

# Antigen uptake and subsequent cell kinetics in bronchus-associated lymphoid tissue

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 豊嶋, 幹生 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1085">http://hdl.handle.net/10271/1085</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 232号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏名	豊嶋幹生		
論文題目	Antigen uptake and subsequent cell kinetics in bronchus-associated lymphoid tissue (気管支随伴リンパ組織における抗原取り組みと細胞動態の検討)		

博士(医学) 豊 嶋 幹 生

## 論文題目

Antigen uptake and subsequent cell kinetics in bronchus-associated lymphoid tissue

(気管支随伴リンパ組織における抗原取り込みと細胞動態の検討)

## 論文の内容の要旨

## [はじめに]

気管支随伴リンパ組織 (bronchus-associated lymphoid tissue: BALT) は抗原取り込み、肺局所へのリンパ球集積、抗体産生等、気道系の免疫学的防御機構において重要な役割を果たしている。BALT の発達は抗原刺激に依存的であり、ヒトではびまん性汎細気管支炎 (DPB) などの慢性気道感染症において BALT 過形成が認められることが報告されているが、BALT の形成、抗原取り込み、抗体産生の機序については十分明らかにされていない。マウスにおいて緑膿菌死菌の経気道的投与により、BALT の形成を惹起し、BALT における抗原取り込みの過程、免疫担当細胞の動態、サイトカインの発現について検討を加えた。

## [材料ならびに方法]

SPF の 8 週齢、雄、BALB/c、C57BL/6 マウスを加熱処理した緑膿菌死菌と Freund complete adjuvant の腹部皮下注によって感作した (感作群)。感作 3 週間後より噴霧装置を用いて、緑膿菌死菌を週 1 回 30 分間、計 10 回噴霧投与した。投与終了 1 週間後に肺を摘出し、ホルマリン固定後、HE 染色にて BALT 形成の程度を組織学的に検討した。非感作群においても同様に緑膿菌死菌を投与し、組織学的検討を行った (非感作群)。緑膿菌死菌の反復吸入により BALT の形成を惹起した後、蛍光色素 PKH26 でラベルした緑膿菌死菌を 5 分間噴霧投与し、5、10、15、20、30 分後に肺を摘出し、蛍光顕微鏡と透過型電子顕微鏡にて、BALT における緑膿菌の分布と局在を観察した。抗マウス IgM、CD 4、CD 8、インターロイキン (IL)-4、インターフェロン (IFN)- $\gamma$  単クローン抗体を一次抗体として、アビジン-ビオチン酵素複合体法による免疫染色を行った。

## [結 果]

緑膿菌死菌の反復吸入によってリンパ性上皮、リンパ濾胞を伴う BALT の形成が認められた。BALT の形成は感作群、非感作群ともに認められたが、その程度は非感作群よりも感作群で強く、C57BL/6 マウスよりも BALB/c マウスで強かった。蛍光顕微鏡による観察では、BALT 内部に緑膿菌の蛍光発光が認められ、非感作群では緑膿菌噴霧投与終了 5 分後ではリンパ性上皮、円蓋域のみに、10 分後に濾胞領域、傍濾胞領域にも蛍光発光が認められたが、感作群では噴霧投与終了 5 分後より BALT 内の全ての領域で蛍光発光が認められた。透過電顕による検討では、緑膿菌は上皮細胞とマクロファージ内に認められた。免疫染色ではリンパ濾胞の内部には多数の IgM 陽性細胞が認められ、リンパ濾胞周囲には CD 4、CD 8、IL-4、IFN- $\gamma$  陽性細胞が散在しており、CD 4 陽性細胞が CD 8 陽性細胞より、IL-4 陽性細胞が IFN- $\gamma$  陽性細胞より優位であった。

## [結 論]

マウスにおいて、緑膿菌の反復吸入によって BALT の形成が惹起され、蛍光色素で標識した緑膿菌

が BALT 内部に認められたこと、非感作群よりも感作群において BALT 形成の程度が強く、緑膿菌の BALT 内部への分布が速やかであったことより、反復する抗原刺激によって BALT の形成が惹起され能動的に抗原の取り込みが行われること、および BALT の形成と抗原取り込みには感作が重要である可能性が推定された。

Th2 優位である BALB/c マウスにおいて Th1 優位である C57BL/6 マウスよりも BALT 形成の程度が強かったこと、および免疫染色においてリンパ濾胞内部に IgM 陽性細胞が多数認められ、濾胞周辺に CD4、IL-4 陽性細胞が優位に散在していたことから、抗体産生器官である BALT の形成に Th2 リンパ球が関与しており、B リンパ球と Th2 リンパ球が共同して抗体産生に関与し、Th2 リンパ球が気道の粘膜免疫において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

ヒトの慢性気道感染症の一つであるびまん性汎細気管支炎 (diffuse pan bronchiolitis; DPB) は原因不明の呼吸器疾患として知られ、その発症機序の解明が急がれている。

申請者は DPB の患者の気道において気管支随伴リンパ組織 (bronchus-associated lymphoid tissue; BALT) の過形成がしばしば認められることに着目し、BALT を介する経気道的抗原感作と局所免疫応答が DPB の発症に関連する可能性を解明するため、Th1 優位の C57BL/6 と Th2 優位の BALB/c の各マウスを用い、緑膿菌死菌による経皮的、および経気道的感作により BALT の過形成病変を惹起させ、抗原摂取、免疫系細胞の動態、およびサイトカインの発現の変化を基礎的に検討して、BALT 形成との関連を追及した。

申請者の口頭発表と論文をもとに審査委員会において審査した結果、評価された点は次のとおりである。

1. Th1 優位の C57BL/6 と Th2 優位の BALB/c のマウスを用い、加熱処理緑膿菌死菌＋フロイド完全アジュバントの初回皮下感作を行い、3 週間後より同死菌を噴霧投与して 2 次感作を行い BALT 過形成病変を惹起させ、感作群を準備した。ついで、同菌の噴霧投与だけを行った非感作群と比較検討した。経気道的抗原感作による BALT 過形成の実験モデルとして、この方法の妥当性が確認された。
2. BALT の形成は C57BL/6 と BALB/c マウスにおいて感作群、非感作群ともに認められた。その形成の程度は、感作群の方が非感作群よりも顕著で、しかも、BALB/c マウスの方が C57BL/6 マウスよりも強いことから、前感作による増強効果と系統差の存在が示唆された。
3. 経気道的に噴霧投与された PKH-26 蛍光標識緑膿菌は、非感作群では 5 分後に BALT のリンパ性上皮と円蓋域に、10 分後に濾胞領域と傍濾胞領域に比較的ゆっくりと摂取されたが、感作群では 5 分後にすでに BALT 内の全域で広く摂取され、摂取速度の違いが認められた。また、電顕的観察により、リンパ性上皮とマクロファージによる緑膿菌の貪食像を確認した。
4. 免疫担当細胞の分布について免疫組織化学的手法で検索し、Th2 優位の BALB/c マウスの感作群において、BALT のリンパ濾胞に IgM<sup>+</sup>細胞の集積をリンパ濾胞周囲 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、IL-4<sup>+</sup>、および IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞の散在的分布を明らかにし、さらに CD4<sup>+</sup>と IL-4<sup>+</sup>細胞の分布が他の細胞と比べ優位であることを見いだした。

以上のことより申請者は、感作群において抗原の経気道的反復投与を行うと、BALT の過形成と緑膿菌の摂取が増強され、さらに Th2 優位の BALB/c マウスでその増強効果が一層顕著となり、Th2 リン

パ球が BALT 形成と局所免疫応答に密接に関与すると結論した。

これに対し審査委員会は、本研究が経気道的抗原感作により惹起される BALT 過形成における経皮的感作の必要性と、BALT 内の Th2 リンパ球の関与の重要性を明らかにし、慢性気道感染症の発症機序の解明のために基礎的知見を提供するものとして高い評価を与えた。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問が行われた。

- 1) 抗原として緑膿菌を用いた理由、噴霧させた緑膿菌の吸収量はどのくらいか
- 2) IgA クラススイッチに関与する因子とその作用機序
- 3) リンパ濾胞内における IgA 陽性細胞の局在
- 4) マウス系統間で BALT 形成の程度に違いが見られる理由
- 5) 円蓋部におけるマクロファージの同定を行ったか、また感作群と非感作群でその分布の違いが認められるか
- 6) BALT 形成における Th2 リンパ球の関与を直接的に証明する実験を行ったか
- 7) 気管支洗浄液中の細胞性・液性因子の変化を検索したか
- 8) 胸腺摘出マウスを用いて、BALT 形成の T 細胞依存性を検索したか
- 9) 緑膿菌に対する特異的免疫応答を検索したか

これらの試問に対し申請者の解答は適切であり、問題点の十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山下 昭  
副査 教授 小出 幸夫 副査 講師 鈴木 一也