(平成11年4月30日受付)
(平成11年8月23日受理)

組織球性壊死性リンパ節炎におけるアポトーシス細胞の 性状ならびに発現機構について

—In situ endo-labeling および免疫組織学的検討—

小田島 肇¹⁾, 富永 邦彦²⁾, 浅野 重之³⁾
北條 洋¹⁾, 若狭 治毅⁴⁾, 阿部 正文¹⁾

- 1) 福島県立医科大学医学部病理学第一講座
- 2) 竹田総合病院病理科
- 3) いわき市立総合磐城共立病院病理科
- 4) 福島県立医科大学名誉教授

Characteristics of apoptotic cells and a possible activation mechanism
of apoptosis in histiocytic necrotizing lymphadenitis
— In situ endo-labeling and immunohistochemical study —

Hajime Odajima¹⁾, Kunihiko Tominaga²⁾, Shigeyuki Asano³⁾, Hiroshi Hojo¹⁾, Haruki Wakasa⁴⁾, Masafumi Abe¹⁾.

- 1) 1st. Department of Pathology, Fukushima Medical University, School of Medicine
- 2) Pathology Division, Takeda General Hospital
- 3) Pathology Division, Iwaki Kyoritsu General Hospital
- 4) Professor Emeritus, Fukushima Medical University

Histiocytic necrotizing lymphadenitis (HNL) is a benign, self-limiting disorder that is characterized histologically by proliferation of large blastoid T cells and histiocytes and by cell death showing karyorrhectic nuclear debris. Recent articles have shown that the main form of cell death in HNL is apoptosis though it remains unclear whether the apoptotic cells are CD4-positives T cells (helper/inducer T cells) or CD8-positive T cells (cytotoxic T cells). In addition, the mechanism of apoptosis in HNL has not been clarified. In the present study, to elucidate the cell type of apoptotic cells and the possible activation mechanism of apoptosis, 40 cases of HNL were analyzed using the TUNEL method and immunohistochemical and ultrastructural techniques. The large lymphocytes in the involved areas were mainly CD8-positive cells, while the majority of apoptotic cells detected by the TUNEL method were CD4-positive cells, and a small number of apoptotic cells were CD8-positive cells. B and NK cells were rarely seen in the involved areas. Double immunostaining revealed that many CD8-positive large lymphocytes expressed perforin and/or granzyme B and that the majority of CD4-positive small lymphocytes were positive for caspase 3 (CPP32), the farthest downstream apoptosis inducer, which is critical to induction, but not for bcl-2. The CD4/CD8 ratio in CPP32-positive cells inversely correlated with the duration from the onset to the pathologic diagnosis in 7 cases of short duration up to 20 days ($r = -0.76$, $p < 0.05$).

These findings suggest that in the early stage of HNL, the apoptosis of CD4-positive helper T cells is induced via the perforin and/or granzyme B pathway of activated CD8-positive cytotoxic T cells and that expression of caspase 3 (CPP32) and reduction of bcl-2 protein may be associated with the event of apoptotic cell death in HNL.

Key words | Histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi's disease), Apoptosis, Caspase family

はじめに

組織球性壊死性リンパ節炎 (histiocytic necrotizing lymphadenitis : HNL, Kikuchi's disease) は、1972年菊池¹⁾、藤本ら²⁾により初めて報告されて以来、国内外で多数の報告が見られ、国際的に独立した疾患単位として認められている^{3,4)}。本症は病因不明な反応性のリンパ節疾患で、臨床的には不明熱と頸部リンパ節腫脹を主徴とし、病理組織学的には傍皮質を中心とする大型リンパ球および組織球の増生と細胞壊死からなる壊死性病変を特徴とする。ときに、大型リンパ球の増生が著しいと悪性リンパ腫との鑑別が問題となる⁵⁾。

本症の壊死性病変に見られる大型リンパ球と細胞壊死はT細胞由来とされ、またこの細胞壊死はアポトーシス (apoptosis) によることが明らかにされてきている⁶⁾。しかし、本病変におけるアポトーシス細胞がCD4陽性T細胞 (helper/inducer型) か、CD8陽性T細胞 (suppressor/cytotoxic型) か議論の多いところであり^{7,8)}、また、アポトーシスの機序に関してもほとんど解明されていないのが現状である。

今回、私たちはHNLにおけるアポトーシス細胞の由来とアポトーシス発現機序を明らかにするため、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling (TUNEL) 法を用いた組織中のDNA断片化の検出、および免疫組織化学染色法、電顕酵素抗体法による各種アポトーシス関連抗原の発現を検討した。その結果、本病変の早期ではCD4陽性T細胞が顕著なアポトーシスを生じ、後期でもCD8陽性T細胞が軽度のアポトーシスを起こすことが示唆された。また、そのアポトーシスの発現機序には、CD8陽性T細胞によるパーフォリン/グランザイム依存性細胞障害経路の関与が示唆される若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

検索の対象は、当教室で組織学的に壊死性リンパ節炎と病理診断された40症例である。平均年齢は27歳 (9歳から53歳) で、男性23例、女性17例である。また、対照として非特異的リンパ節炎5例 (15歳~34歳、男性2例、女性3例) を用いた。

症例の生検リンパ節の最大断面を20%ホルマリン固定し、パラフィン包埋標本とした。新鮮 per-

iodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)⁹⁾で固定 (4°C, 4時間) 後、sucrose加phosphate bufferにて洗浄し、O. C. T compound (Miles, Elkhart, IN, USA) にて包埋、-80°Cにて保存した。

1. TUNEL 法

TUNEL法は、アポトーシスにおける特徴的なDNAの規則的な断片化の際に生じる3'OH末端を認識し、アポトーシスを生じた細胞を同定する際の一つの指標になる。核断片化を生じた壊死細胞 (necrosis) やDNA合成中の3'OH末端にも反応することが指摘されているが、DNAの規則的断片化を検出する簡便な手段として用いられている¹⁰⁾。生検リンパ節のパラフィン切片を脱パラフィン後、20μg/ml プロテアーゼK (Sigma, St. Louis, MO, USA, 室温15分)、2%過酸化水素 (Wako, Osaka, Japan, 室温5分) で前処理後、ApopTag (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) を使用して染色した。すなわち、Tris-HCl bufferに15秒浸透させた後、TdTとdigoxigenin-dUTPを加え37°C、1時間反応させた。その後、stop/wash bufferで37°C、30分洗浄後、anti-digoxigenin-peroxidaseを室温にて30分反応させた。発色は、0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液を用いた。核染にはメチルグリーンを用いた。

染色標本を鏡し、病変部を強拡大 (×400) で写真撮影し、スライドを投影してTUNEL法陽性核片数と全細胞数とを数え、百分率 (TUNEL法陽性率) を求めた。陽性の判定には、TUNEL法にて核あるいは核片に一致した茶褐色の反応を示すものを陽性細胞として数え、胞体のみに茶褐色の反応を示すものは除外した。

2. 免疫組織化学的方法

a. Streptavidin-biotin complex (strept-ABC) 法

ホルマリン固定パラフィン標本は2μm、PLP固定標本は3μmの連続切片を作成し、strept-ABC法を用いて免疫染色を施した¹¹⁾。すなわち、一次抗体を4°Cで一晩反応させた後、ビオチン化二次抗体 (DAKO A/S, Denmark)、ついでStrept ABC complex (DAKO A/S, Denmark) をそれぞれ室温、20分間反応させた。各反応後切片はPBSで十分に洗浄した。発色にはDAB溶液を用いた。発色後、ヘマトキシリンで核染し鏡した。免疫染色に

用いた一次抗体は表1に示した。パラフィン標本のCD3染色、CD8染色については病変部を強拡大で写真撮影し、スライドを投影してCD3、CD8各陽性細胞数を数えた。また、PLP固定標本に対してTUNEL法を施行した後、CD4、CD8染色を行い、TUNEL法陽性を示す細胞の性状を検討した。

アポトーシス関連抗体（パーフォリン、グランザイムB、Fas、Fasリガンド、Bcl-2、Bcl-X、Bax、CPP32、ICH1-L）の免疫染色については、染色標本を検鏡し病変中のアポトーシス細胞、大型リンパ球のそれぞれについて各抗体の陽性像を－(0%)、±(<20%)、+(≥20, <70%)、++(≥70%)の4段階に評価した。

h. 免疫二重染色法

症例のパラフィン標本について、CD8、CD20、CD68とCPP32との免疫二重染色を施した¹²⁾。まず、通常のstrept-ABC法を用いて1回目の抗体を反応させ、DABにて発色後、glycine-HCl buffer (pH2.2) で1時間処理した。再び通常のstrept-ABC法にて2回目の抗体を反応させ、4-chloro-1-naphtolにて発色した。水溶性封入材で封入した

後、2日以内に検鏡し、病変部を強拡大(×400)写真撮影した。得られたスライドを投影して病変中のCPP32陽性細胞数、CPP32陽性CD8陽性細胞数、CPP32陽性CD20陽性細胞数、CPP32陽性CD68陽性細胞数を数え、CPP32陽性細胞の由来を検討した。

3. 電顕酵素抗体法

PLP固定標本の5μm凍結切片について電顕酵素抗体法(pre-embedding法)を施した¹³⁾。まず、strept-ABC法にてCD4あるいはCD8の染色を施した。その後、1.25% glutaraldehydeにて固定した。過酸化水素を添加しないDAB溶液中に30分浸透の後、0.025%過酸化水素加DAB溶液にて発色した。0.1M cacodylate buffer (pH7.4)にて洗浄、30分間1% OsO₄にて後固定し、70%、80%、90%アルコール勾配各10分、100%アルコール10分2回、酸化プロピレン10分2回交換しプロピレンエポン(1:1)溶液中に一昼夜おいた。エポン支柱を作成し、その表面に反応させた試料をはりつけて60°Cでエポン樹脂を重合させ、超薄切片作成後、電子顕微

表1 使用抗体

Antibodies	Reactivity	Dilution	Source
CD3	Pan T	1:600	DAKO* ¹
CD4	Helper/inducer T	1:200	Becton-Dickinson* ²
CD8	Suppressor/cytotoxic T	1:50	Becton-Dickinson
CD20 (B1)	Pan B	1:100	Coulter Clone * ³
CD56	NK cell	1:300	Zymed* ⁴
CD57	NK cell	1:50	Becton-Dickinson
CD68 (KP-1)	Macrophage	1:50	DAKO
TIA-1	Activated T cell and NK cell	1:1000	Coulter Immunology* ³
Perforin	Pore forming protein	1:100	住友電工* ⁵
Granzyme B	Serine protease	1:20	Monogan* ⁶
CD95 (Fas)	Apoptosis induced protein	1:200	MBL* ⁷
Fas ligand	TNF family	1:200	Transduction-Laboratories* ⁸
Bcl-2	Apoptosis suppressing protein	1:50	DAKO
Bcl-x	Apoptosis suppressing protein	1:200	Carbiochem* ⁹
Bax	Apoptosis inducing protein	1:200	Carbiochem
CPP32	ICE protease family	1:1	Immunotech* ¹⁰
ICH1-L	Apoptosis inducing protein	1:1	Immunotech
TIAR	RNA-binding protein	1:2000	Transduction-Laboratories

*¹: Glostrup, Denmark

*³: Hialeah, FL, USA

*⁵: 大阪, 日本

*⁷: 名古屋, 日本

*⁹: Cambridge, MA, USA

*²: San Jose, CA, USA

*⁴: San Francisco, California, USA

*⁶: Uden, Netherlands

*⁸: Lexington, KY, USA

*¹⁰: Marseille, France

鏡 (JEM-100CX, JEOL) で観察した。

4. 統計学的検討

非特異的リンパ節炎とHNL病変部におけるTUNEL法陽性率の差の検定には、Cochran-Cox法を用いた。発熱、リンパ節腫脹などの自覚症状を確認できた日（初発日）からリンパ節生検されるまでの時間経過（臨床病日）とTUNEL法陽性率、免疫染色法による検討で得られた病変中のCD4、CD8陽性細胞数、あるいはCPP32陽性細胞中のCD4/CD8比との相関については、相関係数（ r ）を求め検定を行った。

結 果

検討したHNLの生検リンパ節全40症例で傍皮質を中心に病変が見られ、大型リンパ球、濃縮した核や断片化した核を有する縮小した細胞（アポトーシス細胞）、アポトーシス小体、およびアポトーシス小体を貪食したマクロファージ、組織球の出現が認められた。

1. TUNEL法

検討した18例の病変部にはすべて、TUNEL法陽性のアポトーシス細胞を認めた（図2a）。TUNEL法陽性率は、 $10.4 \pm 5.5\%$ （2.1-21.0%）であった。個々の症例のTUNEL法陽性率と発症からリンパ節生検までの時間経過（臨床病日）が確認された12症例の相関を検討した。経時的にTUNEL陽性率の低下傾向が見られたが、 $r = -0.31$ で優位の相関はなかった（図1）。対照として

図1 TUNEL法陽性率と臨床病日との関連性
TUNEL法陽性率の経時的な低下傾向が見られたが、有意の相関はない。（ $n=12$, $r=-0.31$ ）

用いた非特異的リンパ節炎5例では、胚中心のマクロファージに貪食された核片と傍皮質のアポトーシス細胞においてTUNEL法陽性像が散在性に認められた。胚中心のTUNEL法陽性率は $4.8 \pm 1.8\%$ 、傍皮質におけるTUNEL法陽性率は $0.3 \pm 0.2\%$ であり、HNLの病変部のTUNEL法陽性率と非特異的リンパ節炎傍皮質のTUNEL法陽性率には有意の差（ $p < 0.01$ ）が認められた。

2. 免疫組織学的検討（表2）

a. 非特異的リンパ節炎におけるアポトーシス関連抗原の免疫染色所見

対照として用いた非特異的リンパ節において、パーフォリンは、傍皮質の大型細胞の一部に顆粒状の胞体内陽性像を認めるに過ぎなかった。グランザイムBは傍皮質と胚中心の大型芽球様細胞の胞体内に顆粒状に陽性像を認めた。Fasは、ほぼすべての細胞の細胞膜領域に弱い陽性反応を認めた。Fasリガンド陽性の細胞はごく少数で、胞体内に顆粒状の陽性像を認めた。Bcl-2は胚中心の細胞を除き、マントル層や傍皮質のほとんどすべての細胞に陽性

表2 Apoptosis関連抗体の反応性

	HNL 病 巣		非特異的リンパ節炎傍皮質
	アポトーシス細胞	大型リンパ球	大型リンパ球
CD3	+	+	+
CD4	+	-~±	-
CD8	±	+	+
CD20 (B1)	±	±	±
CD56	-	-~±	-
CD57	-~±	±	±
CD68 (KP-1)	-	-	-
TIA-1	+	+	±
Perforin	±	+	±
Granzyme B	±	+	±
CD95 (Fas)	±	+	++
Fas ligand	±	±	±
Bcl-2	-	±	++
Bcl-x	-	-	-
Bax	-~±	-~±	-~±
CPP32	-	±	-
ICH1-L	-	-~+	+
TIAR*1	±	++	++

-: 陰性, ±: <20%陽性, +: ≥20, <70%陽性, ++: ≥70%陽性

*1: TIARは、アポトーシス細胞では胞体に、大型リンパ球では核に陽性。

を示した。Bcl-x¹⁴⁾は、観察したすべての細胞に陰性を示した。Bax¹⁵⁾は胚中心、傍皮質の一部大型リンパ球の胞体内に顆粒状に陽性を示した。CPP32は、胚中心の細胞と傍皮質中の形質細胞に陽性を示した。ICH1-L¹⁶⁾は、傍皮質と胚中心の多くの大型リンパ球の胞体に陽性を示した。TIAR¹⁷⁾は、胚中心・傍皮質においてほとんどの細胞の核に陽性を示した。また、濃縮した核を有する少数のアポトーシス細胞の胞体に陽性を示したが、核片には陽性像を認めなかった。

b. 壊死性病変部構成細胞の免疫表現型

—CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, CD57, TIA-1, CD68の免疫染色—

HNLの病巣は、主としてCD3陽性の大型リンパ球、アポトーシスを示すCD4陽性細胞とそれを貪食するCD68陽性のマクロファージ、組織球から構成されていた。大型リンパ球の多くはCD8陽性細胞であり(図2b)、CD4陽性細胞は少数であった。TIA-1は多くの大型リンパ球の胞体内とアポトーシス細胞やアポトーシス小体を貪食したマクロファージに陽性顆粒を認めた。アポトーシス細胞の多くはCD4陽性細胞であったが(図2c)、少数はCD8陽性細胞であった。TUNEL法とCD4あるいはCD8の二重染色では、アポトーシス細胞の多くはCD4陽性を示し(図2d)、少数はCD8陽性を示した(図2e)。病変には、その他にCD4陽性小型リンパ球が認められたが、CD20陽性細胞はほとんど認められなかった。CD57は400倍検鏡下で極少数のリンパ球に陽性を示したが、CD56陽性細胞の出現は極めてまれであった。パラフィン標本の病変部のCD3, CD8染色陽性細胞数と症例の発症からリンパ節生検までの時間経過との相関を検討したが、CD3陽性細胞数については、 $n=22$, $r=-0.53$ 、CD8陽性細胞については、 $n=22$, $r=-0.05$ と有意の相関は認められなかった。病変部のCD56陽性細胞とCD57陽性細胞はないか、あっても極少数であった。従って、病変部へのNK細胞の関与は統計的に無視できるものと判断された。そこで、各症例のCD3陽性細胞数からCD8陽性細胞数を引いた数をCD4陽性CD8陰性細胞数と仮想し、相関を検討したところ、 $n=22$, $r=-0.55$, $p<0.01$ と有意の負の相関を示した(図3)。

c. 壊死性病変部におけるアポトーシス関連抗体の免疫染色所見

パーフォリンは大型リンパ球の胞体内に顆粒状の陽性像を示した。グランザイムBはTIA-1と同様に、大型リンパ球の胞体内とアポトーシス細胞やアポトーシス小体を貪食したマクロファージに陽性顆粒を認め、小型リンパ球は陰性を示した(図4a, c)。Fasは大型リンパ球ならびに小型リンパ球に弱い陽性所見を示した。Fasリガンドは少数の症例で大型リンパ球の胞体に陽性顆粒を認めるのみであった。Bcl-2蛋白は、大多数の大型リンパ球および小型リンパ球で陰性を示した。Bcl-xは、大部分の症例で陰性であった。Baxは、極少数の大型リンパ球や組織球の胞体内に陽性であった。CPP32は、主として小型リンパ球と形質細胞の胞体に陽性を示したが、少数の大型リンパ球にも陽性を示した(図4b)。ICH1-Lは、極少数のアポトーシス細胞の胞体内に陽性を示した。また、少数の大型リンパ球、小型リンパ球の核と胞体にも陽性を示した。TIARはアポトーシス細胞以外の病巣に出現しているすべての細胞の核に陽性であった。なお、アポトーシス細胞では胞体にTIAR陽性を示すものを少数認めた。

d. 免疫二重染色所見

CD8とグランザイムBの免疫二重染色では、グランザイムB陽性細胞の多くがCD8陽性を示した(図4c)。CPP32とCD8の免疫二重染色では、病巣部にCPP32陽性細胞、CPP32陽性CD8陽性の細胞、CD8陽性細胞の3種類の反応性を示す細胞が観察された(図4d)。CPP32とCD20、CPP32とCD68のそれぞれの免疫二重染色では、CPP32陽性CD20陽性細胞やCPP32陽性CD68陽性細胞はほとんど認められなかった。このため病変中のCPP32陽性CD8陰性細胞はCPP32陽性CD4細胞を反映しているものと考えられた。CPP32陽性CD8陰性細胞数とCPP32陽性CD8陽性細胞数との比を求め、症例の発症からリンパ節生検までの時間経過との相関を検討した。検討した24例の相関係数は $r=0.19$ と低く、相関図にも全体として直線的な相関は見取ることが出来なかった(図5)。しかし、発症から20日未満の症例7例に限って相関を検討すると、 $n=7$, $r=-0.76$, $p<0.05$ と明瞭な有意の負の相関を認めた(図6)。

図2 TUNEL法とCD4, CD8の免疫染色

- a ; 病巣部 (写真右半分) には TUNEL 法陽性像 (茶褐色, 核) を多数認めるが, 非病巣部 (写真左半分) にはほとんど認められない. ($\times 210$)
- b ; 大型リンパ球 (矢印) は CD8 陽性を示す. ($\times 840$)
- c ; PLP 固定凍結切片を用いた CD4 染色では, 小型リンパ球とアポトーシス細胞の細胞膜 (矢印) に陽性像を認める. ($\times 840$)
- d ; TUNEL 法陽性細胞 (茶褐色, 核) や核片には CD4 (黒紫色, 細胞膜) 陽性 (矢印) を示す. ($\times 825$)
- e ; CD8 陽性 (黒紫色, 細胞膜) 細胞 (矢印) の極少数は, TUNEL 法陽性 (茶褐色, 核) を示す. ($\times 840$)

図3 CD4細胞数と臨床病日との関連性
各症例のCD3陽性細胞数からCD8陽性細胞数を引いた数をCD4陽性CD8陰性細胞数として、発症から生検までに要した日数(臨床病日)との相関を検討すると有意の負の相関を認める。(n=22, $r=-0.55$, $p<0.01$)

図4 グランザイム B, CPP32, CD8 の免疫単染色または免疫二重染色
a ; 大型リンパ球やアポトーシス細胞の胞体内 (矢印) に顆粒状のグランザイム B 陽性像を認める。(×840)
b ; 大型リンパ球は CPP32 陽性を示す。(×840)
c ; CD8 とグランザイム B の免疫二重染色。グランザイム B (黒紫色, 胞体内顆粒状) 陽性細胞の多くが CD8 (茶褐色, 細胞膜) 陽性 (矢印) を示す。(×840)
d ; 免疫二重染色では CD8 (茶褐色, 細胞膜) 陽性でかつ CPP32 (黒紫色, 胞体) 陽性の大型細胞 (矢印) が散見される。(×840)

図5 CPP32 陽性 CD4/CD8 陽性細胞と臨床病日との関連性

検討した24例において、CPP32陽性CD8陰性細胞数とCPP32陽性CD8陽性細胞数の比と臨床病日との間に明らかな相関は見られない。(n=24, $r=0.19$)

図6 発症から20日未満の症例のCPP32陽性CD8陰性細胞数とCPP32陽性CD8陽性細胞数の比と臨床病日との間に有意の負の相関を認める。(n=7, $r=-0.76$, $p<0.05$)

3. 電顕酵素抗体法

病変部から作成された超薄切片中にはアポトーシスの核形態像を示すCD4陽性細胞が認められた(図7a)。また、大型リンパ球はCD8陽性を示した(図7b)。

考 察

アポトーシス (apoptosis) は形態のみならず機能においてもネクローシス (necrosis) とは異なり、細胞分裂と表裏一体となって組織の細胞動態を制御する役割を果たしている¹⁸⁾。従って、その異常は発癌、AIDSなどのウイルス感染症、自己免疫疾

患、アルツハイマー病などの神経変性疾患、放射線障害などのさまざまな疾患の発症に強く関わっているとされる¹⁹⁻²¹⁾。最近、HNLの特徴的な壊死性病変はアポトーシスに起因していることが明らかにされているが、その発現機構あるいはその標的細胞に関しては不分明な点が多い。そこで私たちはまずHNLの壊死巣はアポトーシス病変であることを確認するとともにアポトーシスの標的細胞の同定を試みた。

TUENL法の成績ではHNL18症例のTUNEL法陽性率(TUNEL法陽性核断片と病変部有核細胞数の比)は平均10.4%で、非特異的リンパ節の傍皮質におけるTUNEL法陽性率0.3%に対し有意の高値を示した。このことは、アポトーシスがHNLの壊死性病変に深く関与していることを示唆しており、TUNEL法を用いた浅野²²⁾、Moriら²³⁾の報告と一致している。また、HNL病変におけるTUNEL陽性率は、臨床病日が進むとともに減少傾向が見られている。

HNLにおけるアポトーシス細胞の性状については論議のあるところであり、Liu Qら²⁴⁾は、アポトーシスに陥っている細胞は少数のCD8陽性細胞およびCD4陽性細胞で、その数はCD8陽性細胞が優位であると報告しているが、Asanoら²⁵⁾はCD4陽性細胞が主であると主張している。今回の検討では、壊死巣内に出現するリンパ球の多くは免疫組織学的にCD3陽性大型リンパ球であり、その大多数はCD8陽性細胞であった。一方、CD4陽性細胞は小型リンパ球と大多数のアポトーシス細胞であった。電顕酵素抗体法による観察でもアポトーシスの核形態像を示す細胞はCD4陽性細胞であり、CD8陽性細胞は大型リンパ球であり、上記の所見と一致していた。さらに抗CPP32単クローン抗体を用いた免疫二重染色の結果から、CPP32陽性細胞の大多数はCD4陽性T細胞であることが示唆された。CPP32はcaspase familyの一つで、アポトーシスの実行過程を担うシステインプロテアーゼカスケードを形成しているとされ、この中で最下流に位置づけられている^{26,27)}。CPP32は広い発現分布を示すが、特に免疫系の細胞で高発現しており、リンパ球系のアポトーシスに関与する重要な因子と考えられている²⁸⁾。従って、壊死巣内に認められるCPP32陽性細胞はアポトーシスと密接に関係している細胞とみなされる。これらの免疫染色の所見は、HNLの壊死巣内におけるアポトーシス細胞の主体は、

図7 免疫電顕像

a ; アポトーシス細胞。小型細胞の核はほぼ均一化しアポトーシスの所見とみなされる。細胞膜に CD4 陽性像が見られる。(×17,300) bar=1 μ m

b ; CD8 陽性細胞。核は大型で明瞭な核小体を有している。胞体も大きく、細胞内小器官に乏しい。(×7,410) bar=2 μ m

CD4 陽性細胞であることを示唆している。

パーフォリンは natural killer (NK) 細胞や細胞障害性 T 細胞の胞体内に存在し、 Ca^{2+} 依存性に細胞膜に渗透圧性融解をおこす pore-forming protein である²⁹⁾。グランザイム B はパーフォリン、グランザイム A と共に NK 細胞や細胞障害性 T 細胞の胞体内に存在するセリンプロテアーゼで、細胞のアポトーシスを誘導するとされる³⁰⁾。Mori ら²³⁾ は CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞が産生するパーフォリンおよびグランザイムによって T 細胞のアポトーシスが生じると報告しているが、CD4 陽性細胞がアポトーシス細胞になるかどうか不明である。私たちの検討でも、HNL 病変内の大型リンパ球は TIA-1、パーフォリン陽性を示し、免疫二重染色の結果、CD8 陽性大型リンパ球にグランザイム B 陽性を認めた。これらの所見は、CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞が HNL のアポトーシス病変に強く関与していることを示唆し、Asano²⁵⁾、Mori²³⁾ らの報告を支持するものである。今回の検討ではアポトーシス細胞の主体は CD4 陽性細胞であり、パーフォリン/グランザイム依存細胞障害経路を介して、CD8 陽性 T 細胞の脱顆粒により CD4 陽性 T 細胞がアポトーシスに陥り、その結果、グランザイムおよび TIA-1 陽性顆粒がマクロファージの細胞質内に残ったものと推測される。

一般に細胞障害性 T 細胞や NK 細胞はパーフォリン/グランザイム依存性細胞障害経路の他、Fas 依存性細胞障害経路によって標的細胞のアポトーシスを起こすとされている³¹⁾。Fas はアポトーシスを誘導する 45kd の膜蛋白で、細胞外領域は TNFR family と相同性を有し、細胞内領域には TNFR-1 と共通の death domain を有する³¹⁾。Fas リガンドは TNF ファミリーに属する 40kd の膜蛋白で、細胞障害性 T 細胞が持つことが知られている³²⁾。Ohshima ら³³⁾ は、免疫二重染色法や flow cytometry の分析から、TIA-1 陽性 CD8 陽性リンパ球は Fas ならびに Fas リガンドを有しているが、CD4 陽性細胞ではこれらの発現は極めてまれと報告した。そしてこれらのことから、CD8 陽性細胞が HNL のエフェクター細胞であり、かつ標的細胞であるとみなした。今回の検討では、HNL の壊死性病変の大型リンパ球の多くは弱い Fas 陽性を示したが、Fas リガンド陽性細胞はほとんど認められず、また CD4 あるいは CD8 陽性細胞が Fas リガンドを発現しているかどうか明らかに出来なかった。この Fas

リガンドの反応性の違いは、flow cytometry と immunohistochemistry という検出法の差異による可能性も推測された。従って、HNL における壊死性病変に Fas 依存性細胞障害経路のアポトーシスが関与しているかどうかは、今回の検討では明らかにすることは出来なかった。Bcl-2 蛋白はアポトーシス制御活性を有するとされ、ICE caspase の活性化を制御する³⁴⁾。HNL の壊死性病変では Bcl-2 蛋白陽性細胞は減少し、大型リンパ球および小型リンパ球の大多数は Bcl-2 蛋白陰性を示した。従って、HNL 病変では Bcl-2 蛋白によるアポトーシス抑制機構が働かず、アポトーシスに陥りやすい状態にあると推測される。

TUNEL 法陽性率の経時的な減少が伺われることから、アポトーシス細胞の動態を明らかにするため、アポトーシス細胞の免疫表現型と発症から生検診断までの臨床病日との関連を検討した。パラフィン標本でカウントした CD3 陽性細胞と発症から生検診断までの臨床病日との相関は、相関係数 $r = -0.53$ で時間経過と共に病巣の CD3 陽性細胞が減少する傾向を認めたが、CD8 陽性細胞数と臨床病日との相関係数は、 $r = -0.05$ で時間経過とは無関係であった。さらに、NK 細胞の関与は統計学的に無視出来る範囲と判断されることから、CD3 陽性細胞数から CD8 陽性細胞数を減じた値を CD4 陽性細胞と考え、臨床病日との相関を検討すると有意の負の相関を示した。このことは、HNL では CD4 陽性細胞がアポトーシスに陥り減少していくことを物語っている。さらに CPP32 陽性 CD4 陽性細胞と CPP32 陽性細胞の比を算出し、症例の発症から生検診断を受けるまでの臨床病日との相関を検討すると、臨床病日 20 未満の 7 例については、統計学的に有意の負の相関が認められた。これらの事実は、病初期においてアポトーシスにより CPP32 陽性 CD4 陽性細胞が迅速に減少し、CD4/CD8 比の低下を来すことを示唆している。一方、臨床病日 20 以降の症例では、CPP32 陽性細胞の CD4/CD8 比はむしろ高値で、平均値は 2.14、最高値は 5.0 である。CD4 陽性細胞の増殖が認められないことから考えると、これは CPP32 陽性 CD8 陽性細胞の減少に起因している可能性が高い。Jones ら³⁵⁾ によると血液細胞のパーフォリンに対する抵抗性は、多核白血球、CD56 陽性細胞、CD8 陽性細胞、CD19 陽性細胞、CD4 陽性細胞の順に減弱し、CD4 陽性細胞が最も感受性が高いとしている。このことも HNL の初期

に、CD4 陽性細胞がパーフォリン/グランザイム依存性細胞障害経路によってアポトーシスを起こし易いことを支持している。また、Kuo は³⁶⁾HNL 病変の CD8 陽性 T 細胞が 1 ないし 3 カ月をピークとして増加し、その後減少する傾向が見られたと報告している。今回の検討結果も、CPP32 陽性細胞の CD4/CD8 比の低下が臨床病日 20 日前後にピークを示し、その後上昇傾向にあることを示していることから、Kuo の報告を支持するものと考えられる。従ってこれらの所見は、HNL の病初期では CD4 陽性細胞が著しいアポトーシスを起こし、後に CD8 陽性細胞がアポトーシスを起こしている可能性を示唆する。

以上の結果から、HNL の壊死性病変の成立過程を推測してみると、HNL の病変初期は、何らかの抗原刺激あるいは病原体の感染を受けた T 細胞 (CD4 陽性細胞) を排除するために、CD8 陽性細胞 (細胞障害性 T 細胞) の増殖がおり、パーフォリン/グランザイム依存細胞障害経路によって、標的細胞である T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞) がアポトーシスに陥ると想定される。そして病変後期では、増殖した CD8 陽性細胞 (細胞障害性 T 細胞) の制御のために CD8 陽性細胞自身のアポトーシスがおり、病態が終息に向かうと推測される。

壊死性病変ではパーフォリン/グランザイム依存性細胞障害経路のみでなく、Fas 依存性細胞障害経路も関与している可能性は否定できない。壊死性病変におけるアポトーシスの機序については十分に解析されておらず、今後病因を含めた詳細な検討が必要と考えられる。

結 語

HNL の壊死性病変について、TUNEL 法、免疫染色法、電顕酵素抗体法をもちいて検討を加えた結果、以下の知見が得られた。

1. HNL の病変には TUNEL 法陽性の核断片が

多数認められ、病変形成にアポトーシスが関与していることが確認された。

2. HNL 病巣部の大型リンパ球様細胞の多くは CD8 陽性 T 細胞であり、アポトーシス細胞の大多数は CD4 陽性 T 細胞とみなされた。大型リンパ球様細胞はパーフォリンおよびグランザイム陽性を示すことから、CD8 陽性大型リンパ球様細胞がパーフォリン/グランザイム依存性細胞障害経路を介して CD4 陽性細胞のアポトーシスを起こすものと推察された。
3. HNL の病変部のアポトーシスは Bcl-2 蛋白の陰性化と CPP32 の発現が深く関与していると考えられた。
4. 発症から生検診断までの臨床病日とアポトーシス細胞の動態を検討してみると、HNL の病変では早期には CD4 陽性細胞の顕著なアポトーシスが生じ、後に CD8 陽性細胞もアポトーシスを起こしている可能性が示唆された。
5. 以上の成績から HNL の壊死性病変の成立過程を想定してみると、HNL の早期には、何らかの病原体の感染を受けた CD4 陽性 T 細胞を排除するため CD8 陽性 T 細胞の増殖が生じ、パーフォリン/グランザイム依存性細胞障害経路を介して CD4 陽性 T 細胞のアポトーシスを引き起こすと考えられた。そして後期において CD8 陽性 T 細胞はアポトーシスによって減少し、病態が終息に向かうと推測された。

謝辞：貴重な症例を快く御提供下さいました福島県内外の医療機関の諸先生方、ならびに限りない御援助を頂きました福島県立医科大学第一病理学教室員、技術員の皆様に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第38回日本リンパ網内系学会総会 (1998年、熊本)、第1回血液病理研究会 (1998年、福岡) にて発表した。

文 献

- 1) 菊池昌弘：特異な組織像を呈するリンパ節炎について、日血会誌 35 : 379-380 1972
- 2) 藤本吉秀, 小島 靖, 山口和克：頸部の亜急性壊死性リンパ節炎—新しい病態の提唱—。内科 30 : 920-927 1972
- 3) 若狭治毅, 木村伯子：小壊死巣を伴う特異なリンパ節炎—new disease entity—。日病会誌 62 : 138-139 1973
- 4) Nathwani BN, Brynes RK : Reactive immunoblastic proliferations. Semin. Diagn. Pathol 5 : 317-28 1988

- 5) Chamulak GA, Brynes RK, Nathwani BN : Kikuchi-Fujimoto disease mimicking malignant lymphoma. *Am J Surg Pathol* 14 : 514-23 1990
- 6) Felgar RE, Furth EE, Wasik MA, Gluckman SJ, Salhany KE : Histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi's disease) : in situ end-labeling, immunohistochemical, and serologic evidence supporting cytotoxic lymphocyte-mediated apoptotic cell death. *Mod Pathol* 10 : 231-41 1997
- 7) Asano S, Akaike Y, Jinnouchi H, Muramatsu T, Wakasa H : Necrotizing lymphadenitis : a review of clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural studies. *Hematol Oncol* 8 : 251-60 1990
- 8) Sumiyoshi Y, Kikuchi M, Takeshita M, Ohshima K, Masuda Y, Parwaresch MR : Immunohistologic studies of Kikuchi's disease. *Hum Pathol* 24 : 1114-9 1993
- 9) McLean IW, Nakane PK : Periodate-lysine paraformaldehyde fixative a new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 22 : 1077-1083 1974
- 10) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493-501 1992
- 11) Boon ME, Hendrikse FC, Kok PG, Bolhuis P, Kok LP : A practical approach to routine immunostaining of paraffin sections in the microwave oven. *Histochem J* 22 : 347-52 1990
- 12) Tominaga K, Yamaguchi Y, Nozawa Y, Abe M, Wakasa H : Proliferation in non-Hodgkin's lymphomas as determined by immunohistochemical double staining for Ki-67. *Hematol Oncol* 10 : 163-169 1992
- 13) Tsunoda R, Terashima K, Takahashi K, Kojima M : An ultrastructural study with enzyme-labeled antibody technique on immunoglobulin-containing cells in human tonsils, especially in germinal centers. *Acta Pathol Jpn* 28 : 53-75 1978
- 14) Foreman KE, Wrone-Smith T, Boise LH, Thompson CB, Polverini PJ, Simonian PL, Nunez G, Nickoloff BJ : Kaposi's sarcoma tumor cells preferentially express Bcl-xL. *Am J Pathol* 149 : 795-803 1996
- 15) Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ : Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74 : 609-619 1993
- 16) Van de Craen M, Van den Brande I, Declercq W, Irmeler M, Beyaert R, Tschopp J, Fiers W, Vandenabeele P : Cleavage of caspase family members by granzyme B : a comparative study in vitro. *Eur J Immunol* 27 : 1296-9 1997
- 17) Taupin JL, Tian Q, Kedersha N, Robertson M, Anderson P : The RNA-binding protein TIAR is translocated from the nucleus to the cytoplasm during Fas-mediated apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 : 1629-33 1995
- 18) Akbar AN, Salmon M : Cellular environments and apoptosis : tissue microenvironments control activated T-cell death. *Immunol Today* 18 : 72-76 1997
- 19) Manning FC, Patierno SR : Apoptosis : inhibitor or instigator of carcinogenesis ?. *Cancer Invest* 14 : 455-65 1996
- 20) Ameisen JC, Estaquier J, Idziorek T : From AIDS to parasite infection : pathogen-mediated subversion of programmed cell death as a mechanism for immune dysregulation. *Immunol Rev* 142 : 9-51 1994
- 21) Cotman CW, Su JH : Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 6 : 493-506 1996
- 22) 浅野重之, 小田島肇, 野沢佳弘, 富永邦彦, 阿部正文, 若狭治毅 : 反応性ならびに腫瘍性リンパ節におけるアポトーシス. *日網会誌* 35 : 237-46 1995
- 23) Mori N, Yatabe Y, Asai J, Nagasawa T : Immunohistochemical study of necrotizing

- lymphadenitis : a possible mechanism for apoptosis involving perforin and granzyme-producing cytotoxic T cells. *Pathol Int* 47 : 31-7 1997
- 24) Liu Q Ohshima K, Shinohara T, Kikuchi M : Apoptosis in histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Pathol Int* 45 : 729-34 1995
- 25) Asano S, Kanno H, Tominaga K, Muramatsu T, Nozawa Y, Akaike Y, Segami H, Wakasa H : Necrotizing lymphadenitis. Electron microscopical and immunohistochemical study. *Acta Pathol Jpn* 37 : 1071-84 1987
- 26) Harvey NL, Butt AJ, Kumar S : Functional activation of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) is an early process in apoptosis. *J Biol Chem* 272 : 13134-9 1997
- 27) Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, et al : Yama/CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a crmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81 : 801-809 1995
- 28) Alnemri TF, Litwack G, Alnemri ES : CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *J Biol Chem* 269 : 30761-30764 1994
- 29) Trapani JA, Smyth MJ, Apostolidis VA, Dawson M, Browne KA : Granule serine proteases are normal nuclear constituents of natural killer cells. *J Biol Chem* 269 : 18359-65 1994
- 30) 中嶋啓雄, 岡 隆宏 : Granzymes, Fas-ligand and apoptosis : 感染炎症免疫 25 : 228-235 1995
- 31) Nagata S. : Apoptosis mediated by the Fas system. *Prog Mol Subcell Biol* 16 : 87-103 1996
- 32) Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S : Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 14 : 1129-1135 1995
- 33) Ohshima K, Shimazaki K, Kume T, Suzumiya J, Kanda M and Kikuchi M : Perforin and Fas pathways of cytotoxic T-cells in histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Histopathol* 33 : 471-478 1998
- 34) Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y : Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* 12 : 2251-2257 1996
- 35) Jones J, Morgan BP : Comparative susceptibility of peripheral blood leukocytes and related cell lines to killing by T-cell perforin. *Immunol* 82 : 555-560 1994
- 36) Kuo TT : Kikuchi's disease (histiocytic necrotizing lymphadenitis). A clinicopathologic study of 79 cases with an analysis of histologic subtypes, immunohistology, and DNA ploidy. *Am J Surg Pathol* 19 : 798-809 1995