

原 著

モルモットにおけるツベルクリン遅延型皮膚反応の調節機構

——ウサギ赤血球とロゼットをつくらないリンパ球による反応の抑制——

露 口 泉 夫・寺 岡 修
河 面 孝・白 土 裕 江

大阪府立羽曳野病院

受付 昭和 51 年 11 月 8 日

SUPPRESSION OF TUBERCULIN-TYPE DELAYED SKIN REACTION BY
SENSITIZED GUINEA PIG SPLEEN CELLS WHICH GIVE NON-ROSETT-
ING LYMPHOID CELLS WITH RABBIT RED BLOOD CELLS

Izuo TSUYUGUCHI*, Osamu TERAOKA, Takashi KOHMO and Hiroe SHIRATSUCHI

(Received for publication November 8, 1976)

In guinea pigs, tuberculin-type delayed skin reaction was found to be suppressed by spleen cells which showed no rosetting with rabbit red blood cells (RRBC). Separation of spleen cells into RRBC-rosette forming cells (RFC) rich and RRBC-RFC depleted cells fractions was done by using Ficoll-Hypaque gravity sedimentation technique.

1) RRBC-RFC depleted spleen cells from guinea pigs immunized with complete Freund's adjuvant suppressed the skin reactions such as erythema and induration of their own animals when they were injected simultaneously at the same place of the injection of antigen TAP (Tuberculin Active Peptide).

2) In the experiment of local passive transfer of tuberculin-type delayed skin reaction to normal guinea pigs with lymph node cells from animals immunized with tubercle bacilli, RRBC-RFC depleted spleen cells from the same donor were found to suppress the reactions 24 hour later when injected with lymph node cells.

In both experiments 1) and 2), RRBC-RFC rich spleen cells showed rather enhancing activity. Treatment of the cells at 56°C for 30 min. abolished the suppressive activity of RRBC-RFC depleted spleen cells.

It remains to be elucidated whether suppressor cells observed above are B cells or belong to subset of T cells which do not form rosette with rabbit red blood cells.

緒 言

モルモットにおいては、胸腺由来のいわゆる T-リンパ球は、ウサギ赤血球に親和性をもち、ロゼットをつくる性質をもっている¹⁾²⁾。著者らはツベルクリン遅延型

皮膚反応が、このウサギ赤血球とロゼットをつくる性質をもつリンパ球により、正常動物に受身感作しうることを報告してきた³⁾。

免疫反応、特に流血抗体産生系においては、T-リンパ球がその調節に関与していることが広く知られてい

* From the Osaka Prefectural Habikino Hospital, Habikino-shi, Osaka 583 Japan.

る⁴⁾。一方、細胞性免疫反応系においては、T-リンパ球の他に、骨髓由来のいわゆる B-リンパ球が、その反応の調節によつているという報告がある⁵⁾⁶⁾。

そこで著者らは、フロイドの完全アジュバントで免疫したモルモットの脾臓細胞を用い、ウサギ赤血球とによるロゼットを形成後、ロゼット形成細胞、すなわち T-リンパ球の多い分画と、少ない分画を比重遠心法⁷⁾により分離し、ツベルクリン遅延型皮膚反応に及ぼす、それぞれの細胞分画による影響を検討した。

材料および方法

動物：モルモットは市販の白色雑種を使用した。ウサギは市販の体重 2 kg のものを使用した。

免疫方法：結核菌によるモルモットの感作は、結核死菌 0.5 mg/ml を含む市販のフロイドの完全アジュバントを、後足蹠の皮下に 0.1~0.2 ml 注射し、4~6 週間後の動物を実験に供した。

リンパ節および脾臓細胞浮遊液の作成：エーテル麻酔下で、膝窩および鼠径部の局所リンパ節を摘出した。また脾臓は麻酔下で、その部分切除を行なった。ハサミとピンセットを用いてそれぞれの細胞をほぐし、RPMI-1640 培養液を用いて 3 回洗浄後、同じ培養液に細胞浮遊液を作成した。細胞の生存率は、エオジン染色液による dye exclusion test により算定した。

ウサギ赤血球は、使用当日に Alsever 液中に耳静脈より採血し、3 回生理的食塩水で洗浄後、RPMI-1640 培養液で 5×10^8 /ml に調整して用いた。

ロゼット形成とその分離：これらはいずれも既に報告した方法³⁾で行なつた。すなわち脾臓細胞浮遊液と、約 20 倍量の赤血球数を含むウサギ赤血球浮遊液を混じ、37℃ 15 分間インキュベート後、室温で 1,500 回転 3 分間遠心し、そのまま氷水中に 1 時間静置し、ロゼット形成を行なつた。ロゼットを形成後、ロゼットを多く含む細胞分画とロゼットを取り除いた細胞分画への分離は、比重 1.115 に調整した Ficoll-Hypaque を用いての比重遠心法で行なつた。ロゼットを多く含む分画中のロゼットを形成しているウサギ赤血球、および遊離の赤血球は 0.5 % 塩化アンモニウムにより溶血させ、最終的に RPMI-1640 培養液による両分画の細胞浮遊液を作成した。

正常動物へのツベルクリン反応の受身感作方法：すでに報告した local passive transfer 法³⁾により行なつた。抗原として TAP (Tuberculin Active Peptide) 20 μ g を加えた感作モルモットからの局所リンパ節細胞 10^6 コを正常モルモットの背部皮内に注射し、経時的に局所の発赤腫脹の面積の大きさを測定することにより、反応の程度を観察した。TAP は結核菌体より山村らの方法⁸⁾で抽出精製したもので、大阪大学医学部第 3 内科田原留之助博士より恵与されたものを用いた。

Table 1. Specific Depletion of Rabbit Red Blood Cell-rosette forming Spleen Cells by the Method of Gravity Sedimentation

RFC (percent)		
Before separation	After separation	
	Interface	Bottom
38.3	5.0	33.0
38.1	4.2	37.2
29.1	2.7	50.0

Each cell fraction was treated with ammonium chloride to lyse erythrocytes and reosetted with rabbit red blood cells. Only rosettes possessing three or more adherant red blood cells were counted.

実験成績

1. ウサギ赤血球と脾臓細胞とによるロゼット形成とその分離

ウサギ赤血球 (RRBC) と脾臓細胞とによるロゼット (RFC) を形成後、Ficoll-Hypaque 比重遠心法により分離を行ない、塩化アンモニウムで溶血後、それぞれの細胞分画を用いて再びウサギ赤血球によるロゼット形成をみたのが表 1 である。ロゼット形成細胞は大部分試験管管底に集まり、中間層にみられるのは、ほとんどロゼット形成性のない細胞に属することがわかる。このようにして分離した、ロゼット形成細胞の多く含まれる分画を RFC rich 分画、少ない分画を RFC depleted 分画として以下の実験に用いた。

2. ツベルクリン遅延型皮膚反応に及ぼす分離したそれぞれの細胞分画の影響

表 2 はフロイドの完全アジュバントで免疫したモルモットから部分切除した脾臓細胞を用いて、ウサギ赤血球とによるロゼットを形成後、上記の方法で分離し、それぞれの細胞分画を作成し、もとの自己の皮内に、抗原 TAP とともに注射した場合の、局所の遅延型反応に及ぼす影響をみた成績である。注射後 48 時間の反応の成績で、抗原 TAP 20 μ g を単独注射した際の局所の発赤腫脹の面積を 100 とした場合に、同じ個体の脾臓から分離したそれぞれの細胞分画を、抗原 TAP に加えて注射した際の面積の割合を % で示したものである。なお TAP 単独注射で、発赤の直径が 10 mm 以下を示した個体は実験より省いた。RFC rich 分画と一緒に加えた場合には、むしろ反応の増強をみるのに比し、同じ細胞数の RFC depleted 分画を加えた場合には、約 1/2 に反応の減弱をみた。抗原 TAP なしでそれぞれの細胞分画単独の注射では何ら認むべき反応はみられない。代表的な反応の時間経過を図に示した。いずれも抗原 TAP のみの注射による局所の反応の強さを 100 として、それぞれの分離した細胞分画を加えたときの反応の強さ

Fig. Effect of RRBC-RFC Depleted and Rich Spleen Cell Fractions on TAP-induced Skin Reactions. Strength of Reaction was shown in Percent Size of Erythematous Area to the Control Induced by TAP Alone

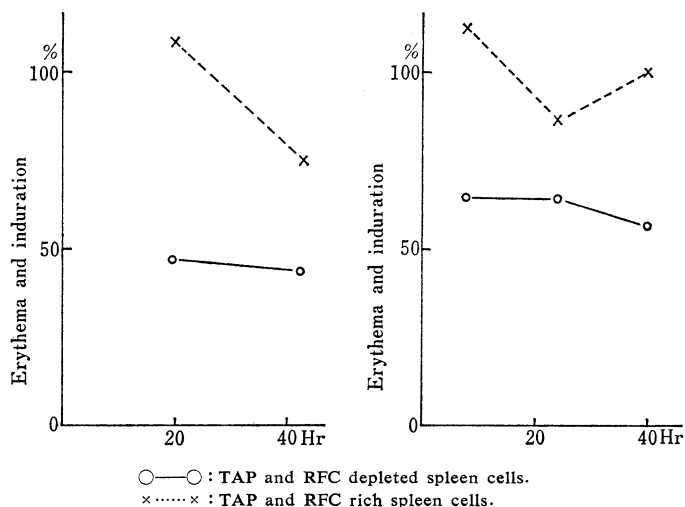


Table 2. The Effect of RRBC-RFC Depleted and Rich Spleen Cells on TAP-induced Delayed Skin Reactions

Erythema and induration (% area to the control)		
TAP alone	TAP and	
	RFC depleted cells	RFC rich cells
100	47	83
(control)	39	100
	49	78
	25	100
	31	124
	46	113
	44	75
	53	86
	29	59
100	40±3	91±6

One million fractionated spleen cells by Ficoll-Hypaque gravity sedimentation technique were injected into autologous skin intradermally with 10μg TAP(Tuberculin Active Peptide) and erythema and induration were measured 48 hours later. Guinea pigs which showed less than 10 mm in diameter of erythema by the injection of TAP alone were discarded from the experiments.

を%で示している。RFC depleted 分画を加えた際の反応の減弱が明らかにみられる。

3. 正常動物への遅延型反応の受身感作に及ぼす分離細胞分画の影響

フロイドの完全アジュバントで感作したモルモットの局所リンパ節細胞を用いて、正常動物へのlocal passive transfer の方法によるツベルクリン遅延型皮膚反応の受身感作が可能である。この際に、同じ個体から部分切除

Table 3. The Effect of RRBC-RFC Depleted and Rich Spleen Cells on Local Passive Transfer of TAP-induced Delayed Skin Reactions

Erythema and induration (% area to the control)		
TAP and lymph node cells		
—	+RFC depleted cells	+RFC rich cells
100	66	100
(control)	59	116
	100	216
	44	100
	73	100
	48	60
	91	140
100	69±9	120±20

One million RRBC-RFC depleted or rich cells were injected into normal guinea pigs intradermally with TAP and same numbers of sensitized guinea pig lymph node cells from the same donor. Skin reactions were measured 24 hours later. The recipient guinea pigs which showed less than 5 mm in diameter of erythema by the transfer of TAP and lymph node cells alone were discarded from the experiments.

した脾臓細胞より分離した細胞分画 (RFC rich および RFC depleted) をリンパ節細胞と同時に局所に注射し、受身感作の成立における、それぞれの細胞分画の影響を検討した。表3に示したのは、抗原 TAP と感作リンパ節細胞のみによる局所の反応の大きさを100とした場合、同じ donor の脾臓より得た分離細胞分画を加えた際の反応の大きさを%で示したものである。T-リンパ球の多く含まれている RFC rich 分画を加えた場合には、むしろ反応の増強が認められる場合があるのに比し、RFC

depleted 分画を加えた系では、反応の減弱をみている。Local passive transfer の系では、感作リンパ球と抗原 TAP を一緒に注射後24時間に反応のピークがみられるため、反応の測定はいずれも、注射24時間後における発赤腫脹の面積の大きさでみている。この場合、TAP と感作リンパ節細胞のみによる24時間後の発赤が直径5 mm 以下を示した個体は実験より省いた。

考 察

上記の実験結果は、ツベルクリン遅延型皮膚反応においては、ウサギ赤血球とロゼットを形成しない脾臓細胞により、その反応の発現が抑制されることを、結核菌による active immunization と、感作リンパ球による passive immunization の両方の系において示している。この場合、生きた細胞が必要であることは、56°C 30分間の処理で上述の抑制作用が失われることより確かめた。

一般に流血抗体産生系においては、suppressor T-リンパ球により、その調節がなされていることが報告され⁴⁾、また細胞性免疫系においても、胸腺由来のリンパ球による調節機構の報告がなされている⁹⁾。一方 Turk and Parker らは、卵白アルブミンで免疫したモルモットにおいては、感作 T-リンパ球とともに suppressor B-リンパ球が誘導されることを報告、細胞性免疫系における B-リンパ球による調節機構の存在を示唆する成績を観察している⁵⁾⁶⁾。

モルモットにおいてはウサギ赤血球に親和性を持ち、ロゼットをつくるリンパ球はT-リンパ球であること¹²⁾、またツベルクリン遅延型皮膚反応が、このロゼット形成細胞により、正常モルモットに受身感作しうることを著者らは報告してきたが³⁾、このウサギ赤血球とはロゼットをつくる性質のない細胞で、しかも B-リンパ球表面抗原をもたない細胞、いわゆる null cell の存在がモルモットで知られている。著者らがみてきた抑制的に働く細胞が、この null cell に属しているのかもしれない。したがって B-リンパ球ではなく、いわゆる suppressor T-cell として、T-リンパ球の subpopulation に属している可能性も考慮に入れなければならない。ウサギ赤血球とによるロゼット形成後、分離した場合、ロゼットを形成しない細胞分画においてもなお、抗 T-リンパ球家兎血清の作用をうける細胞の存在を著者らは観察しているが、このことは、上記の可能性を示唆している。この抗 T-リンパ球血清は、モルモットの胸腺細胞を家兎に免疫して得た抗血清で、モルモットの肝臓および赤血球で十分吸収したのを用いた。著者らは前報³⁾で、ウサギ赤血球とロゼット形成性のリンパ球で、ツベルクリン反応が正常動物に受身感作しうるとい報告に際し、脾臓細胞を用いた場合、リンパ節細胞に比し、受身感作能が弱かったが、これは脾臓中に感作 T-リンパ球が少ないという

こと以外に、共存するロゼットをつくらないリンパ球が、脾臓にはリンパ節よりも相対的に多く、抑制的に働いていた可能性が考えられる。

ここでみてきた抑制的に働く細胞の誘導に際し、結核菌による免疫が必要なのか等の免疫学的な特異性に関しては、純系モルモットを用いての今後に残された問題である。

著者らは皮内反応惹起抗原として、PPD の代りに TAP を使用したが、遅延型皮膚反応惹起能に関しては、PPD と同等の活性をもっていた。また TAP には、PPD にみられるようなB-リンパ球に対する mitogenicity はないことが知られている。

結 語

モルモットを用いてのツベルクリン遅延型皮膚反応において、ウサギ赤血球とロゼットをつくらない脾臓細胞が、反応に抑制的に作用していることを、次の二つの実験結果から結論した。

1. 結核菌感動物の TAP による皮内反応に際し、同じ個体の脾臓より分離した、ウサギ赤血球とロゼットをつくらない細胞と一緒に局所に注射することにより、その反応の減弱が観察された。
2. 結核菌感動物の局所のリンパ節細胞を用いての正常動物へのツベルクリン反応の局所移入実験において、同じ donor の脾臓より分離した、ロゼットをつくらない細胞を加えることにより、その受身移入反応の減弱がみられた。

稿を終るに当たり、ご校閲をいただいた山本和男院長に感謝いたします。なお本論文の要旨は第51回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) Stadecker, M. J. et al.: J. Immunol., 111 : 1834, 1973.
- 2) Wilson, A. B. and Coombs, R. R. A.: Int. Arch. Allergy, 44 : 544, 1973.
- 3) Tsuyuguchi, I. and Kohmo, T.: Amer. Rev. Resp. Dis., 112 : 535, 1975.
- 4) Gershon, R. K.: Contemporary Topics in Immunobiology, 3 : 1, 1974.
- 5) Parker, D. et al.: Int. Arch. Allergy, 49 : 276, 1975.
- 6) Turk, J. L. and Parker, D.: Int. Arch. Allergy, 49 : 241, 1975.
- 7) Böyum, A.: Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21 : Suppl. 97, 77, 1968.
- 8) Yamamura, Y. et al.: Z. Immun. Allergie Klin. Immunologie, 137 : 171, 1969.
- 9) Fujimoto, S. et al.: J. Immunol., 116 : 800, 1976.