

外来抗原に対する結膜リンパ装置の反応

庄司 純¹⁾, 稲田 紀子¹⁾, 葛西 浩¹⁾, 石井 康雄²⁾, 北野 周作¹⁾

¹⁾日本大学医学部眼科学教室, ²⁾新川橋病院眼科

要 約

ocular surface の局所免疫は、主として conjunctival-associated lymphoid tissue (CALT), 分泌型 IgA および免疫担当細胞によってつかさどられている。今回我々は、モルモットに horseradish peroxidase (HRP) を点眼することによって、ocular surface に抗原が侵入してきた際の CALT の変化を PAS 染色, peroxidase 染色およびアルカリフォスファターゼ染色を用いて組織学的に、経時的に検討した。CALT のリンパ上皮細胞は、HRP 点眼 30 から 60 分後に HRP を貪食し、24 時間経過すると intraepithelial pocket を形成した。HRP 点眼 2 週間後では CALT の濾胞域がアルカリフォスファターゼ反応強陽性を示した。これらの変化は、ocular surface における局所免疫発現の最初のステップであると考えられた。また、各染色法においてリンパ上皮と結膜上皮の間に相違が見られ、リンパ上皮は結膜上皮とは異なった性質を有していると考えられた。(日眼会誌 96: 432-439, 1992)

キーワード：結膜リンパ装置, リンパ上皮, 局所免疫, Ocular surface, 西洋ワサビペルオキシダーゼ

Immunoresponses to the External Antigen in Conjunctival-associated Lymphoid Tissue

Jun Shoji¹⁾, Noriko Inada¹⁾, Hiroshi Kasai¹⁾, Yasuo Ishii²⁾ and Shusaku Kitano¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nihon University

²⁾Eye Clinic, Shinkawabashi Hospital

Abstract

The local immunity of the ocular surface is governed by conjunctival-associated lymphoid tissue (CALT), secretory IgA and immunocytes. The authors performed a histological investigation of the time-course changes in CALT caused by invasion of antigen to the ocular surface through the instillation of horseradish peroxidase (HRP) into the guinea pig eye. We used PAS staining, peroxidase staining, alkaline phosphatase staining. The lymphoepithelial cells of CALT phagocytosed HRP 30-60 min after the instillation, and formed intraepithelial pockets 24 hours after instillation. The follicular area of CALT was strongly positive for alkaline phosphatase 2 weeks after instillation. These changes were considered to be the first step in the manifestation of local immunity on the ocular surface. Each staining technique revealed differences between the lymphoepithelium and conjunctival epithelium, suggesting that lymphoepithelium has characteristics different from those of conjunctival epithelium. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 432-439, 1992)

Key words: Conjunctival-associated lymphoid tissue, Lymphoepithelium, Local immunity, Ocular surface, Horseradish peroxidase

別刷請求先：173 板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 庄司 純
(平成 3 年 4 月 26 日受付, 平成 3 年 9 月 19 日改訂受理)

Reprint requests to: Jun-Shoji, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nihon University,
30-1 Ōyaguchikami-machi, Itabashi-ku 173, Japan

(Received April 26, 1991 and accepted in revised form September 19, 1991)

I 緒 言

全身の粘膜組織は、常に異物、異種蛋白、細菌など種々の外来抗原と接しているが、これらの抗原が粘膜内に侵入しないように粘膜組織には第一線生体防御機能 (first defense line) と呼ばれる防御機能が備わっている¹⁾。第一線生体防御機能の中の一つに、局所免疫と呼ばれる防御機構が存在するが、これは、分泌型 IgA, mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) と総称されるリンパ装置、および免疫担当細胞の働きによって外来抗原が粘膜に侵入するのを免疫応答によって防御する機構であり、生体内に侵入した抗原に対する免疫応答である全身免疫とは区別されている。局所免疫による免疫応答が行われるためには、まず MALT によって抗原が認識されることが不可欠となる。そして一度、抗原が認識されれば、その抗原に対する特異的な免疫応答が IgA などを介して行われるとされている。

MALT には、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)、気管支における bronchial-associated lymphoid tissue (BALT) などのリンパ装置が含まれているが、ocular surface においても同様のリンパ装置が発見され、1980年 Chandler ら²⁾によって conjunctival-associated lymphoid tissue (CALT) と呼ばれる結膜リンパ装置として報告された。

今回、我々は、モルモットに抗原を点眼して実験し、形態学的に検討した結果、ocular surface に抗原が侵入してきた際の CALT の変化を組織学的にとらえることができたので報告する。

II 実験方法

実験動物には、350~500 g 白色ハートレー系モルモットを使用した。また、抗原には、horseradish peroxidase (和光純薬工業: HRP) 10 mg を 1 ml の生理食塩水に溶解して用いた (HRP 溶液)。

HRP 溶液と Freund's complete adjuvant の等量混合液を乳化後、モルモットの両眼に 1 回、0.1 ml を点眼した。点眼後、30, 60 分、3, 12, 24 時間、1, 2, 3 週間と経時的に眼瞼および眼球を摘出した。また、無処置のまま摘出した試料を対照として用いた。各試料は、下記のごとく固定、染色し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡にて観察した。

1. Periodic acid Schiff 染色 (PAS 染色)

試料は、4%パラホルムアルデヒド [0.1 M phosphate buffered saline (PBS) pH=7.4] にて 12 時間固定した後、アルコール系列にて脱水、キシロールにて透徹し、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋された試料をマイクロームにて薄切し、脱パラフィンを行った後、染色を行った。染色は、まず、0.5%過ヨウ素酸水溶液中で 5 分反応させた後、洗浄し、さらにシッフ試薬で 15 分反応させ、亜硫酸水で 3 分間、3 回洗浄し、さらに流水にて洗浄した。核染色には、マイヤーのヘマトキシリンを用いた。

2. Peroxidase 染色

試料は、2%グルタルアルデヒドおよび 2%パラホルムアルデヒドの等量混合液 (0.1 M PBS pH=7.4) にて 1 時間固定した後、細切し、0.1 M PBS にて洗浄した。その後、試料を Graham-Karnovsky 法 [0.005% H₂O₂ 加 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 溶液・Tris/HCl buffer pH=7.6] にて発色させた。内因性 peroxidase を阻止するために、DAB 溶液に、65 mg/dl のアジ化ナトリウムを加えた。さらに、1%オスミウム酸にて 1 時間後固定した後、アルコール系列にて脱水し、エポキシ樹脂 (エポック 812) にて包埋後、マイクロームにて薄切した。光学顕微鏡用切片は、トリジンブルー染色し、透過型電子顕微鏡用超薄切片は、ウラニールアセテートおよびクエン酸鉛の二重染色を行った。

3. アルカリフォスファターゼ染色

試料は、periodate-lysin paraformaldehyde (PLP) 溶液にて 12 時間固定後、OCT compound に包埋し、ドライアイスイソペンタンにて急速凍結した。凍結した試料は、クライオスタットにて薄切し、アルブミンスライドに塗布した後、風乾した。染色は、アゾ色素法 [naphthol AS-MX phosphoric acid (disodium salt) 10 mg, 0.05 mol/l AMP 緩衝液 (pH=9.8) 20 ml, fast red violet LB salt 10 mg の混合液] を用いて行った。

III 結 果

対照および HRP 点眼処置を行ったどの試料においても、下眼瞼の瞼結膜から円蓋部にかけて、主に鼻側に大きな濾胞構造が認められた。組織学的に濾胞は、リンパ濾胞様の構造を呈しており、中心には、胚中心を持った濾胞域、その側方には傍濾胞域、上方には円蓋域を認め、表層は上皮によって被われていた (図 1)。

1. PAS 染色

リンパ濾胞に隣接する結膜上皮には、細胞質が赤く染色される PAS 反応陽性の goblet 細胞を多数認めた。一方、リンパ濾胞を被う上皮には goblet 細胞はほとんど認められなかった (図 2)。

2. Peroxidase 染色

HRP 点眼 30 から 60 分後の試料を、透過型電子顕微鏡にて観察してみると、リンパ濾胞を被う上皮の最

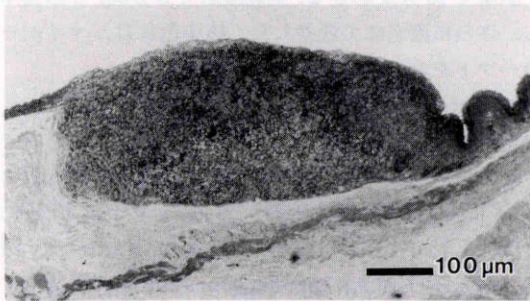


図1 結膜リンパ装置。瞬結膜から円蓋部にかけてリンパ濾胞構造を認める (光学顕微鏡写真・トルイジンブルー染色, $\times 90$)。

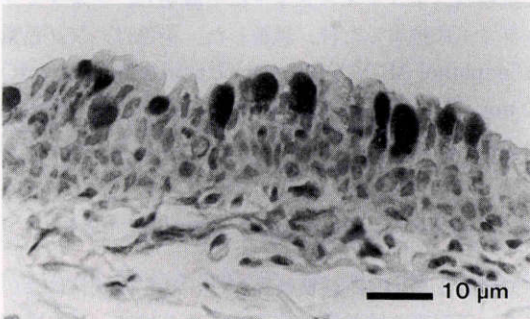
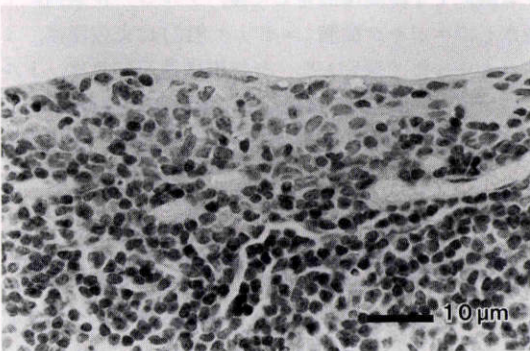


図2 対照のリンパ上皮 (上段)・結膜上皮 (下段)。結膜上皮には PAS 染色陽性の goblet 細胞を多数認めるが、リンパ上皮には goblet 細胞は認められず、上皮内には多数のリンパ球の浸潤を認める (光学顕微鏡写真・PAS 染色, $\times 880$)。

表層の上皮細胞は、microvilli が長短不規則で、細胞質内には、vesicle や mitochondria が多数存在する大型の細胞が大半をしめていた。また、最表層の上皮細胞の vesicle 内に electron dense な顆粒が認められ、peroxidase 反応は陽性であったが、上皮細胞の細胞間隙は、peroxidase 反応陰性であった (図 3)。また、最表層の上皮細胞直下には、1~2 個ずつ散在性にリンパ球が認められた (図 4)。さらに、上皮の基底部では、円蓋域と基底膜によって境されていたが、リンパ球が基底細胞の間隙を通過している所見が所々に認められ (図 5)、その部位より上方の上皮層内には、塊状になったリンパ球の浸潤を認めた (図 6)。また、隣接する結膜上皮細胞の中に、細胞質内に peroxidase 反応陽性の顆粒を認める細胞が少数ながらも存在した。

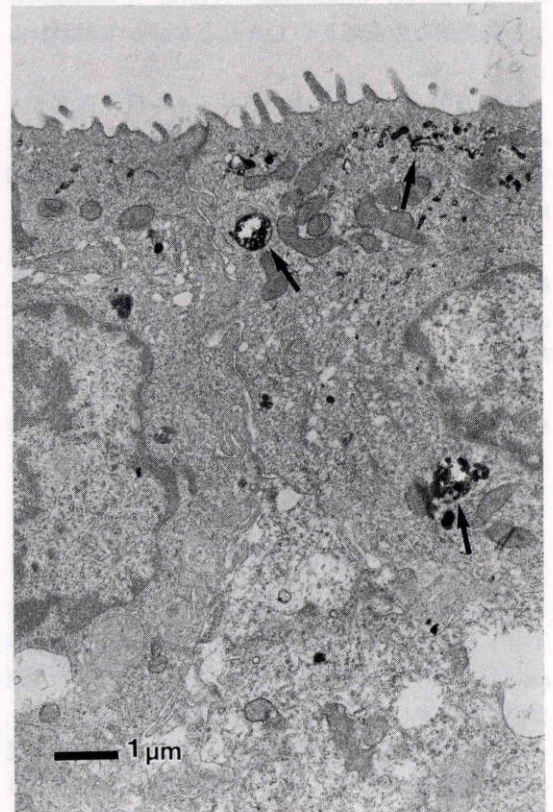


図3 HRP 点眼 30 分後のリンパ上皮細胞。リンパ上皮細胞の細胞質には多数の vesicle が認められ、vesicle 内には pinocytose した HRP が peroxidase 反応陽性として観察される (矢印)。細胞間隙は peroxidase 反応陰性である (透過型電子顕微鏡写真・peroxidase 染色, $\times 8,115$)。

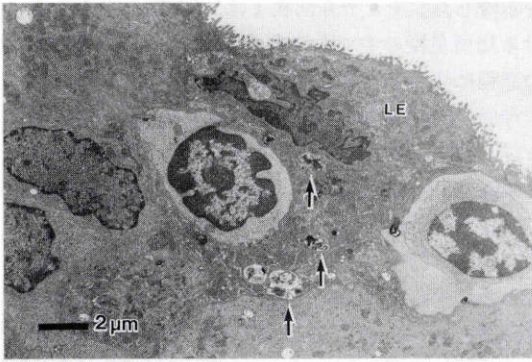


図4 HRP点眼60分後のリンパ上皮。リンパ上皮細胞 (lymphoepithelium: LE) 内には pinocytose した HRP が認められ (矢印), リンパ上皮細胞の細胞間隙にはリンパ球が認められる (透過型電子顕微鏡写真・peroxidase 染色, $\times 3,130$).

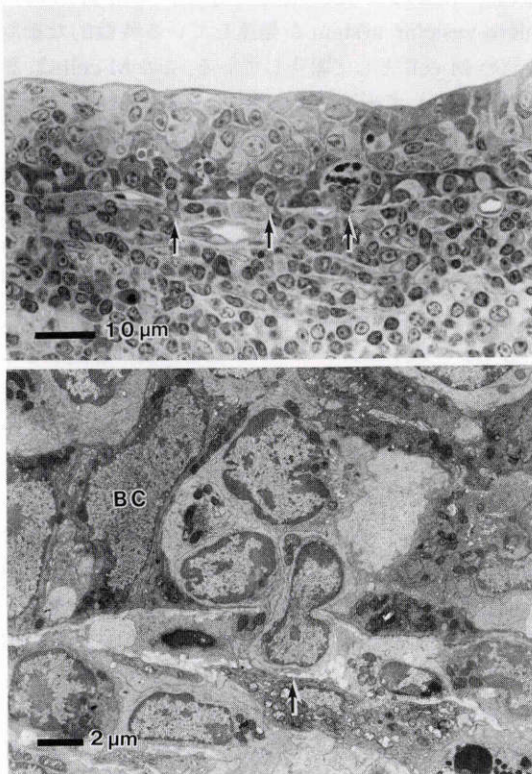


図5 HRP点眼60分後のリンパ上皮(基底部)。リンパ上皮の基底細胞 (basal cell: BC) の細胞間隙をリンパ球が通過している (矢印) (上段: 光学顕微鏡写真・トルイジンブルー染色, $\times 825$, 下段: 透過型電子顕微鏡写真・peroxidase 染色, $\times 3,070$).

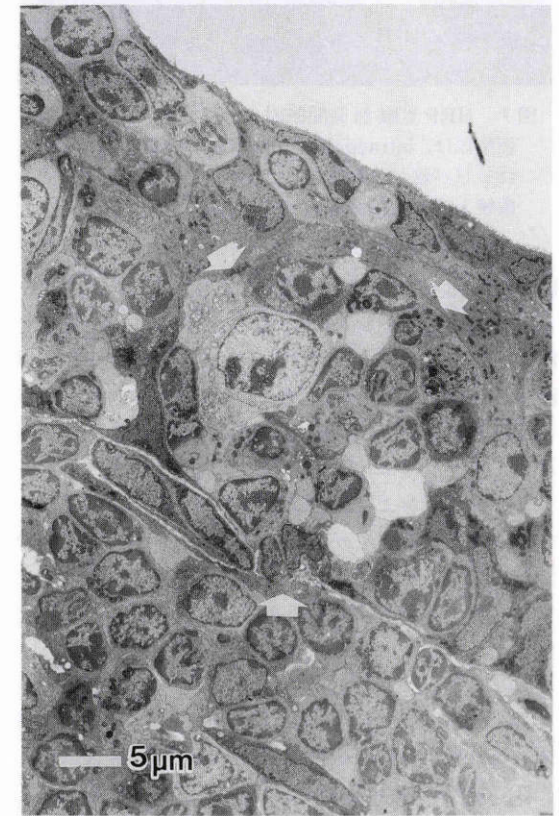


図6 HRP点眼60分後のリンパ上皮。リンパ上皮の基底細胞間隙をリンパ球が通過しており, 上皮内には浸潤したリンパ球が一塊となって認められる (矢印) (透過型電子顕微鏡写真・peroxidase 染色, $\times 1,545$).

HRP点眼後24時間を経過する頃になると, リンパ濾胞を被う上皮の最表層の上皮細胞直下には多数のリンパ球が認められるようになり, リンパ球は上皮細胞によって包みこまれたようになっている所見が得られ (図7), さらに, 1週間後では, リンパ球を包みこんだ上皮細胞の部分はこぶ状に突出してきている像が認められた (図8). これに対して, リンパ濾胞に隣接した結膜上皮には, リンパ球や形質細胞の浸潤が散在性に認められたが, リンパ濾胞を被う上皮に認められたような上皮細胞直下に多数のリンパ球が集簇しているような所見は認められなかった.

3. アルカリフォスファターゼ染色

対照の試料では, アルカリフォスファターゼ反応陽性細胞が, 傍濾胞域に比較的多く存在しており, 濾胞域には, 僅かにしか認められなかった (図9). HRP点

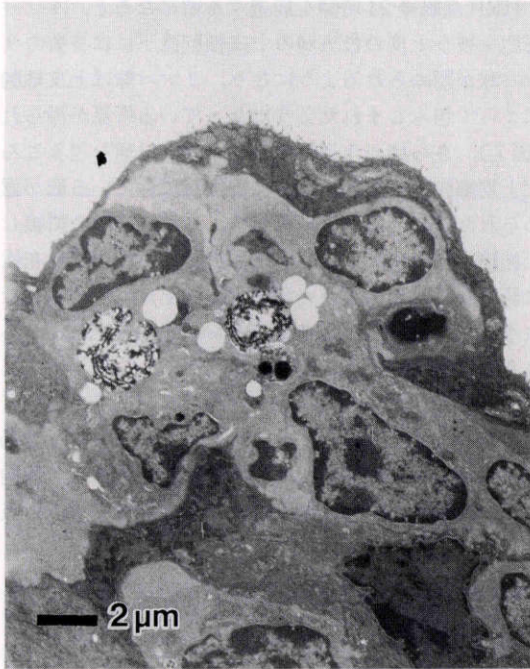


図7 HRP点眼24時間後のリンパ上皮。リンパ上皮細胞には、intraepithelial pocketが形成され、そこにリンパ球が多数遊走してきている(透過型電子顕微鏡・peroxidase染色, $\times 2,230$)。

眼処置後3時間では、円蓋域にアルカリフォスファターゼ反応陽性細胞が軽度増加していたが、濾胞域では対照とほぼ同様であった。HRP点眼後2~3週間経過した試料では、濾胞域にアルカリフォスファターゼ反応陽性細胞が増加し、濾胞域のアルカリフォスファターゼ活性は強陽性を示した(図10・11)。

また、対照およびHRP点眼後の全ての試料において、結膜上皮のアルカリフォスファターゼ反応は陽性であったが、リンパ濾胞を被う上皮ではアルカリフォスファターゼ反応は陰性であった(図11)。

IV 考 按

Chandlerら²³⁾は、結膜に存在する結膜リンパ装置を、conjunctival-associated lymphoid tissue(CALT)として報告し、このCALTによって抗原が認識されると、抗原によって感作されたB-cellはCALTを離れ、所属リンパ節、胸管を経て、大循環に入り、分化成熟しながら涙腺にIgA形質細胞として帰還し、その抗原に特異的なIgAを分泌すると述べ、ocular surfaceにも腸管や気管支などと同様に局所免疫が存在すること

を示唆した。そこで今回我々は、ocular surfaceにおける局所免疫の中でも特にCALTにおける抗原認識の過程に注目し、組織学的に検討した。

今回、実験動物にはモルモットを使用した。モルモットには、結膜の円蓋部から瞬結膜にかけて大きな結膜濾胞が存在することが知られており⁴⁾、これがCALTに相当するものであると考えられた。CALTは、組織学的にはリンパ濾胞の構造をとっていた。すなわち、中心には胚中心を持った濾胞域、その外側には傍濾胞域、上方には円蓋域が存在し、表層は上皮によって被われており、gut-associated lymphoid tissue(GALT)⁶⁾やbronchial-associated lymphoid tissue(BALT)⁷⁾の構造と同様であった。

GALTやBALTなどのリンパ濾胞を被う上皮は一般的にリンパ上皮と呼ばれ、隣接する粘膜上皮とは区別されている。Owen⁸⁾はマウスのパイエル板を観察し、リンパ上皮細胞の中にmicrovilliを持たず細胞表面には不規則なmicrofoldを出し、細胞質内にはmicro-vesicular systemが発達している特徴的な細胞を認めM-cellとして報告している。このM-cellは、腸管内に侵入して来る外来抗原をpinocytosisによって細胞質内に取り込むことからantigen trapping cellとして働くことが明らかになっている⁸⁾⁹⁾。また、M-cellには、細胞質のくぼみによってできた細胞間隙が存在し、intraepithelial pocketと呼ばれている。細胞質内に抗原を取り込んだM-cellは、貪食した抗原をintraepithelial pocketに放出し、そこに遊走して来ているリンパ球やマクロファージなどに抗原を提示するとされ、M-cellがantigen presenting cellとしての性質を持っていると考えられている¹⁰⁾。このようなM-cellの働きによってGALTは外来抗原を認識している。

一般に、リンパ上皮には、goblet細胞は認められないと言われているが、CALTにおいても隣接する結膜上皮と異なり、CALTを覆う上皮には、goblet細胞が認められないことは、今回の実験やFranklinら¹¹⁾の報告から確認されている。また、Latkovic⁵⁾は、モルモットの結膜リンパ濾胞を被う上皮を観察し、上皮細胞のmicrovilliや細胞内小器官が結膜上皮細胞のものとなっており、リンパ上皮と同様の特徴を有していることを報告している。今回の実験では、アルカリフォスファターゼ染色にても、CALTを覆う上皮と隣接する結膜上皮との間に染色性の相違がみられた。M-cellは、アルカリフォスファターゼ活性は低いがエラス

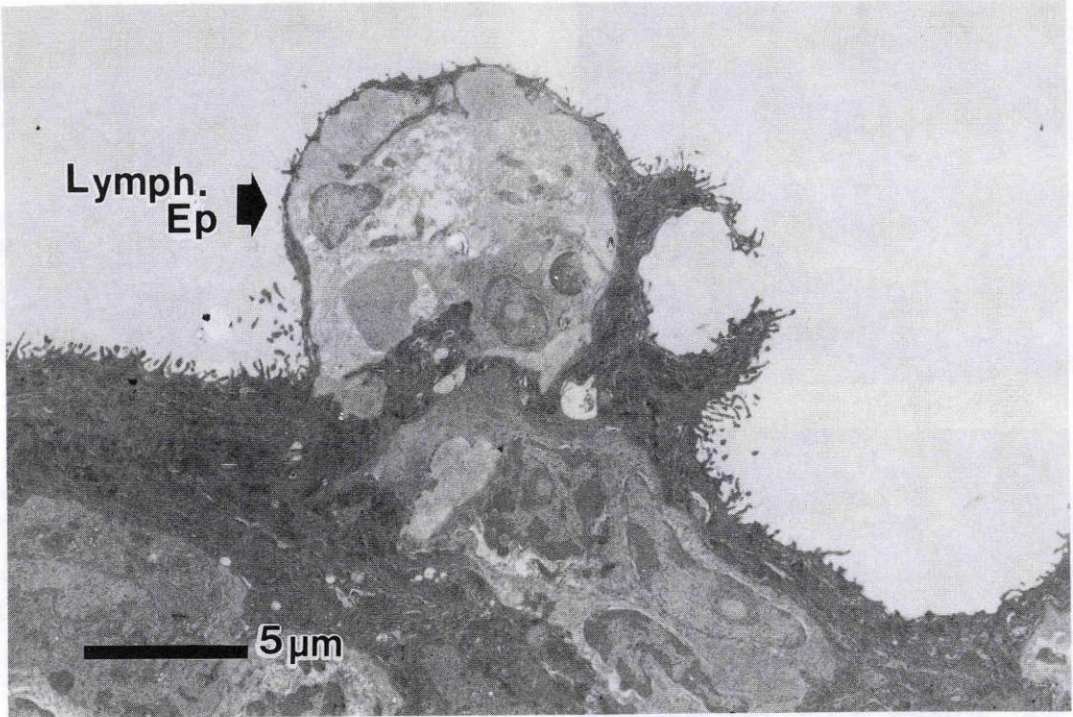


図 8 HRP 点眼 1 週間後のリンパ上皮。リンパ上皮細胞の intraepithelial pocket には、多数のリンパ球が遊走してきており、表層はこぶ状に突出している（透過型電子顕微鏡写真・peroxidase 染色, ×4,270）。

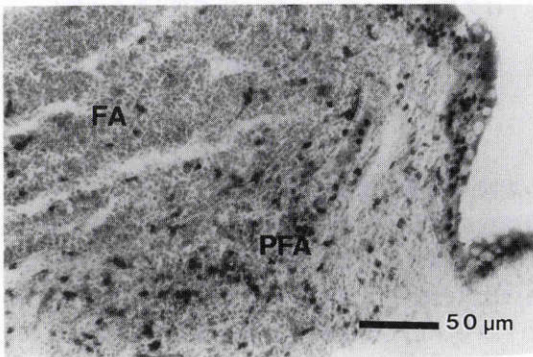


図 9 対照のリンパ濾胞。傍濾胞域 (parafollicular area : PFA) にアルカリフォスファターゼ反応陽性の細胞が多数認められるが、濾胞域 (follicular area : FA) にはほとんど認められない (光学顕微鏡写真 : アルカリフォスファターゼ染色, ×215)。

ターゼ活性は高いとの報告⁹⁾もあり、今回の実験でみられた、CALT のリンパ上皮のアルカリフォスファターゼ活性が低かったことと一致する。このように、CALT を覆う上皮は、リンパ上皮と形態学的には類似

の組織であると考えられ、CALT のリンパ上皮にも M-cell 類似の細胞が存在することが示唆された。

今回我々が行った透過型電子顕微鏡による観察では、HRP 点眼 30 から 60 分後の試料において、リンパ上皮細胞の vesicle 内が、peroxidase 反応陽性であった。これは、リンパ上皮細胞の pinocytosis によって抗原である HRP がリンパ上皮細胞内に取り込まれた所見と考えられ、CALT のリンパ上皮細胞にも antigen trapping の働きが存在することを示唆している。また、HRP 点眼後 24 時間を経過するころより、最表層のリンパ上皮細胞下にはリンパ球や免疫担当細胞が増加し、あたかも遊走して来たリンパ球がリンパ上皮細胞によって包みこまれたようになっていた。このような、パイエル板の M-cell に生じる intraepithelial pocket と同様な変化が CALT のリンパ上皮にも生じたこと、また、リンパ上皮の基底膜を通過し、リンパ球がリンパ上皮内へと遊走してきていることより、CALT においても、一度、リンパ上皮細胞が抗原を貪食すると、リンパ上皮下よりリンパ球や免疫担当細胞が intraepithelial pocket に遊走し、抗原を認識するの

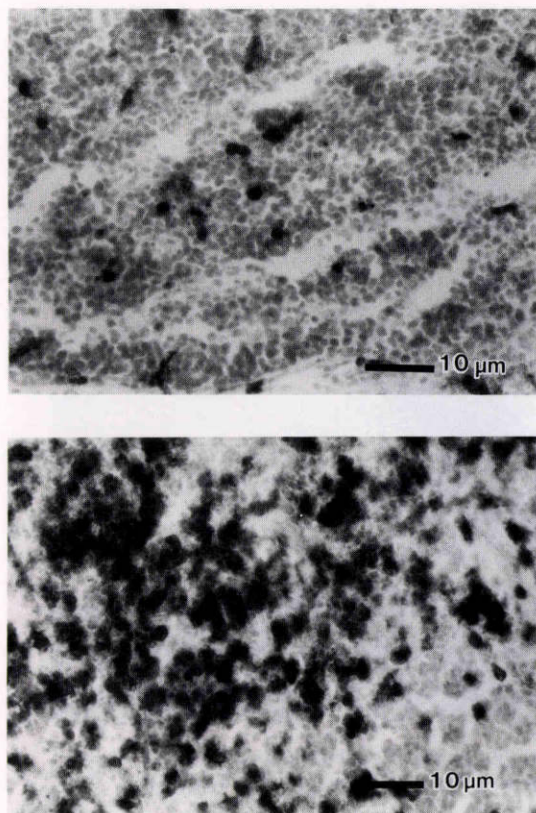


図10 リンパ濾胞の濾胞域(上段:対照,下段:HRP点眼2週間後)。HRP点眼後2週間経過した濾胞域ではアルカリフォスファターゼ染色陽性の細胞が増加してきている(光学顕微鏡写真:アルカリフォスファターゼ染色,×875)。

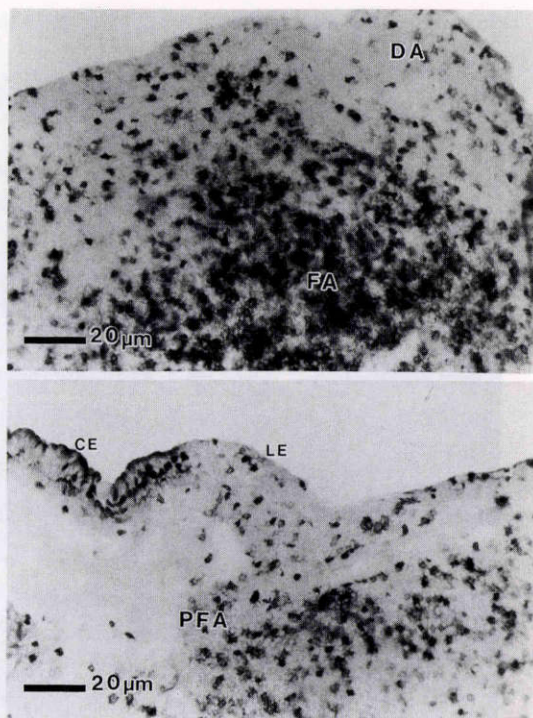


図11 HRP点眼2週間後のリンパ濾胞。濾胞域(FA)には多数のアルカリフォスファターゼ染色陽性細胞が認められるが傍濾胞域(PFA)にはほとんど認められない。結膜上皮(conjunctival epithelium:CE)はアルカリフォスファターゼ反応陽性なのに対し、リンパ上皮(LE)はアルカリフォスファターゼ反応陰性である(光学顕微鏡写真:アルカリフォスファターゼ染色,×410)。

ではないかと考えられた。これに対し、瞬結膜の上皮細胞にも、HRPの取り込みと考えられる所見が認められたが、これは、我々¹²⁾が以前にも報告したように、多量の抗原であるHRPを投与したためと考えられる。しかし、今回の実験では、結膜上皮には *intraepithelial pocket* の形成は認められなかったことから、結膜上皮よりもリンパ上皮のほうが、*intraepithelial pocket* を介して、抗原情報が効率よくリンパ球やマクロファージへと伝達されるのではないかと考えられた。

次に、アルカリフォスファターゼ染色による観察を行ったところ、HRP点眼2～3週間のものでは、結膜濾胞のアルカリフォスファターゼ活性が増強していた。田川ら¹³⁾は、ヒト結膜濾胞を免疫組織化学的に検討し、濾胞を構成するリンパ球が中心のB細胞領域とそ

の周囲のT細胞領域にわかれることを示し、さらに結膜濾胞が腸管のパイエル板や孤立リンパ小節と類似のリンパ球構成をもつことを明らかにした。Franklinら¹⁴⁾は、CALTの濾胞域の細胞をポークウィード・マイトジェンにて刺激するとIgA産生形質細胞に分化することを証明した。また、渡辺¹⁴⁾は、感作動物のリンパ節を経時的に観察し、抗原刺激後、アルカリフォスファターゼ活性局在の観察を行うことは、抗原と反応して抗体産生細胞に分化するB細胞系の細胞を検出するのに有効な手段であると述べている。これらのことより、HRP投与後の濾胞域におけるアルカリフォスファターゼ活性の増強は、抗原情報が濾胞域に伝わり抗体産生を行う形質細胞へと分化しようとするB細胞の機能的変化を酵素組織化学的にとらえたものと考えられた。

以上のことより、CALTにおいて、リンパ上皮細胞による抗原の取り込みと、濾胞域におけるB細胞の分化が、ocular surfaceにおける局所免疫発現の最初のステップであると考えられた。

本論文の要旨は第94回日本眼科学会総会において発表した。本研究には文部省科学研究費(課題番号01480422, 北野)の補助を受けた。

文 献

- 1) **Brandtzaeg P**: Structure, synthesis and external transfer of mucosal immunoglobulins. *Ann Immunol (Inst Pasteur)* 124C: 417, 1973.
- 2) **Chandler JW, Axelrod AJ**: Conjunctival-associated lymphoid tissue: A probable component of the mucosa-associated lymphoid system, in O'Connor GR (ed): *Immunologic Diseases of the Mucous Membranes: Pathology, Diagnosis and Treatment*, New York, Masson, 63-70, 1980.
- 3) **Chandler JW, Gillette TE**: Immunologic defense mechanisms of the ocular surface. *Ophthalmology* 90: 585-591, 1983.
- 4) **Dwyer RSTC, Dzrouger S, Monnickendam MA**: Unusual features in the conjunctiva and cornea of the normal guinea-pig: Clinical and histological studies. *Br J Ophthalmol* 67: 737-741, 1983.
- 5) **Latkovic S**: The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. III. The bulbar zone, the zone of fornix and the supranodular zone. *Acta Ophthalmol* 57: 305-320, 1978.
- 6) **名倉 宏**: 分泌型IgAと消化管局所免疫. *感染・炎症・免疫* 14: 271-284, 1984.
- 7) **Racz P, Tenner-Racz K, Myrvik QN, et al**: Functional architecture of bronchial associated lymphoid tissue and lymphoepithelium in pulmonary cell-mediated reactions in the rabbit. *J Reticuloendothel Soc* 22: 59-83, 1977.
- 8) **Owen RL**: Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of peyer's patches in the normal unabstracted mouse intestine: An ultrastructural study. *Gastroenterology* 72: 440-451, 1977.
- 9) **木原 彊**: M細胞, 腸管の抗原侵入門戸. *医学のあゆみ* 147: 354-358, 1988.
- 10) **赤保内良和, 小林壮光**: 粘膜における抗原処理機構. *臨床免疫* 22: 495-502, 1990.
- 11) **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.
- 12) **庄司 純, 藤沢秋子, 江波戸文秀, 他**: 結膜リンパ組織を被う上皮細胞の特徴. *あたらしい眼科* 6: 1181-1185, 1989.
- 13) **田川義継, 斉藤 学, 小阪 貴, 他**: ヒト結膜濾胞のリンパ球サブセット. *臨眼* 40: 239-242, 1986.
- 14) **渡辺慶一**: 抗体産生細胞の機能と形態学的識別—免疫細胞化学および酵素細胞化学の応用. *代謝* 14: 2089-2102, 1977.