

氏名(本籍) 福 島 浩 平
学位の種類 医 学 博 士
学位記番号 医 第 2 2 7 8 号
学位授与年月日 平 成 3 年 2 月 27 日
学位授与の条件 学位規則第5条第2項該当
最終学歴 昭 和 59 年 3 月 27 日
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Immunohistochemical characterization, Distribution and Ultrastructure of Lymphocytes Bearing T Cell Receptor Gamma/Delta in Inflammatory Bowel Disease.
(炎症性腸疾患における $\gamma\delta$ 型T細胞の分布と超微形態について)

(主 査)
論文審査委員 教授 松 野 正 紀 教授 京 極 方 久
教授 橋 武 彦

論文内容要旨

末梢血およびリンパ装置に分布するCD3陽性T細胞の抗原リセプターは、大多数が $\alpha\beta$ ヘテロダイマーからなり、これらは抗原認識の上で重要な役割を演じている。近年抗原リセプターに $\gamma\delta$ 鎖を有するT細胞が発見され、腸管粘膜における免疫反応に重要な役割を果たしていることが示唆されている。本論文は、病態の形成に免疫学的側面が深くかかわっているとされる炎症性腸疾患、すなわちCrohn病と潰瘍性大腸炎における $\gamma\delta$ 型T細胞の存在様式について免疫組織化学的に検討を行なったものである。

【対象および方法】

対照群11例、Crohn病10例、潰瘍性大腸炎8例の手術摘出標本より $5\times 10\text{mm}$ の全層性の組織を採取し、速やかにperiodate-lysine-2% paraform-aldehyde液にて 4°C 、6時間固定した。厚さ 6μ の凍結切片を作製し、光顕免疫組織染色では、Biotin-Streot Avidin Immunostaining system (BioGenex Laboratory社)を用い、表面マーカーの検索では二重染色法を行なった。また、 δ 鎖陽性細胞の超微形態を観察する目的で、Preembedding methodによる電顕酵素抗体法を行なった。

陽性細胞の定量化を行なうために、粘膜固有層内リンパ球は単位面積(1mm^2)あたりの陽性細胞数を求め、上皮細胞内リンパ球は上皮細胞1000個あたりの陽性細胞数を算出した。

使用したモノクローナル抗体は、CD3 (Leu 4), CD4 (Leu 3 a), CD8 (Leu 2 a), TCR δ 1, β F1である。

【結 果】

δ 鎖陽性細胞とCD3陽性細胞との比でみると、大腸上皮細胞間では対照群(36%)と比較し、潰瘍性大腸炎(8%), Crohn病(13%)と δ 鎖陽性細胞の減少が認められた。また粘膜固有層では、対照群(15%)と比較しCrohn病回腸において著しく減少していた(4%)。一方、 δ 鎖陽性細胞はびらん形成部位やリンパ濾胞T細胞領域および類上皮細胞性肉芽腫の周囲において β 鎖陽性細胞を含めた他の炎症性細胞と共に集積する所見が認められた。表面マーカーの特徴として、大腸粘膜固有層の δ 鎖陽性細胞は対照群(80%), Crohn病(59%)ではCD4(-)CD8(-)が主体であるのに対し、潰瘍性大腸炎ではほとんど認められなかった(3%)。さらに、Crohn病リンパ濾胞T細胞領域においてpostcapillary venule内に、CD4(-)CD8(-)の δ 鎖陽性細胞が認められた。超微形態からみると、対照群と炎症性腸疾患群では相違がみられ、前者では

細胞質にelectron-opaque granuleの発達が、後者でvesicular structureの発達が認められた。

【考 察】

本論文の最も重要な点は、炎症性腸疾患における $\gamma\delta$ 型T細胞の存在様式を初めて明らかにしたことである。

マウス腸管では上皮細胞間に存在するCD8 (+) $\gamma\delta$ 型Tリンパ球が外来抗原の刺激のもとで活性化され細胞障害性を獲得しているとの報告がある。また本細胞が、上皮細胞層において外来抗原の侵入や悪性化に対するサーベイランスシステムの重要な因子であることも指摘されている。従って、炎症性腸疾患とくに潰瘍性大腸炎にみられる上皮での δ 鎖陽性細胞の減少は、外来抗原に対する防御能の低下を招来する可能性がある。また、粘膜固有層における潰瘍性大腸炎とCrohn病との間での δ 鎖陽性細胞の表面マーカーの相違は、両疾患の病態の相違を反映している可能性がある。

近年、 $\gamma\delta$ 型T細胞が骨髄由来の単球の集積と接着を惹起し肉芽腫形成に重要な役割を有するとの報告があるが、Crohn病の類上皮細胞性肉芽腫周囲にも本細胞が認められたことは興味深い。

また、従来よりMycobacteriumとCrohn病との関係については議論があるが、実験的には $\gamma\delta$ 型T細胞がMycobacterium刺激下で増殖するとされている。今回の検討では、Crohn病で δ 鎖陽性細胞の増加は認められず、Mycobacterium感染がCrohn病発症と密接な関係があるとの説を支持する結果は得られなかった。しかし、逆に本細胞が増加しないことがCrohn病の発症や慢性化に関与する可能性も考えられ今後の検討が必要である。

超微形態についてみると、対照群と炎症性腸疾患群で顆粒の形態について差が認められた。large granular lymphocyteでは、顆粒の発達段階とその形態が密接な関係にあるとされ、その考えが本細胞にも当てはまるとすれば対照群と比較して炎症性腸疾患ではより未熟な細胞が動員されているといえよう。

結論として、炎症性腸疾患における $\gamma\delta$ 型T細胞は潰瘍性大腸炎とCrohn病の間に差を有しつつ、対照群とはきわめて異なる存在様式を呈していることが解明された。これらの変化が、果して疾患の原因であるのかあるいは結果であるのかは、さらに今後の検討が重要であると考えられる。

審査結果の要旨

潰瘍性大腸炎（以下UC）およびクローン病（以下CD）は病態の形成に何らかの免疫異常が深く関与するとされるが、その実態については未だ解明されていない。一方、近年発見された $\gamma\delta$ 型T細胞は、皮膚や腸管粘膜などの外界との接点の場において広く分布し、生体防御に重要な役割を演じていることが報告されている。しかし、ヒトにおいては分布様式の解明すら不十分であり、疾患との関わりについてもほとんど不明である。本研究は免疫組織化学を駆使し、以上の疑問に積極的に取りくんだ労作である。その方法であるが、手術摘出標本を用い凍結切片を作成して、二重染色法pre-embedding法による免疫電顕を行ない、生体内での分布様式、すなわちphenotypeや超微形態について存在部位をおさえつつきめ細かく検討している。まず対照群における $\gamma\delta$ 型T細胞について、1) δ 鎖陽性上皮細胞間リンパ球($\delta(+)$ IEL)は、回腸ではCD3(+)細胞に占める割合が10数%であるのに対し、大腸では40%近く占めている。2) δ 鎖陽性粘膜固有層内リンパ球($\delta(+)$ LPL)では、回腸で15%を占めるのに対し大腸では3%にすぎない。3) phenotypeについてみると、 $\delta(+)$ IELの大半がCD8(+)であるのに対し、 $\delta(+)$ LPLではCD4(-)CD8(-)が主体であるなど、本細胞のheterogeneityを正確に把握した上でUC、CDに対する検討を行なっている。その中で、とくに重要と考えられる点について列挙してみると、1) UC大腸での $\delta(+)$ IELの著名な減少、2) UC大腸での $\delta(+)$ LPLのphenotypeの変化、すなわちCD4(-)CD8(-)の著名な減少3) CD回腸における $\delta(+)$ LPLの減少4) CDでの肉芽腫内の本細胞の存在5) UC、CDともにみられる炎症巣への本細胞の集積6) UC、CD両者にみられる $\delta(+)$ LPLの超微形態の変化、すなわち未熟な顆粒様構造の出現など、興味深い所見と共に定量的評価を加味しつつ解明している。これらの点をふまえ、UCにおける $\delta(+)$ IELの減少により外来抗原の侵入し易い状態にあり、CD8(+)の本細胞が外来抗原の存在下で活性化されているとする実験的報告から、 $\delta(+)$ LPLのphenotypeの変化は、mucosal barrierの減弱と外来抗原の侵入を示唆する所見と考えられる。さらに、本細胞の炎症巣への集積と超微形態の変化、すなわち未熟な形態を有するpopulationの増加などから、炎症性腸疾患において本細胞が積極的に動員されていることを指摘している。

その他にも、本細胞のhomingの問題や、CDの病因としてのmycobacteriumとの関わりなどについても多角的に考察している。

本研究は、まさにpioneer的な研究であり、しかも、数々の重要な示唆に富む研究である。

よって学位を授与するに値するものと認める。