

結膜における S-100 蛋白陽性細胞の分布

高浦 典子, 稲田 紀子, 庄司 純, 澤 充

日本大学医学部眼科学教室

要 約

酵素抗体法により正常結膜およびアレルギー性結膜炎の結膜における S-100 蛋白陽性細胞の分布を観察し検討した。実験動物としてハートレイ系モルモットを用いた。正常群は非感作群モルモットとし、アレルギー性結膜炎モデルは、卵白アルブミンと水酸化アルミニウムの等量混合液をモルモット腹腔内に注入し感作した後、卵白アルブミン溶液点眼により発症させた。免疫組織化学法として抗ウシ脳 S-100 蛋白ウサギ抗体を一次抗体とし、間接酵素抗体 (ABC) 法で染色した。両群の輪部上皮内や、眼瞼皮膚上皮内の S-100 蛋白陽性細胞の分布はランゲルハンス細胞の分布と思われた。また、正常結膜で

は、結膜濾胞の濾胞域にわずかに胚中心がみられたが、アレルギー性結膜炎群では胚中心が多くみられた。この胚中心では S-100 蛋白陽性細胞を認め、*follicular dendritic cell*, *interdigitating cell* の存在が示唆された。以上から、角膜輪部、結膜濾胞の濾胞域および傍濾胞域、皮膚に抗原提示機能を有する *antigen presenting cell* が存在する可能性が示唆された。(日眼会誌 99: 873-877, 1995)

キーワード: S-100 蛋白, ランゲルハンス細胞, 嵌合細胞, 濾胞樹状細胞, 抗原提示細胞

Distribution of S-100 Protein Positive Cells in Conjunctiva

Noriko Takaura, Noriko Inada, Jun Shoji and Mitsuru Sawa

Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

Abstract

We compared the distribution of S-100 protein positive cells in normal conjunctiva and in an induced allergic conjunctivitis model using Hartley strain quinea pigs. The animals were sensitized by intraperitoneal injection of ovoalbumin solution with hydroxy aluminum, followed by topical application of the ovoalbumin solution. The primary antibody was antiovine brain S-100 positive antibody, detected by the avidin biotin complex method. S-100 positive cells were present at the limbal corneal epithelium and on the skin of the palpebrae in both the normal group and the allergic conjunctivitis group, indicating the presence of Langerhans cells.

In the allergic group, positive cells were also detected in palpebral conjunctiva and the germinal centers of conjunctival follicles. These cells were identified as follicular dendritic cells or interdigitating cells. In conclusion antigen presenting cells were present in the limbal conjunctiva, follicular and parafollicular area of conjunctival follicles, and palpebral skin in the allergic conjunctivitis models. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 873-877, 1995)

Key words: S-100 protein, Langerhans cell, interdigitating cell, Follicular dendritic cell, Antigen presenting cell

I 緒 言

S-100 蛋白は当初、神経組織、特にグリア細胞に局在する特異蛋白と考えられていたため、グリオーマの病理診断マーカーとして基礎および臨床に導入された¹⁾。しかし、その後の研究により神経組織以外にも S-100 蛋白に陽性を示す様々な組織や細胞が明らかとなり、リンパ系

組織でも、皮膚の Langerhans cell (LC) やリンパ節の interdigitating cell (IDC) が S-100 蛋白陽性であることが知られている²⁾³⁾。Follicular dendritic cell (FDC), LC, IDC などの樹状細胞は、抗原提示細胞としての働きがあり、局所の免疫機構を考えるうえで重要である。特に LC については、田川ら⁴⁾⁵⁾によって、角膜輪部に存在する抗原提示細胞としてその存在は既に報告されてい

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 高浦 典子
(平成6年10月24日受付, 平成7年4月6日改訂受理)

Reprint requests to: Noriko Takaura, M.D. Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine.
30-1 Oyaguchi-kamimachi, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

(Received October 24, 1994 and accepted in revised form April 6, 1995)

る。しかし、S-100 蛋白をマーカーとして結膜組織の樹状細胞について検討した報告はまだなく、眼科領域では、船田ら⁹⁾のヒト虹彩における S-100 蛋白陽性細胞についての報告があるのみである。今回我々は、S-100 蛋白の結膜での抗原提示細胞のマーカーとしての役割について注目した。ハートレイ系モルモットを使用し、正常結膜とアレルギー性結膜炎モデルにおける S-100 蛋白陽性細胞の分布について検討を行った。

II 実験方法

実験動物には 300~400 g の白色ハートレイ系モルモットを使用し、正常群 5 匹 10 眼とアレルギー性結膜炎群 5 匹 10 眼の 2 群に分け検討した。正常群は、未処置(無点眼)のモルモットとした。アレルギー性結膜炎群は、以下の処置を行った。卵白アルブミン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と水酸化アルミニウム (5 mg/ml) の混合液 1 ml をモルモットの腹腔内に注入し感作し、その後 14 日後に卵白アルブミン (5 mg/ml) を点眼し、アレルギー性結膜炎を発症させた。アレルギー性結膜炎群は、アレルギー発症 24 時間後に、正常群は未処置のまま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、眼瞼ごと眼球を摘出した。

摘出した試料は直ちに 2% Periodate lysin paraformaldehyde (PLP) 溶液で 1 時間固定後、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。凍結した試料は、クライオスタットを用いて約 6 μm 厚に薄切し、L-リジンコートスライドに塗布し風乾した後、以下の染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

1. 酸性ギムザ染色法

標本は 70% アルコールに 3 分間浸漬した後、Diff Quick[®] (ミドリ十字) を用いてキットの染色法に従って染色し、結膜の炎症性変化を観察した。

2. 酵素抗体法

抗ウシ脳 S-100 蛋白ウサギ抗体 (Research development corp.) を一次抗体とし、間接酵素抗体法 (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 (和光純薬株式会社) を用いた。核染色はメチルグリーン染色を行った。

III 結果

1. 酸性ギムザ染色

正常群、アレルギー性結膜炎群ともに結膜濾胞は下眼瞼円蓋部に存在し、内部は濾胞域、傍濾胞域、円蓋域に分れていた。正常群では、結膜上皮は結膜上皮細胞および杯細胞が観察され、結膜下組織にはほとんど細胞浸潤を認めなかった。アレルギー性結膜炎群の瞼結膜上皮には、杯細胞は殆ど認められず、結膜上皮は脱落もしくは一部欠損していた。また、結膜下組織では、リンパ球、

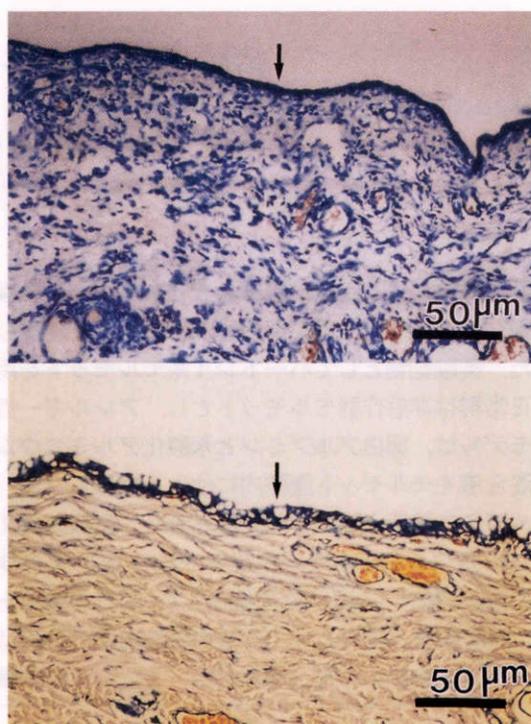


図 1

上段：アレルギー性結膜炎群の瞼結膜(酸性ギムザ染色)。結膜下組織では、リンパ球、好中球、好酸球などが浸潤し、上皮は一部脱落している。瞼結膜上皮(矢印)。下段：正常群の瞼結膜。上皮には杯細胞が認められた(矢印)。

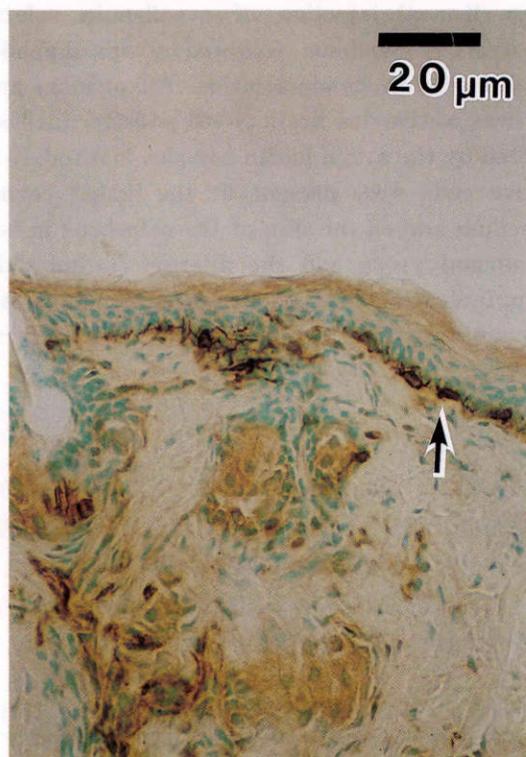


図 2 正常群眼瞼の皮膚面(酵素抗体法)。上皮基底部の S-100 蛋白陽性細胞(矢印)。

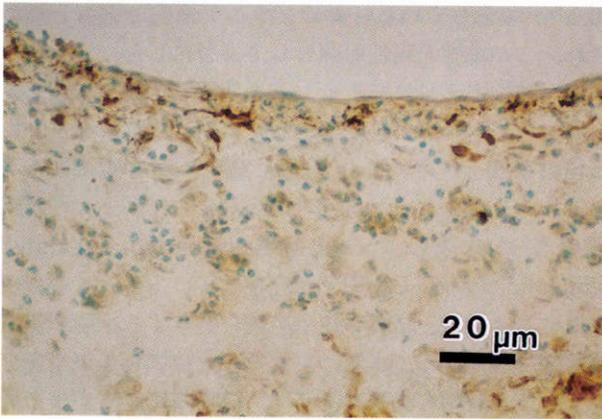


図 3 アレルギー性結膜炎群の瞼結膜 (酵素抗体法).
上皮下に S-100 蛋白陽性細胞を認める.

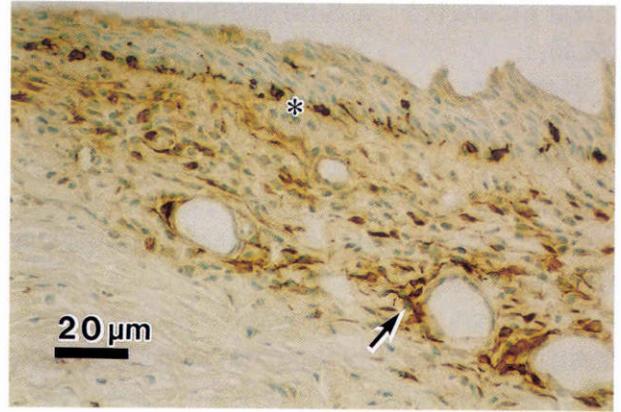


図 6 アレルギー性結膜炎群角膜輪部 (酵素抗体法).
アレルギー性結膜炎の角膜輪部上皮付近に認められた
S-100 蛋白陽性細胞 (*印). 血管腔周囲にも存在する
S-100 蛋白陽性細胞 (矢印).

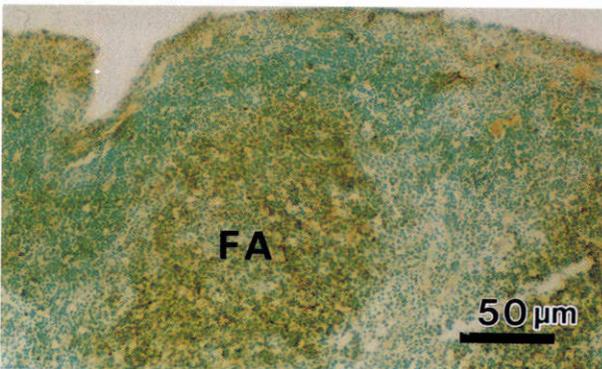


図 4 アレルギー性結膜炎群の結膜濾胞 (酵素抗体法).
S-100 蛋白陽性細胞が融合し, 網目状に濾胞域全体
が染色されている. FA: 濾胞域.

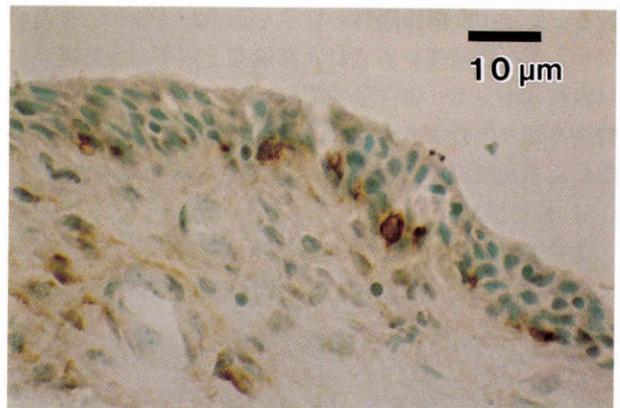


図 7 正常群角膜輪部 (酵素抗体法).
上皮基底部に S-100 蛋白陽性細胞が並んでいる.

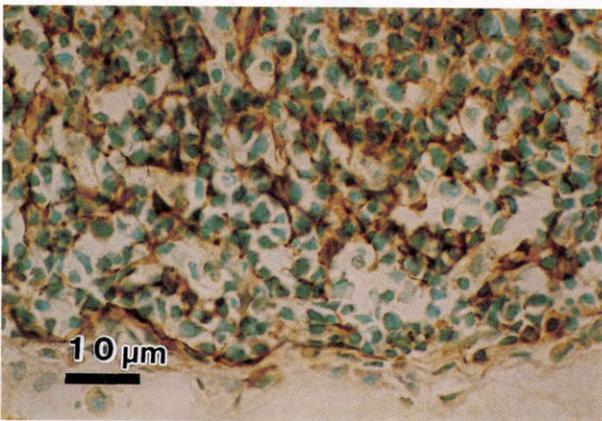


図 5 アレルギー性結膜炎群の結膜濾胞強拡大 (酵素
抗体法).

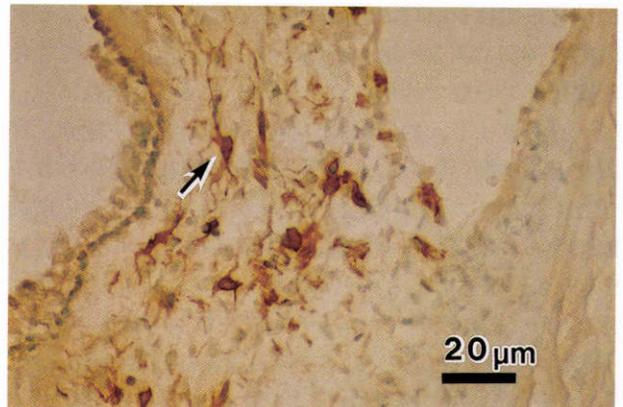


図 8 陽性対照 (酵素抗体法).
虹彩根部の S-100 蛋白陽性細胞 (矢印).

好中球, 好酸球などが主体の細胞浸潤を認めた (図 1).

2. 酵素抗体法

1) 眼瞼皮膚

正常群, アレルギー性結膜炎群とも, 上皮基底部に S-100 蛋白陽性細胞が並んで観察され, 特に瞼縁付近の皮膚では高密度であった (図 2).

2) 結膜

正常群では, 球結膜から瞼結膜にかけてのどの部位にも S-100 蛋白陽性の細胞は殆どみられなかった. 一方, アレルギー性結膜炎群では, 瞼結膜の結膜下組織に細胞浸潤が強く, 一部結膜上皮が脱落している瞼結膜では,

上皮直下に樹枝状をした S-100 蛋白陽性の細胞を認めた (図 3)。

3) 結膜濾胞

正常群では結膜濾胞の濾胞域に胚中心が存在する場合と、存在しない場合とがあり、胚中心が形成されていない濾胞域には S-100 蛋白陽性の細胞は認められなかったのに対し、胚中心を形成している濾胞域では胚中心に網目状の陽性像を示した。これに対し、アレルギー性結膜炎群では濾胞内に胚中心の形成が殆どの例に認められ、濾胞域内は S-100 蛋白陽性細胞が融合し網目状に濾胞域全体が染色された (図 4, 5)。アレルギー性結膜炎群の傍濾胞域の特に血管周囲にも樹枝状に染色される細胞が観察された。

4) 角膜輪部

正常群およびアレルギー性結膜炎群ともに、角膜輪部上皮の基底部付近には 1 列に並ぶ比較的大型で不規則な形をした S-100 蛋白陽性の細胞を認めた (図 6)。また、アレルギー性結膜炎群では角膜輪部上皮下の血管周囲には樹枝状の S-100 蛋白陽性細胞が存在し、細胞突起で血管腔を取り囲むように存在していた (図 7)。さらに、輪部付近の角膜実質内にも、S-100 蛋白陽性細胞を認めた。

5) 虹彩根部

正常群、アレルギー性結膜炎群とも虹彩根部の実質内に不規則な形をした S-100 蛋白陽性細胞を認めた (図 8)。

IV 考 按

S-100 蛋白は、1965 年 Moore⁷⁾によって、ウシの脳から発見された酸性蛋白で、100%の飽和硫酸に可溶性であることからその名前が与えられた。S-100 蛋白は神経細胞やグリア細胞、特にアストログリアに多量に存在し、末梢神経系ではシュワン細胞に局在しているため、長年代表的な神経系関連組織・細胞のマーカー抗原として免疫組織化学の分野で利用されてきた¹⁾。しかし、最近になってメラノサイト、軟骨細胞、脂肪細胞、筋上皮細胞、汗腺などの神経外組織にも S-100 蛋白の局在が認められるとともに¹⁾、リンパ系組織では、マクロファージや皮膚の LC、さらに末梢リンパ組織、胸腺髄質に存在する IDC が S-100 蛋白陽性であることが判明した⁸⁾。また、この蛋白は α 鎖と β 鎖のサブユニット組成を持つ 2 量体であり、その組み合わせによって、S-100 ao ($\alpha\alpha$)、S-100 a ($\alpha\beta$)、S-100 b ($\beta\beta$) の 3 種類の S-100 蛋白が存在する⁹⁾。LC や、IDC は β 鎖のみから成る S-100 b 蛋白を持ち、単球/マクロファージ系細胞には、 α 鎖のみから成る S-100 ao 蛋白が局在している¹⁾。現在、S-100 蛋白抗体は数社から市販されているが、どの抗体も主として β 鎖を認識する抗体であるため、今回の実験では単球/マクロファージ系細胞を同定することはできなかったと考えられる。今回の実験では、正常群、アレルギー性結膜炎群の両群に見られた虹彩根部実質内の S-100 蛋白陽性細胞は、既に船

田ら⁶⁾が報告している虹彩のメラニン細胞であると推測され、この細胞を陽性対照として参考にした。

今回実験モデルにモルモットを使用した。モルモットについては 1979 年 Klareskog ら¹⁰⁾が、モルモットには角膜輪部上皮中に抗 Ia 抗体に染色される樹状細胞があることを報告し、1980 年 Chandler ら¹¹⁾によって結膜円蓋部に結膜リンパ装置 (conjunctiva-associated lymphoid tissue, CALT) が存在していることも報告されているように、結膜の免疫応答に関与する細胞や組織が解明されている。また、モルモットはアレルギーモデルとしても有用な動物であり¹²⁾、結膜の炎症性変化を観察するため、今回はモルモットのアレルギー性結膜炎モデルを実験モデルとして使用した。

LC は、ATPase 染色や non-specific esterase 染色、S-100 蛋白に陽性を示す細胞で、酵素組織化学や免疫組織化学的手法により観察可能であり、電子顕微鏡による観察では細胞質内に Birbeck 顆粒と呼ばれるラケット状の構造物を持つことにより同定されるため、既に皮膚表皮内に存在する抗原提示細胞として知られている。田川ら⁴⁾はモルモットの角膜輪部および上皮中に皮膚表皮中と同様 LC の存在することを電子顕微鏡および ATPase 染色により示し、角膜輪部実質中に少数ではあるが Birbeck 顆粒をもつ典型的なランゲルハンス細胞が上皮直下あるいは血管周囲にみられたことを報告している。以上のことから、眼瞼皮膚表皮内および角膜輪部に認められた S-100 蛋白陽性細胞は、その分布から LC が最も考えられた。LC は免疫細胞として、表面抗原の主要組織適合遺伝子複合体 MHC クラス II 抗原を強く発現していることから、体表面の組織において外界などからの抗原情報を T リンパ球へ伝達する抗原提示細胞として働いていると考えられている⁵⁾。今回の実験でも、正常群と比較してアレルギー性結膜炎群の角膜輪部上皮下の血管周囲や角膜輪部実質内などの場所で陽性細胞が多く認められた。竹内らは¹³⁾、春季カタルなどのアレルギー性結膜炎疾患において、結膜上皮および実質内で LC が増加していると報告し、遅延型過敏反応ばかりでなく、即時型アレルギーに対しても LC が関与していることを示唆している。今回の LC と考えられる S-100 蛋白陽性細胞の増加は、アレルギー反応による LC の変化が組織学的に観察されたものと考えられた。

樹状細胞と呼ばれる非貪食性の抗原提示細胞には、リンパ組織中の B 細胞依存性領域、特にリンパ濾胞の胚中心に存在する FDC、T 細胞依存性領域に存在する IDC などがあり、これら IDC、FDC は Nakajima ら²³⁾により、S-100 蛋白陽性であると報告されている。粘膜組織には粘膜関連リンパ組織 (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) と呼ばれるリンパ組織があり、その 1 つである Peyer 板では、B 細胞領域である濾胞域、T 細胞領域である傍濾胞域、さらに円蓋域と内部が細分化さ

れている。IDCやFDCの分布はパイエル板においても例外ではなく、傍濾胞域にはIDC、胚中心にはFDCやtingible macrophageが散在していると報告¹⁴⁾されている。モルモットの結膜においてMALTに相当する組織として、結膜関連リンパ装置(CALT)が報告されており、臨床的には結膜濾胞に相当する組織であると考えられている。CALTはパイエル板と同様に結膜上皮下に円蓋域、濾胞域、傍濾胞域に分かれており、傍濾胞域はT-cell領域、濾胞域はB-cell領域であることが報告¹⁵⁾されている。一方、田川ら¹⁶⁾が行った結膜濾胞の免疫組織化学的検討では、濾胞内にLCは認められていない。CALT内のS-100蛋白陽性細胞については、パイエル板と同様に胚中心にはFDCが、傍濾胞域ではIDCが存在する可能性が示唆された。CALTは、IgAを介した生体防御を誘導する組織であることから、正常群およびアレルギー性結膜炎群における、二次濾胞の形成がアレルギー反応としてのものなのか、抗原侵入に対する防御反応の結果であるかは不明であったが、二次濾胞形成によって、FDCと考えられるS-100蛋白陽性細胞の増加がみられたものと考えられた¹⁷⁾。

今回の実験では細胞特異的マーカーや透過型電子顕微鏡を用いた個々のS-100蛋白陽性細胞の同定には至っていないが、角膜輪部ではLC、濾胞域ではFDC、傍濾胞域ではIDC、眼瞼皮膚ではLCと思われる細胞が染色された。特に結膜濾胞内にLCとは異なる樹状細胞が存在している可能性が考えられた。

文 献

- 1) 高橋聖之: S-100蛋白の免疫組織化学。検査と技術 19: 812—816, 1991.
- 2) Nakajima T, Sato Y, Watanabe S, Shimosato Y, Ishihara K, Isobe T: Immunoelector on microscopical demonstration of S-100 protein in epidermal Langerhans cells. Biomed Res 3: 226—231, 1982.
- 3) Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Shimosato Y, Motoi M, Lennert K: S-100 protein in Langerhans cells, Interdigitating reticulum cells and Histiocytosis X cells. Gann 73: 429—432, 1982.

- 4) 田川義継, 竹内 勉, 佐賀徳博, 松田英彦: 角膜結膜におけるランゲルハンス細胞. 日眼会誌 86: 825—832, 1982.
- 5) 田川義継: ランゲルハンス細胞. 眼科 34: 37—43, 1992.
- 6) 船田みどり, 氏家和宣, 所 敬, 下川伶子: ヒト虹彩のS-100蛋白陽性細胞. 眼紀 38: 192—197, 1987.
- 7) Moore BW: A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Biophys Res Commun 6: 739—744, 1965.
- 8) Takahasi K, Isobe T, Ohtsuki Y, Sonobe H, Takeda I, Akagi T: Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system. Am J Pathol 116: 497—503, 1984.
- 9) 磯辺俊明, 奥山典生: S-100蛋白質. 蛋白質核酸酵素 29: 1085—1100, 1984.
- 10) Klareskog L, Forsum U, Tjernlund UM, Lars R: Expression of Ia antigen-like molecules on cells in the corneal epithelium. Invest Ophthalmol 18: 310—313, 1979.
- 11) Chandler JW, Axelrod AJ: Conjunctiva associated lymphoid tissue: A probable component of the mucosa-associated lymphoid system. In: Oconnor GR (Ed): Immunologic diseases of the mucous membranes: pathology, diagnosis and treatment, New York Masson 63—70, 1980.
- 12) 庄司 純, 稲田紀子, 高浦典子, 澤 充: アレルギー性結膜炎の組織学的検討. 日眼会誌 99: 129—134, 1995.
- 13) 竹内 勉, 田川義継, 樋口真琴, 松田英彦: アレルギー性結膜疾患におけるランゲルハンス細胞の動態. 日眼会誌 89: 702—708, 1985.
- 14) 庄司 純: 感染に対する眼の防御機構. 眼科 33: 1065—1075, 1991.
- 15) 芹沢 宏, 三浦総一郎, 土屋雅春: Peyer板と局所免疫. 臨床免疫 23: 1644—1653, 1991.
- 16) 田川義継, 斎藤 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.
- 17) 土橋陸夫, 佐藤裕信: 濾胞樹状細胞の発生とその多様性. 細胞 26: 213—216, 1994.