)	3/8 (37.5)	
5			1/6 (16.7)	2/6 (33.3)	3/6 (50.0)		1/6 (16.7)		4/6 (66.7)	1/6 (16.7)
6		1/6 (16.7)	1/6 (16.7)	2/6 (33.3)	2/6 (33.3)		2/7 (28.6)	1/7 (14.3)	3/7 (42.9)	1/7 (28.6)
Adult		1/6 (16.7)	3/6 (50.0)	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)		2/11 (18.2)	3/11 (27.3)	5/11 (45.5)	1/11 (9.1)

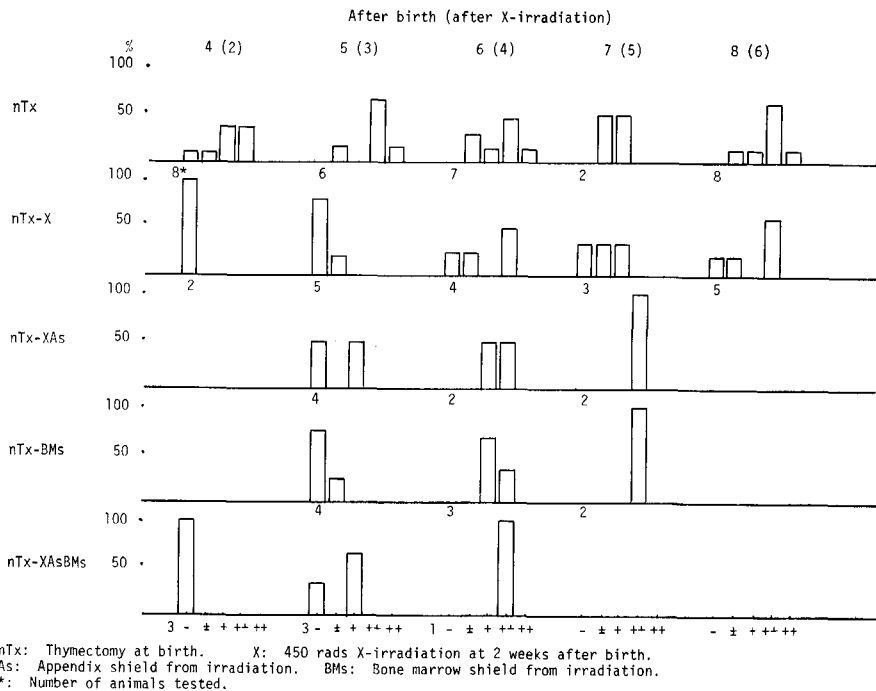


図-4 生下時胸腺摘出ウサギの oxazolone 感作に対する X-線照射及び虫垂又は骨髄シールドの影響

表—3 胸腺摘出及び X-線照射成熟ウサギの oxazolone 感作に対する自家胸腺移植の影響

Treatment	Days after treatment					
	4	5	6	7	8	10
Tx-X-Tc	—	—	+	+	ND	ND
X	ND	ND	ND	—	—	—

Tx-X-Tc: Thymectomy, 650 rads whole body X-irradiation and intraperitoneal replacement of autologous thymus.

X: 650 rads whole body X-irradiation.

ND: Not done.

5. 胸腺摘出, X-線照射における虫垂及び骨髄シールドの影響

生下時胸腺摘出の2週後に, 450 radの全身照射をすると, 生後6週になり半数に反応性の回復がみられた。しかしその後も回復のおそいものがあり, 生後8週でもその割合はあまり変りはなかった。一方虫垂及び虫垂・骨髄シールド群は生後5週で約半数に, 生後6週で全例に反応性が回復した。また骨髄シールド群は6週で回復した。すなわち, 虫垂及び骨髄のシールドは, X-線照射による障害からの回復を促進し, 特に虫垂の方が効果的であった。

6. 生下時胸腺摘出動物の SREC に対する PFC の産生

生後週を追って, SRBC に対する PFC の産生を, 所属リンパ節及び脾細胞についてみると, 表-4 に示したように, 4週までは徐々に増加し, 5週で成熟ウサギと同

表—4 幼若ウサギの半赤血球に対する PFC 産生に及ぼす生下時胸腺摘出の影響

Weeks after birth	PFC number in 10 ⁶ nucleated cells			
	Reg. LN		Spleen	
	nTx	—	nTx	—
2	13	47	2	22
3	45	96	6	55
4	74	98	72	32
5	141	184	34	107
6	227	166	91	76
8	725	397	42	134

Reg. LN: Regional (popliteal) lymph node cells.

nTx: Thymectomy at birth.

—: Untreated.

程度の産生を示した。生下時胸腺摘出ウサギでは, 2, 3週はごくわずかの産生があり, 4, 5週で正常動物に近い値がえられた。すなわち, この週齢頃に PFC 産生に補助的役割をする T-細胞の回復があると思われる。

考 案

Oxazolone に対する接触性皮膚過敏症は, モルモットの皮膚に塗布することにより誘導できることが Gell ら¹⁾ によって初めて報告された。その後 1968 年になり, Asherson ら^{6~9)} は, マウスを用いて, 1回感作でも十分な過敏性を獲得することをみている。しかしウサギに誘導した報告はみられない。これらの実験によると 10% oxazolone アルコール溶液塗布で感作を成立させていることから, われわれは, ウサギに同濃度のアルコール溶液を首の背部に塗布して, 感作が成立するかどうかをみた。この塗布部を選んだのは, ウサギがなめて抗原を消失させるのを防ぐためである。なお oxazolone はわが国では手に入れることがむずかしいので, 当研究所, 化学部門, 関川博士により合成されたものを使用した。1回塗布後6ないし8日目の皮膚反応で, 全例に明らかな発赤を示す反応をみたことは, oxazolone はウサギに対しても強力な接触性皮膚過敏症感作抗原となりうることを示すと共に, ウサギでもマウス及びモルモットと同様に皮膚塗布により接触性過敏症をおこすことができることを証明している。

接触性皮膚過敏症の皮膚反応は, リンパ球により被動感作が可能であり^{7,10)}, 遅延型反応の典型の1つに入れている。われわれの実験においては, 1回感作では定型的な遅延型反応を示したが, 感作回数をふやすことにより即時型反応の合併がみられた。Oxazolone は他の抗原物質とは異なり, 血清抗体産生能力も強いといわれている。特に Freund's incomplete adjuvant (FIA) 又は Freund's complete adjuvant (FCA) 乳剤として感作した時には, 血清の中に被動感作に有効な抗体の存在がみとめられている¹⁰⁾。Zembara ら⁸⁾ 及び Askenase ら^{13,14)} は, マウスの腹腔細胞でえられる被動感作は, 血清中にある細胞親和性抗体の作用にあるといい, マウスにおける oxazolone に対する接触性皮膚過敏症は, リンパ球, 大食細胞及び血清に含まれる中介因子によっておこされる complex reaction であるといっている。更に Baer ら¹⁰⁾ によると, モルモットにおいても, oxazolone を FIA 又は FCA と共に感作した時の初期の反応は, 8ないし24時間に反応が出現し始め, リンパ節細胞で被動感作ができる late skin reaction をおこし, 感作数週間後の血清では early skin reactivity の被動感作が

できることから、oxazolone に対する皮膚反応は、30 分 で始めて 72 時間で消失する液性抗体による反応と、8 時間で始めて 24 ないし 48 時間ピークの細胞性免疫による反応の両方が関与していると述べている。これらのことを考え合わせると、われわれのみたウサギの場合も、1 回塗布では細胞性免疫による遅延型反応であるが、感作の重複により血清抗体関与の反応が加わり、より早い反応の出現がみられたと考えられる。そこで、Askenase¹³⁾の方法にのっとり血清の凝集素価を測定したが、抗体価は低く、又感作回数と血清抗体価との平行関係を見とめることができなかった(本論文には記載しなかった)。しかし反応の強さと沈降素価の間には関連がないという報告もある¹⁰⁾ことから、Askenase らのいう細胞親和性抗体が強い関連性を示すと考えられる。なお血清抗体については今後の詳細な研究が残されている。一方組織学的な検索によっても、oxazolone 感作は、所属リンパ節の初期の胸腺依存域の強い増殖性反応と共に、後期には骨髄細胞依存域の発達があり、胸腺由来細胞のみでなく、骨髄由来細胞、すなわち血清抗体の産生もかかわっていることが示唆されている^{15~19)}。

さて、このような接触性皮膚過敏症は、oxazolone 感作をも含めて、胸腺由来細胞との近密な関連があることが多数報告されている。前述したように、組織学的な所属リンパ節の変化の他、donor cell を抗胸腺細胞血清であらかじめ処理すると、被動感作の効果が低くなること、oxazolone 感作後の炎症巣に遊走してくる細胞は抗原陽性の T-細胞であること⁹⁾、更に生下時に胸腺摘出したマウスに胸腺移植を行なった実験によって、oxazolone の初期の反応は胸腺由来の細胞によりおけると結論した Davies ら¹⁸⁾の仕事などから、両者の関連が裏付けられている。

これらのマウスあるいはモルモットでみられた両者の関係がウサギでもみられるかどうかを追及するのがこの実験の目的の 1 つである。ウサギの免疫系は、未だマウスのように解明されているとはいえない。しかし、胸腺摘出によりリンパ節の傍皮質部のリンパ球が減少することや²⁰⁾、胸腺細胞に特異的な抗血清を作ることができることなど^{21~23)}、ウサギの免疫系はマウスとかなり似通っていると思われる。従って、接触性皮膚過敏症においても、胸腺の摘出はその反応性に大きく影響すると期待される。われわれの実験による生下時胸腺摘出は、生後 4 週まで過敏性誘導の欠如ないし低下がみられ、胸腺の重要性が示唆された。しかし文献的に、成熟ウサギの胸腺摘出は免疫反応に影響を与えないことが知られている^{24~26)}。Good ら²⁷⁾によると、生後 5 日後の胸腺摘出

による影響は、ウサギはマウスより弱いといい、Archer ら²⁸⁾は、生下時胸腺摘出した動物の血中、脾リンパ節の中にリンパ球の減少がみられるが、7 ないし 10 日には回復してくるといふ。更に Elfenbein ら²⁹⁾によると、生下時のウサギの脾には con A に反応する functional T-cell が低濃度ではあるがすでに存在することを証明している。このようにマウスとは異なり、ウサギでは生下時にすでに胸腺由来細胞が末梢リンパ組織に分散しており³⁰⁾、その原因は両動物の胎生期間の違いによると考えられる。従って、生下時胸腺摘出の影響は、たとえその反応性が胸腺由来細胞のみによるとしても、術後一時的であり、早期の回復がみこまれる。われわれの生下時胸腺摘出実験で、5 週頃には非摘出正常群と匹敵する値までもどったのは、このようなウサギの特性であり、またこれは組織学的な回復時期とも一致する²⁸⁾。同様処置動物で T-細胞の補助作用を必要とする SRBC に対する PFC 産生反応をみた成績でも、4 ないし 5 週で対照値においつくことは、胸腺由来細胞の機能的回復を示している。さらに、成熟ウサギ胸腺摘出、X-線照射の組み合わせ後、自家胸腺をもどしてやった実験で示された早い感作誘導の回復は、oxazolone 過敏症発現における胸腺由来細胞の重要性をより直接的に証明している。

さらに、生下時胸腺摘出後 2 週目に 450 rad の X-線照射した実験で、虫垂又は骨髄のシールドによる回復の促進がみられた。Richter ら^{30~33)}は、ウサギの抗原感受性細胞は骨髄にあるとのおべており、又虫垂が抗体産生、特に IgM 産生細胞の源であるという報告²⁰⁾もある。このように骨髄あるいは虫垂は、ウサギの免疫系の発達に重要な位置を占めると思われるが、われわれの今回の実験にみられたシールドの効果は、両臓器の中樞性の働きというよりも、前述のように生下時すでにこれらの臓器に分散している胸腺由来細胞の増殖による回復を示している。一方ツベルクリン反応の発現には生後早期の胸腺摘出が大きく影響することが Nagatani ら³⁴⁾、Konda³⁵⁾により述べられており、われわれの oxazolone に対する接触性皮膚過敏症の 1 回感作により誘導される遅延型反応は、胸腺由来細胞が効果細胞として働いていると結論される。

結 論

Oxazolone の 1 回皮膚塗布により、ウサギに接触性皮膚過敏症を誘導することができた。この反応は定型的な遅延型反応の時間的経過を示した。感作をくり返すことにより皮膚反応の時間的経過が早くなり、即時型反応の合併を示した。

この遅延型反応の出現には、ウサギの胸腺由来細胞が効果細胞として働いていることが、生下時胸腺摘出、胸腺摘出後 X-線照射及び X-線照射後自家胸腺移植実験で示唆された。

謝 辞

本実験に使用した oxazolone を合成して下さった当研究所化学部門、関川勲博士に深謝する。

文 献

- 1) Gell, P. G. H., Harington, C. R. and Rivers, R. P.: *Brit. J. Exp. Pathol.*, **27**, 267, 1946.
- 2) Eisen, H. N., Orris, L. and Belman, S.: *J. Exp. Med.*, **95**, 473, 1952.
- 3) Chase, M. W.: *Int. Arch. Allergy*, **5**, 163, 1954.
- 4) Eisen, H. N.: In "Cell and Humoral Aspect of Hypersensitivity State" (H. S. Lawrence ed.), p. 89, Hoeber-Harper Book, 1961.
- 5) Gibbins, B. L. and Hinrichs, D. J.: *Cell. Immunol.*, **24**, 202, 1976.
- 6) Asherson, G. L. and Ptak, W.: *Immunol.*, **15**, 405, 1968.
- 7) Ptak, W. and Asherson, G. L.: *Immunol.*, **17**, 769, 1969.
- 8) Zembara, M. and Asherson, G. L.: *Cell. Immunol.*, **1**, 276, 1970.
- 9) Asherson, G. L., Allwood, G. G. and Mayhew, B.: *Immunol.*, **25**, 485, 1973.
- 10) Baer, H., Stone, S. H. and Malik, F.: *J. Immunol.*, **117**, 1159, 1976.
- 11) De Sousa, M. A. and Parrott, D. M. V.: *J. Exp. Med.*, **130**, 671, 1969.
- 12) Jerne, N. K. and Nordin, A. A.: *Science*, **140**, 405, 1963.
- 13) Askenase, P. W. and Asherson, G. L.: *Immunol.*, **23**, 289, 1972.
- 14) Askenase, P. W. and Hayden, B. J.: *Immunol.*, **27**, 563, 1974.
- 15) Oort, J. and Turk, J. L.: *Brit. J. Exp. Pathol.*, **46**, 147, 1965.
- 16) Parrott, D. M. V. and De Sousa, M. A.: *Nature*, **212**, 1316, 1966.
- 17) De Souse, M. A. and Parrott, D. M. V.: *J. Exp. Med.*, **130**, 671, 1969.
- 18) Davies, A. J. S., Carter, R. L., Lenchers, E. and Wallis, V.: *Immunol.*, **17**, 111, 1969.
- 19) Onoé, K.: *Acta Path. Jap.* **26**, 671, 1976.
- 20) 花岡正男: *日病会誌*, **60**, 37, 昭46.
- 21) Fradelizi, D. P., Chou, C. T., Cinader, B. and Dubiski, S.: *Cell. Immunol.*, **7**, 484, 1973.
- 22) Shek, P. N., Chou, C. T., Dubiski, S. and Cinader, B.: *Int. Arch. Allergy*, **46**, 753, 1973.
- 23) Colas de la Noue, H., Koperstych, S. and Richter, M.: *Immunol.*, **23**, 655, 1972.
- 24) Abdou, N. I. and Richter, M.: *Path. Microbiol.*, **37**, 73, 1971.
- 25) Taniguchi, M. and Tada, T.: *J. Exp. Med.*, **139**, 108, 1974.
- 26) Pery, D. Y. E., Cooper, M. D. and Good, R. A.: *Science*, **161**, 265, 1968.
- 27) Good, R. A., Dalmaso, A. P., Martinez, C., Archer, O. K.: *J. Exp. Med.*, **116**, 773, 1962.
- 28) Archer, O. K., Sutherland, D. E. K. and Good, R. A.: *Lab. Invest.*, **13**, 259, 1964.
- 29) Elfenbein, G. J., Harrison, M. R. and Mage, R. G.: *Cell Immunol.*, **15**, 303, 1975.
- 30) Haasay, R. and Richter, M.: *Path. Microbiol.*, **38**, 313, 1972.
- 31) Singhal, S. K. and Richter, M.: *J. Exp. Med.*, **128**, 1099, 1968.
- 32) Abdou, N. I. and Richter, M.: *J. Exp. Med.*, **129**, 757, 1969.
- 33) Richter, M., Rose, B. and Abdou, N. I.: *Int. Arch. Allergy*, **38**, 269, 1970.
- 34) Nagatani, Y.: *Acta Haemat. Jap.* **29**, 60, 1966.
- 35) Konda, S.: *Acta Haemat. Jap.* **30**, 51, 1967.

Contact Skin Hypersensitivity against Oxazolone in Rabbits

Harue OKUYAMA, Junko TAKEDA, Shinsuke MIMURA
Michiyo KONISHI and Kazuo MORIKAWA

A contact skin hypersensitivity against oxazolone was induced in rabbits by a single painting of 0.2 ml of 10% oxazolone-ethanol solution at the skin. The time course of the skin reaction indicated the typical delayed type in the animals sensitized by a single painting, while the immediate type reaction was shown to be superimposed as well by multiple paintings.

It was suggested that effector cells for the delayed reaction of the contact skin hypersensitivity against oxazolone in the rabbits are the thymus derived cells as in mice and guinea pigs by experiments of neonatal thymectomy, thymectomy followed by X-irradiation, and autologous thymus transplantation after X-irradiation.