

の発現レベルについて検討したところ、若齢と老齢マウスにおける LC 密度、またその表面抗原の発現に有意な差は認められなかった。そこで次に角質層破壊に伴い経時的に得られる表皮 LC 密度を表皮シートの抗 Ia^b 抗体を用いた染色によって、また表面抗原の発現レベルをそこから得られる表皮細胞浮遊液を抗 H-2K^b, 抗 Ia^b, 抗 CD40, 抗 CD54, 抗 CD80, 抗 CD86 抗体を用い染色したもののフローサイトメトリー分析により検討した結果、若齢マウスでは耳翼のテープストリッピングを 8 回行うと 12~24 時間で LC のリンパ節への移動が最大になるのに対し、高齢マウスでは 4 回のテープストリッピングで 12~24 時間後に LC の移動が最大となった。高齢マウス耳翼を 8 回テープストリッピングすると LC の密度が急激に減少する。このことは過剰なテープストリッピングによる表皮の破壊が起こっていると解釈できた。さらに、若齢マウス耳翼の 8 回テープストリッピングにより活性化した LC はその約 30% が H-2K^b, Ia^b, CD40, CD54, CD80, CD86 の発現を高めるが、老齢マウス耳翼の 4 回テープストリッピングで得られる LC も同様の割合でそれぞれの表面抗原の発現を増強させることが判った。

次に、若齢マウスと高齢マウスの耳

翼をそれぞれ 8 回と 4 回テープストリッピングし、24 時間後に TRP-2 ペプチドを塗布し免疫マウスを作製し、B16 細胞を皮下移植した時のがん細胞の増殖について検討した。結果、TRP-2 免疫若齢マウスでは B16 細胞の増殖が非常に抑制されるが、TRP-2 免疫高齢マウスでの B16 細胞の増殖は、対照として行った免疫無しのマウス内での B16 増殖よりは明らかに弱くなるものの、TRP-2 免疫若齢マウスで得られる B16 細胞の増殖抑制に比べるとその効果は優位に低いことが判明した。

以上の結果より、老齢マウスでの皮膚表皮 LC の密度及び表面抗原の発現は若齢マウスとほとんど変わらないものの、CTL 感作能という点に関しては若齢マウスより劣る可能性と、表皮 LC の機能は高齢マウス LC と若齢マウス LC とでは同程度であるが、老齢マウスでは感作される側のリンパ球の機能低下により、効果的な CTL 感作が妨げられているものと考えられた。

考 察

ヘルペスウイルスのように潜在的に感染しているウイルスについては、それに特異的な CTL の頻度が既に高いので、この方法は大変効果的なワ

ワクチン法となるに違いないが、癌治療においてはより特異的 CTL 頻度の高い癌抗原ペプチドの選択が治療効果を高める大きな要因となるであろう。以前の我々の研究でこの方法は Th 細胞をも強く感作できることが証明されている。さらに CTL は Th 細胞の助けにより、より強く感作されることが判明しているため、CTL 特異的ペプチドと共に Th 細胞特異的ペプチド（特に Th1 細胞特異的ペプチド）を併用して塗布すればより高いワクチン効果が得られるかもしれない。また一種類のペプチドよりも数種類のカクテルの方がより効果的であるといわれているので、HSV ワクチンであれば HSVgpB ペプチドの他のエピトープペプチドを同定し、それらを混ぜた抗原液のハリア破壊皮膚への塗布はより高い HSV 特異的 CTL 感作が期待できるかもしれない。これまでに行なわれている単離培養により得られる樹状細胞を用いたウイルスワクチン法やがん治療法の研究を見ると、ペプチド単独のパルスよりも heat shock protein (HSP) を結合させたペプチドまたは抗原遺伝子を組み込んだベクターをパルスした方が樹状細胞はより効果的に CTL へ抗原提示することか判っているため、HSP-ペプチド複合体または抗原 DNA をテープストリッピング皮膚に塗布

すればより強く CTL を感作できるかもしれない。

皮膚角質層破壊と LC 機能のマウスを用いた研究から、LC を効果的に活性化するための角質層破壊の回数は、年齢によりだいぶ異なるようである。我々は年齢の異なる種々のヒト皮膚を用いてテープストリッピング実験も既に行っているが、ヒトでもマウス同様角質層破壊の程度は年齢によってだいぶ異なるようだ。CD54 を指標として、LC 活性化の最も効果的なテープストリッピング回数は、30～40歳で8回で、それ以上では4回位であった。今後我々の開発した皮膚を介した免疫法をヒトで応用するためには、そのヒトの年齢に合った角質層破壊法の選択が重要となるに違いない。

結 論

MHC クラス II-K^b 分子に結合し CTL を誘導できることが知られている HSVgpB, VSVNP, TRP-2, MUT1, OVA ペプチドを、テープストリッピングにより角質層除去した皮膚へ塗布した場合、角質層除去後 12-24 時間で塗布した時に最も強く近傍リンパ節内においてそれらペプチドに特異的な CTL が感作された。テープストリッピング B6 マウス耳翼によるペプチド塗布を行った2週間後に、同

マウステープストリッピング腹部による同じペプチド処理を行うと、全身でペプチド特異的 CTL 活性が高まった。耳翼あたり 20~40 μ g のペプチド塗布した時、最も強い CTL の感作が観察された。この方法により TRP-2(B16 メラノーマのエピトープ)または MUT1(3LL 肺癌細胞のエピトープ)免疫したマウスは、それぞれ B16 細胞または 3LL 細胞の皮下移植を拒絶した。さらにこの免疫法を B16 または 3LL 担癌マウスに行った時、各々癌細胞増殖の極端な低下が観察された。表皮 LC の蛍光 DNA の取り込みは角質層破壊直後が最も効率良く、この結果は、経皮免疫法が DNA 治療への応用の可能性を示唆させた。さらに角質層破壊による経皮的免疫法をヒトに応用するためには、ヒト個人個人に合った角質層破壊法の選択が重要であることも判った。

研究発表

1) J Invest Dermatol 109. 175. Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. 1997. T Nishijima, Y Tokura, G Imokawa, N. Seo, F Furukawa, M Takigawa
 2) Cell. Immunol 178 172 Spontaneous Hair Follicle cycling may influence the

development of murine contact photosensitivity by modulating keratinocyte cytokine production. 1997 Y. Tokura, U. Hofmann, S M-Rover, R. Paus, H. Wakita, H Yagi, N Seo, F. Furukawa, M Takigawa

3) Br J. Dermatol 138 357 Streptococcal impetigo induces Th1-preponderant activation of T lymphocytes with subsequent anergy to superantigenic exotoxins in patients with atopic dermatitis 1998 Y Tokura, M I-Ginoza, N Seo, T Ito, M Sakurai, F Furukawa, M Takigawa

4) Photomed Photobiol 19 57 Generation of monoclonal antibody specific for fluoroquinolone-photoadducts: cross-reactivity among fluoroquinolones 1998. Y Tokura, N Seo, M Takigawa

5) Br J Dermatol 138:357 Streptococcal impetigo induces Th1-preponderant activation of T lymphocytes with subsequent anergy to superantigenic exotoxins in patients with atopic dermatitis. 1998. Y Tokura, M Ishii-Ginoza, N. Seo, T Ito, M Sakurai, F Furukawa, M. Takigawa

6) J Immunol. 160:3719 Cross-reactivity in murine Fluoroquinolone photoallergy: Exclusive usage of TCR V β 13 by immune T cells that recognize

- fluoroquinolone-photomodified cells
1998 Y Tokura, N Seo, H Yagi, F Furukawa, M Takigawa
- 7) *J Dermatol* 138 904 Severe mosquito bite hypersensitivity, natural killer cell leukemia, latent or chronic active epstein-barr virus infection and hydroa vacciniforme-like eruption 1998 Y Tokura, S Ishihara, K Ohshima, A Hidano, M Koide, N Seo, M Takigawa
- 8) *Clin Exp Immunol* 112 403 Tumour-specific cytotoxic T lymphocyte activity in Th2-type Sezary syndrome its enhancement by interferon-gamma (IFN- γ) and IL-12 and fluctuations in association with disease activity 1998 N Seo, Y Tokura, K Matsumoto, F Furukawa, M Takigawa
- 9) *J Immunol* 161 4138 Down-regulation of tumoricidal NK and NK T cell activities by MHC K^b molecules expressed on Th2-type $\gamma\delta$ T and $\alpha\beta$ T cells coinfiltrating in early B16 melanoma lesions 1998 N Seo, Y Tokura, F Furukawa, M Takigawa
- 10) *Photomed Photobiol* 20 105 Induction of Th1-skewing cytokine production by 8-methoxypsoralen plus UVA in T lymphocytes 1998 Y Tokura, N Seo, H Yagi, H Wakita, S Moriwaki, F Furukawa, M Takigawa
- 11) *J Immunol* 163 242 Depletion of IL-10- and TGF- β -producing regulatory $\gamma\delta$ T cells by administering a daunomycin-conjugated specific mAb in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells 1999 N Seo, Y Tokura, M Takigawa, K Egawa
- 12) *J Invest Dermatol* 113 202 Treatment of T lymphocytes with 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A induces transient but biologically active Th1-skewing cytokine production 1999 Y Tokura, N Seo, H Yagi, H Wakita, S Moriwaki, F Furukawa, M Takigawa
- 13) *Arch. Dermatol Res* 291 382 Hyporesponsiveness of peripheral blood lymphocytes to streptococcal superantigens in patients with guttate psoriasis evidence for systemic stimulation of T cells with superantigens released from focally infecting *Streptococcus pyogenes* 1999 Y Tokura, N Seo, A Ohshima, H Wakita, R Yokote, F Furukawa, M Takigawa
- 14) *J Dermatol Sci* 21 34 Lymphocyte stimulation test with drug-photomodified cells in patients with quinolone photosensitivity 1999 Y Tokura, N Seo, A Ohshima, H Yagi, F Furukawa, M Takigawa
- 15) *J Invest Dermatol Symp Proc* 4 184 Modulation of T-lymphocytes proliferation by exogenous natural

ceramides and sphingosylphosphorylcholine. 1999 Y Tokura, H Wakita, N Seo, F. Furukawa, K Nishijima, M Takigawa.

16) Proc. Natl Acad. Sci. USA 97 371
Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunotherapy 2000. N Seo, Y Tokura, T Nishijima, F. Furukawa, M Takigawa

知的所有権の取得状況

特許取得・公開番号：特開平 10-316585；発明の名称・キラーT細胞賦活化剤；出願人：日東電工株式会社；発明者：瀧川雅浩、瀬尾尚宏