

マウスにおける結膜関連リンパ組織の検討

崎元 暢¹⁾, 庄司 純¹⁾, 齋藤 圭子²⁾, 稲田 紀子¹⁾, 岩崎 隆³⁾, 澤 充¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部眼科学教室, ²⁾ 銚子市立総合病院眼科, ³⁾ 東十条病院眼科

要 約

目 的：マウスの結膜関連リンパ組織を組織学的に検討した。

方 法：正常マウス(4～6 週齢)結膜での濾胞様組織の存在部位を組織学的に検討した。次いで、濾胞の抗原刺激による形態的变化を観察するために卵白アルブミンとコレラトキシン B の混合液を点眼し、経時的に検討するとともに、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 S-100 蛋白抗体で免疫組織学的に検討した。

結 果：濾胞様組織は瞬膜に存在する所見が得られた。濾胞様組織は抗原投与により拡大、増加した。免疫

組織学的検討では濾胞様組織内に CD4, CD8 陽性細胞, S-100 蛋白陽性細胞があった。また、上皮間ポケット内にも CD4 陽性細胞があった。

結 論：マウス瞬膜の濾胞様組織は結膜関連リンパ組織であることを示す所見が得られた。(日眼会誌 106: 3—8, 2002)

キーワード：結膜関連リンパ組織, 濾胞, 免疫組織, マウス, 瞬膜

Histological Study of Conjunctiva-associated Lymphoid Tissue in Mice

Tohru Sakimoto¹⁾, Jun Shoji¹⁾, Keiko Saito²⁾, Noriko Inada¹⁾, Yutaka Iwasaki³⁾ and Mitsuru Sawa¹⁾

¹⁾ Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

²⁾ Eye Clinic, Choshi City Hospital

³⁾ Eye Clinic, Higashijyujo Hospital

Abstract

Purpose : To investigate conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in mouse conjunctiva.

Method : We examined normal mice, ranging in age from 4 to 6 weeks, to investigate the presence of follicular tissue histologically. Next, we treated mice by topical instillation of ovalbumin and cholera toxin B, and then examined conjunctival follicles by immunohistological methods.

Results : Follicular tissue was present at the nictitating membrane. Both size and amount of follicular tissue was increased by the topical ovalbumin treatment. Immunohistological examination

revealed CD4, CD8, and S-100 protein positive cells in follicular tissue. The epithelial layer, corresponding to follicular tissue, had intraepithelial pockets and CD 4 positive cells in the pockets.

Conclusion : It was concluded that the follicular tissue at the nictitating membrane is CALT in mice. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 3—8, 2002)

Key words : Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT), Follicle, Immunohistology, Mouse, Nictitating membrane

I 緒 言

結膜組織には結膜関連リンパ組織(conjunctiva-associated lymphoid tissue, CALT)と呼ばれるリンパ組織が存在しており、結膜の局所免疫において重要な役割を担っている¹⁾²⁾。CALT は、結膜下組織にリンパ球の集簇を主体として形成されるリンパ濾胞様組織で、組織学的には濾胞域、傍濾胞域、円蓋域、リンパ上皮に大別さ

れる。また、CALT は結膜嚢内に侵入する外来抗原に対して抗原特異的 IgA 産生前駆 B 細胞を誘導する機能を有するとされている³⁾⁴⁾。

これまでに CALT の存在は、ヒト⁵⁾、サル⁶⁾、ウサギおよびモルモット¹⁾²⁾で報告されている。モルモットにおいては、下眼瞼の瞼結膜から円蓋部にかけて、肉眼でも視認可能な大型の CALT が存在することから、これまでに様々な組織学的、免疫学的検討が加えられてき

別刷請求先：173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 崎元 暢
(平成 13 年 3 月 9 日受付, 平成 13 年 5 月 28 日改訂受理)

Reprint requests to : Tohru Sakimoto, M. D. Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine.
30-1 Ooyaguchikami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan

(Received March 9, 2001 and accepted in revised form May 28, 2001)

た。サルにおいては、高内皮細静脈(high endothelial venule, HEV)や鎖状構造を有するリンパ管を伴う結膜濾胞の形態学的研究の報告⁶⁾があり、ヒトにおいてはびまん性あるいは濾胞状 CALT の免疫組織学的研究が報告⁵⁾されている。

一方、マウスでは鼻咽頭における nasopharyngus-associated lymphoid tissue(NALT)や、腸管におけるパイエル板や孤立リンパ小節などの gut-associated lymphoid tissue(GALT)の存在が既に明らかにされ、マウスの NALT および GALT を含めた粘膜関連リンパ組織を介した免疫応答に関する研究がなされている^{7)~10)}。しかし、CALT に関する報告はこれまでにない。

今回、我々はマウスにおける CALT の存在について組織学的に検討した。

II 実験方法

実験動物には、specific pathogen free(SPF)下で飼育した 4~6 週齢 BALB/c 雌マウス 18 匹 36 眼を使用し、以下に述べる検討項目について組織学的に検討した。

1. 正常マウス結膜の組織学的検討

非処置マウス 3 匹 6 眼を頸椎脱臼により屠殺後、眼球を眼瞼とともに摘出し、カルノア液で固定した。上昇アルコール系列で脱水後、Tecnovit 7100[®] (Heraeus 社)で包埋した後、ミクロトームで約 7 μ m の連続切片を作製した。染色はヘマトキシリン・エオジン染色とギムザ染色を行い、光学顕微鏡(BH-2, オリンパス)で観察した。

2. 濾胞様組織の抗原投与による経時的変化

処置群 9 匹 18 眼と非処置群 3 匹 6 眼とに分けて検討した。抗原として卵白アルブミン(ovalbumin, OVA) (Sigma Chemical 社) 0.25 μ g/ml, およびアジュバンドとしてコレラトキシン B(cholera toxin B, CTB) (List Biological Laboratories 社) 0.1 μ g/ml を含有した OVA 点眼液を作製した。処置群は、OVA 点眼液 0.05 ml を 1 日 1 回、両眼に実験開始日、および実験開始後 1, 7, 8 日目に点眼することで抗原投与を行った。そして実験開始後 2, 9, 14 日目にそれぞれ 3 匹 6 眼ずつ眼球、眼瞼を摘出し、上記検討項目 1. と同様の方法で連続切片を作製し、検討を行った。また、非処置群は OVA 点眼液の点眼を行わない群とし、14 日目に眼球、眼瞼を摘出し、ギムザ染色による同様の検討を行った。

3. 濾胞様組織の免疫組織学的検討

3 匹 6 眼に対し、OVA 点眼液を実験開始日、および実験開始後 1, 7, 8 日目に点眼し、9 日目に眼球、眼瞼を摘出した。2% periodate lysin paraformaldehyde (PLP) 溶液で 1 時間固定後、Tissue-Tek[®] (サクラ精機)に包埋し、ドライアイスイソペンタンで急速凍結した。凍結した試料は、クライオスタットを用いて約 7 μ m 厚の連続切片を作製し、抗マウス CD 4 モノクロー

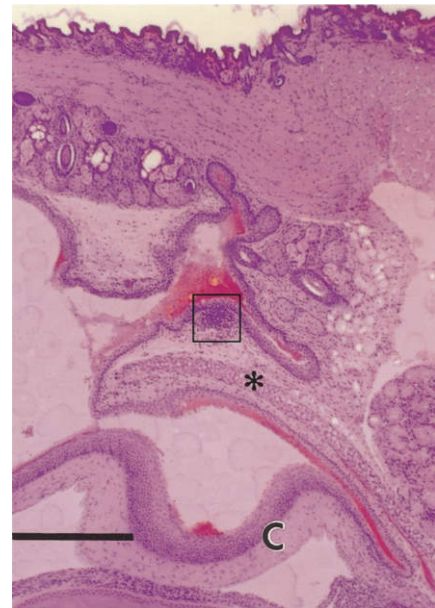


図 1 正常マウスの濾胞様組織(ヘマトキシリン・エオジン染色)。

軟骨組織を伴った瞬膜(*)が円蓋部からのびている。瞬膜には濾胞様組織(□)が存在している。図上方は眼瞼、下方は角膜(C)。バーは 500 μ m

ナル抗体(Immunotech 社), 抗マウス CD 8 モノクローナル抗体(Immunotech 社), 抗ウシ脳 S-100 蛋白ウサギ抗体(Serotec 社)を一次抗体とし、間接酵素抗体法(avidin-biotin complex 法, ABC 法)で染色した。ABC 法には Vectastain ABC kit[®] (Vector 社)を用い、ペルオキシダーゼの発色には 3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩(和光純薬)で作製した Karnovsky 液を用いた。核染色はメチルグリーン染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

III 結果

1. 正常マウス結膜の組織学的検討

軟骨組織を伴った瞬膜が内眼角部側に存在していた。瞬膜は結膜で覆われ、結膜下組織には、リンパ球の集簇を主体とする濾胞様組織が 1 か所のみ存在していた(図 1)。周囲の結膜上皮には胚細胞(goblet 細胞)があったが、濾胞様組織を覆う上皮には goblet 細胞はなかった(図 2)。

2. 濾胞様組織の抗原投与による経時的変化

処置群では、処置群 2 日目において、瞬膜に加え円蓋部にも濾胞様組織が存在していた(図 3)。処置群 9 日目において、連続切片で観察したところ濾胞様組織が瞬膜の複数か所に存在していた(図 4)。非処置群では検討 1. と同様 1 か所のみであった。また、処置群 9 日目において、濾胞様組織を覆う上皮には上皮細胞の細胞質の変形および浸潤細胞の集簇により形成された上皮間ポケットが存在した(図 5)。処置群 14 日目においても瞬膜の複

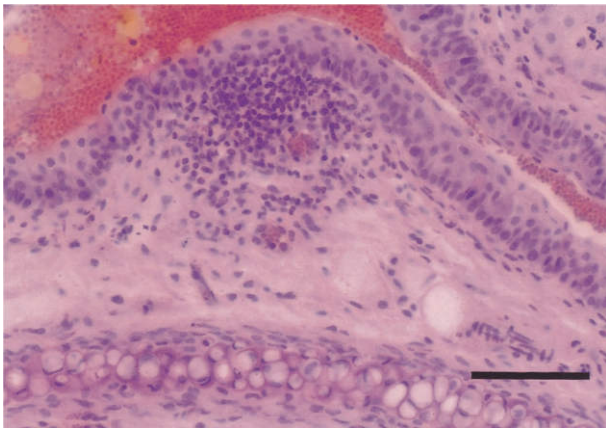


図 2 濾胞様組織の拡大図(ヘマトキシリン・エオジン染色)。

図 1 □ の強拡大写真。濾胞様組織直上の結膜上皮に胚細胞(goblet 細胞)はない。バーは 100 μm

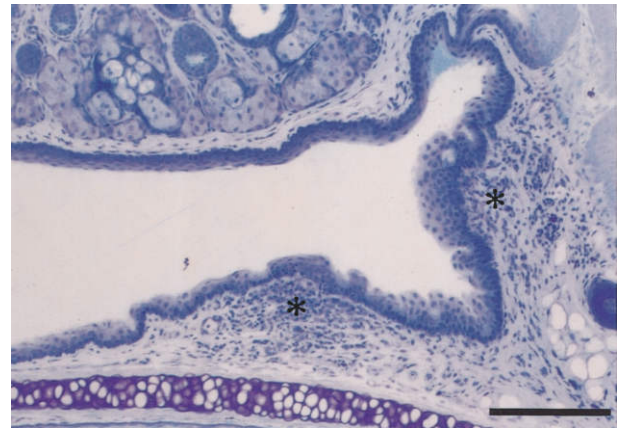
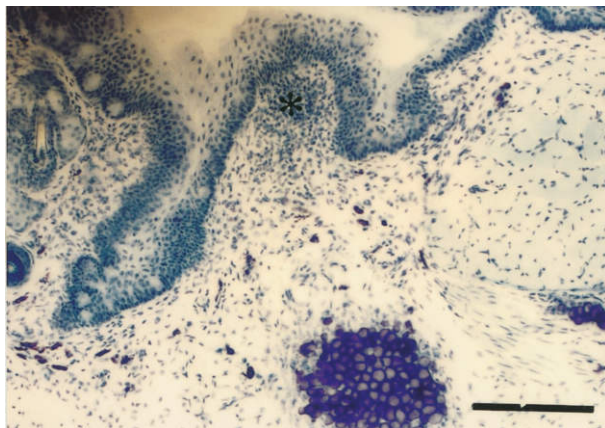
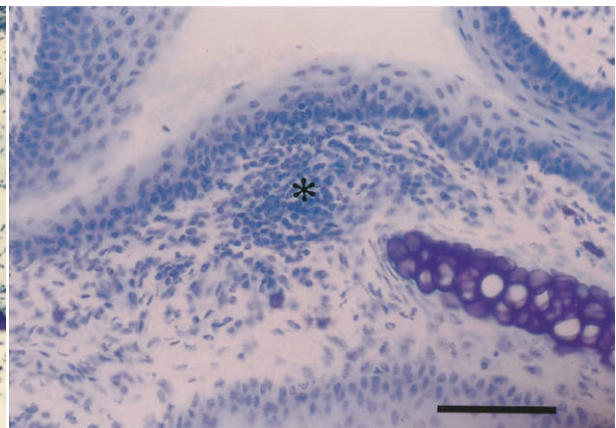


図 3 処置群 2 日目の濾胞様組織(ギムザ染色)。

円蓋部および瞬膜に濾胞様組織(*)が存在している。バーは 200 μm



A



B

図 4 9 日目の濾胞様組織(ギムザ染色)。

濾胞様組織(*)が複数か所ある(同一眼)。

A: 円蓋部, バーは 100 μm B: 瞬膜中央部, バーは 200 μm

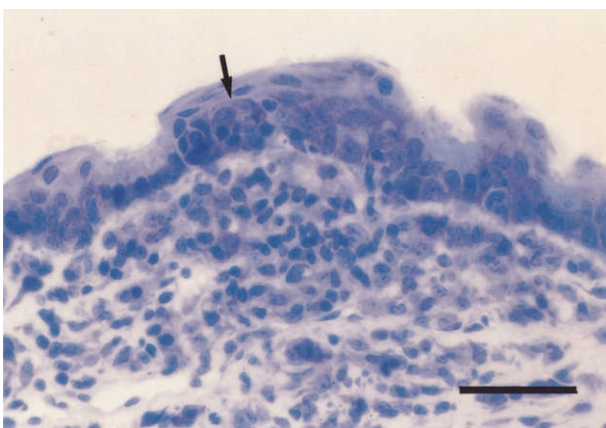


図 5 処置群 9 日目の上皮間ポケット(ギムザ染色)。

上皮間ポケットの形成がある(矢印)。バーは 50 μm

数か所に濾胞様組織があったが、個々の濾胞様組織は処置群 9 日目と比較して小さかった(図 6)。

3. 濾胞様組織の免疫組織学的検討

濾胞様組織とその周囲に細胞膜表面が陽性に染色される CD4, CD8 陽性細胞が存在していた(図 7, 8)。CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の分布領域に明確な違いはなかった。また、濾胞様組織の直上にあつた上皮間ポケット内には CD4 陽性細胞が存在していた(図 9)。一方、抗 S-100 蛋白抗体を用いた検討では、網目状に染色される S-100 陽性像が濾胞様組織の中心部と考えられる領域にあつた(図 10)。

IV 考 按

現在までに CALT が存在すると報告されている動物種では、その組織学的証明手法は研究者により若干の差異はあるものの、おおむね次の 3 点が共通のものとなっている。すなわち、① 濾胞域、傍濾胞域、リンパ上皮

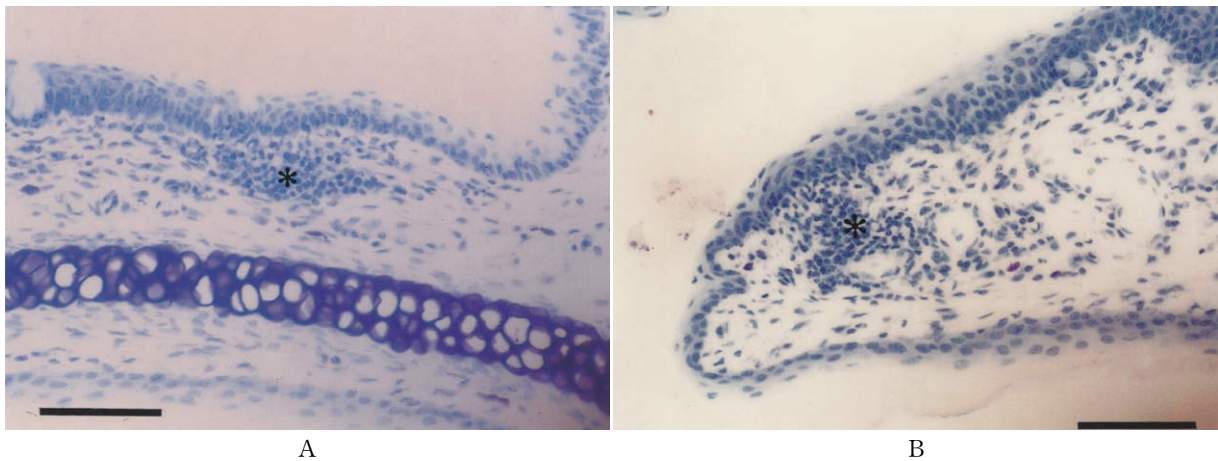


図 6 処置群 14 日目の濾胞様組織(ギムザ染色).
濾胞様組織(*)が複数か所あるが、縮小傾向にある(同一眼).
A: 瞬膜の円蓋部側, バーは 100 μm B: 瞬膜先端, バーは 100 μm

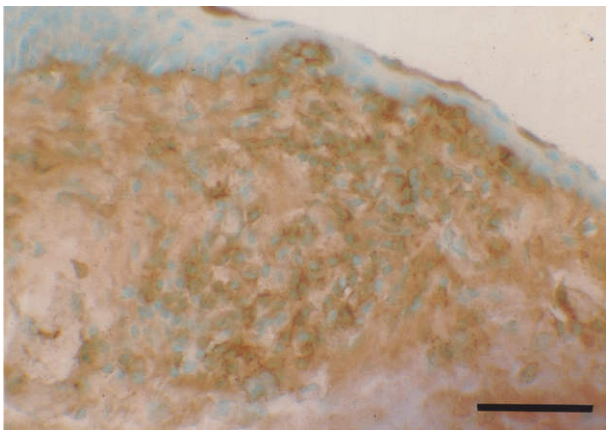


図 7 抗 CD4 抗体(間接酵素抗体法).
細胞周囲が CD4 陽性に染色されており、一部は上皮間ポケット内にも存在している。バーは 100 μm

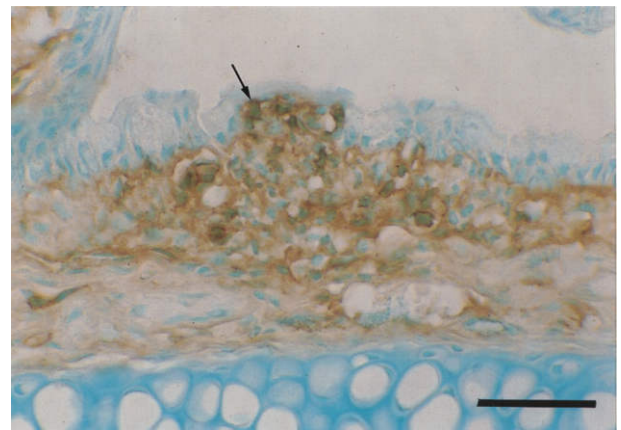


図 9 抗 CD4 抗体(間接酵素抗体法).
上皮間ポケット内の細胞が陽性に染色されている(矢印). バーは 100 μm

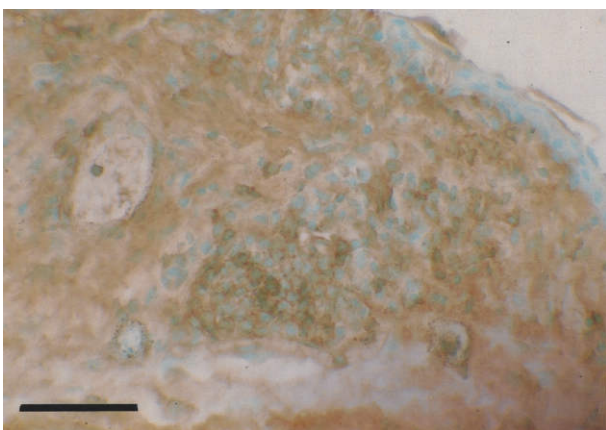


図 8 抗 CD8 抗体(間接酵素抗体法).
細胞周囲が CD8 陽性に染色されている。バーは 100 μm

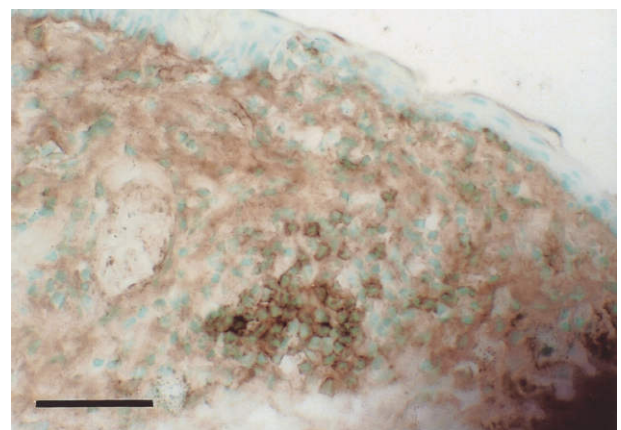


図 10 抗 S-100 蛋白抗体(間接酵素抗体法).
濾胞様組織の中心部に網目状の S-100 陽性像がある。
バーは 100 μm

など, CALT を構成する各組織の証明¹⁾³⁾⁵⁾⁶⁾¹¹⁾, ② CALT 内の各種リンパ球の証明⁵⁾⁶⁾¹²⁾, ③ リンパ上皮内の抗原提示の場である上皮間ポケットの証明³⁾, である。

1. CALT を構成する各組織の証明

腸管においては GALT の概念が確立する以前から、パイエル板などの末梢リンパ組織の存在が証明されてお

り、SPF 環境下や生下時の GALT においては、リンパ組織の発達、特に濾胞域の胚中心や傍濾胞域で未熟であること¹³⁾、それら未熟リンパ組織は抗原投与により活性化されること¹⁴⁾が明らかにされている。NALT では、生下時のマウスにおいて I region associated antigen (Ia 抗原)陽性樹状細胞を伴う B リンパ球領域がまず発達し、生後 7, 14 日と成長するにつれ HEV を伴う T リンパ球領域が遅れて発達すると報告¹⁵⁾されている。しかし、マウス NALT は生後 4 週間でほぼ成熟するものの、明らかな濾胞域、傍濾胞域は形成しないとされている。ヒト CALT においても同様に明らかな濾胞域、傍濾胞域は形成しない⁵⁾。今回の我々の検討では、まず、正常マウスを用いた実験では、瞬膜に濾胞様組織があったものの、その組織はモルモット CALT などにおいてあるような濾胞域、傍濾胞域、円蓋域といった分節構造を有しない、小規模なものであった。今回の抗原投与は、インフルエンザワクチンなどで使用されている投与方法¹⁰⁾に準じて、OVA+CTB 溶液を点眼するという方法で行った。抗原投与により、濾胞様組織は増大傾向を示すとともに、複数か所出現したが、その増大した濾胞様組織においても濾胞域と傍濾胞域との区別はつかなかった。また、いったん増大した濾胞様組織も抗原投与から日数を経るに従い、縮小するとの結果となった。つまり、マウスの GALT と NALT で組織学的構造が異なるように、マウス結膜の濾胞様組織は NALT 類似の構造で、濾胞域と傍濾胞域が明確には区別されない組織であると考えられた。

一方、抗 S-100 蛋白抗体を用いた免疫組織学的検討では網目状の陽性染色像があった。濾胞域は B リンパ球に対する抗原提示能を有する濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell, FDC) が網目状の三次元構造を形成し、その中に B 細胞が存在する形態をとっている¹⁶⁾。高浦ら¹⁷⁾はモルモットアレルギー性結膜炎モデルにおいて、抗 S-100 蛋白抗体を用いて、CALT 胚中心における S-100 蛋白陽性細胞を証明し、FDC の存在を推定している。つまり、今回の S-100 蛋白陽性像は、FDC の存在を示す所見であるとともに、濾胞域に相当する領域が存在していることを意味するものであると考えられた。

2. CALT 内の各種リンパ球の証明

今回、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体の 2 種類の抗体を選択した。パリエル板では CD4 陽性 T リンパ球や CD8 陽性 T リンパ球などの T リンパ球は傍濾胞域、円蓋域を中心に存在している。マウス NALT や GALT では、T 細胞領域において CD4, CD8 陽性細胞が存在しているが、その存在比率はおおよそ 4:1 とされている¹⁸⁾。今回の我々の検討では、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体は濾胞様組織内で陽性像を示し、濾胞様組織内に T 細胞領域が形成されていることが示されたと考えられた。

3. リンパ上皮内の上皮間ポケット

リンパ上皮は、上皮内に上皮間ポケット (intraepithelial pocket) と呼ばれる細胞質のくぼみが存在することが組織学的特徴とされている。庄司ら³⁾はモルモットの CALT を覆うリンパ上皮内にその存在を報告している。今回の我々の検討でも、9 日目に摘出した群において上皮間ポケットの形成を確認しており、免疫組織学的検討でも上皮間ポケット内に CD4 陽性細胞が存在した。この陽性像は、抗原物質が上皮内に取り込まれることにより上皮間ポケットが形成され、それに向かいリンパ球が遊走してきていることを示していると考えられ、この濾胞様組織上に存在する上皮はリンパ上皮であると考えられた。

今回の我々の検討では、抗原投与による濾胞様組織の拡大、増加傾向が示された。また、濾胞様組織がリンパ球の集簇した組織であったこと、S-100 蛋白陽性の網目状構造により濾胞域と考えられる領域が確認でき、加えて、T 細胞領域や上皮間ポケットを形成するリンパ上皮が観察できた。以上の結果から、マウスの瞬膜に存在する濾胞様組織は CALT であると考えられた。

文 献

- 1) Chandler JW, Gillette TE: Immunologic defense mechanisms of the ocular surface. *Ophthalmology* 90: 585—591, 1983.
- 2) Tomasi TB Jr, Larson L, Challacombe S, McNabb P: Mucosal immunity: The origin and migration patterns of the cells in the secretory system. *J Allergy Clin Immunol* 65: 12—19, 1980.
- 3) 庄司 純, 稲田紀子, 葛西 浩, 石井康雄, 北野周作: 外来抗原に対する結膜リンパ装置の反応. *日眼会誌* 96: 432—439, 1992.
- 4) Franklin RM, Remus LE: Conjunctival-associated lymphoid tissue: Evidence for a role in the secretory immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 181—187, 1984.
- 5) Knop N, Knop E: Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1270—1279, 2000.
- 6) Ruskell GL: Organization and cytology of lymphoid tissue in the cynomolgus monkey conjunctiva. *Anat Rec* 243: 153—164, 1995.
- 7) 一宮一成, 鈴木正志, 肖 艶靈, 黒野祐一, 茂木五郎: マウス鼻粘膜における IgA 応答の組織学的検討. *耳鼻免疫アレルギー* 16: 16—20, 1998.
- 8) 柳田 学, 清野 宏: IgA 抗体産生に対する経口免疫と経鼻免疫の効果の相違. *臨床免疫* 33: 519—524, 2000.
- 9) 田畑泰彦, 筏 義人: 腸管免疫と経口ワクチン. *臨床消化器内科* 15: 323—329, 2000.
- 10) Hirabayashi Y, Kurata H, Funato H, Nagamine T, Aizawa C, Tamura S, et al: Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine

- combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. *Vaccine* 8 : 243—248, 1990.
- 11) 稲田紀子, 庄司 純, 高浦典子, 澤 充 : 結膜関連リンパ装置におけるリンパ球ホーミングの形態学的検討. *日眼会誌* 99 : 1111—1118, 1995.
- 12) 田川義継, 斉藤 学, 小阪 貴, 竹内 勉, 松田英彦, 高見 剛, 他 : ヒト結膜濾胞のリンパ球サブセット. *臨眼* 40 : 239—242, 1986.
- 13) Nagura H : Mucosal defence mechanism in health and disease : Role of the mucosal immune system. *Acta Pathol Jpn* 42 : 387—400, 1992.
- 14) Pollard M, Sharon N : Responses of the Peyer's patches in germ-free mice to antigenic stimulation. *Infect Immun* 2 : 96—101, 1970.
- 15) van der Ven I, Sminia T : The development and structure of mouse nasal-associated lymphoid tissue. *Reg Immunol* 5 : 69—75, 1993.
- 16) Shoji J, Inada N, Saito K, Takaura N, Iwasaki Y, Sawa M : Immunohistochemical study on follicular dendritic cell of conjunctiva-associated lymphoid tissue. *Jpn J Ophthalmol* 42 : 1—7, 1998.
- 17) 高浦典子, 稲田紀子, 庄司 純, 澤 充 : 結膜における S-100 蛋白陽性細胞の分布. *日眼会誌* 99 : 873—877, 1995.
- 18) 福山 聡, 廣井隆親, 清野 宏 : 鼻粘膜の免疫. *臨床免疫* 34 : 239—247, 2000.
-