

Ocular surface の局所免疫機構

稲田 紀子¹⁾, 庄司 純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 における局所免疫機構を観察するために, horseradish peroxidase (HRP) で免疫したモルモットを使用し, 特異抗体の染色が可能である酵素抗原法を用いて結膜局所における特異抗体産生能を観察するとともに, 酵素抗体法にて IgA の局在を免疫組織化学的に検討した。酵素抗原法陽性細胞は, 結膜リンパ装置の傍濾胞域を中心に結膜下組織に多数出現し, 電子顕微鏡で形質細胞と同定された。さらにミラー切片法により酵素抗原法陽性細胞と抗 IgA 抗体陽性細胞は多くの部位で一致していた。以上の結果より, ocular surface における局所免疫を司る IgA 型の特異抗体を分泌する形質細胞の分布が, 免疫組織化学的に観察できた。さらに, 結膜リンパ装置に分布している免疫担当細胞が特異抗体産生形質細胞へと分化成熟する可能性が示唆された。(日眼会誌 96: 817-822, 1992)

キーワード: 局所免疫, 結膜リンパ装置, Ocular surface, 酵素抗原法, 酵素抗体法

The Local Immune System of Ocular Surface

Noriko Inada¹⁾, Jun Shoji¹⁾, Hiroshi Kasai¹⁾,Yasuo Ishii²⁾ and Shusaku Kitano¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine²⁾Eye Clinic, Shinkawabashi Hospital

Abstract

Local immunity on the ocular surface was observed in guinea pigs immunized with horseradish peroxidase (HRP) by determining the activity of a specific antibody in local sites of the conjunctiva by the enzyme-antigen method, which enables a specific antibody to be stained. In addition, immunohistochemical study of the localization of IgA was performed by the enzyme-labelled antibody method. The enzyme-antigen method revealed a number of positive cells in the subconjunctival tissue and the parafollicular area of conjunctival-associated lymphoid tissue. These cells were identified as plasma cells by electron microscopy. The mirror section technique revealed that the cells positive for the enzyme-antigen method were consistent with anti-IgA-positive cells at many sites. Thus the distribution of plasma cells secreting IgA-specific antibody responsible for local immunity on the ocular surface was observed immunohistochemically. The results suggest that immunocytes in the conjunctival-associated lymphoid tissue differentiate and mature into specific antibody-producing plasma cells. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 817-822, 1992)

Key words: Local immunity, Conjunctival-associated lymphoid tissue, Ocular surface, Enzyme-antigen method, Enzyme-labelled antibody method

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 稲田 紀子

(平成3年4月26日受付, 平成4年1月31日改訂受理)

Reprint requests to: Noriko Inada, M.D. Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine, 30-1 Ooyaguchi Kamimachi, Itabashi-ku 173, Japan

(Received April 26, 1991 and accepted in revised form January 31, 1992)

I 緒 言

粘膜組織は、外界と直接接しており、外部から侵入してくる細菌や異種蛋白などの外来抗原から生体を守るために、第一線生体防御機構 (first defence line) と呼ばれる機能がいくつも備わっている。その中に、特有のリンパ装置と IgA クラスの免疫グロブリンおよび免疫担当細胞によって担われている局所免疫機構があり、免疫応答によって外来抗原の侵入を阻止している。

Ocular surface に関しても、1980年 Chandler¹⁾ によって conjunctival-associated lymphoid tissue (CALT) と呼ばれるリンパ装置の存在が報告されるとともに、局所免疫機構の概念が導入された。Ocular surface の中でも特に結膜下組織には、免疫グロブリンを分泌する形質細胞が多数存在しているが、これらの形質細胞と局所免疫機構との関係についての詳細は不明な点が多い。そこで今回我々は、抗原を点眼で投与し、動物を免疫した。次いで、免疫された動物の ocular surface に産生される特異抗体および特異抗体を分泌する形質細胞の局在について CALT を中心に検索した。その方法として、特異抗体が検出可能である酵素抗原法を用いて免疫組織化学的に検討し、ocular surface における特異抗体産生能を観察した。さらに、酵素抗体法を用いて IgA の局在を明らかにし、免疫グロブリンと局所免疫機構の関係について若干の検討を加えたので報告する。

II 実験方法

実験動物には白色ハートレー系モルモットを使用した。免疫方法は、10 mg/dl の horseradish peroxidase (HRP) 溶液と Freund's complete adjuvant の等量混合液を乳化後、その 0.1 ml を右眼のみに 1日1回3日間点眼した。約1か月後に同濃度の HRP 溶液 0.1 ml を再び右眼に 1日1回3日間追加点眼して感作した。追加点眼前および追加点眼後1週間目にペントバルビタールナトリウム (ネプタール[®]) の過量腹腔内投与によって屠殺し、眼瞼を含めて両側の眼球を摘出した。摘出した試料は、直ちに 2% periodate lysin paraformaldehyde (PLP) 溶液で 4°C、12時間固定した後、10%、15%、20% sucrose 加 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 で各4時間洗浄後、OCT compound に包埋し、ドライアイスイソペンタンで急速凍結した。クライオスタットにて凍結組織切片 (6 μm)

を作製し、アルブミン塗布スライドガラスに貼付した。未処置のモルモット眼を対照として同様に処理した。これらの凍結切片は、hematoxylin-eosin (H-E) 染色をおこなったほか、以下に述べる酵素抗原法および酵素抗体法を施行した。

酵素抗原法は渡辺²⁾の方法に準じて行った。凍結組織切片を内因性 peroxidase 阻止後、HRP 溶液 (50 μg HRP/ml/PBS, pH 7.4) で2時間反応させ、PBSにて洗浄後 1% glutaraldehyde (PBS, pH 7.4) にて10分間後固定した。固定後、Graham-Karnovsky 法により 0.005% H₂O₂ 加 3,3'-diaminobenzidin (DAB) 溶液 (0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6) にて peroxidase 反応を行った。

酵素抗体法は、avidin biotin peroxidase complex 法 (ABC 法・Vector 社) に従って内因性 peroxidase 阻止後、凍結切片を正常ヤギ血清で前処理し、一次抗体に抗モルモット IgA/ウサギ IgG、二次抗体としてビオチン化した抗ウサギ IgG/ヤギ血清を使用し、次いで ABC を作用させ、peroxidase 染色で発色した。内因性 peroxidase 阻止は、酵素抗原法、酵素抗体法ともに 0.3% H₂O₂ 加メタノールで室温 30 分で処理し、また DAB 溶液中にアジ化ナトリウム 65 mg/dl を添加して行った。光学顕微鏡用切片は、メチルグリーンで核染色し観察した。

一部の試料は、ミラー切片法に準じてミラー切片を作製し、一方は酵素抗原法で他方は酵素抗体法にて染色し、両者を比較検討した。

透過型電子顕微鏡観察用試料は、凍結切片を酵素抗原法で反応、発色させた後、1% OsO₄ で一時間後固定した。型通りアルコール系列にて脱水し、エポキシ樹脂 (エポック 812) にて倒立包埋し、超薄切片を作製した。透過型電子顕微鏡用切片は、ウラニールアセテートの単染色を行った。

III 結 果

凍結切片を H-E 染色し、光学顕微鏡で観察すると、下眼瞼結膜の鼻側を中心としてリンパ組織が認められた。リンパ組織は上皮 (epithelium・E) で被われ、その中心部分には胚中心をもった濾胞域 (follicular area・FA) が形成されていた。また、濾胞の周辺および濾胞間に位置する粘膜下組織には傍濾胞域 (parafollicular area・PFA) が、濾胞と上皮の間には円蓋域 (dome area・DA) が分別された (図1)。傍濾胞域には、細静脈、毛細血管やリンパ管が豊富に認められ、

その中に毛細血管後細静脈も認められた。追加点眼後のリンパ組織を比較すると、点眼前に比べ点眼後では、リンパ組織の円蓋域および傍濾胞域が拡大しており、傍濾胞域を形成する細胞数も増加していた。

酵素抗原法：HRP 追加点眼前の試料では、リンパ組織内およびその近傍に酵素抗原法で陽性を示す細胞は認められなかった（図 2）。HRP を追加点眼した場合の試料を光学顕微鏡で観察すると、peroxidase 反応により細胞質が褐色に染まる酵素抗原法陽性の細胞が多数認められた。酵素抗原法陽性細胞は、リンパ組織の円蓋域および傍濾胞域に認められ、瞼結膜および円蓋部結膜の結膜上皮内および結膜上皮下にも存在した。その数は、リンパ組織の傍濾胞域に最も多く、それに比較して濾胞域内にはほとんど認められなかった（図 3, 4, 5）。

透過型電子顕微鏡で観察すると、傍濾胞域には粗面小胞体が細胞質のほぼ全域にわたって良好に発達し、その粗面小胞体が特有の層板状構造や空胞状構造を呈した形質細胞が多数認められた。傍濾胞域に認められた形質細胞のほとんどは、空胞状に拡大した粗面小胞体内が高電子密度として観察され、酵素抗原法陽性であった（図 6）。また、形質細胞以外に酵素抗原法陽性を示す細胞は認められなかった。

酵素抗体法：追加点眼後のリンパ装置を観察したところ、細胞質内が褐色に染色される酵素抗体法陽性細胞は、リンパ装置の円蓋域、傍濾胞域および結膜上皮下、一部上皮内に分布して認められた。

ミラー切片法：追加点眼後のミラー切片において、円蓋域、傍濾胞域および結膜下組織のどの部位においても酵素抗原法陽性であり、かつ酵素抗体法も陽性である細胞が認められた（図 7）。

IV 考 按

腸管に代表される粘膜組織では、パイエル板などのリンパ装置で抗原刺激された幼若な B 細胞が、所属リンパ節を経て血流を介して粘膜固有層に移動する間に、IgA 産生形質細胞へ分化成熟すると考えられており、これらの免疫反応は局所免疫機構と呼ばれている。Ocular surface においても、Chandler ら¹¹の報告により腸管と同様の局所免疫機構の存在が示唆され、パイエル板に相当するリンパ装置として、結膜の conjunctival-associated lymphoid tissue (CALT) が報告された。パイエル板は、組織学的には一層のリンパ上皮細胞に覆われたリンパ小節の集合体で、リンパ

上皮、円蓋域、濾胞域、傍濾胞域に区分され、それぞれの免疫機能を分担している³⁾。今回、モルモットの瞼結膜の特に下眼瞼に存在したリンパ組織は、光学顕微鏡的観察により上皮、円蓋域、濾胞域、傍濾胞域に分けられ、その特徴的な形態から CALT と同定できた。

酵素抗原法とは、抗体産生細胞内における特異抗体の局在を観察するために Leduc, Avrameas ら⁴⁾によって考案された方法である。原理は、酵素である horseradish peroxidase (HRP) を抗原として免疫すると、HRP に対する特異抗体である抗 HRP 抗体が生体内に産生される。抗 HRP 抗体が含まれると考えられる組織切片を抗原である HRP 溶液に浸透させることにより、抗 HRP が存在する部位には、HRP-抗 HRP 抗体の抗原抗体複合物が形成される。この抗原抗体複合物には酵素活性が存在しているため、酵素組織化学的に染色を行うことで組織中に存在する特異抗体（抗 HRP 抗体）の局在を観察するものである。今回我々は、ocular surface における特異抗体産生細胞の分布を観察する目的で、酵素抗原法による観察を行った。酵素抗原法陽性細胞は追加点眼後の CALT およびその周囲の結膜下組織に出現したが、それらの細胞を透過型電子顕微鏡によって観察すると、抗体産生細胞である形質細胞と同定できた。

ミラー切片法⁵⁾は、割面に対して左右見開きの形で薄切する方法で、同一細胞の同一割面を異なる方法で染色することが可能である。そこで今回、酵素抗原法と抗モルモット IgA 抗体を用いた酵素抗体法をそれぞれ施行し、抗 HRP 抗体産生細胞と IgA 陽性細胞との関係の観察を行った。その結果、酵素抗原法による陽性細胞と酵素抗体法による IgA 陽性細胞が一致する部位が多数存在した。本実験では、追加点眼前後の IgA 陽性細胞の比較および各クラスの免疫グロブリンを産生する細胞の検討は行っていないため、抗 HRP 抗体がすべて IgA 型免疫グロブリンであるとは限らないが、局所免疫をつかさどる IgA 型の抗 HRP 抗体が産生されていることが、組織学的に同定できたと考えられる。すなわち、ミラー切片法により、結膜下に浸潤してきた酵素抗原法陽性の形質細胞が、IgA 型の特異抗体を産生していることが証明でき、これらの形質細胞が局所免疫に関与していることが示唆された。しかし、全身免疫に関与する IgM, IgG 型の抗 HRP 抗体産生細胞が結膜下にどのように出現してくるかは、今後の研究課題と考えている。

IgA 型特異抗体を産生する形質細胞の分布を観察し

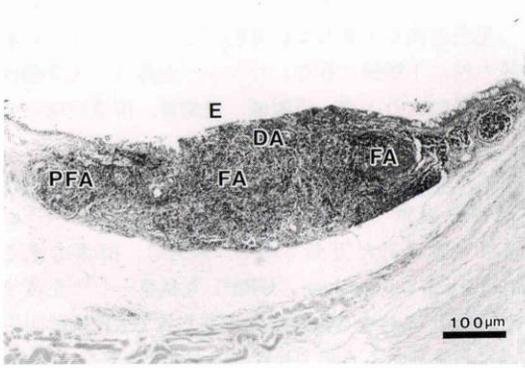


図1 結膜リンパ装置：リンパ上皮 (E)，円蓋域 (DA)，濾胞域 (FA)，傍濾胞域 (PFA) に区分される。(光学顕微鏡写真・H-E染色, ×82)

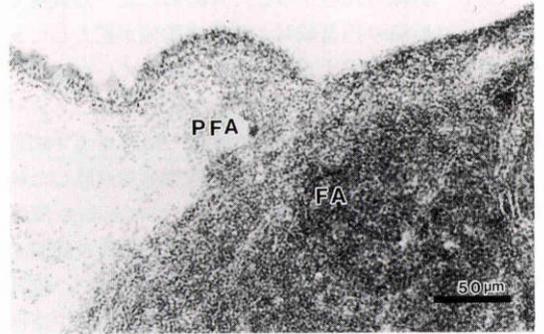


図2 追加点眼前の CALT：HRP 溶液を追加点眼しない CALT には、抗 HRP 抗体保有細胞は認められない。(光学顕微鏡写真・酵素抗原法, ×210)

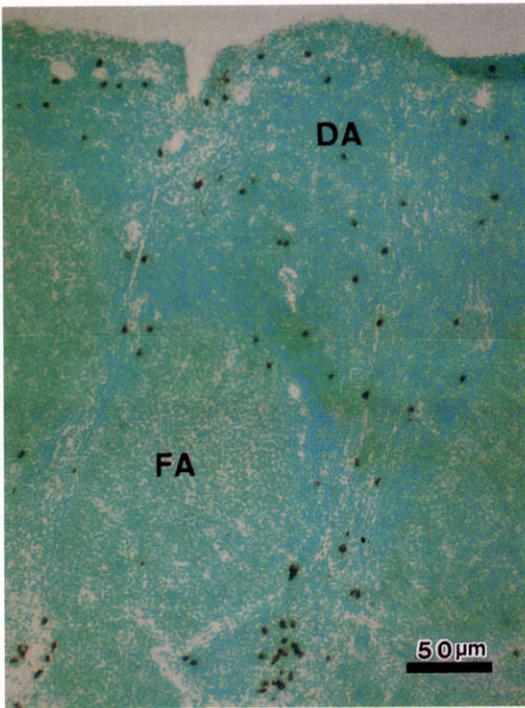


図3 追加点眼後の CALT における抗 HRP 抗体保有細胞の局在(リンパ上皮，円蓋域，濾胞域)：リンパ上皮内および円蓋域 (DA) に抗 HRP 抗体保有細胞を認めるが，濾胞域 (FA) にはほとんど認められない。(光学顕微鏡写真・酵素抗原法, ×210)

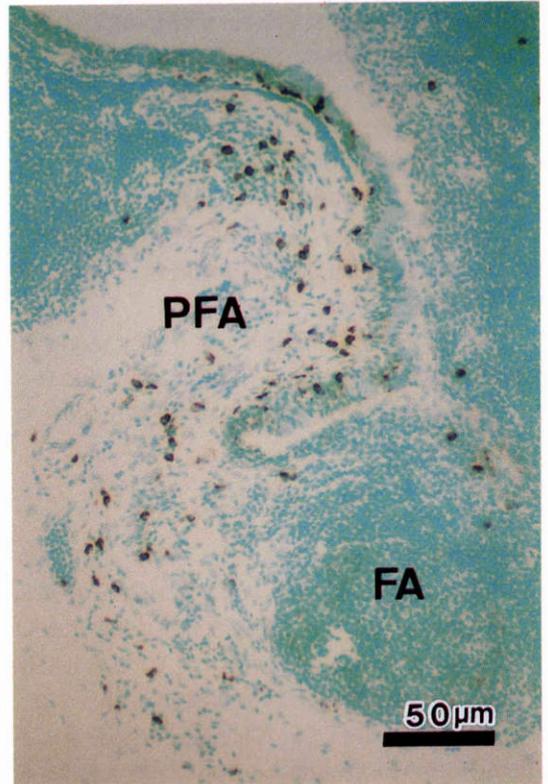


図4 追加点眼後の CALT における抗 HRP 抗体保有細胞の局在(濾胞域，傍濾胞域)：傍濾胞域 (PFA) に多数の抗 HRP 抗体保有細胞を認める。(光学顕微鏡写真・酵素抗原法, ×290)

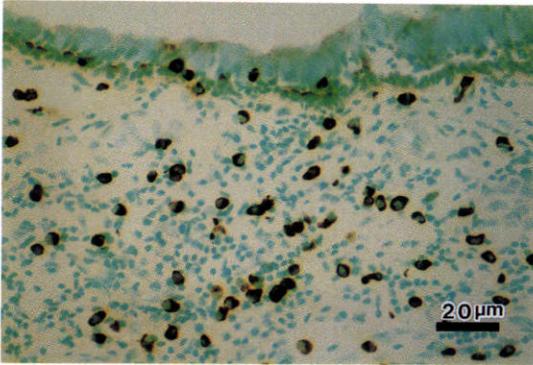


図 5 追加点眼後の CALT における抗 HRP 抗体保有細胞の局在(円蓋部結膜)：結膜下組織に多数の抗 HRP 抗体保有細胞を認める。(光学顕微鏡写真・酵素抗原法, ×390)

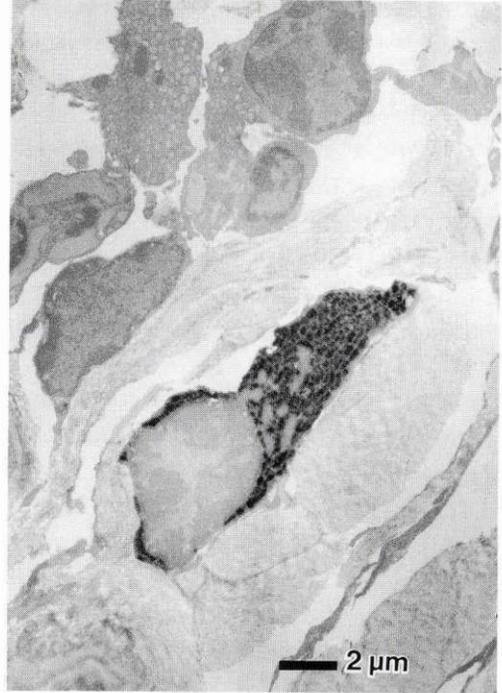
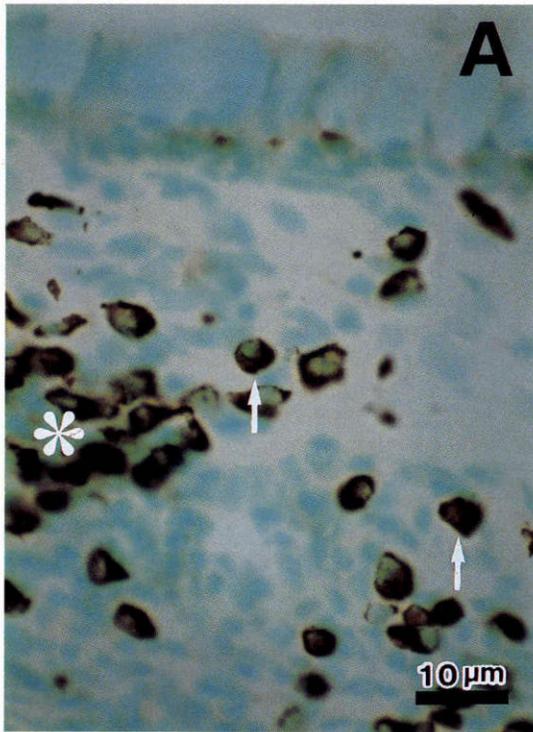
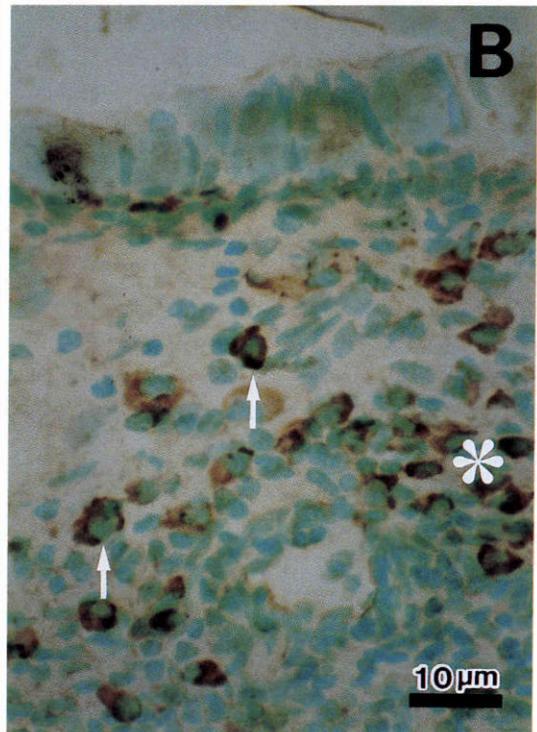


図 6 酵素抗原法陽性形質細胞：囊胞状に拡大した粗面小胞体に peroxidase 反応陽性像が認められ, 抗 HRP 抗体を保有していることがわかる。(透過型電子顕微鏡写真・酵素抗原法, ×4,085)

PFA



酵素抗原法



酵素抗体法 (ABC 法)

図 7 傍濾胞域のミラー切片像 (A 酵素抗原法・B 酵素抗体法)：酵素抗原法による抗 HRP 抗体保有細胞と抗モルモット IgA 抗体を用いた酵素抗体法による IgA 保有細胞は同一細胞である。(矢印, *領域, ×150)

てみると、傍濾胞域および結膜下組織に多数出現していた。パイエル板を含む gut-associated lymphoid tissue (GALT) や bronchial-associated lymphoid tissue (BALT) を一般的なリンパ節と組織学的に比較してみると、胚中心を含む濾胞域および傍濾胞域がリンパ節の皮質に相当するが、免疫グロブリン産生が行われる髄質に相当する部位は認められない。しかし、腸管や気管支の粘膜固有層には多数の形質細胞が T 細胞とともに存在し、抗体の産生にあずかっていることから、粘膜固有層がリンパ節という髄質に相当する機能を有していると考えられている⁶⁾。今回の実験でも、追加抗原刺激に対し特異抗体産生形質細胞は、傍濾胞域およびその周囲の結膜下組織に出現したことから、ocular surface における結膜下組織も GALT や BALT と同様にリンパ節の髄質に相当する機能を有していると考えられた。IgA 型免疫グロブリンによる first defence line は、ocular surface のあらゆる部位から侵入しようとする抗原に即座に対応し、その侵入を阻止する作用を発揮するが、この first defense line が成立するうえで、結膜下組織での特異抗体の産生は機能の重要な一端を占めていると考えられる。

また、追加点眼前には特異抗体産生形質細胞は認められず、追加点眼後に傍濾胞域および結膜下組織に出現している。この結果から、抗原を点眼で投与しただけでも、モルモットは感作された状態となり、再び同一抗原である HRP が ocular surface に侵入するとすかさず二次免疫応答を発現したものと推察される。Franklinら⁷⁾は、ウサギの CALT のリンパ球を porkweed mitogen によって in vitro において刺激すると IgA 産生形質細胞に分化することを証明している。また、腸管では濾胞域の未熟な B 細胞が抗原によって刺激されると、特異抗体を産生する形質細胞の前駆細胞となることも報告されている⁸⁾。これらのことにより、ocular surface に侵入した抗原が CALT を刺激する

とその個体は感作され、IgA 型の特異抗体を産生するようになるが、その一方で再循環性のリンパ球の一部に粘膜組織を巡回する記憶細胞が含まれており、対応する抗原に遭遇すると迅速かつ効果的に二次免疫応答を発現するものと思われる。

今回の結果から、酵素抗原法は ocular surface における局所免疫反応の観察に有用なことが示され、また、ocular surface においても腸管や気管支と同様の局所免疫反応が営まれていることが示唆された。

なお、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。また、本研究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) Chandler JW, Axelrod AJ: Conjunctiva-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.
- 2) 渡辺慶一, 名倉 宏: 抗体産生像の超微形態. 新版日本血液学全書, 9, 東京, 丸善, 197-220, 1981.
- 3) 名倉 宏: Peyer 板の構造と免疫機能. 医学のあゆみ 147: 349-353, 1988.
- 4) Leduc EH, Avrameas S, Bouteille M: Ultrastructural localization of antibody in differentiating plasma cells. J Exp Med 127: 109-118, 1968.
- 5) 渡辺慶一, 中根一穂: 改訂版. 酵素抗体法, 東京, 学際企画, 95-98, 1986.
- 6) 名倉 宏: 節外性リンパ組織の構造と機能. 病理と臨床 4: 466-474, 1986.
- 7) 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.
- 8) 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.