扁桃組織における活性化リンパ球の分布

札幌医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：形浦昭克教授）

梁 耀，原 洸 保 明，形 浦 昭 克

IMMUNOHISTOLOGICAL IDENTIFICATION OF THE ACTIVATED LYMPHOCYTES IN HUMAN PALATINE TONSIL

YOH RYAN, M. D., YASUAKI HARABUCHI, M. D.,
and AKIKATSU KATAURA, M. D.

Department of Otolaryngology, Sapporo Medical College, Sapporo

Employing various monoclonal antibodies and immunoperoxidase technique, we studied the distribution of the activated lymphocytes in human tonsillar tissue. Both the activated T-cells positive for IL2-receptor (IL2-R) and the activated B-cells defined by L29 were seen in the interfollicular area. Vast majority of the lymphocytes in the germinal center was stained with the L29, the anti-transferrin-receptor antibody, and the Ki-67 antibody which reacts with cycling cells in G₁, S, or G₂+M phase. On the other hand, scarcely any cells in the mantle zone were stained with those. The Ki-67 positive cells in the germinal center were identified as two types of staining pattern, i. e., with strong nucleolar staining found in the dark zone and with nuclear staining found in the light zone. Small number of IL2-R positive cells was found in the mantle zone. The cell number per unit area of the activated lymphocytes in the interfollicular area as well as in the germinal center was decreased as the increment of patients' age. From these results, the immunological activation system of T- and B-cells in the tonsils was discussed.

Key words: 扁桃, 活性化リンパ球, 単クローン抗体, 酵素抗体法

A 92—1958—52060

緒 言

外来抗原の侵入門戸に位置する扁桃は免疫臓器として上気道の感染防御の働きを有している。この働きは扁桃組織に分布するリンパ球、形質細胞、マクロファージ、樹状突起細胞などの免疫担当細胞の細胞間相互作用によってなされており、外来抗原に対し活発な免疫応答している。このような種々の免疫担当細胞のなかには活性化されたものが存在しており、扁桃の免疫応答機構上重要な働きを有すると考えられている。今回筆者らは、扁桃の免疫応答機構を解明するひとつの試みとして、種々の単クローン抗体を用いて扁桃組織における活性化リンパ球の分布形態を酵素抗体法にて検索した。

対象と方法

対象：習慣性扁桃炎20例（5歳以下，6～10歳，11～20歳，および21歳以上のおのおの5例）の手術的に摘出した扁桃を対象とした。

単クローン抗体：表1に用いた単クローン抗体とその特異性を示した。Ki-67抗体¹⁾はG₁期，S期，G₂+M期の細胞の核に反応する抗体である。OKT9抗体²⁾は、活性化細胞，および増殖期の細胞に発現するトランスフェリンレセプター（TRf-R）と特異的に反応する抗体である。さらに、活性化B細胞を認識するL29抗体³⁾，およびIL2レセプター（IL2-R）と反応し、活性化T細胞を認識するTa60a抗体⁴⁾を用いた。

酵素抗体法：avidin-biotin-peroxidase complex

表1 活性化リンパ球に対する単クローン抗体

単クローン抗体	反 応 抗 原	認 識 細 胞	製 造 元
Ki-67	G ₁ , S, G ₂ +M期核	細胞周期回転細胞	Kouservierung社
OKT 9	トランスフェリン レセプター	活性化細胞	Ortho社
L 29	活性化B細胞膜	活性化B細胞	札幌医大第1病理学教室
Ta 60a	IL2 レセプター	活性化T細胞	DAKO社

表2 各種活性化抗原陽性細胞の分布形態

	陰窩上皮下	濾胞間	暗殻	胚 中 心	
				暗帯	明帯
Ki-67陽性細胞	少 数 核小体陽性	少数散在性 核小体陽性	無	多 数 核小体陽性	極多数 核陽性
TRf-R陽性細胞	多 数	少数散在性	無	多数瀰漫性・膜陽性 少数散在性・樹枝状細胞質陽性	
L29陽性細胞	少 数	少数散在性	無	多数瀰漫性 膜/細胞間陽性	
IL2-R陽性細胞	極少数	少数散在性	極少数		無

TRf-R：トランスフェリンレセプター

IL2-R：IL2レセプター

a

b

図1 Ki67陽性細胞の分布。胚中心 (GC) に多数，濾胞間 (IF) には少数分布しているが，暗殻 (MZ) にはほとんど存在しない (図1a, ×200)。胚中心暗帯 (DZ) では核小体が強陽性を示したのに対し，胚中心明帯 (LZ) では核全体が陽性像を呈する細胞が数多く分布している (図1b, ×400)。

(ABC)法⁵⁾⁶⁾を用いた。摘出した扁桃を7×7×7mmに細切し，-80℃に瞬間凍結した後，クリオスタットにて凍結切片を作製し，アセトン固定した。マウス抗ヒト単クローン抗体を組織切片上に滴下し，室温45分間反応した後，リン酸緩衝液にて洗浄した。次に biotin 標識抗マウス IgG (Vector Labs 社)，および avidin-biotin peroxidase complex (Vector Labs 社) をそれぞれ室温45分間反応した。3-3' diaminobenzidine にて

発色後，メチルグリーンにて対染色し，鏡検した。

扁桃組織の濾胞領域，および濾胞間領域をそれぞれ無作為に3カ所を抽出し，ocular grid にてそれぞれの部位の面積と陽性細胞数を測定し，単位面積 (50×50μm) 当たり存在する陽性細胞の分布密度 (陽性細胞数/濾胞または濾胞間の面積) を計算した。

図2 OKT9抗体による染色像(×200)。胚中心(GC)が膜陽性を示し、tingible body macrophageと考えられる大型樹状突起細胞が細胞質陽性(矢頭)を呈する。陰窩上皮下(SE)には多数、および濾胞間(IF)には少数の陽性細胞が認められるが、暗殻(MZ)には分布していない。

図3 L29抗体による染色像(×100)。胚中心(GC)は陽性像を示すが、暗殻(MZ)は陰性である。濾胞間(IF)には少数の陽性細胞が認められる。

結 果

表2に扁桃の各領域における各種活性化抗原保有細胞の分布をまとめた。Ki67陽性細胞は主に胚中心に多

図4 IL2レセプター陽性細胞の分布像(×400)。濾胞間(IF)に少数の比較的大型の陽性細胞が分布し、暗殻(MZ)にも少数の陽性細胞が認められるが、胚中心(GC)にはほとんど認められない。

数分布していた。胚中心暗帯では核小体が強陽性を示したのに対し、胚中心明帯では核全体が陽性像を呈する細胞が前者に比較して数多く分布していた。濾胞間には少数散在性に分布していたが、暗殻にはほとんど存在しなかった(図1)。

トランスフェリンレセプター(TRf-R)に対する抗体であるOKT9抗体を用いた染色では、ほとんどの胚中心の細胞が膜陽性を示し、形態像からtingible body macrophageと考えられる少数の大型樹状突起細胞が細胞質陽性を呈した。濾胞間と陰窩上皮下には少数散在性にOKT9陽性細胞が認められたが、暗殻には全く存在しなかった(図2)。

活性化B細胞を認識するL29抗体による染色では、Ki67、およびOKT9と同様に胚中心が陽性像を示し、暗殻は陰性であった。濾胞間、および陰窩上皮下には少数の細胞が陽性像を呈した(図3)。

IL2レセプター(IL2-R)と反応するTa60a抗体を用いた染色では、濾胞間に少数散在性に分布する比較的大型の細胞が膜陽性を示した。暗殻には少数の小型

表3 各種活性化抗原陽性細胞の分布密度(n=20)

	胚中心 (個/50×50μm±SEM)	濾胞間 (個/50×50μm±SEM)
Ki-67陽性細胞	19.6±4.56	3.68±1.14
TRf-R陽性細胞	69.4±9.67	2.53±0.77
L29陽性細胞	58.8±3.70	4.32±0.99
IL2-R陽性細胞	0.72±0.43	2.30±0.43

TRf-R: トランスフェリンレセプター

IL2-R: IL2レセプター

図5 胚中心(図5 a)および濾胞間(図5 b)における加齢に伴う各種活性化抗原陽性細胞の分布密度(個/50×50 μ m)の変動(5歳以下, 6～10歳, 11～20歳, 21歳以上; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

リンパ球が陽性像を呈したが、胚中心は全く染色されなかった(図4)。

胚中心におけるこれらの活性化抗原保有細胞の分布密度を比較すると、TRf-R陽性細胞、およびL29陽性細胞はKi67陽性細胞より有意に多数分布していた($p < 0.01$, 表3)。また、加齢に伴う各種活性化抗原陽性細胞の分布密度の変動をみると、胚中心ではKi67, TRf-R, およびL29陽性細胞が、濾胞間では、Ki67, TRf-R, およびIL2-R陽性細胞がそれぞれ加齢に伴って有意に減少していた(図5)。

考 察

扁桃リンパ球の特徴として、マイトージェンの非存在下で培養しても、 ^3H -thymidineの取り込みが高く、活発にDNA合成をすること(spontaneous DNA synthesis)⁷⁾、S期、および $G_2 + M$ 期の細胞が存在していること⁸⁾などのin vitroの成績から末梢血リンパ球と異なり活性化リンパ球、特に活性化B細胞が豊富に存在していることが示唆されている。最近では単クローン抗体を用いたflow cytometryによって扁桃B細胞の20～40%がL29やトランスフェリンレセプターなどの活性化抗原を有すること⁹⁾¹⁰⁾や、扁桃T細胞なかにはIL2レセプターを有するものも存在すること¹¹⁾が証明されている。今回の検索によって扁桃組織におけるこれらの活性化リンパ球の分布形態が明らかにされた。

濾胞間、および陰窩上皮下には活性化B細胞と活性化T細胞の両者が分布することがL29陽性細胞とIL2レセプター陽性細胞の分布形態から判明した。

過去に筆者ら⁵⁾⁶⁾は、濾胞領域ではB細胞の分化、成熟が遂行され、暗殻に分布するB細胞は胚中心に存在するヘルパーT細胞の働きによって活性化され胚中心へ移動し、分化することを示唆した。今回の検索では、暗殻を構成するB細胞にはKi67, L29, およびトランスフェリンレセプター(TRf-R)がすべて欠如しているのに対し、胚中心の細胞にはこれらの活性化抗原がいずれも存在した。この成績から、暗殻のB細胞は休止期(G_0 期)の状態にあるのに対し、胚中心のB細胞は活性化されていることが裏づけられた。

TRf-R陽性細胞とL29陽性細胞の胚中心における分布密度がKi67陽性細胞の値に比べ高値を示した成績は、前2者の抗体が胚中心に分布する濾胞樹状突起細胞に交叉反応性を有すること³⁾¹²⁾に起因していると考えられる。したがって、活性化細胞の指標としてはKi67抗原が他2者に比較して有用に思われる。Ki67抗原は G_1 , S期, $G_2 + M$ 期の核に存在する抗原で、最近その抗原量はDNA量の増加に伴って増加すると報告されている¹³⁾。胚中心暗帯と胚中心明帯におけるKi67陽性細胞の染色像を比較すると、後者には核全体が強陽性を示す細胞、すなわちKi67抗原量が多い細胞が多数分布していた。このことより、両者に分布しているリンパ球はそれぞれ細胞周期が異なる可能性、すなわち胚中心明帯には細胞周期後期の細胞が分布している可能性が示唆される。

IL2レセプター(IL2-R)は主に活性化T細胞に存在

する活性化抗原のひとつであるが、過去に筆者ら⁹⁾¹⁴⁾は、扁桃B細胞を *in vitro* にて分化誘導すると IL2-R が発現することから、扁桃B細胞の活性化にこの抗原が関与する可能性を報告した。このことは、IL2-R 陽性細胞が暗殺に認められた成績からも支持され、濾胞におけるB細胞の分化、成熟機構において IL2 レセプターが関与していることが示唆される。

従来、扁桃における活性化リンパ球は加齢に伴って減少することが spontaneous DNA synthesis の低下やS期、G₂+M期細胞の減少などの研究成績から支持されている⁷⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。今回加齢に伴う活性化リンパ球の分布動態について検索した。年齢によって濾胞、および濾胞間の大きさが異なるため、単位面積当たりの細胞の分布密度を比較した。その結果、胚中心と濾胞間の両者において各種活性化抗原陽性細胞の分布密度が加齢と共に減少することが明らかになった。このことは、加齢に伴うB細胞の活性化機構の退縮と、T細胞性免疫応答能の低下を反映していると考えられる。

これまでの筆者らの報告^{5),6)}と今回の研究成績から扁桃における免疫応答機構について推察した。リンパ上皮共生部位や陰窩上皮下では活性化状態にある種々の免疫担当細胞によって活発に外来抗原処理が行われている。一方、濾胞では、ヘルパーT細胞と暗殺B細胞のIL2レセプターを介する作用にて暗殺の休止期(G₀期)B細胞は活性化され、胚中心暗帯へと移動する。さらに活性化が進んだ免疫芽球になると胚中心明帯に移動する。そして、B細胞最終分化段階であるメモリーB細胞や形質細胞になると濾胞を離れ、上皮下や濾胞間に分布する。濾胞間には活性化Tおよび活性化B細胞が散在しており、種々の免疫担当細胞による細胞間相互作用に関与していると思われる。

ま と め

1. 種々の単クローン抗体を用いて扁桃組織内における活性化リンパ球の分布形態を酵素抗体法にて検索した。

2. 濾胞間、および陰窩上皮下には活性化B細胞と活性化T細胞の両者が分布していることが明らかにされた。

3. 胚中心のほとんどのリンパ球はKi67, L29, およびトランスフェリンレセプターなどの活性化抗原を有していたが、暗殺の細胞はこれらの抗原が欠如していた。胚中心暗帯と胚中心明帯におけるKi67の染色像はそれぞれ異なっていた。IL2レセプター陽性細胞

は暗殺にも認められた。これらの成績から、濾胞領域におけるB細胞の活性化は暗殺、胚中心暗帯、さらに胚中心明帯へと遂行され、その過程においてIL2レセプターが関与している可能性が示唆された。

4. 胚中心と濾胞間の両者における各種活性化リンパ球の分布密度は加齢に伴って減少することが明らかにされた。

文 献

- 1) Gerdes J, Schwab U, Lemke H et al: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20, 1983.
- 2) Haynes BF, Nemler M, Cotner T et al: Characterization of a monoclonal antibody (5E9) that defines a human cell surface antigen of cell activation. *J Immunol* 127: 347-351, 1981.
- 3) Kokai Y, Ishi Y, Kikuchi K: Characterization of two distinct antigens expressed on either resting or activated human B cells as defined by monoclonal antibodies. *Clin exp Immunol* 64: 382-391, 1986.
- 4) Ueda R, Nishida K, Koide Y et al: Two mouse monoclonal antibodies detecting two different epitopes of an activated lymphocyte antigen on adult T-cell leukemia cells. *Cancer Res* 45: 1314-1319, 1985.
- 5) Yamanaka N, Sambe S, Harabuchi Y et al: Immunohistological study of tonsil. Distribution of T cell subsets. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 96: 509-516, 1983.
- 6) Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A: Immunohistological identification of B cell differentiation in human tonsillar follicle by using monoclonal antibodies. *Tohoku J Exp Med* 147: 21-31, 1985.
- 7) Yamanaka N, Kobayashi K, Himi T et al: Spontaneous DNA synthesis in tonsillar lymphocytes and its clinical implications. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 96: 181-187, 1983.
- 8) 松田史明, 山中 昇: 扁桃リンパ球の細胞動態に関する研究 I. —flow cytometry および³H-thymidineによる検索—. *日耳鼻* 89: 1018-1029, 1986.
- 9) 原渕保明, 山中 昇: ヒトB細胞亜群におけるEBウイルス感受性. *日耳鼻* 90: 1799-1811, 1987.
- 10) Harabuchi Y, Koizumi S, Osato T et al: Flow cytometric analysis of Epstein-Barr virus receptor among the different B-cell subpopulations using simultaneous two-color immunofluorescence: *Virology*

- 165: 278-281, 1988.
- 11) Sugiyama M, Yamane H, Konishi K et al: Subsets of tonsillar lymphocytes and activated cells in each subset analyzed by two-color flow cytometry: *Acta Otolaryngol (Stockh)* 104: 129-134, 1987.
- 12) Pileri S, Gerdes J, Rivano M et al: Immunohistological determination of growth fractions in human permanent cell lines and lymphoid tumors: a critical comparison of the monoclonal antibodies OKT9 and Ki67. *Brit J Immunol* 65: 271-276, 1987.
- 13) 佐々木功典, 村上知之, 高橋 学, 松村耕治, 辻 龍雄 他: Cell cycleに伴う Ki-67 抗原量の変化. 第47回日本癌学会総会記事: 261, 1988.
- 14) Yamanaka N, Matsuda F, Tsubota H et al: Immune response of tonsillar B lymphocytes. *Acta Otolaryngol (Stokh) Suppl* 454: 148-152, 1988.
- 15) 松田史明, 山中 昇: 扁桃リンパ球の細胞動態に関する研究II. 一加齢, および疾患における変化一. *日耳鼻* 89: 1149-1158, 1986.
-
- 稿を終えるに臨み, 貴重な単クローン抗体を御供与頂いた札幌医科大学第一病理学講座菊地浩一教授にお礼申し上げます. なお, 本論文の一部は第7回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー研究会にて発表した.
-
- (原稿受付 1989年6月22日急載)
- 別刷請求先 〒060 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学耳鼻咽喉科学教室 原淵保明