

原 著

扁桃組織における免疫学的応答

第一篇 扁桃組織における免疫グロブリン産生細胞の動態

河原田 和 夫

信州大学医学部耳鼻咽喉科学教室

IMMUNOLOGICAL RESPONSE OF TONSIL I. DYNAMIC REACTION OF TONSILLAR IMMUNOGLOBULIN PRODUCING CELL

Kazuo KAWARADA

Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine,
Shinshu University

KAWARADA, K. *Immunological response of tonsil. I. Dynamic reaction of tonsillar immunoglobulin producing cell.* Shinshu Med. J., 27: 428-433, 1979

For the purpose of analysing tonsillar immunological responses in upper respiratory infection, tonsils of 19 adult patients with acute pharyngitis were investigated by immunofluorescent staining method. The number of cell containing immunoglobulins (IgA, IgG and Secretory IgA) increased significantly after 5 to 9 days from the onset of pharyngeal pain. These results proved that tonsillar immunoglobulin producing cells responded to the infection, and suggested a valuable immunological function of the tonsil.

(Received for publication; April 12, 1979)

Key words: 扁桃 (tonsil)

免疫グロブリン産生細胞 (immunoglobulin producing cell)

I 緒 言

扁桃はリンパ節の一種であり、古くから免疫に関する器官であると考えられていたが、近年の免疫学の進歩により、ようやくその機能が明らかになりつつある。すでに免疫グロブリン IgG, IgA, IgM, IgD および IgE 産生細胞が扁桃に存在することが確認され¹⁾、さらに局所免疫上、重要な因子である分泌性 IgA が、扁桃腺窩上皮から分泌されるとの報告もある²⁾。

しかし、これらの免疫グロブリン産生細胞が、感染の際にどう応答するかについては、まだ明らかにされていない。扁桃は、ワルダイエル輪を形成しており、経鼻、経口いずれの感染においても、侵入抗原に対し

最初に応答すると予想されるので、扁桃の免疫学的機能を解明するためには、種々の感染に際しての扁桃組織の応答を動的にとらえることが重要である。

著者は、このような見地から急性咽頭炎の扁桃における免疫グロブリン産生細胞を蛍光抗体法により検索したところ、IgG, IgA および分泌性 IgA のいずれの産生細胞も、炎症がすすむにつれて増加したので、抗原刺激に対する扁桃組織の免疫学的応答と考えた。

II 材料および方法

対象：症例は、1971年7月から10までの間、坂総合病院（宮城県塩釜市）耳鼻科において、急性咽頭炎

あるいは急性扁桃炎と診断し、約2週間の観察をしえた19例で、いずれも20才以上の成人であった。

臨床所見：既往歴には、易感染傾向、鼻アレルギー、糖尿病、肝疾患、副腎皮質ホルモン剤の服用などはなかった。主訴は、咽頭痛、嚥下病で多くは発熱、鼻汁、鼻閉塞などの感冒症状をともなったが、咽頭所見については、咽頭発赤は必ずしも認められず、上咽頭粘膜や口蓋垂の発赤、腫脹をともなるものであった。

咽頭ぬぐい液を、血液寒天培地に接種し、溶連菌感染ではないことを確認した。

材料の採取：咽頭痛を訴えた日を第1病日とし、症例毎に病日を遡って一回、扁桃の部分切除（大きさ、約 $1 \times 1 \times 2 \text{mm}^3$ ）を行い、切除資料は -70°C に保存した。

抗分泌性IgA標識抗体の調整：Tomasiら⁴⁾の方法にもとづき次の様に行った。

(a) 分泌性IgAの抽出：

人初乳の採取：分娩後2～3日目の産婦10人から、約100mlずつの初乳を採取して、35,000回転、60分遠心し、脂肪と沈澱物を除去した。

塩析⁵⁾：得られた初乳100mlに、等量の0.01M pH 7.4の磷酸緩衝食塩水（以下PBSと略す）で2倍に稀釈し、200mlの飽和硫酸を攪拌しながら徐々に加え、60分放置した。6,000回転、15分遠心上清をすて、沈澱物をPBSでとかし全量を100mlとした。さらに攪拌しながら飽和硫酸25mlを加え、20%飽和にし、6,000回転、15分遠心し沈澱物を除去した。上清液に、飽和硫酸25mlを加え、33%飽和にし、遠心後最終の沈澱物を10mlのPBSにとかし、透析により脱塩した。

電気泳動⁶⁾：透析した試料を、ブロック型ゾーン電気泳動装置で、ジャガイモデンプンを支持体として、ベロナール緩衝液を用い、 4°C で、 $1 \text{mA}/\text{cm}^2$ の電流を20時間流した。

カラムクロマトグラフィー⁷⁾：電気泳動により分離した γ グロブリン分画を、0.01M PBSにより一夜透析し、洗浄したdiethylaminoethanol salicylate (DEAE) セルロース15gを用い、直径2cmのクロマト管に高さ23cmのカラムにしたものを重上した。溶出液は、pH 7.5 0.01M, pH 6.4 0.1M, pH 4.7 0.3 Mの3種のPBSで段階的に溶出した。流速30ml/時で、紫外線吸収装置で監視しながら、フラクションコレクターにより5mlずつ採取した。

このようにして得た試料を、0.01M PBSで透析したあと、IgMを分離するために、セファデックスG-200カラムクロマトグラフィー⁸⁾により、0.14M NaClで溶出した。

溶出した試料に、IgGおよびIgMが混在せず、IgAのみより成ることを、抗IgG、抗IgMおよび抗IgA血清(Hyland Lab.)を用い、Ouchterlony法⁹⁾により確認した。

(b) 抗血清の調整：

免疫方法：セファデックスG-200で溶出した最終試料に生理食塩水を加え1%溶液とし、Freundのcomplete adjuvantを等量加えたものを家兎の皮内に0.2mlずつ4ヶ所に接種した。同様の方法で、2週間々隔でさらに2回接種し、2週間後に採血した。

抗血清の精製：得られた抗血清を、ベンズジオンズ蛋白、精製IgGで吸収、免疫電気泳動法¹⁰⁾により、1本のIgA沈降線のみを生ずる特異抗血清となるよう精製した。

(c) 蛍光抗体の調製¹¹⁾：

標識¹²⁾：得られた抗血清10mlにfluoresceiniso-thiocyanate (FITC) 6mgをふくむ1ml炭酸緩衝液をまぜあわせ、セファデックスG-25で濾過し、流出のはやいバンドのみを集め、ついでDEAEカラムクロマトグラフィーにかけ、未標識蛋白を完全に除去し精製した。

力価：得られた標識抗血清を、前述したOuchterlony法により同様の操作を行い、IgGやIgMが混在していないことを確かめ、力価の測定に供した。

慢性扁桃炎患者の摘出扁桃を用いて染色し、80倍まで特異蛍光を証明しえたが、実験には20倍のものを使用した。この際、非特異蛍光はみられなかった。

蛍光抗体法：抗IgG、抗IgA(Hyland Lab.)および前述の自家製抗分泌性IgAを、それぞれ1:80、1:20および1:20に稀釈して使用した。

抗分泌性IgA抗体には、抗IgAと抗transport piece抗体の両者がふくまれているので、抗IgAで染色されず、自家製抗分泌性IgAでのみ染色される場合には、transport piece産生細胞と考えられる。しかし、今回の実験では、その点を区別せず、自家製抗分泌性IgAで染色されたものは、分泌性IgA産生細胞とみなした。

組織切片を、 -20°C のクリオスタットで、4～6 μ の厚さに細切し、カバーガラスに直接貼付し、風乾後アセトンで室温10分間固定した。

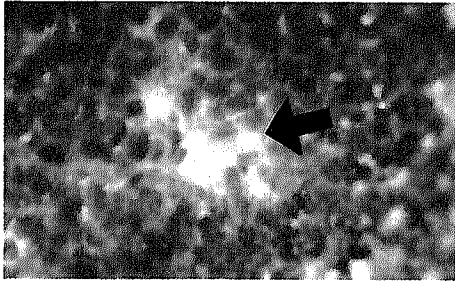


図 1

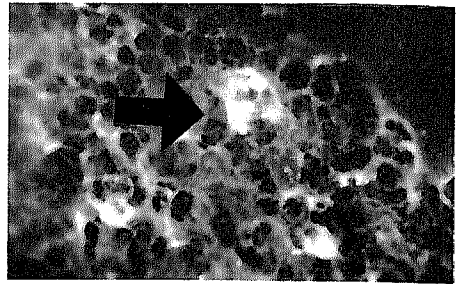


図 6

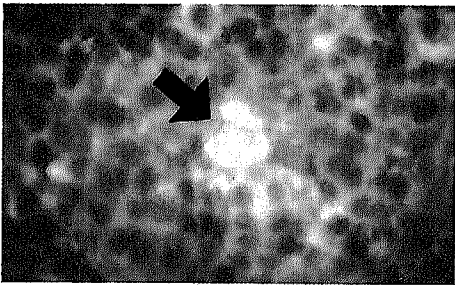


図 2

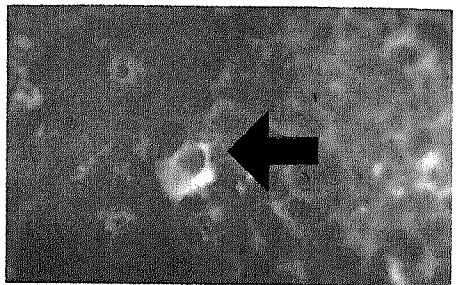


図 7

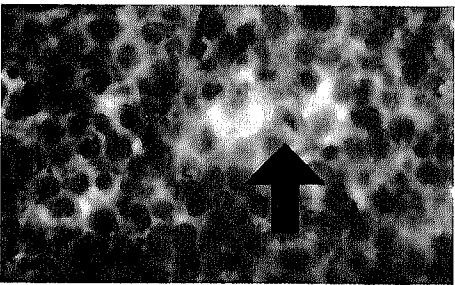


図 3

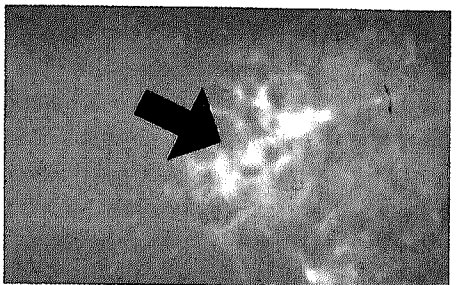


図 8

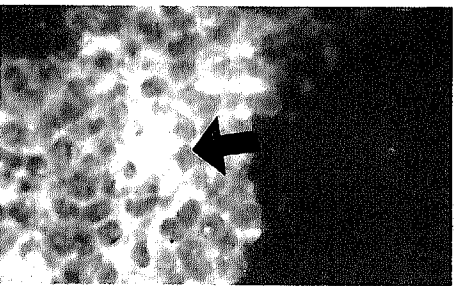


図 4

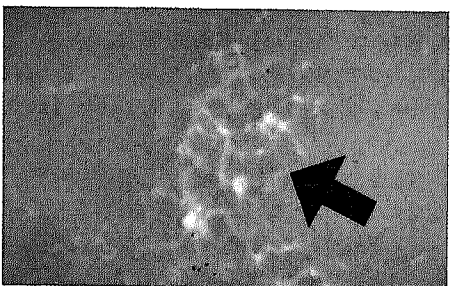


図 9

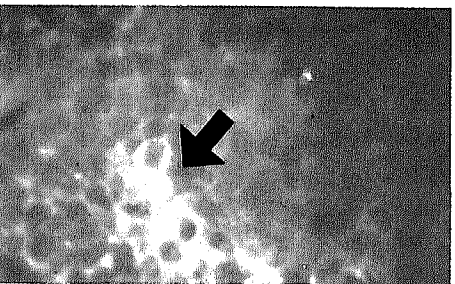


図 5

- 図 1 抗 IgG 陽性細胞 1°
- 図 2 抗 IgG 陽性細胞 2°
- 図 3 抗 IgG 陽性細胞 3°
- 図 4 抗 IgA 陽性細胞 1°
- 図 5 抗 IgA 陽性細胞 2°
- 図 6 抗 IgA 陽性細胞 3°
- 図 7 抗分泌性 IgA 陽性細胞 1°
- 図 8 抗分泌性 IgA 陽性細胞 2°
- 図 9 抗分泌性 IgA 陽性細胞 3°

扁桃組織における免疫学的応答

染色法は、蛍光抗体を 37°C, 30分反応させ PBS で 10分間洗浄し、さらに純水に適したあと、50%グリセリン食塩水で封入した。

千代田光学製の FM200 A 型蛍光顕微鏡により、UV 励起方式、400倍率で観察し、陽性細胞数により、下記のごとく 0°~3° までの判定基準をつくった。

- 0°: まったく陽性細胞がない。
- 1°: 全視野に数個の陽性細胞。
- 2°: 1視野に 1~3 個の陽性細胞。
- 3°: 1視野に数個以上の陽性細胞。

Ⅲ 成 績

上気道感染の際、扁桃における免疫グロブリン産生細胞の動態を知るために、抗 IgG, 抗 IgA および抗分泌性 IgA 蛍光抗体を用い、対応する陽性細胞の分布を観察した

抗 IgG 陽性細胞についてみると、第 3 例 (第 4 病日, 図 1) の germinal center の周縁に、唯 1 個の陽性細胞がみられ、他の視野にも、陽性細胞は少なかった (判定基準: 1°)。

第 10 例 (第 7 病日, 図 2) では、germinal center の周縁に、あきらかな陽性細胞がみられ、そのまわりにも弱い蛍光を発する数個の細胞がみられた (判定基準: 2°)。

第 14 例 (第 8 病日, 図 3) では、germinal center の周縁に、あきらかな陽性細胞が数個みられるとともに、蛍光を発する細胞がふえてみられた (判定基準: 3°)。

抗 IgG による陽性細胞に関して集約すると、図 10-a のごとく、第 1~4 病日 6 例中、1°: 3 例, 2°: 3 例, 第 5~9 病日 9 例中、2°: 6 例, 3°: 3 例, 第 10 病日以降 4 例中、1°: 2 例, 2°: 1 例, 3°: 1 例であった。

抗 IgA の陽性細胞についてみると、第 4 例 (第 4 病日, 図 4) では、上皮下の間質にある形質細胞と思われるものが蛍光を発した (判定基準: 1°)。

第 10 例 (第 7 病日, 図 5) は、上皮下というよりは、germinal center のまわりに、形質細胞と思われる陽性細胞が集団をなした (判定基準: 2°)。

第 11 例 (第 8 病日, 図 6) は、上皮下の陽性細胞がふえ、一部上皮まで達する細胞もみられた (判定基準: 3°)。

抗 IgA による陽性細胞に関してまとめると、図 10-b のごとく、第 1~4 病日 6 例中、1°: 4 例, 2°: 2

例, 第 5~9 病日 9 例中、1°: 2 例, 2°: 3 例, 3°: 4 例, 第 10 病日以降 4 例中、1°: 1 例, 2°: 2 例, 3°: 1 例であった。

抗分泌性 IgA による陽性細胞については、第 2 例 (第 3 病日, 図 7) は、くずれかかっている上皮に 1 個の陽性細胞がみられた (判定基準: 1°)。

第 5 例 (第 8 病日, 図 8) は、上皮および上皮下の細胞が、部分的に染め出された (判定基準: 2°)。

第 9 例 (第 6 病日, 図 9) は、上皮および上皮下の細胞の多くが染め出された (判定基準: 3°)。

抗分泌性 IgA による陽性細胞に関してまとめると、図 10-c のごとく、第 1~4 病日 6 例中、1°: 3 例, 2°: 2 例, 3°: 1 例, 第 5~9 病日 9 例中、2°: 3 例, 3°: 6 例, 第 10 病日以降 4 例中、1°: 2 例, 2°: 1 例, 3°: 1 例であった。

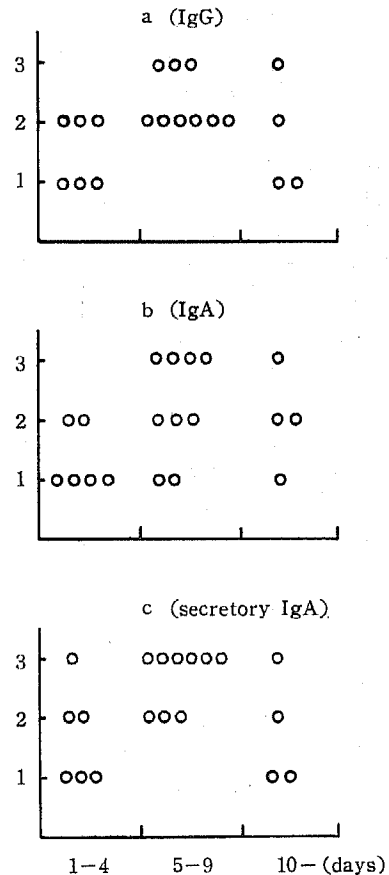


図 10 急性咽喉炎における免疫グロブリン産生細胞の動態

以上の如く、検索した三種の免疫グロブリン産生細胞は、いずれも第5～9病日に増加していることが確認された。このことは、急性咽頭炎の急性期に、扁桃組織が侵入抗原に対し、免疫学的に反応していることを示している。

IV 考 察

本実験の結果を評価するにあたって、第一に考えなければならないのは、対象とした患者の診断である。急性咽頭炎という診断は、あくまでも臨床診断であって、病因診断ではないから、いろいろの病因が含まれると考えられ、免疫学的反応もまた多様でありうる。

したがって、病原体を証明したうえで、病因診断を確実にし、それに対応した扁桃の反応を調べるのが、本来の方法であるが、今回は前段階として、まず概括的にこの問題をとらえてみようということ、臨床診断の枠の中で、特異抗体の反応としてではなく、広く免疫グロブリン産生細胞の反応として、実験を組み立てた。

その結果、IgG、IgA および分泌性 IgA いずれの産生細胞も、第5～9病日に有意に増加していることが判明した。逆に、臨床診断の急性咽頭炎は、たしかに扁桃の免疫グロブリン産生細胞に抗原刺激を与えるような感染であったことが判明したといえる。

このように、気道感染に反応して、扁桃が抗体を産生することを、著者も明らかにしたが、この扁桃由来の抗体は、どのように働くのであろうか。

ライノウイルスあるいはインフルエンザウイルスの実験感染において、鼻咽腔洗浄液中に検出される分泌性 IgA が、感染防禦に重要な役割を果している¹³⁾¹⁴⁾が、扁桃が分泌性 IgA の産生器官として主動的役割を果しているかどうか興味ぶかいところである。Ogra and Karzon¹⁵⁾は、ポリオ生ワクチン接種後の鼻咽腔洗浄液中の IgA 抗体を検索し、小児においては扁桃摘出により、この分泌性 IgA 抗体の産生が低下する事実を認めており、IgA 機構の中での扁桃の重要性を示している。

また IgG 抗体も、急性気道感染の際、鼻咽腔洗浄液中に検出されている。Butler ら¹⁶⁾は、ライノウイルスおよびコクサッキーウイルスの実験感染において、感染初期の鼻咽腔分泌液中にみられる IgG は、感染局所で産生されると報告しており、この事実は本実験結果とよく符合する。この点でも扁桃が重要な役

割を果していることが示唆された。

しかしながら、今までのところ、扁桃の免疫機能に関する動態的研究は、いずれも間接的な証明にとどまっており、直接的な証明は、今後に残された問題である。

V 結 語

急性気道感染において扁桃の免疫学的反応を動的にとらえることを目的として、急性咽頭炎と診断した19例の扁桃組織の小切片を、蛍光抗体法により検索した。

IgG、IgA および分泌性 IgA 産生細胞を染色し、病日とそれらの細胞との量的関係をみたところ、いずれも第5～9病日に陽性細胞がふえた。

扁桃の免疫グロブリン産生細胞は、急性咽頭炎の際、発病後第5～9日にあきらかにふえたことから、感染に反応していることが判明し、急性気道感染において、扁桃が免疫学的に重要な働きをしていることが示唆された。

東北大学医学部石田名香雄教授の御助言に深謝する。

本論文の要旨は、日本耳鼻咽喉科学会第73回学術講演会(1972. 5., 岐阜市)において発表した。

文 献

- 1) Crábbe, P. A. and Heremans, J. F.: Distribution in human nasopharyngeal tonsils of plasma cells containing different types of immunoglobulin polypeptide chains. *Lab. Invest.*, 16: 112-123, 1967
- 2) Tada, T. and Ishizaka, K.: Distribution of rE forming cells in lymphoid tissues of the human and monkey. *J. Immunol.*, 104: 377-387, 1970
- 3) Rossen, R. D., Morgen, C., Hsu, K. C., Butler, W. I. and Rose, H. M.: Localization of IIs external secretory IgA by immunofluorescence in tissues lining the oral and respiratory passages in man. *J. Immunol.*, 100: 706-717, 1968
- 4) Tomasi, T. B. Jr., Tan, E. M., Solomon, A. and Prendergast, R. A.: Characteristics of an immune system common to certain ex-

- ternal secretion. *J. exp. Med.*, 121 : 101-124, 1965
- 5) 中村 宏, 尾上 薫 : 抗体の精製. 免疫の生化学, p. 181, 共立出版, 東京, 1967
 - 6) Kunkel, H. G. and Trautman, R. : Zone electrophoresis in various types of supporting media. In "electrophoresis. Theory, Methods and Applications." (Bier, M. ed.) pp. 225-227, Academic Press Inc. New York, 1960
 - 7) Sober, H. A., Gutter, F. J., Wychoff, M. M. and Peterson, E. A. : Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum proteins of an ion-exchange cellulose. *J. Amer. chem. Soc.*, 78 : 756-763, 1956
 - 8) Flodin, P. and Killander, J. : Fractionation of human-serum proteins by gel filtrations. *Biochim. biophys. Acta.*, 63 : 403-410, 1962
 - 9) Ouchterlony, O. : Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 5 : 1-15, 1955
 - 10) Heremans, J. F. and Hereman, M. Th : Immunoelectrophoresis. *Acta. med. scand., Suppl.*, 367 : 27-50, 1961
 - 11) 川村明義, 川島豊作, 塩入康平 : 蛍光抗体と非特異反応. *最新医学*, 17 : 2739-2746, 1966
 - 12) Riggs, J. L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J. H., Downs, C. M. and Metcalf, T. G. : Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Amer. J. Path.*, 34 : 1081-1098, 1958
 - 13) Douglas, R. G., Rossen, R. D., Butler, W. T. and Couch, R. B. : Rhinovirus neutralizing antibody in tears, parotid saliva, nasal secretions and serum. *J. Immunol.*, 99 : 297-303, 1967
 - 14) Rossen, R. D., Butler, W. T., Waldman, R. H., Alford, R. H., Hornick, R. B., Togo, Y. and Kasal, J. A. : The proteins in nasal secretions. II. A longitudinal study of IgA and neutralizing antibody levels in nasal washings from men infected with influenza virus. *J. Amer. med. Ass.*, 211 : 1157-1161, 1970
 - 15) Ogra, P. L. and Karzon, D. T. : Formation and function of poliovirus antibody in different tissues. *Progr. med. Virol.*, 13 : 156-193, 1971
 - 16) Butler, W. T., Waldman, T. A., Rossen, R. D., Douglas, R. G. and Couch, R. B. : Changes in IgA and IgG concentrations in nasal secretions prior to the appearance of antibody during viral respiratory infection in man. *J. Immunol.*, 105 : 584-591, 1970

(54. 4. 12 受稿)