

# Migratory patterns of thoracic duct lymphocytes into bronchus-associated lymphoid tissue of immunized rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 潤 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1141">http://hdl.handle.net/10271/1141</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 288号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏名	佐藤 潤		
論文題目	Migratory patterns of thoracic duct lymphocytes into bronchus-associated lymphoid tissue of immunized rats (気管支随伴リンパ組織過形成ラットにおける胸菅リンパ球の動態について)		

博士(医学) 佐藤 潤

## 論文題目

Migratory patterns of thoracic duct lymphocytes into bronchus-associated lymphoid tissue of immunized rats

(気管支随伴リンパ組織過形成ラットにおける胸管リンパ球の動態について)

## 論文内容の要旨

〔はじめに〕

粘膜系免疫機構はIgA抗体による液性免疫が中心であり、抗原特異的IgAを誘導するためのIgA循環帰巢経路を形成している誘導組織 (inductive tissue) と実効組織 (effector tissue) から成り立っている。気管支随伴リンパ組織 (BALT) は、気道系の誘導組織として作用すると考えられており、慢性気道感染症や経気道的な抗原の反復投与によってBALTの過形成が誘導される。他のリンパ組織におけるリンパ球のhomingの検討は多くみられるが、BALTに関する知見は乏しい。特に、BALT過形成状態における感作リンパ球のBALT内への流入・分布に関しては明らかではない。以上の点を明らかにするため下記の検討を行った。

〔対象ならびに方法〕

実験動物は、DAラット (8週令雄、体重160~180g) を用いた。感作 recipient として、trinitrophenyl-conjugated keyhole limpet hemocyanin (TNP-KLH) の経気管内投与にてBALT過形成ラットを作成した。感作 donor として、TNP-KLHの反復腸管内投与ラットを用いた。横隔膜直下にて胸管内にポリエチレンチューブを挿入し、ヘパリン加RPMI1640溶液中に24時間にわたって胸管リンパ球を採取した。感作の有無によって以下の3群に分け検討した。1) A群; 感作 donor + 感作 recipient, 2) B群; 非感作 donor + 感作 recipient, 3) C群; 非感作 donor + 非感作 recipient。リンパ球の標識には5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) を用い、標識リンパ球 $1.0 \times 10^6$ 細胞/個体を recipient ラットの尾静脈より緩徐に静注した。静注後、0.5、4、12、24時間後に、両肺を取り出し、凍結切片を作成した。標識リンパ球の検出には、peroxidase標識ウサギ抗FITC抗体 (DAKO) を用い、DABにて発色させた。光学顕微鏡にてBALT内の陽性細胞を計測し、経時的变化および各群間の陽性細胞数について比較検討した。

〔結果〕

1) TNP-KLH 感作ラットでは、非感作ラットと比較して、最終感作1および3日後にBALの総細胞数が有意に増加していた ( $p < 0.01$ )。BALの細胞分画では、最終感作3日後にリンパ球分画の有意な増加がみられた ( $p < 0.01$ )。組織所見においても、最終感作1~7日後にBALTの過形成が確認された。2) TNP-KLH腸管感作ラットでは、非感作ラットと比較して、単位時間あたりに流出する胸管リンパ球数が優位に増加していた ( $p < 0.01$ )。3) CFSE標識リンパ球は、投与0.5時間後では、胞隔とBALT内部に存在したが、4時間以降はBALT内部にのみ存在した。A群およびC群における経時的検討では、BALT内の陽性細胞数は投与12時間後より有意な増加がみられた ( $p < 0.05$ )。BALTあたりの陽性細胞数は、投与12および24時間後において、A群がC群と比較して有意に増加していた ( $p < 0.01$ )。4) 投与12時間後における3群の比較では、BALT内の陽性細胞は、A群がB群およびC群と比較して有意に

増加していたが ( $p < 0.05$ )、B群はC群と比較して陽性細胞が増加している傾向がみられた ( $p = 0.10$ )。

#### [考察]

今回の我々の検討では、胸管由来のリンパ球は肺内においては、4時間以降はBALT内にもみ特異的に存在し、BALT以外の気道粘膜には存在しなかった。胸管リンパ球は組織分離のリンパ球と異なり、より生理的なリンパ球の再循環の状態にあると考えられ、BALTが気道系におけるリンパ球のhomingの主たる部位と考えられた。また、BALT内には時間依存的に標識リンパ球が増加し、抗原による刺激により有意に流入が増加することが確認された。この原因としては、BALT内への血流量の増加、高内皮性静脈(HEV)の増加と機能亢進、感作による接着因子発現の増強、BALT内部でのリンパ球の存在時間の延長などが考えられた。また、抗原による刺激がBALTの過形成を誘導する機序として、他のリンパ組織からのリンパ球流入が増加することが確認された。今回の検討から、感作された腸管随伴リンパ組織(GALT)由来のリンパ球が、過形成したBALT内に豊富に流入することから、粘膜免疫においてBALTが実効組織として作用する可能性も考えられた。今後、BALTへのリンパ球のhomingが抗原特異的であるかの検討が必要である。

#### [結論]

腸管などの誘導組織由来のリンパ球の流入の増加・亢進は、BALT過形成を惹起し、その結果として局所粘膜免疫に関与する可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

間質性肺炎など難治性呼吸器疾患の際には、しばしば気道系に気管支随伴リンパ組織(bronchus-associated lymphoid tissue; BALT)の過形成が認められる。申請者はその機構を解明するため、リンパ球が生理的にリンパ組織へホーミングする能力を有することに着目し、BALT過形成ラットのBALT局所へ抗原感作リンパ球が流入・分布するか否かを検討し、BALT形成におけるリンパ球ホーミングの関与を追求した。

審査委員会において審査の結果評価された点は、次のとおりである。

- 1) 用いた材料、および方法は本研究目的を解明するうえで問題がないと評価された。すなわち、近交系成熟雄DAラットを用い、trinitrophenyl-conjugated keyhole limpet hemocyanin (TNP-KLH)の経気管内投与によってBALT過形成を惹起させ、感作recipientラットとした。一方、TNP-KLHの腸管内反復投与を行い、感作donorラットを準備し、腹式胸管リンパ排導法を用いて胸管リンパ球(thoracic duct lymphocytes; TDL)を採取した。腸管随伴リンパ組織(gut-associated lymphoid tissue; GALT)由来の抗原感作リンパ球の生体内分布を検索するため、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)でリンパ球( $1.0 \times 10^8$ 個)を標識し、感作recipientラットに静注したのちの標識リンパ球の分布を、peroxidase標識ウサギ抗FITC抗体による直接型免疫酵素抗体法で検出した。

実験群として、感作donor+感作recipient組合せ群(A群)と非感作donor+感作recipient組合せ群(B群)を、対照群として非感作donor+非感作recipient組合せ群(C群)を準備した。

- 2) TNF-KLHの経気管内投与後1~7日目に肺にBALTが過形成され、さらに気管支肺胞洗浄液内の

リンパ球数が増加することを確認し、BALT過形成ラットを実験的に作成することに成功した。

- 3) 腸管経由抗原感作ラットから採取した TDL 数が、非感作群と比べ有意に増加したことから、感作リンパ球がGALTから胸管リンパ内へ、さらに循環系へと動員されていることが明らかにされた。
- 4) CFSE 標識抗原感作リンパ球を感作 recipient ラットへ静注し BALT 内への分布を検索したところ、投与後 4 時間以降 BALT 内に選択的に分布しはじめ、12~24 時間後に B 群や C 群 (対照群) と比べ有意に増加していた。B 群では対照群と比べ増加傾向が認められた。これらの所見をもとに申請者は、抗原の経腸管感作による GALT 由来の活性化リンパ球が、過形成 BALT 内へ選択的にホーミングすると主張した。

以上の結果に対し審査委員会では、本研究は BALT の過形成に GALT 由来の抗原活性化リンパ球が BALT へ選択的に流入することが密接に関係することを明らかにするとともに、粘膜系免疫機構において BALT は従来考えられていたように気道系の誘導組織として作用するだけでなく、実効組織としても大きい役割を果たす可能性を示唆するものとして、高く評価された。

口頭発表において、申請者に対し次のような質問がなされた。

- 1) 感作抗原として TNP-KLH を選んだ理由
- 2) 感作の際フロイド完全アジュバントを用いた理由、および肺やその他の臓器での肉芽腫症の出現の有無について
- 3) 抗原の 2 次感作において静脈内や腹腔内投与を試みたか否か、またそれらと経気道的感作や経腸管的感作の効果との違いについて
- 4) 感作 donor ラットの TDL 中に含まれる活性化リンパ芽球の割合、および T 細胞亜群や B 細胞の比率について
- 5) 経気道的感作ラットと、経腸管的感作ラットの TDL の BALT へのホーミング能の違いについて
- 6) 非感作正常 TDL と、抗原活性化リンパ芽球分画の BALT へのホーミング能の違いについて
- 7) BALT における高内皮性細静脈の同定について
- 8) BALT におけるリンパ球ホーミング能の定量的検討について

これらの質問に対する申請者の解答は概ね適切であり、本研究での問題点を十分把握しており、本論文は博士 (医学) の学位論文にふさわしい内容を備えていると審査委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 筒井 祥博 副査 助教授 古川 福実