唾液腺の免疫病理学的研究, 第1報, 臓器非特異性 抗原 (DNA) に対するラット唾液腺の反応

竹 内 宏 金 久 純 也 堀 泰 典

岐阜歯科大学口腔病理学講座* (主任: 寺崎太郎教授)

[受付: 昭和56年4月20日]

Immunopathological study of salivary glands I. Tissue response of rat salivary glands to DNA antigen

Hiroshi Takeuchi, Junya Kanehisa, and Yasunori Hori

Department of Oral Pathology, Gifu College of Dentistry

Takano, Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02

(Chief: Prof. Taro Terazaki)

[Accepted for publication April 20, 1981]

Key words: DNA antigen/parotid gland/lacrymal gland/ADCC/cytotoxic factor

Abstract: Repeated injections of DNA antigen gave rise to acinous cell injuries and T-cell infiltration with proliferation of the rat parotid glands and internal lacrymal glands following the formation of antibodies to the DNA antigen. Histopathological observation suggested that the cell injuries, ie degeneration or necrosis, were caused by the ADCC or cytotoxic factor of T-cells which exudated and infiltrated the intralobular connective tissue from the intraparotid or other lymph nodes. In addition to the above observations, T-cell's immunoproliferation of the intraparotid lymph nodes was demonstrated by FITC-conjugated anti T-cell serum. The T-cells flowed out from the punctuated hyperplastic intraparotid lymph nodes injured the connective tissues and acinous cells adjacent to the lymph nodes.

These histopathological observations were similar to the autoimmune disease of the parotid gland 'sicca syndrome or Sjögren's syndrome' in humans which are caused by organ-specific antigens or organ-non specific antigens. Thus, it is suggested that the DNA antigen stimulates the formation of circulatory antibodies and sensitized T-cells and that its immunological reaction sometimes brings about glandary injuries.

緒 言

生体自己成分を認識し得ずに自己抗体を産生するに至った生体は、その対応抗原の存在する臓器組織において免疫反応を展開し、自己免疫疾患をひき起す。この際の自己抗原は多種類にのぼるが、臓器特異性抗原と臓器非特異性抗原の2型に大別され、系統的あるいは限局性疾患を招来する

ものである。

近年、免疫学の著しい発展に伴って、これら自己免疫の各型とその成因に関して極めて明快に考究されつつあるが、口腔領域のそれは今なお不明な点が多い。

そこで今回、口腔の自己免疫疾患の様相を明らかにすべく、臓器非特異性抗原に代表的なDNAをとりあげて、動物実験を試みたところ唾液腺や涙腺の如き頭頸部の外分泌腺に興味ある知見を得

* 岐阜県本巣郡穂積町高野 (〒 501-02)

たので以下に報告する。

実験材料と実験方法

1. 概略

SD 系ラットに DNA を毎週 1 回ずつ免疫し、最終注射より 1 週間後に屠殺、外涙腺、内涙腺、耳下腺、顎下腺、腎臓をとり出し、凍結ならびにパラフィン切片上において、これら各組織の形態変化、T-cell, B-cell, γ -globulins の動態を免疫病理学的に検索するに加えて、屠殺時に得た血清を用いて若干の血清学的分析を行った。

2. 被験動物と感作法

体重 250~300g の SD 系ラット (♂) (50 匹) の掌蹠ならびに後肢筋肉に、仔牛胸腺より抽された DNA とアルブミンを等量の Freund's incomplete adjuvant とともに毎週 1 回ずつ免疫した。なお、DNA は Miles 社製 (Salt free, 0.255% タンパク質, 0.33% RNA, 9.62% 水分含有) で、アルブミンとの混和比は 40mg/ml である。

屠殺は 5 週後すなわち 4 回感作後より開始し、各週毎に 16 週 (15 回感作) にわたって行い、血清採取、涙腺、唾液腺、腎臓をそれぞれ剔出し、各対の片側を凍結切片とし、他側を 95% ethanol 固定パラフィン切片とした。

3. 観察方法

a. 免疫病理学的観察

凍結切片は 5~7 μ の連続切片とし、主として蛍光抗体染色、すなわち、抗 T-cell 蛍光抗体染色、抗ラット γ -globulins 蛍光抗体染色に供し、パラフィン切片は 2~4 μ の連続切片とし、H・E 染色・トルイジン・ブルー染色をそれぞれに施し、各組織の形態変化の観察にあてた。

i) 抗 T-cell 抗体の作製

同系ラットより摘出した胸腺を Hanks solution で十分に洗い、同 solution 内でカバーガラスですり合わせつつ胸腺片をもみほぐし、これをステンレスメッシュを通過させて胸腺細胞のみをとり出し、 5.5×10^7 個の Hanks solution suspension とし、体重 2.5~3 kg の家兎 (♂) に耳静脈より各週に 1 回、計 6~8 回注射した。寒天ゲル内沈降反応によって沈降抗体の産生を確認した後、血清を採取し、通法によって蛍光抗体液を作製した。

なお、本蛍光抗体液使用に際して、他組織細胞との交叉染色性を防止するため、ラット赤血球、肝臓、好中球、大食細胞の粉末を作製し、これらとの吸収を行った。さらに、本蛍光抗体液の特異染色性を確認するために、脾およびリンパ節の凍結切片上にて、抗 γ -globulins 蛍光抗体液との対比染色を行った。その結果は Fig. 1 の如くで、両臓器とも抗 T-cell 蛍光抗体染色陽性細胞は胸腺依存域に明確に把えることができた。

ii) 抗 γ -globulins 蛍光抗体液の作製

50 匹の無処置 SD 系ラットより採取した血清から 3 回にわたる $1/3$ 硫酸塩析法によって粗 globulin を調製し、これを生食に再溶解して透析した後、等量の incomplete adjuvant で各週 1 回 2 ml ずつ計 7 回家兎に免疫し、従来の方法に準じて蛍光抗体液とした。

実験結果

1. 無処置対照群の所見

外涙腺、耳下腺、顎下腺は形態学的に何ら変化なく、小葉間結合組織にわずかに γ -globulins の滲出を認める程度であった。

一方、内涙腺には若干の炎症反応があって、 γ -globulins は他臓器よりもやや広範に滲出し、同部にリンパ球や好中球の軽度の浸潤を認め、リンパ球は少数のものが抗 T-cell 蛍光抗体液で蛍光陽性を示した。

また、腎においては数個の糸球体にかなり多量の γ -globulins の局在を示す強い蛍光を認めた。しかし、このような所見はすべての糸球体にわたるものではなかった。同様の蛍光所見は尿細管に沿って走行する血管内にも認められたが、これら蛍光陽性部には組織傷害や炎症反応は認められなかった。

2. 実験群の所見

ラット血清中には第 9 週において抗 DNA 抗体が沈降抗体として認められたが、各ラットの IgG 量はこれに先立って次第に増量し、8 週以降は hypergamma globulinemia というべき状況を呈し、1500mg/100ml 以上を示した。但し、抗 DNA 抗体の産生にはラット間においてばらつきがあり、屠殺時に産生のみない例もあった。

抗 DNA 抗体を産生したラットにおいては、唾液腺と涙腺を中心として少数例（5 匹）に病的変化を認めたが、実験週齢による著明な差異はなく、いずれの週齢のラットもほぼ共通したものであった。

まず、唾液腺や涙腺の小葉間結合組織においては、多量の Immunoglobulins が滲出し (Fig. 2A)、著しいものでは Fig. 2B の如く、各腺終末部の基底膜までこれを認めた。このように Immunoglobulins の滲出の顕著な小葉間結合組織では、多分に edematous であって、膠原線維束は膨化して鬆粗となり、同部に多数の mast cell とその degranulation を認めた。また、症例によっては Fig. 3 の如く、ここを走行する細静脈から T-cell の浸潤をきたすものがあつた。

つぎに、腺房についてみると、Immunoglobulins の滲出の著しい部位に一致して種々の程度の退行性変化を認めた。これの最も顕著な例は Fig. 4A の如く、1 つの小葉のほぼ全域が壊死に陥っているもので、軽度な例は、小葉間結合組織付近の腺房細胞が、核濃縮、核膨化、核膜の一部消失あるいは核消失を散在性にきたしていた (Fig. 4B)。

このような腺房部にはリンパ球の浸潤を伴っていたが、これらは、Immunoglobulins を保有せず、抗 T-cell 蛍光抗体液染色で蛍光陽性を示すところから、その大部分は T-cell であることが判別し得た。これら T-cell の浸潤の様相は、1) 腺房基底膜に沿って散在性に浸潤するもの (Fig. 5A)、2) 小集塊状に浸潤するもの (Fig. 5C)、3) 大集塊をなすものの 3 型に大別され、1) の如き浸潤は耳下腺、顎下腺、内涙腺、外涙腺のいずれの腺にも認めたが、2) の状況を示す例は顎下腺や外涙腺には少なく、3) の例に至っては耳下腺と内涙腺にしかみることができなかった。

ところで、耳下腺には intraparotid lymph node が位置しているが、これらはほぼ全例においてリンパ球が充実性に分布し、germinal center を有する 2 次リンパ小節あるいは 1 次リンパ小節を認めるものはなかった。これを抗 γ -globulins 蛍光抗体液と抗 T-cell 蛍光抗体液で染め分けると、前者に蛍光陽性を示すリンパ球はほとんどなく、錯走する sinusoid 内に存在する液成分に diffuse

な蛍光を認め、逆に、抗 T-cell 蛍光抗体液陽性所見は、リンパ節のほぼ全域に充満するリンパ球に認めることができた (Fig. 6)。この所見は、DNA 抗原の遷延感作に際して、intraparotid lymph node においては T-cell が主として immunoproliferation を起すものであることを示しているものである。また、実験例によってはこの immunoproliferation に起因して、同リンパ節全体が lymphoma の如く著しく腫大するものがあった。これら intraparotid lymph node の被膜は完全なものではなく、ほぼすべての実験例で、被膜の一部が消失し、同部からリンパ球が溢出し、その溢出部において Fig. 7 の如く周囲組織の壊死変化を認めた。これは形態学的に、intraparotid lymph node で immunoproliferation を起した T-cell が cytotoxic な性状を有していることを示唆するものであった。

これを腎について観察すると、糸球体において Fig. 7A の如く、著しい immunoglobulins の沈着を認め、この所見は、無処置対照と比較してみても明確な差異を示すものであった。これと同時に、曲尿細管内にも同 immunoglobulins の存在を認めた (Fig. 8B)。また、ヒトの弓形血管に相当する管腔には T-cell を認めた (Fig. 8C)。但し、H・E 染色で観察した場合、組織傷害を明確に把握することはできなかった。

考 察

DNA は臓器非特異性抗原の代表的なものの 1 つで、これには native DNA と denatured DNA があり、native DNA に対する抗体は SLE に特異的に出現し、denatured DNA に対する抗体は SLE のみならず他疾患にも広く検出される¹⁾。

これは、生体がもし DNA 抗体を産生した場合には、種々の自己免疫疾患を招来することを示すものであり、多分に口腔の諸臓器組織にも何らかの形で影響をおよぼしているものと考えられる。今日、口腔領域で自己免疫疾患が明らかにされているのは、sicca syndrome と Sjögren's syndrome である。この両疾患の自己抗原にも他の自己免疫と同様に、臓器特異性抗原と臓器非特異性抗原とがある。前者の代表的抗原は唾液腺や

涙腺の抽出物であって、今日まだ単離に至っていないものの、患者のこれら腺上皮抗体の陽性率は約40~50%である²⁻⁴⁾。一方、臓器非特異性抗原には数多くのものが検出されている中で、とくに非ヒストン核タンパクや酸性核タンパクが最も頻度高い検出率を示している⁵⁾。

今回、実験に供した市販のウシ胸腺 DNA も抗原接種時には denatured DNA として抗原性を発揮するもので、頭頸部では唾液腺と涙腺に免疫反応による組織傷害を惹起せしめ、その他にはあまり著変を認めなかった。

この際の免疫反応は B-cell immunity と T-cell immunity の両方にわたるもので、その主たる変化は腺組織の退行性変化とリンパ球の浸潤増殖であった。このような結果に至る機転は体液性免疫と細胞性免疫との両者にまたがることは明らかである。体液性抗体による反応については Coombs and Gell の第Ⅱ型と第Ⅲ型とが考えられる。第Ⅱ型では補体依存性細胞溶解と抗体依存性細胞性溶解をとりあげるべきである。過去において、ADCC を媒介する細胞は null cell とみなされていたが、今日、Lamon, E. W. ら (1975)⁶⁾ の説く如く、null cell 以外にも T-cell や B-cell が ADCC を遂行する機能のあることが認められている。今回の実験では、浸潤増殖したリンパ球のほとんどが T-cell であったところから、ADCC による過敏反応が起るものと仮定するなら、その媒介細胞は T-cell と考えるのが妥当である。

第Ⅲ型すなわち Arthus 型は、周知の如く、抗原抗体複合物を貪食した多数の好中球が出すリゾチームおよび血管障害による局所組織の壊死性変化であるが、本実験においては、好中球の浸潤はほとんどなく、また、血管変化も実験的 Arthus 現象にみられる如き著しいものでなかったところから、一応、これを除外してもよいのではなからうか。

さらに組織学的検索によって、局所に浸潤増殖した T-cell あるいは intraparotid lymph node において immunoproliferation を起した T-cell は、多分に cytotoxic factor をも有しているようである。このことは、これら T-cell が macrophage の浸潤なくして、付近の組織を傷害し、壊

死に陥し入れていることから推察し得るものであるが、また一方では、先述の ADCC による可能性もあって、両機序のいずれか一方、あるいは両者が同時に反応していることも考えられ、現時点において、擦断し切れないところである。この点に関しては、in vitro で明確にすべき用意がある。

また、今回の16週にわたる経時的観察において、過敏反応による組織傷害が、内涙腺と耳下腺に多大であり、外涙腺と顎下腺では軽度であったが、かかる所見はヒトに生じる sicca syndrome や Sjögren's syndrome と類似している。自己抗原が臓器特異性であっても、また非特異性であっても、この結果は同じであるが、近接する臓器であり、細部に異なるものの類似点の多い臓器間において、このような病的変化の差異が生じる機序は今回の実験でも分らない。ただ、明らかなことは、耳下腺と内涙腺において、immunoglobulins の滲出が著しいことと、T-cell の浸潤増殖が強く現われることであり、この差が、臓器差につながる機作と考えられる。とくに、耳下腺においては intraparotid lymph node の immunoproliferation が関係するところが大きいようである。sicca syndrome や Sjögren's syndrome におけるリンパ球の浸潤機序、リンパ球の種類、およびその意義に関しては、現在まだ十分に明らかにされてはいないが、今回の実験で、DNA の遷延感作によって、immunoproliferation を起すべく機能付けられた T-cell が、血行性あるいは被膜を消失した intraparotid lymph node から直達性に腺房に浸潤し、それが ADCC あるいは cytotoxic T-cell としての作用を有しつつ増殖し、腺房を傷害に陥し入れて行くことが示唆された。

なお、今回の16週にわたる実験では、腺房の傷害が全域に拡大し、リンパ球との置換や epimyoepithelial island の如き組織変化は認めなかったが、さらに遷延感作を反復すれば、このような所見を得ることも可能と考える。

今後、in vitro における免疫担当細胞の諸種の性状、さらに長期にわたる経時的観察、臓器特異抗原による変化などについて実験を重ねて行く所存である。

Fig. 1 A : Specific fluorescence of T-cells in thymus dependent area of the rat's spleen. (staining with FITC-labeled anti T-cell serum. $\times 100$)
B : Non-fluorescence of lymphocytes in serial section. (staining with FITC-labelled anti γ -globulins serum. $\times 200$.)

Fig. 2 $I\gamma$ -globulins exudated to the interlobular connective tissue (A) and its localization interacinous space (B).

A : $\times 100$, B : $\times 200$.

Fig. 3 T-cells in the small vein (A) and infiltrated to the interlobular connective tissue (B).

A : $\times 100$, B : $\times 400$.

Fig. 4 A : Necrosis of acinous lobules. $\times 80$.
B : Necrobiosis of acinous cell. $\times 320$.

Fig. 5 A : Scattered infiltration of T-cells. $\times 400$.
B : Clustered infiltration of T-cells. $\times 400$.
C : Large amounts of T-cells infiltrated into the necrotic lobules. $\times 200$.

Fig. 6 A : Immunoproliferating T-cells showed specific fluorescence of FITC-labeled anti T-cell serum in the intraparotid lymph node. $\times 200$. $\times 400$.
B : Specific fluorescence of immunoglobulins in the sinusoid of serial section of A. $\times 200$.

Fig. 7 Necrosis by T-cell runned over from intraparotid lymph node.
A : $\times 200$, B : $\times 400$.

Fig. 8 A : Large amounts of immunoglobulins on the surface of the glomeruli. $\times 200$.
B : Localization of immunoglobulins in the renal tubules. $\times 200$.
C : T-cells in the vv. arcuatae. $\times 400$.

結 語

DNA 抗原の遷延感作によって、特異抗体を産生したラットの頭頸部の外分泌腺を免疫組織学的に検索したところ、50匹のラットの中の5匹に耳下腺と内涙腺に、腺房細胞の変性・壊死を中心とする組織傷害と、同部への T-cell の浸潤・増殖を認めた。また、intraparotid lymph node に T-cell の著しい immunoproliferation を示すものも一部に観察し得たが、ここから溢出した T-cell は周囲組織を強く傷害する傾向にあって、同細胞が cytotoxic factor を有していることがうかがえた。

以上の外分泌腺の変化は、DNA 抗原による B-cell immunity と T-cell immunity の両免疫反

応が関与して生じたものとみなし得、前者によって、II型の ADCC、後者によって、IV型の cell-mediated hypersensitivity がこれに参画したと想定された。

なお、上記の如き所見は、多分にヒトの外分泌腺の自己免疫疾患、とくに、sicca syndrome や Sjögren's syndrome に類似していたことから、ヒトにおけるこれらの疾患の発症機転解明の一助になり得る考え、今後、種々の検索法を加味してさらに詳細に考究する所存である。

謝辞：稿を終えるにあたって、御指導と御校閲を賜った、本学講座、寺崎太郎教授に深甚の謝意を表します。また、種々御手伝願った三浦和津恵嬢に感謝致します。

抄録：臓器非特異性抗原による自己免疫疾患には、DNA 抗原の関連性に注目すべきものがある。今回、同抗原による一連の免疫反応が耳下腺を中心とする頭頸部の外分泌腺に如何なる組織変化を与えるのかを知るべく、遷延感作を行ったところ、1) 体液性抗体によると考えられる腺房の傷害、2) immunoproliferation とみなし得る T-cell の浸潤と増殖を認めた。尚、T-cell の増殖は腺房傷害部と、intraparotid lymph node の両部に顕著であった。

文 献

- 1) KOFFLER, D., CARR, R. I., AGNELLO, V., et al.: Antibodies to polynucleotides; disirubition in human serums. *Science*, **166**: 1648-1649, 1969.
- 2) JONES, B. R.: Lacrimal and salivary precipitating antibodies in SJÖGREN'S syndrome. *Lancet*, **2**: 773-776, 1958.
- 3) BERTRAM, U. and HALBERG, P.: A specific antibody against the epithelium of the salivary ducts in sera from patients with SJÖGREN'S syndrome. *Acta. Allerg.*, **19**: 458-466, 1964.
- 4) FELTKAMP, T. E. W. and VON ROSSUM, A. L.: Antibodies to salivary duct cells, and other autoantibodies, in patients with SJÖGREN'S syndrome and other idiopathic autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **3**: 1-16, 1968.
- 5) 東篠 毅, 本間光夫: シェーゲレン症候群の免疫異常. 臨床免疫, **12**: 421-427, 1980.
- 6) LAMON, E. W., SKURZAK, H. M., ANDERSSON, B., et al.: Antibody-dependent lymphocyte in the murine sarcoma virus system: activity of IgM and IgG with specificity for MLV determined antigen (s). *J. Immunol.*, **114**: 1171-1176, 1975.