

皮膚遊出細胞の免疫学的検索

(その2) Skin vesicle test による検索

東京女子医科大学第二病院皮膚科
 助教授 平野京子
ヒラノ キョウコ

(受付 昭和53年 8月18日)

Immunological Examination of Skin Infiltrated Cells (Part II) Used Skin Vesicle Test for the Experiment

Kyoko HIRANO, M.D.

Department of Dermatology, Tokyo Women's Medical College Second Hospital

Continuing from the last test, in order to examine the function of the infiltrated cells on parts of the skin and the changes of the component of the fluid due to inflammation and immunity reaction skin vesicle test, using Cantharides Cerata patches was performed as follows.

[III] The following E, EAC Rosett forming cells, phagocytes of the Latex particles of the lymphocytes, mononuclear cells and neutrophilic Leucocytes which infiltrated due to the skin vesicle test, were tested.

In lymphocytes, the result was $EAC < E$ and there was a vast amount of thymus derived lymphocytes. In mononuclear cells, the result was $EAC > E$. It is suggested that both mononuclear cells and neutrophilic leucocytes had both IgMFC and C_3 receptor or either one of them.

[IV] To each of the various bullous skin diseases, the differences in the following 7 components of the bullous fluid and the blood plasma were assayed. (IgG, IgA, IgM, Transferrin, Ceruloplasmin and α_2 -Macroglobulin). As the result, in wide-range burns, all components in blood plasma and bullous fluid decreased as time passed. In case of Herpes Zoster, IgG of the bullous fluid showed a tendency to increase.

I. はじめに

前回(その1)は主として skin window test を用いて、アレルギー性疾患の各タイプにおける遊出細胞の動態の検索および皮膚遊出単核球の起源について組織化学的染色態度による追求であつたが、今回(その2)は cantharides cerata による skin vesicle test を用いて遊出細胞中に好中球と単核球(マクロファージ=Mφ)の E-RFC, EAC-RFC および phagocyte についてと水疱性皮

膚疾患の主要蛋白分画の定量を行なつたので続いて報告する。

実験的水疱形成として従来試みられた方法には、カンタリジン発疱膏貼布、ドライアイス圧抵、尿素水溶液皮内注射、トリプシン水溶液皮内注射、モノブロム醋酸水溶液皮膚穿刺法等があるが、これらの中、カンタリジン発疱膏貼布によるものが最も組織や細胞の破壊および液成分の変動の少ない方法として広く用いられている。その水

疱液は細胞内液の滲透圧による排出によるものではなく表皮内還流液の貯溜によるとされている。

実験 (III)

skin vesicule test による細胞の E-RFC, FAC-RFC および Latex particules 貪食率について

1) カンタリジンにより形成された水疱内の細胞出現率

カンタリジン発疱膏(持田製薬 KK 製)を鳥居製パッチテスト用絆創膏に塗布し、健康被験者10名の大腿伸側に24時間貼布し、生じた水疱液をsyringeにて吸引し、液中の細胞を採取した。その一部をスライドグラスに塗布後 Giemsa 染色にて細胞の同定を行なう一方、Türk 液にて白血球計算盤により細胞数を算定した。その結果は表1のごとくで、細胞出現率は、count した細胞数平均348個中、好中球45%、リンパ球43%、単核球9%、その他3%となり、その他の細胞としては、上皮由来性細胞、好酸球等が含まれる。

2) カンタリジンにより形成された水疱内好中球、リンパ球、単核球(Mφ)のEおよびEACロ

表1 カンタリジンにより形成された水疱内の細胞出現率

	Total cell counts	Neutro (%)	Ly (%)	Mono (%)	Others (%)
S. K. ♂ 60	288	81	18	1	0
S. S. ♂ 35	730	81	11	6	2
M. I. ♀ 4 M	546	15	52	18	15
K. K. ♂ 16	298	49	47	2	2
T. O. ♂ 22	350	76	21	1	2
M. N. ♂ 20	309	31	52	8	9
T. T. ♂ 64	200	39	48	13	0
Y. F. ♂ 44	203	30	55	15	0
T. Y. ♀ 30	356	26	64	8	2
M. H. ♂ 10	200	25	62	13	0
Average	348	45	43	9	3

ゼット形成率および EAC 貪食率(表2), (写真1, 2)

操作法は表3のごとくである。EAC-RFC は好

表2 カンタリジンにより形成された水疱内好中球、リンパ球、単核球の EAC, Eロゼット形成率および EAC 貪食率

	EAC-RFC			E-RFC			EAC-Phagocyte Mono (%)
	Neutro (%)	Ly (%)	Mono (%)	Neutro (%)	Ly (%)	Mono (%)	
S. K. ♂ 60	62	53	75	61	59	0	0
S. S. ♂ 35	51	28	79	21	4	0	9
M. I. ♀ 4 M	53	12	38	17	29	9	3
K. K. ♂ 16	79	27	75	14	35	—	1
T. O. ♂ 22	42	20	100	38	45	33	2
M. N. ♂ 20	40	12	0	40	24	27	0
T. T. ♀ 64	17	4	7	6	19	18	0
Y. F. ♂ 44	12	0	6	11	2	13	0
T. Y. ♀ 30	17	2	55	44	49	7	1
M. H. ♂ 10	6	2	5	0	54	37	0
Average	38	16	44	25	32	16	2

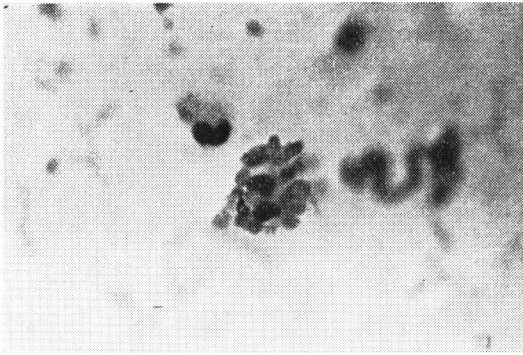


写真1 Skin vesicule test 好中球 EAC-Rosett
×1000

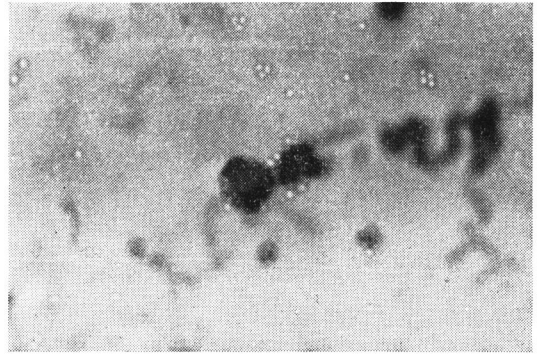


写真3 Skin vesicule sest 好中球 Latex 粒子取
り込み×1000

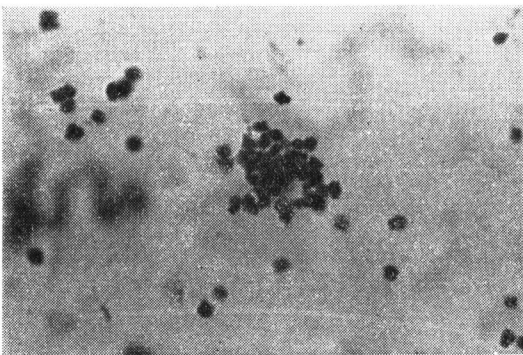


写真2 Skin vesicule test 単核球 EAC-Rosett
×1000

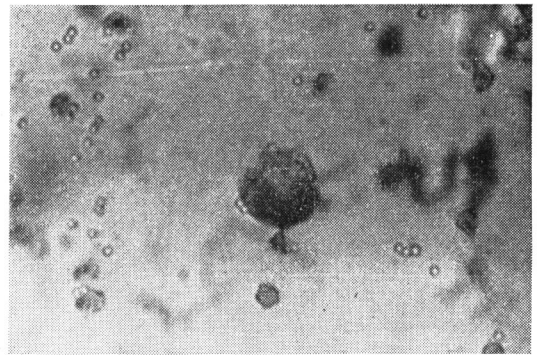
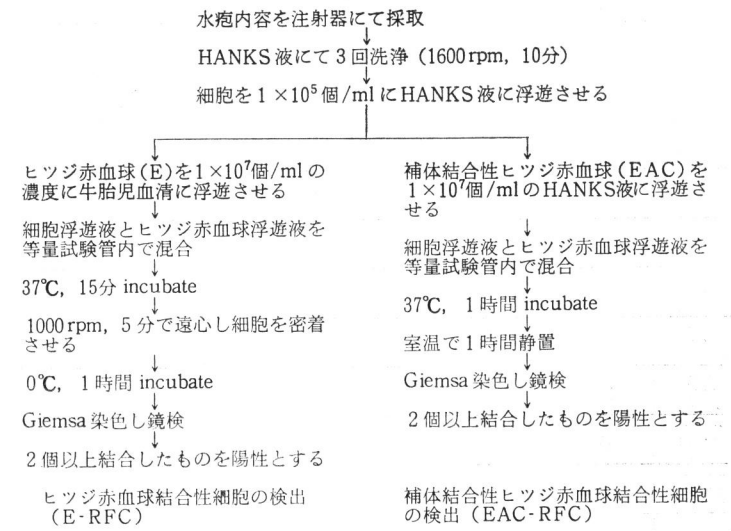


写真4 Skin vesicule test 単核球 Latex 粒子取
り込み×1000

表 3



注: E. EAC 日本抗体工業製

表4 カンタリジンにより形成された水疱内好中球, 単核球の HANKS 液のみと, これに水疱液, 血清添加時のラテックス貪食率の変動

	Neutro			Mono		
	HANKS (%)	Blister fluid (%)	Plasma (%)	HANKS (%)	Blister fluid (%)	Plasma (%)
S. S. ♂ 35	16	—	34	33	—	67
S. K. ♂ 60	5	7	23	25	55	45
M. M. ♀ 45	4	21	24	10	17	32
K. H. ♀ 54	26	—	47	22	—	22
M. I. ♀ 4 M	10	13	8	15	17	9
K. K. ♂ 16	7	8	2	14	10	20
T. O. ♂ 22	3	2	9	3	0	7
M. N. ♂ 20	33	0	16	30	70	60
M. Y. ♂ 17	13	80	—	17	25	—
Average	13	19	20	17	24	29

表5 取り込み能

水疱内容を注射器にて採取
↓
HANKS 液にて 3 回洗浄 (1600 rpm, 15分)
↓
細胞を 1×10^6 個/ml に HANKS 液に浮遊させる
↓
Latex 粒子を 5×10^6 個/ml になるよう HANKS 液に浮遊させる
↓
(水疱, 血清添加による取り込み能をみるときは, 20% に HANKS 液に希釈した水疱, 血清を全体の 1/5 量添加する。)細胞浮遊液と Latex 浮遊液を等量加え, 37°C 15 分間 incubate する
↓
ice-cold saline を加え, 1000 rpm, 4 分遠沈した後, 上澄を捨て, 沈渣を 2% グルタルアルデヒドで固定し, グリセリンゼリーにて封入し, 位相差顕微鏡で観察
↓
Latex 粒子を付着および捕食した細胞を陽性とする

注: Latex particles The DOW Chemical company 製 Diameter (m μ) 1.101

中球38%, リンパ球16%, 単核球44% であり, E-RFC は好中球25%, リンパ球32%, 単核球16% となり, また, EAC を貪食した単核球が2% みられた。

3) カンタリジンにより形成された水疱内好中球, 単核球の貪食率の比較 (HANKS 液のみの場合と同一被験者の水疱液または血清を添加した場合との貪食率の変動 (表4, 写真3, 4)

好中球, 単核球の貪食能 (取り込み能) 実験には Latex particles を用いた。その操作法は表5のごとく行なつた。HANKS 液のみと, 水疱液または血清添加の際のラテックス貪食率は, 表4に示したように, 好中球では, HANKS 液のみでは13%, 水疱液添加19%, 血清添加20% であり, 単核球では, HANKS 液のみでは17%, 水疱液添

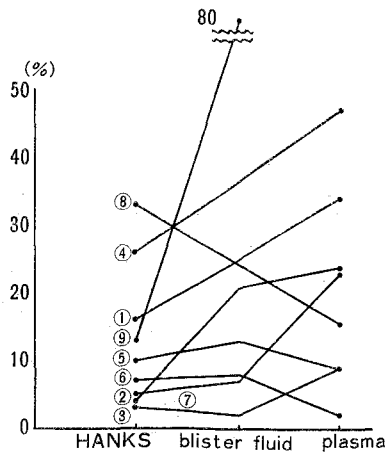


図1 Neutrophil

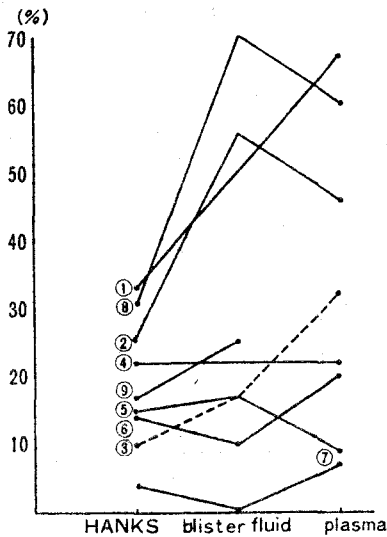


図2 Mono nuclear cell

加24%, 血清添加29%となつた。以上の結果をグラフにしたものが図1と図2であり。好中球, 単核球ともに Latex 貪食率は HANKS<水疱液添加<血清添加の順で増加がみられた。また, 単核球は好中球より貪食率がやや高かつた。

実験 [IV]

水疱形成性皮膚疾患の水疱液と skin vesicule test 水疱内容液 および 血漿の主要蛋白分画の量的比較

実験Ⅲの好中球および単核球の取り込み能との関連性をみる目的で, skin vesicule test を用いて皮膚局所滲出液を採取し, 血漿成分との比較を行い, 併せて各種水疱性皮膚疾患の水疱液の成分との比較も行なつた。skin vesicule test は実験Ⅲと同様, カンタリジン 発疱膏貼布24時間後に形成された水疱内容液を使用した。実験法としては, IgG, IgA, IgM, β_1C/β_1A globulin (C_3), Transferrin Ceruroplasin, α_2 -macro globulin の7種について Radial immunodiffusion test (HYLAND 製 immuno-plate) を用い検索した。

結果

1) 正常者4名の血漿成分と skin vesicule test 水疱内容液を上記7種の蛋白分画について比較してみると表6のごとくである。(斜線右上部が血漿, 左下部が水疱内容液) 水疱内容液は血漿成分に比し全体にすべてが低値を示したが, その中, IgM と α_2 -macroglobulin が殊に低値であつた。表6の下部は血漿蛋白分画上記7種の正常値を示す。

2) 熱傷にて形成された水疱の内容液と血漿との比較は表7のごとくである。上段第1例(M. Y. ♀ 18)は受傷面積30%の広範囲熱傷で他の6例は小範囲局所熱傷である。広範囲熱傷の血漿 α_2 -macroglobulin は, IgM と共に初期に高値を

表6 Comparison of chief proteinfraction in the bloodplasma and bulla fluid (normal person)

Name Sex Age	Time	Bulla-fluid		Blood plasma						
		IgA (mg/dl)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	$\beta_1C/\beta_1Agl.$ (mg/dl)	Transferrin (mg/dl)	Ceruloplasmin (mg/dl)	α_2 -macroglobulin (mg/dl)
K. Y. ♂ 28	1 day	780	223	700	180	58	105	195	16	47
		1540	510	880	440	60	77	180	15	47
K. H. ♀ 54	1 day	1665	266	1560	212	72	80	206	29	140
		880	250	760	210	58	95	190	21	47
A. S. ♀ 40	1 day	121	123	124	125	126	127	128	129	130
		121	123	124	125	126	127	128	129	130
F. Y. ♀ 53	1 day	121	123	124	125	126	127	128	129	130
		121	123	124	125	126	127	128	129	130

Normal value of chief proteinfraction in the Blood plasma

422~1453 (938) mg/dl	56~478 (267) mg/dl	50~391 (131) mg/dl	61~232 (147) mg/dl	144~424 (284) mg/dl	21~49 (35.2) mg/dl	106~358 (232) mg/dl
----------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	--------------------------	---------------------------

表 7

		Blood plasma		Bulla-Blister fluid											
Name Sex Age	Time	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	$\beta_1C/\beta_1Agl.$ (mg/dl)	Trans- ferrin (mg/dl)	Cerulo- plasmin (mg/dl)	α_2 -macro- globulin (mg/dl)							
M. Y. ♀ 18 (30%)	1 hrs	1090	1540	218	302	90	160	79	114	215	230	17	22	235	560
	1 day	880	1390	172	292	28	150	65	99	195	440	14	22	100	440
		2 days	610	1260	102	282	21	118	73	109	115	205	11	24	90
M. K. ♀ 9	1 day	990		225		75		55		213		13		110	
	5 days	960		190		104		63		190		16		130	
H. H. ♀ 7	3 days	390		135		40		70		160		14		120	
Y. S. ♀ 3	12 hrs	480		70		7		106		215		22		175	
M. T. ♀ 33	3 days	720		145		110		78		175		13		80	
K. I. ♀ 0	3 days	710		100		20		82		170		15		90	
M. K. ♂ 20	1 day	910		185		18		49		165		15		48	

表 8

		Blood plasma		Bulla-Blister fluid											
Name Sex Age	Time	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	$\beta_1C/\beta_1Agl.$ (mg/dl)	Trans- ferrin (mg/dl)	Cerulo- plasmin (mg/dl)	α_2 -macro- globulin (mg/dl)							
Y. S. ♀ 42	2 days	1400	1680	127	158	60	78	97		210		15		73	
		940	1160	375	432	104	75	118		215		13		195	
K. Y. ♂ 19	15 days (Recidiv)	1040	1320	310	442	85	95	142		235		20		180	
		1490	1320	215	358	70	124	155		220		37		110	
Y. S. ♂ 43	2 days	1110	1400	388	464	198	284	56		210		22		200	270
		2220	3200	540	716	104	136	136	80		248		29		188
Y. S. ♀ 12 normal skin	4 days	1340	1140	245	215	175	150	103	98	260	220	23	22	297	260
		1030		165		125		72		175		18		195	
T. S. ♀ 51	2 days	1725	1750	144	198	104	104	182		335		37		114	

表 9

Name Sex Age	Time	Blood plasma Bulla-Blister fluid						
		IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	β_1C/β_1AgI (mg/dl)	Trans- ferrin (mg/dl)	Cerulo- plasmin (mg/dl)	α_2 -macro- globulin (mg/dl)
K. T. ♀ 72	1 day	1260 1400	310 250	78 70	111 97	184 160	24 20	210 100
	3 days	1520	285	75	95	165	20	103
T. K. ♀ 48	1 day	1230 1440	311 324	104 104	122 122	260 284	34 36	284 206
	4 days	2160	492	160	182	404	47	294

Insect bite

M. H. ♂ 10	2 days	1460 940	315 235	85 60	168 113	255 165	15 42	315 240
	normal skin	1130	280	60	135	200	28	263
N. T. ♀ 5	4 days	960	205	185	90	225	17	210

表 10

Name Sex Age	Exami- nation material	Behçet Syndrome						
		IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	β_1C/β_1AgI (mg/dl)	Trans- ferrin (mg/dl)	Caruro- plasmin (mg/dl)	α_2 -macro- globulin (mg/dl)
M. N. ♀ 27	B	1320	270	90	85	235	17	73
	N	980	208	123	118	290	28	230
Y. H. ♂ 46	B	950	196	50	123	280	22	55
	N	860	167	135	143	155	25	130
Y. N. ♀ 22	B	860	167	135	135	155	25	130
	N	780	167	135	124	155	23	120
T. T. ♀ 64	B	1200	335	98	88	165	23	150
	E	1040	290	70	85	156	22	100
H. M. ♂ 53	B	1900	332	142	45	130	12	63
	N	1240	218	60	45	130	12	63
Y. K. ♀ 46	B	1490	463	125	107	255	22	255
	N	1120	290	53	77	195	15	70

表 11

Toxicodermia										
K. S. ♀ 33		B	1860	198	186					
	N		1160	115	60	75	145	17	55	
	E		1280	155	140	85	170	22	103	
Autosensitization dermatitis										
Y. Y. ♀ 19		B	1290	260	104	63				
	N		1070	164	42	88	322	28	196	
	E		1035	164	74	76	285	24	215	
Lichen simplex chronica Vidal										
S. S. ♀ 73		B	1460	238	175	191	292	28	234	
	N		1065	154	67	98	227	24	88	
	E		1020	155	75	95	230	25	75	
Contact dermatitis										
T. Y. ♀ 30		B	1640	215	78					
	N		1260	170	65	98	210	15	45	
	E		1300	160	40	105	220	17	15	

示し、水疱液との著明な差がみられたのが特徴的であるが、1日、2日と時間の経過と共に血漿水疱液共にすべての蛋白分画量は漸次低下していった。小範囲局所熱傷の第2例(M.K. ♀ 9)では、水疱液の IgM, β_2C/β_{1AgI} および α_2 -macroglobulin は5日後には上昇を示した。

3) Herpes zoster の水疱液と血漿との各蛋白分画量の比較表8では、血漿および水疱液共に IgG の増加が著明であり、第2例(K.Y. ♂ 19)では Recidiv の際にさらに上昇を示したのが特徴的であった。IgA も一般的に高く、殊に水疱液が他の疾患に比し高値を示した。

4) Contact dermatitis (Bullaformation type) および Insect bite の水疱液と血漿との各蛋白分画量の比較(表9)。Contact dermatitis の水疱液の IgG は血漿のものより高値を示す事が特徴的で、IgA も1例に於て血漿より高値であり、水疱液の α_2 -macroglobulin も対照に比しやや高値であった。これに対し Insect bite では水疱液の IgG は血漿および正常皮膚面 skin vesicule test 内容液より低かった。

5) 対照として非水疱形成性皮膚疾患の皮疹部

および健常皮膚面の skin vesicule test 水疱内容と血漿との主要蛋白分画量を比較した(表10, 表11)。対照として用いた疾患は Behçet syndrome, Poikiloderma atrophicans vasculare, Sweet syndrome, Psoriasis vulgaris, Polyarthritus nodosa (cutaneous type), Toxicodermia, Autosensitization dermatitis, Lichen simplex chronica Vidal, Contact dermatitis (no Bulla-formation type) である。これらの健常皮膚面および皮疹部の skin vesicule test 水疱内容液および血漿共に上記7種の蛋白分画量は対照健康人とのそれと有意の差はみられなかった。

総括並びに考按

[Ⅲ] skin vesicule test (実験的水疱) は、皮膚疾患の水疱形成の発症機序の研究としてはじめられた方法で、現在カンタリジン発疱膏貼布による方法が最も多く用いられている。カンタリジンは、組織学的に Acantholysis を起す物質¹⁾で一種の刺激的水疱であり、今回はこの方法にて皮膚水疱局所に遊出して来た細胞を採取して上記実験を行なった。

skin vesicule test の水疱内細胞はリンパ球と好

中球が主体をなし、10%位の $M\phi$ が出現した。これら水疱内細胞の EAC, E ロゼット形成率は、リンパ球では $EAC < E$, 好中球は $EAC > E$, 単核球は $EAC > E$ であり、リンパ球は、末梢血液中のリンパ球の比率 (T-cell 及び B-cell) と一致している。現在までわかっているように、好中球では、 C_3 および IgM-Fc 両 Receptor を保有する²⁾ため EAC-RFC の方が多くなつていられる。すなわち細菌の貪食には細菌そのものより抗体または補体の結合したものの方が貪食されやすく、これにより好中球の Lysosome 内の殺菌物質の放出により殺菌が行われる。また、単核球でも実験結果より C_3 , IgM-Fc Receptor の両方または少なくとも一つを保有する事が推測される。免疫グロブリンで被覆された赤血球を用いた研究は単球においてもおこなわれており、IgG の Fc fragment および補体第3成分に対する表面 Receptor を有している事がわかつており³⁾⁴⁾、皮膚遊出単核球は前回の skin window test の結果とも併せて Van Furth の称する exudate $M\phi$ と言える事が示唆された。

水疱内好中球および単核球の Latex 貪食率の変動は $HANKS < \text{水疱液} < \text{血清}$ のそれぞれを添加の順で増加しており、これは好中球および単核球では、貪食される Latex 粒子の表面に特殊な Opsonin 作用を有する免疫グロブリンの存在が必要であるように思われ⁵⁾⁶⁾、貪食促進作用は IgG より IgM の方が一層効果的であり、補体成分がなくても付着は起り得る⁷⁾⁸⁾。そのため血清添加時の Latex 貪食率が他の場合に比し高値を示したものと考えられる。実験的水疱内容では血清より IgM は低値をとる。

[IV] Cantaris による水疱液は24時間では血清に比し蛋白濃度は低く、48時間まで一旦減じ、次いで72時間値で高くなるという⁹⁾。今回の実験の正常者の24時間値も、7種の重要蛋白分画はすべて血漿より低値を示した。重症広範囲熱傷の受傷初期には血漿の α_2 -macroglobulin が高値を示した。 α_2 -macroglobulin は現在 α_1 -Antitrypsin, Inter- α -Trypsin Inhibitor, α_1 -Antichymotrypsin, Anti-

rombin III, C_1 -Inactivator などと共に抗線溶物質として考えられており¹⁰⁾、重症熱傷時には線溶系の亢進がみられ、その regulate のために初期より増加するのではないかと考えられる。局所小範囲熱傷の5日目の水疱液で α_2 -macroglobulin が上昇してきている事も局所における修復過程の同意義と考えられる。Herpes zoster の際の血清 IgG は初期より上昇線をとるが、汎発性の散布疹を伴う重症型では初期より下降線をとる、その下降線上で汎発化する。すなわち、Varicella-Zoster Virus の初期感染である Varicella の抗体は IgM と IgG にあり、2次感染すなわち Herpes zoster の抗体は IgG 分画にある。また血清 IgA は Herpes zoster では一定していないが(本症例のすべて)、汎発疹を伴う Herpes zoster generalisatus では正常者よりやや高値を示す¹¹⁾。その mechanism は不明の点が多いが水疱液中で血漿より高値をとつた第6例 (Y.S. ♀12) は興味がある。

Contact dermatitis (Bullaformation type—allergic) の水疱液の IgG は血漿より逆に高値であつた。 β_{1c}/β_{1A} (C_3) は補体成分のうち最も量的に多く、生物学的活性化がみられれば、白血球の遊走、貪食作用の強化、血管の透過性および平滑筋収縮に係りて来て、急性期反応物質として量的に変動をみる¹²⁾。また Transferrin (鉄結合性蛋白) は PH に強く依存し可逆的であり、炎症性疾患では血清鉄および Transferrin は低下を来し、その低下は感染症発症48時間で認められるという。血清銅は主として Ceruloplasmin と結合して運搬され、Ceruloplasmin は α_2 -globulin 分画にある。血清銅は感染症や炎症性疾患(例えばウイルスや細菌性感染症, SLE, RA 等)の際に増加し、その機能のうち鉄代謝との関連性が重視されている。上記3蛋白分画成分の変動は今回の実験ではあまりみられなかつた。

以上は、前号“そのI”と共に、皮膚に遊出して来る細胞の免疫学的基礎的実験であるが、今後免疫学の進歩と共に更に発展した検査法が開発され得ると思われ、殊に皮膚遊出単核球がいわゆる

exsudate Mφ である事より, Mφ と Lymphocyte の Interaction による局所免疫反応も今後の課題であろう. さらに各種疾患におけるこれらの細胞の動態や機能および液成分との関連等未だ皮膚局所反応には未解決の分野が残されており, 今後の検索の発展が望まれる.

(本研究費の一部は“その1”と共に吉岡研究奨励金によりました事を御礼申し上げます. なお終始協力した研究協力者の本教室安田和正助手に感謝の意を表します.

文 献

- 1) **Stoughton, R.B., et al.:** J Invest Dermat **32** 287 (1959)
- 2) **矢田純一:** 臨床免疫 **7** (10) 1037 (1975)
- 3) **Labuglio, A.F., et al.:** Science **158** 1582 (1967)
- 4) **Huber, H., et al.:** Science **162** 1281 (1968)
- 5) **Mudd, S., et al.:** Phagocytosis *physiol Rev* **14** 210 (1934)
- 6) **Rowley, D.:** Phagocytosis *Advances Immun* **2** 241 (1961)
- 7) **Robbins, T.B., et al.:** J Exp Med **122** 385 (1965)
- 8) **Rabinovitch, M.:** J Immun **99** 1115 (1967)
- 9) **石本光秋:** 皮膚科最近の進歩 III 医歯薬出版東京 (1960) 335~362 頁
- 10) **小野一郎・他:** 第16回プラスミン研究会報告集 26~29 頁 (1976) 於神戸
- 11) **平野京子:** 臨皮 **30** (1)85 (1976)
- 12) **Alper, C.A.:** Plasma Metabolism. Ed. Rothchild and Waldmann. Academic Press. (1977) p. 393~413