



Depletion of rat splenic macrophages and reduction of lymphocyte homing into the spleen after chronic thoracic duct lymph drainage

メタデータ	言語: Japanese 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: 張, 鑫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1117

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 264号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏 名	張 鑫		
論文題目	Depletion of rat splenic macrophages and reduction of lymphocyte homing into the spleen after chronic thoracic duct lymph drainage (ラット胸管リンパ長期間体外排導後の脾臓におけるマクロファージの減少及びリンパ球ホーミング能の低下)		

博士(医学) 張 鑫

論文題目

Depletion of rat splenic macrophages and reduction of lymphocyte homing into the spleen after chronic thoracic duct lymph drainage

(ラット胸管リンパ長期間対外排導後の脾臓におけるマクロファージの減少及びリンパ球ホーミング能の低下)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

リンパ球のリンパ節へのホーミングは、リンパ節内に生理的に存在する特殊な血管、高内皮性細静脈(HEV)の内皮細胞膜上に発現される接着分子と、リンパ球膜上の対応リガンドによる adhesion molecule-ligand pathway を介しての多段階の相互作用によって惹起することが明らかにされてきた。しかし、脾臓には HEV が欠如し、リンパ球のホーミングが量的にもっとも盛んであるにも拘わらず、そのホーミング機構に関しては現在のところ全く不明である。そこで、我々はリンパ球の脾臓へのホーミング機構とマクロファージ(Mφ)との相互関係を明らかにするため、胸管リンパ(TDL)排導ラットを作成し、TDL排導後における脾臓Mφの量的・機能的変化、分布形態、接着分子の発現、並びにリンパ球のホーミング能の変化について、免疫組織化学的染色法、画像解析、放射活性測定法、及び蛍光顕微鏡で検討を行った。

〔材料並びに方法〕

- (1) TDL排導ラットの作成と末梢血白血球数の計算：近交系雄DA、及び雄(DA×Lewis)F1ラット(180～300g、15週齢)を用い、腹式ビニールチューブ挿入法でTDL排導手術を行った。覚醒後はBollmannケージ内に入れ、0.45%の食塩水と固形飼料(MM3)を自由に与えた。sham controlに対して排導チューブを胸管内に挿入しない以外は同一手順を施した。また、正常、sham control、及び排導ラットの尾静脈より採血し、白血球数計算の後末梢血のサイトスピン塗抹標本を作成し May Grünwald-Giemsa染色を施し、白血球の各分画を計算した。
- (2) 各種リンパ球の準備と再注入実験：TDLリンパ球を24時間毎1～14日間無菌的に採取した。また、DAラットの末梢リンパ節、及び胸腺より細胞浮遊液を用意した。さらに、排導リンパ球を4%ホルマリンPBSにて30分処理し死滅リンパ球を準備した。 2.4×10^6 個のTDLリンパ球(これは14日間に排導されたTDLリンパ球の総数に相当)、並びに同数のリンパ節細胞、或いは胸腺細胞をTDL排導後24時間目のDAラットに静注し、以後10～14日間排導を持続した。また、排導自家リンパ球、或いは死滅リンパ球を毎日再注入し、同じ期間排導を継続した。
- (3) Flow cytometryによる構成細胞の解析：正常及び排導後7日目の脾臓細胞を 5×10^6 個/mlに調整し、各種の抗ラットIgGマウス一次抗体と45分間反応させ、さらに、FITC標識ウサギF(ab)₂抗マウスIgGと1時間培養し、脾リンパ球の各亜群をEPICS ProfileによるFlow cytometry解析を行った。
- (4) 免疫組織化学的染色、及び画像解析：正常、sham control群、TDL排導群及びリンパ球再注入群の各ラットを脱血死させたのちに、OCT compoundを用い脾臓、頸リンパ節、及び肝臓の各組織の凍結切片標本を作成し、アルカリ性フォスファターゼ間接型免疫組織化学染色法で免疫染色を行った。抗Mφ抗体としてED1, 2, 3及びMar1, 3を用いた。染色標本に対し画像解析装置(LUZEX III)を用いて単

位面積あたりの陽性細胞数を計算した。

- (5) Mφの非免疫食食能の測定：2%ラテックスビーズPBS液の静注1時間後に、脾臓と肝臓を摘出し凍結切片標本を作成し、蛍光顕微鏡でMφのin vivo非免疫食食能を観察した。
- (6) リンパ球の脾臓へのホーミング能の測定：胸管リンパ球、或いは脾臓細胞を 50×10^6 個/mlに調整し、 $50 \mu\text{g/ml}$ FITC を添加し20分、 37°C で培養させ、洗浄ののち 100×10^6 個を静注した。20分～24時間にわたり経時的に脾臓を摘出し凍結切片標本を作成し、蛍光顕微鏡で標識リンパ球の分布を観察した。また、 ^3H -uridine 標識リンパ球のホーミングはサンプルオキシダイザーと液体シンチレーションカウンタによる脾臓の放射活性の変化で検索した。

〔結果〕

- (1) TDL排導後の胸管リンパ球数、末梢血リンパ球数、及び単球数の経時変化：TDLの持続的排導により胸管リンパ球数の経時的な減少が認められ、TDL排導後7日目頃より胸管基底線を形成した。14日間の排導で約 2.0×10^9 個のリンパ球が排導された。排導3日目より末梢血リンパ数が急速に減少し、排導停止時までリンパ球のみの著明な減少症が持続した。一方、血中単球数は排導開始後漸次増加し、排導14日目では正常の約2倍となり単球増多症が認められた。
- (2) TDL 排導後における各種臓器の細胞・組織学的変化：組織学的には、脾臓と頸リンパ節では、胸腺依存域とリンパ濾胞のリンパ球密度がともに減少した。とくに脾臓では赤脾髄と白脾髄の境界が不分明となり、組織の著しい萎縮像が認められたが、リンパ球亜群の比率の変化は認められなかった。一方、肝臓においては著変は認められなかった。
- (3) TDL排導後における各種組織のMφの量的、並びに機能的変化：脾臓とリンパ節では排導7日目頃より Mar1⁺・ED1⁺・ED2⁺・ICAM-1⁺・赤脾髄MφとED3⁺・辺縁帯Mφが減少し始め、排導14日目には殆ど検出されなくなった。しかし、ED3⁺・メタロフィール Mφと Mar3⁺・tingible body Mφは残存していた。一方、肝臓のクッパー細胞数には有意な変化は認められなかった。さらに、脾臓Mφのin vivoでの非免疫食食能が著明に減少したのに対し、肝臓クッパー細胞の食食能には有意な変化は認められなかった。
- (4) 脾臓Mφの量的減少、並びに機能的低下に対するリンパ球再注入の阻止効果：排導TDLリンパ球及びリンパ節リンパ球の再注入を受けたラットでは、脾臓Mφの量的減少、及び食食能の機能的低下が95%以上阻止されたが、死滅リンパ球、及び胸腺細胞の再注入では阻止されなかった。一方、肝臓クッパー細胞には有意な変化は認められなかった。
- (5) リンパ球の脾臓へのホーミング能の低下：TDL 排導10～14日目のラットへ標識リンパ球を静注しそのホーミングをみたところ、全観察期間において減少傾向が観察され、対照の約1/3まで低下した。対照ラットでは、標識リンパ球は注射後20分以内に辺縁帯にもっとも多く出現し、その後、辺縁帯より白脾髄に移動し、6時間目でピークに達し、以後次第に減少した。一方、TDL排導ラットでの分布動態は対照と異なり、白脾髄に出現するピーク時間が3時間になり、その後、標識リンパ球数が急速に減少し、白脾髄内におけるリンパ球の滞在時間の短縮化が認められた。

〔考察〕

ラット胸管リンパの長期間体外排導により、末梢血リンパ球減少症、単球増多症、脾臓リンパ球密度の低下、リンパ組織の萎縮が起こり、同時に脾及び頸リンパ節における Mar1⁺・ED1⁺・ICAM-1⁺・Mφの減少と機能低下が惹起された。自家リンパ球の再注入によってこの減少が阻止されたことから、脾

臓における再循環リンパ球と食食性Mφとの間に密接な共存関係が成立していることが示唆された。しかし、Mar3⁺・tingible body MφおよびED3⁺・メタロフィール Mφは残存していたことから、脾 Mφの分化起源と分布様式の不均一性が示唆された。長期間TDL排導で減少する脾Mφは骨髓単球由来のMφで、リンパ球依存性であるに対し、減少しないMφはリンパ球非依存性で脾内で独自に分化するMφ群である可能性が考えられた。さらに、リンパ球の脾臓へのホーミング能の低下が観察されたことから、脾Mφの立体的分布、特に辺縁帯におけるED3⁺・辺縁帯Mφの立体的分布が、リンパ球の脾内へのホーミングを調節する可能性が強く示唆された。

〔結論〕

胸管リンパの長期間体外排導ラットにおいて、脾及び頸リンパ節のMφの量的減少、食食能の機能的低下、リンパ球の脾へのホーミング能の低下などが認められた。これらの減少は、排導早期における自家リンパ球の再注入により阻止された。脾臓への再循環リンパ球と脾内Mφ、とくに辺縁帯Mφとの細胞間共存関係の重要性が明らかにされた。なお、胸管リンパ排導により肝クッパー細胞の量的及び機能的変化は惹起されなかった。

論文審査の結果の要旨

白血球の体内循環は、血球上の接着分子と血管内皮細胞、細胞外マトリックスなどに存在するリガンドとの相互作用を含む多段階の過程を経て生じる。例えば炎症部位への白血球の浸潤については、①血管内皮上のセレクチンと白血球上のシアロムチンとの相互作用による血管壁への白血球の弱い付着、②走化因子を含む白血球活性化因子の作用による白血球上の免疫グロブリンスーパーファミリー分子(ICAM-1、VCAM-1など)と内皮細胞上のインテグリンとの強固な結合、③血管内皮細胞間隙の白血球の通過、④炎症部位への遊走といったプロセスから成っている。ところで、リンパ球のリンパ節へのホーミングは高内皮性細静脈(HEV)の内皮細胞に発現される接着分子と、リンパ球のリガンドの相互作用により生じるが、一方リンパ球の循環が盛んである脾臓については、HEVが存在しないこともあり、ホーミングの機構が全く不明である。

申請者は、リンパ球の脾臓へのホーミング機構をマクロファージ(Mφ)との相互作用から検討した。方法は胸管ドレナージにより、持続的に胸管リンパ液を排出する胸管リンパ(TDL)排導ラットを作製し、排導前後におけるリンパ球のホーミング能と脾臓Mφの量的・機能的変化、分布形態、接着分子発現との関連性を検討した。

その結果、① TDLの持続的排導により胸管リンパ球数の経時的な減少が認められ、それに伴って末梢血中のリンパ球が減少し、逆に単球の微増が認められた。②組織学的には脾臓、リンパ節の胸腺依存域とリンパ濾胞のリンパ球密度がともに減少し、とくに脾臓では赤脾髄と白脾髄の境界が不明瞭となった。リンパ球亜群の比率の変化は認められなかった。③脾臓ではMar1⁺・ED1⁺・ED2⁺・ICAM-1⁺・赤脾髄MφとED3⁺・辺縁帯Mφが減少し、ED3⁺・メタロフィールMφとMar3⁺・tingible body Mφは残存していた。脾臓Mφのin vivoでの非免疫食食能が著明に減少した。④排導TDLリンパ球及びリンパ節リンパ球の再注入を受けたラットでは、脾臓Mφの量的減少及び食食能の機能的低下が阻止された。⑤ TDL排導ラットへ標識リンパ球を静注しその脾へのホーミングをみたところ減少傾向が観察され、リンパ球の脾内滞在時間も短縮が認められた。

このことから脾Mφの分化起源の相違と機能的局在性の不均一性が示唆された。TDL排導で減少する

脾Mφはリンパ球依存性であるに対し、減少しないMφはリンパ球非依存性で脾内で独自に分化するMφ群である可能性が考えられた。脾Mφの立体的分布が、リンパ球の脾内へのホーミングを調節することが示唆された。

さらに、本論文について次の質問があった。

- 1) リンパ球とMφとの相互作用の生物学的意義
- 2) TDL排導ラットの作製時の注意点
- 3) ラットの系によるTDL排導の効果の違い
- 4) 排導リンパ液のリンパ球のサブセット
- 5) TDL排導ラットの末梢血中好中球の変動
- 6) メタロフィールMφとMZMφの区別
- 7) リンパ球のFITCによるラベル法

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 瀧 川 雅 浩

副査 教授 筒 井 祥 博 副査 助教授 三 浦 克 敏