

鼻粘膜局所免疫応答における T リンパ球の役割

—マウスにおける実験的検討—

佐野 啓介 柴 宏巳 川内 秀之

島根医科大学耳鼻咽喉科学教室

An investigation on the role of T lymphocytes in local response of Nose

—An Experimental study in mice—

Keisuke SANO, Hiromi SHIBA, Hideyuki KAWAUCHI

Department of Otolaryngology, Shimane Medical University, Shimane

Mucosal immunity has been proven to be present in the nasal mucosa as well as tracheal or gastrointestinal tract. For the last half decade, we have been clarifying the mechanism of immune response in the nasal mucosa, employing mice as an experimental animal. In this study, we show that lymphocyte aggregates (nasal associated lymphoid tissue, NALT) in nasal submucosa have an important role as an inductive site and/or possibly effector site in a local IgA response and examine the role of T cell subset in nasal cavity for mucosal immunity, employing a flow-cytometric analysis. Horseradish peroxidase (HRP) ($100\mu\text{g}$ in $2\mu\text{l}$) as a protein antigen is challenged intranasally 7 times at two days interval for 2 weeks with cholera toxin (CT) ($1\mu\text{g}$) as a mucosal adjuvant. Ag specific IgA titers in nasal washings from mice challenged with HRP with CT are higher than those from mice challenged with HRP only. Nasal lymphocytes including NALT are harvested for an analysis of lymphocyte subsets by a flow-cytometry. Flow-cytometric analysis of T cell subsets show that population of $\alpha\beta$ TCR positive T cells are higher in Ag-challenged mice than saline-challenged control mice. These data suggest that NALT could be at least an inductive site of local immune response of nasal mucosa and that T cell subsets ($\alpha\beta$ TCR and/or $\gamma\delta$ TCR positive T cells) mobilized to nasal mucosa might up regulate IgA response in nasal mucosa.

はじめに

細菌、ウイルスといった外来抗原に対する生体の防御機構のうち、それらと直接接触する機会の多い粘膜面での免疫応答の重要性が指摘さ

れ、特に消化管関連リンパ装置、および気管支関連リンパ装置といった概念で研究報告されている。我々はこれまでに鼻粘膜局所免疫応答について検討する目的でマウスを用いた系におい

て粘膜アジュバントとしてコレラトキシンを併用した蛋白抗原の点鼻を行い、鼻局所免疫応答の賦活を試みてきた。その結果マウス鼻粘膜下に存在するリンパ球集簇がいわゆる nasal associated lymphoid tissue (NALT) としての機能を有しており鼻粘膜局所での感染防御に重要な役割を持つ可能性を示してきた。今回、感作マウスの鼻腔および気管支洗浄液中の抗原特異的抗体価を測定すると共に、マウス鼻腔よりリンパ球を単離し、その表面マーカーについての検討を加え報告した。

方 法

マウスは BALB/C または C57BL/6 マウスの雄を購入し SPF 環境下で飼育管理したものをを用いた。

抗原として Horseradish peroxidase (HRP) (Sigma 社製) を用い粘膜アジュバントとして Cholera toxin (CT) (Sigma 社製) を併用した。100 μ g の HRP を 2 μ l の燐酸緩衝液に溶解し CT 1 μ g と併用あるいは単独で、1 日おきに 2 週間合計 7 回マウス右鼻腔に点鼻感作を行った。

組織学的検討は、感作マウスおよび無処理マウスについて鼻腔組織を採取し、PLP 固定後、EDTA トリス緩衝液による脱灰、OCT コンパウンドへの包埋を行い、6 μ m の凍結切片を作成し染色を行った。HE 染色および免疫染色を行い、免疫染色は一次抗体としてウサギ抗マウス IgA ポリクローナル抗体 (Zymed Laboratories 社製) を用い、二次抗体としてペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cooper Biomedical 社製) を用いた¹⁾。抗体産生についての検討は、マウスを 2 群に分けグループ A には HRP と CT を用いて感作を行い、グループ B には HRP のみで感作を行い、感作終了後 2、3 週間目にマウスを脱血後、屠殺し PBS を用い鼻腔洗浄液、肺洗浄液を採取した。抗原特異的抗体価はフォスファターゼ結合マウス γ 鎖および α 鎖特異的抗体を用いた ELISA 法にて

測定した。

次にマウス鼻腔よりリンパ球を単離しその表面マーカーについての検討を加えた。採取方法は田村らの方法に準じて行い、マウスの上顎部分を摘出し、コラゲナーゼ溶液 4mg/ml にひたし 37 $^{\circ}$ C、30 分間処理した後軟部組織を採取し、金属メッシュを通した。70%と 45%のパーコールの希釈列を作り細胞浮遊液を重層し、200G、4 $^{\circ}$ Cにて 20 分間遠沈し単核球を単離した。採取した細胞を用い、flow-cytometry にて細胞表面マーカーについて検討を行った。方法は各抗体あたり単核球 1×10^5 個を準備し、FITC 標識抗マウス CD3, CD4, CD8, $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR モノクローナル抗体 (PherMingen 社製) による単染色、およびヒツジ抗マウス IgM 抗体と FITC 標識抗ヒツジ IgG 抗体 (ともに Kirkegaard Perry Laboratories 社製) による二重染色にて行った。

結 果

ELISA による鼻腔洗浄液中の HRP 特異的 IgA 抗体を測定した結果、2 週目、3 週目の時点で HRP 単独群に比べ CT 併用群で有意に高い IgA の上昇を認めた (Fig. 1)。気管洗浄液中の IgA 抗体価はともに低い値を示し、IgG 抗体価は CT 併用群の気管洗浄液中でわずかに上昇を認めたもののいずれも低い値を示した。

感作マウス、無処理マウスについて凍結切片を作成し、HE 染色にて NALT の状態を比較した。無処理マウスに比べ感作マウスでは鼻腔底側壁に存在する NALT の細胞集簇の増殖が認められた (Fig. 2)。

免疫染色を行った結果、IgA 陽性細胞が HRP 単独群に比べ CT 併用群において NALT 直上の上皮下や周囲組織に動員されている所見が認められた。NALT は High endothelial venule (HEV) を有し、電顕での観察より M cell (membranous epithelial cell) 様の細胞が存在することが確認された。

次にマウス鼻腔よりリンパ球を単離しその表

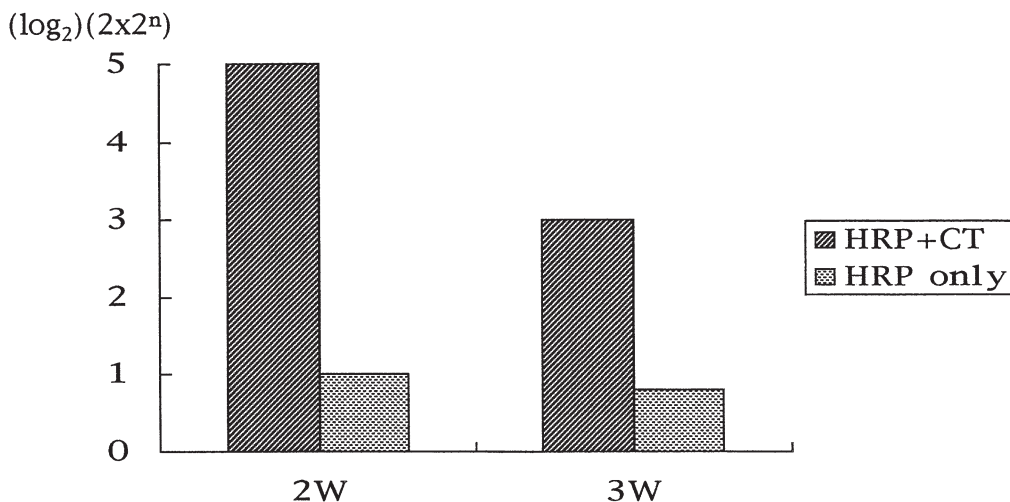
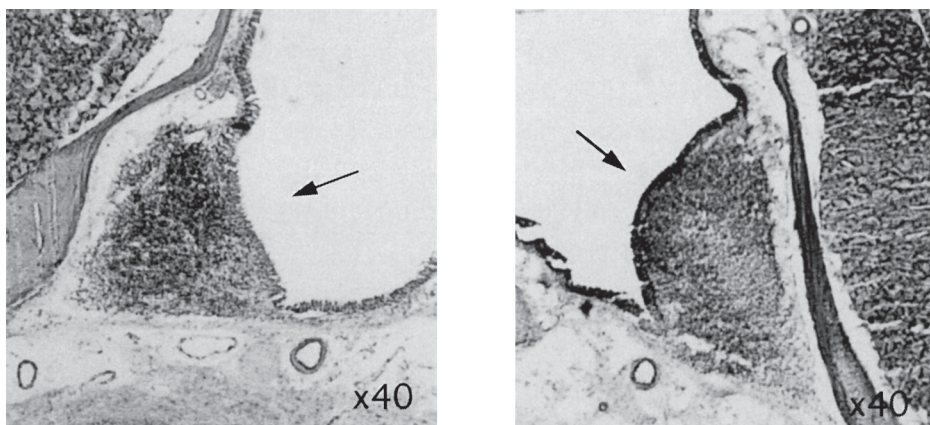


Fig. 1 鼻腔洗浄液中の抗原特異的 IgA 抗体価：感作後 2 週間および 3 週間ともに HRP 単独群に比べ CT 併用群で有意に高い抗体価の上昇を認めた。



非感作マウス

感作マウス

Fig. 2 NALT の HE 染色像：左は非感作マウス，右は感作マウスの NALT を示す。感作による細胞の増殖が認められる。

面マーカーについての検討を加えた。前述の方法にて単離したマウス鼻腔リンパ球を用い、flow-cytometryにて細胞分画の解析を行った。HRPとCTにて感作したマウスについて解析した結果、IgM陽性細胞、CD3陽性細胞が認められ²⁾、同様に感作を行ったマウスおよび

無処理マウスについて特にその T cell マーカーを中心に比較を行った結果、感作により $\alpha\beta$ TCR 陽性細胞の割合が増加する傾向が認められた (Fig. 3)。

まとめと考察

蛋白抗原と cholera toxin を用いた経鼻感作

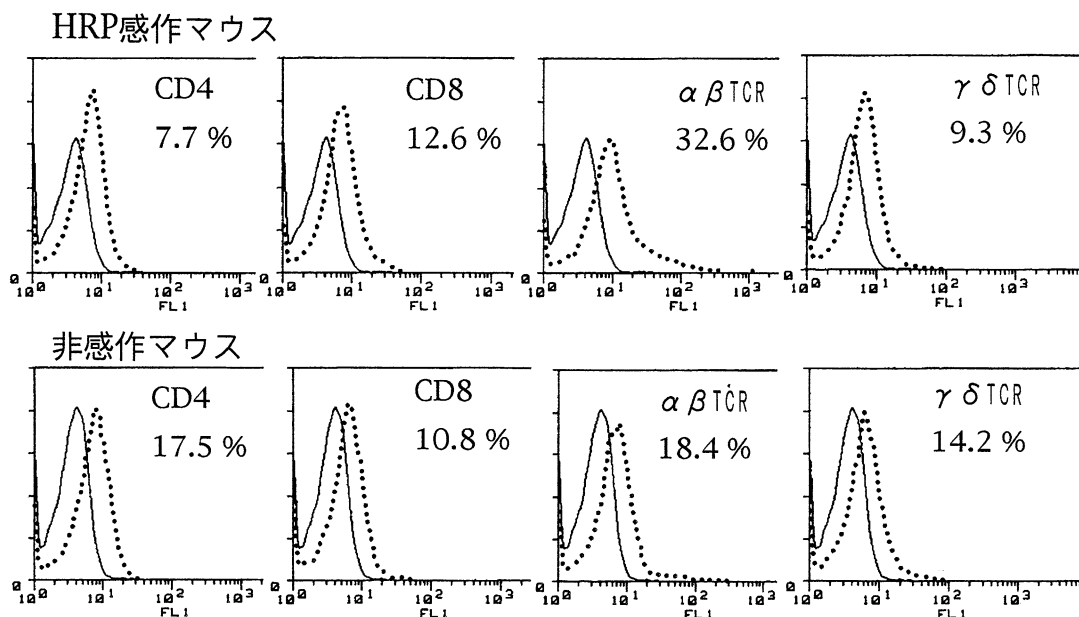


Fig. 3 マウス鼻腔リンパ球のT細胞分画：上段は感作マウス，下段は非感作マウスのもので，感作群で $\alpha\beta$ TCR陽性細胞分画の増加が認められる。

によるマウス実験モデルにより，鼻粘膜局所免疫応答についての検討を行った。NALTはその機能的，形態的特徴より，鼻粘膜局所免疫応答における誘導部位あるいは実行部位としての役割を持つ可能性が示唆された。マウス鼻腔よりリンパ球を単離しそのサブセットについての検討を行った結果，蛋白抗原に対するIgA産生においてT細胞，特に $\alpha\beta$ TCR陽性T細胞

が何らかの重要な役割を持つ可能性が示され今後さらに検討を行う予定である。

文 献

- 1) 川内秀之：鼻粘膜局所免疫応答機構の解析—動物実験による基礎的検討—，日鼻誌，32巻2号：100-108，1994年
- 2) 川内秀之，他：鼻咽腔の局所免疫応答における扁桃の役割，口腔科，8巻3号：337-344，1996年

質 疑 応 答

質問 榎本冬樹（順天堂浦安病院）

コレラトキシンを使わないHRPの系ではT cellのフローサイトメトリーはいかがでしたか。

応答 佐野啓介（島根医大）

今回，HRPとコレラトキシンの併用群HRP単独群，対照群の3群間での比較は行っていない。