

ラット皮膚細胞に対する natural cytotoxicity (SCMC) の検討

—natural cytotoxicity 細胞 (NC) とキラー細胞 (KC) との比較—

藤本 英雄

Spontaneous Cell Mediated Cytotoxicity (SCMC) against Rat Skin Epidermal Cells

—Comparison of Natural Cytotoxicity Cell (NC) with Killer Cell (KC)—

Hideo Fujimoto

First Department of Surgery, Okayama University Medical School

[Summary]

We have reported that normal rat spleen cells show spontaneous cell-mediated cytotoxicity (SCMC) against rat skin epidermal cells and that the cold target inhibition assay reveals that NC and immune spleen cells belonged to different cell populations.

This time, we attempted to separate NC and KC from skin allografted immune spleen cells by using Percoll sedimentation and compare their cytotoxicity with that of normal spleen cells.

Normal and skin grafted immune spleen cells were fractionated by 30–50% (grading by 5%) Percoll, and each fraction was used as an effector in the ^{51}Cr release cytotoxicity assay with the target of allogeneic or syngeneic rat tail epidermal cells. The results were; Fr. 40% as NC and Fr. 50% as KC population.

Cytotoxicity of nonadherent cells to the plastic dish and nylon wool column showed approximately the same distribution.

Cold target inhibition assay was then performed with each fraction, confirming the results in our previous report.

Each fraction was treated with antiasialo GM1 serum and complement and drastic elimination of the cytotoxicity was seen only in Fr. 40%.

In addition, cytotoxicity of Fr. 40% and Fr. 50% of 0, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13 and 16 th days, following the syngeneic and allogeneic skin graft, was monitored in order to determine the kinetics of NC and KC activities.

Key words : natural cytotoxicity cell,
killer cell,
Percoll sedimentation

I. 序 論

生体の免疫防御機構における natural killer system の存在が最近注目されている。大部分の報告では標的細胞として cancer cell line や virus-induced tumor が使用されている。しかし、Kiessling¹⁾ は正常細胞の生理的な増殖に対しても natural killer system の関与が示唆されると述べている。

一方、我々は²⁾、ラット皮膚上皮細胞が *in vitro* 殺細胞試験の標的細胞として使用可能であり、正常ラット脾細胞が同系および同種皮膚細胞に対し natural cytotoxicity (spontaneous cell-mediated cytotoxicity: SCMC) を発揮する事実を明らかにしている。さらに、皮膚細胞に対する natural cytotoxicity 細胞 (NC) と同種皮膚移植により得られた感作脾細胞を cold target cell inhibition assay により比較し、NC と同種抗原特異的感作脾細胞は異なった細胞群に属する細胞であると報告している。今回我々は、SCMC を担当する NC と感作脾キラー細胞 (KC) の違いを明らかにする目的で、正常ラット脾細胞および同種皮膚移植ラット脾細胞を Percoll 濃度勾配遠心法を用いて分画し、各分画細胞の殺細胞能を比較した。さらに、抗 Asialo GM1 抗体 (抗 ASGM1 抗体) 処理によりそれらの免疫特性への影響を検索した。また、同種皮膚移植後の宿主脾細胞の SCMC および KC 活性の経日的変化を測定し、NC と KC の相違および各々の細胞の拒絶反応との関与を明らかにした。

II. 方 法

1. 実験動物

7~8 週齢の近交系雌性 F344 (Rtl^{1/1}) および雌性 ACI (Rtl^{0/1}) ラットを日本チャールズリバー社および富士アニマルファーム社より購入し、使用した。

2. 培養液

RPMI 1640 培養液に、25 mM HEPES 緩衝液、10% ウシ胎仔血清 (FCS, Grand Island Biochemical Co., Gibco, USA) および 1% 抗生剤 (penicillin-streptomycin solution: GIBCO) を添加したものを培養に使用した。

3. ラット同種皮膚移植

ACI ラット腹部皮膚を F344 ラット頸部に Billingham の方法³⁾ に準じて全層移植を行った。5 日間絆創膏にて保護した後は毎日観察を行った。rejection の判定は皮膚移植片の 50% 以上が necrosis に陥った日とした。移

植片の平均生着日数±標準偏差は 9.2±0.5 日であった。

4. 脾細胞および nylon wool 非付着性脾細胞の分離

ACI または F344 ラットより脾を採取し、粉碎して脾細胞を単離した。脾細胞浮遊液を 80 μ メッシュフィルター (池本化学工業) にて濾過し、debris を除去し、さらに浮遊液中の赤血球は 0.75% NH₄Cl トリス緩衝液処理にて破壊し、150 μ メッシュフィルターにて濾過した後、磷酸緩衝生理食塩液 (PBS) にて 3 回洗浄して使用した。脾細胞浮遊液を FCS にて 24 時間 coating を行った plastic dish に入れ、37°C で 1 時間 incubate した。次にこの plastic dish 非付着細胞を nylon wool column にて再び 37°C、1 時間の incubation を行った後 PBS にて nylon wool を洗浄し、nylon wool 非付着性脾細胞を取り出した。

5. Percoll 濃度勾配遠心法

Kurnick らの方法⁴⁾ に準じて、まず Percoll 原液 (Pharmacia) を 9, 1.5 M NaCl 液を 1 の割合に混合して等浸透圧 Percoll 液を作製した。これを 100% 液として PBS にて希釈し、30%、35%、40%、45%、50%、しの 5 段階の希釈液を作製した。20 ml 丸底試験管にこの希釈液を、濃い順にそれぞれ 3 ml ずつ、パスツール・ピペットにて静かに重層して不連続濃度勾配チューブを作った。

この際、各重層液境界面に界面リングが形成されていることを確認した。この上に単離脾細胞 (2×10⁸) 浮遊 PBS 3 ml を重層し、600 G (2,000 r.p.m.) にて室温で 20 分間、遠心分離にかけた。遠心後、各層の境界面に形成された分離細胞層をそれぞれ上から Fr. 1 (30% 層)、Fr. 2 (35% 層)、Fr. 3 (40% 層)、Fr. 4 (45% 層)、Fr. 5 (50% 層) とし、各々をパスツール・ピペットで回収した。FCS を少量加えた後、3 回洗浄して count した。

6. 抗 ASGM1 抗体および補体処理

Kasai らの方法⁵⁾ に準じて、5×10⁶ 個の脾細胞に 1:40 に希釈した抗アシアロ GM1 (和光純薬) 血清 0.4 ml を加え、室温で 30 分間放置した。その後、1:12 に希釈した補体 (LOW-TOX-M RABBIT COMPLEMENT, CEDARLANE) 0.4 ml を加え、37°C で 30 分間 incubation した後、3 回洗浄した。

7. 皮膚上皮細胞の分離および ⁵¹Cr 標識

Tanaka and Sakai の方法⁶⁾ のように、ACI および

F344 ラット尾より採取した皮膚片を 0.5% trypsin-PBS 中にて 37°C、3 時間で消化した後、皮膚片より epidermis を剝離し、その基底膜層より 0.025% DNase (deoxyribonuclease 1, SIGMA)—PBS 中に皮膚上皮細胞を遊出させた。単離皮膚上皮細胞を 150 μ メッシュフィルターにて濾過した後、PBS にて 3 回洗浄して使用した。

次に、単離した皮膚上皮細胞 (10⁷ 個/0.5 ml) を 300 μ Ci の Na₂⁵¹CrO₄ (科研化学) と plastic tube (Falcon 200, Falcon Plastics, USA.) 中に混合し、37°C・5% CO₂ の条件にて 2 時間標識した。標識後、RPMI 1640 培養液にて 3 回洗浄し、残存 ⁵¹Cr を除去した。

8. K 562 腫瘍細胞の ⁵¹Cr 標識

K 562 腫瘍細胞 (10⁷ 個/0.5 ml) を 200 μ Ci の Na⁵¹CrO₄ で同様の条件下で標識して使用した。

9. *in vitro* 殺細胞試験

⁵¹Cr 標識皮膚上皮細胞浮遊液 (10⁵/ml) 0.1 ml と正常脾細胞および同種皮膚移植後各時期に得られた脾細胞浮遊液 (10⁷/ml) 0.1 ml を U-bottomed microplate (Nunc, A/S Nunc, Denmark) にて混合し (E:T ratio=100:1)、37°C、5% CO₂ の条件にて 12 時間培養した。培養後、plate を 1,400 r.p.m. にて 5 分間遠沈し、上清 0.1 ml を plastic tube (744, 栄研機材) に採取して、遊出した ⁵¹Cr 量をガンマカウンターにて計測し、殺細胞能を以下のように算出した。

%⁵¹Cr release

$$= \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

なお、maximum release は、10⁴ 個の標的細胞を microplate 中にて蒸留水と混合して 3 時間の遊出 ⁵¹Cr 量を測定した結果より、total label の 80% とした。

また、spontaneous release は攻撃細胞の代わりに、培養液を加えた場合の標的細胞からの ⁵¹Cr 遊出量とした。spontaneous release は 12 時間培養において maximum release の約 30% であった。

標的細胞に K 562 腫瘍細胞を用いた場合は、脾細胞と混合の後、同様の条件下で 6 時間培養して殺細胞能を測定した。

10. cold target cell inhibition assay

⁵¹Cr で標識した皮膚上皮細胞に同種および同系の非標識皮膚上皮細胞を 1:20 の割合で混合して標的とし、攻撃細胞には正常脾細胞および同種皮膚移植後各時期の脾細胞を用いて殺細胞能を測定した (E: hot T: cold T ratio=100:1:20)。

III. 結 果

1. 各 Percoll 分画脾細胞の殺細胞能

正常 F344 ラット脾細胞、および ACI より F344 ラットに同種皮膚移植し細胞性免疫能の上昇している術後

表 1 Method of Percoll Gradient Sedimentation

		Normal F344 (n=6)	Skin Grafted F344 (n=5)
Spleen Cells in PBS			
Percoll 30% (1.04g/ml)	Fr. 1	1.6±0.3% (6.1%)	2.1±0.6% (4.9%)
35%	Fr. 2	1.7±0.4% (4.9%)	2.3±0.4% (5.3%)
40% (1.05g/ml)	Fr. 3	18.9±1.2% (53.6%)	30.3±2.1% (60.8%)
45%	Fr. 4	8.7±0.9% (30.7%)	11.8±1.1% (25.7%)
50% (1.06g/ml)	Fr. 5	1.6±0.2% (4.7%)	1.4±0.2% (3.3%)
	Total	32.5±3.0% (100%)	47.9±4.4% (100%)

* 100% Percoll = Percoll 9 + 1.5M NaCl

13日目の脾細胞を、それぞれ Percoll 濃度勾配遠心法にて分離し、Fr. 1~Fr. 5 の各分画のリンパ球を攻撃細胞に、F344 および ACI ラット皮膚上皮細胞を標的細胞として殺細胞能を測定した。各分画のリンパ球回収率は表1に示したように、正常脾細胞の場合重層したリンパ球の $32.5 \pm 3.0\%$ が回収され、回収されたリンパ球の各分画への分布は Fr. 3 (40% 分画) に 53.6% と最も多く、次が Fr. 4 であり、Fr. 5 (50% 分画) は 4.7% であった。一方、皮膚移植による感作脾細胞の場合、回収率は $47.9 \pm 4.4\%$ とやや増加したが、その各分画への分布は正常細胞の分布と同様であった。

各分画の殺細胞能は図1のように、正常 F344 脾細胞を攻撃細胞に用いた場合、F344 および ACI 上皮細胞に対する殺細胞能は Fr. 3 でそれぞれ $32.9 \pm 2.0\%$ 、 $29.2 \pm 3.1\%$ と最も高く、Fr. 5 では未分画細胞を用いた場合よりも低値を示した。一方、同種皮膚移植感作脾細胞の場合は、donor 由来の ACI 上皮細胞に対しては、Fr. 5 の殺細胞能が $49.7 \pm 3.5\%$ と最も高い値を示したが、F344 上皮細胞に対しては Fr. 3 で最も高く、Fr. 5 では値はやや上昇するものの攻撃細胞に正常脾細胞を用いた場合と同様の分布を示した。

次に、plastic petri dish および nylon wool 非付着性脾細胞を用いて同じく各 Percoll 分画の殺細胞能を測

定してみると、図2のように、図1とはほぼ同様の分布を示した。また、この場合 K562 腫瘍細胞を標的細胞に用いても、正常および感作脾非付着細胞の F344 皮膚上皮細胞に対する反応と同様の結果であった。

以上の結果より、正常脾細胞中の SCMC を担当する NC は Fr. 3 (40% 分画) に存在し、B細胞あるいは macrophage に属さない非付着性細胞であり、natural killer 細胞の標的である K562 腫瘍細胞にも同様の活性を示す。一方、感作脾細胞の殺細胞能は Fr. 3 と Fr. 5 (50% 分画) に存在し、前者は NC による SCMC、後者は KC による donor 特異的殺細胞活性と考えられる。

2. Cold target cell inhibition assay

我々はすでに、NC と同種皮膚移植後に得られた感作脾細胞を cold target cell inhibition assay により比較し報告している。その結果は、表2の Exp. 1 に示すように、ACI ラットより F344 ラットに同種皮膚移植し、9日目および12日目に採取した感作脾細胞を攻撃細胞に使用し、ACI 皮膚上皮細胞を hot target に使用した場合、cold target として ACI 皮膚上皮細胞を加えると 80.6% の抑制がかかるが、F344 皮膚上皮細胞を加えると 39.7% しか抑制されない。これに対して、hot tar-

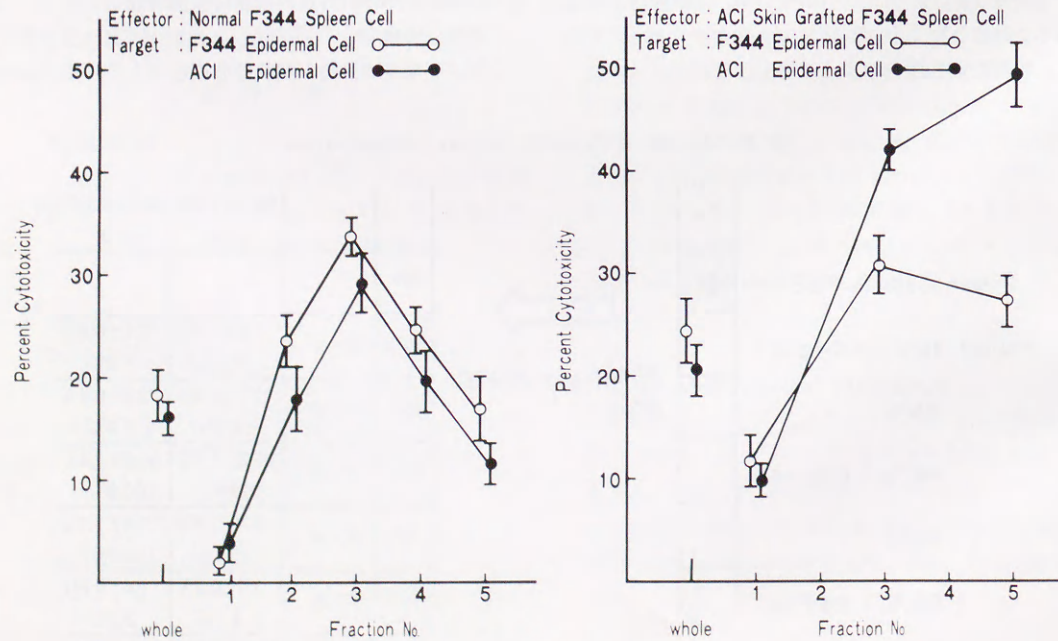


図1 Cytotoxicity of Fractionated Normal & Skin Grafted F344 Spleen Cells by Percoll Gradient Sedimentation

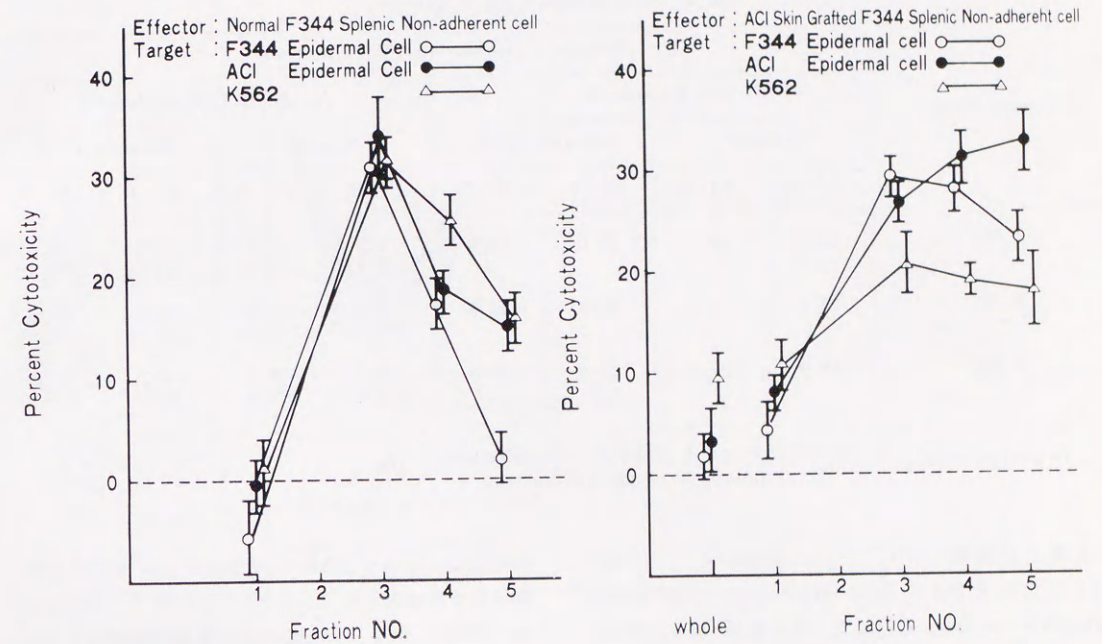


図2 Cytotoxicity of Fractionated Normal & Skin Grafted F344 Spleen Non-adherent Cells by Percoll Gradient Sedimentation

表2 Cold Target Cell Inhibition Assay

Target Skin		Percent Cytotoxicity (% inhibition)						
		Exp. 1.			Exp. 2.			
		Normal	Immune (9 d)	Immune (12 d)	Normal		Immune (12d)	
Hot	Cold				Fr. 40%	Fr. 50%	Fr. 40%	Fr. 50%
ACI	None	34.3	53.3	44.8	53.8	28.6	54.2	65.3
	ACI	5.2 (84.8)	16.2 (69.6)	8.7 (80.6)	12.0 (77.0)	7.0 (75.5)	21.4 (60.5)	27.6 (57.7)
F344	None	6.2 (81.9)	31.8 (40.3)	27.0 (39.7)	14.0 (74.0)	7.8 (72.7)	18.2 (66.4)	62.8 (3.8)
	ACI	43.8	50.8	46.5	52.8	28.9	55.7	30.1
F344	None	10.2 (76.7)	10.4 (74.5)	7.5 (83.6)	—	—	—	—
	F344	6.6 (84.9)	11.2 (78.0)	8.5 (81.4)	—	—	—	—

get に F344 皮膚上皮細胞を使用した場合、cold target が ACI でも F344 でも約 80% の抑制が認められた。以上より、感作脾細胞中に NC と KC が独立して存在すると結論づけた。

一方、上述のように Percoll 濃度勾配遠心法により感

作脾細胞を NC (Fr. 3) と KC (Fr. 5) に分画することが可能である。そこで Fr. 3 と Fr. 5 の細胞の heterogenicity をさらに明らかにする目的で、F344 正常脾細胞および ACI 同種皮膚移植後 12 日目の F344 感作脾細胞のそれぞれの分画を攻撃細胞に用い、標的細胞

表 3 Anti-ASGM1 Ab Treatment

Target Skin	Percent Cytotoxicity (% inhibition)							
	No Treatment				A-ASGM1+Complement			
	Normal		Immune (12 d)		Normal		Immune (12 d)	
	Fr. 3	Fr. 5	Fr. 3	Fr. 5	Fr. 3	Fr. 5	Fr. 3	Fr. 5
F 344	49.2	14.1	33.6	13.0	2.2 (95.3)	3.1 (78.0)	1.3 (96.1)	3.5 (73.1)
ACI	46.0	11.6	38.4	46.5	3.5 (92.4)	2.9 (75.0)	1.8 (95.3)	43.3 (6.9)
K 562	49.9	29.3	41.9	27.5	7.5 (85.0)	8.2 (68.8)	4.2 (90.0)	6.2 (77.5)

in parenthesis: $\frac{\% \text{ cytotoxicity of A-ASGM1+Complement}}{\% \text{ cytotoxicity of no treatment}} \times 100$

の皮膚上皮細胞は ACI を hot target にし、これに ACI または F344 を cold target として cold target cell inhibition assay を行った。その結果、表 2 の Exp. 2 に示すように、正常脾細胞を攻撃細胞に用いた場合は Fr. 3 も Fr. 5 も cold target の種類にかかわらず、その殺細胞能には同程度に 70% 台の抑制がかかった。ところが、感作脾細胞を攻撃細胞に用いた場合、Fr. 3 では cold target に ACI を加えても(60.5%)、F344 を加えても(66.4%)、それぞれ 60% 台の抑制が見られたのに対し、Fr. 5 の場合は、ACI を加えると 57.7% の抑制がかかるが F344 を加えてもわずか 3.8% しか抑制されなかった。これにより、Fr. 5 による殺細胞能は同種移植抗原に対する特異的な反応であり、Fr. 3 による殺細胞能と比較すると Fr. 3 と Fr. 5 は明らかに異なった細胞であることが確認された。さらに、SCMC は MHC (major histocompatibility complexes) には規制されないということがわかった。

3. 抗アシアロ GM1 抗体処理の SCMC に及ぼす影響

Percoll 濃度勾配遠心法により得られた Fr.3 及び Fr.5 の細胞の免疫特性をさらに明らかにするために、正常 F344 脾細胞及び ACI ラットからの同種皮膚移植後 12 日目の感作 F344 脾細胞から得られた両分画細胞を抗 ASGM1 抗体および補体で処理して、F344 および ACI 皮膚上皮細胞あるいは K562 腫瘍細胞に対する殺細胞能を検討すると、表 3 に示すように、標的細胞には関係なく正常脾細胞の Fr.3 および Fr.5、および感作脾細胞の Fr.3 の殺細胞能を 85.0~96.1% と特異的に抑制していることがわかる。これに対して感作脾細胞の Fr.5

の場合は、同系の F344 上皮細胞および K562 腫瘍細胞に対する殺細胞能はそれぞれ 73.1, 77.5% 抑制されたが、同種の ACI 上皮細胞に対する殺細胞能は 6.9% しか抑制されなかった。抗 ASGM1 抗体および補体処理により NK 細胞が特異的に抑制されるという Kasai²⁾ や Habu³⁾ の結果からすると、著明な抑制を受けた Fr. 3 は主に NC を含む分画であり、SCMC が特異的に抑制されたと考えられる。

4. 皮膚移植後の NC 活性および KC 活性の経日的変動

同系および同種皮膚移植後の Fr. 3 および Fr. 5 の殺細胞能を連続的に測定することによって、NC 活性および KC 活性の特性の違いを kinetics の面から明らかにしようと試みた。同系 (F344→F344) および同種 (ACI→F344) 皮膚移植後、1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, および 16 日目の脾細胞を同様にそれぞれ Percoll で分離し、Fr. 3 および Fr. 5 の F344 および ACI 皮膚上皮細胞、さらに control として K562 腫瘍細胞に対する殺細胞能を測定した。

その結果、同種皮膚移植後の Fr. 3 の NC 活性は、F344 皮膚上皮細胞および K562 腫瘍細胞を標的にした場合、最初の 3 日間は低下をみたものの 4 日目より上昇を始め、10 日目まで高値を保ち、rejection (9 日目) 以後徐々に下降傾向を示した(図 3, 図 5)。この場合、Fr. 5 の KC 活性は初期の低下以降は顕著な変動は示さず低値を保ったままであった。ところが、ACI を標的にした場合は Fr. 5 の KC 活性は rejection 後も上昇を続け、13 日目に peak を示した(図 4)。これに対して同

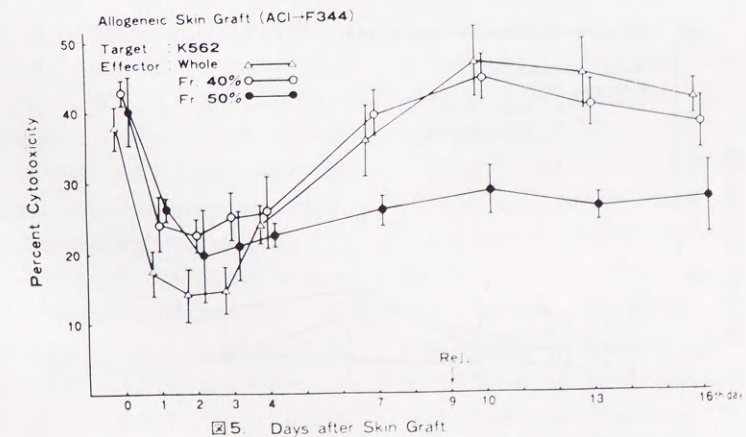
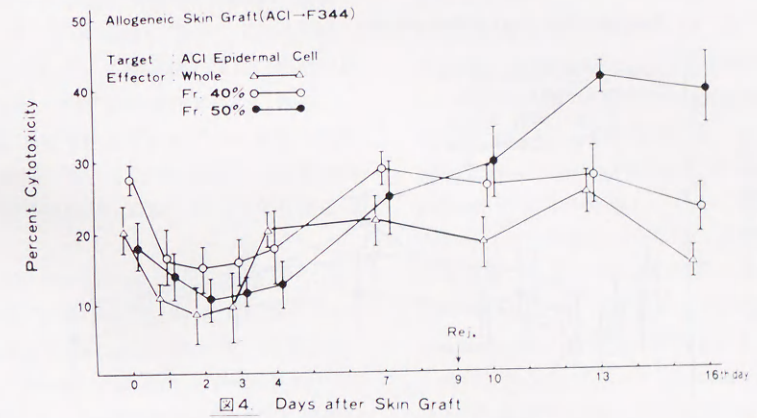
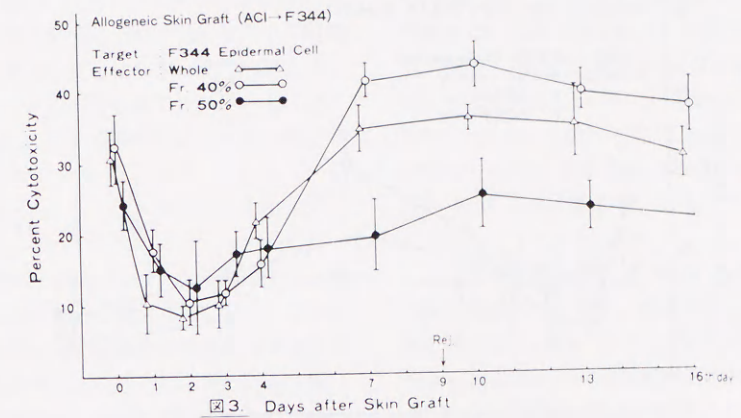


図 3-5 Kinetics of Cytotoxic Activities of Fractionated Spleen Cells after Skin Graft

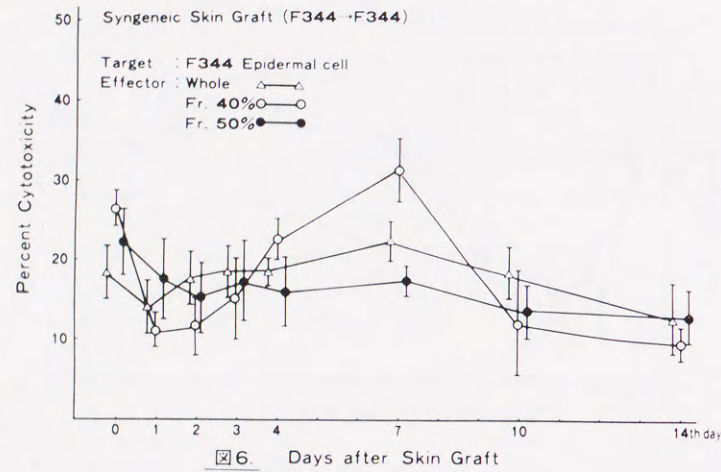


図6 Days after Skin Graft

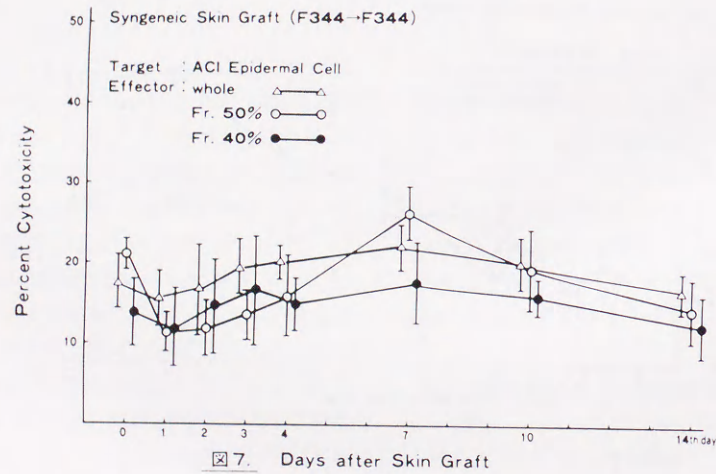


図7 Days after Skin Graft

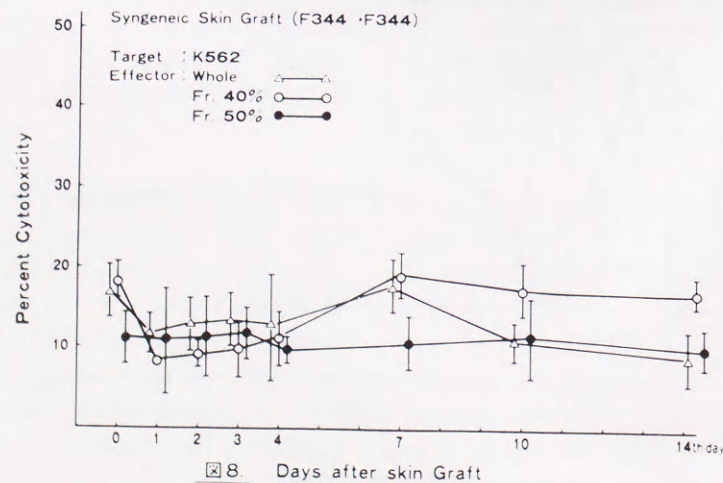


図8 Days after skin Graft

図6-8 Kinetics of Cytotoxic Activities of Fractionated Spleen Cells after Skin Graft

系皮膚移植の場合、Fr. 3 のみが F344 および ACI 上皮細胞に対して7日目に若干の上昇を見るのみで、同種移植の場合のような顕著な変動はなかった(図6, 7, 8)。この結果より、kineticsの面から見てもNCとKCは、異なったpopulationに属する細胞であることが確認できた。

IV. 考 察

Natural Killer (NK) 細胞は、約12年前に腫瘍に対する細胞傷害反応の研究過程で発見された^{8,9)}。当時研究者たちは、自己腫瘍や同じ組織型の腫瘍に対する特異的細胞傷害反応を見出すことを期待し、実際にある種の癌患者やウイルスで誘導した腫瘍動物でそのような反応を観察した。しかし、まったく正常の動物およびヒトのリンパ系細胞もまた、ある細胞や株化腫瘍細胞を傷害することが確認され、このNK現象に関与する攻撃細胞がNK細胞と命名されて以来、多種多様な種類の細胞が標的となり得るか否かについて検討されてきた。さらに、NK活性は生理的に増殖を絶えず行っている細胞の恒常性を維持するとの推測も報告されている¹⁾。この観点からすれば、皮膚上皮細胞はNK細胞の標的となり得る細胞と考えられる。

皮膚上皮細胞を *in vitro* assay に用いた報告では、Lloyd and Darnale¹⁰⁾ が、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ にて標識したラット皮膚細胞を補体依存性殺細胞試験の標的細胞に用いている。さらに、Steinmuller and Wunderlich¹¹⁾ は⁵¹Cr標識皮膚細胞をリンパ球依存性殺細胞試験の標識細胞に用いて同種皮膚特異抗原の存在を示唆した。また、Tanakaら⁶⁾ は、ラットを用いて皮膚上皮細胞を単離し、試験管内混合培養法における刺激細胞に用い皮膚細胞-リンパ球混合培養法を確立した。さらに我々は²⁾、ラット皮膚上皮細胞に対するSCMC活性を報告している。SCMCの担当細胞は脾臓にのみ存在し、他のリンパ系組織には認められず、また担当細胞は生後約8週より脾内に出現し、cold target cell inhibition assayの結果より主要組織適合性抗原の影響を受けない反応であると判明した。以上の種々の観点より、SCMCはnatural killer systemに属する反応と考えられた。

しかし、SCMCがnatural killer systemの一因であるためには、担当細胞の特性の検討が必要であろう。また、免疫反応における重要な攻撃機構のひとつである同種抗原特異的キラー細胞との比較も重要と考えられる。Percoll濃度勾配遠心法によりリンパ球を分離しNK細胞を取り出す方法はKurnick¹²⁾以来盛んに行われるようになり、現在ではNK活性を検討する場合のroutine

methodのひとつになっている。そこで、正常ラット脾細胞および同種皮膚移植ラット感作脾細胞をPercoll濃度勾配遠心法にて分離すると、NCは40%層(Fr. 3)に、KCは50%層(Fr. 5)に分画され、NCはnatural killer systemの担当細胞であるlarge granular lymphocyteの分布する40%層と同一の分画に認められ、NCとKCとは異なった細胞群であることが明確となった。

以上のように、NCはlarge granular cellと同一の分画に確認されたため、両者がまったく同一の細胞なのか、単に同じ分画に分布しているのかが問題となる。large granular cellは細胞膜表面にASGM1を持ち、抗¹ASGM1抗体と補体の処理によりそのNK活性を失活することが知られている^{5,7)}。そこで同処理を行ってみると、NC(Fr. 3)による活性は消失するがKC(Fr. 5)は影響を受けなかった。従って、NCはlarge granular lymphocyteに属する細胞と考えられる。

一方、SCMCに対するmacrophage等の免疫応答細胞の関与についても検討されるべきである。そこで、脾細胞をpetri dish adherence法、nylon wool column passage法により処理し、そのSCMC活性を測定すると、非附着性脾細胞のSCMC活性は同程度か、またはやや増強し、そのNC活性およびKC活性の分布に変化はなかった。この結果より、NCはB細胞あるいはmacrophageに属さない細胞であると思われた。

また、NCとKCのheterogenicityに関しても、Percoll濃度勾配遠心法により分布する分画の違い、抗ASGM1抗体に対する反応の違いによって異なった細胞群と考えられるが、40%層と50%層の分画を用い cold target cell inhibition assayを行うと、未分画細胞を用いた場合よりいっそう明確にheterogenicityの差異が確認された。感作脾細胞中のKC分画(50%層)にはNCの混入はないと考えられた。

最後に、同系および同種皮膚移植後のNC活性およびKC活性の変動を経日的に測定した。その結果、いずれも最初の数日間活性の低下が認められたが、この活性の低下がGuillou¹³⁾やCox¹³⁾らのいうようにNK細胞に対する麻酔剤の影響なのか、または皮膚移植のstressによる内因性のステロイドのためなのかは不明である。その後、4日目より上昇し始めたNC活性はrejection後の10日目以後下降傾向を示したのに対し、KC活性はrejection後もさらに上昇し、NC活性とKC活性の“dissociation”が見られた。これらの皮膚移植後のNC活性およびKC活性のkineticsはGuillouら¹³⁾やHäyryら^{14,15)}の腎移植後、およびOnoら¹⁶⁾の肝切除後に

測定した NK 活性および KC 活性の kinetics とほぼ一致する。

以上のように, SCMC の担当細胞である NC は natural killer system に属する細胞と考えられ, 同種抗原特異キラー細胞とはその性格を異にするものである。しかし, この NC の *in vivo* における役割については未解決である。NC の標的細胞である皮膚上皮細胞の中には, keratinocyte, Langerhans 細胞, melanocyte 等の種々の細胞が含まれており, NC の標的細胞をより詳細に検討することにより明確化されるであろう。

V. 結 語

今回, 我々は Percoll 濃度勾配遠心法を用いて正常ラット脾細胞及び同種皮膚移植ラット脾細胞を分離し, 各分画細胞の殺細胞能を測定することによって SCMC を証明し, さらに cold target cell inhibition assay, 抗 ASGM1 抗体および補体処理, および皮膚移植後のそれぞれの活性の経日的測定等により natural cytotoxicity 細胞 (NC) と感作脾キラー細胞 (KC) の特性の違いを明らかにした。

1) Percoll 濃度勾配遠心法によって分離された正常ラット脾細胞および同種皮膚移植ラット脾細胞の殺細胞能の測定, cold target cell inhibition assay, 抗 ASGM1 抗体及び補体処理により NC は 40% 層に, KC は 50% 層に主に含まれ, SCMC の担当細胞は NC であることが明らかにされた。さらに, NC は B 細胞あるいは macrophage には属さない細胞と思われた。

2) 同系および同種皮膚移植後の NC 活性の経日的測定により NC と KC はまったく異なった kinetics を示し, それぞれ 10 日目, 13 日目に peak を示した。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました岡山大学第一外科・折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに, 直接御指導, 御校閲を賜りました田中伸一郎先生に深謝致します。

文 献

- 1) Kiessling R, Haller O: Natural killer cells in the mouse; an alternative immune surveillance mechanism? *Contemp Top Immunobiol* 8: 171, 1978
- 2) Tanaka S, Ota T, Amamiya S, Kobatake T, Orita K: Spontaneous cell-mediated cytotoxicity (SCMC) against rat skin epidermal cells. *Transplant Proc* 15: 1662~1663, 1983

- 3) Billingham RE: Free skin grafting in mammals. *Transplantation of tissue and cells*. p.l. Willys & Sivers Co, 1961
- 4) Kurnick JT, Östberg L, Stegagno M, Kimura AK, Örn A, Sjöberg O: A rapid method for the separation of functional lymphoid cell populations of human and animal origin on PVP-Silica (Percoll) density gradients. *Scand J Immunol* 10: 563~573, 1979
- 5) Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, Okumura K, Tada T: A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol* 10: 175~180, 1980
- 6) Tanaka S, Sakai A: Stimulation of allogeneic lymphocytes by skin epidermal cells in the rat. *Transplantation* 27: 194~199, 1979
- 7) Habu S, Fukui H, Shimamura K, Kasai M, Nagai Y, Okumura K, Tamaoki N: *In vivo* effects of anti-asialo GM1; I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J Immunol* 127: 34~38, 1981
- 8) Kiessling R, Klein E, Wigzell H: Natural killer cells in the mouse; I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5: 112~117, 1975
- 9) Herberman RB, Nun ME, Lavrin DH: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors: I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 16: 216~229, 1975
- 10) Lloyd KO, Darnule TV: Properties of rabbit anti-rat epidermal cell sera; Demonstration of tissue-specific differentiation antigens. *J Immunol* 112: 311~319, 1974
- 11) Steinmuller D, Wunderlich JR: The use of freshly explanted mouse epidermal cells for the *in vitro* induction and destruction of cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol* 24: 146~163, 1976
- 12) Guillou PJ, Hegarty J, Ramsden C, Davison AM, Will EJ, Giles GR: Changes in human natural killer activity early and late after renal transplantation using conventional immunosup-

pression. *Transplantation* 33: 414~421, 1982

- 13) Cox JH, Forsyth AT, DE Villiers JS, Yacoub MH, Chisholm PM: The kinetics and specificity of lymphocyte infiltration of cardiac allografts in unmodified and cyclosporine-treated rats. *Transplantation* 38: 17~22, 1984
- 14) Nemlander A, Saksela E, Häyry P: Are "natural killer" cells involved in allograft rejection? *Eur J Immunol* 13: 348~350, 1983
- 15) Häyry P: Intra-graft events in allograft destruction. *Transplantation* 38: 1~6, 1984
- 16) Ono M, Tanaka N, Orita K: Activation of NK activity and auto-reactive cytotoxicity after hepatectomy. *Acta Med Okayama* 38: 207~213, 1984