原 著

同系蛋白結合 Hg^{2+} 抗原を用いたリンパ球増殖試験 (LPT)

— Hg^{2+} の mitogen 活性の LPT への影響回避に関する研究—

大 安 努

長崎大学大学院歯学研究科 (指導: 藤井弘之教授)

[受付: 平成 7 年 9 月 29 日, 受理: 平成 7 年 12 月 11 日]

Lymphocyte proliferation test (LPT) using the isogenic protein bound Hg^{2+} antigen
—Studies to avoid the influence of the mitogenic activity of Hg^{2+} to LPT—

Tsutomu Daian

Nagasaki University, Graduate School of Dentistry

(Director: Prof. Hiroyuki Fujii)

1-7-1, Sakamoto, Nagasaki 852, Japan

[Received on September 29, 1995; Accepted on December 11, 1995]

Key words: mitogenic response/mercury/metal allergy/*in vitro* examination/epidermal protein bound Hg^{2+}

Abstract: A study was made concerning suppression of mitogenic activity of Hg^{2+} in lymphocyte proliferation test (LPT). Three kinds of antigens, i. e. Hg^{2+} , epidermal protein bound Hg^{2+} and fractionated epidermal protein bound Hg^{2+} was prepared, and the proliferative activity between sensitized lymphocytes and non-sensitized lymphocytes was examined. There was no significant difference in the proliferative response to Hg^{2+} antigen between sensitized lymphocytes and non-sensitized lymphocytes.

The proliferative response of sensitized lymphocytes to epidermal protein bound Hg^{2+} antigen was significantly increased than the non-sensitized lymphocytes' response or the response in control cultures in RPMI 1640 alone.

The proliferative responses of sensitized lymphocytes to four kinds of fractionated epidermal protein bound Hg^{2+} antigens were specifically increased, while, a slight fluctuation among antigens was observed.

These findings suggested that the influences of the mitogenic activity of Hg^{2+} could be avoided by using the isogenic protein bound Hg^{2+} antigen in LPT.

抄録: Hg^{2+} アレルギーの検査に感作リンパ球の抗原特異的増殖試験 (LPT) を用いるに当たって問題となる Hg^{2+} 自体の mitogen 活性の抑制に関する実験を行った。 Hg^{2+} で感作したマウスを用いて, Hg^{2+} , 水銀結合表皮蛋白, 分画した水銀結合表皮蛋白の 3 種類の抗原を調製し, 感作リンパ球と非感作リンパ球の増殖活性を比較検討し, 以下の結果を得た。

Hg^{2+} を抗原として利用した場合, 感作リンパ球と非感作リンパ球の増殖の間には差が認められなかった。

ホモジネートした水銀結合表皮細胞を抗原にした場合, 感作リンパ球の増殖反応は非感作リンパ球の増殖反応

および感作リンパ球のコントロール (RPMI 1640 のみ) 培養での増殖反応よりも有意に高くなった。

分画した水銀結合表皮細胞を抗原にした場合、すべての画分に対して感作リンパ球は特異的に増殖したが、画分間の差は認められなかった。

以上より、 Hg^{2+} の mitogen 活性の LPT への影響は、水銀を同系の蛋白と結合させたハプテン・キャリアー結合体を抗原とすることにより回避できることが示された。

緒 言

難治性で、再発を繰り返す口内炎や皮膚炎などの一部に金属アレルギーがある¹⁾。現在、金属アレルギーが疑われる場合、感作の有無の判定にはパッチテストが広く用いられている。しかし、*in vivo* で行うパッチテストにはいくつかの弱点も指摘されている²⁾。

そこで、生体外での *in vitro* 検査の実施が可能になれば、その臨床的意義は低くない。金属アレルギーの反応の成立にはリンパ球が主要な役割を演じている³⁾。このことは、リンパ球を検査の対象にすれば、*in vitro* で感作の有無を判定できる可能性があることを示唆している。すでに、リンパ球を刺激、分裂促進する作用がないとされる Co, Au などの金属イオンを用いたリンパ球増殖試験 (lymphocyte proliferation test, 以下 LPT と略) に関する報告はいくつかあり⁴⁻⁷⁾、Ni に関する本法の診断価値は最近になって高く評価される傾向にある⁸⁾。しかし、他の金属イオンに対するリンパ球増殖試験の術式はまだ未完成の段階である。特にわが国で感作率が高いとされている水銀など一部の金属イオンは、それ自体がリンパ球分裂促進因子 (mitogen) であり⁹⁻¹⁰⁾、このことが金属アレルギーの *in vitro* 検査の実用化を妨げる一つの原因となっている。

一方、金属イオンは分子量が小さく、それ自体では免疫原性を持たない不完全抗原、いわゆるハプテン¹¹⁾である。しかし、これが特定の担体蛋白と結合してハプテン・キャリアー結合体となると感作能を持つようになる¹²⁾とされている。このことは、mitogenic な作用を持つ金属イオンにあらかじめ蛋白を結合させておけば、その作用もまた変化する可能性があることを示唆している。

本研究の目的は、水銀の mitogenic な作用が、蛋白と結合することにより、どのように変化するのかを検討することである。

材料および方法

1. リンパ球の分離

1) 水銀感作マウスの作製

実験に供した動物は6週齢の雌の Balb/c マウスで、操作はジエチルエーテル麻酔下で行った。

水銀感作リンパ球は、寺野ら¹³⁻¹⁴⁾が作製した水銀感作マウスより分離した。まず、マウスの腹部体毛を除去し、5% HgCl_2 と金属イオン浸潤補助剤としての1%ラウリル硫酸ナトリウム (以下 SLS と略) を混和した白色ワセリンを同部に約 25 mg 塗布後、絆創膏で固定し、さらにその上をテープで保護した。このグループを paint 群 (5匹) とした。水銀塗布7日後に保護テープを全て除去し、フリーの HgCl_2 を除去するために腹部を70%エタノールで拭いた。なお、腹部に1%SLSのみを混和した白色ワセリンを約 25 mg 塗布したグループをコントロール群 (5匹) とした。テープ除去2日後、マウスの左側耳翼の厚さを定圧下 (ミットヨ社製マイクロメーター) で計測した後、1.5% HgCl_2 を溶解した97%エタノールを左側耳翼に塗布した。さらに24, 48, 72時間後に同部の厚さを前述した方法で計測 (mouse ear swelling test, MEST¹⁵⁻¹⁶⁾) した。この実験を6回繰り返し、各群30匹の耳翼厚さの変化を、分散分析法の時系列データの解析法¹⁷⁾を用いて検定した。

2) リンパ球の分離

頸椎脱臼により屠殺した上記1)のマウスから、滅菌したピンセットで脾臓を取り出し、これをPRMI1640培地中に浮遊させた。RPMI 1640を滴下しながらステンレスメッシュで脾臓をほぐしたあと、遠沈管に入れた5 ml/Ficoll-Conray 液 (Ficoll-Paque: Pharmacia, New Jersey, U. S. A.) の上に静かに重層し、200 g, 30分間遠心した。中間層のリンパ球層をパスツールピペットで静かに採取し、10 ml RPMI 1640中に混和し、200 g, 10分間遠心した。その後、細胞のペレットをRPMI 1640でよく洗い、150 g, 10分間遠心し、この操作を2回繰り返した。最後に10%ウシ胎児血清を加えたRPMI 1640中に沈渣を浮遊させ、細胞数を $5.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ にした。細胞数の測定は、トリパンブルー溶液で染色後、血球計算盤上で行った。

2. 抗原の調製

1) Hg^{2+}

HgCl_2 を PRMI1640 培地に溶解し、0.5, 1.0, 5.0,

10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0 μM の水銀濃度に調製した。

2) 水銀結合表皮蛋白

後述のリンパ球増殖試験 1 回当たり 5 匹, 計 25 匹のマウスを用いて, 以下の通り水銀結合蛋白を調製した。

(a) 水銀塗布表皮の採取

マウスの尾の皮膚にワセリン基剤の 5% HgCl_2 を塗布後, 24 時間¹⁸⁾で頸椎脱臼により屠殺した。70%エタノールで尾全体をよく拭いた後, 尾を切断し, 多量の石油ベンジンとイオン交換水で洗浄してフリーの水銀を除去した。

次に, Steinmuller と Wunderlich¹⁹⁾ の方法に従い, 尾の先端まで縦切開を入れ, 皮膚を引き剥がした。その皮膚を filter paper 上で半分に横断し, 0.5% trypsin in HBSS (ハンクス平衡塩) 溶液中に浮遊させた。これを 37°C で 60~80 分培養後, 皮膚片を dry filter paper 上に真皮側を上にして平らに置き, ゆるんだ真皮をピンセットを用いて除去した。

(b) 表皮細胞のホモジナイズ

5 匹分の表皮に対して, 10 ml の RPMI 1640 培地を加え, Potter-Elvehjem's homogenizer でホモジナイズし, ナイロンメッシュでろ過した。一部を抗原原液 ($\times 1.0$) として保存し, 残りを RPMI 1640 培地で抗原含有量が $\times 0.8, \times 0.6, \times 0.4, \times 0.2$ になるように希釈した。

(c) 試料中の水銀量と蛋白量の測定

水銀量は原子吸光度計を用いて分析²⁰⁾, 測定した。試料を還元・気化法により処理し, それから原子吸光度計 (HITACHI Co. Ltd, Tokyo, Japan) を用いて水銀濃度を測定した。水銀量はこの濃度の値から計算により求めた。

また, それぞれ蛋白量は, Lowry らの方法²¹⁾に従い測定した。

3) 画分別水銀結合表皮蛋白

上記と同様の操作で得られた水銀結合表皮蛋白を Figure 1 に示す方法で, 遠心して, precipitate (ppt)-1 (核画分), ppt-2 (ミトコンドリア画分), ppt-3 (ミクロソーム画分), supernatant (sup)-3 (可溶性画分) の 4 つの画分に分画した。遠心には, 日立社製 refrigerated centrifuge と ultracentrifuge を用いた。なお, 各画分の水銀量を一定にするため, LPT の前に各抗原の水銀濃度を測定して, RPMI 1640 培地でそれぞれ希釈した。

3. リンパ球増殖試験とその評価

感作リンパ球と非感作リンパ球を 96 穴マイクロプレートに各穴にそれぞれ 150 μl ずつ分注し, 前記 2. で

Fig. 1 Experimental procedure for the fractionation of homogenized epidermal cells of mice.

ppt : precipitate, sup : supernatant

調製した抗原を 50 μl ずつ添加し, 37°C で 6 日間培養した。リンパ球増殖の評価は MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, 同仁化学研究所, 熊本) assay^{22~25)} により行った。すなわち, 培養終了 6 時間前に, MTT 試薬を各 well に 10 μl ずつ加え, 培養終了後, 形成された MTT-ホルマゼンを acid-isopropanol で溶解し, ELISA reader を用いて比色定量し, それぞれの optical density (O. D.) を求めた。その後, O. D. 値から stimulation index (S. I.: 抗原添加検体 O. D./抗原無添加検体 O. D.) を算出し, 前述した分散分析法¹⁷⁾で増殖の程度を検定した。なお, 各抗原当たり 5 回のリンパ球増殖試験を繰り返した。

結 果

1. マウスの水銀感作

MEST の結果, 耳翼厚さの増加量は, 全計測時点を通じて paint 群の方がコントロール群に比べて有意に大きかった ($P = 0.0066$)。しかし, 両群の経時的変化に有意差は認められなかった ($P = 0.2882$) (Fig. 2)。

2. Hg^{2+} に対するリンパ球の応答

Figure 3 に, Hg^{2+} に対する感作リンパ球と非感作リンパ球の反応を示した。低濃度 (0.5~1.0 μM) での増殖傾向と, 高濃度 (5.0~100 μM) での抑制傾向がみられた。しかし, 今回設定した Hg^{2+} 濃度では, 感作リンパ球と非感作リンパ球の増殖活性に有意な差は認められなかった。

3. 水銀結合表皮蛋白に対するリンパ球の応答

Table 1 に, 用いた抗原の蛋白量と水銀濃度の測定結果を示した。

Figure 4 に, 感作リンパ球と非感作リンパ球の水銀結

Fig. 2 The changes of increase in mouse's auricula thickness during the period of mouse ear swelling test (MEST).

95% C. L. : confidence limits at 95% level.

(●) : paint group, (□) : control group.

Table 1 The amount of the protein and the concentration of Hg^{2+} in Hg^{2+} -epidermal protein antigen.

rate of dilution for Hg^{2+} -epidermal protein	amount of protein (mg/ml)	conc. of Hg^{2+} (μM)
$\times 1.0$	0.39	0.89
$\times 0.8$	0.31	0.71
$\times 0.6$	0.23	0.53
$\times 0.4$	0.16	0.36
$\times 0.2$	0.08	0.18

合表皮蛋白に対する LPT の結果を図示した。リンパ球群別にみて、水銀結合表皮蛋白抗原に対する感作リンパ球の増殖応答（全抗原濃度に対する平均値）は、コントロール（RPMI 1640）に対する増殖応答（破線）と比較して、有意に大きくなった（ $P < 0.05$ ）。また、この水銀結合表皮蛋白抗原に対する感作リンパ球の増殖応答は、非感作リンパ球の増殖応答に比較しても有意に大きかった（ $P = 0.0002$ ）。

しかし、感作リンパ球および非感作リンパ球ともに、濃度間にリンパ球増殖応答の有意差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）（Fig. 5）。

4. 画分別水銀結合表皮蛋白に対するリンパ球の応答

Figure 6 は、分画した水銀結合表皮蛋白に対する感作リンパ球と非感作リンパ球の増殖応答を分析した結果である。4 画分ともに、感作リンパ球の増殖応答は非感作リンパ球のそれより有意に大きかった（いずれも $P < 0.001$ ）。しかし、感作リンパ球および非感作リンパ球の増殖応答に画分別有意差は認められなかった（ $P >$

Fig. 3 Proliferative responses of murine splenocytes to Hg^{2+} . Stars show statistically significant difference between control and corresponding bar ($P < 0.05$).

Stimulation Index (S.I.) : the optical density in each culture per that in medium alone culture. Interrupted line shows S.I. to RPMI 1640 alone control.

The mean of the optical density in RPMI 1640 alone culture was 0.253.

(■) : sensitized group. (▨) : non-sensitized group.

Fig. 4 Proliferative responses of splenocytes from Hg^{2+} -sensitized (■) and -nonsensitized (▨) mice. Interrupted line shows S.I. to RPMI 1640 alone control.

The mean of the optical density in RPMI 1640 alone culture was 0.224.

95% C. L. : confidence limits at 95% level.

Fig. 5 Proliferative responses of splenocytes from Hg^{2+} -sensitized (■) and -nonsensitized (▨) mice. Interrupted line shows S. I. to RPMI 1640 (control). The mean of the optical density in RPMI 1640 alone culture was 0.224.

Table 2 The amount of the protein and the concentration of Hg^{2+} in fractionated Hg^{2+} -epidermal protein antigens.

	amount of protein (mg/ml)	conc. of Hg^{2+} (μM)
Hg^{2+} -nuclei fractions	0.438	0.52
Hg^{2+} -mitochondrial fractions	0.445	0.52
Hg^{2+} -microsomal fractions	0.460	0.52
Hg^{2+} -soluble fractions	0.792	0.52

0.05)。

Table 2 に、使用した抗原の蛋白量と水銀濃度の測定結果を示した。

考 察

Hg^{2+} や Zn^{2+} など一部の金属イオンはリンパ球を分裂促進する作用を持つ (mitogen) とされている。Reardon らは²⁶⁾、Balb/c mice のリンパ球 (5×10^6 cells/ml) を用いて、 Zn^{2+} と Hg^{2+} に対する mitogenic response を評価した。彼らは、144 時間培養した場合、 Zn^{2+} は $200 \mu M$ で、 Hg^{2+} は $10 \mu M$ で最もリンパ球を増殖させ、 Zn^{2+} は $800 \mu M$ 、 Hg^{2+} は $10 \mu M$ より高い濃度で toxic effect がみられたと報告している。 Hg^{2+} を抗原として LPT を

Fig. 6 Proliferative responses of splenocytes from Hg^{2+} -sensitized (■) and -nonsensitized (▨) mice. Interrupted line shows S. I. to RPMI 1640 (control). The mean of the optical density in RPMI 1640 alone culture was 0.291.

行った今回の実験では、 $0.5 \sim 1.0 \mu M$ で mitogen 作用によると思われる S. I 値の上昇と、 $5.0 \sim 100 \mu M$ で toxic effect によると思われる S. I 値の下降がみられた (Fig. 3)。この傾向は感作リンパ球も非感作リンパ球も同様であった。

Hg^{2+} の mitogen 作用のメカニズムについて、Nordlind ら²⁷⁾ および Holst ら²⁸⁾ は、アイソトープをラベルした $^{203}HgCl_2$ を用い、 Hg^{2+} が細胞接触 15 分後には細胞膜に結合していること、96 時間後に核への取り込みが最も高く、細胞増殖の調節に重要である non-histon phosphoprotein に Hg^{2+} が見い出せることから、DNA 合成に対する影響に注目している。筆者ら¹⁸⁾ も、マウス皮膚に塗布された Hg^{2+} の表皮細胞内蓄積量は、塗布 12 時間後まで増加し、その後は少なくとも 18 時間その状態を保つこと、および表皮細胞中の単位蛋白当たりの水銀結合量は、核画分に最も多い傾向があったことを報告した。また、Reardon ら²⁶⁾ は、lectin mitogen や sulfhydryl-binding hapten と同様に、 Hg^{2+} が自己の細胞膜表面構造物であるクラス I、クラス II 抗原を修飾し、これを他の膜の膜表面構造物と結合させて、自己構造物を変化させた結果、T リンパ球がこれを非自己と認識する可能性を指摘している。このように、 Hg^{2+} のリンパ球刺激機序に関する仮説はいくつかあるが、まだ実態は解明されて

いない。

一方、Helber-Katz ら³⁰⁾は、MHC (major histocompatibility complex) に拘束されたT細胞の抗原認識機構として、T細胞抗原レセプター、自己のMHC、抗原の三分子複合体モデルを提案した。これらの報告から、 Hg^{2+} に同系の蛋白を結合させたハプテン・キャリアー結合体を抗原とすることにより、 Hg^{2+} の mitogen 作用が抑制でき、水銀感作リンパ球が特異的に増殖するのではないかと考え、同系マウスの蛋白(表皮細胞)に Hg^{2+} を結合させたハプテン・キャリアー結合体を抗原として LPT を行った。分析の結果、この抗原に反応した感作リンパ球の増殖応答は非感作リンパ球の応答、およびコントロール(RPMI 1640のみ)培養でのリンパ球の増殖よりも有意に高いことが分かった(Fig. 4)。このことは、水銀を結合させた同系の蛋白を抗原として利用することにより、水銀の mitogenic な作用が抑制され、感作リンパ球が特異的に増殖したことを示している。

Hg^{2+} は蛋白分子のいたるところに存在する SH 基(sulfhydryl group) に容易に結合するといわれている³¹⁻³⁴⁾。本実験でも、感作リンパ球と非感作リンパ球間の増殖応答が、 Hg^{2+} のみを抗原とした場合と、今回調製した水銀塗布マウス表皮細胞抗原の場合で異なり(Fig. 3, 4)、分画しても各画分に Hg^{2+} が存在していたことが明らかである(Table 2)。これらのことから、直接的証拠はないが、本実験のマウス尾部水銀塗布で Hg^{2+} と表皮蛋白がハプテン・キャリアーを形成した可能性は高いと考えた。

一般に、リンパ球の増殖に深く関連していると考えられているヘルパーT細胞(T_H)は、MHC クラスII分子に結合した抗原を認識するといわれている³⁵⁾。Nishioka ら³⁶⁾は、TNClB (trinitrochlorobenzene) 感作マウスのリンパ節細胞に、トリニトロフェニル化(TNP)した表皮細胞の抽出物を含むリボソームを反応させ、リボソーム上のハプテン化された分子とI a 抗原は、マクロファージの存在下でTリンパ球を特異的に刺激することを示した。Yokozeki ら³⁷⁾は、*in vivo* で、トリニトロフェニル化した表皮細胞を組み込んだリボソームをマウスに皮下注射あるいは腹腔内注射すれば接触アレルギーの発生率が高くなることから、表皮細胞におけるI a 抗原が接触アレルギーの誘導に重要な役割を果たしていると指摘している。MHC クラスII抗原は健全な重層扁平上皮細胞には観察されないが、生体内外環境からの侵襲刺激による炎症病態下では扁平上皮細胞にも産生、発現されるといわれている³⁸⁻³⁹⁾。今回 LPT に使用した水銀結合表皮細胞においても同様のことが起こっている可能

性がある。また、この水銀結合表皮中の抗原提示細胞(ランゲルハンス細胞等)の免疫刺激活性がコントロールと比較して亢進していた可能性も考えられる。

抗原刺激により MHC クラスII抗原が発現し、それと Hg^{2+} が結合し、この複合体をT細胞が認識して増殖活性が高まっているとすれば、ほとんどが膜状構造物であるミクロソーム画分⁴⁰⁾と Hg^{2+} の結合体はより特異的に水銀感作リンパ球を増殖させる可能性もある。そこで、ホモジナイズした水銀結合表皮細胞を遠心分離により4つの画分(核画分、ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分、可溶性画分)に分けて、それぞれを抗原として LPT を行った。その結果、すべての画分に対して感作リンパ球は特異的に増殖したが、画分間の差は認められなかった(Fig. 7)。このことは、ミクロソーム画分だけでなく全ての画分に MHC クラスII抗原が発現した可能性、あるいは、調整したリンパ球浮遊液中に混入したマクロファージの MHC クラスII抗原が機能した可能性を示唆している。

今後、感作リンパ球を特異的に増殖させる至適条件の特定や、 Hg^{2+} 以外の mitogenic な性質を持つ金属イオンへの応用を検討したい。

結 論

Hg^{2+} の mitogen 活性の影響を受けにくい LPT の開発を目的に本実験を計画した。マウスを用いて、 Hg^{2+} 、水銀結合表皮蛋白、分画した4種の水銀結合表皮蛋白の抗原を調製し、感作ならびに非感作マウスの脾リンパ球の増殖応答を比較検討し、以下の結果を得た。

1. Hg^{2+} を抗原として利用した場合、感作リンパ球と非感作リンパ球の増殖の間には差が認められなかった。

2. 水銀結合表皮蛋白を抗原にした場合、感作リンパ球の増殖反応は非感作リンパ球の増殖反応およびコントロール(RPMI1640のみ)培養での増殖反応よりも有意に高くなった($P=0.0002$)。

3. 分画した4種の水銀結合表皮蛋白を抗原にした場合、リンパ球の増殖反応において、画分間の差は認められなかった。

4. 以上より、 Hg^{2+} の mitogen 活性の LPT への影響は、水銀を同系の蛋白と結合させた、ハプテン・キャリアー結合体を抗原とすることにより回避できることが示された。

稿を終えるにあたり、終始ご指導とご校閲を賜わりまし

た長崎大学歯学部歯科補綴学第二講座 藤井弘之教授に深甚の謝意を表します。また、本研究に多大のご援助、ご教示をいただいた本学口腔細菌学講座 山田 毅教授、前本学歯科補綴学第二講座 浪越建男博士、本学口腔外科学第一講座 富永尚宏博士に深謝致します。また、実験機器や施設を一部利用させていただき、さらに種々ご協力下さった本学口腔細菌学講座、本学口腔外科第一講座、本学歯科薬理学講座、本学医学部附属動物実験施設、本学歯科補綴学第二講座の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) 中山秀夫：金属アレルギー，皮膚と免疫・アレルギー—その基礎から臨床まで—(谷奥喜平編)：355～369，金原出版，東京，1974.
- 2) 浪越建男：いわゆる金属アレルギーに関する研究，テーシス，長崎大学大学院歯学研究科：60～65，1991.
- 3) 菊池由生子：免疫反応による組織障害—アレルギー—，医科免疫学(菊池浩吉編)，第3版，：353～374，南江堂，東京，1991.
- 4) Silvennoinen-Kassinen, S and Niinimäki, A. : Gold sensitivity blast transformation, Contact Dermatitis. **11** : 156～158, 1984.
- 5) Al-Tawil, N.G., Marcusson, J. A. and Möller, E. : Lymphocyte stimulation by trivalent and hexavalent chromium compounds in patients with chromium sensitivity. Acta Dermato-Venerol. **63** : 296～303, 1983.
- 6) Al-Tawil, N.G., Marcusson, J. A. and Möller, E. : T and B lymphocytes in patients with nickel sensitivity, Scand. J. Immunol. **22** : 495～502, 1985.
- 7) Vein, N.K. and Svejgaard, E. : Lymphocyte transformation in patients with cobalt dermatitis, Brit. J. Dermatitis. **99** : 191～196, 1978.
- 8) 和田 攻, 沢本 豊, 郭 新彪：金属アレルギー(5 ニッケルとスズ)，アレルギーの臨床 **9** : 874, 1989.
- 9) Nordlind, K. and Henze, A. : Stimulating effect of mercuric chloride and nickel sulfate on DNA synthesis of thymocytes and peripheral blood lymphocytes in children, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **73** : 162, 1984.
- 10) Caron, G. A., Poutala, S. and Provost, T. T. : Lymphocyte transformation induced by inorganic and organic mercury. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **37** : 76, 1970.
- 11) 藤本重義：IV型アレルギー，免疫学イラストレイテッド(多田富雄監訳)，第2版：295～304，南江堂，東京，1990.
- 12) 石井良文，菊池浩吉：抗原と抗原性，医科免疫学(菊池浩吉編)，第3版：87～100，南江堂，東京，1991.
- 13) 寺野元博，大安 努，浪越建男，中村 茂，菅 浩二，近藤麻里，藤原 勲，藤井弘之：水銀感作マウス作製の検討，補綴誌 **37**，89 回特別号：158，1993.
- 14) 寺野元博，大安 努，中村 茂，菅 浩二，小池麻里，藤原 勲，南 二郎，藤井弘之：水銀感作マウス作製について—感作法の検討—補綴誌 **38**，92 回特別号：193，1994.
- 15) Thorne, P. S., Hawk, C., Kaliszewski, S. D. and Guiney, P. D. : The noninvasive mouse ear swelling assay. I. Refinements for detecting weak contact sensitizers. Fund. Appl. Toxicol. **17** : 790～806, 1991.
- 16) Vreeburg, K. J., Groot, K., Hoogstraten, I. M., Blomberg, B. M. and Scheper, R. J. : Successful induction of allergic contact dermatitis to mercury and chromium in mice. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **96** : 179～183, 1991.
- 17) 田口玄一：27 時系列データの解析法，実験計画法(下)，第3版：765～800，丸善，東京，1977.
- 18) Daian, T., Namikoshi, T. and Fujii, H. : Intracellular Distribution of Hg^{2+} applied to epidermis in Mice. Analysis of Subcellular Fractions. J. Dermatol. Sci. in press.
- 19) Steinmuller, D. and Wunderlich, J. R. : The Use of Freshly Explanted Mouse Epidermal Cells for Cell-Mediated Cytotoxicity, Cell Immunol **24** : 146～163, 1976.
- 20) 産業公害防止協会：公害防止の技術と法規：361～364，丸善，1990.
- 21) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193** : 265～275, 1951.
- 22) 菅原 勇，石坂重昭，辻井 正，西山利正：MTT アッセイ—細胞増殖能および細胞障害試験に応用可能な迅速比色定量法，医学のあゆみ **128**，11 : 733～735，1984.
- 23) 葛西正孝，疋田一郎，徳永 徹：MTT アッセイを用いた T 細胞増殖の測定，Medical Immunology. **12**，3 : 411～415，1986.
- 24) Slater, T. F., Sawyer, B. and Sträuli, U. : Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts, Biochem. Biophys. Acta **77** : 383～393, 1963.
- 25) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol.

- Methods. **65** : 55~63, 1983.
- 26) Reardon, C. L. and Lucas, D. O. : Heavy-metal mitogenesis : Zn^{++} and Hg^{++} induce cellular cytotoxicity and interferon production in murine T lymphocytes. *Immunobiol.* **175** : 455~469, 1987.
- 27) Nordlind, K. : Binding and uptake of mercuric chloride in human lymphoid cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **77** : 405, 1985.
- 28) Holst, M. and Nordlind, K. : Phosphorylation of nuclear proteins of peripheral blood T lymphocytes activated by nickel sulfate and mercuric chloride. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **85** : 337, 1988.
- 29) 池澤義郎, 大沢純子, 北村和子, 杉山真理子, 勝村芳雄, 針谷 毅 : 金属アレルギーの発症機序. 皮膚 34 巻増刊 14 号 : 59~65, 1992.
- 30) Heber-Katz, E., Hansburg, D. and Schwartz, R. H. : The Ia molecule of the antigen-presenting cell plays a critical role in immune response gene regulation of T cell activation. *J. Mol. Cell Immunol.* **1** : 3~14, 1983.
- 31) Nwokoro, N. A. and Schachter, H. : L-fucose metabolism in mammals. Kinetic studies on pork liver 2-keto-3-deoxy-L-fuconate : NAD+ oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **250** : 6191~6196, 1975.
- 32) Chao, E. S. and Frenkel, G. D. : Studies on the Mechanism of the Stimulation of Polymerase II-catalyzed RNA Synthesis by Mercury Compounds. *J. Biol. Chem.* **258** : 9861~9866, 1983.
- 33) Reddy, C. C. and Massaro, E. J. : Biochemistry of selenium : a brief overview. *Fundamental Appl. Toxicol.* **3** : 431~436 (1983).
- 34) Chavez, E., Zazueta, C., Osornio, A., Holgun, J. A. and Miranda, M. E. : Protective Behavior of Captopril on Hg^{++} -Induced Toxicity on Kidney Mitochondria. *In Vivo and In Vitro Experiments.* *J. Pharmacol. Experimental Therapeu.* **256** : 385~390, 1991.
- 35) 佐藤英俊 訳 : 免疫応答の細胞間相互作用. 抗原提示と免疫刺激. 第3版 : 8~9, 南江堂, 東京, 1992.
- 36) Nishioka, K., Funai, T., Yokozeki, H. and Katayama, I. : Induction of hapten-specific lymphoid cell proliferation by liposome-carrying molecules from haptenated epidermal cells in contact sensitivity. *J. Invest. Dermatol.* **83** : 96~100, 1984.
- 37) Yokozeki, H., Nishioka, K., Katayama, I., Takijiri, C. and Hashimoto, K. : Induction and suppression of contact sensitivity by liposomes carrying molecules from haptenated epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* **84** : 33~36, 1985.
- 38) Takeuchi, Y., Tonai, I., Kaneda, T. and Nagura, H. : Immunohistochemical analysis of cell in mucosal lesion of lichen planus. *J. Oral Pathol.* **17** : 367~373, 1988.
- 39) 糸原重美, 小林邦彦, 塩原哲夫, 名倉 宏, 安保 徹, 南野昌信, 小林 繁 : 生体防御の最前線—消化管に集結するリンパ球の謎—(石川博通編), 第1版 : 78~79, 菜根出版. 東京, 1994.
- 40) Nishioka, K., Aoki, T., Nishioka, K. and Tashiro, M. : Studies on carrier substances of DNCB contact allergy. *Dermatologica.* **142** : 232~240, 1971.