

A study of bronchus-associated lymphoid tissue in a rat model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*

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: 北澤, 浩 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1551

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	医博論第 274号	学位授与年月日	平成10年 3月 9日
氏名	北澤 浩		
論文題目	A study of bronchus-associated lymphoid tissue in a rat model of chronic pulmonary infection with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (緑膿菌によるラット慢性気道感染症モデルにおける気管支随伴リンパ組織に関する研究)		

博士(医学) 北澤 浩

論文題目

A study of bronchus-associated lymphoid tissue in a rat model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*

(緑膿菌によるラット慢性気道感染症モデルにおける気管支随伴リンパ組織に関する研究)

論文内容の要旨

[はじめに]

びまん性汎細気管支炎をはじめとする慢性気道感染症において、気管支随伴リンパ組織 (bronchus-associated lymphoid tissue: BALT) の過形成がしばしば観察される。しかしながら、その免疫学的防御に関する機能的側面の解明は十分でない。ラットにおいて慢性気道感染症モデルを作製し、慢性気道感染症におけるBALTの役割を明らかにすることを目的とした。

[材料ならびに方法]

慢性気道感染症モデルは慢性気道感染症患者より分離されたムコイド型、血清感受性の緑膿菌 Ym 株を、Cashらの方法に従い寒天ビーズに混入して雄SDラット (specific pathogen free, 6-8週令、150-200g) の気管内に25ゲージ針にて接種した。経時的な病態変化として、肺内緑膿菌量、病理組織像、免疫組織所見 (アビジンビオチン化酵素複合法)、気管支肺胞洗浄液 (BALF) および血清抗緑膿菌抗体価の推移につき検討した。免疫染色には、免疫酵素抗体として、OX6 (Ia)、W3/25 (helper T)、OX8 (non helper T)、抗 IgG、A、M 抗体を使用した。抗緑膿菌抗体価は Brettらの方法にほぼ準じ、ELISA法により測定した。すなわち、緑膿菌 Ym 株を $10,000 \times g$ 、10分間遠心後、 10^{10} cfu/ml となるように0.3%メチルグリオキサールを含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) に溶解したもの、0.5%グルタルアルデヒドPBS、1%牛血清アルブミンPBSを順次マイクロタイタープレートに加え、さらに適当に希釈した血清またはBALF、ビオチン標識抗ラットIgG、IgAまたはIgM抗体、アルカリホスファターゼストレプトアビジン、発色基質を反応させ、405nmにて吸光度を測定した。気管支肺胞洗浄は摘出した肺に生食5mlを気管より注入後吸引を2回繰り返しておこなった。

[結果]

10^6 cfuの緑膿菌混入寒天ビーズ液を気管内に注入すると、肺内緑膿菌量は1日目には 10^8 cfuに増加し、4日目には 10^5 cfuに減少し、以後漸減したが28日目には 10^4 cfu、70日目には 10^3 cfuを認めた。組織所見では7日目まで、末梢気道壁、気腔内に著しい好中球浸潤がみられ、以後リンパ球や泡沫細胞浸潤が主所見となった。BALTでは濾胞領域に7-28日目まで胚中心を認め、傍濾胞領域では7日目以後にリンパ管内のリンパ球集簇や、高内皮性細静脈の顕在化とリンパ球流入像がみられた。同時期にBALT過形成による気道の狭窄も観察された。

免疫組織所見では表面IgG (surface IgG:sIgG) 陽性細胞を除き、BALTと末梢気道壁の各免疫担当細胞はほぼ同様の推移を示した。4-7日目の所見ではIa抗原陽性細胞、helperT細胞、non-helperT細胞、sIgM陽性細胞、sIgA陽性細胞の増加がみられた。14日目まで helperT細胞が優位を示したが、21日目にはnon-helperT細胞が優位となり、28日目にはsIgM陽性細胞とsIgA陽性細胞は減少した。

抗緑膿菌IgM抗体価は、BALFでは4-14日目、血清では7-14日目に有意に上昇し、いずれも7日

目にピークがみられた。BALF 抗緑膿菌 IgA 抗体価は、7 日目以降有意に上昇し 28 日目にピークとなり以後低下したが、70 日目に至るまでコントロールに比して高値であった。血清抗緑膿菌 IgA 抗体価は 7 - 42 日目まで有意に上昇した。抗緑膿菌 IgG 抗体価は BALF、血清ともに 7 日目以降上昇し観察期間中引き続き増加した。

〔結論〕

ラットの気管内に緑膿菌混入寒天ビーズを接種することにより、ヒトの慢性細気管支炎に極めて類似した肺組織像を呈する実験動物モデルが作製された。このモデルにおける免疫組織所見、抗緑膿菌抗体価の検討では、BALT および末梢気道壁の各免疫担当細胞の推移と BALF 抗緑膿菌 IgA 抗体価の推移はほぼ一致していた。以上の所見より免疫グロブリン産生細胞は、少なくともその一部は過形成 BALT からもたらされている可能性が示唆され、BALT が慢性気道感染症における肺局所の免疫防御に重要な働きを担っていると推察された。

論文審査の結果の要旨

ヒトのびまん性汎気管支炎などの慢性気道感染症において、しばしば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。その際の感染局所での抗体産生における BALT の関与や役割については、まだ十分に解明されていない。そこで、申請者は慢性気道感染症実験モデルラットを用い、気道および気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) の免疫組織化学的ならびに免疫化学的検索をおこない、慢性気道感染症における BALT の免疫学的役割を解明した。申請者の口頭発表と論文について審査委員会において審査された結果、評価された点は次のとおりである。

1) 慢性気道感染症ラットおよび検索法に対する評価

成熟雄 SD ラットの気管内に緑膿菌 (Ym 株) 混入寒天ビーズを接種することにより、ヒトの慢性細気管支炎類似の肺組織像と病態を呈する慢性気道感染症実験モデルラットを準備し実験に供しているが、その作製法およびモデルの適格性について問題はないと評価された。また、免疫組織化学的染色法、肺内緑膿菌量の定量、および BALT と血清中抗緑膿菌抗体価の定量に関しても、方法論的にみて適切であると判定した。

2) 結果に対する評価

- (1) 10^6 cfu 緑膿菌混入寒天ビーズを気管内へ注入したところ、肺内緑膿菌は 1 日目をピークとし以後漸減したが、微量 (10^3 cfu) ではあるが 70 日目まで認められたことにより緑膿菌が遷延感作抗原として長期間作用する可能性を証明した。また病理組織学的検索により、気道壁とくに細気管支領域に好中球、リンパ球、泡沫細胞などの炎症細胞の浸潤を認め、また胚中心の発達したリンパ濾胞の増生を伴う BALT の過形成、および BALT による気道狭窄などの所見を認めている。これらの所見は緑膿菌による慢性気道感染症の病態と経過を的確に反映しているものと判定した。
- (2) 免疫組織化学的染色法により局所へ浸潤した各免疫系細胞を 70 日間にわたり検索し、各免疫担当細胞は BALT と末梢気道壁でほぼ同様の推移で分布することを明らかにした。すなわち、4 ~ 7 日目で $OX6^+$ (Ia^+) 細胞、 $W3/25^+$ (helper) T 細胞、 $OX8^+$ (non helper) T 細胞、 $sIgM^+$ 細胞、 $sIgA^+$ 細胞の増加がみられ、14 日目まで $W3/25^+$ T 細胞が優位であったが、21 日目では $OX8^+$ T 細胞が優位となり、28 日目には $sIgM^+$ 細胞と $sIgA^+$ 細胞は減少した。

一方、抗緑膿菌IgM抗体価はBALFと血清では、7日目をピークに上昇したが、IgA抗体価はBALFおよび血清で7日以降著しく増加し、70日以降も比較的高値を保った。IgG抗体価も、BALFと血清いずれもIgAとほぼ同様の傾向を示し、70日以降も引き続き増加した。

以上の所見をもとに申請者は、BALT および末梢気道壁の各免疫担当細胞の推移と、BALF 内抗緑膿菌抗体、とくにIgA抗体価の推移がほぼ一致することから、気道局所での抗体産生細胞、とくにIgA産生細胞は少なくともその一部は過形成BALTからもたらされたものであると主張している。

審査委員会では、これらの結果は慢性気道感染症に対する免疫防御、とくにIgA抗体産生部位としてBALTが重要な役割を果たすことをin vivoで実証したものであるとして高く評価した。

審査の過程において、申請者に対し次のような質問がなされた。

- 1) 緑膿菌としてムコイド型血清感受性Ym株を選んだ理由
- 2) Ym株を寒天ビーズに混入する理由と混入後の安定性
- 3) 気道内注入した緑膿菌寒天ビーズの気道壁への侵入部位はどこか、またその後どのように消失するか
- 4) 本実験モデルラットとヒトびまん性汎気管支炎との違いについて
- 5) BALTにおける高内皮性細静脈の出現時期と分布部位
- 6) 末梢気道壁、およびBALTにおけるマクロファージや形質細胞の分布・動態
- 7) 抗緑膿菌抗体産生におけるhelper T細胞の関与について
- 8) BALTにおけるムコイドに対する抗体産生

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、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 山下 昭

副査 教授 小出 幸夫 副査 教授 筒井 祥博