

# 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

稲田 紀子, 庄司 純, 高浦 典子, 澤 充

日本大学医学部眼科学教室

## 要 約

高内皮細静脈は全身のリンパ節, 粘膜関連リンパ装置に存在する血管であり, リンパ球のホーミングの際に重要な働きをしている。Ovalbumin で免疫したモルモットを使用し, ovalbumin 溶液を点眼した後, 結膜関連リンパ装置における高内皮細静脈を形態学的に観察した。結膜関連リンパ装置の傍濾胞域に高内皮細静脈が存在した。血管内のリンパ球が高内皮細静脈の血管腔に伸びた内皮細胞の小突起によって取り囲まれている所見, リンパ球が血管内皮細胞に取り込まれている所見, リンパ球

が細静脈周囲腔に血管内皮細胞から放出している所見が認められた。結膜関連リンパ装置にも他の粘膜関連リンパ装置に存在する高内皮細静脈が観察でき, 結膜においてもリンパ球のホーミングが起こっていることが示唆された。(日眼会誌 99: 1111-1118, 1995)

キーワード: 高内皮細静脈, 結膜関連リンパ装置, リンパ球, ホーミング

## A Morphological Study of Lymphocyte Homing in Conjunctiva-associated Lymphoid Tissue

Noriko Inada, Jun Syoji, Noriko Takaura and Mituru Sawa

Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

### Abstract

High endothelial venule (HEV) is an important component of the mucosa-associated lymphoid tissue and plays a role in the homing phenomenon of lymphocytes. We investigated the presence of HEVs in conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) using guinea pigs sensitized with ovalbumin. Electron microscopy showed characteristic findings for HEVs in the parafollicular area of the CALT. Lymphocytes in the vessels are trapped not only by

microprocesses extending from the vascular endothelium but also by the endothelial cells. Some endothelial cells also appear to release lymphocytes. We conclude that HEVs are present also in the CALT. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1111-1118, 1995)

Key words: High endothelial venule, Conjunctiva-associated lymphoid tissue, Lymphocyte, Homing

## I 緒 言

粘膜組織には, 粘膜関連リンパ装置 (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) と呼ばれるリンパ組織が存在し, 局所免疫を司っている。局所免疫の中心的な役割を果たしているのはリンパ球であり, T細胞, B細胞の相互作用により, 局所で免疫グロブリン (特に IgA) が産生され, 液性免疫が成立している。粘膜局所に抗原が侵入すると, 粘膜関連リンパ装置を介してリンパ球が感作され, 感作されたリンパ球はリンパ管を通過し, さらに血液中に入る。そして, 再度抗原刺激を受けると,

全身を巡っていたリンパ球が粘膜関連リンパ装置を中心に戻って来るといった再循環を繰り返している。このリンパ球の再循環は, ホーミング現象と呼ばれ, リンパ系組織に特徴的な現象とされている<sup>1)2)</sup>。血液中から粘膜組織にリンパ球がホーミングする際には, 粘膜リンパ装置に存在する毛細血管から移行する細静脈を通してリンパ球が遊出してくる。この血管は, 特に高内皮細静脈 (high endothelial venule, HEV) と呼ばれ, ホーミング現象に際して他の血管とは異なる特殊な機能を有しているといわれている<sup>3)4)</sup>。外来抗原から ocular surface を守るために結膜にも結膜関連リンパ装置 (conjunctiva-associated

別刷請求先: 173 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 稲田 紀子

(平成7年1月31日受付, 平成7年5月25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 Tokyo 173, Japan

(Received January 31, 1995 and accepted in revised form May 25, 1995)

lymphoid tissue, CALT)が認められている<sup>5)</sup>.今回,結膜関連リンパ装置内の高内皮細静脈の存在とその形態についてリンパ球との関係を含めて,透過型電子顕微鏡を用いて観察した.

## II 実験方法

実験動物には,白色ハートレイ系モルモット5匹10眼を使用した.Ovalbumin(10 mg/dl)溶液と Freund's

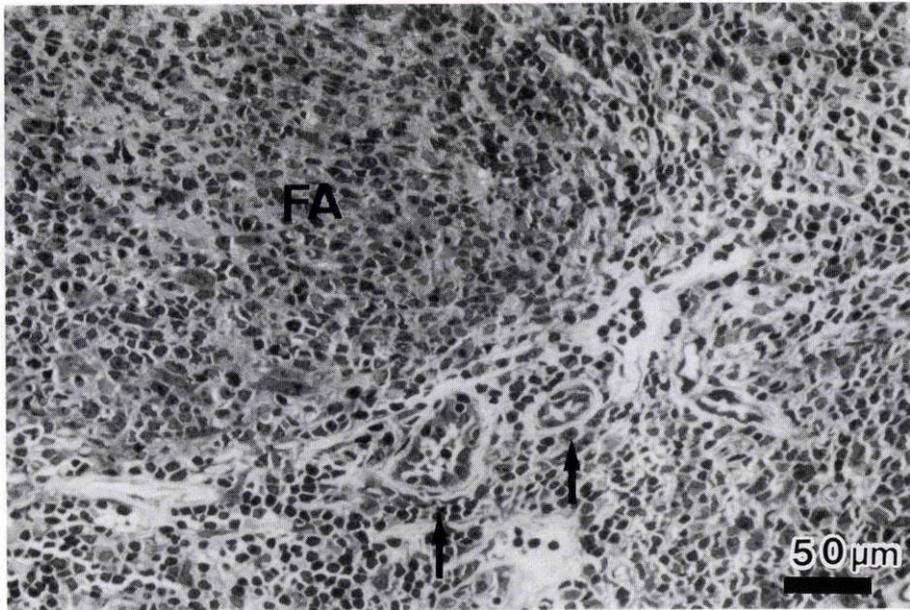


図1 結膜関連リンパ装置.

濾胞液 (FA) 周囲の傍濾胞域に丈の高い内皮細胞をもつ細静脈が認められる(矢印). 光学顕微鏡写真, トルイジンブルー染色

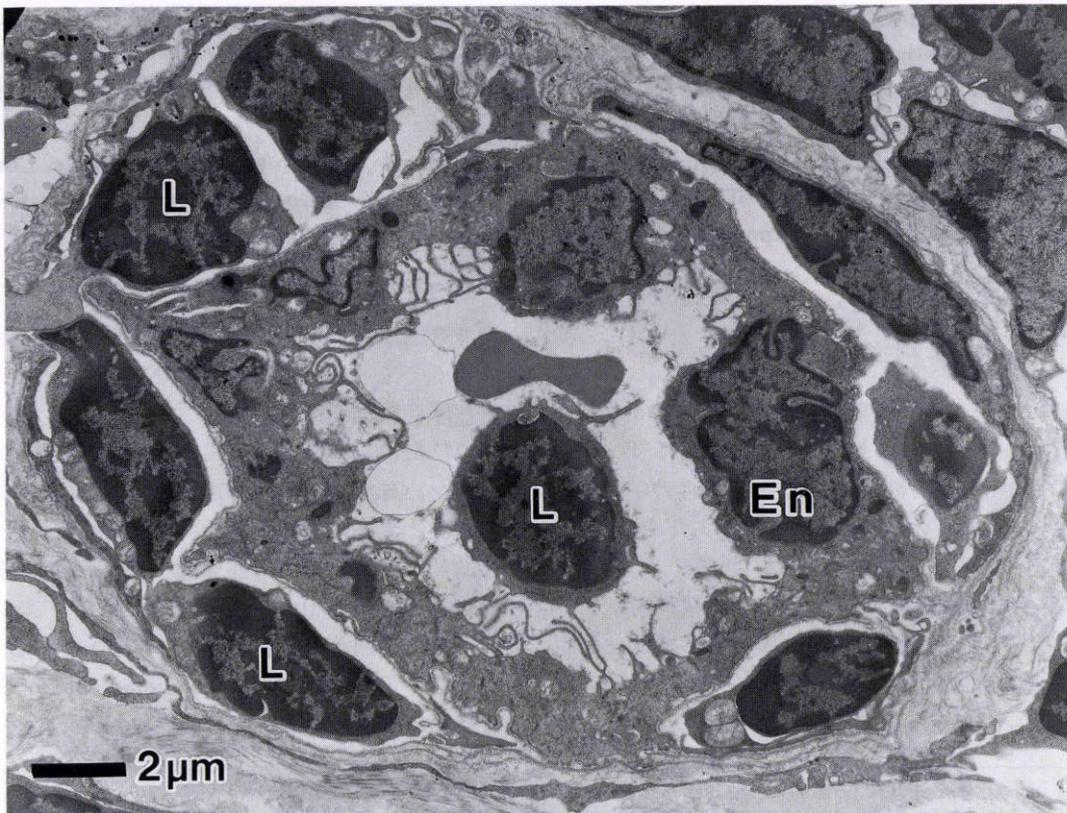


図2 高内皮細静脈.

内皮細胞(endothelial cell, En)は血管腔に突出し,血管腔内および内皮細胞の基底膜にリンパ球(lymphocyte, L)を認める.血管内腔には細い小突起が伸びている.透過型電子顕微鏡写真

complete adjuvant の等量混合液を乳化後,その0.1 ml をモルモットの両眼に1日1回3日間点眼して感作した.約1か月後に同濃度の ovalbumin 溶液を追加点眼

し,点眼後3日目にペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)の過量腹腔内投与によって屠殺し,眼瞼を摘出した.摘出した試料は,2.5% glutaraldehyde(0.2

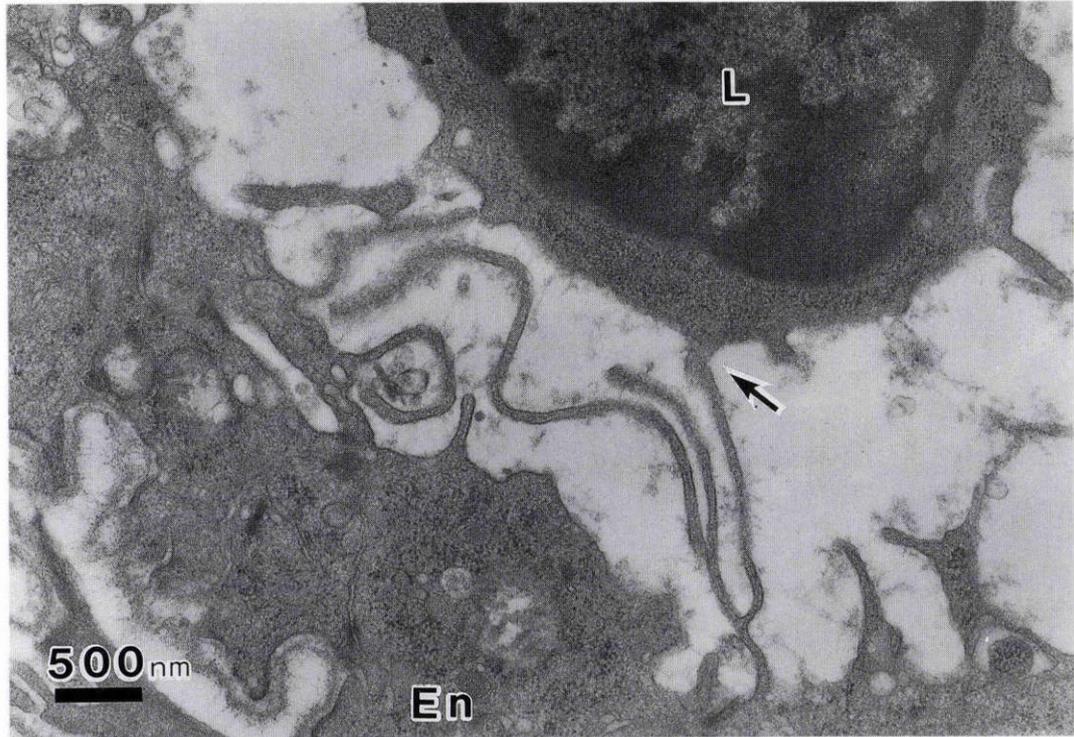


図3 高内皮細静脈の小突起,

血管腔内のリンパ球(L)に内皮細胞(En)から伸びた小突起の一部が接触している(矢印).透過型電子顕微鏡写真

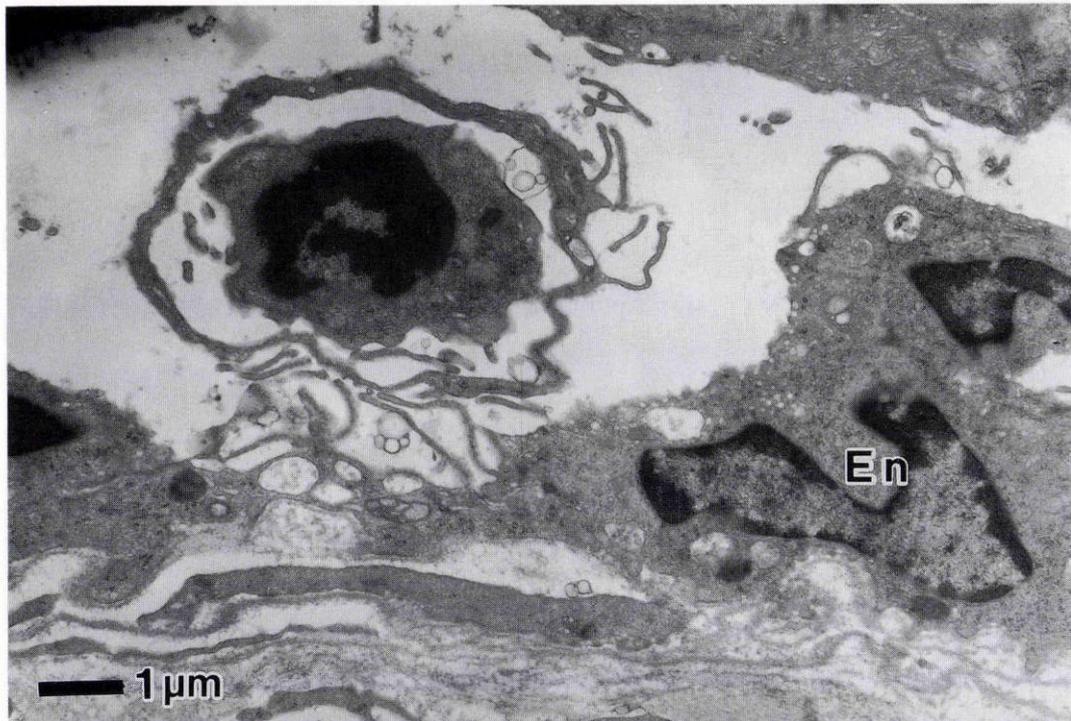


図4 血管内皮細胞とリンパ球 A,

血管内のリンパ球の周囲に内皮細胞(En)から伸びた小突起が取り囲んでいる.内皮細胞の核は基底部,細胞小突起は核の上部に位置している.透過型電子顕微鏡写真

mol/l-cacodylate buffer)で固定後細切し, 1% オスミウム酸で後固定した. 次に, アルコール系列で脱水し, エポキシ樹脂で包埋後, 超薄切片を作製した. 一部の切片

は, トルイジンブルー染色し, 光学顕微鏡で観察した. 超薄切片はウラニールアセテートとクエン酸鉛の二重染色を施し, 透過型電子顕微鏡で観察した.

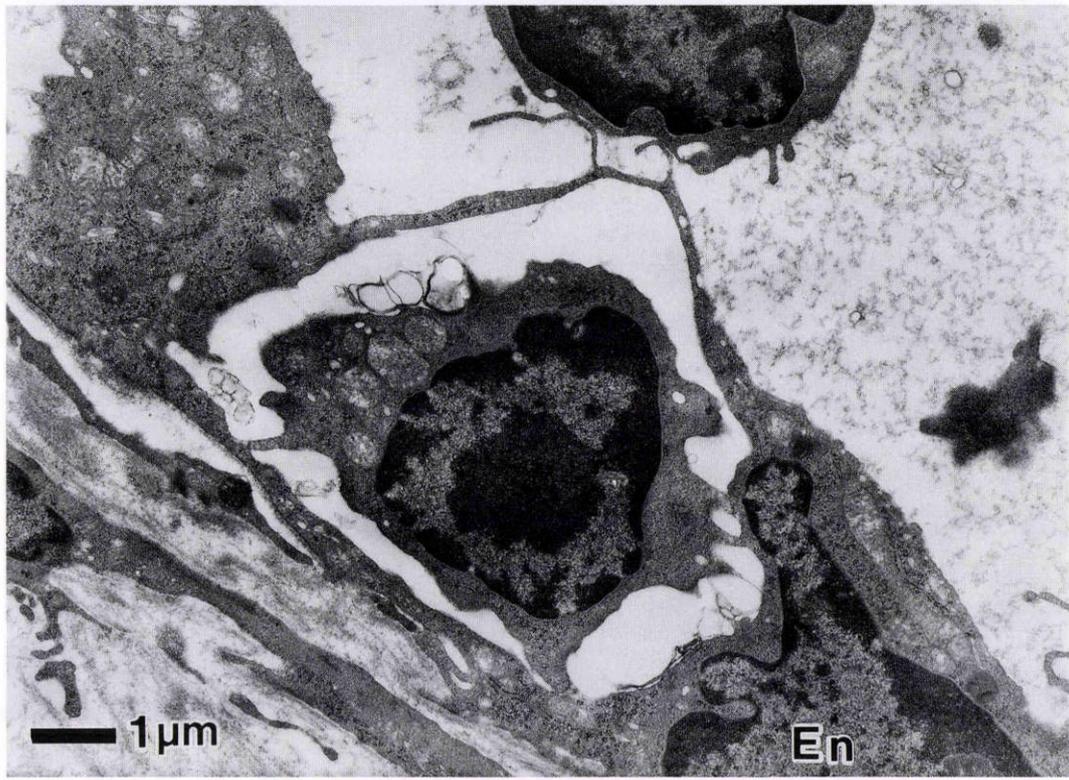


図5 血管内皮細胞とリンパ球 B.  
内皮細胞 (En) の細胞質内にリンパ球が取り込まれている. 透過型電子顕微鏡写真

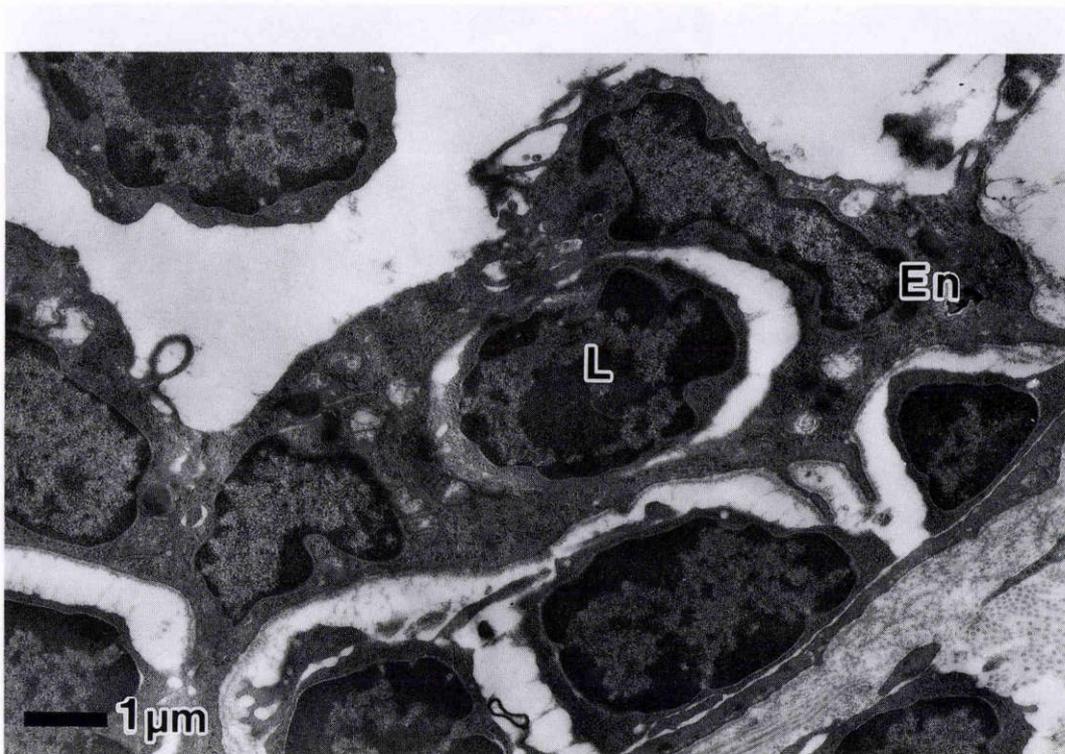


図6 血管内皮細胞とリンパ球 C.  
内皮細胞 (En) の核がリンパ球の側方から上方に位置している. 透過型電子顕微鏡写真

### III 結果

#### 1. 光学顕微鏡観察

トルイジンブルー染色標本では、モルモットの下眼瞼結膜にリンパ組織が認められた。リンパ組織内は、濾胞域 (follicular area, FA) とその周囲の傍濾胞域に分別され、傍濾胞域には血管、リンパ管が多数存在し、その中に細静脈が認められた (図1)。細静脈の内皮細胞は、密に並列し、丈が高く、内腔へ突出していた。

#### 2. 透過型電子顕微鏡観察

細静脈の血管内皮細胞 (endothelial cell, En) は、立方形様で自由表面が血管腔に突出し、細い小突起が血管内腔に伸びていた。血管内皮細胞の核は比較的明るく、不整形であった。血管の周囲は、膠原線維や細網繊維で囲まれ、細静脈周囲腔が形成され、血管内腔および血管基底部にリンパ球が認められた (図2)。血管内皮細胞の自由表面から伸びる細い小突起はリンパ球の膜表面に近接し、

一部はリンパ球に接触していた (図3)。リンパ球と血管内皮細胞との関係を観察すると、A~Eの5つの形態に分類できた。A: リンパ球は、血管内皮細胞から伸びた小突起に包み込まれるよう存在していた。また、この時、血管内皮細胞は基底側に核を認め、ゴルジ装置やミトコンドリアなどの細胞内小器官は核の上部に位置していた (図4)。B: リンパ球は完全に血管内皮細胞の細胞質内に取り込まれていた (図5)。C: リンパ球が血管内皮細胞の細胞質内に認められるが、内皮細胞の核はリンパ球の側方から上方にかけて位置していた (図6)。D: 血管内皮細胞内のリンパ球は基底側に存在し、血管内皮細胞の核はリンパ球の上方に位置していたが、リンパ球下方の血管内皮細胞の細胞質には間隙は認められなかった (図7)。E: 血管内皮細胞の基底部では、細胞質の一部が突起様に変形し、血管内皮細胞の基板の一部に間隙が認められた。その間隙からリンパ球の細胞質が血管周囲腔に遊出していた (図8)。血管内皮細胞の基板の一部



図7 血管内皮細胞とリンパ球 D.

内皮細胞 (En) の核はリンパ球の上方に位置している。内皮細胞の基底側にも細胞質が存在し、間隙は認められない (矢印)。\* : tight junction, 透過型電子顕微鏡写真

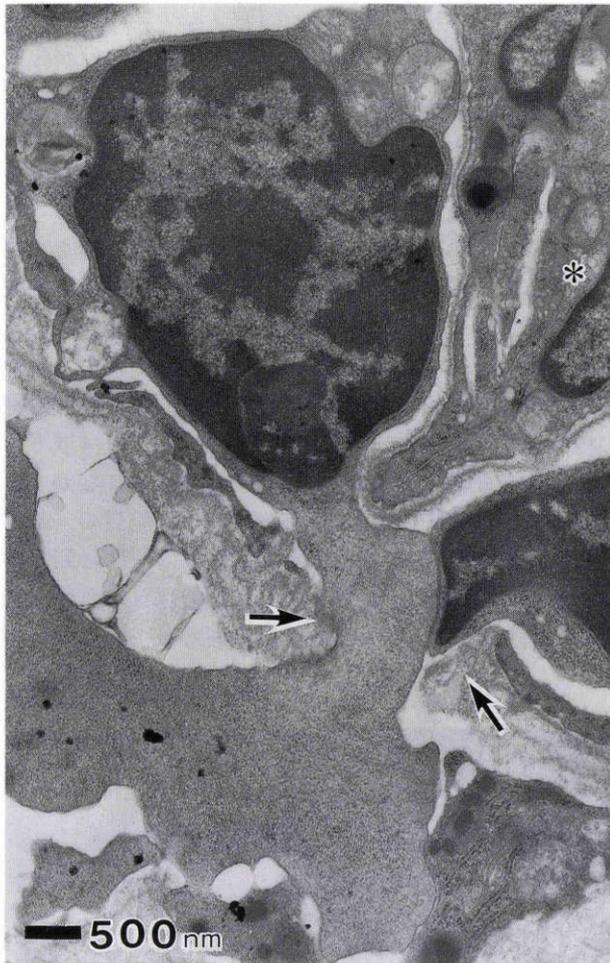


図8 血管内皮細胞とリンパ球 E.

内皮細胞の細胞質は突起様に変形し、基板の一部に間隙が認められ(矢印),リンパ球の細胞質が細静脈周囲腔に遊出している。\*: tight junction, 透過型電子顕微鏡

に裂隙が認められ,リンパ球は細静脈周囲腔に移動していた(図9)。リンパ球が細静脈を通過する過程で,血管内皮細胞の間隙を通過するような所見は認められなかった。

#### IV 考 按

高内皮細静脈は,毛細血管後細静脈(post-capillary venules)の中で末梢性のリンパ組織に存在するものを特に,その立方形の内皮細胞をもつ形態学的な特徴から,高内皮細静脈と命名された血管である。Gowans ら<sup>3)</sup>は,ラットのリンパ節において,リンパ球が血液からリンパ節に移動する際,皮質に存在する毛細血管後細静脈を通過すること,また,リンパ節に移動したリンパ球は再びリンパ管に入り,胸管を経由して血液中に入るという再循環を繰り返していることを報告した。さらに,標識したリンパ球を抗原刺激したラットの血管内に投与するとリンパ節ばかりでなく,脾臓,腸管のパイエル板にもリンパ球が認められたことから,再循環,つまりホーミングはリ

ンパ節のみの現象ではないことを説いている。その後,高内皮細静脈は注目を集め,その特殊な形態および機能については,リンパ球ホーミングの臓器特異性<sup>6)</sup>やそれに関する種々の接着分子の発現<sup>7-9)</sup>など数々の報告がなされてきた。現在,全身の粘膜関連リンパ組織では,高内皮細静脈を介して感作されたリンパ球がホーミングすることによって,それぞれのリンパ組織が互に関係し合っているといった common mucosal immune system (CMIS) の概念が唱えられるまでになった<sup>10)</sup>。眼瞼結膜に存在するリンパ装置は CALT と呼ばれ,ocular surface の局所免疫に深く関与し,CMIS の一員としての働きの有無が検討されている。しかし,結膜の局所免疫応答に関与するリンパ球のホーミングに関しては,未解明の部分も多く残されている。今回我々は,CALT 内の高内皮細静脈の存在と,そのリンパ球のホーミングの形態について組織学的に観察した。

モルモットの下眼瞼には,Dwyer ら<sup>11)</sup>が報告しているように大きな結膜濾胞が存在している。著者らはこれまでに,モルモットに対し,horseradish peroxidase と Freund's complete adjuvant の混合液を点眼して免疫し,免疫組織化学的に検討した結果,この結膜濾胞が抗原特異的 IgA の産生を誘導する組織であり,CALT としての機能を有することを示唆してきた<sup>12-14)</sup>。しかし,この組織におけるホーミングに関しては,これまでに検討されていない。今回は,CALT におけるホーミングの観察に主眼を置いたため,実験動物にはモルモットを用い,抗原には horseradish peroxidase と同程度の分子量を有するが,horseradish peroxidase よりも抗原性の高い ovalbumin を使用し,Freund's complete adjuvant と混合して点眼するという方法で感作した。この方法で免疫した場合,粘膜免疫は誘導されているものの,全身感作が成立するかどうかについては不明である。抗体価の測定も施行していないが,免疫後,結膜濾胞の腫大,結膜濾胞内に二次濾胞の形成がみられるなど horseradish peroxidase と Freund's complete adjuvant で免疫した場合と同様の組織学的変化が観察されたことから,今回の実験においても結膜濾胞内で免疫応答が生じている状態であると判断した。

眼瞼結膜に認められるリンパ装置の傍濾胞域には,多数のリンパ管,細動脈,細静脈が認められ,その中に高内皮細静脈として光学顕微鏡的にも判定可能な血管が認められた。透過型電子顕微鏡で観察すると,高内皮細静脈の内皮細胞は細い突起を血管腔に延ばし,リンパ球の表面と突起とが部分的に接触している所見が認められた。今田ら<sup>15)</sup>は接着分子である intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) に対する抗ラット ICAM-1 単クローン抗体を用いた免疫電子顕微鏡像で高内皮細静脈の血管内腔,特に小突起に ICAM-1 が発現していることを報告し,ホーミングには接着分子を発現した突起が重要

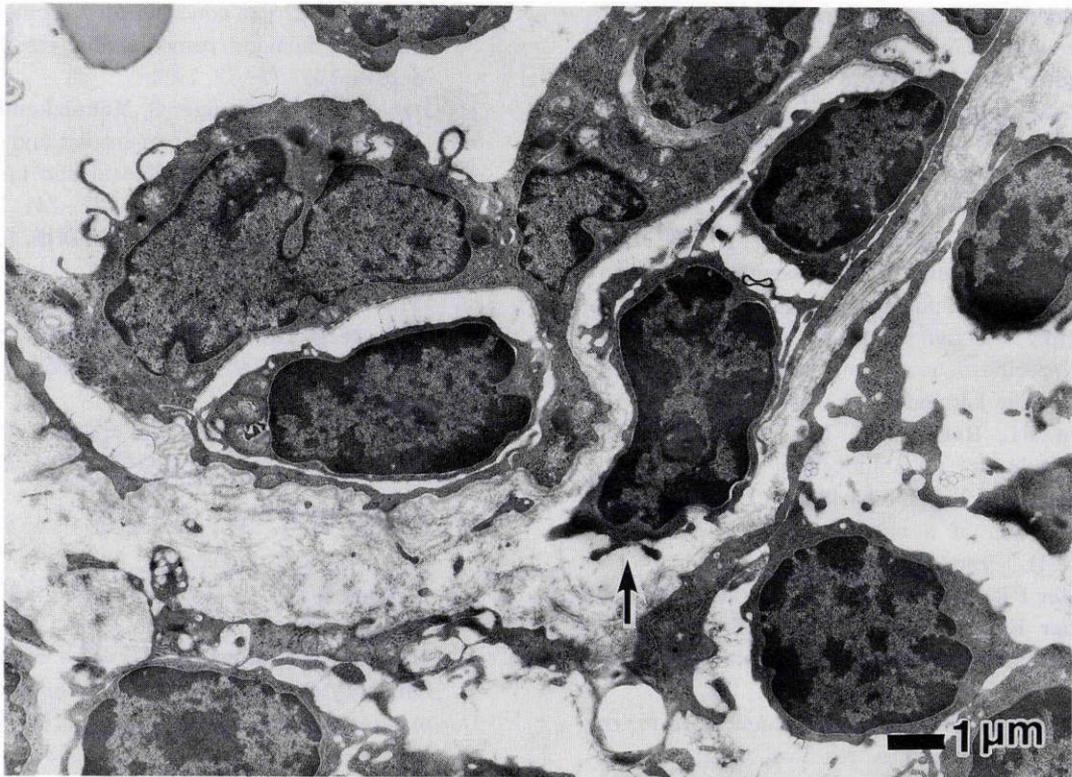


図9 血管内皮細胞とリンパ球 E.

内皮細胞の基底膜に裂隙が認められ、リンパ球が細静脈周囲腔に遊出している(矢印). 透過型電子顕微鏡写真

であると述べている. 今回の実験でも内皮細胞の突起とリンパ球の接触がみられ, この現象がリンパ球のホーミングに関する第一段階であると考えられた.

リンパ球はさらに細い突起に補足され, 内皮細胞の細胞質に取り込まれてゆく. リンパ球を取り込んだ血管内皮細胞内では, 内皮細胞の核は基底側から血管腔側に移動すると同時に, リンパ球は内皮細胞の基底側に位置するようになり, さらに基底側から内皮細胞外へと放出されるようになる. この時, 血管内皮細胞の基底膜には乱れが生じ, 断裂した部分から, リンパ球は細静脈周囲腔に遊出している. リンパ球が血管内皮細胞を通過するルートについては, Marchesi ら<sup>16)</sup>がラットのリンパ節内の細静脈では, リンパ球は血管内皮細胞内を通過し, 多核白血球は内皮細胞の細胞間隙を通過すると報告したことをはじめとして, Schoeffl<sup>17)</sup>がマウス, ラットのパイエル板の高内皮細静脈では, ほとんどのリンパ球が内皮細胞の細胞間隙を通過し, 一部が内皮細胞内を通過していると発表している. また, Farr ら<sup>18)</sup>は, ラットのリンパ節においてリンパ球が高内皮細静脈を通過する際には, 血管内皮細胞の細胞質に取り込まれ, さらに細胞間隙に移動してから血管周囲腔に遊出すると報告した. リンパ球が血管内腔から細静脈周囲腔に移動する際のルートは何種類かあり, 観察する動物種の違いや観察部位の違いにより, その形態が異なることが示唆される. 今回の観察では, リンパ球が遊出する際には内皮細胞の細胞間隙は強く結合し,

リンパ球が細胞間隙を通過するような所見は認められなかった. したがって, モルモットの CALT における高内皮細静脈ではリンパ球が血管内腔から血管周囲腔に移動するルートとして, 血管内皮細胞によるリンパ球の取り込みと放出によるルートが主なものであると考えられた. 今回観察された血管内皮細胞とリンパ球との関係は, 今田ら<sup>15)</sup>がラットのパイエル板で報告している超微細形態像と類似しており, これらの結果から, CALT 内にも高内皮細静脈が存在し, 全身の粘膜関連リンパ装置と同様なリンパ球のホーミング現象が起こっていると考えられ, CALT も CMIS の一端を担っている可能性が示唆された.

本論文の要旨は第 60 回日本中部眼科学会で発表した.

#### 文 献

- 1) Kraal G, Duijvestijn AM, Hendriks HH: The endothelium of the high endothelial venule: A specialized endothelium with unique properties. *Exp Cell Biol* 55: 1-10, 1987.
- 2) Pals ST, Horst E, Scheper RJ, Meijer CJM: Mechanisms of human lymphocyte migration and their role in the pathogenesis of disease. *Immunol Rev* 108: 111-133, 1989.
- 3) Gowans JL, Knight EJ: The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc Roy Soc B* 159: 257-282, 1964.
- 4) Anderson ND, Anderson AO, Wyllie RG: Specialized structure and metabolic activities of

- high endothelial venules in rat lymphatic tissues. *Immunol* 31: 455—473, 1976.
- 5) **Chandler JW, Axelrod AJ**: Conjunctiva-associated lymphoid tissue: A probable component of the mucosa-associated lymphoid system. In: O'Connor GR (Ed): *Immunologic Disease of the Mucous Membranes; Pathology, Diagnosis and Treatment* New York Masson: 63—70, 1980.
  - 6) **Butcher EC, Scollay RG, Weissman IL**: Organ specificity of lymphocyte migration: Mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules. *Eur J Immunol* 10: 556—561, 1980.
  - 7) **Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CH, Springer TA**: Induction by IL 1 and Interferon- $\gamma$ : Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137: 245—254, 1986.
  - 8) **Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC**: A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 331: 41—46, 1988.
  - 9) **Tamatani T, Miyasaka M**: Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells. *Int Immunol* 2: 165—171, 1990.
  - 10) **McGhee JR, Kiyono H**: Mucosal immunity to vaccines: Current concepts for vaccine development and immune response analysis. *Adv Exp Med Biol* 327: 3—12, 1992.
  - 11) **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.
  - 12) 稲田紀子, 庄司 純, 葛西 浩, 石井康雄, 北野周作: 結膜リンパ装置と局所免疫. *あたらしい眼科* 8: 1413—1416, 1991.
  - 13) 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.
  - 14) 稲田紀子, 庄司 純, 葛西 浩, 石井康雄, 北野周作: Ocular surface の局所免疫機構. *日眼会誌* 96: 817—822, 1992.
  - 15) 今田正人, 山下 昭: リンパ球ホーミングに関する HEV 内皮細胞の電顕的観察. 接着分子, その働きと生体への関与: 68—77, メジカルビュー社, 東京, 1993.
  - 16) **Marchesi VT, Gowans JL**: The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: An electron microscope study. *Proc Roy Soc B* 159: 283—290, 1963.
  - 17) **Schoeffl GI**: The migration of lymphocytes across the vascular endothelium in lymphoid tissue. *J Exp Med* 136: 568—588, 1972.
  - 18) **Farr AG, Bruyn P**: The mode of lymphocyte migration through postcapillary venule endothelium in lymph node. *Am J Anat* 143: 59—92, 1975.