

ラット皮膚細胞の関与する免疫反応への紫外線の影響

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

高 橋 健 治

(平成 6 年12月 2 日受稿)

Key words: 皮膚細胞, 免疫反応, 紫外線

緒 言

最近フロンガスによるオゾン層の破壊が世界的な環境問題となり, 紫外線の生物に及ぼす影響が注目されるようになった。紫外線のうち地表に到達するものは UV-A (320~400nm) と UV-B (280~320nm) である。しかし生物に及ぼす影響が問題視されているのは寧ろ UV-B である。UV-B は表皮と真皮の上層までしか透過できない。その影響を受ける細胞は主に表皮にある細胞である。また UV-B が免疫反応に影響を与えるという報告も多数ある^{1)~3)}。一方, 我々は皮膚細胞が各種の免疫反応において重要な役割を演じていることを報告してきた^{4)~7)}。そこで我々は, 皮膚細胞が関与する免疫反応において UV-B がどのように影響を及ぼすかを *in vitro* にて検索したので報告する。

材 料 と 方 法

1. 実験動物

日本チャールズリバー社及び静岡県実験動物農業組合にて繁殖及び維持されている 6~10 週令の雌性近交系ラット F 344 (RT1^{LV1}) と WKA (RT^{1K}) を購入して使用した。購入ラットは岡山大学医学部附属実験動物施設にて specific pathogen free の状態で使用まで飼育した。

2. 培養液の調整

各種細胞の浮遊及びアッセイに用いた培養液は RPMI 1640 に 25mM HEPES 緩衝液及び 10% 牛胎児血清 (GIBCO 社, USA), 抗生剤 (1% PenicillinG, 1% Streptomycin) を添加したものを使用した。

3. 各種細胞浮遊液の作製

1) 皮膚細胞浮遊液の作製

皮膚細胞は田中等の方法⁸⁾により作製した。ラット尾皮膚を 70% エタノールで消毒した後, 皮膚を基底膜層あたりで剥離し短冊状に細切し, 0.5% トリプシン溶液で 37℃, 3 時間浮遊消化して残存している真皮成分をのぞき, 0.025% DNase 溶液中, 表皮基底細胞層側よりガラス棒による擦過で皮膚細胞を単離した。単離細胞浮遊液は 150 メッシュフィルターを通過させて混入物を除去し, リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.15M) により洗浄して最終的に培養液に浮遊した。この細胞浮遊液には, 皮膚上皮細胞および Langerhans 細胞が含まれており, リンパ球の混入は 1% 以下であった。以下, 皮膚上皮細胞と Langerhans 細胞を含むものを皮膚細胞という。

2) 脾細胞浮遊液の作製

エーテル麻酔下にラットを脱血屠殺した後, 無菌的に脾臓を摘出した。脾はリン酸緩衝液中にペースト状に細切して浮遊させた。浮遊液中の混入赤血球は 0.75% 塩化アンモニウム処理により破壊して 150 メッシュフィルターを通過させて夾雑物を除去し, 最終的に培養液に浮遊した。

3) K562 継代腫瘍

Natural Killer (NK) 活性の標的細胞として岡山大学第一外科において継代培養している NK 感受性腫瘍 K562 (慢性骨髄性白血病細胞) を用いた。

4. UV-B 照射

光源としては 280~320nm の波長を持ち 312nm にピークを持つ Vilber Lourmat 社製 VL-6LM を用いた。線量設定には同社の VLX radiometer

で線量を測定して決定した。照射は光源から細胞浮遊液までの距離を13cmとして、各細胞にたいする照射は脾細胞 5×10^7 個/5 ml に対して $5 \sim 40 \text{ mJ/cm}^2$ 、皮膚細胞 1×10^7 個/2 ml に対して $5 \sim 150 \text{ mJ/cm}^2$ 、K562細胞 5×10^5 個/2 ml に対して50, 100, 150 mJ/cm^2 を総照射線量とした。

5. 試験管内免疫検査法

1) Mitogen によるリンパ球幼若化反応

U底のマイクロプレート (Corning社, USA, 96 well) に、未処理脾細胞および5, 10 mJ/cm^2 のUV-B照射を行ったF344脾細胞 (5×10^5 個/well) に各種 mitogen (0.1 ml/well) : PHA ($10 \mu\text{g/ml}$), Con A ($25 \mu\text{g/ml}$), LPS ($100 \mu\text{g/ml}$) を添加して、5% CO_2 ・ 37°C の加湿培養器で48時間培養して、 ^3H -Thymidine を $1 \mu\text{Ci/well}$ 加えて更に24時間培養して脾細胞の ^3H -Thymidine の取り込みを測定した。

2) Mixed Lymphocyte Response (MLR)

MLRの反応細胞にはWKA脾細胞を、刺激細胞にはF344脾細胞を用いて、U底のマイクロプレートに反応細胞及び刺激細胞を 5×10^5 個/well ずつ混合して72時間培養した。なお刺激細胞には正常脾細胞と10または 20 mJ/cm^2 のUV-B照射を行った脾細胞の両者を使用し、混合培養の前に刺激細胞は $25 \mu\text{g/ml}$ の mitomycin C により処理を行った。72時間培養後に ^3H -Thymidine を添加して更に24時間培養して反応細胞の ^3H -Thymidine の取り込みを測定した。

3) Mixed Lymphocyte-Skin Cell Response (MLSR)

MLSRは田中等の方法⁶⁾に準じて行った。反応細胞にはWKA脾細胞を用い、刺激細胞には未照射または 20 mJ/cm^2 照射のF344皮膚上皮細胞を用いてU底マイクロプレートにて反応細胞 5×10^5 個/well と刺激細胞 2.5×10^5 個/well を96時間混合培養した。96時間後 ^3H -Thymidine を添加して更に24時間培養して、反応細胞に取り込まれた ^3H -Thymidine を測定した。

4) Natural Cytotoxicity Assay

我々は正常ラット脾細胞が同系および同種の皮膚細胞に対してNK活性を持っていることを報告している⁷⁾。

ラット皮膚細胞を $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ $300 \mu\text{Ci}$ で2時

間標識し、その 1×10^4 個/well をU底マイクロプレートにて脾細胞と皮膚細胞の割合を100対1の割合で混合して12時間培養した。培養後上清を採取して遊出した ^{51}Cr を測定して以下の算出式により殺細胞能を算出した。また、対照としてK562腫瘍細胞を $100 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr で1時間標識して、4時間培養により殺細胞能を測定した。UV-B照射の影響をみるために攻撃細胞に5, 10, 20, 40 mJ/cm^2 照射し、標的細胞に50, 100, 150 mJ/cm^2 の照射を行った。

$$\%^{51}\text{Cr release} = \frac{\text{exp. release} - \text{spont. release}}{\text{maxim. release} - \text{spont. release}} \times 100$$

5) 統計学的検討

数値およびグラフは平均値±標準偏差で示し、統計学的検討は Wilcoxon 検定により危険率5%以下の場合を有意とした。

結 果

1. Mitogen に対するリンパ球幼若化反応におけるUV-Bの影響

Fig. 1の如く、5または 10 mJ/cm^2 の照射によりPHA, ConA, LPSのいずれのmitogenに対する反応も抑制された。この際、照射量によって抑制効果に変化がなく、リンパ球のmitogen反応の抑制には 5 mJ/cm^2 で充分と考えられた。

2. リンパ球混合培養法(MLR)におけるUV-Bの影響

MLRにおけるUV-B照射の影響をみると、脾

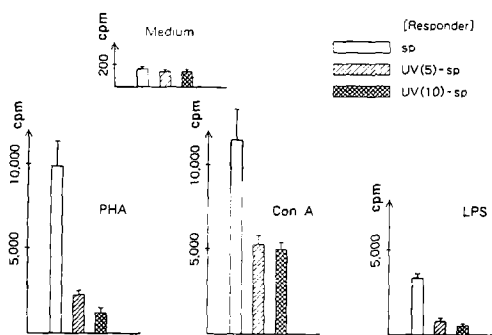


Fig. 1 UV-B照射の mitogen 反応に対する影響
F344脾細胞 (5×10^5 個/well) を5または 10 mJ/cm^2 のUV-Bで処理した後に各種 mitogen と混合して48時間培養した。

細胞の刺激性は未照射の場合に比べ10mJ/cm²照射で65.2%, さらに20mJ/cm²照射では30.4%と減弱した (Fig. 2).

3. リンパ球皮膚混合培養法 (MLSR) における UV-B の影響

UV-B照射によるMLSRへの影響は, F344皮膚細胞をUV-B20mJ/cm²の照射で前処理してWKA脾細胞と混合培養すると, 照射しなかったコントロール群に対して54.6%まで反応が抑制された (Fig. 3). 従って, 皮膚細胞も脾細胞と同様にUV-B照射により抗原性が減弱し, 反応細胞の抗原認識が低下すると考えられた.

4. Natural Cytotoxicity Assay における UV-B 照射の影響

皮膚細胞に対する脾細胞のNK活性に及ぼすUV-Bの影響を, K562細胞を一方の標的細胞として比較検討した. まず, 攻撃細胞である脾細胞をUV-B照射し cytotoxicity assay を行うと, Fig. 4 の如く F344皮膚細胞に対し F344脾細胞の殺細胞能は, 照射量を増加してゆくに従って低下し, 20mJ/cm²では未照射時の殺細胞能の58.7

%まで減弱した. また, K562細胞に対しても同様に, F344脾細胞の殺細胞能は照射量とともに減弱し, 皮膚細胞を標的細胞とした場合と差は

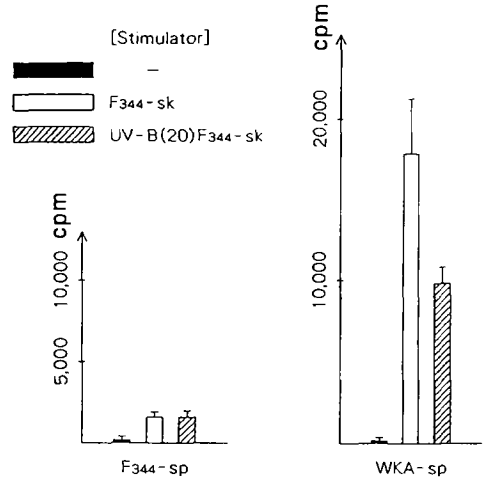


Fig. 3 UV-B照射のMLRに対する影響
未処理 F344 (F344-sp) または WKA 脾細胞 (WKA-sp) を UV-B (20mJ/cm²) で処理した F344皮膚細胞 (F344-sk) と混合培養した.
Responder : Stimulator = 2 : 1

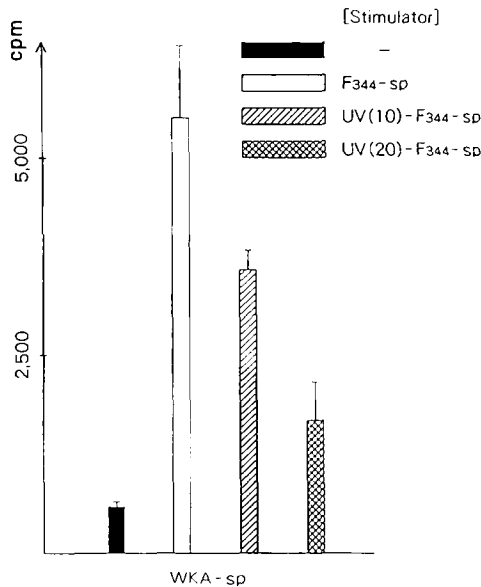


Fig. 2 UV-B照射のMLRに対する影響
未処理 WKA 脾細胞 (WKA-sp) を UV-B (10または20mJ/cm²) で処理した F344脾細胞 (F344-sp) と混合培養した.
Responder : Stimulator = 1 : 1

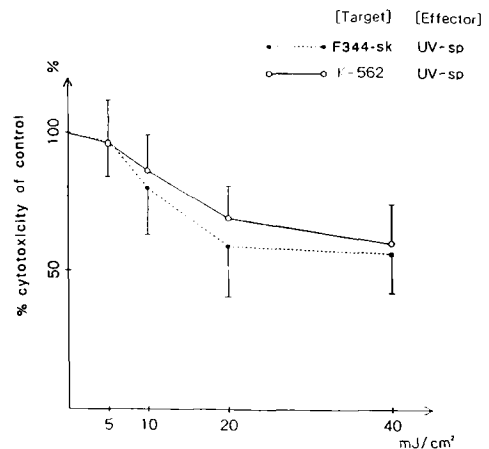


Fig. 4 UV-B照射の Natural Cytotoxicity に対する影響 (1)
F344脾細胞 (F344-sp) に漸増的に UV-B 照射し, F344皮膚細胞または K562腫瘍細胞に対する殺細胞能を測定した. (数値は UV-B非照射群に対する百分率で表現した.)

なかった。

一方、標的細胞をUV-Bで照射すると、K562細胞は照射量を50から150mJ/cm²まで増量しても脾細胞に対するNK感受性は変化なく、かえって感受性が増強される傾向があった(有意差なし)。しかし、皮膚細胞に照射を行った場合、50mJ/cm²より感受性の低下が認められ150mJ/cm²の照射では、未照射群に比較して58.4%まで感受性が低下した。各照射群の反応は統計学的に有意の差を持っていた(Fig. 5)。またこの場合、UV-B照射自体が皮膚細胞に障害性を示すか否かについて、50、100、150mJ/cm²のUV-B照射を行い、⁵¹Crで標識した皮膚細胞の viability の変化、

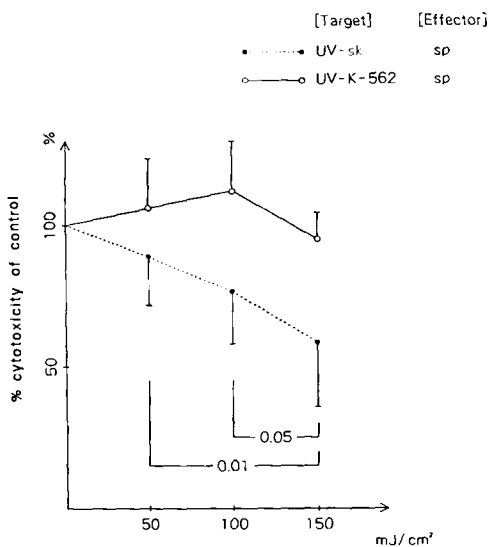


Fig. 5 UV-B照射の Natural Cytotoxicity に対する影響(2)
F344脾細胞の、漸増的にUV-B照射したF344皮膚細胞またはK562腫瘍細胞に対する殺細胞能を測定した。(数値はUV-B非照射群に対する百分率で表現した。)

⁵¹Cr の総標識量、及び assay 時の spontaneous release を比較したが、特に有意差はなく、UV-B による直接の影響はないと考えられた (Table 1)。

考 察

今回我々は、免疫反応を構成する抗原認識相と組織破壊相の2つの相における紫外線の影響を検討した。

まず抗原認識相におけるUV-Bの影響は、リンパ球に紫外線照射し mitogen によるリンパ球幼若化反応への影響を調べてみると、Judith O. Pretell 等⁹⁾がPHAを用いて行ったように、ConA, LPSにおいてもリンパ球の幼若化は抑制された。これは紫外線によるリンパ球の mitogen receptor への障害も一因ではないかと考えられた。

次にMLRにおいて、刺激細胞である脾細胞へのUV-B照射により反応細胞の³H-Thymidineの取り込みが抑制された。

次に行ったMLSRにおいても、刺激細胞である皮膚細胞にUV-B照射すると反応細胞の³H-Thymidineの取り込みが抑制された。これはJ. Czernielewski 等⁹⁾の述べているように、MLSRにおいてリンパ球刺激に必須の存在である Langerhans 細胞が、一時的に機能低下を起こしたためであろうと考えられる。また、Werner Aberer 等¹⁰⁾によると Langerhans 細胞をUV-B照射することにより細胞表面抗原であるIa抗原が消失してしまったと報告している。これらのことは細胞表面での紫外線の障害を示すものである。次に免疫反応の組織破壊相に対する影響を検討した。標的細胞に皮膚細胞を用いた Natural Cytotoxicity Assay において、皮膚細胞にUV

Table 1 Viability of Skin Cells in Natural Cytotoxicity
各照射量におけるF344皮膚細胞の細胞活性

	sk (n=27)	UV (50) -sk (n=19)	UV (100) -sk (n=13)	UV (150) -sk (n=15)
Cell viability (%)	63.3±10.4	66.0± 9.1	63.0± 9.5	62.5±14.2
Spontaneous release (%)	30.9± 5.8	32.3± 5.1	31.8± 6.5	31.5± 5.8
Total count (cpm)	5,536±1,815	5,907±1,954	6,494±2,159	6,313±1,548

-B照射した場合、その viability に変化を起こすことなく、そのNK活性の感受性が照射量依存性に低下した。このことは紫外線の皮膚細胞表面への影響によると考えると、皮膚細胞表面のNK抗原決定基の障害が起き、それにより皮膚細胞のNK細胞に対する感受性が低下したためであると説明できるかもしれない。ただし注目すべき点は、MLSRにおける皮膚細胞の細胞刺激性のUV-B照射の影響と、皮膚細胞のNK細胞に対する感受性のUV-B照射の影響とを比較すると、照射線量が後者の場合の方がより多く必要としたことである。このことは、MLSRにおける刺激性はLangerhans細胞に主体があり、NK細胞に対する感受性は皮膚上皮細胞に主体があると説明されるかもしれない。また、リンパ球のうちNK細胞は皮膚細胞の増殖や carcinogenesis 等における免疫防御機構に関わっており¹¹⁾、NK活性の感受性の低下は免疫監視からの離脱を意味する。このように、UV-Bは皮膚

細胞に対して、核DNAレベルでの障害の他にも細胞表面レベルにおいても様々な形で影響を及ぼしていると考えられた。

結 論

ラット脾細胞及び皮膚細胞に対するUV-B照射の影響を検討した。

1) UV-B照射によりリンパ球の mitogen に対する幼若化反応が抑制された。

2) UV-B照射により脾細胞及び皮膚細胞の抗原提示能が減弱した。

3) UV-B照射により脾細胞の殺細胞能が減弱した。

4) UV-B照射により皮膚細胞の natural cytotoxicity の感受性が低下した。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げると共に、終始御指導を賜りました田中信一郎先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Ullrich ES : Suppression of the immune response to allogenic histocompatibility antigens by a single exposure to ultraviolet radiation. *Transplantation* (1986) **42**, 287—291.
- 2) Schwarz T, Urbanska A, Gschnait F and Luger AT : Inhibition of the induction of contact hypersensitivity by a UV-mediated epidermal cytokine. *J Invest Dermatol* (1986) **87**, 289—291.
- 3) Chung TH, Burnham KD, Robertson B, Roberts KL and Daynes AR : Involvement of prostaglandins in the immune alterations caused by the exposure of mice to ultraviolet radiation. *J Immunol* (1986) **137**, 2478—2484.
- 4) Tanaka S, Ashby M, Sakai A and Kountz LS : Specificity of cytotoxic lymphocytes generated by Ag-B compatible skin grafts. *Transplant Proc* (1978) **10**, 579—580.
- 5) Tanaka S, Sakai A, Miyashita A, Butt HMK and Kountz LS : Minimum length of time for alloantigen recognition *in vitro*. *Transplant Proc* (1979) **11**, 830—833.
- 6) Tanaka S and Sakai A : Stimulation of allogenic lymphocytes by skin epidermal cells in the rat. *Transplantation* (1979) **27**, 194—199.
- 7) Tanaka S, Ota T, Amamiya S, Kobatake T and Orita K : Spontaneous cell-mediated cytotoxicity (SCMC) against rat skin epidermal cells. *Transplant Proc* (1983) **15**, 1662—1663.
- 8) Pretell OJ, Wimberly J, McAuliffe JD and Parrish AJ : Comparison of effects of UV-A, UV-B, UV-C on growth and viability of mitogen-stimulated human peripheral blood cells. *Photochem Photobiol* (1984) **39**, 369—374.
- 9) Czernielewski J, Faure M, Schmitt D and Thivolet J : *In vitro* mixed skin cell lymphocyte culture reaction (MSLR) in man : analysis of the epidermal cell and T cell subpopulations. *Clin Exp Immunol* (1982) **50**, 426—433.

- 10) Aberer W Schuler G, Stingl G, Hönigsmann H and Wolff K : Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* (1981) **76**, 202—210.
- 11) Herberman RB and Ortaldo JR : Natural killer cells ; Their role in defenses against disease. *Science* (1981) **214**, 24—30.

**The effect of UV-B on the immune responses
with the skin cells of the rat**

Kenji TAKAHASHI

**First Department of Surgery,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. K. Orita)**

The effect of UV-B radiation on immune responses was evaluated by radiation of rat spleen and skin epidermal cells *in vitro*. The radiation deteriorated the immune responses without influencing the viability of the irradiated cells. The mitogenic blastogenesis of the spleen cells was inhibited. The stimulatory effect of the spleen and skin cells was inhibited in mixed lymphocyte cultures. The cytotoxicity of spleen cells was decreased. The susceptibility of target skin cells to natural cytotoxicity was decreased. Therefore, UV-B radiation causes changes in the cell membrane resulting in the inhibition of immune responses.