

## ヒト口蓋扁桃リンパ球のマウスへの移植の試み

川内 秀之 佐野 啓介 柴 宏巳 石光亮太郎

島根医科大学耳鼻咽喉科学教室

**A Transfer Study of Human Tonsillar Lymphocytes into NOD/LtSz-scid/scid Mice.**

Hideyuki KAWAUCHI, Keisuke SANO, Hiromi SHIBA, Ryoutaro ISHIMITSU,  
Department of Otolaryngology, Shimane Medical University

It is very important for ENT clinicians to better understand mechanisms of the mucosal immunity of the upper respiratory tract and ongoing trials of its clinical application, because nasopharyngeal mucosal lining is the entry and proliferating site of invading pathogens. It is equipped with the sophisticated common mucosal immunity, as demonstrated by a large number of researches in animals and humans. Homing theory is now settled down for explaining recruitments of primed immunocytes from inductive sites to various distant mucosal sites. However, it still remains to be investigated how these precursor B and T cells recruit to the distant mucosal sites and how final effector antibody-producing B cells differentiate and have a clonal expansion. To challenge this issue, we have done a transfer study of human tonsillar lymphocytes into NOD/LtSz-scid/scid mice and obtained a successful results that human leukocytes (CD 45+), T cells (CD 3+), and B cells (CD 20+) are engrafted in spleens and other nonlymphoid organs. In FACS analysis, CD 45+, CD 3+, CD 4+ (helper/inducer) and CD 8+ (suppressor/cytotoxic) human cells were detected with a various number (up to 57% of whole murine spleen cells) in spleens of NOD/LtSz-scid/scid at 4 weeks interval after human tonsillar mononuclear cells ( $1 \times 10^8$ ) were inoculated intraperitoneally into these mice. An immunohistochemistry also revealed that human leukocytes were present in spleen, thymus, liver, and lung. But these cells were not present in noninflammatory tubotympanal or nasopharyngeal mucosae.

This study might be useful for an evaluation of lymphocyte homing and mechanism of the final differentiation of recruiting precursor lymphocytes for mounting antigen-specific immune response in peripheral mucosal sites such as tubotympanum and nasopharynx.

## はじめに

耳鼻咽喉科のターゲットである上気道粘膜におけるアレルギー素因の獲得や感染症に対する免疫防御機能の成立において、ワルダイエル扁桃輪の免疫担当細胞がどのような役割を果たしているかどうかについて評価する手段は、*in vitro* での免疫学的な機能検査、組織標本を用いた免疫染色による細胞分画の解析、採取した細胞による分子生物学的手法を用いた解析に限定されているのが現状である。我々は、これまでヒト扁桃組織に相当すると考えられているマウスの鼻咽腔関連リンパ装置 (nasopharyngeal lymphoreticular tissue, NALT) を中心に一連の検討<sup>1)2)3)</sup>を行ってきたが、今回はこれらの研究から得られたデータを基盤に、免疫機能が欠如した免疫不全 (severe combined immunodeficiency, SCID) マウスを用いて、ヒト口蓋扁桃リンパ球をこれらのマウスに移入し、*in vivo* でのヒト口蓋扁桃リンパ球の動態について検討を行ったので、その結果を報告する。

## 実験方法

動物：ヒト口蓋扁桃リンパ球の移入実験に供したマウスの系統は、SCID CB-17/lcr-scid jel (CB-17 scid) および NOD (non-obese diabetes)/LtSz-scid の2種類の免疫不全マウスであり、SPF (specific pathogen-free) 管理下で飼育した雄または雌マウスを6週から8週齢で移入実験に使用した。

ヒト口蓋扁桃リンパ球の採取：慢性扁桃炎あるいは扁桃肥大の患者より摘出した口蓋扁桃を無菌操作で採取し、10%ウシ胎児血清および100 $\gamma$ のペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI-1640培養液中で、扁桃組織を細切しスライドガラスにて潰した後、遠心分離により単核球分画を得た。

ヒト口蓋扁桃リンパ球のSCIDマウスへの移入実験：ヒト口蓋扁桃から分離された単核球  $1 \times 10^8$  個を2 mlのRPMI-1640培養液に溶解し、

無菌的にSCIDマウスの腹腔内に投与した。

ヒト口蓋扁桃リンパ球のSCIDマウスでの組織内分布の解析：ヒト口蓋扁桃リンパ球移入後、経時にマウス各組織における分布を組織切片を用いた免疫染色を行うと同時に、脾臓やリンパ節では直接採取した単核球を蛍光標識モノクローナル抗体を用いた flow cytometry により解析し、リンパ球分画の検討を行った。FACS (fluorescence activated cell sorter) 解析を行う際に使用した蛍光標識モノクローナル抗体は、以下のとおりである。Phycoerythrin (PE) 標識抗 CD 45 モノクローナル抗体 (IMMUNOTECH 社), fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD 3 モノクローナル抗体 (IMMUNOTECH 社) FITC 標識抗 CD 4 モノクローナル抗体 (PharMingen 社), PE 標識抗 CD 8 モノクローナル抗体 (PharMingen 社), PE 標識抗 CD 19 モノクローナル抗体 (IMMUNOTECH 社), PE 標識抗 CD 20 モノクローナル抗体 (Beckton Dickinson 社)。これらの抗体は順に、白血球 (CD 45), T細胞 (CD 3), helper/inducer T細胞 (CD 4), suppressor/cytotoxic T細胞 (CD 8), 形質細胞を除いたB細胞 (CD 19, CD 20) をそれぞれ同定するために使用した。Flow cytometryはBeckton Dickinson社製FACScanを用いて行い、single colorあるいはtwo color解析によりリンパ球サブセットを同定した。

免疫組織学的検討：ヒト口蓋扁桃リンパ球を移入されたSCIDマウスの脾臓、リンパ節、胸腺などのリンパ組織は無固定にて OCT compound で凍結包埋し、6ミクロンの凍結切片を作成し、免疫染色に供した。鼻粘膜や耳管中耳粘膜は、上顎骨や側頭骨と共に PLP 固定液で4 Cで12時間固定し、10%EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)-Tris 緩衝液 (pH 6.95) で脱灰後、OCT compound に包埋し、連続切片を作成し、免疫染色に供した。免疫染

色の詳細は省くが、一次抗体はマウス抗ヒト CDモノクローナル抗体であり、二次抗体には Dako 社の Envison (ペルオキシダーゼ標識デキストラン結合ヤギ抗マウス/ウサギイムノグロブリン抗体) を使用した。

結 果

ヒト口蓋扁桃リンパ球の SCID マウスへの生着

SCID マウスの脾細胞を用いた flow cytometry による解析

NOD scid マウスおよび CB-17 scid マウスにヒト口蓋扁桃リンパ球から採取した単核  $1 \times 10^8$  個を腹腔内投与し、1ヶ月後に脾細胞を用いて、ヒト口蓋扁桃リンパ球の生着につき FACS 解析を行った。ヒト口蓋扁桃リンパ球を移入された CB-17 scid マウス 11 匹では、いずれのマウスにおいても、脾細胞の FACS 解析で CD 45 陽性細胞 (ヒト白血球) に相当する部分に全く細胞が認められなかった (Fig. 1)。

一方、NOD-scid マウスにおいては、4 症例の扁桃摘出患者より得られたヒト口蓋扁桃リンパ球を用いて、異なる時期に移入を行い、計 13 匹中 7 匹において、移入後 1 ヶ月の脾細胞の FACS 解析により、ヒト由来のリンパ球が種々の割合で検出された。Fig. 2 は、24 才の慢性扁桃炎患者より摘出した扁桃リンパ球の細胞分画を、scid マウスに移入する前に FACS 解析したものであるが、CD 3 陽性の T 細胞が、35.2%、CD 20 陽性の B 細胞が 39.7%、さらに T 細胞サブセットでは、CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>-</sup>細胞が 27%、CD 4<sup>-</sup>CD 8<sup>+</sup>細胞が 9.7%、CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup>細胞が 2.1% に認められている。本症例の口蓋扁桃から採取した単核球を移入した 4 匹の NOD scid マウスでは 4 匹中 2 匹でヒト口蓋扁桃リンパ球が生着した (Fig. 3)。

コントロールで表示したのは、ヒト細胞を移入していない無処理の NOD scid マウスの脾細胞の結果であり、右側に、CD 3 陽性細胞、CD 4 陽性細胞、CD 20 陽性細胞、CD 8 陽性細胞の

Flow Cytometry of Spleen Cells Harvested from CB-17 scid Mice engrafted : 0/11 (0%)

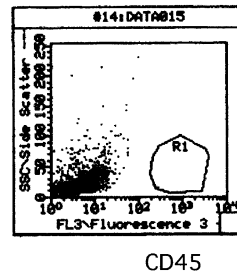


Fig. 1 ヒト口蓋扁桃単核球を腹腔内に移入し 1 ヶ月を経過した CB-17 scid マウスの脾細胞の FACS 解析。CD 45 陽性細胞部分 (R1) の部分に全く細胞が見られない。横軸が蛍光強度、縦軸に細胞数を示している。

Flow Cytometric Analysis of Tonsillar Lymphocytes

24 y.o. chronic tonsillitis

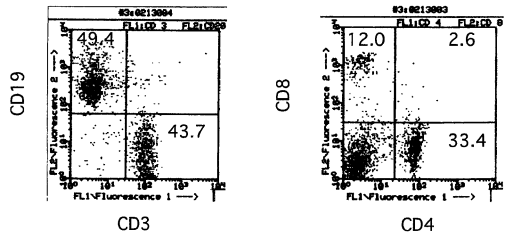


Fig. 2 24 才の患者由来の扁桃単核球の FACS 解析。two color で解析を行っている。各領域内の数字はその分画の細胞のパーセントを示している。

順に、生着したマウスでの解析結果を図式している。その結果、T-1 のマウスでは、脾細胞全体の 22.5% が、T-2 のマウスでは 57.3% が CD 3 陽性のヒト T 細胞であった。CD 4 陽性ヒト helper/inducer T 細胞、CD 8 陽性ヒト suppressor/cytotoxic T 細胞の占める割合は各々、T-1 マウスで 3.0%、8.4% であり、T-2 マウスで 26.2%、30.2% であった。しかしながら、CD 20 陽性のヒト B 細胞系の細胞は T-1 マウスで 1.7%、T-2 マウスで 0.9% であり、コントロールに比較して、T-1 で 1% 程度認められたのみであった。さらに別の症例で行った移入実験において生着したヒト T 細胞サブセットについて、FITC と PE を用いた two color

Flow Cytometry of Spleen Cells Harvested from NOD-SCID Mice

Case 1 : engrafted 2/4 (50%)

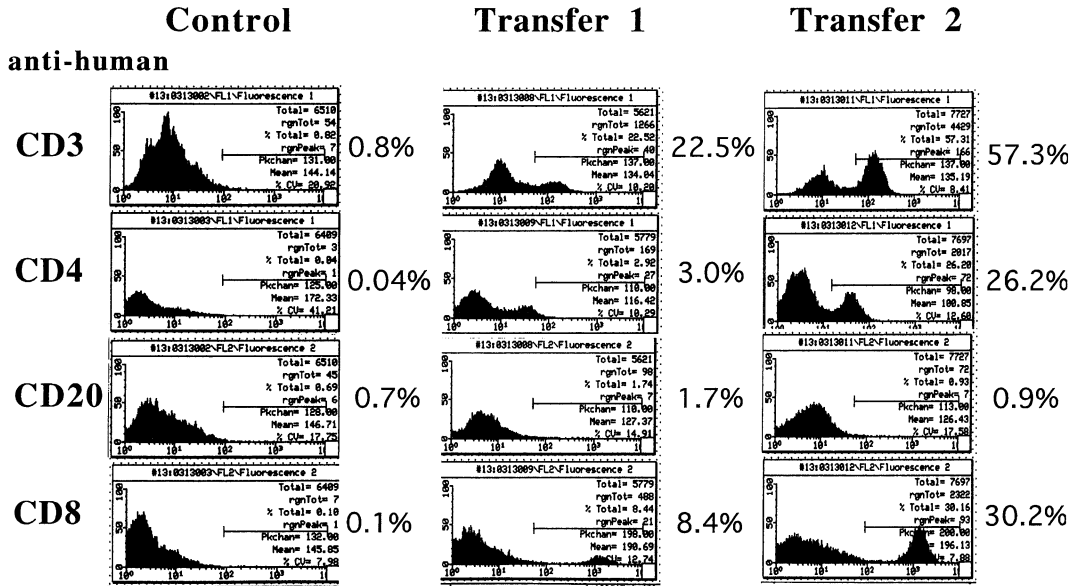


Fig. 3 ヒト口蓋扁桃単核球を移入し1ヶ月を経過したNOD scid マウスの脾細胞の FACS 解析. コントロールはヒト扁桃細胞を移入していないマウス, Transfer 1 (T-1)と Transfer 2 (T-2) は, 生着が見られたマウスである.

Flow Cytometry of Spleen Cells Harvested from NOD-scid Mice

Case 3 : engrafted 1/2 (50%)

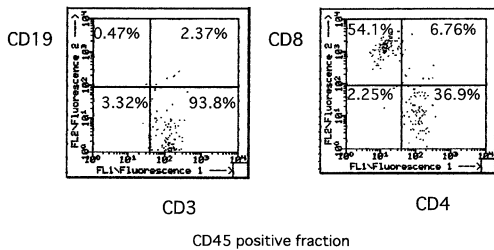


Fig. 4 ヒト口蓋扁桃単核球が移入され生着した NOD scid マウスの脾細胞でのヒト T 細胞分画の検討. two color で解析を行ない, 右図の各領域内の数字はその分画のパーセントを示している.

解析により, 脾細胞を解析したところ, CD 45 陽性細胞分画のうち 36.9%が, CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>-</sup>細胞, CD 4<sup>-</sup>CD 8<sup>+</sup>細胞が54.1%, CD 4<sup>+</sup>CD 8<sup>+</sup>細胞が6.76%と各サブセットの T 細胞が生着していることが示された (Fig. 4). ヒト口蓋扁桃リンパ球をNOD scid マウスに移入し生

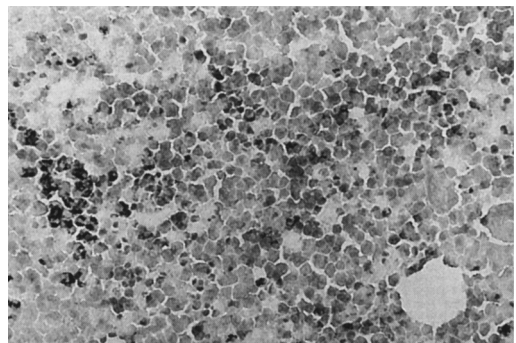


Fig. 5 ヒト口蓋扁桃リンパ球が生着した NOD scid マウスの脾臓における CD 3 陽性のヒト T 細胞が濾胞周囲を中心として染色されている.

着したマウスにおいても, 同じ患者から得られた扁桃リンパ球を移入した場合でも個体差が見られ, さらには移入したリンパ球を採取した患者によっても生着率が異なったが, いずれの移入実験においても NOD scid マウスを用いた場合は 50%以上の生着率であった.

### 免疫組織学的検討

脾細胞のFACS解析でヒト口蓋扁桃リンパ球の生着が見られたマウスにおいて、脾臓、腸間膜リンパ節、胸腺、骨髄について免疫組織学的検討を行った。その結果、脾臓においては、FACS解析の結果を支持するように、CD3陽性細胞が濾胞周囲を中心として認められた (Fig. 5)。一方、FACS解析ではT細胞に比べわずかにしか認められなかったB細胞についてもCD20陽性細胞が脾臓で濾胞部分を中心として染色された。骨髄の循環血液中についても検討した結果、CD3陽性細胞のみならず、CD20陽性細胞が認められた。鼻粘膜、耳管/中耳粘膜におけるヒト由来のリンパ球の分布についても検討したが、鼻粘膜や耳管/中耳に局所感作を行っていない炎症のない鼻腔や耳管/中耳の粘膜には、ヒト由来のリンパ球は認められなかった。

### 考 察

ヒト口蓋扁桃を中心としたワルダイエル扁桃輪について、粘膜面でのIgA反応を担う共通粘膜免疫系の誘導部位としての役割や実効部位としての可能性が以前より示唆されているが、冒頭でも述べたごとく、ヒト口蓋扁桃リンパ球や抗原提示細胞を用いた検討は、*in vitro*での機能的検討や免疫組織学的研究により行われてきた。経口的あるいは経鼻的に侵入してくる種々の非自己抗原に対して、ヒト口蓋扁桃や咽頭扁桃のBリンパ球やTリンパ球が抗原特異的に活性化されるかもしくは免疫学的記憶を獲得することは、扁桃のリンパ組織としての構造からも、容易に想像できる。しかし、記憶T細胞や抗体産生細胞の前駆B細胞がどのようなメカニズムで遠く離れた粘膜免疫実効組織に帰趨 (hom-ing) し、粘膜局所で抗原特異的なIgA免疫応答発現のための最終的な分化・増殖をするかについては、解明されていない点が多い。しかしながら、ヒト口蓋扁桃由来のリンパ球の共通粘膜免疫系の組織への帰趨やそこでの分化・増殖

をヒト生体内で解析することは、現時点での方法論では不可能であることは言うまでもない。

一方、SCIDマウスは1983年にBosmaら<sup>4)</sup>によって報告された機能的なT細胞とB細胞を欠如する免疫不全マウスであり、ヒトや異なる種の動物のリンパ球を受動移入する実験モデルとして、自己免疫疾患の病態の解明などの目的に使用されてきた。耳鼻咽喉科学領域においても、ヒト口蓋扁桃リンパ球を用いた移入実験は、慢性関節リウマチ、掌蹠膿疱症、IgA腎症などにおける扁桃リンパ球の関わりを検討するために行われており、Jorgensenら<sup>5)</sup>やHayashiら<sup>6)</sup>の興味あるデータの報告もある。しかしながら、従来のCB-17 scidマウスを用いた移入実験では、ヒト末梢血リンパ球の生着率はきわめて低く、さらに4週間以上の長期にわたる生着はできないことがGreinerら<sup>7)</sup>によって報告されており、これまでの我々の予備実験においてもヒト口蓋扁桃リンパ球さらには末梢血リンパ球の腹腔内投与による移入によっても、生着することはできなかった。Nadalら<sup>8)</sup>は、ヒト口蓋扁桃リンパ球を採取するドナーが血清中に抗Ebstein-Barrウイルス抗体を持っていることが、CB-17 scidマウスへのヒト口蓋扁桃リンパ球の生着に必須であり、Ebstein-Barrウイルスに感染していないケースではヒト口蓋扁桃リンパ球はCB-17 scidマウスに生着しないと述べている。今回我々が使用したNOD scidマウスは、Natural Killer活性やマクロファージさらには補体活性に機能不全のあるNOD/LtマウスとSCIDマウスの遺伝形質を両有するマウスであり、CB-17 scidマウスに比して、ヒト末梢白血球が長期に生着できるマウスであることが、Greinerら<sup>7)</sup>により示されている。

そのため、今回我々はヒト口蓋扁桃単核球のNOD scidマウスへの移入モデルを作製するために検討を行い、扁桃リンパ球が1ヶ月以上にわたって長期に生着できることを見出した。しかし、今回の移入実験の結果が示すように、

マウスの個体差や移入するヒト口蓋扁桃リンパ球により、生着率や生着できる細胞数にもかなりの幅があることも示された。脾細胞のFACS解析と免疫組織学的検討の結果から、ヒト口蓋扁桃リンパ球を移入した結果、末梢血リンパ球を移入した場合と同じように脾臓や循環血液中にもヒト由来のT細胞やB細胞が生着できること、さらにはTリンパ球のサブセットの解析からNOD scid の体内でもCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>の各T細胞が存在していることも示された。炎症のない正常のNOD scid マウスの鼻粘膜や耳管/中耳粘膜においては、マウスをSPF環境で飼育管理していることもあり、これらのヒト由来のリンパ球の動員は認められなかった。ヒトリンパ球の帰趨に関わる接着分子やそのリガンドとマウスのそれらでは種差があることは否めないが、LFA-1やICAM-1などの多くの接着分子に関しては機能的に交叉反応することが報告されており、共通粘膜免疫系の中で実効組織と考えられる炎症のない鼻粘膜や耳管/中耳粘膜においてヒト扁桃リンパ球の動員が見られなかった結果は、誘導組織であると考えられる扁桃リンパ球の末梢実効組織への帰趨に、炎症反応による種々の遊走因子や接着分子の発現が必須であることを示唆するものと考えられる。

今回我々が行った scid マウスへのヒト口蓋扁桃リンパ球移入実験で使用したヒト口蓋扁桃リンパ球は、慢性扁桃炎や扁桃肥大の患者より口蓋扁桃摘出術を行った際に採取したものである。これらの患者血清中のEbstein-Barrウイルス抗体価は測定していないが、移入後1ヶ月でCB-17 scid マウスへはまったく生着せず、NOD scid マウスでは50%以上の確率で生着した今回の結果は、同じ患者より採取した口蓋扁桃リンパ球をCB-17 scid マウスとNOD scid マウスに移入した場合も同様であり、生着の有無はEbstein-Barrウイルス抗体価の有無とは関係がない。GreinerやNadalらの一連の実験

においても示されているように、Ebstein-Barrウイルスに感染していないヒト口蓋扁桃リンパ球あるいは末梢血リンパ球のCB-17 scid マウスへの移入は、移入後少なくとも1ヶ月以上の長期の生着率において、問題がある。ヒト末梢血リンパ球をNOD scid マウスへ移入した場合、移入後3ヶ月においても脾臓において生着が見られることもGreinerらにより報告されている。以上の観点から、今回作製したNOD scid マウスへのヒト口蓋扁桃リンパ球移入モデルは、ヒト口蓋扁桃リンパ球の共通粘膜免疫系組織への帰趨(homing)や実効部位として考えられる鼻喉腔粘膜での分化増殖をin vivoで動的に解析する上で、十分有用なモデルであると考えられる。しかしながら、本実験モデルは、現時点においては予備実験の域をでないものであり、今後、ヒト口蓋扁桃リンパ球の抗原特異的な動的免疫機能を評価するための手段として確立できるかどうか、さらに慎重に検討を重ねていきたいと考えている。

本研究の内容は、第27回日本耳鼻咽喉科感染症研究会において口演した。

本研究は1997年度文部省科学研究費補助金(一般B:研究課題番号07457401,萌芽的研究:研究課題番号08877259,一般C:研究課題番号08671964,奨励研究:課題番号08771404)により行われた。

#### 参 考 文 献

- 1) 川内秀之:鼻粘膜における局所免疫応答機構の解析. 日鼻誌 32(2):100-108, 1994
- 2) 川内秀之, 佐野啓介, 石光亮太郎:鼻粘膜における局所免疫応答機構の解析—マウスを用いた実験的検討 その2—. 日鼻誌 36(2):40-44, 1997.
- 3) Kawauchi H, Sano K, Shiba H, et al: Mucosal immunity of nasopharynx-an experimental study in mice. Proceedings of the XVI World Congress of Otorhino-

- laryngology Head and Neck Surgery, Monduzzi Editore S.P.A, Bologna, Italy, pp1717-1720, 1997
- 4) Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ : A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature 301 : 527-529, 1983
- 5) Jorgensen C, Couret I, Canovas F, et al : In vivo migration of tonsil lymphocytes in rheumatoid synovial tissue engrafted in SCID mice. Autoimmunity 24 (3) : 179-185, 1996
- 6) Hayashi Y, Kunimoto M, Kuki K et al : Animal model of focal tonsillar infection : human tonsillar lymphocytes induce skin lesion in SCID mice. Acta Otolaryngol Suppl 523 : 193-196, 1996.
- 7) Greiner DL, Shultz LD, Yates J, et al : Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with CB-17 scid/scid mice. Amer J Pathol 146 (4) : 888-902, 1995.
- 8) Nadal D, Albine B, Schlapfer E, et al : Distribution and engraftment patterns of human tonsillar mononuclear cells and immunoglobulin secreting cells in mice with severe combined immunodeficiency : role of the Epstein-Barr virus. Int Arch All Appl Immunol 95 (4) 341-351, 1991.

質 疑 応 答

質問 榎本冬樹 (順天堂大)

マウスの個体によるバラツキはどの程度でしょうか。

移植するヒトの扁桃による生着率の差はどうか。(再現性はどの程度なのか)

応答 川内秀之 (島根医科大学)

NOD scid マウスでもヒト由来のリンパ球の脾臓での生着率は個体差があり、少ないものでは5% (脾細胞全体の)ぐらい、一番多いもので60%ぐらいである。移入するヒト扁桃リンパ球のサブセットの割合の違いや疾患の違いによる生着率の差は症例数が多くないので、今後の検討で明らかにしたい。

質問 友田幸一 (金沢医科大学)

病巣感染の扁桃において皮膚等へのリンパ球の移行動態への将来の展望は?

応答 川内秀之 (島根医科大学)

この実施モデルの有用性については、今後の詳細な種々の検討が必要である。

連絡先 : 川内秀之

〒693-0021 島根県出雲市塩冶町 89-1

島根医科大学耳鼻咽喉科学教室

TEL 0853-20-2273 FAX 0853-23-4096