— 原 著 —

マウス皮膚移植における抗 $\alpha\beta$ -T 細胞
リセプター抗体の効果

内山 喜一郎

日本医科大学外科学第2教室

Effect of anti- $\alpha\beta$ T cell receptor monoclonal antibody
on skin allograft rejection in mice

Kiichiro Uchiyama

The Second Department of Surgery, Nippon Medical School

T cell receptors recognize foreign antigens in the context of glycoproteins encoded by the major histocompatibility complex (MHC). $\alpha\beta$ T cell receptor ($\alpha\beta$ TCR) consists of disulfide-linked heterodimeric glycoproteins composed of α - and β -chain. H57-597 is a hamster monoclonal antibody which is directed against the β chain of the murine TCR complex. We purified an anti- $\alpha\beta$ TCR monoclonal antibody (anti-V β mAb) which had very similar properties to H57-597, and examined the effect of this mAb in complete H-2-disparate skin allograft. C57BL/6 (B6) mice grafted with DBA abdominal skin were injected intraperitoneally with 250 μ g of anti-V β mAb just after grafting. These B6 mice rejected their skin grafts with a mean survival time (MST: 8.5 ± 0.8 days) similar to that of the control mice (MST: 8.5 ± 0.5 days). To examine the modulation of TCR and the T cell function, B6 mice were injected with only one dose of 250 μ g of anti-V β mAb, and lymphocytes from peripheral blood (PBL), lymph nodes and spleen were tested by flow cytometric analysis (FCM), mixed lymphocyte reaction (MLR) and cell mediated lympholysis (CML) on days 3, 7, 14, 28, 42, and 56 post-injection. There were no detectable Thy-1.2 $^{+}\alpha\beta$ TCR $^{+}$ cells present in these organs by FCM for the first 1 week after the administration of mAb, but about 26% of Thy-1.2 $^{+}$ cells still remained. The numbers of Thy-1.2 $^{+}\alpha\beta$ TCR $^{+}$ cells had recovered fully in PBL, but only up to 60% of control levels in the lymph nodes and spleen by day 56 post-treatment. Spleen cells from B6 mice treated with 250 μ g of anti-V β mAb demonstrated significant suppression of both donor-specific proliferative response in MLR and cytotoxicity in CML up to 28 days post-injection. Then the response fully recovered by day 56 post-injection. These data indicate that anti-V β mAb treatment in mice leads to the rapid and nearly total depletion of $\alpha\beta$ TCR $^{+}$ cells. In order to deplete more $\alpha\beta$ TCR $^{+}$ cells and acquire longer graft survival, 100 μ g or 250 μ g of mAb was injected on days 3, 7, 10, following the injection just after skin grafting. These B6 mice retained their grafts with MST of 12.2 ± 1.5 or 12.8 ± 0.8 days, respectively. B6 mice administered with 250 μ g of mAb every day after grafting also retained grafts with similar MST of 10.3 ± 0.8 days, but survival time was prolonged for no longer than 12 days. Despite the depletion of all $\alpha\beta$ TCR $^{+}$ cells from peripheral blood, lymph nodes and spleen with anti-V β mAb, Thy-1.2 $^{+}\alpha\beta$ TCR cells still remained, and these cells were thought to include $\gamma\delta$ TCR $^{+}$ cells capable of antigen-specific immunological responses. The data suggested that administration of anti-V β mAb alone was not enough to make skin allografts survive longer than 12

days, and certain Thy-1.2⁺ $\alpha\beta$ TCR cells and other unknown factors might play an important role in the response to diverse foreign antigens in epithelia.

Key words: T cell receptor, monoclonal antibody, H57-597, skin allograft, rejection

緒 言

臓器移植後における移植片拒絶反応は、T細胞が主役の反応である。移植抗原を認識したヘルパーT細胞は様々なリンホカインを産生し放出する。放出されたリンホカインによって活性化した各種エフェクター細胞は、移植組織を傷害し移植片を拒絶する。T細胞はその抗原特異的リセプター (T cell receptor, TCR) を介して、抗原分子と抗原提示細胞 (antigen presenting cell, APC) 表層上の主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) との複合体を認識することが知られている¹⁻³⁾。移植組織の生着を延長するために、現在様々な免疫抑制剤 (副腎皮質ホルモン、サイクロスポリン A, FK506, 抗リンパ球抗体、抗接着分子抗体、など) を組み合わせた免疫抑制療法が行われている^{4,5)}。なかでも、抗 CD3 抗体 (OKT3)⁶⁾、抗 IL-2 リセプター抗体⁷⁾、抗 ICAM-1/抗 LFA-1 抗体⁸⁾ などは、移植免疫を担うリンパ細胞の活性を直接抑制する抗体として成果が注目されているが、その結果には未だ問題が残されている。

T細胞の抗原認識に主要な役割を果たす TCR 分子は、90%以上が α 鎖と β 鎖が S-S 結合した $\alpha\beta$ TCR であり⁹⁻¹¹⁾、残りは γ 鎖と δ 鎖が結合した $\gamma\delta$ TCR^{12,13)} からなっている。TCR と機能単位をなす CD3 分子群は、 γ , δ , ϵ , ξ , η の 5 つのサブユニットから成り¹⁴⁾、TCR を介する抗原刺激を細胞内に伝達する役割を担っている。H57-597 (以下 H57 と略す) は $\alpha\beta$ T 細胞の β 鎖を認識するモノクローナル抗体であるが、*in vitro* で、すべての $\alpha\beta$ TCR⁺ 細胞に結合し $\gamma\delta$ TCR⁺ 細胞には反応しないこと、ウェルの底面に接着固定した抗体には $\alpha\beta$ TCR⁺ 細胞を活性化し IL-2 を産生させる働きのあることが報告されている¹⁵⁾。

本論文は、H57 に類似した抗 $\alpha\beta$ TCR モノクローナル抗体 (以下抗 $V\beta$ mAb と略す) を作成

し、この抗体をマウスに投与することによって $\alpha\beta$ TCR⁺ T 細胞の機能を抑制し、同種皮膚移植片の拒絶に $\alpha\beta$ TCR⁺ T 細胞以外の細胞が関与するか否かを検討したものである。抗 $V\beta$ mAb 投与による末梢血、リンパ節、脾臓中の $\alpha\beta$ TCR⁺ T 細胞の数と割合、機能などの変動を Flow cytometry (FCM)、混合リンパ球反応 (Mixed lymphocyte reaction, MLR)、細胞媒介性リンパ球溶解反応 (Cell mediated lympholysis, CML) で測定し、移植片の拒絶に及ぼす $\alpha\beta$ TCR⁺ T 細胞と $\gamma\delta$ TCR⁺ T 細胞の役割について考察を加えた。

研究材料および方法

1) 動物: C57BL/6 (B6, H-2^b)、DBA/2 (DBA, H-2^d) は Jackson Laboratory (USA) により購入した。C.B-17/Icr scid (scid, H-2^d) は、Emil R. Unanue 博士 (Washington University, St. Louis, MO, USA) より供与された。実験には、すべて生後 8 週齢～12 週齢の雌を用いた。

2) Media: 細胞培養および MLR や CML の測定には、Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO Laboratories, USA) に 1.0mM sodium pyruvate, 1×10^5 U/L penicillin, 1×10^5 μ g/L streptomycin, 116mg/L L-arginine, 36mg/L L-asparagine, 2g/L NaHCO₃, 1.5mM L-glutamine, 10mM HEPES buffer および 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol を加えたものを使用した。FCM, MLR, CML には 5～10% の割合に fetal bovine serum (Hazleton Biologics, USA) を加えた培養液を用いた。

3) モノクローナル抗体: Kubo らの方法¹⁵⁾ に準じて抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体 (抗 $V\beta$ mAb) を作成した。要約すると、マウス T 細胞ハイブリドーマ DO-11.10 の TCR を分離して得た TCR rich 分画で免疫したハムスターの脾臓から B 細胞を分離し、マウス骨髄腫細胞 P3X63AG8.653 と細胞融合

させ $V\beta$ 鎖特異的ハイブリドーマを作成した。このハイブリドーマを scid マウスの腹腔内に注入することで貯留する腹水から抗体を精製した。この抗体が B 細胞と反応しないことは FCM で確認している (data 未発表)。

4) 皮膚移植: Billingham & Medawar らの方法¹⁶⁾を用いて DBA マウスの腹壁皮膚をそれぞれ B6 マウスの背側に移植した。皮膚移植後に抗 $V\beta$ mAb 100 μ g, または 250 μ g をレシピエントの B6 マウス腹腔内に投与した。投与方法により, 術直後 1 回のみ, 術直後と術後 3, 7, 10 日目, 術直後から毎日投与の各群に分けた。術後 7 日目に移植片をおおっていたガーゼを除去し, 以後毎日, 移植皮膚片が拒絶されるまで観察した。移植皮膚片の 90% 以上の領域が壊死になった日を拒絶日と定めた。なお, 対照群には抗 $V\beta$ mAb の代わりにハムスター IgG (Cappel 社, USA) 250 μ g を投与した。

5) Flow cytometry (FCM): 抗 $V\beta$ mAb 250 μ g を β 6 マウスの腹腔内に 1 回注射し, 3, 7, 14, 28, 42 および 56 日目にそれぞれ 2~3 匹のマウスを末梢血採血後屠殺し, 脾臓, リンパ節 (腋窩, そけい部, 腸間膜) を摘出し, リンパ球を分離した。末梢血リンパ球 (Peripheral blood lymphocyte, PBL) は Ficoll-Hypaque 比重遠心法で分離精製した。脾細胞浮遊液は, single cell suspension を作成後比重遠心法で分離調整した。リンパ節は Ficoll-Hypaque を用いることなく single cell suspension を作成した。対照群の細胞浮遊液は 2~3 匹の無処置 B6 マウスから同様にリンパ球を採取調整した。これら 3 種のリンパ球を, Biotin を conjugate した抗 $V\beta$ mAb あるいは抗 Thy-1.2 mAb (Becton Dickinson 社, USA), streptavidin-coupled phycoerythrin, FITC-conjugated goat anti-rat IgG (Caltag Laboratories, USA) を用いて単染色及び二重染色し, FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems 社, USA) で分析した。

6) MLR: 抗 $V\beta$ mAb 250 μ g を無処置の B6 マウス腹腔内に注射後, 3, 7, 14, 28, 42, 56 日

目にそれぞれ 2~3 匹の B6 マウスを屠殺し, 摘出した脾臓から 5×10^6 /ml の脾細胞浮遊液を作り反応細胞とした。刺激細胞は DBA マウスの脾細胞浮遊液 5×10^6 /ml に 20Gy X 線照射し使用した。96 穴マイクロプレートの各ウェル内にそれぞれ 100 μ l の反応細胞と刺激細胞を混合し, 37°C, 5%CO₂ の条件下で 2~5 日間培養した。なお, 対照には刺激細胞として DBA の代わりに 20Gy を照射した B6 マウスの脾細胞を使用した。培養 2~5 日後, 各ウェルに 1 μ Ci の ³H-サイミジンを加え, さらに 24 時間培養した。反応細胞のサイミジンの取り込みはセルハーベスターを用いて濾紙上に吸着させ細胞を乾燥, 液体シンチレーションカウンターで各ウェルの cpm を測定した。結果は, 抗 $V\beta$ mAb 投与 (treated) B6 の MLR と非投与 (untreated) B6 の MLR について, それぞれの刺激時 (allogeneic MLR) と非刺激時 (syngeneic MLR) の差をとり Δ cpm として表した。

$$\Delta \text{cpm} = \text{allogeneic MLR}$$

$$- \text{syngeneic MLR}$$

7) CML: MLR の実験で, 抗 $V\beta$ mAb 250 μ g を腹腔内に注入した B6 マウスから CML の反応細胞 (B6 splenocyte 5×10^6 /ml) を調整し, DBA マウスより刺激細胞 (irradiated DBA splenocyte 5×10^6 /ml) を調整した。反応細胞 17×10^6 個 (3.4 ml) と X 線照射した刺激細胞 22×10^6 個 (4.4 ml) を 37°C, 5%CO₂ 条件下で 5 日間混合培養して感作, 細胞を回収しエフェクター細胞とした。標的細胞は ⁵¹Cr で標識したマウス骨髄腫細胞 P815 (H-2^d) と EL-4 (H-2^b) を 2×10^3 細胞/ウェルの割合で用いた。エフェクター細胞と標的細胞の比 (E/T) は 3:1, 10:1, 30:1, 100:1 とし, 96 穴マイクロプレートを用いて総量 200 μ l となるよう混合, 37°C, 5%CO₂ 下 4 時間培養した。反応後の上清 100 μ l を各ウェルより採取し, 放出された ⁵¹Cr をガンマカウンターで測定した。抗 $V\beta$ mAb 非投与 (untreated) B6 マウスを用いて同様の CML を行い対照とした。結果は, % specific lysis として下記の式で計算した。

$$\% \text{Specific lysis} =$$

$$\frac{\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}}{\text{total cpm} - \text{spontaneous cpm}} \times 100$$

8) 統計処理：皮膚移植を受けた各群間の統計学的検定には Tukey's studentized range test を用いた。p<0.05をもって有意差とした。

結 果

1. 移植皮膚生着期間

対照としてハムスターIgGを投与したアロ皮膚移植群 (group 1, 2) は投与回数に関係なく8.0±0.6日と8.5±0.5日で移植皮膚片を拒絶した。アロ皮膚移植+抗Vβ mAb投与群では、抗Vβ mAb投与量100μgでも250μgでも、術当日1回限りの投与 (group 3, 5) では8.8±2.0日とも8.5±0.8日で拒絶されたが、術直後、3, 7, 10日目に投与した場合 (group 4, 6) には12.2±1.5日, 12.8±0.8日と生着期間が約4日間延長した (p<0.001)。250μgを術後毎日投与した群 (group 7) も生着期間が10.3±0.8日と延長する (p<0.001)。しかし、group 4, group 6に比べ生着期間が延長することはなかった。抗Vβ mAb投与によると思われる副作用は特に認められなかった (Table 1)。

2. αβ TCR⁺細胞数と割合の変化

抗Vβ mAb抗投与したマウスのリンパ節、脾臓、PBLにおけるThy-1.2⁺αβ TCR⁺、およびThy-1.2⁺αβ TCR⁺の各T細胞数の割合の変動を対照の無処置B6マウスのそれと比較し% Controlとして表した (Fig. 1)。Thy-1.2⁺αβ TCR⁺細胞は、抗Vβ mAb投与3日後にはいずれもほぼ0%となった。この状態が7日目まで続き、14日目から回復し始め、56日目にはリンパ節、脾では対照の58.0, 59.3%, PBLでは129.7%まで回復した。一方、Thy-1.2⁺細胞は3日目には17.7~36.6% (平均26.1%) まで低下し、14日目から急激に回復が始まった。56日目には、リンパ節、脾で75.0, 78.3%, PBLで119.1%に回復した。リンパ節におけるThy-1.2⁺αβ TCR⁺細胞の回復過程をFCMで解析した (contour plot) のが Fig. 2である。3日目にはThy-1.2⁺αβ TCR⁺細胞がほぼ0%にまで減少するが、7日目にはThy-1.2⁺αβ TCR⁺細胞が出現した。14日目にはThy-1.2⁺αβ TCR⁺が出現した。14日目からThy-1.2⁺αβ TCR⁺細胞が減少しThy-1.2⁺αβ TCR⁺細胞が出現し始め、56日目にはControlのパネルと比較して、かなり正常に近い状態にまで回復しているのが確認できた。

Table 1 Treatment with anti-Vβ mAb and skin allograft survival

Group	Donor	Treatment ^a	Dose	n	Graft survival (days)	MST±SD ^b (days)	P ^c
1.	DBA	Hamster IgG	250 μg Day 0,3,7,10	6	7,8,8,8,8,9	8.0±0.6	
2.	DBA	Hamster IgG	250 μg Every day	6	8,8,8,9,9,9	8.5±0.5	
3.	DBA	anti-Vβ mAb	100 μg Day 0 only	6	7,7,7,10,11,11	8.8±2.0	NS ^d
4.	DBA	anti-Vβ mAb	100 μg Day 0,3,7,10	6	10,11,12,13,13,14	12.2±1.5	<0.001 ^e
5.	DBA	anti-Vβ mAb	250 μg Day 0 only	6	7,8,9,9,9,9	8.5±0.8	NS ^f
6.	DBA	anti-Vβ mAb	250 μg Day 0,3,7,10	6	12,12,13,13,13,14	12.8±0.8	<0.001 ^g
7.	DBA	anti-Vβ mAb	250 μg Every day	6	9,10,10,11,11,11	10.3±0.8	<0.001 ^h

C 57 BL/6 female mice were grafted with female DBA abdominal skin on the posterior-lateral thorax, and injected with either anti-Vβ mAb or Hamster IgG intraperitoneally at each time point. The grafts were inspected daily until rejection (defined as >90% necrosis of the graft).

^aIntraperitoneal injection

^bMST: mean survival time, SD: standard deviation

^cTukey's studentized range test

^{d,f}P values: p=NS for comparisons of group 1 vs. 3,5

^{e,g,h}P values: p<0.001 for comparisons of group 1 vs. 4,6; and for group 2 vs. 7

Fig. 1 Effect of anti-V β mAb on T cell subsets. After single dose (250 μ g) of anti-V β mAb injection, lymphocytes from spleens ($\blacktriangle$), lymph nodes ($\blacksquare$), and peripheral blood ($\bullet$) from two or three mice were pooled respectively, and examined by single-(Thy-1.2 $^{+}$ or $\alpha\beta$ TCR $^{+}$) and two-color (Thy-1.2 $^{+}$ $\alpha\beta$ TCR $^{+}$) flow cytometry. Staining was done with biotinylated anti-V β mAb and streptavidin-coupled phycoerythrin for TCR $\alpha\beta^{+}$ cells: anti-Thy-1.2 mAb and FITC conjugated goat anti-rat IgG for Thy-1.2 $^{+}$ cells. Thy-1.2 $^{+}$, TCR $\alpha\beta^{+}$, and Thy-1.2 $^{+}$ TCR $\alpha\beta^{+}$ cells are plotted as percent control.

3. MLRの変動

抗V β mAbを腹腔内投与したB6マウスの脾臓を、抗体投与後種々の日に摘出、その脾細胞をX線照射したDBA脾細胞と共に培養し脾細胞の増殖反応を観察した(Fig. 3)。2日から5日まで

の混合培養で最大の取り込みを示すのは培養4日から5日であった。5日間混合培養した脾細胞の増殖反応(anti-V β mAb-treated Δ cpm/untreated Δ cpm $\times$ 100)は、抗V β mAb投与により3日目には対照の2.6%まで低下、7、14、28日目でもそれぞれ19.3%、25.5%、12.0%と抑制されていた。その後42日目には、77.6%と急激に回復し始め、56日目には完全に(126.1%)回復した。

4. CMLの変動

脾細胞のP815に対する傷害活性は、E/T=30:1では、抗V β mAb投与後3日目に対照群が81.9%であったのに対し17.2%まで低下した。その後、7日目から28日目の間に7.4%、6.9%、1.3%と抑制が亢進した(対照は86.2%、78.4%、77.7%)。しかし、42日目には、MLR同様CMLも対照群の値にまで急激に回復し(74.2%)、以後、正常の細胞傷害活性を持続した。なお、同系骨髄腫細胞EL-4(H-2 b)に対してはB6細胞は傷害活性を示さなかった(Fig. 4)。

考 察

T細胞リセプターに対するモノクローナル抗体(mAb)は、移植領域ばかりでなく実験的自己免疫疾患の治療や疾病の予防にも種々利用されている。例えば、マウスのexperimental allergic encephalomyelitis(EAE)は、 $\alpha\beta$ TCR $^{+}$ 細胞の中でもV β 8を使用する細胞群が疾病に関与すると言われ、V β 8に特異的なmAbの投与で予防できることが報告されている^{17,18)}。また、マウスのcollagen induced arthritisも特定のV β TCR $^{+}$ 細胞が関与すると言われ、H57を投与しその細胞の働きを抑制すると、発症が予防されることが最近明らかになった¹⁹⁾。

このように疾患の原因が一つに絞られる場合は、mAbの使用で比較的十分な効果を得やすいが、様々な細胞が多様な抗原を認識し拒絶を惹起すると考えられる臓器移植では、単一のmAbで拒絶反応を抑制し臓器の長期生着を期待するのは困難である。さらに、抗体投与によって引き起こされるlympholysisは、免疫系のネットワークに

Fig. 2 Discrimination of Thy-1.2⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells in lymph node after treatment with anti-V β mAb. Two-color FCM was done at weekly intervals on lymph node cells from B 6 mice injected with single dose (250 μ g) of anti-V β mAb. Cells were stained with the same method shown in Fig. 1. A total of 10,000 cells were analyzed in each sample.

破綻を引き起こす結果種々の副作用が生じ、その対策も必要になってくる²⁰⁾。例えば、OKT3 mAb (マウスモデルでは145-2C11)は、CD3の ϵ 鎖に結合し移植片の生着にその効果を発揮するが、発熱、食思不振等の副作用に加えて、長期の生着が得られない等の欠点を持っている²¹⁾。今回使用した抗 V β mAb は、投与の際の注意深い観察にも拘らず、マウスに食思不振など通常の行動を抑制すると思われる副作用は全く認められなかった。

抗 V β mAb はすべての TCR の β 鎖に結合する。抗 V β mAb 250 μ g の一回投与によって、末梢血、リンパ節、脾臓の Thy-1.2⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺細胞は3日目から7日目まで検出困難な状態にまで減少した(Fig. 1)。しかし、Thy-1.2⁺細胞はこの間でも約26%は残存していた。一方、抗 V β mAb 投与後の脾細胞の増殖反応は56日目まで完全に回復するものの、3日目では対照の2.6%、7日目に19.3% (いずれも5日間混合培養)と著しく低下した(Fig. 3)。細胞傷害活性も同様に完全に回復したのは56日目であったが、3日目では17.2%、

7日目では7.4%(E/T=30:1)と低下した(Fig. 4)。このように、抗 V β mAb 100 μ g または250 μ g 一回投与で $\alpha\beta$ TCR⁺細胞は末梢血、リンパ節、脾臓で激減したにも拘らず(Fig. 1)、移植片の生着期間は対照群と有意の差が認められなかった(Table 1, group 3, group 5)。その理由は明らかではないが、測定した組織以外、例えば、移植局所の組織などに残存する $\alpha\beta$ TCR⁺細胞に起因するか、或いは、 $\alpha\beta$ TCR⁺細胞以外の細胞が拒絶に関与する可能性が考えられる。そこで、 $\alpha\beta$ TCR⁺細胞をより完全に除去する目的で、100 μ g または250 μ g 抗 V β mAb を術後3, 7, 10日に投与する群 (group 4, 6) と、250 μ g を毎日投与する群 (group 7) を設けて検討した。いずれも生着期間が、それぞれ12.2 $\pm$ 1.5日 (group 4)、12.8 $\pm$ 0.8日 (group 6)、10.3 $\pm$ 0.8日 (group 7) と延長した($p<0.001$) (Table 1)。手術時に存在している $\alpha\beta$ TCR⁺細胞をも除く目的で皮膚移植1週間前に抗 V β mAb 100 μ g を投与し、更に移植直後から3, 7, 10日目に抗体を追加投与してみたが

Fig. 3 MLR response of anti-V β mAb-treated B 6 splenocytes. Each MLR assay was done at weekly intervals. Responder splenocytes from B 6 mice injected with single dose (250 μ g) of anti-V β mAb (■) and untreated B 6 mice (▨) were cultured with stimulator splenocytes from irradiated B 6 (syngeneic MLR) or DBA (allogeneic MLR) mice for 2 to 5 days. Results are shown as Δ cpm, calculated as allogeneic MLR minus syngeneic MLR.

($n=2$, data 未発表), 移植片は11日目で拒絶され更に延長することはなかった。

抗 V β mAb の頻回投与により, より十分な $\alpha\beta$ TCR $^{+}$ 細胞を除去することで移植片の生着が延長する。従って, 一回投与により移植片の生着の延長が認められなかった機序の一つは, 残存する $\alpha\beta$ TCR $^{+}$ 細胞によるものと思われる。しかし, 抗体を頻回投与したにも拘らず, 4 日以上延長が認められなかった。抗 V β mAb を一回投与したマウスの脾臓細胞では, 投与 3 週間後でも MLR

Fig. 4 CML response of anti-V β mAb-treated B 6 splenocytes. Each CML assay was done at weekly intervals. Effector splenocytes from B 6 mice injected with single dose (250 μ g) of anti-V β mAb (■) and untreated B 6 mice (▨) were tested for their cytolytic reactivity against 51 Cr-labeled P 815 (H-2 d) and EL-4 (H-2 b) targets following 5 days of culture with irradiated DBA splenocytes. None of the mAb-treated splenocytes had significant cytolytic reactivity against syngeneic EL-4 targets.

(Fig. 3) や CML (Fig. 4) は著しく抑制されたままである。この事実からすれば, 術後12日以上生着を期待しても不思議ではない。しかし, 抗体の一回投与によって $\alpha\beta$ TCR $^{+}$ 細胞は測定限界以下になるが, Thy-1.2 $^{+}\alpha\beta$ TCR $^{+}$ 細胞以外の Thy-1.2 $^{+}$ 細胞群は完全に除去されることなく, 26%程度残存する (Fig. 1)。Thy-1抗原陽性細胞は $\alpha\beta$ TCR $^{+}$ 細胞のみでなく, $\gamma\delta$ TCR $^{+}$ 細胞や NK 細胞, 或いは, T 細胞以外の細胞にも認めら

れる²²⁾。移植免疫に関与する免疫系の細胞として、マクロファージ、NK 細胞、 $\alpha\beta$ TCR⁺細胞、 $\gamma\delta$ TCR⁺細胞等があるが、抗原特異的に反応する主たる細胞は $\alpha\beta$ TCR⁺細胞と $\gamma\delta$ TCR⁺細胞である。従って、抗 V β mAb の投与により $\alpha\beta$ TCR⁺細胞の影響をほとんど除外したと思われるマウスでみられる移植片の特異的拒絶は、 $\gamma\delta$ TCR⁺細胞による可能性が考えられる。 $\gamma\delta$ TCR⁺細胞は分布する臓器により使用する V 領域が異なり、マウスでは皮膚や消化管粘膜に多く存在し、ほとんどが Thy-1⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻である^{23,24)}。最近、 $\gamma\delta$ TCR⁺細胞がクラス I、クラス II MHC 拘束性にアロ抗原を認識し、細胞増殖や細胞傷害活性を示すことが明らかにされた^{25,26)}。マウスの皮膚には Thy-1 が陽性で、 $\gamma\delta$ TCR 陽性の樹枝状表皮細胞 (Thy-1⁺DEC) や、抗原提示細胞 (APC) として働くランゲルハンス細胞が存在し、拒絶反応に関与することが知られている²⁷⁻²⁹⁾。従って、抗 V β mAb の頻回投与によって、4 日以上移植片の生着延長が認められなかった機序の一つは、 $\gamma\delta$ TCR⁺細胞による可能性も考えられる。すなわち、抗 $\alpha\beta$ TCR モノクローナル抗体 (抗 V β mAb) の投与によって $\alpha\beta$ TCR⁺細胞の活性を抑制することはできるが、単独投与で長期間にわたる拒絶反応抑制を誘導できなかった原因の一つは、移植片の拒絶反応には、 $\alpha\beta$ TCR⁺細胞以外に、 $\gamma\delta$ TCR⁺細胞や他の未知の細胞が関与することによると思われる。

結 論

抗 $\alpha\beta$ TCR モノクローナル抗体 (抗 V β mAb) を用いて、マウスの同種皮膚移植における拒絶反応抑制効果、および $\alpha\beta$ TCR⁺T 細胞数の割合の変化、機能の抑制、回復過程について検討を行い下記の結果を得た。

1) 抗 V β mAb 100 μ g または 250 μ g を移植当日と 3, 7, 10 日後に投与すると、移植皮膚片は平均 12 日間生着した。これは対照に比べ、4 日間の生着延長である。

2) 抗 V β mAb 250 μ g 一回投与により $\alpha\beta$ TCR⁺細胞は、末梢血、リンパ節、脾で投与 3 日後

から約 1 週間検出困難なレベルにまで減少、以後漸増した。8 週間後、末梢血では細胞数の割合が完全に回復したが、リンパ節、脾では約 60% の回復であった。一方抗 V β mAb 投与マウスの脾細胞は、投与 3 日後から 28 日後まで、MLR や CML の有意な抑制が続くが、8 週間後には完全に回復した。

3) $\alpha\beta$ TCR 特異的抗 V β mAb の投与により、 $\alpha\beta$ TCR⁺細胞が末梢 (末梢血、リンパ節、脾臓) より消失するにも拘らず、移植片の生着に 4 日以上以上の延長が認められないところから、マウスの同種皮膚移植片の拒絶には、 $\alpha\beta$ TCR⁺細胞以外の細胞、特に抗原特異的 $\gamma\delta$ TCR⁺細胞の役割を考慮する必要があるであろう。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った現シンシナチ大学外科 associate professor Douglas W. Hanto M. D. Ph. D. 及び日本医科大学外科学第 2 教室庄司 佑教授、微生物学免疫学教室横室公三教授に深謝いたします。また、ご助言、ご協力いただいた外科学第 2 教室渋谷哲男助教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C.: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, **329**, 506~512, 1987.
- 2) Babbitt, B.P., Allen, P.M., Matsueda, G., Haber, E., and Unanue, E.R.: Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature*, **317**, 359~361, 1985.
- 3) Davis, M.M., and Bjorkman, P.J.: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, **334**, 395~402, 1988.
- 4) Kahan, B.D.: Cyclosporine. *N. Engl. J. Med.*, **321**, 1725~1738, 1989.
- 5) Schreiber, S.L., and Crabtree, G.R.: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today*, **13**, 136~142, 1992.
- 6) Leo, O., Foo, M., Sachs, D.H., Samelson, L.E., and Bluestone, J.A.: Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1374~1378, 1987.
- 7) Kirkman, R.L., Barrett, L.V., Gaueton, G.N., Kelley, V.E., Koltun, W.A., Schoen, F.J., Ythier, A., and Strom, T.B.: The effect of anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody on allograft rejection. *Transplantation*, **40**, 719~722, 1985.

- 8) Isobe, M., Yagita, H., Okumura, K., and Ihara, A.: Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science*, **255**, 1125~1127, 1992.
- 9) Saito, H., Kranz, D.M., Takagaki, Y., Hayday, A. C., Eisen, H.N., and Tonegawa, S.: Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature*, **309**, 757~762, 1984.
- 10) Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S.P., Aleksander, I., and Mak, T.W.: A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature*, **308**, 145~149, 1984.
- 11) Dembic, Z., Haas, W., Weiss, S., McCubrey, J., Kiefer, H., Boehmer, H. and Steinmetz, M.: Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes. *Nature*, **320**, 232~238, 1986.
- 12) Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C.: The T cell receptor/CD3 complex; A dynamic protein ensemble. *Ann. Rev. Immunol.*, **6**, 629~662, 1988.
- 13) Chien, Y., Iwashima, M., Kaplan, K.B., Elliott, J.F., and Davis, M.M.: A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature*, **327**, 677~682, 1987.
- 14) Brenner, M.B., McLean, J., Scheft, H., Riberdy, J., Ang, S., Seidman, J.G., Devlin, P., and Krangel, M. S.: Two forms of the T-cell receptor γ protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, **325**, 689~694, 1987.
- 15) Kubo, R., Born, W., Kappler, J.W., Marrack, P., and Pigeon, M.: Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine $\alpha\beta$ T cell receptors. *J. Immunol.*, **142**, 2736~2742, 1989.
- 16) Billingham, R.E., and Medawar, P.B.: The technique of free skin grafting in mammals. *J. Exp. Biol.*, **28**, 385~402, 1951.
- 17) Acha-Orbea, H., Mitchell, D.J., Timmermann, L., Wraith, D.C., Tausch, G.S., Waldor, M.K., Zamvil, S.S., McDevitt, H.O., and Steinman, L.: Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell*, **54**, 263~273, 1988.
- 18) Urban, J.L., Kumar, V., Kono, D.H., Gomez, C., Horvath, S.J., Clayton, J., Ando, D.G., Sercarz, E.E., and Hood, L.: Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. *Cell*, **54**, 577~592, 1988.
- 19) Moder, K.G., Luthra, H.S., Kubo, R., Griffiths, M., and David, C.S.: Prevention of collagen induced arthritis in mice by treatment with an antibody directed against the T cell receptor $\alpha\beta$ framework. *Autoimmunity*, **11**, 219~224, 1992.
- 20) Reinherz, E.L., Hussey, R.E., and Schlossman, S.F.: A monoclonal antibody blocking human T cell function. *Eur. J. Immunol.*, **10**, 758~762, 1980.
- 21) Hirsch, R., Eckhaus, M., Auchincloss, H., Jr., Sachs, D.H., and Bluestone, J.A.: Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in mice. *J. Immunol.*, **140**, 3766~3772, 1988.
- 22) Kimball, J.W.: The tissues and cells of the immune system. In: *Introduction to immunology*. Macmillan Publishing Company, New York, 1986, 147~149.
- 23) Tonegawa, S., Berns, A., Bonneville, M., Farr, A.G., Ishida, I., Ito, K., Itohara, S., Janeway, C.A., Kanagawa, O., Kubo, R., Lafaille, J.J., Murphy, D.B., Nakanishi, N., Takagaki, Y., and Veebeek, S.: Diversity, development, ligands, and probable functions of $\gamma\delta$ T cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **292**, 53~61, 1991.
- 24) Bonneville, M., Janeway, C.A., Ito, K., Haser, W., Ishida, I., Nakanishi, N., and Tonegawa, S.: Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of $\gamma\delta$ T cells. *Nature*, **336**, 479~481, 1988.
- 25) Matis, L.A., Cron, R., and Bluestone, J.A.: Major histocompatibility complex-linked specificity of $\gamma\delta$ receptor-bearing T lymphocytes. *Nature*, **330**, 262~264, 1987.
- 26) Matis, L.A., Fry, A.M., Cron, R.Q., Cotterman, M. M., Dick, R.F., and Bluestone, J.A.: Structure and specificity of a class II MHC alloreactive $\gamma\delta$ T cell receptor heterodimer. *Science*, **245**, 746~749, 1989.
- 27) Rivas, A., Koide, J., Cleary, M.L., and Engleman, E. G.: Evidence for involvement of the $\gamma\delta$ T cell antigen receptor in cytotoxicity mediated by human alloantigen-specific T cell clones. *J. Immunol.*, **142**, 1840~1846, 1989.
- 28) Koning, F., Stingl, G., Yokoyama, W.M., Yamada, H., Maloy, W.L., Tschachler, E., Shevach, E.M., and Colign, J.E.: Identification of a T3-associated $\gamma\delta$ T cell receptor on Thy-1⁺ dendritic epidermal cell lines. *Science*, **236**, 834~837, 1987.
- 29) Streilein, J.W., Toewes, G.T., Gilliam, J.N., and Bergstresser, P.R.: Tolerance or hypersensitivity to 2,4-dinitro-1-fluorobenzene: The role of Langerhans cell density within epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **74**, 319~322, 1980.

(受付: 1994年2月14日)