リンパ濾胞内抗原捕捉域の変遷に関する三次元的研究

山形大学医学部病理学第二講座

佐 藤 裕 信

(昭和63年2月3日受付)
(昭和63年2月10日受理)

Tridimensional study on transition of antigen trapping area in lymph follicles

Hironobu Sato

Department of Pathology, Yamagata University School of Medicine

In lymph follicles of rat popliteal lymph nodes (PLNs), the transition of the localization of PAP (peroxidase-anti-peroxidase complex) trapping area with development of germinal centers was tridimensionally studied to analyze the differentiation of follicular dendritic cells (FDCs). Rats 5 weeks old were injected sheep red blood cells (SRBCs) into foot pads. The PLNs were extirpated at different intervals, at one day before extirpations PAP were injected into foot pads. Detection of PAP in lymph follicles and detail observations were performed in serial paraffin sections and in electron microscopy by immunoperoxidase technique. After the injection of SRBCs, lymph follicles and germinal centers increased in number. In early primary lymph follicles, the PAP trapping area occupied large space, however the ratio of the PAP trapping area occupying in the follicles was decreased with development of germinal centers. The trapping of PAP became weak in which centroblasts had been just appeared in the primary follicles, and then the medullary side of the germinal centers revealed no PAP trapping with further development of germinal centers. In electron microscopical observation, the trapping of PAP in secondary follicles could be found on the surface of cytoplasmic membranes of FDCs, which formed complicated labyrinth structures, in corona and light zone. On long time interval after injection of SRBCs, the germinal centers were atrophic, while cytoplasmic processes of FDCs remained complicated. The differentiation of FDCs is discussed.

Key Words : Immune complex trapping-Lymph node-Lymph follicle-Germinal center-Follicular dendritic cell

緒 言

リンパ濾胞内樹枝状細胞 follicular dendritic cell (FDC)^{1)~3)}は歴史的に antigen-retaining reticular cell⁴⁾, follicular reticular cell⁵⁾, desmo-dendritic cell⁶⁾⁷⁾, dendritic reticulum cell (DRC)⁸⁾⁹⁾等の様々

な名称で呼ばれ、リンパ濾胞内の免疫現象において特異な役割を演じる細胞として知られている。FDCの起源については、細網細胞由来とする説^{9)~15)}、骨髓由来とする説¹⁶⁾、遊走する抗原保持細胞に由来するとする説¹⁷⁾¹⁸⁾、等が示されているが、未だ不明である。形態学的特徴として FDCは複雑な樹枝状の胞

体突起を有し、突起相互で纏絡しあい、リンパ濾胞内に網状に分布する。FDCの突起相互間およびFDCの突起とリンパ球の間にはしばしばdesmosome様構造がみられる⁶⁾⁹⁾¹⁹⁾。さらにFDCはその細胞膜上、特に樹枝状胞体突起に抗原を捕捉し、長期間その抗原を保持する機能を有することより、免疫学的記憶に関与することが示唆されている^{5)18)20)~25)}。FDCによる抗原の捕捉域は、一次濾胞では濾胞中心部に円形に分布し、二次濾胞では主にコロナ(暗殻)から胚中心明調帯にかけてのいわゆるcap areaに分布することが知られている。抗原捕捉域の変遷過程の究明は、FDCの分化や細胞動態の解明のために非常に重要である。しかし胚中心の発達に伴う抗原捕捉域の分布の変遷についての観察はあまり行なわれていない。¹⁵⁾

今回の実験では、ラット膝窩リンパ節を羊赤血球で刺激し、胚中心の発達過程および退縮過程を連続切片で経時的に観察した。さらに上記各過程のリンパ濾胞内の抗原捕捉域の変遷を三次元的に検討した。以下その結果を報告し若干の考察を加えた。

材料と方法

実験動物；Wistar ラット(日本チャールズリバー Inc.)の5週令の雄を用い、specific pathogen free (SPF)の条件下で飼育した。

実験方法；リンパ濾胞の発達過程の経時的観察のため上記ラットに $1 \times 10^9 / \text{ml}$ の羊赤血球(SRBC；東洋血清)0.2mlを両側後肢足蹠皮下に投与し、投与後1日、3日、5日、10日、3週、6週、10週、14週目に両側後肢の膝窩リンパ節(PLN)を摘出した。摘出一日前に家兎soluble peroxidase-anti-peroxidase complex (PAP, DAKO社製)を生食で5倍希釈し、0.2mlを両側後肢足蹠皮下に注入した。対照群としては5週令およびSRBC投与3日、5日、10日、3週後に対応するSRBC未投与のラットPLNを観察した。各時期の実験群は各々2匹から5匹のラットを用いた。尚、コントロールとしてPAPを投与しないラットPLNも同様の方法で観察した。

固定方法；PLN摘出時には胸腔内よりZamboni固定液²⁶⁾で灌流固定を行なった。摘出後PLNはZamboni固定液でさらに4℃、1日浸漬固定後、型の如く脱水を経てパラフィン包埋した。なお一部は4% paraformaldehydeと1.25% glutaraldehydeの混合液で4℃、4時間固定し電顕試料として用い

た。

光顕標本作製法；パラフィン包埋試料は、3 μm の連続切片を作製後、家兎PAPの局在を検出する為、間接酵素抗体法を行なった。即ち、脱パラ切片をphosphate buffered saline(PBS)で洗浄後、0.02%塩化カルシウムを添加した0.1% Trypsin/0.01 M PBS (Trypsin, DIFCO Lab.)で37℃10分間蛋白分解酵素処理を行ないPBSで洗浄した。非特異的反応を防ぐため5%豚血清に15分浸漬しPBS洗浄後、peroxidase-conjugated swine immunoglobulins to rabbit immunoglobulins (DAKO社製)と室温で1時間反応させた。Karnovsky法²⁷⁾によるdiaminobenzidine(DAB)反応(DAB濃度30mg/dl)を行ない、核染はメチルグリーン、一部はヘマトキシリンで行なった。尚、一部の切片はperoxidase-conjugated swine immunoglobulins to rabbit immunoglobulinsを反応させずに直接DAB反応を行なった。

電顕標本作製法；4% paraformaldehyde-1.25% glutaraldehyde固定試料は磷酸緩衝液で洗浄後Microslicer DTK-2000 (D.S.K.)で薄切し、70 μm の浮遊切片を作製した。DAB液(DAB濃度30mg/dl)で30分浸漬後に、Karnovsky法によるDAB反応を室温で1時間行ない、1%オスミウムにて後固定(1時間、4℃)後、脱水を経てAraldite-Eponに平板包埋した。包埋試料は8800 Ultratome III (LKB)で超薄切し、電子顕微鏡(HS-9；日立、加速電圧75KV)で観察した。

三次元的解析；パラフィン連続切片標本から8枚おきに光学顕微鏡描画装置(OlympusBH-DA)を用いて、リンパ節の輪郭、辺縁洞、皮質と髄質の境界、リンパ濾胞および胚中心をトレース紙に描画した。これを用いてSRBC刺激後の各リンパ節群のうち無作為に選んだ1個のリンパ節についてリンパ濾胞および胚中心の数、リンパ濾胞の辺縁洞に対しての垂直方向(縦径)および平行方向(横径)の最大径を計測した。但し5週令およびSRBC刺激後3週とそれに対応する非刺激群は各々6個のリンパ節について計測し等平均の検定を行なった。尚、ここで胚中心としたものは、光顕的に弱拡大($\times 40$)でリンパ芽球の集積が認識できたものを指す。さらに横径と縦径を用いて楕円方程式からリンパ濾胞の断面積を算出し、SRBC刺激後の日数との関係を検討した。

また各時期のリンパ節群のうち5週令、SRBC刺

表1 SRBC 刺激後のリンパ節のリンパ濾胞数, 胚中心数とリンパ濾胞の大きさの経時的変化

SRBC 刺激 後の日数	リンパ 濾胞数(F)	胚中心 数(GC)	GC/F(%)	リンパ濾胞の直径 ³⁾	
				横径 (μm)	縦径 (μm)
5 週 ¹⁾	52.7	1.2	2.3	260 $\pm$ 81	147 $\pm$ 48
5 週 + 1 日 ²⁾	41	0	0	249 $\pm$ 67	140 $\pm$ 50
5 週 + 3 日 ²⁾	78	26	33	244 $\pm$ 89	162 $\pm$ 61
5 週 + 5 日 ²⁾	74	48	65	307 $\pm$ 110	183 $\pm$ 106
5 週 + 10 日 ²⁾	88	57	65	247 $\pm$ 82	167 $\pm$ 59
5 週 + 3 週 ¹⁾	122.8	89.5	73	301 $\pm$ 109	217 $\pm$ 83
5 週 + 6 週 ²⁾	126	55	44	204 $\pm$ 73	150 $\pm$ 55
5 週 + 10 週 ²⁾	94	17	18	252 $\pm$ 79	173 $\pm$ 57
5 週 + 14 週 ²⁾	95	6	6	206 $\pm$ 67	141 $\pm$ 44

1) 6 週のリンパ節を調べた。

2) 1 個のリンパ節を調べた。

3) Mean $\pm$ SD

刺激後 3 日, 5 日, 10 日, 3 週, 6 週目のそれぞれ 3 個のリンパ濾胞を無作為に選び, その連続切片をすべて写真撮影 ($\times 100 \sim \times 400$) した。写真を基にリンパ濾胞の輪郭, 胚中心の輪郭, DAB 陽性像の範囲 (陽性像の外縁を最短距離で結んだ。)を Digitizer 上で描画し, コンピューター画像解析装置 (DIANA, 盟和商事) を用いて立体構築を行なった。コンピューターは PC-9801F2 (NEC) を使用した。胚中心の発達に伴うリンパ濾胞中の PAP の捕捉域の占める割合の変化について検討するため, 立体構築をした各リンパ濾胞につきリンパ濾胞, PAP 捕捉域の体積を算出し, リンパ濾胞の体積に占める捕捉域の体積の比を求めた。

結 果

1. リンパ濾胞および胚中心の数とその大きさの経時的变化

各時期のリンパ濾胞, 胚中心の数およびリンパ濾胞の直径を表 1 に示した。リンパ節 1 個あたりのリンパ濾胞の数は SRBC 刺激後漸次増加し, 3 週から 6 週にかけて最大となった。胚中心数は 3 週目にピークを認め, 以後減少を続けた。胚中心を有するリ

ンパ濾胞, 即ち二次濾胞の一次濾胞を含めた全ての濾胞に対する割合は, 胚中心数が最大の 3 週目で最大であった (表 1)。刺激後 3 週目のリンパ節のリンパ濾胞と胚中心の数は同じ時期の未刺激の対照群と比べて有意に増加を認めた (表 2)。

SRBC 刺激後の日数とリンパ濾胞断面積の平均値を対数変換し, 二次関数に近似させた曲線を求めた。図 1 のように, リンパ濾胞の断面積は SRBC 刺激後増加し, ほぼ 10 日目をピークとして以後は減少した。

刺激後 3 週目および同時期に相当する未刺激対照群のリンパ濾胞の直径は 5 週令と比較し有意な増加を認めた。刺激後 3 週目のリンパ濾胞の直径は, 対照群と比べ横径では有意差を認めないが, 縦径では有意差を認めた (表 3)。

2. 画像解析によるリンパ濾胞の PAP 捕捉域の検討

生後 5 週令ラット PLN のリンパ濾胞では, 胚中心を殆ど認めず, 三次元的に PAP 捕捉域はリンパ濾胞の大きな範囲を占めた (図 2)。SRBC 刺激後 3 日目のリンパ濾胞は発達途上の胚中心を有し, PAP 捕捉域は広範で, 胚中心は殆ど PAP の捕捉域内に

表2 生後5週令および3週経過後のリンパ節における
リンパ濾胞数と胚中心数

週令	リンパ濾胞数 ²⁾	胚中心数 ²⁾
5週	52.7±8.6	1.2±2.2
5週+3週 SRBC(-)	78.8±18.2	20.8±5.8
5週+3週 SRBC(+)	122.8±33.5	89.5±23.2

1) 各群とも6個のリンパ節を調べた。

2) Mean±SD

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$; t test

図1 SRBC刺激後の日数(days)とリンパ濾胞断面積(area)
曲線の方程式 $\log(\text{area}) = 0.43 + 0.421 \log(\text{days}) - 0.21(\log(\text{days}))^2$ から、
断面積は9.5日目には最大となった。

図1 SRBC 刺激後の日数 (days) とリンパ濾胞断面積 (area)

曲線の方程式 $\log(\text{area}) = 0.43 + 0.42 \log(\text{days}) - 0.21(\log(\text{days}))^2$ から、
断面積は9.5日目には最大となった。

網羅された(図3 a, 3 b)。刺激後5日目以降においてリンパ濾胞のPAP捕捉域はそれ以前と比較して縮小する傾向を示し、辺縁洞側のコロナから胚中心明調部に限局した。立体的には胚中心暗調部側で中央に陥凹を有する帽子状の形態を示した(図4 a, 4 b)。生後5週令およびSRBC刺激後3日目のリンパ濾胞の体積に占めるPAP捕捉域の体積の比率と、刺激後5日、10日、3週、6週目のこの比率を

求めた結果を表4に示した。両者のリンパ濾胞中に占めるPAP捕捉域の比率の平均値間に有意差を認めた。尚、PAP捕捉域の体積と時間の経過の間には有意の相関は得られなかった(相関係数 $r = -0.20$)。

3. リンパ濾胞および胚中心の発達過程とPAPの分布について

生後5週令のラットリンパ節では辺縁洞直下の皮

表3 生後5週令および3週経過後のリンパ節における
リンパ濾胞の直径 (μm)

週令	横径 (μm) ²⁾	縦径 (μm) ²⁾
5週	260.2 $\pm$ 80.6	146.7 $\pm$ 48.3
5週+3週 SRBC(-)	305.0 $\pm$ 104	181.3 $\pm$ 67.1
5週+3週 SRBC(+)	301.0 $\pm$ 109	216.8 $\pm$ 83.3

1) 各群とも6個のリンパ節を調べた。

2) Mean $\pm$ SD

* $P < 0.01$

図2 SRBC未刺激の5週令のWistarラットPLNのリンパ濾胞の画像

胚中心はみられず, PAP捕捉域はリンパ濾胞の大きな範囲を占める。

図2, 3, 4 ラットPLNのリンパ濾胞のコンピュータ画像解析装置による画像

白色の領域, 濃染する領域, 灰色の領域はそれぞれリンパ濾胞, PAP捕捉域, 胚中心を示す。白い直線は座標軸を示す。

図3 a, 3 b SRBC刺激後3日目のラットPLNのリンパ濾胞の画像

3 aはリンパ濾胞とPAP捕捉域の領域のみの画像。

3 bは3 aの画像に胚中心の領域をかさねたもの。胚中心の出現をみるが, PAP捕捉域は広範囲で, 胚中心の領域を殆ど網羅する。

図4 a, 4 b SRBC 刺激後3週目のラット PLN のリンパ濾胞の画像

4 a はリンパ濾胞と PAP 捕捉域の領域のみの画像。
4 b は4 a の画像に胚中心の領域をかさねたもの。胚中心が発達し, PAP 捕捉域は辺縁洞側のコロナから明調帯に一致する領域に局限する。

図5 SRBC 未刺激の5週令の Wistar ラット膝窩リンパ節 (PLN) の光顕像

一次濾胞内に円形の網状 DAB 陽性像を認める。ペルオキシダーゼ標識抗家兔免疫グロブリンによる間接酵素抗体法, メチルグリーン核染, $\times 300$ 。

表4 リンパ濾胞の体積に占める PAP 捕捉域の体積の比率

	$Vt/Vf(\%)^{1)}$
I 群	$43 \pm 17\%$
II 群	$24 \pm 10\%$

]*

I 群: 5 週令および SRBC 刺激後3日目のリンパ濾胞 (合計6個)

II 群: SRBC 刺激後5日目, 10日目, 3週目, 6週目のリンパ濾胞 (合計12個)

Vt: PAP 捕捉域の体積

Vf: リンパ濾胞の体積

1) $\text{Measn} \pm \text{SD}$

* $p < 0.05$; t test

質域に既に多数の一次リンパ濾胞を認めたが, 胚中心の出現は殆ど認められなかった。PAP 投与後間接酵素抗体法で, 全ての一次濾胞内に DAB 陽性像が検出された。陽性像は, 多くのリンパ濾胞内で広い範囲にわたり円形の網状構造を呈した(図5)。濾胞外ではこのような網状陽性像を認めず, 髄質を中心に多数の組織球による PAP の貪食が DAB 陽性像として観察された。組織球の PAP 貪食像や後述する内因性ペルオキシダーゼによる弱い DAB 反応像は以後の各時期においても認められた。SRBC 刺激後1日目のリンパ節は刺激前と同様の組織所見を認めた。

SRBC 刺激後3日目には一次濾胞の他に, 一次濾胞内にリンパ芽球 (centroblast) がわずかに出現しているものから, リンパ芽球がある程度集積した未

図6 SRBC刺激後3日目のPLN

リンパ濾胞にリンパ芽球の出現を認め、PAP捕捉域はリンパ芽球の集合巣では疎に分布する。ペルオキシダーゼ標識抗家兔免疫グロブリンによる間接酵素抗体法、メチルグリーン核染、 $\times 150$

熟な胚中心を含む二次濾胞など様々の初期発達段階のリンパ濾胞が観察された。二次濾胞は全体の3分の1程度であった。DAB陽性像はリンパ芽球が出現した領域では疎になる傾向にあり、二次濾胞でのDAB陽性像は胚中心の髓質側で疎になりコロナ（暗殻）から胚中心にかけて分布した。より発達した二次濾胞のDAB陽性像は、胚中心の辺縁洞側からコロナにかけて分布する傾向を示し、胚中心の髓質側ではDAB陽性像はさらに疎になり、染色性も減弱した(図6)。SRBC未刺激の対照群に胚中心は認められず、網状のDAB陽性像が一次濾胞内に検出された。

SRBC刺激後5日目の胚中心の発達程度は刺激後3日目と同様に様々であるが、より発達が進み、

図7 SRBC刺激後5日目のPLN

PAP捕捉域は胚中心の辺縁洞(MS)側からコロナにかけて円蓋状に分布し、胚中心髓質側(M)には僅かに微細な陽性像を認める。ペルオキシダーゼ標識抗家兔免疫グロブリンによる間接酵素抗体法、メチルグリーン核染、 $\times 300$ 。

胚中心はリンパ濾胞の3分の2にみられた。二次濾胞のDAB陽性像は胚中心の辺縁洞側からコロナにかけての部分で円蓋状の分布を示し、胚中心髓質側に陰性領域を認めるものもみられた(図7)。この時期のSRBC未刺激の対照群に胚中心は認められなかった。

SRBC刺激後10日目には二次濾胞の胚中心に明調帯（辺縁洞側）と暗調帯（髓質側）の区別が識別できるようになった。DAB陽性像は主に辺縁洞側のコロナから胚中心の明調帯にかけての部分に三日月型に分布し暗調帯へは殆ど分布を認めなかった(図8)。暗調帯と明調帯の境界付近でDAB陽性像は弱くなり、稀に暗調帯で極く微細な陽性像がみられた。一次濾胞は概して小さく、DAB陽性像は中心

図8 SRBC 刺激後10日目の PLN

発達した二次濾胞を認め、PAP 捕捉域は胚中心の明調帯からコロナにかけて三日月状に分布する。ペルオキシダーゼ標識抗家兔免疫グロブリンによる間接酵素抗体法、メチルグリーン核染、 $\times 150$ 。

図9 SRBC 刺激後14週目の PLN

リンパ濾胞内に巣状のリンパ芽球様細胞を認め、PAP 捕捉像を認める。ペルオキシダーゼ標識抗家兔免疫グロブリンによる間接酵素抗体法、メチルグリーン核染、 $\times 300$ 。

部に限局する傾向を示した。この時期の SRBC 未刺激の対照群には胚中心の出現を認めた。一部は成熟した胚中心もみられるが、小さいものが殆どで、二次濾胞の比率は少なかった。

SRBC 刺激後 3 週目のリンパ濾胞は二次濾胞が 7 割を占め、DAB 陽性像は刺激後10日目と同様の局在を示した。SRBC 未刺激の対照群は10日目と同様に一部に成熟した胚中心をみるにすぎなかった。SRBC 刺激後 6 週目のリンパ濾胞における二次濾胞の頻度は 5 割程度に減少し、リンパ濾胞は概して小さくなると同時にその輪郭はやや不鮮明となった。DAB 陽性像の局在は、SRBC 刺激後 3 週目と同様である。

SRBC 刺激後10週目および14週目で二次濾胞の

頻度は 2 割以下に減少し、リンパ濾胞の輪郭はさらに不鮮明となり、小さいものが多くみられた。胚中心も萎縮性のものが多くみられた。DAB 陽性像の局在には基本的な変化は認められないが、明調帯と暗調帯の区別が識別できなくなった輪郭が不鮮明な萎縮性の胚中心では、DAB 陽性像が胚中心をほぼ網羅する所見もみられた。弱拡大ではリンパ濾胞にあきらかな胚中心は認識できないが、強拡大で初めてリンパ芽球巣が認識できるものもみられた(図 9)。

PAP 非投与ラットのリンパ節では、内因性ペルオキシダーゼによる弱い DAB 反応像が主に髄質の組織球胞体内や赤血球にみられたが、リンパ濾胞には網状の DAB 陽性像はみられなかった。また PAP 投

図10 SRBC 刺激後10日目の PLN の二次濾胞明調帯の電顕像

FDC (*) の胞体突起により形成された迷路様構造に著しい PAP の捕捉を認める。DAB 反応後, 未染色., $\times 7000$. bar = 1 μm .

図11 SRBC 刺激後10日目の PLN の二次濾胞暗調帯の電顕像

紡錘形の細胞 (*) の細胞膜に PAP の捕捉を認める。DAB 反応後, 未染色., $\times 5600$. bar = 1 μm .

与群の切片に間接酵素抗体法を用いず, 直接 DAB 反応をした場合も同様であった。

4. PAP 捕捉像の電顕的観察

SRBC 未刺激の 5 週令のリンパ節の一次濾胞では樹枝状の胞体突起を有する FDC の細胞膜上に明瞭な DAB 陽性像を認めた。FDC は多稜形或いは紡錘形の核を有し, 核膜にそって軽度のクロマチンの凝集を認め, 明瞭な核小体を 1 個有し, 核に陥凹を有するものもみられた。FDC の胞体突起は相互に纏絡し, 濾胞内で網状の分布を示したが, その纏絡は後述する二次濾胞内の細胞ほど複雑ではなかった。髄質には多数の組織球がみられ, その胞体内に大小の電子密度の高い貪食物 (PAP) を認めたが, その細胞膜上に DAB 陽性像はみられなかった。

SRBC 刺激後 3 日目のリンパ濾胞内の FDC の細胞膜上の DAB 陽性像は, 光顕的観察結果と同様に,

リンパ芽球の近傍やリンパ濾胞の髄質側ではやや弱い傾向を示した。

刺激後 5 日目の発達途上の二次濾胞では, 胚中心の髄質側に分布する FDC の細胞膜上の DAB 陽性像は弱い傾向を示した。この時期にはあきらかな迷路様構造はみられなかった。Tingible body macrophage が認められたが, 殆ど PAP の貪食を示さなかった。

刺激後 10 日目および 3 週目の発達した二次濾胞では辺縁洞側のコロナから明調帯にかけて, FDC の細胞膜上に多量の DAB 陽性像がみられた。FDC の核小体は明瞭で, 胞体および核はコロナでは紡錘形, 明調帯では長円形の傾向がみられた。FDC の胞体突起相互の纏絡は著しく, 複雑な迷路様構造を形成し, 同部には著明な DAB 陽性像が認められた (図10)。Tingible body macrophage は著明にみられた。暗

図12 SRBC 刺激後14週目の PLN の電顕像

FDC (*) の胞体突起に纏絡を認める。DAB 反応後、未染色, $\times 3400$ 。bar = 1 μm 。

調帯と明調帯の境界領域の FDC の DAB 陽性像は微弱となり、ここの胞体突起相互の纏絡は軽度であった。暗調帯には、樹枝状の胞体突起を有する紡錘形の、既に述べた FDC と同様の形態の細胞が少数みられた。この細胞の多くは DAB 陽性像を認めないが、時に細胞膜に微弱な DAB 陽性像を認めた(図11)。暗調帯では迷路様構造はみられなかった。

SRBC 刺激後10週目、14週目の明調帯と暗調帯の区別がつかなくなった萎縮性の胚中心を有するリンパ濾胞や、少数のリンパ芽球(主に centrocyte)をまじえるリンパ濾胞は、tingible body macrophage も有し、FDC は長円形や多稜形を示し、細胞膜上に DAB 陽性像を認めた。発達した胚中心の明調帯でみられる FDC に比し、迷路様構造は軽度であるが胞体突起は纏絡を依然として示した(図12)。

PAP 非投与ラットのリンパ節では、内因性ペルオキシダーゼによる DAB 反応像が主に髄質の組織球と血管内の少数の顆粒球の細胞質の顆粒や赤血球に

みられた。FDC の細胞膜上に DAB 陽性像はみられなかった。

考 案

Kaplan et al. (1950)²⁸⁾以来の多くの研究により、リンパ濾胞における抗原の捕捉は、リンパ濾胞に局在する follicular dendritic cell (FDC) の細胞表面に抗原抗体複合物の形で捕捉されることが明らかにされてきた。免疫複合体の一種である PAP (peroxidase-anti-peroxidase complex) のリンパ濾胞への捕捉は Chen et al.²⁾, Dijkstra et al.¹³⁾²⁹⁾, 土橋ら¹²⁾, Imai et al.¹⁴⁾, 前田¹⁵⁾により記載されているが、PAP を用いた方法は感作の必要がなく、光顕および電顕的に観察できる優れた方法である。今回光顕的观察に用いた方法は前投与した家兎 PAP を間接酵素抗体法を用いて、パラフィン切片上で検出したものである。従来、凍結切片を用いた方法や蛍光抗体法に比して、手技も容易で、組織構造の保存の良い標本作製することが可能となり、組織構造の詳細な観察に有用であった。パラフィン切片で検出した DAB 陽性像は、同時に作製した電顕切片の DAB 陽性像とリンパ濾胞中の局在がよく一致し、PAP の捕捉像と同一の局在を示すと考えられた。

今回の実験では、抗原抗体複合物と同一の抗原で感作した場合の捕捉をみるのではなく、刺激した抗原 (SRBC) とは別の抗原抗体複合物 (PAP) の捕捉をみたが、Imai et al.⁹⁾は horseradish peroxidase (HRP) 感作後のマウス二次リンパ濾胞内の抗原抗体複合物の捕捉を観察し、その結果は今回の実験と一致した。成熟した二次濾胞の捕捉域の局在や捕捉能については、抗原抗体複合物と同一の抗原で感作した方法の捕捉は、PAP を用いた方法の捕捉と同一であり、両方の方法は捕捉域の局在および捕捉能については同一である可能性が示唆される。しかし抗原抗体複合物と同一抗原で感作した場合の胚中心の発達過程での捕捉域の変遷を詳しくみた報告がないので断定はできない。また両方の方法での抗原抗体複合物の捕捉機構の相違については、現在のところ十分明らかではない。

5 週令のラットを SRBC で刺激することにより胚中心の早期出現と、リンパ濾胞の全体の数ならびに胚中心を有する二次濾胞の増加を認めた(表2)。この結果はマウス膝窩リンパ節を用いた Hoshi et al.³⁰⁾のリンパ濾胞と胚中心の誘導成績とよく一致した。前田¹⁵⁾は生後早期にラットを SRBC で刺激し

て、一次濾胞の早期形成をみており、SRBCの刺激がFDCの分化および発育に影響を与えている可能性を示唆している。しかしリンパ濾胞の発達とFDCの分化との相互の関係はなお未解明である。

SRBC刺激後3週目のリンパ濾胞の大きさは、未刺激の場合や生後5週令のそれと比べて、有意差は認めたが極端な差は示さなかった(表3)。これは生後5週令のリンパ濾胞はすでに十分大きいことを示すと共に、リンパ濾胞の数が増加した刺激後3週目の濾胞の大きさは、新生した濾胞のうちにまだ小さいものも含むため、未刺激の場合や生後5週令の濾胞と比較して、全体として差が少なくなったためと考えられる。

Lennert⁸⁾やStein et al.³¹⁾は成熟した胚中心は数週から数カ月持続した後、徐々にcentroblastが消失し、FDCとcentrocyteを残し胚中心は退縮することを報告している。このことは、SRBC刺激後3週以後、二次リンパ濾胞の比率が減少し、刺激後14週では胚中心が少なくなった今回の結果とよく符合する。萎縮性の胚中心内FDCの胞体突起は、迷路様構造は軽度であるが依然として纏絡を示し、なお分化した形態が保たれていた。一旦分化したFDCのその後の運命や終末は不明であり、興味深い。

画像解析から得られたリンパ濾胞に占めるPAP捕捉域の体積比は、胚中心が出現し、リンパ濾胞が発達すると、有意に減少した(表4)。しかしPAP捕捉域の体積と時間の経過の間には有意の相関は得られず、リンパ濾胞の大きさはSRBC刺激後途中までは時間の経過につれて増加した。これは5週令ラットは一次濾胞形成期の後期にあたるが¹⁵⁾、この時期の捕捉域は広い範囲を占めていることを示す。また、胚中心の発達に伴いリンパ濾胞の体積が増加しても、PAP捕捉域の体積はそれに応じて増加しないことを示唆するかもしれない。もしそうなら完成した二次濾胞のPAP捕捉域は、基本的には胚中心形成直前の一次濾胞のPAP捕捉域が、そのまま変形して成立したものと考えられる。PAP捕捉域の体積が変化する可能性として次のことが考えられる。分化成熟に伴うFDCの胞体突起の発達により捕捉域の増加をきたすこと、FDCあるいはFDCの前駆細胞のリンパ濾胞内への遊走のため捕捉域が増加すること、胚中心のリンパ芽球領域の拡大により捕捉領域が圧排され捕捉域が減少すること、あるいは胚中心の発達の過程でPAPを捕捉していた細胞がPAPの捕捉能を失って捕捉域が減少することなど種々の

可能性があり、解析は難しく今後に待たれる。

今回、全リンパ濾胞にPAPの捕捉を認め、PAP捕捉域の局在位置は一次濾胞が二次濾胞に発達するに伴い変化した。胚中心の発達に伴うPAP捕捉域の分布の変遷を模式化して図13に示した。5週令ラットの一次濾胞のPAP捕捉域は濾胞内に広範に概ね一様に分布したが、リンパ芽球(centroblast)が出現した部位のPAP捕捉像は疎になり、胚中心が発達するにつれて胚中心の髄質側にPAP捕捉像を認めない領域が観察された。完成した二次濾胞のPAP捕捉像は主として辺縁洞側のコロナから胚中心の明調帯にかけて三日月状に網状に分布した。PAP捕捉域は胚中心の発達に伴いリンパ芽球の増殖する領域によって圧排されるように辺縁洞側に偏在した。上記の結果は概ね前田¹⁵⁾の蛍光抗体法による記載に一致する。前田は一次濾胞に出現したリンパ芽球集合巣をPAPの捕捉をみない陰性領域とし、この領域が拡大していくとしたが、今回の観察では初期の胚中心で疎なDAB陽性像をリンパ芽球間にみた。この違いは蛍光抗体法で微細な変化を検出できなかったためと思われる。

Imai et al.⁹⁾はdendritic reticulum cell (DRC)、即ちFDCを、迷路構造の有無によって明調帯のdendritic reticulum cell with labyrinth structureと暗調帯およびコロナのdendritic reticulum cell without labyrinth structureに分類した。今回の光顕的観察では暗調帯にPAP捕捉像を検出できなかったが、電顕的観察では暗調帯にFDCの形態と一致する細胞の細胞膜に時に弱いPAP捕捉像を認めた。上記の細胞はdendritic reticulum cell without labyrinth structureに相当する。

Stein et al.³¹⁾のヒトリンパ濾胞についての検索では、明調帯のDRCはC3bおよびモノクローナル抗体のTÜ 1が陽性であるが、暗調帯のDRCは通常それらが陰性であるという。彼らは上記の結果から、免疫グロブリン-C3b複合体と結合する明調帯のDRCと、免疫グロブリン-C3b複合体と結合しない暗調帯のDRCがあるとし、DRCは分化と機能において異なることを示唆した。またJeurissen et al.³²⁾はラットリンパ濾胞に対するモノクローナル抗体を作製し、ED5は免疫複合体を保持するFDCと反応し、ED6は免疫複合体を保持しないFDCと反応するとしている。これらの結果により明調帯に分布するFDCと暗調帯に分布するFDCにはheterogeneityがある可能性が示唆され興味深い。今回、

図13 胚中心の発達に伴う PAP 捕捉域の分布の変遷

胚中心の発達途上で、胚中心髄質側の PAP 捕捉像が疎になると共にその染色性が低下し、PAP の捕捉を認めない領域が出現した。リンパ濾胞内にリンパ芽球が増殖した部位の FDC は、辺縁洞側に圧排されるが、一部はリンパ芽球の増殖により FDC 相互間の距離は開いても留ることが考えられる。今回の結果から一次濾胞の FDC が、胚中心の発達に伴い明調帯の FDC と暗調帯の FDC に分化し、heterogeneity を有するに至ったと推測することが可能と思われる。もちろん FDC を動的に追って得られた仮説ではなく、暗調帯の FDC が一次濾胞の既存の FDC に由来せず、リンパ濾胞外からの FDC の遊走やリンパ濾胞内での FDC の新生などのような可能性も完全には否定できない。現在までのところ FDC の分化、成熟、細胞動態に関して未解明な点が

多く、今後の研究に待たれる。

リンパ節での抗原抗体複合物の辺縁洞から胚中心内の FDC への移動については、Szakal et al.¹⁷⁾¹⁸⁾は樹枝状形態をとる細胞により運ばれるとし、Heinen et al.³³⁾³⁴⁾はリンパ球によって運ばれるとし、異なった成績が報告されている。また抗原抗体複合物の捕捉には、C 3 受容体^{20)31)35~38)}および補体^{2)20)35)39)~43)}の関与、さらに Fc 受容体の関与^{37)44)~47)}も示されている。しかし両方の受容体や補体の関係や役割についての知見は未だ十分ではない。またリンパ濾胞の微小環境の他の要素についても未解明であり、さらに究明が必要である。

結 語

1. パラフィン包埋切片を用いた間接酵素抗体法は

リンパ濾胞内の PAP の検出と組織構造の詳細な観察に有用であった。

2. SPF 飼育の 5 週令ラットを SRBC で刺激して、リンパ濾胞数および胚中心数の増加を認めた。
3. リンパ濾胞に占める PAP 捕捉域の体積比は胚中心が発達すると、未発達の時期に比し減少を認めた。
4. 一次濾胞内にリンパ芽球が出現すると同部の PAP 捕捉は疎になり、胚中心の発達に伴い胚中心髄質側に PAP 捕捉の認められない領域が出現した。
5. SRBC 刺激後長期間経過したリンパ濾胞の胚中心は萎縮性となったが、FDC の胞体突起の纏絡

は依然としてみられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり御懇切な御指導と御校閲を賜りました恩師山形大学医学部病理学第二講座今井大教授に深謝申し上げます。御懇切な御助言を賜りました山形大学病理学第一講座荒井茂教授に深謝申し上げます。また直接御指導、御助言を賜りました山形大学病理学第二講座土橋陸夫博士並びに前田邦彦博士に深謝申し上げます。

本論文の要旨は第27回日本網内系学会（昭和62年6月13日、神戸市）で発表した。

文 献

- 1) Chen LL, Adams JC, Steinman RM : Anatomy of germinal centers in mouse spleen, with special reference to "follicular dendritic cells". J Cell Biol 77 : 148-164, 1978
- 2) Chen LL, Frank AM, Adams JC, Steinman RM : Distribution of horseradish peroxidase (HRP)-anti-HRP immune complexes in mouse spleen with special reference to follicular dendritic cells. J Cell Biol 79 : 184-199, 1978
- 3) Tew JG, Thorbeche GJ, Steinman RM : Dendritic cells in the immune response : characteristics and recommended nomenclature (a report from the reticuloendothelial society committee on nomenclature) . J Reticuloendothel 31 : 371-380, 1982
- 4) Hanna MGJr, Szakal AK : Localization of ¹²⁵I-labeled antigen in germinal centers of mouse spleen. Histologic and ultrastructural autoradiographic studies of the secondary immune reaction. J Immunol 101 : 949-962., 1968
- 5) Nossal GJV, Abott A, Mitchell J, Lummus Z : Antigen in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles J Exp Med 127 : 277-290, 1968
- 6) Kojima M : Macrophages, reticuloendothelial system and mononuclear phagocyte system. Recent Adv. RES Res, 16 : 1-25, 1978
- 7) 浅野重之 : リンパ節内 1 次小節構成細胞および 1 次小節の個体発生の電子顕微鏡的研究。日網会誌, 19, 121-143, 1979
- 8) Lennert K : Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Springer-Verlag Berlin : 1-71, 1978
- 9) Imai Y, Terashima K, Matsuda M, Dobashi M, Maeda K, Kasajima K : Reticulum cell and dendritic reticulum cell : Origin and function. Recent Adv. RES Res 21 & 22 : 51-81, 1983
- 10) Kamperdijk EWA, Raaymakers EM, de Leeuw JHS, Hoefsmit EchM : Lymph node macrophages and reticulum cells in the immune response. I. the primary response to paratyphoid vaccine. Cell Tiss. Res. 192 : 1-23, 1978
- 11) Heusermann U, Zurborn KH, Schroeder L, Stutte HJ : The origin of the dendritic reticulum cell. An experimental enzyme histochemical and electron microscopic study on the rabbit spleen. Cell Tissue Res 209 : 279-294, 1980
- 12) 土橋陸夫, 寺嶋一夫, 今井大 : リンパ小節内樹枝状細胞の起源と抗原捕捉機能に関する電顕的研究。日網会誌23 : 249-259, 1983
- 13) Dijkstra CD, Kamperdijk EWA, Döpp EA :

- The ontogenetic development of the follicular dendritic cell. An ultrastructural study by means of intravenously injected horseradish peroxidase (HRP)-anti- (HRP) complexes as marker. *Cell Tissue Res* 236 : 203-206, 1984
- 14) Imai Y, Dobashi M, Terashima K : Postnatal development of dendritic reticulum cells and their immune complex trapping ability. *Histol Histopathol* 1 : 19-26, 1986
 - 15) 前田邦彦 : Follicular Dendritic Cell(FDC)の分化と機能に関する細胞学的研究。日網会誌26 : 85-104, 1986
 - 16) Parawaresch MR, Radzun HJ, Feller AC, Peters KP, Hansmann ML : Peroxidase-positive mononuclear leukocytes as possible precursors of human dendritic reticulum cells. *J Immunol* 131 : 2719-2725 : 1983
 - 17) Szakal AK, Holmes KL, Tew JG : Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of non-phagocytic cells, including cells, with dendritic morphology. *J Immunol* 131 : 1714-1727, 1983
 - 18) Tew JG, Mandel TE, Phipps RP, Szakal AK : Tissue localization and retention of antigen in relation to the immune response. *Am J Anat* 170 : 407-420, 1984
 - 19) Swartzendrüber DC : Desmosomes in germinal centers of mouse spleen. *Exp cell Res* 40 : 429-432, 1965
 - 20) Klaus GGB, Humphrey JH : The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of B memory cells. *Immunol* 33 : 31-40, 1977
 - 21) Klaus GGB, Humphrey JH, Kunkl A, Dongworth DW : The follicular dendritic cell : Its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunol Rev* 53 : 3-28, 1980
 - 22) Mandel TE, Phipps RP, Abott A Tew JG : The follicular dendritic cell : long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev* 53 : 29-59, 1980
 - 23) Tew JG, Phipps RP, Mandel TE : The maintenance and regulation of the humoral immune response : persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as a accessory cells. *Immunol Rev* 53 : 175-201, 1980
 - 24) Tew JG, Phipps RP : Immune functions of dendritic-type cells. The reticuloendothelial system : a comprehensive treatise, vol. 6, Immunology, (ed.) Bellanti, J. A. and Herscovitz, H. B., Plenum press NY 67-85, 1984
 - 25) Humphrey JH : The function and origin of follicular dendritic cells. *Folia Microbiol* 30 : 184-190, 1985
 - 26) Stefanini, De Martino C, Zamboni L : Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216 : 173-174, 1967
 - 27) Graham RCJr, Karnovsky MJ : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 14 : 291-302, 1966
 - 28) Kaplan MH, Coons AH, Deane NW : Localization of antigen in tissue cells. III. Cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse. *J Exp Med* 91 : 15-29, 1950
 - 29) Dijkstra CD, van Tilburg NJ, Döpp EA : Ontogenetic aspects of immune-complex trapping in the spleen and popliteal lymph nodes of the rat. *Cell Tissue Res* 223 : 545-552, 1982
 - 30) Hoshi H, Kamiya K, Nagata H, Yoshida K, Aijima H : Formation of lymph follicles in draining lymph nodes after local injection of various antigenic substances in mice. *Arch histol jap* 49 : 25-37, 1986
 - 31) Stein H, Gerdes J, Mason DY : The normal and malignant germinal centre. *Clinics in Haematology* 11 : 531 : 559, 1982
 - 32) Jeurissen SHM, Dijkstra CD : Characteristics and functional aspects of nonlymphoid cells in rat germinal centers, recognized by two monoclonal antibodies ED5 and ED6. *Eur J Immunol* 16 : 562-568, 1986
 - 33) Heinen E, Braun M, Coulie PG, Van Snick J,

- Moeremans, M, Cormann N, Kinet-Denoël C, Simar LJ : Transfer of immune complexes from lymphocytes to follicular dendritic cells. *Eur J Immunol* 16 : 172, 1986
- 34) Braun M, Heinen E, Cormann N, Kinet-Denoël C, Simar LJ : Influence of immunoglobulin isotypes and lymphoid cell phenotype on the transfer of immune complexes to follicular dendritic cells. *Cellular Immunology*. 107 : 99-106, 1987
- 35) Papamichail M, Gutierreg C, Embling P, Johnson P, Holborow, EJ, Pepys MB : Complement dependence of localization of aggregated IgG in germinal centres. *Scand J Immunol* 4 : 343-347, 1975
- 36) Gerdes J, Stein H : Complement (C3) receptors on dendritic reticulum cells of normal and malignant lymphoid tissue. *Clin exp Immunol* 48 : 348-352, 1982
- 37) Humphrey JH, Grennan D : Isolation and properties of spleen follicular dendritic cells. *Adv exp Med Biol* 149 : 823-827, 1982
- 38) Heinen E, Lilet-Leclercq C, Mason DY, Stein H, Boniver J, Radoux D, Kinet-Denoël C, Simar LJ : Isolation of follicular dendritic cells from human tonsils and adenoids. II. Immunocytochemical characterization. *Eur J Immunol* 14 : 267-273, 1984
- 39) 山川光徳 : 甲状腺組織内リンパ濾胞の機能と構造に関する免疫組織化学的研究. *日網会誌* 25 : 15-32, 1985
- 40) 前多松喜 : リンパ濾胞樹枝状細胞における Clq の合成と免疫複合体の捕捉. 保持について. *日網会誌* 25 : 215-227, 1985
- 41) Imai Y, Yamakawa M, Masuda A, Sato T, Kasajima T : Function of the follicular dendritic cell in the germinal center of lymphoid follicles. *Histol Histopath* 1 : 341-353, 1986
- 42) Kasajima T, Sato T, Yamakawa M, Masuda A, Imai Y : Immunocytochemical study on the immune complex and germinal center of synovial tissue of rheumatoid arthritis with special regard to complement and follicular dendritic cells. *Acta Pathol Jpn* 36 : 839-855, 1986
- 43) 笠島武, 増田昭博, 佐藤隆司, 山田光徳, 山田幸雄, 島田誠, 岡田典子, 今井大 : リンパ濾胞胚中心内樹枝状細胞の免疫組織化学的検討—とくに補体・補体レセプターの局在を中心として—. *病理と臨床* 4 : 1201-1212, 1986
- 44) White RG, Henderson DC, Eslamy MB, Nielsen KH : Localization of a protein antigen in the chicken spleen. Effect of various manipulative procedures on the morphogenesis of the germinal center. *Immunology* 28 : 1-21, 1975
- 45) Tsunoda R, Yaginuma Y, Kojima M : Immunocytological studies on the constituent cells of the secondary nodules in human tonsils. *Acta Pathol Jpn* 30 : 33-57, 1980
- 46) Heinen E, Radoux D, Kinet-Denoël C, Moeremans M, De Mey J, Simar LJ : Isolation of follicular dendritic cells from human tonsils and adenoids. III. Analysis of their Fc receptors. *Immunology* 54 : 777-784, 1985
- 47) Radoux D, Kinet-Denoël C, Heinen E, Moeremans M, De Mey J, Simar LJ : Retention of immune complexes by Fc receptors on mouse follicular dendritic cells. *Scand J Immunol* 21 : 345-353, 1985