HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	モルモット接触過敏症のAdoptive Transfer
Author(s)	小野江, 和則; 安水, 良知; 森川, 和雄
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 38, 66-70
Issue Date	1978-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26512
Type	departmental bulletin paper
File Information	38_P66-70.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

モルモット接触過敏症の Adoptive Transfer

小野江和則　安水良知　森川和雄

(北海道大学免疫科学研究所病理部門)

(昭和52年10月1日受付)

近年，免疫反応を担うリンパ球はT細胞，B細胞から成り，それらは更に subpopulation, subset に分けられる事が明かとなった。これらの細胞は，相互作用 (co-operation) によって反応を増強 (helper, amplifier)，又は抑制 (suppressor) し，全体として反応を巧に制御 (regulate) する事が次々と証明されて来た。これらの免疫制御についての知見は，多くは液性抗体産生系に於いて得られて来たが，その中で中心的役割を演ずる細胞はT細胞である事が明かとなり，T-ology なる言葉が用いられるまでになった。

細胞性免疫に於いても，リンパ球の協同作用が知られて来たが，液性抗体産生系に較べて，反応発現の簡便で信頼できる有力な指標を持たない事もあって，未だ流動的な部分が多い。これらは用いる抗原，動物種によって著しい多様性を示し，又感作後の時期によってもかなり複雑な経過を辿る様である[1]。現在，これらの反応を制御する細胞として (Suppressor cell として) T細胞[2~4]，B細胞[5] が共に報告されている。

我々は細胞性免疫の一モデルと考えられる，モルモット，Oxazolone 接触過敏症[6] の adoptive transfer の系を確立し，更にその制御機構を解析すべく次の実験を企図した。今回は，実験条件の選択に的を絞った関係上，全体として纏った結果を示すには到っていないが，途中経過の意も兼ねて報告する。

材料と方法

動　物　Strain-2, Strain-13, Hartley/M モルモット (400~600 g) を用いた。

抗　原　抗原として用いた Oxazolone は当研究所化学部門，関川助教授らによって精製されたものを用いた。

感　作　1 mg の Oxazolone を 0.5 mℓ の Drakeol-Arlacel (65:35) に溶し，これを 2 mg H37Rv 結核死菌を懸濁した phosphate buffered saline (PBS) と混和，Oxazolone in complete Freund's adjuvant (CFA) として用いた。感作は，足蹠，鼠径部，腋窩，項部3カ所に 0.1 mℓ 宛，前肢に 0.05 mℓ，合計 1.0 mℓ を 11 カ所に注射した。

細胞浮遊液及び移入　感作後一定期間を経てからエーテル麻酔下で各所属リンパ節全てを剔出，ステンレスメッシュ (100メッシュ) で磨潰し 10% fetal calf serum (FCS) 加 Eagle's MEM 中に集めた。細胞は同液で2回洗い，一部は Hank's BSS で更に洗ってロゼット法により細胞膜レセプターを検出し，残りは10% 正常同系モルモット血清加 Eagle's MEM で更に一度洗い，最終的に 5 mℓ の同培養液に再浮遊した。細胞は1匹の動物の所属リンパ節総量を1匹の正常 recipient に移入したが，この量は細胞パックにして約 0.3~0.4 mℓ であった。細胞浮遊液は同系モルモット腹腔内に注射したが，一部では感作時期の異る動物のリンパ節細胞や脾細胞を同時に移入した。又他の一群では細胞を静脈注射した。

血清移入　感作後19日目及び46日目の動物を心採血し，この血清を静注，2時間後に皮膚反応を行った。この際，感作後46日目の血清の donor と recipient は同種間，即ち Strain-13 モルモットの免疫血清を Hartley/M モルモットに 3 mℓ 宛注射した。16日目の動物では同系同士で行った。

Nylon Wool Column 法　B細胞を除くため，一群で nylon wool column 通過細胞を集め，これを移入した。方法は Julius[7] の方法に準じた。

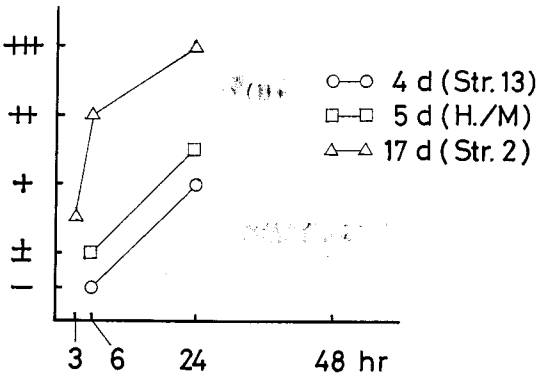
ロゼット形成法　T細胞マーカーにはウサギ赤血球，補体結合リンパ球 (CRL) は EAC (羊赤血球＋ウサギ抗羊赤血球 IgM＋AKR 又は A/He マウス血清) によって検出した。詳細は前に報告した[8]。Fc リセプター (FcR) は EA (羊赤血球＋ウサギ抗羊赤血球 IgG) を用いて検出した[9]。

皮膚反応　皮膚反応は腹腔内移入群では移入後6日目に行った。静注群及び血清移入群では，2時間後に行った。モルモット背部の毛をバリカンで除いた後，1%，0.5%，0.1% Oxazolone アルコール溶液，対照として無水アルコールを直径 2 cm になるまで (約 0.1 mℓ) 滴下し，3, 6, 24, 48時間後に判定した。1% 溶液で陽性を (+)，0.5% で陽性を (++)，0.5% で強陽性を (+++) とした。

結　　果

能動免疫群

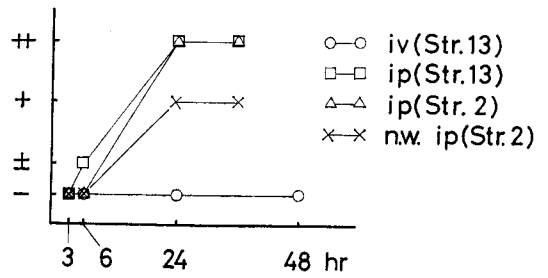
結果は図-1に示した。感作後4日目でモルモットは皮膚反応陽性となった。その後，経過と共に反応は増強し，又早期に見られる様になったが，いずれもピークは24時間後に見られ，遅延型のパターンを示した。



図—1　Oxazolone/CFA 感作後の皮膚反応
4日目 (○), 5日目 (□), 17日目 (△)。
一群2匹宛の平均。
( ) 内は用いたモルモットの種類を表す。

adoptive transfer 群

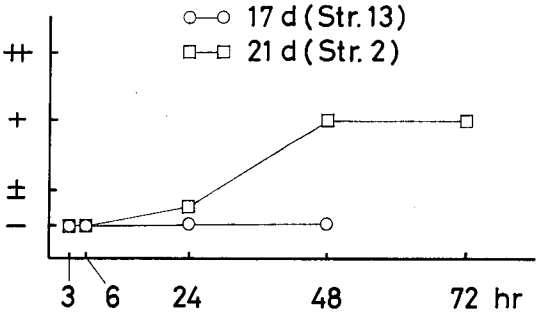
Strain-13 モルモットで感作後5日目のリンパ節細胞浮遊液を静注した動物は，その後2時間目に皮膚反応を行ったが，反応は全く見られなかった (図-2)。



図—2　感作リンパ節細胞移入群 (5日目)
皮膚反応は，静注群 (iv) は2時間後，腹腔内移入群 (ip) は6日目に行った。(n.w.: nylon wool column 通過細胞を移入)

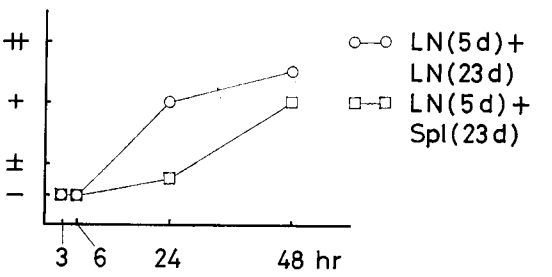
同じ時期の細胞を腹腔内に移入，6日目に皮膚反応を行った群では，いずれも典型的な遅延型反応を示した。nylon wool column 通過細胞は収量が少い為2匹より得た細胞を混合して1匹に移入した。皮膚反応はやや弱かったが，反応パターンは同じで，T細胞の関与が裏付けられた。

感作後17, 21日目のリンパ節細胞を移入した群は図-3に示した。17日目 (Strain-13) では反応は移入できず，21日目 (Strain-2) では反応は弱い乍ら陽性であった。しかし，特に24時間目に限って見るならば，両者共反応は弱かった。



図—3　感作リンパ節細胞移入群 (17, 21日目)
移入は全て腹腔内に行った。

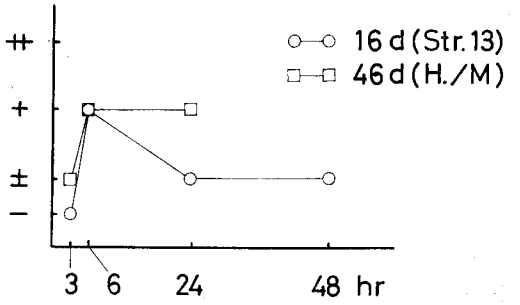
我々はこれらの結果から，この時期のリンパ節細胞の中に suppressor cell の存在を想定し，次に感作5日目のリンパ節細胞と23日目のリンパ節細胞又は脾細胞を混合して1匹の正常 recipient に移入する実験を行った。結果は図-4に示した。23日目脾細胞を混合移入した群では，反応の低下が認められたが，リンパ節細胞を混合移入した群では，反応の低下は著明でなかった。但し，両者とも48時間目と比較して24時間目の反応が弱かった。



図—4　感作リンパ節細胞及び脾細胞混合移入群
( ) は donor 感作後の日数を表す。(LN: リンパ節細胞，Spl: 脾細胞)

血清による受身伝達群

結果は図-5に示した。感作後46日目の血清では同種の Hartley/M モルモットに早期の反応を惹起し，この反応は持続したが，16日目の血清を同系 Strain-13 に静注した群では6時間目の反応後消退した。

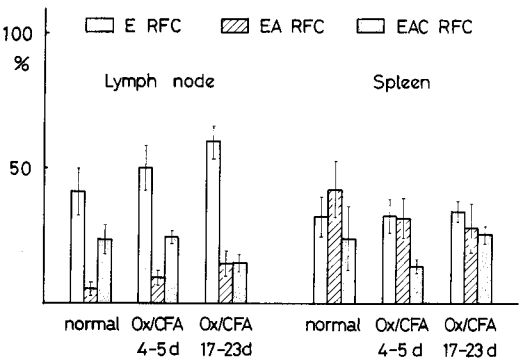


図—5 感作血清静注群

感作後16日目及び46日目の Strain-13 の血清を夫々同系 (Str. 13) 及び同種 (Hartley/M) に静注し，2時間後に皮膚反応を行った。

移入細胞の膜リセプターによる解析

移入する細胞の一部を取り，T 細胞リセプター，Fc リセプター (FcR)，補体リセプター (CR) を夫々のマーカーであるウサギ赤血球，EA，EAC とのロゼット形成能によって調べた。正常リンパ節では，ウサギ赤血球結合細胞 (T 細胞) は 41.1±9.2%，FcR^+ 細胞は 5.3±2.8% であったが，Oxazolone+CFA で感作後，所属リンパ節の T 細胞率は 4～5 日目で 50.2±8.6%，17～23 日目で 59.7±5.9%，FcR^+ 細胞は 4～5 日目で 9.6±2.9%，17～23 日目で 13.7±4.7% といずれも有意の増加が認められた (図-6)。しかし，脾細胞では著明な変化は認められなかった。



図—6 リンパ節及び脾細胞のロゼット形成能

Ox/CFA: Oxazolone+Complete Freund Adjuvant 感作群

考　　察

Oxazolone は，古くは Oort と Turk[6] によって，モルモットの接触過敏症の実験に使われた。彼らは感作後の所属リンパ節の組織学的変化を観察し，その本態は傍皮質，胸腺依存域に於けるリンパ球の増殖反応にある事を明かにした。その後 Asherson ら[10] がこの抗原の接触過敏症に対する強力な免疫原性に注目し，マウスを用いて多くの成績を発表し，この分野での進歩に大きな貢献をした事は広く知られている。当教室に於いても，従来比較的惹起が困難であると考えられていたウサギの系に於いても，Oxazolone が接触過敏症を起す事を観察し報告して来た[11]。

今回，我々は，この Oxazolone とモルモットを用いた過敏症の系に於いて，その制御機構を明かにする為のモデル条件設定の為に，いくつかの実験を行った。

我々は，感作後早期 (5 日目) のリンパ節細胞の adoptive transfer によって，Oxazolone に対する接触性過敏反応を惹起する事ができた。しかし，この移入は，静注後皮膚反応を早期に行う系では成功せず，腹腔内移入後 6 日目の皮膚反応試験で始めて陽性に見られた事から考えても，単純に effector cell の有無によるだけでは説明は困難である。接種抗原がリンパ節内にそのままの形で存在し，細胞と共に移入されて recipient が能動感作されたと考えれば説明は容易である。この場合，静注群では皮膚反応が陰性であった事も充分説明し得る。しかし，Oxazolone は油溶性で，用いた CFA 中の Drakeol に溶解していると考えられ，この様な形での抗原は長期間注射局所に貯留する事が知られており[12]，更にリンパ節内に入った僅かな抗原も，細胞外の油成分に溶解しているものは，細胞の洗浄によって殆ど除かれると考えられる事から，移入された抗原量は非常に少い事が予想される。にも拘らず，強い反応が誘導できており，又 Baer ら[1] は，組織不適合な recipient には感作リンパ節細胞によって過敏反応が移入されない事，CFA を用いず Oxazolone を塗布感作した場合にも移入されない事を報告しており，単に抗原移入だけでこの問題を捉える事には疑問が残る。

最近，lymphoid cell 膜に結合したハプテンの移入によって，接触過敏症に対するトレランスが誘導される，という報告がなされてきた[13,14]。この場合にも，移入 lymphoid cell と recipient の組織適合が必要である。我々の観察した結果とは全く逆の現象であるが，いずれも細胞成分と密接に関係した形でのハプテンが有効であると考えられる点，興味深い。

感作 17 日目のリンパ節細胞移入群では，全く反応は見られなかった。これは，Baer ら[1] の報告と一致するが，21 日目のものでは弱い乍ら反応が認められた。5 日目のリンパ節細胞と比較して，この時期には effector cell が全身に撒布された為に committed cell が少いのか，反応が液性抗体産生系に変換した為なのか，或は sup-

pressor cell が働いているのかなどの場合が考えられる。5日目と23日目のリンパ節細胞の混合浮遊液を腹腔に移入した群で，反応が余り抑えられなかった事は，suppressor cell の関与がない事を思わせるが，必ずしも否定できる訳ではない。17日目のリンパ節細胞では全く反応が移入できなかったが，21日目では弱い乍らも反応が惹起された事から，17日目以後の約1週間の間に，リンパ節内での細胞反応が質的に大きく変化している事も考えられる。この問題は，5日目と17日目のリンパ節細胞を混合移入する実験によって，より明瞭になると思われる。

23日目の脾細胞と5日目のリンパ節細胞とを混合移入した群では，特に24時間目の反応が抑えられていた。脾細胞単独移入群がないので結論は出し難いが，抑制的な成分が充分に考えられる。また，感作後3週前後の細胞移入群に共通して，24時間目の反応の低下が認められたのも興味深い。

血清による移入の結果では，16日目の血清で特に6時間目の反応だけが目立った。勿論抗体価の問題もあるが，抗体の種類（IgM から IgG への転換）と関連付けられるかも知れない。

移入したリンパ節細胞 population の膜リセプターによる分類では，感作後，T細胞，FcR^+ 細胞の増加が認められた。4～5日目の T 細胞の増加は前の報告[8]と一致した。同じ時期の細胞を，nylon wool column を通過させて移入した群でも，反応を誘導できたこと（図-2）と合せ考えれば，T 細胞の強い関与が明かであろう。17～23日目では，T 細胞は更に増加したが，この時期には組織学的には類上皮細胞結節が形成される。これらの結節周囲のリンパ球 population を暗示する，FcR^+ 細胞の増加は，これらの細胞が輸入リンパ管からのみリンパ節内に入り，この流入は末梢の抗原刺激によって増加するという，我々の仮説[9]を支持する。抗原刺激により所属リンパ節の血流量並びに血中より輸出リンパ管に移行するリンパ球が増加するという報告[15]があるが，これは我々の得た結果及び仮説に相反するものではない。これらの FcR^+ 細胞の機能的意義については，今後追求されなければならないが，現在我々は，この中に suppressor T 細胞が含まれていると考えている。

細胞性免疫の有効なパラメーターとして，現在いくつかのものが考えられている。皮膚反応に限ってみても，Scheper ら[16]は，皮膚の厚さ，紅斑の広さ，強度の3つを測るのが望ましいと提唱している。今回我々は，紅斑の強さのみを指標としてきたが，今後より客観的で正確な測定方法を開発する必要があろう。ラジオアイソトープでラベルした核酸前駆物質の取込みで測定される細胞の増殖反応や，Migration Inhibitory Factor (MIF) 又は Chemotactic Factor などで計測されるリンフォカインの産生などを指標としてきた in vitro のパラメーター以外に，液性抗体産生系に於ける抗体量の測定や，plaque forming cell (PFC) assay の如き，より確実で簡便な測定法の確立を望みたい。この事は，より精密に細胞の相互作用を研究して行く上に，欠くべからざる条件であると考えられる。

結　論

モルモットを Oxazolone で感作し，感作後5日目のリンパ節細胞を正常同系モルモットの腹腔内に移入する事により，recipinnt に接触過敏症を導入する事ができた。感作後5日目のリンパ節細胞浮遊液は，T 細胞の割合が増加しており，又ナイロンウールカラム通過細胞を移入しても同じ結果が得られる事より，これらの反応に関与するのは基本的には T 細胞である事が示唆される。

しかし，同じ細胞浮遊液を，静脈内に移入，2時間後に皮膚テストを行うと，反応は見られなかった。又，感作後17日目のリンパ節細胞では，この反応を移入する事ができなかった。この，感作後5日目と17日目のリンパ節細胞の差違と，腹腔内移入と静脈移入との差違について検討を加えた。

文　献

1) Baer, H., Stone, S. H. and Malik, F.: J. Immunol. **117**; 1159, 1976.
2) Phanuphak, P., Moorhead, J. W. and Claman, H. N.: J. Immunol. **113**; 1230, 1974.
3) Asherson, G. L., Zembala, M., Mayhew, B. and Goldstein, A.: Eur. J. Immunol. **6**; 699, 1976.
4) Morikawa, S., Baba, M., Harada, T. and Mituoka, A.: J. Exp. Med. **145**; 237, 1977.
5) Campa, M., Garzelli, C., Ferrannini and Falcone, G.: Clin. Exp. Immunol. **26**; 355, 1976.
6) Oort, J. and Turk, J. L.: Brit. J. Exp. Path. **46**; 147, 1965.
7) Julius, M. H., Simpson, E. and Herzenberg, L. A.: Eur. J. Immunol. **3**; 645, 1973.
8) Onoé, K.: Acta Path. Jap. **26**; 671, 1976.
9) Onoé, K., Yasumizu, R., Takeda, J., Okuyama, H. and Morikawa, K.: Submitted for publication.
10) Asherson, G. L. and Ptak, W.: Immunol. **15**; 405, 1968.
11) 三村信輔・武田純子・小野江和則・奥山春枝・森川

和雄: Minophagen Med. Rev. **21**; 251, 1976.
12) 奥山春枝・武田純子・小野江和則・森川和雄: 北海道大学免疫科学研究所紀要, 38; 13, 1978.
13) Miller, S. D., Sy, M. S. and Claman, H. N.: Eur. J. Immunol. **7**; 165, 1977.
14) Claman, H. N., Miller, S. D. and Sy, M. S.: J. Exp. Med. **146**; 49, 1977.
15) Hay, J. B. and Hobbs, B. B.: J. Exp. Med. **145**; 31, 1977.
16) Scheper, R. J., Noble, B., Parker, D. and Turk, J. L.: Int. Arch. Allergy appl. Immunol. **54**; 58, 1977.

Adoptive Transfer of Contact Sensitivity to Oxazolone in Guinea Pigs

Kazunori ONOÉ, Ryoji YASUMIZU
and Kazuo MORIKAWA

Lymph node cells harvested from guinea pigs which were sensitized with oxazolone in complete Freund's adjuvant 5 days before could induce contact sensitivity into normal isologous recipients when they were injected intraperitoneally and the recipients were skin tested 6 days later. As T cell proportion in lymph node cell supensions at this stage increased and nylon wool passed T cell enriched fraction had the same potency, it becomes evident that T cell is essentially responsible for these reactions.

However when the same cell suspensions were injected intravenously and the recipients were skin tested 2 hours after cell transfer, they showd no response. Lymph node cells sensitized 17 days before had no effect on the transfer of this sensitivity either.

The reaction why there were great differences among those cell suspensions and between i.v. and i.p. cell injection groups will be discussed.