

同種皮膚移植とリンパ球反応に関する研究

2. 感作リンパ節細胞移入による皮膚生着期間の短縮

山口大学医学部 第1解剖学教室 (指導：栗屋和彦教授)

池 田 幸 策*

(原稿受付：昭和45年3月3日)

Studies on Lymphocyte Reaction in Skin Allograft

2. Accelerated Rejection of Skin Allograft by Transfer of Sensitized Lymph Node Cells

KOSAKU IKEDA

1st Department of Anatomy, Yamaguchi University School of Medicine

(Director: Prof. Dr. KAZUHIKO AWAYA)

It has been repeatedly demonstrated that the lymphocytes play an important role in allograft immunity. However, there is no agreement about the way in which the lymphocytes react with graft antigens. Najarian and Feldman^{2,3)} showed that, in mice and guinea pigs, accelerated rejection of skin allograft was caused by transfer of sensitized lymphoid cells enclosed in cell-impenetrable diffusion chamber. In spite of the similarity of design of their experiment, Wilson et al.⁵⁾ failed to reproduce the result of Najarian and Feldman. Thus, there is a clear difference between the two cases. The present study was carried out in order to find a solution for this problem.

Two inbred strains of mice, strong A and Db, were used throughout the study. Mice used were females of 2 months of age. To obtain the sensitized donors, the skin grafts were exchanged orthotopically between Strong A and Db mice. Ten days later, lymph nodes from the sensitized donors were transplanted to the isologous nonsensitized recipient mice. Simultaneously with the lymph node transplantation, the recipients were test-grafted with full-thickness skin grafts of the allogeneic strain. The skin graft was made according to the technique described in the preceding paper¹⁾. The lymph nodes were inserted into the subcutaneous tissues or peritoneal cavities of the recipients. Figure 1 shows experimental proce

*現所属：山口大学医学部 第一外科教室 (主任：八牧力雄教授)

dures in the present study. The recipient mice were divided into four groups according to the types of lymph node transplants: (1) mice transplanted with the axillary lymph nodes, (2) mice transplanted with the axillary, cervical, inguinal and mesenteric lymph nodes, (3) mice transplanted with the axillary lymph nodes enclosed in cell-impenetrable diffusion chamber and (4) mice transplanted with the combined lymph nodes enclosed cell-impenetrable diffusion chamber. Control group consisted of mice receiving the skin allograft alone.

Chief results obtained are summarized in Table 1 and 2. The accelerated rejection of skin allograft was observed in recipient mice transplanted with the combined lymph nodes (group 2). Such an acceleration of the rejection was not induced by placing these lymph nodes within diffusion chamber.

These findings suggest that allograft rejection might be caused by a direct contact of lymphocytes with allograft but not by diffusion of humoral factor released from the sensitized lymphocytes. The results obtained support the view of Wilson et al., but disaccord with that of Najarian and Feldman. Further studies on this point are now in progress.

著者はこの論文の第一編¹⁾において、マウスの同種皮膚移植後、宿主リンパ組織、とくに所属リンパ節に著明に大型幼若リンパ球が出現し、このようなリンパ球の増殖反応が移植皮膚片の脱落につながっていることを述べた。そして、この場合リンパ球は移植片に接触してその胞体から細胞障害因子を放出して移植片を破壊にみちびく可能性を示唆しておいた。

このような可能性の当否についての研究はすでにいくつみられる。Najarian と Feldman (1962)²⁾ は ³H-thymidine で標識したマウスの感作脾細胞を未処置マウスに受身的に移入することによって同種皮膚移植の拒否反応が促進されることを観察した。しかし、移植片の拒否現象をおこしている局所には標識細胞はほとんどみられなかった。さらに、感作脾細胞(非標識)を拡散小室(diffusion chamber)に封入して腹腔内または皮下に移入したマウスに同種皮膚移植を行なった場合にも、同様に移植片の拒否がみられた。また、近交系モルモットについて同様な実験を行なってもマウスの場合と同様な結果が得られた(1963)³⁾。これらの事実からNajarianらは移植片の拒否にはリンパ系細胞から放出される液性因子が重要な役割を果たしているが、この場合、リンパ系細胞が移植片に直接に接触する必要はなく、両者は離れて存在していてもよいことを強調した。同様な所見は Kretschmer ら (1962)⁴⁾ も家兎を用いた実験で観察してい

る。一方、Wilson ら (Billingham 一派, 1966)⁵⁾ は Najarian らと同じ系のマウスを用いてその実験をいねいに追試したが、拡散小室内に封入したリンパ系細胞の受身的移入によって移植皮膚片の拒否促進はみられなかったという。

今日の知見によれば、このようなリンパ系細胞はほとんどリンパ球と考えてよいであろう。したがって、上述の Najarian らと Wilson らの主張はリンパ球が移植片を障害する場合に、リンパ球は移植片からはなれていても作用するのか、直接に接触することによって作用するのか、という微妙且つ重要な点でくいちがっている。これはリンパ球の機能を理解するうえにきわめて重要な課題であり、このようなくいちがいについて検討して置くことが必要である。本研究はこのような要請のもとに行なわれた。

材 料 と 方 法

動物: 用いた動物は近交系の Strong A系と Db系、生後2月目のメスのマウスである。

感作リンパ節を得るための皮膚移植: 上記の二系のマウスの間で皮膚の交換移植を行なった。その手技の詳細は第一編で述べたとおりである。ここでは、それぞれの系の一匹あてのマウスにおいて、胸郭の左背部の毛包発育の休止期にある部位から、直径約 1.5cm の小円形の皮膚片を“つまとり法”(pinch graft)によ

り採取したのち、これを相手の同じ部位に移植した。

リンパ節の採取と移入：この皮膚移植によって、マウスはそれぞれの相手の系に対して感作されることになる。そして、その局所リンパ節と腸間膜根リンパ節には大型幼若リンパ球が著増し、これが移植後10日目前後に増殖の頂点に達することは既述のとおりである¹⁾ 腸間膜根リンパ節におけるこの細胞の増殖は他の遠隔部位のリンパ節においてもその増殖がおこっていることを推定させる。したがって、ここでは皮膚移植後10日目にこれらの感作マウスから、両側の浅・深

腋窩リンパ節、両側の浅・深頸部リンパ節、両側鼠径リンパ節および腸間膜根リンパ節をとりだしたのち、これと同系の非感作マウスの皮下に移入することにした。これらのリンパ節は細切して固形のまま移入された。移入部位は下記の皮膚の試験移植片 (test skin graft) の周辺である。被移入マウスはつぎの4群にわけられた (表1と2)。

- 1. 感作腋窩リンパ節を移入されたマウス。
- 2. 感作腋窩-, 頸部-, 鼠径-および腸間膜根リンパ節を移入されたマウス。

Table 1. Survival time of skin allograft in mice transplanted with the lymph nodes sensitized to skin allograft.
Mean±standard error. (Stong A mice→Db mice).

Experimental groups	Day of onset of graft rejection	Day of complete rejection of graft
1. Mice transplanted with the axillary lymph nodes (n=5)	11.2 ± 1.58	21.6 ± 1.70
2. Mice transplanted with the combined axillary, cervical, inguinal and mesenteric lymph nodes (n=6)	7.5 ± 0.81	16.7 ± 1.09
3. Mice transplanted with the axillary lymph nodes enclosed in cell-impenetrable diffusion chamber (n=4)	12.0 ± 1.29	23.0 ± 1.47
4. Mice transplanted with the combined lymph nodes enclosed in cell-impenetrable diffusion chamber (n=4)	11.5 ± 0.65	26.0 ± 2.04
Control (Mice received the skin allograft alone) (n=6)	9.8 ± 1.08	18.3 ± 1.01

Table 2. Survival time of skin allograft in mice transplanted with the lymph node cells sensitized to skin allograft.
Mean±standard error. (Db mice→Strong A mice).

Experimental groups	Day of onset of graft rejection	Day of complete rejection of graft
1. Mice transplanted with the axillary lymph nodes (n=6)	9.2 ± 1.28	20.8 ± 1.11
2. Mice transplanted with the combined axillary, cervical, inguinal and mesenteric lymph nodes (n=8)	8.3 ± 0.37	17.1 ± 0.83
3. Mice transplanted with the axillary lymph nodes enclosed in cell-impenetrable diffusion chamber (n=4)	11.5 ± 1.5	20.0 ± 2.04
4. Mice transplanted with the combined lymph nodes enclosed in cell-impenetrable diffusion chamber (n=2)	12.5	27.5
Control (Mice received the skin allograft alone) (n=6)	11.2 ± 1.05	21.7 ± 1.20

3. 感作腋窩リンパ節を1個の拡散小室(diffusion chamber)に封入して移入されたマウス。
4. 上記の全リンパ節を拡散小室に封入して移入されたマウス。この場合、腸間膜根リンパ節は1個の小室に封入して腹腔内に、他のリンパ節は1個または2個の小室に封入して皮下に移入した。したがって、この場合のマウスは1個体に2ないし3個の拡散小室をもつことになる。

皮膚移植だけを受けたマウスが対照として用いられた。

拡散小室の手法：これは教室で慣用している方法^{6,7)}に従って行なった。用いた小室は細胞を通さないHA型 millipore filter (毛細孔径 $0.45 \pm 0.2 \mu$, 厚さ 150μ) の壁をもつ小室で、このなかに上記の細切されたリンパ節を封入して小室を組み立てたのち、移入した。

皮膚の試験移植 (test skin graft)：上述のリンパ節の移入を受けたマウスに、移入と同時に、はじめに

皮膚片の交換を行なった相手の系のマウスの皮膚片を移植した。図1は以上の一連の実験操作を模式的に示したものである。移植部位と移植の手法は上述のとおりである。皮膚の試験移植片の生着状況は肉眼的に毎日観察して、第一編の場合と同様に脱落開始と完全脱落の時期に注目した。

結 果

1. Strong A系マウス→ Db 系マウスの場合

これは Strong A系マウスの皮膚を移植することによって感作された Db 系マウスのリンパ節を非感作 Db 系マウスに移入し、同時にはじめの Strong A系マウスの皮膚片を移植した場合である(図1-a)。

この場合の主な結果は表1に示すとおりである。対照群5例の皮膚の平均生着期間は、脱落開始時期が 9.8 ± 1.08 日、完全脱落の時期が 18.3 ± 1.01 日である。これに対して、多数のリンパ節を細切して固形のまま移植片の周辺に移入した第2群においては、試験移植片の脱落開始と完全脱落の時期はそれぞれ約2日間短縮される。その他の群では生着期間がむしろやや延長される傾向がみられた。これはとくに全リンパ節を拡散小室に封入して移入した第4群で著明であった。

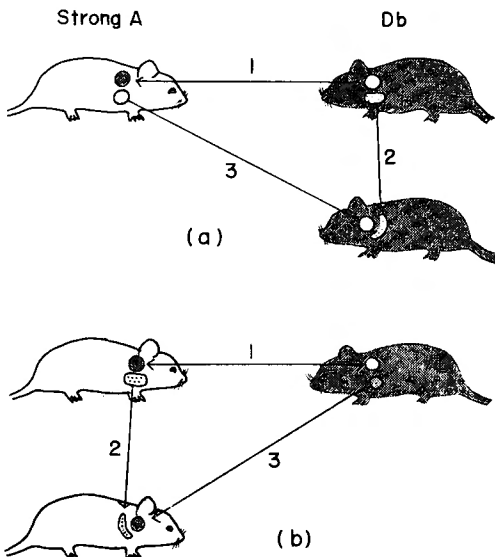
2. Db 系マウス→Strong A系マウスの場合

これは Db 系マウスの皮膚を移植することによって感作された Strong A系マウスのリンパ節を非感作 Strong A系マウスに移入し、同時にはじめの Db 系マウスの皮膚片を移植した場合である(図1-b)。

この場合の主な所見は表2に示すとおりである。対照群6例の皮膚片の脱落開始と完全脱落の時期はそれぞれ 11.2 ± 1.05 日、 21.7 ± 1.20 日である。これに対して、感作腋窩リンパ節を移入された第1群と、感作全リンパ節を移入された第2群では皮膚片の生着期間の短縮がみられた。第1群では脱落開始は約2日間、第2群では脱落開始は約3日間、完全脱落は約4日間短縮された。全リンパ節を拡散小室に封入後移入された第4群ではやはり生着期間の延長がみられた。しかし、その他の群では対照とくらべて差はみとめられなかった。

3. 移入リンパ節の組織学的所見

図1からも明らかなように、リンパ節の移入はいずれも同系移植に相当する。細切してそのまま皮下に移入されたリンパ節は完全脱落の20日前後においても完全に生きていた。リンパ節はややビマン化する傾向はみられるが、全体としての構造はよく保たれている



PROCEDURES:

1. EXCHANGE OF SKIN ALLOGRAFT
2. TRANSFER OF SENSITIZED LYMKH NODE CELLS
3. TEST SKIN ALLOGRAFT

Fig. 1. Experimental model in the present study.

○●: skin allograft. ○●: lymph nodes.

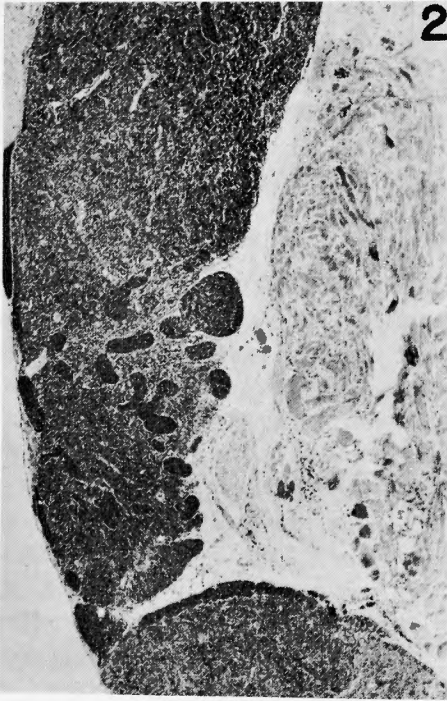


Fig. 2. The lymph node transplant 19 days after subcutaneous transplantation. The transplant was taken from the axillary lymph nodes of a Db-strain mouse sensitized to skin allograft of a Strong A-strain mouse. The lymph node transplant is fully living. Animal No. SGL 3. $\times 50$.

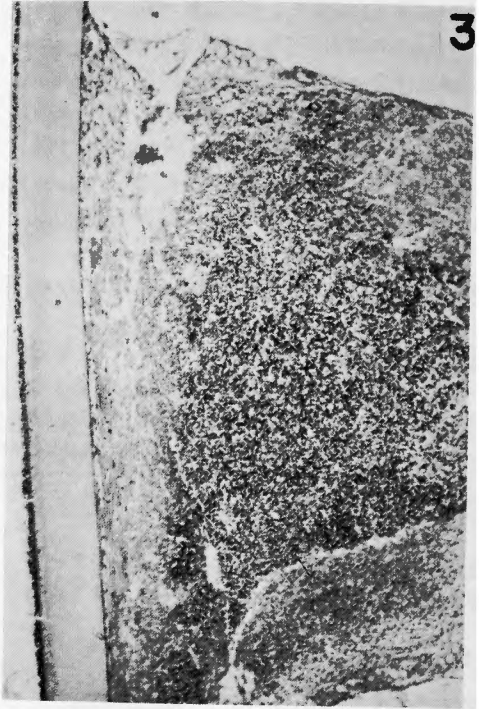


Fig. 3. The lymph node transplant enclosed in cell-impenetrable diffusion chamber 12 days after subcutaneous transplantation. The transplant was taken from the axillary lymph nodes of a Db-strain mouse sensitized to skin allograft of a Strong A-strain mouse. The peripheral area of lymph nodes is degenerating but the lymphocytes in central area are still living. Animal No. SGL 70. $\times 50$.

(図2). 拡散小室に封入されたリンパ節は小室壁に接した周辺部は移入後10日すぎ頃から変性壊死に落ちいるが、中央部はヒマン性リンパ組織として生きている(図3). これは既報の吉村の報告⁷⁾と大すじにおいて一致している。しかし、本実験の場合には14日以後は壊死の程度はかなり増強されるようである。

論 議

上述の所見は感作リンパ節細胞の受身的移入によりマウスの皮膚の生着期間がかなり短縮されることを示している。しかし、このような短縮は感作リンパ節を拡散小室に封入して移入した場合にはみられない。このことは同種皮膚移植片を拒否する能力が感作リンパ節細胞によって受身伝達されること、このような拒否

現象はリンパ節細胞そのものによる作用であり、細胞から游出する液性因子による可能性は少ないことを示している。これらの成績は拡散小室を用いて類似の実験を行なった Wilson ら⁵⁾の結果とは大すじにおいて一致しているが、Najarian ら²⁾の結果とは一致していない。以下、これらのことも考慮にいれて、二、三の考察を加えてみたい。

移植皮膚片の脱落と液性因子との関係

既述のように、Najarian ら²⁾は拡散小室に封入された感作リンパ節細胞によって移植皮膚片は対照よりも早く変性におちいることを観察してリンパ球から放出される液性因子の重要性を強調している。Najarian らの実験とわれわれの実験との主なちがいは Najarian らが感作リンパ細胞を懸濁液の形で小室内に封入して

いること、これらの細胞がリンパ節だけでなく脾からもとられていること、小室壁の millipore filter に VC 型（毛細孔の直径 0.1 μ ）を用いていること、および移植皮膚片を移植後 6 日目にとりだしてその変性の状況を調べていることなどであろう。このうち、もっとも重要と思われるのはわれわれの場合に感作リンパ節を細切して固形のまま小室内に封入していることで、ほかのことは本質的なちがいはない。したがって、この手技上のちがいが、異なった結果をきたした主な原因の一つであろうと思われる。ただ一つ、Najarian らの実験で気になることは、皮膚の移植片の周囲に 3～4 個の小室を植えこんでいることで、これによって皮膚の移植部位に循環障害をおこして移植片が早く壊死におちいることも考えられる。著者らは 2 個の小室を移植片の周囲に挿入するだけで、局所がかなり大きくふくれ上ることを経験しているので、この推定はある程度当を得ているものと思われる。Wilson らは 2 個の小室を腹腔内に移入しているので、このような循環障害をひきおこすおそれがなく、皮膚の変性の促進がおこらなかったのかもしれない。以上のことのほかにはわれわれの成績が Najarian らのそれと異なる理由はあまり考えられない。いずれにしても、本実験の成績が Wilson らの成績と一致していることは既述のとおりである。なお、Najarian らの実験を追試した藤本 (1966)⁸⁾も Najarian らの成績に対しては否定的である。したがって、われわれの拡散小室による実験に関する限り、感作リンパ節細胞の液性因子が移植皮膚片の拒否に重要な役割を演じているとは考えられない。

リンパ球と移植皮膚片との接触の重要性

一方、本実験では、感作リンパ節細胞を小室に封入しないで、細切して固形のまま移植片の周囲に植えこんだ場合には移植片の脱落が促進されることを明示することができた。これは感作リンパ球の機能について論ずるうえできわめて重要な所見である。今日の知見からこのような感作リンパ節細胞の作用はリンパ球の作用とみなしてさしつかえない。花岡 (1969)⁹⁾によればリンパ球には間葉系の細網細胞由来のものと、胸腺由来の小リンパ球の芽球化に由来するものとの二系があって、前者は抗体 (IgM) をつくるが、後者は抗体をつくることなく、非特異的な細胞障害因子 (lymphocyte cytotoxic factor, LCF) を放出して標的細胞を障害するという。移植片の拒否に働くリンパ球は主として後者ということになる。われわれの実験の場

合には、移植片の周囲に移入された感作リンパ球が移植片に直接接触して LCF を放出し、これを壊死にみちびいたものと考えられる。このようにリンパ球の作用はそれと移植片との直接接触によって発揮される可能性が非常に強いことを著者は強調しておきたい。このことは第 1 編でも推定しておいたが、第 2 編ではこれがある程度実証されたわけである。しかし、この場合にも、感作リンパ球と移植片との距離、いいかえれば、リンパ球の放出する LCF の作用のどの範囲についても考慮する必要があるように思われる。すなわち、両者は完全に密接する必要はなくて、かなり近い距離にあればよいのではないかということである。移植局所に感作リンパ球が予想外に少いことも報告されているので²⁾、これは今後検討を要する問題である。

つぎに、このような相互接触による移植片の障害作用は生きたリンパ球によって行なわれることは当然予想されることである。事実、本実験では移植片の周囲に移入されたリンパ節は長期にわたってほぼ完全な形で生きていることが確認された。これに対して、拡散小室に封入されたリンパ節の多くは大なり小なり変性におちいっており、このようなリンパ節の生きたリンパ球から放出される LCF はあまり多くないものと思われる。したがって、たとえば、移植片がこれらのリンパ球の障害作用の及ぶ範囲にあって、その LCF が millipore filter 壁を通して移植片に移行するにしても、その作用はそれほど強くないことが予想される。拡散小室に封入された感作リンパ節によって移植皮膚片の脱落が促進されなかった理由の一つはこのあたりにもあるかもしれない。しかし、Kretschmer⁴⁾らの家兎での観察では小室内の感作リンパ節細胞は壊死におちいていたにもかかわらず、移植片の生着は対照にくらべて早く拒否されたという。この点もわれわれの観察とは異っており、今後問題をはかっている。

なお、ここで感作リンパ球が移植皮膚片に近づく機構について簡単にふれておきたい。今日ではその役割は抗体にあるとする考えが強くなってきた^{10, 11)}。すなわち、抗体は細胞結合性抗体 (cell-bound antibodies) または細胞親和性抗体 (cytophilic antibodies) としてリンパ球に付着し、リンパ球はその作用によって移植片に近づき、そこで LCF を放出して移植片を破壊するものと考えられる。これも将来、なお検討すべき課題である。

リンパ球の液性因子と enhancement

最後に、われわれの所見のうちで、もう一つ注目しているのは感作リンパ節を拡散小室に封入して移入した場合には、移植皮膚片の生着期間が対照よりも延長されることがみられたことである。その理由は明らかではないが一種の enhancement の現象^{12,13)}ではないかと考えられる。すなわち、小室内で変性をまぬがれて生存をつづけているリンパ球からの液性因子、または変性死滅したリンパ球からの液性因子は少量ながらも小室外に放出されて移植片に影響を与えているものと思われる。液性因子ないし抗体に enhancement の作用があることはすでに指摘されているから^{10,12,13,14)}、その推定はあながち無理ではない。Wilson もその可能性についてごくわずかふれている。

結 語

近交系の Db 系と Strong A 系を用いて感作リンパ節細胞の受身的移入が同種皮膚移植片の生着期間に及ぼす影響を調べた。主な所見はつぎの通りである。

1) 感作された腋窩-、頸部-、鼠径-、および腸間膜根リンパ節を受身移入されたマウスでは皮膚の同種移植片の生着期間はかなり短縮された。すなわち、Strong A 系→Db 系の場合には脱落開始と完全脱落の時期は対照群にくらべてそれぞれ約2日間短縮され、Db 系→Strong A 系の場合には脱落開始の時期は約3日間、完全脱落の時期は約4日間短縮された。後者においては感作腋窩リンパ節だけを移入された場合にも脱落は約2日早く始まった。

2) これらのリンパ節を拡散小室(diffusion chamber)に封入して移入した場合には皮膚の同種移植片の生着期間の短縮はみられず、むしろ延長の傾向がみられることもあった。

3) 以上の事実は同種皮膚移植片の脱落は感作リンパ球の直接の障害作用によるもので、液性因子によって引き起こされる可能性は少ないことを示唆している。

文 献

- 1) 池田幸策：同種皮膚移植とリンパ球反応に関する研究。1. 同種皮膚移植と所属リンパ節の細胞反応およびそれに及ぼす6-Mercaptopurine の影響。日本外科宝函, 39: 19-37, 1970.

- 2) Najarian, J.S. and Feldman, J.D.: Passive transfer of transplantation immunity. I. Tritiated lymphoid cells. II. Lymphoid cells in millipore chambers. J. exp. Med., 115: 1083-1093, 1962.
- 3) Najarian, J. S. and Feldman, J. D.: Passive transfer of transplantation immunity. III. Inbred guinea pigs. J. exp. Med., 449-456, 1963.
- 4) Kretschmer, R. R. and Pérez-Tamayo, R.: The role of humoral antibodies in rejection to skin homografts in rabbits. II. Passive transfer of transplantation immunity by sensitized lymph node cells within diffusion chambers. J. exp. Med., 116: 879-896, 1962.
- 5) Wilson, D. B., Silvers, W. K. and Billingham, R. E.: Failure to transfer sensitivity to skin homografts by means of 'immune' lymphoid cells in diffusion chamber. Nature, 209 (5030): 1359-1360, 1966.
- 6) 栗屋和彦：拡散小室(diffusion chamber)による細胞・組織の生体内培養法。日本血液学全書, 6-II: 577-588, 1965.
- 7) 吉村允：拡散小室(diffusion chamber)によるマウス造血組織の同種移植。1. 移植リンパ節と骨髄の小室内における運命。山口医学, 18: 1-20, 1969.
- 8) 藤本吉秀：同種移植免疫に関する diffusion chamber を用いての研究。臨床外科, 21: 299-314, 1966.
- 9) 花岡正男：In vitro におけるリンパ球の非特異的細胞障害作用——細胞免疫におけるリンパ胚球の役割について——。最新医学, 24: 1469-1477, 1969.
- 10) 藤井源七郎：拒絶反応の機序。第5回日本移植学会総会抄録, 47頁, 1969(昭和44)。
- 11) 栗屋和彦：拒否反応の形態学。日本口腔科学会雑誌, 19: 277-283, 1970.
- 12) Kaliss, N.: Immunological enhancement of tumor homografts in mice: review. Cancer Res., 18: 992-1003, 1958.
- 13) Kaliss, N.: Elements of immunological enhancement: consideration of mechanisms. Ann. N. Y. Acad. Sci., 101: 64-79, 1962.
- 14) Russell, P. S. and Monaco, A. P.: The Biology of Tissue Transplantation. pp. 69-76, Little, Brown and Company, Boston, 1965.