

ヌードマウスにおける接触過敏症の研究 —表皮ランゲルハンス細胞, Thy-1 陽性樹枝状表皮細胞の機能について—

横尾 雅子

ヌードマウス BALB/c (nu/nu) の皮膚を通して2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB) の感作成立あるいは免疫学的不応 (トレランス) の誘導が可能かどうかを検討した。

BALB/c (nu/nu) の皮膚を正常マウス BALB/c に移植して同部に DNFB を塗布して感作すると DNFB に対する接触過敏症の感作は成立したが, 植皮部に中波長紫外線 (UVB) を照射した後 DNFB を塗布する抑制処置を加えた場合, DNFB に対するトレランスは誘導されなかった。さらに, BALB/c (nu/nu) に DNFB を塗布して24時間後に採取した所属リンパ節細胞 (DLNC) を BALB/c に移入すると, 感作は成立した。しかし, UVB と DNFB で処置して24時間後の BALB/c (nu/nu) の DLNC の移入では, BALB/c においてトレランスの誘導は認められなかった。

以上より BALB/c (nu/nu) の皮膚は, DNFB に対して接触過敏症の感作を成立させることはできるが, トレランスを誘導する能力に欠けることが示唆され, この能力の欠陥はヌードマウスの皮膚における Thy-1 陽性樹枝状表皮細胞の機能不全によるものと考えられる。一方同マウスの表皮ランゲルハンス細胞の機能は十分保たれているものと思われる。

(平成3年6月26日採用)

Study on Contact Sensitivity in Athymic Nude Mice —Function of Epidermal Langerhans Cells and Thy-1 Positive Dendritic Epidermal Cells—

Masako Yokoo

Skin from athymic nude mice BALB/c (nu/nu) was grafted onto euthymic mice BALB/c and was painted with 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB). Contact sensitivity to DNFB was induced in the euthymic mice by this application. When the grafted skin from the athymic mice was applied to the euthymic mice with ultraviolet-B (UVB) irradiation and subsequent DNFB painting, the procedure did not produce immunological tolerance in the euthymic mice. The inoculation of athymic mouse lymph node cells (DLNC) drained from DNFB-painted skin into euthymic recipients resulted in the induction of contact sensitivity to DNFB in the animals. On the other hand, DLNC from UVB-irradiated and DNFB-sensitized athymic donors did not lead to the appearance of immunological unresponsiveness, when injected into euthymic recipients. These results indicate that the application of DNFB through the grafted skin of athymic nude mice can induce contact sensitivity, but does not lead to the development of immunological tolerance. The lack of development of tolerance is considered to be due to a functional disorder of Thy-1 positive dendritic

epidermal cells in the nude mouse skin. The nude mouse skin is thought to retain activity inducing contact sensitivity. (Accepted on June 26, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17 (2): 148-158, 1991

Key Words ① Contact hypersensitivity ② Tolerance ③ Ultraviolet-B
④ Athymic nude mice ⑤ Thy-1 positive epidermal cell

はじめに

突然変異ヌードマウスは、英国、グラスゴーにおいてアルピノマウスのクローズドコロニーのなかで偶然に発見され、1962年、Isaacson, Cattanaach によって初めて報告された。¹⁾同マウスの胸腺の欠損は、1968年に Pantelouris が明らかにし、²⁾それ以来動物の自然発生免疫欠損症として注目されるようになった。そして現在では、ヌードマウスは免疫学や実験腫瘍学の分野で広く用いられ、免疫機構の研究や、異種の腫瘍細胞が容易に生着することから、腫瘍の発生機序の解明や抗腫瘍剤の開発などのために大いに役立っている。

先天的に胸腺を欠くヌードマウスにおいては、T細胞が免疫学的にほとんど機能せず、その結果として細胞性免疫能が欠落していることが、多くの研究者によって証明され、³⁾接触過敏症においても、1972年に Pritchard, Micklem⁴⁾がオキサゾンを用いてそれが成立しないことを確認している。

接触過敏症は次のような過程を経て成立すると考えられている。第1過程：ハプテンが皮膚に侵入して皮膚成分と結合して完全抗原となり(抗原の形成)、第2過程：それを抗原提示細胞が処理して抗原情報をイニシエーターT細胞あるいは抑制機構に伝達し(抗原提示)、第3過程：その刺激によって領域リンパ節において細胞増殖が起こり、エフェクターT細胞が産生され(感作成立)、第4過程：体内を循環しているエフェクターT細胞は、再度ハプテンが接触して形成される抗原と反応して皮膚炎を生じ(誘発過程)、第5過程：これに平行してサブレッサーT細胞が誘導され免疫応答の調節をする(抑制

機構)。

T細胞が機能しないヌードマウスにおいては、同細胞が直接関与する第3過程、第4過程、第5過程が作動しないことは容易に理解できる。しかしながら、第1過程、第2過程すなわち抗原情報がリンパ系組織でT細胞を刺激して感作あるいは抑制機構を発動させるまでの過程がヌードマウスにおいて成立するかどうかは、現在でもなお明らかにされてはいない。これら第1過程、第2過程はそのほとんどが皮膚内で進行するので、ヌードマウスの皮膚は接触過敏症の感作を成立させることができるかどうか、また抑制機構を誘導する能力を有するかどうかを検討することによって上記の問題の解明の糸口を得ることができると考えられる。

近年、感作の成立には表皮ランゲルハンス細胞、そして抑制機構の誘導には Thy-1 陽性樹状表皮細胞が関与している可能性を示唆する研究結果が相次いで報告され、⁵⁾⁻⁹⁾我々が計画している実験は間接的ながらヌードマウスにおける両細胞の機能を検討することにもなる。

著者は今回、BALB/c系のヌードマウスの皮膚を同系の正常マウスに移植し、一群の動物には移植皮膚に2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)を塗布して感作を行い、他の群には移植部位に中波長の紫外線を照射した上にDNFBを塗布して抑制機構(免疫学的不応、トレランス)の誘導を試みた。その結果、感作処置を行ったマウスにおいてはDNFBに対する接触過敏症の感作は観察されたが、トレランスの誘導を試みた動物では抑制が認められず、ヌードマウスの皮膚は接触過敏症の感作を成立させる能力は有するが、トレランスの誘導はできないことを示す結果が得られた。さらにこれらの所見とヌードマウスの表皮におけるランゲルハンス細

胞, Thy-1 陽性樹枝状表皮細胞の態度 (密度, 形態) との関連性を検討した.

材料および方法

(1) 動物: 雌性正常マウス BALB/c AJcl, ノードマウス BALB/c AJcl (nu/nu) は Japan Clea より購入し各々の実験には 5~10 週齢の週齢を一致させた動物を用いた.

(2) 抗原: 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB) はナカライより, 4-ethoxymethylene-2-phenyloxazol 5-one (oxazolone, OX) は Sigma 社より購入した.

(3) 紫外線照射: マウスの腹部皮膚あるいは植皮部皮膚を剃毛して仰臥位にて固定し, 中波長紫外線 (UVB, エネルギーの75%は280~320 nm, ピーク波長は 305 nm) を 3 日連続, 1 回 60 mJ/cm² (0.844 mJ/cm²/sec) を照射した. UVB の線量は UV ラジオメーター (UVR-305/365, エーザイ) を用いて測定した.

(4) 植皮: ペントバルビタールによる全身麻酔下で 20×20 mm の腹部皮膚を全層切除し, ドナーからレシピエントに植皮して, タイオーバーをかけて固定した. 10 日後にタイオーバーを外し 14 日後より実験に用いた (Fig. 1).

(5) 感作と誘発および免疫学的不応 (トランス) の誘導: マウスの剃毛した腹部皮膚あるいは植皮部に 0.5% DNFB 溶液 (アセトン 4: オリーブ油 1) 25 μl を塗布して感作し, トランスの誘導は UVB 最終照射より 24 時間後に同部に感作と同じ処置を加えることにより行った. OX による感作は 5% 溶液 (95% エタノール) 100 μl を塗布して行った. 6 日後, 誘発テストは 0.2% DNFB (アセトン 4: オリーブ油 1) 20 μl, 3% OX (95% エタノール) 10 μl を耳介皮膚に塗布し, その 24 時間後に耳介の厚さを dial thickness gauge (Peacock 製) で測定した. 塗布前との値の差を耳介腫脹として表した. 再感作と誘発も同様の方法で行った.

(6) 所属リンパ節細胞による感作およびト

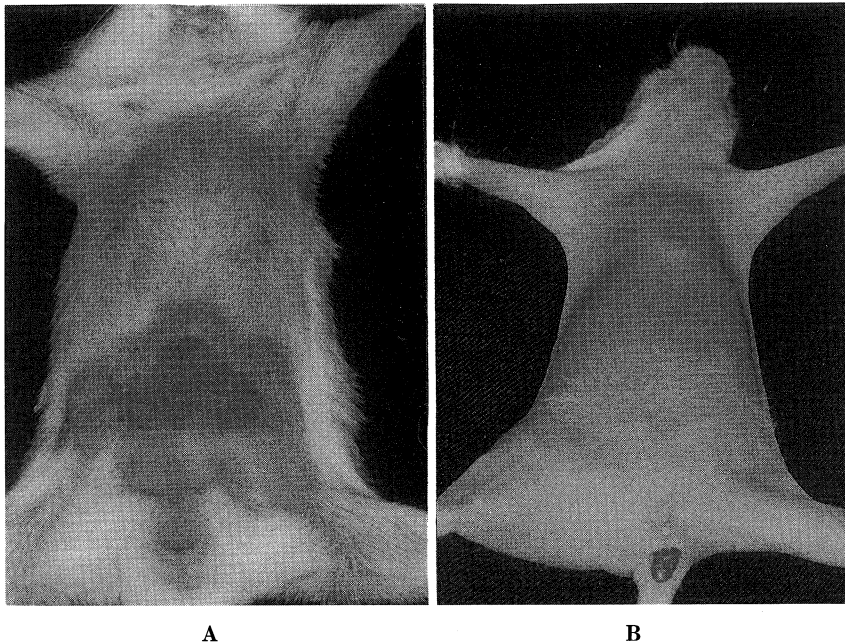


Fig. 1. The results of skin graft

A. The skin of BALB/c (nu/nu) mouse was grafted to the abdomen of BALB/c mouse.
B. The skin of BALB/c mouse was grafted to the abdomen of BALB/c (nu/nu) mouse.

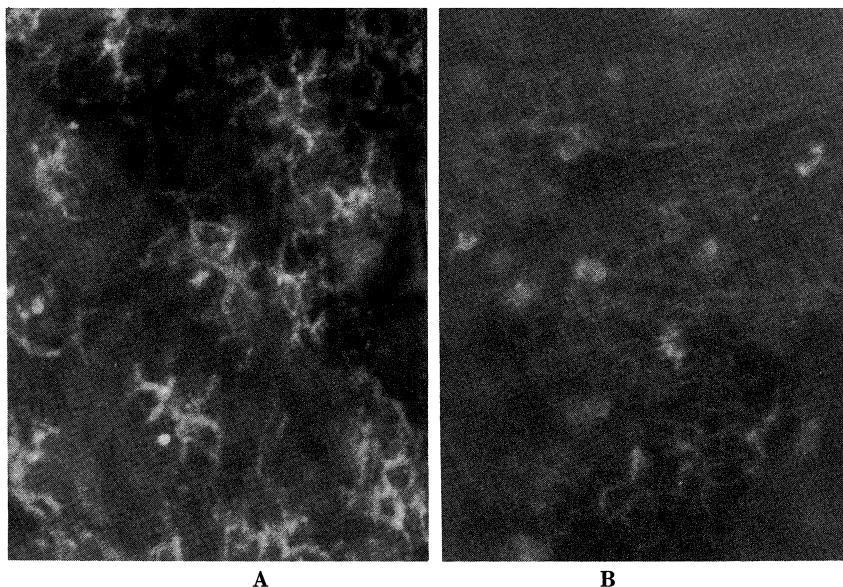


Fig. 2. Immunofluorescence reaction of Thy-1⁺ dEC (×200)
A. Euthymic mice BALB/c showing dendritic cells
B. Athymic nude mice BALB/c showing round cells

レランスの誘導：0.5% DNFB 20 μ l を腹部皮膚あるいは植皮部に塗布し、24時間後に鼠径リンパ節を切除した。採取した所属リンパ節細胞(DLNC)はRPMI 1640で2度洗浄し、 1×10^7 個(0.1 ml, RPMI 1640)をレシピエントの両側足蹠に皮下注射した。誘発テストは6日後に行い、耳介の厚さを測定した後に再感作をし、さらに6日後に誘発反応を観察した。

(7) DLNCの抗体および補体による処理： 1×10^7 個(磷酸緩衝液(PBS))のDLNCは、2%の仔牛血清加RPMI 1640で1:20に希釈した抗Thy-1, 2抗体(Becton Dickinson)と混和して4 $^{\circ}$ C 30分間反応させ、2回RPMIで洗浄した後に1:8に希釈した家兔新鮮血清(C)と37 $^{\circ}$ C 1時間反応させた。これらの細胞は二度洗浄の後使用された。

(8) 蛍光抗体法：マウスの腹部皮膚あるいは植皮部皮膚は0.2% EDTA溶液(PBS)中で37 $^{\circ}$ C 3時間放置した後に表皮層を分離し、30分間アセトンで固定した。表皮片は4 $^{\circ}$ C 一晚抗Thy-1, 2抗体(ラット, Becton Dickinson, PBSで20倍に希釈)あるいはモノクローナル抗I-A^d抗体(マウス, Becton Dickinson, PBS 40

倍希釈)を反応させた後に十分洗浄し、さらにFITC結合抗ラットIgG抗体あるいはFITC結合抗マウスIgG抗体を反応させた。試料はUVフィルターシステムを用い、ニコン蛍光顕微鏡で観察し、オクラー・グリッドを用いて一定区画内のランゲルハンス細胞(LC, 抗I-A抗体に反応)、Thy-1陽性樹枝状表皮細胞(Thy-1⁺dEC)を数え、5区画の平均値を求めた。

(9) 統計処理：各々グループは5匹からなり、一つの実験は2回繰り返した。統計処理はすべてStudent's t-testを使用した。

結 果

(1) UVB照射によるトレランスの誘導(**Table 1**): BALB/cの腹部皮膚に3日連続UVBを照射し、24時間後に同部にDNFBを塗擦した。6日後にDNFBを用いて誘発テストを行って24時間後に耳介の厚さを測定した結果(グループ1, 2), UVBを照射しないでDNFBを塗布した動物(グループ3)に比べて明らかに弱い誘発反応であった。これらの動物にトレランスが誘導されているかどうか検討するために、誘発反応

を観察した後に DNFB (グループ1) あるいは OX (グループ2) による再感作を行い、6日後に DNFB あるいは OX による誘発テストを行った。DNFB による再感作処置により誘発反応は全く増強されないのに対し (グループ1), OX による感作は十分に成立し (グループ2), UVB の照射部に DNFB を塗布した場合 DNFB に特異的なトレランスが誘導されるという結果であった。本実験は、感作及びトレランスの誘導の条件を設定する目的で行われ、この実験条件で

十分に目的を達しうることが明らかになった。

(2) BALB/c(nu/nu)皮膚による感作の成立およびトレランスの誘導 (Table 2): BALB/c の腹部に BALB/c あるいは BALB/c(nu/nu) の皮膚を植皮し、14日後に同部に DNFB を塗布して感作を行い、6日後に誘発テストを施行した。その結果、BALB/c, BALB/c(nu/nu) いずれの皮膚の植皮部を通しての感作も同程度の DNFB に対する接触過敏症が成立した (グループ2, 3)。次に BALB/c, BALB/c(nu/nu) 皮

Table 1. Effect of UVB irradiation on DNFB contact hypersensitivity

Groups	Treatment	Sensitization	Challenge	Ear increment $\text{cm} \times 10^{-3} \pm \text{S.E.}$	Resensitization	Challenge	Ear increment $\text{cm} \times 10^{-3} \pm \text{S.E.}$
1	UVB ^a	DNFB ^b	DNFB ^d	7.0±0.7	DNFB ^b	DNFB ^d	7.8±0.3
2	UVB ^a	DNFB ^b	DNFB ^d	8.0±0.5	Ox ^c	Ox ^e	19.8±0.1
3	None	DNFB ^b	DNFB ^d	16.2±0.5			
4	None	None	DNFB ^d	4.0±0.1			
5	None	Ox ^c	Ox ^e	19.8±0.4			
6	None	None	Ox ^e	3.0±0.2			

*p<0.01

- The shaved abdominal skin was irradiated continuously for 3 days at 60 mJ/cm².
- An amount of 25 μl of 0.5% DNFB was applied for sensitization.
- An amount of 100 μl of 5% Ox was applied for Ox sensitization.
- A challenge test was performed with 20 μl of 0.2% DNFB.
- An amount of 10 μl of 3% Ox was used for the challenge test.

Table 2. Effect of UVB irradiation on DNFB contact hypersensitivity induced BALB/c (nu/nu) skin grafted in BALB/c

Groups	Treatment	Sensitization ^c	Ear increment ^d $\text{cm} \times 10^{-3} \pm \text{S.E.}$	Resensitization	Ear increment ^d $\text{cm} \times 10^{-3} \pm \text{S.E.}$
1	None	DNFB	16.2±0.5	DNFB	20.0±1.0
2	BALB/c ^a skin graft	DNFB	15.0±1.1	DNFB	21.2±0.4
3	BALB/c (nu/nu) ^a skin graft	DNFB	13.7±0.2	DNFB	19.2±0.4
4	BALB/c ^b skin graft UVB	DNFB	5.8±0.3	DNFB	11.5±0.2
5	BALB/c(nu/nu) ^b skin graft UVB	DNFB	6.8±0.3	DNFB	17.8±0.3
6	None	None	4.0±0.1		

*p<0.01

- The skin of BALB/c or BALB/c (nu/nu) mice was grafted to the abdomens of BALB/c mice.
- The skin of BALB/c or BALB/c (nu/nu) mice was grafted to the abdomens of BALB/c mice. Irradiation with UVB (60 mJ/cm²) was performed for 3 days.
- An amount of 25 μl of 0.5% DNFB was applied for DNFB sensitization.
- A challenge test was performed with 20 μl of 0.2% DNFB.

膚の植皮部に UVB を照射し、同部に DNFB を塗布して 7 日後に他の部位で再感作を行った結果、BALB/c からの皮膚の植皮部に処理をした動物 (グループ 4) では、コントロール (グループ 2) に比し明らかに弱い反応がみられてトレランスの成立が観察された。それに反し、BALB/c (nu/nu) の皮膚に同様の処置を行った動物では (グループ 5)、コントロール (グループ 3) と比較してほとんど誘発反応に差がなく、ヌードマウスの皮膚はトレランスを誘導する能力がほとんどないことを示す結果であった。

(3) BALB/c 所属リンパ節細胞 (DLNC) によるトレランスの誘導 (Table 3): BALB/c に DNFB を塗布、24 時間後に採取した DLNC を無処置の BALB/c の足蹠に皮下注射したところ、DNFB に対する接触過敏症の感作が観察さ

れた (グループ 1)。さらに UVB を照射後 DNFB を塗布して 24 時間後の DLNC の移入では明らかな感作は成立せず (グループ 4, 5)、これらの動物を DNFB あるいは OX で再感作を試みたところ、DNFB 再感作動物 (グループ 4) では、コントロール (グループ 1) に比し弱い DNFB に対する誘発反応しかみられなかった。一方 OX による接触過敏症の感作は十分に成立した (グループ 5)。以上の成績から BALB/c においては、UVB 照射後に DNFB を塗布して 24 時間後に採取した DLNC は、レシピエントに DNFB に特異的なトレランスを誘導できることが明らかになった。

(4) BALB/c (nu/nu) DLNC による感作の成立およびトレランスの誘導 (Table 4): BALB/c (nu/nu) に DNFB を塗布し、24 時間後に

Table 3. Induction of contact hypersensitivity and immunological unresponsiveness with draining lymph node cells of BALB/c mice

Groups	Treatment of ^a DLNC donor	Epicutaneous ^b sensitization	Challenge ^c	Ear increment cm $\times 10^{-3} \pm$ S.E.	Resensi- tization	Challenge ^c	Ear increment cm $\times 10^{-3} \pm$ S.E.
1	DNFB	None	DNFB	18.6 \pm 0.4	DNFB	DNFB	23.8 \pm 0.3
2	None	DNFB	DNFB	17.8 \pm 0.3			* 23.8 \pm 0.3
3	None	None	DNFB	3.6 \pm 0.2			
4	UVB/DNFB	None	DNFB	5.7 \pm 0.2	DNFB	DNFB	12.0 \pm 0.2
5	UVB/DNFB	None	DNFB	6.3 \pm 0.2	Ox	Ox	18.0 \pm 0.4
6	None	Ox	Ox	18.6 \pm 0.4			
7	None	None	Ox	3.2 \pm 0.1			

*p<0.01

a. Cells from draining lymph nodes were collected from UVB irradiated and unirradiated BALB/c mice 24 hours after the cutaneous application of 25 μ l of 0.5% DNFB.

b. For sensitization, 25 μ l of 0.5% DNFB or 100 μ l of 5% Ox was applied to the shaved abdominal skin.

c. An elicitation test was performed using 0.2% DNFB or 3% Ox.

Table 4. Induction of contact hypersensitivity and immunological unresponsiveness with draining lymph node cells of BALB/c (nu/nu) mice

Groups	Treatment of ^a DLNC donor	Epicutaneous ^b sensitization	Challenge ^c	Ear increment cm $\times 10^{-3} \pm$ S.E.	Resensi- tization	Challenge ^c	Ear increment cm $\times 10^{-3} \pm$ S.E.
1	DNFB	None	DNFB	16.3 \pm 0.4	DNFB	DNFB	23.8 \pm 0.5
2	DNFB/UVB	None	DNFB	9.3 \pm 0.6	DNFB	DNFB	23.0 \pm 0.2
3	None	DNFB	DNFB	17.8 \pm 0.3			
4	None	None	DNFB	3.6 \pm 0.2			

a. Cells from draining lymph nodes were collected from UVB irradiated or unirradiated BALB/c (nu/nu) mice 24 hours after the cutaneous application of 20 μ l of 0.5% DNFB.

b. For sensitization, 25 μ l of 0.5% DNFB was applied to the shaved abdominal skin.

c. An elicitation test was performed using 0.2% DNFB.

Table 5. Induction of contact hypersensitivity and immunological unresponsiveness with draining lymph node cells of BALB/c (nu/nu) grafted with the skin of BALB/c

Groups	Treatment of donor mice	Treatment of DLNC	Challenge ^e	Ear increment cm $\times 10^{-3} \pm$ S.E.	Resensi- ^f tization	Challenge ^g	Ear increment cm $\times 10^{-3} \pm$ S.E.
1	BALB/c ^a skin graft DNFB	None	DNFB	16.6 \pm 0.8	DNFB	DNFB	23.6 \pm 0.4
2	BALB/c ^b skin graft UVB/DNFB	None	DNFB	7.3 \pm 0.6	DNFB	DNFB	13.6 \pm 0.1
3	DALB/c ^b skin graft UVB/DNFB	None	DNFB	6.6 \pm 0.2	Ox	Ox	18.0 \pm 0.4
4	BALB/c ^b skin graft UVB/DNFB	anti-Thy1, 2 ^c +	DNFB	9.3 \pm 0.4	DNFB	DNFB	19.9 \pm 1.5
5	BALB/c ^b skin graft UVB/DNFB	C ^d	DNFB	8.3 \pm 0.4	DNFB	DNFB	10.3 \pm 0.2
6					DNFB	DNFB	18.5 \pm 0.3
7						DNFB	2.6 \pm 0.2
8					Ox	Ox	18.7 \pm 0.4
9						Ox	4.0 \pm 0.3

*p<0.01 **p>0.05

a. The skin of BALB/c mice was grafted to the abdomens of BALB/c (nu/nu) mice and 25 μ l of 0.5% DNFB was applied to the grafted area.b. The skin of BALB/c mice was grafted to the abdomens of BALB/c (nu/nu) mice. Irradiation with UVB (60 mJ/cm²) was performed for 3 days. Then 25 μ l of 0.5% DNFB was applied to the grafted area.

c. DLNC were treated with anti Thy-1, 2 antibodies and complement.

d. DLNC were treated with complement alone.

e. An elicitation test was performed with 20 μ l of 0.2% DNFB.f. For sensitization, 25 μ l of 0.5% DNFB or 100 μ l of 5% Ox was applied to the shaved abdomen.g. A challenge test was performed with 20 μ l of 0.2% DNFB or 10 μ l of 3% Ox.

DLNCを採取してBALB/cのレシピエントに移入したところ、DNFBに対する接触過敏症の感作は成立した(グループ1)。さらにBALB/c(nu/nu)にあらかじめUVB照射を行ってDNFBを塗布、24時間後のDLNCをレシピエント(BALB/c)に移入すると明らかな感作は成立しないが、DNFBによる再感作は十分に成立し、BALB/c(nu/nu)のDLNCによるトレランスは誘導されないという結果であった(グループ2)。

(5) BALB/c皮膚を植皮したBALB/c(nu/nu)のDLNCによるトレランスの誘導(**Table 5**): **Table 4**はDNFB接触過敏症のトレランスを誘導する処置を加えたヌードマウスのDLNC

は正常マウスと異なり、トレランスを誘導する能力に欠ける可能性を示している。これがもし、**Table 2**で示されたようにヌードマウスの皮膚に原因があるとすれば、正常マウスの皮膚をヌードマウスに植皮して、それを通して処置を加えればヌードマウスのDLNCもトレランスを誘導する能力を持つようになると考えられる。本実験はこの仮定にそって計画された。

BALB/cの皮膚をBALB/c(nu/nu)に植皮し、それらにDNFBを塗布してDLNCを得、その細胞をBALB/cに移入したところ、DNFBに対する誘発反応は陽性を示した(グループ1)。同じくBALB/c(nu/nu)に植皮したBALB/cの皮膚にUVBを照射した後にDNFBを塗布

し、DLNCを調整してそれをBALB/cのレシピエントに移入すると、DNFBに対する誘発反応は明らかな陽性とはならなかった(グループ2, 3)。これらの動物をDNFBあるいはOXにより再感作すると、DNFBに対して明らかに弱い誘発反応しか示さなかったが(グループ2)、OXの再感作は十分に認められ(グループ3)、ヌードマウスも正常マウスの皮膚を通すならば、DNFBに特異的なトレランスを起し得ることを示す結果であった。

同様の処置をして得たDLNCを抗Thy-1, 2抗体と補体で処理して移入すると、DNFBによる再感作を行って得られた誘発反応は(グループ4)、補体のみで処理した細胞を用いたコントロール(グループ5)より明らかに強い。この結果は、トレランスの誘導はDLNCの中の抗Thy-1, 2抗体に反応する細胞が関与している可能性を示す。

(6) BALB/c, BALB/c(nu/nu)表皮におけるLC, Thy-1⁺dECの組織学的検討：8週齢のBALB/c, BALB/c(nu/nu)の腹部皮膚より分離した表皮片について、抗I-A^d抗体あるいは抗Thy-1, 2抗体を用いた蛍光抗体間接法を行い、表皮内に分布するLCとThy-1⁺dECの形態と単位面積当たりの数を検討した。LCの数は、BALB/cで $680 \pm 40/\text{mm}^2$ 、BALB/c(nu/nu)で $664 \pm 44/\text{mm}^2$ 観察されて両者に有意の差はなく、形態においても両者とも樹枝状を呈し相違を認めなかった。一方Thy-1⁺dECについては、BALB/c(nu/nu)の表皮にみられる数は $212 \pm 10/\text{mm}^2$ でBALB/c($620 \pm 45/\text{mm}^2$)の1/3と少なく、形態もBALB/c(nu/nu)ではそのほとんどが円形で、BALB/cの樹枝状なのに比較して明らかに異なっていた(Fig. 2)。また、移植されて14日後の植皮部の表皮における両細胞の数および形態は、BALB/c, BALB/c(nu/nu)とも、週齢を一致させた動物の未処置の皮膚の表皮におけるそれらと差は認められなかった。

考 察

ヌードマウスが発見されてから早くも30年が経過しようとしているが、その間に報告された同マウスにおける接触過敏症の研究はあまり多くない。1972年Pritchard, Micklem⁴⁾は、CBA/H系のヌードマウスにOXを塗布して接触過敏症の感作を試みたが成立せず、さらに同抗原の刺激により所属リンパ節において細胞増殖反応も認められなかったと報告し、これらの免疫応答は、胸腺の皮下あるいは腎被膜下への移植によりある程度の回復がみられたとしている。これらの実験成績は、他の細胞性免疫と同様に接触過敏症の免疫応答もヌードマウスにおいては欠落していることを示しているが、さらに詳細に検討すると必ずしもそのすべてが欠けているわけではないことが最近次々に明らかになってきた。

ハプテンが皮膚に接触して抗原の形成と提示を経て抗原刺激が加わると、感作機構が発動して所属リンパ節においてearly delayed type hypersensitivity (DTH) initiating T cellとDTH effector T cellという2種類の感作リンパ球が産生される(感作過程)。再び同じハプテンが接触して同じように抗原により刺激されると、前者はDTH initiating factorを分泌して誘発後2時間にピークがくるDTH initiating phaseの反応を生じ、後者は種々のリンフォカインを介して誘発24時間後にピークとなる24 hour late phaseの反応を惹起する(誘発過程)。一方、以上の感作過程と平行して、抗原刺激によりこれらの反応を調節する抑制機構(トレランス)が誘導され、DTH-initiating phaseを抑制するsuppressor T cellと24 hour late phaseを抗原特異的あるいは非特異的に抑制する2種類のsuppressor T cellの合計3種類の抑制細胞が産生される。さらにまた、前述の2種類の感作リンパ球をsuppressor cellの作用から保護する役割をもつcontrasuppressor cellも生じるとされている。

最近 Herzog ら^{10)~12)}は、BALB/c 系のヌードマウスの皮膚にピクリールクロライド (PCI) や OX を塗布すると、上述 6 種類の細胞のうち DTH-initiating T cell と抗原特異的に 24 hour late phase を抑制する suppressor T cell の 2 種類が産生されるが、他の 4 種類の細胞は欠けていることを示し、これら 4 種類の細胞は胸腺依存性なのであろうとしている。そしてヌードマウスにおいては、Pritchard, Micklem⁴⁾も示すごとく、24 hour late phase の反応は生じないが、実は誘発早期の DTH-initiating phase の反応は惹起されているという実験成績を報告している。

正常動物にハプテンを塗布して、18~24 時間後に採取した所属リンパ節細胞 (DLNC) を他の同系動物に移入すると、接触過敏症の感作が成立することは以前より知られており、^{13)~15)} Thomas ら¹⁶⁾ はヌードマウスを用いて同様の実験を試みている。彼らは、CBA 系のヌードマウスに FITC を塗布して 18 時間後に得られた DLNC を、同系の正常マウスの足蹠皮下に投与したところ、接触過敏症の感作が成立することを示し我々の実験成績 (Tables 4, 5) と同様の結果を報告している。

さらに Knight ら¹⁷⁾ は、PCI あるいは OX を塗布し、24 時間後に採取された CBAxB10 系のヌードマウスの DLNC を分画して、同系の正常マウスに移入した結果、樹枝状細胞の分画が感作に有効であったと述べている。表皮 LC は皮膚から所属リンパ節に流入して樹枝状細胞になると考えられており、Knight ら¹⁷⁾ の示した樹枝状細胞の感作能力の主な部分は、表皮 LC が担っていると考えられる。近年、接触過敏症において表皮 LC は、抗原提示細胞として重要不可欠な役割を果たしていることを示す実験成績が相次いで報告されている。^{5),6)}

また、正常マウスに移植されたヌードマウスの皮膚を通して抗原刺激を加えると、接触過敏症の感作が容易に成立するという今回の実験結果 (Table 2) は、ヌードマウスの皮膚が接触過敏症における抗原形成と提示のプロセスを進行

させる十分な能力を持つことを示唆している。

Toews ら¹⁸⁾ は、C57BL/6 系の正常マウスの皮膚に UVB を照射して表皮 LC の機能を抑え、同部に DNFB を塗布した場合 DNFB に対する接触過敏症は成立せず、さらに DNFB を塗布して再感作を行うも、それも成立しないでトレランスの状態が誘導されることを発見し、その後それは suppressor T cell の産生によることが明らかとなった。¹⁹⁾ さらにまた、UVB を照射した上にハプテンを塗布し、24 時間後に得られた DLNC もそれをレシピエントに投与した場合にトレランスの状態を誘導することができることが報告された。^{20),21)} そこで著者はまず、ヌードマウスの皮膚を正常マウスに移植し、そこに UVB と DNFB による抑制処置を加え、1 週間後に DNFB による再感作を行ってヌードマウスの皮膚がトレランスの状態を誘導する能力があるかどうかを検討した (Table 2)。その結果、再感作は十分に成立して正常マウスに抑制機構が作動していないことが明らかとなった。さらにヌードマウスに UVB, DNFB による抑制処置を加え、24 時間後の所属リンパ節を正常動物に移入した場合もトレランスは生じず (Table 4)、ヌードマウスに正常マウスの皮膚を移植してその部位に抑制処置を加えて同様の実験を行ったところ、トレランスは成立するようになった (Table 5)。これらの実験は、ヌードマウスの皮膚がトレランス不成立の原因であることを示し、ヌードマウスの皮膚はトレランスを誘導する能力に欠けると結論づけることができる。換言すればこのトレランスは胸腺依存性ということになる。

ヌードマウスの皮膚の Thy-1⁺dEC は、正常マウスのそれに比較して明らかに数が少なく、形態にも大きな相違がみられる。これらの所見は Nixon-Fulton ら²²⁾ の観察と一致しており、彼らはさらに、正常マウスの Thy-1⁺dEC が ConA で刺激されると細胞増殖を起し、IL 2 を分泌するのに対し、ヌードマウスの同細胞ではそれらがなく、また前者では投与された IL 2 に反応してあまり細胞増殖を起ささないのに対して、後者は盛んに増殖するなど機能的な差がある。さ

らに正常マウスの Thy-1⁺ dEC は T 細胞抗原受容体 (TCR) の γ/δ 鎖に対応するメッセンジャー RNA (mRNA) を持つのに対して、ヌードマウスの同細胞には δ 鎖がないなど遺伝子に相違があることを報告している。そして彼らは、これらの形態、機能、遺伝子にみられる所見から、ヌードマウスの Thy-1⁺ dEC は T 細胞分化の極初期の段階で止まっているのであろうと述べている。

最近、接触過敏症のトレランスの誘導に Thy-1⁺ dEC が深く関わっている可能性を示す多くの報告があり、⁶⁾⁻⁷⁾ 我々の今回の実験結果と併せて

考えると、ヌードマウスにおいては、皮膚内で Thy-1⁺ dEC が十分機能せず、そのためにヌードマウスの皮膚を通して抗原刺激を加えた場合、トレランスの誘導が行われにくかったものと思われる。

稿を終わるに当たり、御指導、御校閲を賜りました川崎医科大学皮膚科 植木宏明教授、同大学薬理学 斎藤泰一教授、同大学人体病理学 伊藤慈秀教授、並びに終始御指導くださいました同大学皮膚科 中川昌次郎前助教授、岡 大介講師に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Isaacson, J. H. and Cattanch, B. M. : Report. Mouse News Letter 27 : 31, 1962
- 2) Pantelouris, E. M. : Absence of thymus in a mouse mutant. Nature 217 : 370-371, 1968
- 3) Kindred, B. : Nude mice in immunology. Prog. Allergy. 26 : 137-238, 1979
- 4) Pritchard, H. and Micklem, H. S. : Immune responses in congenitally thymus-less mice. 1. Absence of response to oxazolone. Clin. Exp. Immunol. 10 : 151-161, 1972
- 5) Stingl, G., Katz, S. I., Clement, L., Green, I. and Shevach, E. M. : Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. J. Immunol. 121 : 2005-2013, 1978
- 6) Tamaki, K., Fujiwara, H. and Katz, S. I. : The role of epidermal cells in the induction and suppression of contact sensitivity. J. Invest. Dermatol. 76 : 275-278, 1981
- 7) Sullivan, S., Bergstresser, P. R., Tigelaar, R.E. and Streilein, J.W. : Induction and regulation of contact hypersensitivity by resident bone marrow-derived, dendritic epidermal cells : Langerhans cells and Thy-1⁺ epidermal cells. J. Immunol. 137 : 2460-2467, 1986
- 8) Cruz, C. D., Nixon-Fulton, J., Tigelaar, R.E. and Bergstresser, P. R. : Disparate effects of in vitro low-dose UVB irradiation on intravenous immunization with purified epidermal cell subpopulations for the induction of contact hypersensitivity. J. Invest. Dermatol. 92 : 160-165, 1989
- 9) Welsh, E. and Kripke, M. : Murine Thy-1⁺ dendritic epidermal cells induce immunologic tolerance *in vivo*. J. Immunol. 144 : 883-891, 1990
- 10) Herzog, W., Meade R., Pettinicchi, A., Ptak, W. and Askenase, P. W. : Nude mice produce a T cell-derived antigen-binding factor that mediates the early component of delayed type hypersensitivity. J. Immunol. 142 : 1803-1812, 1989
- 11) Herzog, W. R., Ptak, W. and Askenase, P. W. : Suppression and contrasuppression in athymic nude mice : Nude mice produce the antigen-specific component of a T suppressor factor that inhibits the late 24-hr phase of DTH, but do not generate suppression nor contrasuppression of the early initiating phase of DTH. Cell. Immunol. 127 : 130-145, 1990
- 12) Herzog, W. R., Millet, I., Ferreri, N. R., Ramabhadran, R., Schreurs, J. and Askenase, P. W. : An antigen-specific DTH-initiating cell clone. Functional, phenotypical and partial molecular characterization. J. Immunol. 144 : 3667-3676, 1990
- 13) Asherson, G.L., Zembala, M. and Mayhew, B. : Analysis of the induction phase of contact sensitivity by foodpad transfer of regional lymph node cells. Immunology 32 : 81-88, 1977

- 14) Asherson, G. L., Mayhew, B. and Perera, M. : The production of contact sensitivity by the injection into the foodpads of recipients of the lymph node cells from mice 1 day after painting the skin with contact sensitizing agent : Requirement for matching at the major histocompatibility complex between donor and recipient mice. *Immunology* 37 : 241—244, 1979
- 15) 中川昌次郎, 後藤昌子, 青島忠恕 : DNCB 塗布領域リンパ節による感作実験. *皮膚* 20 : 525—527, 1978
- 16) Thomas, W. R., Edwards, A. J., Watkins, M. C. and Asherson, G. L. : Distribution of immunogenic cells after painting with the contact sensitizers fluorescen isothiocyanate and oxazolone. Different sensitizers from immunogenic complexes with different cell populations. *Immunology* 39 : 21—27, 1980
- 17) Knight, S. C. Bedford, P. and Hunt, R. : The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizer. II. Studies in nude mice. *Cell. Immunol.* 94 : 435—439, 1985
- 18) Toews G. B., Bergstresser, P. R. and Streilein, J. W. : Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* 124 : 445—453, 1980
- 19) Elmets, C. A., Bergstresser, P. R., Tigelaar, R. E., Wood, P. J. and Streilein, J. W. : Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 158 : 781—794, 1983
- 20) Okamoto, H. and Kripke, M. L. : Effector and suppressor circuits of the immune response are activated in vivo by different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 : 3841—3845, 1987
- 21) Oka, D., Nakagawa, S., Kohchiyama, A. and Ueki, H. : The induction of tolerance in contact sensitivity by the injection of the regional lymph node cells from mice 1 day after painting with DNFB to the UV-B irradiation skin of recipients. *Kawasaki Med. J.* 11 : 71—73, 1985
- 22) Nixon-Fulton, J. L., Kuziel, W. A., Santerse, B., Bergstresser, P. R., Tucker, P.W. and Tigelaar, R. E. : Thy-1⁺ epidermal cells in nude mice are distinct from their counterparts in thymus-bearing mice. A study of morphology, function and T cell receptor expressio. *J. Immunol.* 141 : 1897—1903, 1988