

자외선에 의한 면역반응의 억제를 회복시키는 면역조절물질을 생산하는 토양 *Streptomyces* sp.의 분리 및 동정

모영근 · 신영근 · 박동진* · 김창진* · 이종길* · 한성순

충북대학교 약학대학, *KIST 생명공학연구소

(Received August 22, 1995)

Isolation and Identification of Soil *Streptomyces* sp. Producing an Immunomodulator That Restores Ultraviolet B Radiation-Induced Suppression of the Immune Response

Young Keun Mo, Young Keun Shin, Dong Jin Park*, Chang Jin Kim*,
Chong Kil Lee* and Seong Sun Han

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea

Abstract—Soil microorganisms producing immunomodulators that can restore ultraviolet B (UVB) radiation-induced suppression of the immune response were screened *in vitro*. Exposure of freshly isolated murine epidermal cells (EC) to 180 J/m² of UVB radiation resulted in approximately 90% impairment of accessory cell function, as measured by their ability to support anti-CD3 monoclonal antibody-induced T-cell mitogenesis. When the culture supernatants of 150 actinomycete strains were examined for their capacity to prevent or repair the UVB-induced impairment of accessory cell function, 4 of them were identified to contain immunomodulators that can restore the decreased accessory cell function. The soil isolate that showed the most effective restorative activity, G40025, was selected and further characterized. Addition of 10 µl of the culture supernatant of G40025 grown in G-media to cultures of UVB-irradiated EC right after UVB-irradiation restored the decreased accessory cell function by 58%. The immunomodulator produced by G40025 appeared to be stable at 100°C for 10 min. Taxonomical studies by cultural, morphological, and physiological characterization showed that the soil isolate, G40025, belongs to the genus *Streptomyces*.

Keywords □ Ultraviolet B, Langerhans cells, immunomodulators, Taxonomy, *Streptomyces* sp.

자외선은 피부화상을 불러일으키는 것 외에도, 피부의 면역반응을 억제시키며, 피부암 (nonmelanoma skin cancers)의 주요 유발 요인이라는 사실이 실험동물은 물론 사람을 대상으로한 연구에서도 분명히 밝혀지고 있으며¹⁻⁴⁾, 최근 들어, 오존층의 파괴에 따른 자외선에 대한 노출이 증가하면서 자외선이 건강에 미치는 영향에 대한 관심이 증가하고 있다.⁵⁾ 자외선 중에서도 파장이 280 nm에서 320 nm 사이인 ultraviolet (UVB)는 세포성

면역반응을 억제하는 작용이 강력한 것으로서, 저 용량에서는 조사 받은 부위의 세포성 면역반응을 국소적으로 억제하지만, 고 용량에서는 세포성 면역반응을 전신적으로 억제하는 것으로 알려지고 있다.⁶⁾

침투력이 강하지 못한 UVB는 epidermis 부분에 영향을 미치는데, epidermis의 약 95%는 keratinocyte이며, 약 2~5%를 차지하는 dendritic epidermal cell이 면역반응과 관련된 세포이다. Dendritic epidermal cell에는 Langerhans cell 및 Thy-1+ dendritic cell 등이 있는데, Langerhans cell은 항원전달 세포로서 작용하는 일종의 보조성 세포 (accessory

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0431-61-2826 (팩스) 0431-68-2732

cell)이고, Thy-1+ dendritic epidermal cell은 일종의 T 세포로서 그 기능은 잘 알려져 있지 않다.⁷⁻⁸⁾ 저용량 UVB에 의한 세포성 면역반응의 국소적 억제에는 UVB에 의한 Langerhans cell의 수적 감소 및 보조성 세포로서의 기능 저하에 일차적으로 기인하며⁹⁻¹²⁾, 고용량 UVB에 의한 세포성 면역반응의 전신적 억제는 UVB 조사를 받은 keratinocyte에 의한 interleukin (IL)-10¹³⁾, TNF- α ¹⁴⁾, cis-urocanic acid,¹⁵⁾ contra IL-1¹⁶⁾ 등과 같은 면역 억제성 cytokines의 생산에 기인하는 것으로 밝혀지고 있다.

자외선에 의한 면역반응의 억제 및 피부암의 유발 등을 피할 수 있는 가장 좋은 방법은 자외선 조사를 피하는 것일 것이지만, 직업적, 지역적, 기타의 이유로 자외선 노출을 피할 수 없는 경우에 가장 먼저 생각할 수 있는 것은 자외선 차단제 (sunscreens)를 사용하는 것이다. 그러나, 현재 사용되고 있는 자외선 차단제는 자외선에 의한 피부 화상을 예방할 목적으로 개발된 것으로서, 최근의 연구 결과에 의하면, 자외선에 의한 피부 화상의 차단이 자외선에 의해 억제되는 면역반응의 예방과는 일치하지 않는다는 것이다.¹⁷⁻²¹⁾ 즉, 자외선에 의한 피부 화상은 예방할 수 있으나, 자외선에 의해 억제되는 세포성 면역의 회복 또는 예방 효과는 없거나 약한 것으로 밝혀지고 있다. 따라서, 자외선 차단제의 사용은 피부 화상을 방지함으로써 오히려 자외선에 대한 노출 시간을 증가시키고, 결과적으로 면역반응의 억제 및 피부암 유발을 촉진시킬 수 있다는 것이다.

본 연구에서는, 자외선 차단제가 아니라, 자외선에 의해 억제된 세포성 면역반응을 회복시킬 수 있는 면역조절물질을 탐색해 낼 수 있는 시험관 내 시험법을 확립하였으며, 이 방법으로 토양 방선균의 배양액에 대한 탐색을 실시하였다. 또한, 자외선에 의해 억제된 세포성 면역반응의 회복 효능이 가장 우수한 균주인 G40025를 선발하여, 배양학적, 형태학적, 생리학적 특성에 의한 동정을 실시하여 *Streptomyces* 속에 속함을 밝혔다.

실험방법

토양 방선균 및 방선균의 배양

토양 방선균 및 일차 탐색에 사용된 방선균의 배양액은 KIST, 생명공학연구소로부터 분양받았다. 배양액이 더 필요한 경우에는 F-media 또는 G-media를 이용하

여 27°C, 200 rpm에서 4일간 배양하여 얻었는데, F-media의 조성은 10 g의 soluble starch, 20 g의 glucose, 10 g의 soybean meal, 10 g의 fish meal, 1 g의 meat extract, 4 g의 yeast extract, 2 g의 NaCl, 2 g의 CaCO₃, 0.25 g의 K₂HPO₄을 증류수에 녹여 1000 ml로 하여 pH를 7.3으로 조정하는 것이었고, G-media의 조성은 10 g의 soluble starch, 20 g의 glucose, 25 g의 soybean meal, 1 g의 meat extract, 4 g의 yeast extract, 2 g의 NaCl, 2 g의 CaCO₃, 0.25 g의 K₂HPO₄을 증류수에 녹여 1000 ml로 하여 pH를 7.3으로 조정하는 것이었다.

실험동물

실험동물은 생후 4 주된 Balb/c strain (H-2^d)의 생쥐를 한국화학연구소(대전)에서 구입하여 항온 및 항습 시설을 갖춘 충북대학교 약대학 동물사육실에서 2 주 이상을 더 키워서 사용하였다.

세포의 배양

임파구 또는 표피 세포는 10 %의 우혈청 (fetal bovine serum) (Hyclone, USA), 2 mM의 glutamine, 100 units/ml의 penicillin 및 100 g/ml의 streptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 50 μ M의 2-mercaptoethanol (Sigma), 1% (v/v)의 non-essential amino acids (GIBCO BRL, Grand Island, NY), 1 mM의 sodium pyruvate (GIBCO BRL)을 첨가한 RPMI-1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였으며, 세포의 생존도는 trypan blue dye exclusion 방법을 이용하여 측정하였다.

T 세포의 분리

T세포는 생쥐의 비장세포로부터 분리하였다. 생쥐를 치사시킨 후, 비장을 무균적으로 적출, 분쇄하여 비장세포를 얻었으며, 비장세포 중의 적혈구는 0.15 M NH₄Cl, 1.0 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA로 된 buffer (pH 7.3)를 이용하여 용혈시킨 후, Hank's balanced salt solution (HBSS, GIBCO BRL)으로 3회 세척하여 제거시켰다.

비장세포 중에 들어 있는 보조성 세포는 nylon wool에 대한 흡착성을 이용하여 adherent cell을 제거시킨 다음, class II MHC molecule (H-2d)에 대한

단일항체 (M5/114.15.2, ATCC, Rockville, MD)를 가하여 실온에서 30분간 처리한 후, 보체로 guinea pig serum (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA)을 가하고, 37°C에서 60분간 처리하여 파괴시켜 제거하였다. 최종적으로 분리된 T 세포는 CD3에 대한 단일항체에 의하여 증식이 유도되지 아니하였다.

표피 세포의 분리

표피 세포 (epidermal cell)는 생쥐의 귀로부터 분리하였다. 생쥐의 귀를 에탄올로 세척한 다음 절취하여 penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 g/ml) 및 amphotericin B (5 µg/ml)을 포함하는 phosphate buffered saline (PBS) 중에서 핀셋을 이용하여 절개한 후, 연골조직 및 지방조직을 제거시키고, 0.5%의 trypsin 용액에 dermal side를 아래로 하여 부유시킨 다음, 37°C에서 40분간 처리하였다. 느슨해진 표피 세포의 박층 (epidermal sheet)을 벗겨, 0.375 mg/ml의 DNase I, 25 %의 우혈청, Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺를 첨가한 HBSS 중에서 분쇄하여 단세포의 현탁액을 얻은 다음, 3 ml의 Nycoprep (NycoMed Pharma As) 상단에 가하여 실온에서 1,800 rpm으로 5분간 원심분리한 후, Nycoprep 상단에 모인 epidermal cell을 분리하여 HBSS로 3회 세척하여 사용하였다.

자외선의 조사

분리된 표피 세포에 대한 자외선의 조사는 UVB를 발산하는 FS-20 sunlamp (National Biological Corp., Twinsburg, OH)을 이용하였다. FS20 sunlamp로부터 발산되는 에너지의 약 65%가 UVB (280~320 nm) 영역의 자외선이며, 자외선 조사 위치에서 UVB의 강도는 Radiometer UVX-31 (UVP, USA)을 이용하여 측정하였다. 표피 세포는 PBS에 2×10⁶/ml로 현탁시켜, 그 5 ml을 Petri dish (100×20 mm)에 넣고, clean bench의 불을 끈 상태에서 UVB를 조사하였다. 보조성 세포로서의 기능을 억제시키기 위해 조사한 자외선의 양은 특별한 기술이 없는 한 180 J/m²이었다.

LC의 보조성 세포 기능의 측정

표피 세포 중에 들어 있는 Langerhans cell의 보조성 세포 기능 (accessory cell function)은 CD3에 대

한 단일항체 (Boehringer Mannheim)로 자극시킨 T 세포를 이용하여 측정하였다. 즉, 96-well flat-bottom microtiter plate의 각 well에 자외선 조사를 받은 표피 세포 또는 자외선 조사를 받지 않은 정상 표피 세포를 가하고 (unirradiated control group), 자외선 조사를 받은 표피 세포를 가한 well에는 시료인 미생물 배양액을 가하거나 (irradiated experimental group) 또는 대조군에서는 배지만을 가하여 (irradiated control group), 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 48시간 배양한 다음, CD3에 대한 단일항체로 자극시킨 T 세포를 각각 가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 종료 6시간 전의 각 well에 10 µl의 ³H-thymidine (0.5 µCi, Du pont-New England nuclear)을 가하고, 계속해서 6시간을 더 배양한 후, automatic cell harvester (Inotech, Switzerland)를 이용하여 수확한 다음, liquid scintillation counter (Packard)로 측정하였다. 시료중에 함유되어 있는 면역조절물질에 의한 보조성 세포 기능의 % recovery는 아래의 공식으로 계산하였다.

% recovery =

$$\frac{\text{cpm of irradiated experimental group} - \text{cpm of unirradiated control group} - \text{cpm of irradiated control group}}{\text{cpm of irradiated control group}} \times 100$$

균주의 동정

균주의 배양학적 특성은 Shirling과 Gottlieb 등이 기술한 방법에 따라 International Streptomyces Project (ISP)에 수록된 배지 (ISP medium No. 2에서 No. 7)를 이용하여 27°C에서 2 내지 3 주간 배양하면서 일주일 간격으로 조사하였다.²²⁻²⁶ 균사 세포벽의 diaminopimelic acid 성분 분석을 위해서는 균체를 6N HCl로 가수분해시킨 후 cellulose TLC (Merck) 상에서 MeOH-H₂O-6N HCl-pyridine (80 : 26 : 4 : 10)을 전개용매로 하여 분석하였으며²⁷⁾, 기타 생리학적 특성은 Staneck 등의 방법에 준하였다.²⁸⁾ 형태학적 특성은 육안 및 광학현미경 (long working distance objective 장착)을 이용한 관찰과 함께 ISP medium No. 5에서 2 주일 자란 colony의 agar block을 잘라내어 gold palladium으로 처리한 후, Scanning Electron Microscope (Philips model SEM 515)로 관찰하였다.

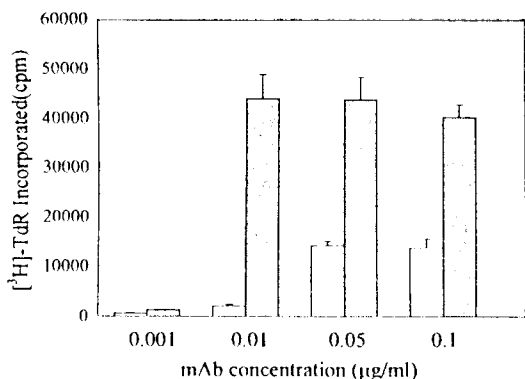


Fig. 1—Effects of anti-CD3 monoclonal antibody concentrations on the proliferation of T cells (2×10^5 /well) in the absence (□) and presence (■) of epidermal cells (1×10^5 /well).

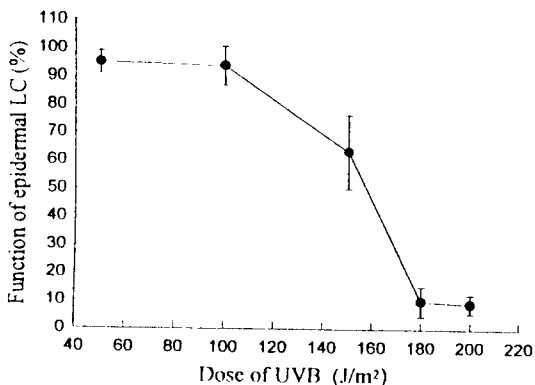


Fig. 2—Suppression of accessory cell function of epidermal Langerhans cells by ultraviolet B radiation.

결과 및 고찰

탐색 방법의 확립

자외선 ultraviolet B (UVB)에 의해 억제된 피부의 면역반응을 회복시킬 수 있는 면역조절물질을 탐색해 내기 위한 시험관 내 시험법을 확립하였다. 이 시험법은 생쥐의 귀로부터 분리한 표피 세포에 자외선을 조사한 직후에 시료를 가하고 2일간 배양한 다음, 표피 세포 중에 들어 있는 Langerhans cell의 보조성 세포 (accessory cell)로서의 기능을 CD3에 대한 단일항체로 자극시킨 T 세포를 이용하여 조사하는 것이었으며, 각 단계별 최적 조건을 조사하였다.

T 세포의 자극 (priming)에 적당한 CD3에 대한 단일항체의 양을 조사한 결과 Fig. 1에 보인 바와 같이,

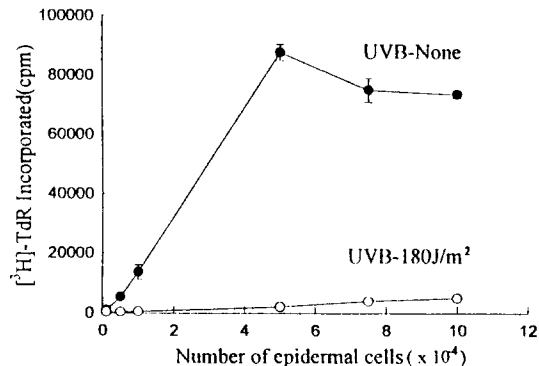


Fig. 3—Effect of epidermal cell density (numbers/well) on the proliferation of anti-CD3 monoclonal antibody-primed T cells (2×10^5 /well).

최종 농도가 0.01 µg/ml로 가해 주는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다. CD3에 대한 단일 항체를 0.05 µg/ml 또는 그 이상으로 가할 경우에는 보조성 세포를 가지 아니하여도 T 세포의 증식이 유도되었는데, 이러한 현상은 microtiter plate에 고정된 CD3에 대한 단일항체에 의한 것으로 사료된다.²⁹⁾

Langerhans cell의 보조성 세포로서의 기능을 억제하기에 적합한 UVB의 조사량을 알아본 결과, Fig. 2에 보인 바와 같이, UVB를 150 J/m²로 조사한 경우에는 Langerhans cell의 보조성 세포로서의 기능이 약 35% 억제되고, 180 J/m²에 의하여 약 90% 억제됨을 알 수 있었다. UVB는 Langerhans cell의 보조성 세포로서의 기능을 억제할 뿐만이 아니라, 고용량에서는 Langerhans cell에 대한 세포독성 (cytotoxicity)을 갖고 있다는 점을 고려하여¹²⁾, 이 이후의 모든 실험에서는 180 J/m²의 UVB를 조사하였다. Microtiter plate의 각 well에 가해 주는 epidermal cell의 양은 Fig. 3에 보인 바와 같이, 5×10^4 에서 가장 적합하고, 그 이상을 가하면 T 세포의 증식이 오히려 억제되는 것으로 나타났다. 이 모든 실험에서 microtiter plate의 각 well에 가해주는 T cell의 양은 2×10^5 이었다.

균주의 탐색

시료인 토양 방선균의 배양액은 100°C에서 10분간 가열처리하여 사용하였으며, microtiter plate의 각 well에 가해주는 양은 일차 탐색에서는 10 µl로 하였고, 일차 탐색에서 효과가 있는 것으로 보이는 경우에는 10배로 계열희석하여 여러 농도에서 재시험을 실시하였다. 탐색 결과, 약 150 개의 토양 방선균 중에서 자외선에 의해 억

제된 Langerhans cell의 보조성 세포의 기능을 회복시킬 수 있는 면역조절물질을 생산하는 것으로 확인된 균주는 4종이었으며, 그 중에서 자외선에 의하여 억제된 보조성 세포의 기능을 회복시키는 작용이 가장 우수한 면역조절물질을 생성하는 균주는 G40025 이었다. 따라서, G40025 균주를 선택하여 다음 실험을 진행하였다.

G40025에 의한 면역조절물질의 생산

선발된 균주인 G40025에 의한 면역조절물질의 생산에 미치는 배지의 영향 및 배양 기간에 대하여 조사한 결과를 Fig. 4에 보였다. G40025 균주는 F-media에서 보다 G-media에서 자외선 회복 면역조절물질을 더 잘 생산하고, 자외선 회복 면역조절물질을 효과적으로 생산하게 하기 위해서는 G-media에서는 4일간 배양하는 것이 적합함을 알 수 있었다. 자외선 조사를 받은 표피 세포의 배양액에 G40025를 4일간 배양하여 얻은 배양액을 각 well에 10 µl씩 첨가한 경우, 자외선에 의해

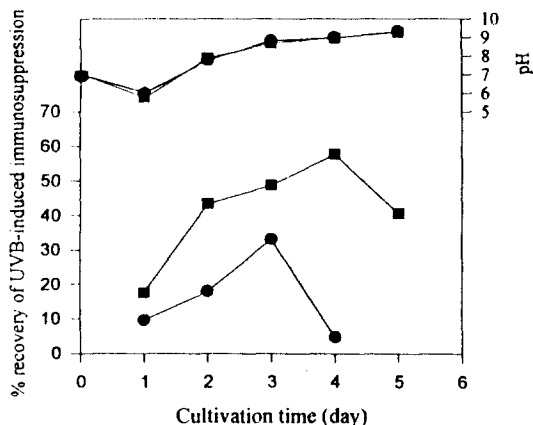


Fig. 4—Time-dependent production of the immunomodulator and changes of the pH of the culture broth by the isolate, G40025, in G-media (-■-) and F-media (-●-).

억제된 Langerhans cell의 보조성 세포로서의 기능이 약 58% 회복되는 것으로 나타났다. G40025 균주에 의하여 생산되는 자외선 회복 면역조절물질은 균주의 배양액을 100°C에서 10분간 가열처리하여 시험에 사용한 만큼 열에 대하여는 안정한 것으로 보이며, 이 면역조절물질을 동정하기 위한 순수분리 및 구조의 결정에 대해서는 현재 연구 중에 있다.

균주의 동정

G40025 균주는 ISP medium No. 2 부터 No. 7에서 비교적 잘 자라고, ISP medium No. 6를 제외하고 다른 모든 경우에서 희색의 aerial mycelia를 형성하였다.

Colony의 reverse color는 배지에 따라 다르게 나타났다 (Table I). Soluble pigments는 ISP medium No. 6 및 No. 7에서 갈색으로 생성되었다. 포자는 1.1~1.2×1.0~1.1 µm의 크기에 smooth surface를 갖고 있고, spore chain은 spiral type이었다(Fig. 5).

이 균주는 glucose, xylose, rhamnose, cellobiose, galactose 등을 이용하여 잘 자라나, mannitol, raf-

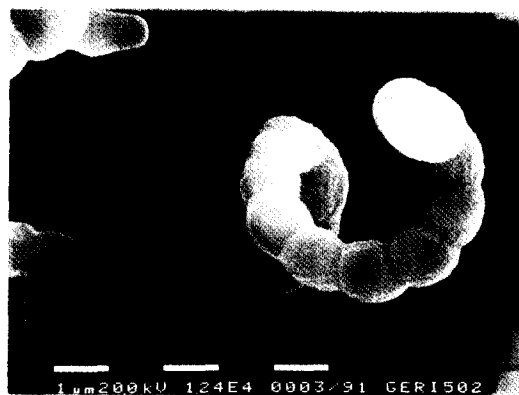


Fig. 5—Scanning electron micrograph of the isolate, G40025, grown on glycerol-asparagine for 14 days. Bar represents 1.0 µm.

Table I—Cultural characteristics of the isolate G40025

ISP medium number	Growth	Aerial mycelium	Reverse color	Soluble pigment
No. 2	Good	Gray	Grayish brown	None
No. 3	Moderate	Gray	Greenish gray	None
No. 4	Good	Gray	Pinkish brown	None
No. 5	Good	Gray	Greenish gray	None
No. 6	Moderate	None	Redish brown	Redish brown
No. 7	Good	Greenish gray	Grayish black	Bluish brown

The isolate was cultured in the indicated medium for 2 to 3 weeks at 27°C, and the cultural characteristics were observed at weekly intervals.

Table II— Utilization of carbon sources

Carbon source ^a	Growth ^b
Arabinose	±
Xylose	+
Inositol	±
Mannitol	-
Fructose	±
Rhamnose	+
Sucrose	±
Raffinose	-
Cellulose	-
Cellobiose	+
Galactose	+
Inulin	-
Melibiose	±

^a The indicated carbon source was added to soluble starch-omitted ISP medium No. 4.

^b The growth of the isolate in soluble starch-omitted ISP medium No. 4, and that in D-glucose-supplemented ISP medium No. 4 were served as a negative control and a positive control, respectively.

Table III— Physiologics properties

Characteristics	G40025
Gelatin liquefaction	-
Hydrolysis of skim milk	+
Peptonization of milk	+
Hydrolysis of starch	+
Reduction of nitrate	+
Diaminopimelic acid type	LL

finose, cellulose, inulin 등은 이용하지 못하였다 (Table II). 이 균주는 gelatin을 액화하지 못하며, skim milk를 가수분해하고, milk를 peptonization시키며, starch를 가수분해하고, nitrate를 환원하며, diaminopimelic acid는 LL-type인 것으로 나타났다 (Table III). 이러한 결과로부터 G40025는 *Streptomyces* 속에 속한다는 것을 알 수 있었다.

결 론

자외선 ultraviolet B (UVB)에 의하여 억제된 피부의 세포성 면역반응을 회복시킬 수 있는 면역조절물질을 탐색하기 위한 *in vitro* 시험법을 확립하여, 약 150여종의 토양 방선균의 배양액에 대한 탐색을 실시한 결과, 4종의 토양 방선균으로부터 자외선에 의하여 억제된 Langerhans cell의 보조성 세포로서의 기능을 회복시킬 수 있는 면역조절물질이 생산됨을 확인할 수 있었다. 이들 중에서, 자외선 회복 효능이 가장 우수한 면역

조절물질을 생산하는 균주는 G40025이었으며, G40025를 G-배지에서 배양하여 얻은 배양액 10 µl를 자외선을 조사한 표피 세포의 배양액에 첨가한 결과, 자외선에 의해서 억제된 보조성 세포의 기능이 58% 정도 회복됨을 관찰할 수 있었다. G40025 균주에 의하여 생산되는 면역조절물질은 열에 안정하였다. G40025 균주는 배양학적, 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과 *Streptomyces* 속에 속하는 것으로 판명되었다.

감사의 말씀

본 연구는 G7 생리활성 천연물질 탐색법 개발에 관한 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Kripke, M. L.: Immunologic mechanisms in UV radiation carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* **34**, 69 (1981).
- 2) Kripke, M. L.: Immunological unresponsiveness induced by ultraviolet radiation. *Immunol. Rev.* **80**, 87 (1984).
- 3) Denkins, Y., Fidler, I. J. and Kripke, M. L.: Exposure of mice to UVB radiation suppresses delayed hypersensitivity to *Candida albicans*. *Photochem. Photobiol.* **49**, 615 (1989).
- 4) Yoshikawa, T., Rae, V., Bruins-Slot, W., van den Berg, J. W., Taylor, J. R. and Streilein, J. W.: Susceptibility to effects of UVB radiation on the induction of contact hypersensitivity as a risk factor for skin cancer in humans. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 530 (1990).
- 5) Urbach, F.: Evidence and epidemiology of UV-induced carcinogenesis in man. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **50**, 5 (1978).
- 6) Noonan, F. P. and DeFabo, E. C.: Ultraviolet-B dose-response curves for local and systemic immunosuppression are identical. *Photochem. Photobiol.* **52**, 801 (1990).
- 7) Streilein, J. W., Grammer, S. F., Yoshikawa, T., Demidem, A. and Vermeer, M.: Functional dichotomy between Langerhans cells that present antigen to naive and to memory/effector T lymphocytes. *Immunol. Rev.* **117**, 159 (1990).

- 8) Tigelaar, R. E., Lewis, J. M. and Bergstresser, P. R.: TCR gamma/delta+ dendritic epidermal T cells as constituents of skin-associated lymphoid tissue. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 58S (1990).
- 9) Toews, G. B., Bergstresser, P. R. and Streilein, J. W.: Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* **134**, 445 (1980).
- 10) Simons, J. C., Tigelaar, R. E., Bergstresser, P. R., Edelbaum, D. and Cruz, P. D.: UVB radiation converts Langerhans cells from immunogenic to tolerogenic antigen presenting cells. Induction of specific clonal anergy in CD 4+ T helper 1 cells. *J. Immunol.* **146**, 485 (1991).
- 11) Simon, J. C., Krutmann, J., Elmetts, C.A., Bergstresser, P. R. and Cruz, P. D. Jr.: Ultraviolet B-irradiated antigen-presenting cells display altered accessory signaling for T-cell activation: Relevance to immune response initiated in skin. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 66 (1992).
- 12) Tang, A. and Udey, M. C.: Effects of ultraviolet radiation on murine epidermal Langerhans cells: Doses of ultraviolet radiation that modulate ICAM-1 (CD54) expression and inhibit Langerhans cell function cause delayed cytotoxicity in vitro. *J. invest. Dermatol.* **99**, 83 (1992).
- 13) Ullrich, S.: Mechanism involved in the systemic suppression of antigen-presenting cell function by UV irradiation. *J. Immunol.* **152**, 3410 (1994).
- 14) Yoshikawa, T. and Streinlein, J. W.: Tumor necrosis factor-alpha and ultraviolet B light have similar effects on contact hypersensitivity in mice. *Regional Immunol.* **3**, 139 (1991).
- 15) Noonan, F. P., De Fabo, E. C. and Morrison, H.: Cis-urocanic acid, a product formed by ultraviolet B irradiation of the skin, initiates an antigen presentation defect in spleen dendritic cells in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **90**, 92 (1988).
- 16) Krutmann, J., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A. and Luger, T. A.: Epidermal cell-contra-interleukin 1 inhibits human accessory cell function by specific blocking interleukin 1 activity. *Photochem. Photobiol.* **52**, 783 (1990).
- 17) Gurish, M. F., Roberts, L. K., Krueger, G. G. and Dayners, R. A.: The effect of various sun-screen agents on skin damage and the induction of tumor susceptibility in mice subjected to ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **76**, 246 (1981).
- 18) Morison, W. L.: The effect of a sunscreen containing Para-aminobenzoic acid on the systemic immunologic alterations induced in mice by exposure to UVB radiation. *J. Invest. Dermatol.* **83**, 405 (1984).
- 19) Fisher, M. S., Menter, J. M. and Willis, I.: Ultraviolet radiation-induced suppression of contact hypersensitivity in relation to Padimate O and oxybenzone. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 337 (1989).
- 20) Mommaas, A. M., van Praag, M. C. G., Bavinck, J.N., Out-Luiting, C., Vermeer, B. J. and Claas, F. H. J.: Analysis of the protective effect of topical sunscreens on the UVB-radiation-induced suppression of the mixed-lymphocyte reaction. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 313 (1990).
- 21) Ho, K. K.-L., Halliday, G. M. and Barnetson, R. St. C.: Sunscreens protect epidermal Langerhans cells and Thy-1+ cells but not local contact sensitization from the effects of ultraviolet light. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 720 (1992).
- 22) Shrling, E. B. and Gottlieb, D.: Methods for characterization of Streptomyces species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**, 313 (1966).
- 23) Shrling, E. B. and Gottlieb, D.: Cooperative description of type culture of Streptomyces. II. Species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**, 69 (1968).
- 24) Shrling, E. B. and Gottlieb, D.: Cooperative description of type culture of Streptomyces. III. Additional species descriptions from first and second studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**, 279 (1968).
- 25) Shrling, E. B. and Gottlieb, D.: Cooperative description of type culture of Streptomyces. VI. Additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**, 391 (1969).
- 26) Shrling, E. B. and Gottlieb, D.: Cooperative description of type culture of Streptomyces. V.

- Additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**, 265 (1972).
- 27) Yamada, K. and Komagata, K.: Taxonomic studies on coryneform bacteria. II. Principal amino acids in the cell wall and their taxonomic significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**, 103 (1970).
- 28) Stanek, J. L. and Roberts, G. D.: Simplified approach to identification of aerobic actinomyces by thin layer chromatography. *App. Microbiol.* **120**, 281 (1974).
- 29) Jenkins, M. K., Chen, C., Jung, G., Mueller, D. L. and Schwartz, R. H.: Inhibition of antigen-specific prolfic proliferation of type I murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* **144**, 16 (1990).