

肝, 胆道系における局所免疫機構の解析

— HRP による総胆管感作ラットでの検討 —

坂内 文男 吉田 豊 服部 淳夫

札幌医科大学病理学第2講座 (主任 森 道夫 教授)

Studies on the Local Immune Mechanism in the Hepatobiliary Tract of the Rat ; Immunological Analysis of the Liver and Bile after Retrograde Injection of HRP into the Common Bile Duct

Fumio SAKAUCHI, Yutaka YOSHIDA and Atsuo HATTORI

Department of Pathology (Section 2) Sapporo Medical College

(Chief : Prof. M. Mori)

ABSTRACT A new experimental model was developed in rats to investigate the local immune mechanism in the hepatobiliary tract. Animals were initially sensitized with subcutaneous injection of horseradish peroxidase (HRP) in the hind foot pads followed by retrograde boosting with the same antigen through the common bile duct 8 weeks after the initial sensitization (ID-rat). Rats which were boosted intravenously with HRP (IV-rat), which received HRP into the common bile duct without initial sensitization (S-rat), and normal rats served as control.

The number of anti-HRP antibody forming cells increased significantly in the portal triad of the liver in the ID-rats. These cells were shown to be positive for IgA by double immunohistochemistry for HRP and IgA. The amount of IgA in the bile also increased in the ID-rats. Immunoblotting after PAGE of the bile revealed the presence of anti-HRP antibody activity. The specific anti-HRP antibody activity in the bile corresponded with secretory IgA. These results indicated that the hepatobiliary system responds to antigenic stimulus by producing specific IgA antibody, and the lymphoid cells localized in the portal triad might serve as the hepatobiliary tract-associated lymphoid tissue, the same as GALT and BALT.

(Received May 6, 1988 and accepted July 25, 1988)

Key words: Bile, Secretory IgA, Lymphoid tissue, Hepatobiliary system, Local immunity

1 緒 言

生体は、皮膚、気道、消化管粘膜を介して外界と接触しており、種々の外来性抗原刺激にさらされている。粘膜下には、外来性抗原に反応して局所免疫をつかさどるリンパ装置が発達し、消化管においては gut-associated lymphoid tissue (GALT)¹⁻³⁾、気道では bronchus-associated lymphoid tissue (BALT)⁴⁻⁷⁾ として知られている。これらのリンパ装置によって産生される主な免疫グロブリンは、IgA である⁸⁻¹¹⁾。粘膜下のリンパ装置で産生された polymer 型 IgA は、一旦血液に入り、上皮細胞の産生する secretory component

(SC) と上皮細胞の表面で結合して、上皮細胞に取り込まれ、細胞内を輸送されて、分泌型 IgA (SIgA) となって粘膜面に分泌される¹²⁻¹⁵⁾。分泌型 IgA は、粘膜、乳汁などの外分泌液に含まれ、局所免疫に参画する^{16,17)}。従って局所免疫には、抗原刺激に反応し IgA 産生にいたるまでのリンパ装置の働きと、SC の産生、IgA の取り込み、SIgA の分泌という上皮細胞の働きを区別することができる。肝胆道系における SC の産生、IgA の輸送及び分泌に関する上皮の役割については、諸家の詳細な検討があり、ヒトでは胆管上皮細胞が SC を産生し、胆汁中に SIgA を分泌するのに対して、ラットでは、SC 産生は肝細胞のみで行われ、SIgA は毛細胆管に分泌さ

れると考えられている²¹⁻²⁷。一方 SIgA は、胆汁中に存在する主要な免疫グロブリンである²⁸⁻³¹が、その大部分は、腸管で産生されたもので、胸管を経由して血液の中に入り、肝細胞を経て、胆汁中に分泌されたものと考えられている³²⁻³³。またその一部は、IgA と抗原が結合した血液中の免疫複合体を、肝細胞が scavenger として取り込み、胆汁中に分泌したものとする報告³⁴⁻³⁶もみられる。しかし、このように全身血流に由来する IgA 以外に、肝胆道の局所で産生される IgA が存在し、これが胆汁中に分泌される可能性が以前から指摘されていた³⁷⁻⁴¹にもかかわらず、肝胆道系に、GALT に相当するリンパ装置が存在するかどうかについては、今まで十分な検索が行われていない。

そこで、この点を解析するために、著者らは horseradish peroxidase (HRP) を抗原として、経十二指腸的に、ラットの総胆管内に逆行性に注入し、肝胆道系に直接増幅感作を与える実験系を作製した。この系を用いることによって、感作後の肝胆道組織の免疫組織学的検討により、局所免疫装置が形成されることが明らかとなった。そこで、増幅感作後の血中及び胆汁中の抗 HRP 抗体活性の同定と、IgA の定量を行うことによって、肝胆道系における局所免疫装置の役割について検討を試みた。

2 材料及び方法

2.1 抗原感作

2.1.1 初回感作

Horseradish peroxidase (HRP, Type II, Sigma 社) 200 μg を、生理食塩水 50 μl に溶解し、等量の Freund 完全アジュバント (Difco 社) と混合、体重約 250 g の Wistar 系雄ラット (SPF) の両足底に、数ヶ所皮下注射した。なお初回感作後、すべての動物はコンベンショナルな環境で、水、飼料(MF, オリエンタル酵母)を自由に与えて飼育した。

感作後 2 週目に、膝窩リンパ節を摘出し、periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP, 4% paraformaldehyde 含有) 固定液で固定後、エタノール系列で脱水、低融点パラフィン (52°C) に包埋した。3 μm の切片を作製し、キシロールで脱パラフィン後、0.6% H_2O_2 メタノール溶液に 30 分間浸漬して内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、0.01 M phosphate-buffered saline, pH 7.2 (以下 PBS) にて 5 分間 3 回洗浄後、HRP 1 mg を PBS 10 ml に溶解した溶液と、室温で 1 時間反応させた。PBS で 10 分間 3 回洗浄後、0.02% 3,3'-diaminobenzidine (DAB), 0.01% H_2O_2 , 0.05 M

Tris-HCl 緩衝液, pH 7.6 で 7 分間発色させ、抗 HRP 抗体産生細胞を同定した。1% メチルグリーンで核染色を行った後、脱水、透徹、封入した。

2.1.2 増幅感作

初回感作動物を 2 群に分け、1 群 5 匹 (IV 群) には、初回感作後 8 週目に、HRP 200 μg を PBS 0.2 ml に溶解し、大腿静脈より注入した。2 群 5 匹 (ID 群) を pentobarbital sodium (ネンブタール, ダイナボット社) 麻酔下に開腹し、十二指腸に約 5 mm の切開創を加え、27 ゲージ二重静脈針を挿入、総胆管内に IV 群と同量の HRP 溶液を逆行性に注入した。初回感作を行わずに、HRP 200 μg を含む PBS 0.1 ml を、等量の Freund 完全アジュバントと混合して総胆管内に逆行性に注入した動物を、胆道局所 1 回感作群 (S 群) とした。

2.2 胆汁及び血液の採取

増幅感作及び胆道局所 1 回感作 2 週後に、動物をネンブタール麻酔下に開腹し、総胆管に外径 0.8 mm のポリエチレンチューブ (No 5, イガラシ医科工業) を挿入し、胆汁約 1 ml を採取した。同じ動物の血液を採取し、血清を分離した。その他、無処置正常ラット 4 匹からも胆汁及び血液を採取した。これらの試料は、すべて -70°C に保存し後日検索を行った。なお、2.1.2 及び 2.2 の操作は、約 20 時間の絶食後に行った。

2.3 組織標本の作製及び免疫染色

胆汁採取後、各動物の肝臓を PLP 固定液で門脈から灌流固定し、一部は 10% sucrose 加 PBS, 15% sucrose 加 PBS, 20% sucrose 加 PBS の順に 8 時間浸漬した後、OCT compound (Miles 社) に包埋し、クリオスタットを用い凍結切片を作製した。残りの肝及び総胆管、脾臓、小腸、骨髄は、2.1.1 に述べたように PLP 固定後、パラフィン包埋標本を作製し、以後の免疫染色に供した。

2.3.1 抗 HRP 抗体産生細胞の同定及び定量化

摘出臓器における抗 HRP 抗体産生細胞を同定するため、3 μm のパラフィン切片について、2.1.1 と同様の方法で検討した。この肝組織については、IV 群、ID 群、S 群それぞれの動物につき、5 枚の組織標本中に見出される抗 HRP 抗体陽性細胞数を数え、Digiplan Mop 203 Mark III (Kontron 社) で測定した肝切片の面積から、単位面積あたりの抗 HRP 抗体産生細胞数を算定した。

2.3.2 抗体産生細胞の免疫グロブリンクラス同定

各群の肝の凍結切片を用いて、抗体産生細胞の免疫グロブリンクラスを検討した。2.1.1 と同様の方法で抗

HRP 抗体陽性細胞を同定し, 1次抗体として抗 IgA, 抗 IgG, 抗 IgM 抗血清 (Miles 社) を用いて間接蛍光抗体法を行った. すなわち, IgA 同定のためには, 10% 正常ウサギ血清と室温で 20 分間反応させ, 次に 200 倍希釈抗ラット IgA (抗 α 鎖) ヤギ血清を室温で 30 分間反応させた. PBS で 5 分間 3 回洗浄後, 50 倍希釈 fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated rabbit Ig to goat Ig (DAKO 社) と室温で 30 分間反応させ, 蛍光顕微鏡で観察した. また, IgG, IgM 同定のためには, 10% 正常ブタ血清と反応させた後, 1次抗体として, それぞれ抗ラット IgG ウサギ血清, 抗ラット IgM ウサギ血清, 2次抗体として FITC conjugated swine Ig to rabbit Ig (DAKO 社) を用い, 同様の操作を行った.

2.4 血清中の抗 HRP 抗体の検討及び抗体活性を有する免疫グロブリンクラスの同定

各実験群より採取した血清と HRP 0.1 mg/ml PBS 溶液を, Ouchterlony 法を用い, 抗原抗体反応を行った. そして, 沈降線が得られた動物群の血清については, さらに免疫電気泳動法を行い, HRP と反応する免疫グロブリンクラスの同定を行った.

2.5 胆汁中の蛋白及び IgA の定量

各実験群及び正常対照群より採取した胆汁の総蛋白量を, Lowry 法を用いて測定し, それぞれの蛋白濃度 3 mg/ml につき, その 1 μ l を Phast System 電気泳動装置 (Pharmacia 社) で SDS PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) し, 次いで Western blotting を行い, 得られた各バンドの中から, IgA H 鎖 (α 鎖) と SC に一致するバンドを, PAP 法で同定した. すなわち, Phast gel, gradient 10-15 (Pharmacia 社) 上で電気泳動後, Immobilon IPVH (日本ミリポア) に各バンドの蛋白を電気的に移動させ, 0.05% Tween 20 加 PBS (Tween-PBS) で軽く洗浄し, 5% スキムミルク加 PBS 中に 1 時間浸漬後, 1次抗体として 2.4.2 で用いた抗ラット IgA 抗体の他, 200 倍希釈抗ラット SIgA ヤギ血清 (Miles 社) を, overnight 反応させた. 2次抗体は 100 倍希釈 rabbit Ig to goat Ig (DAKO 社), 次いで 500 倍釈 goat PAP (DAKO 社) をいずれも室温で 1 時間反応させ, その後 DAB で発色させた. なお各反応終了後, Immobilon 膜を Tween-PBS で 10 分間, 3 回洗浄した. また, ゲルは泳動後に銀染色をほどこし, 得られた各バンドを Densitometer Model OZ-802 (Asuka 社) でスキャンし, その波形より, Digiplan で面積を算出し, 各実験群 IgA の, 正常対照群に対する比を求めた.

2.6 胆汁中の抗 HRP 抗体の検討及び抗体活性を有する免疫グロブリンクラスの同定

2.6.1 抗 HRP 抗体活性の検討

各実験群の胆汁 1 μ l をニトロセルロース膜に吸着させ, 1% bovine serum albumin で 1 時間ブロックした. その後, HRP 1 mg/10 ml PBS と, 4°C overnight 反応させ, Tween-PBS で充分洗浄後, DAB 溶液で発色させ, 抗 HRP 抗体活性の検定を行った.

2.6.2 免疫グロブリンクラスの同定

15% グリセロール, 0.001% bromophenol blue を含む各実験群の胆汁 10 μ l を, カセット電気泳動槽 DPE-110 及び PAG プレート 4/15 (第一化学) を用いて, PAGE を行い, その後 Immobilon 膜に蛋白を電気的に移動させ, 2.6.1 と同様に抗 HRP 抗体活性を検討した. また抗 IgA 抗体, 抗 SIgA 抗体, 抗 IgG 抗体, 抗 IgM 抗体を用いて, 2.5 と同様の手技で, 抗 HRP 抗体活性を持つバンドの免疫グロブリンクラスの同定を行った. ただし抗 IgG 抗体, 抗 IgM 抗体を, 1次抗体として使用した場合は, 2次抗体に swine Ig to rabbit Ig (DAKO 社), 次いで rabbit PAP (DAKO 社) を用いた.

2.6.3 HRP・抗 HRP 抗体複合体の作製

各実験群から得られた胆汁 100 μ l を HRP 1 mg/ml PBS 溶液 100 μ l と混合し, 4°C overnight 抗原抗体反応を行い, PAGE 後, 蛋白を Immobilon 膜に電気的に移動させ DAB 溶液で発色し, HRP・抗 HRP 抗体免疫複合体の存在を確認した. その後, 0.6% H₂O₂ メタノール溶液に 1 時間浸漬し, HRP 活性を完全に阻害した後, 各種抗ラット免疫グロブリン抗体を用い, 2.6.2 と同様の方法により, 免疫複合体の免疫グロブリンクラスを同定した.

3 成績

3.1 初回感作動物の膝窩リンパ節の免疫組織化学的検討

初回足底感作後 2 週目のリンパ節について, 抗 HRP 抗体産生細胞の有無を検討したところ, いずれのリンパ節においても, 主として髄索内に, 多数の抗 HRP 抗体陽性細胞が確認された (図 1).

3.2 増幅感作後の肝内抗 HRP 抗体産生細胞の同定及び定量

各実験群の肝における検索では, ID 群において, グリソン鞘内胆管周囲に多数の抗 HRP 抗体陽性細胞が認められた (図 2). IV 群でも, 抗 HRP 抗体陽性細胞が少数みられたが, 定量的検討の結果, ID 群において

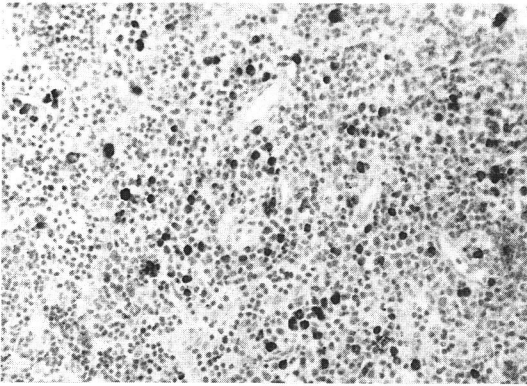


Fig. 1 Popliteal lymph node of a rat, 2 weeks after subcutaneous primary immunization with HRP into hind foot pads. Anti-HRP antibody forming cells are demonstrated by treatment with HRP. 100 \times .

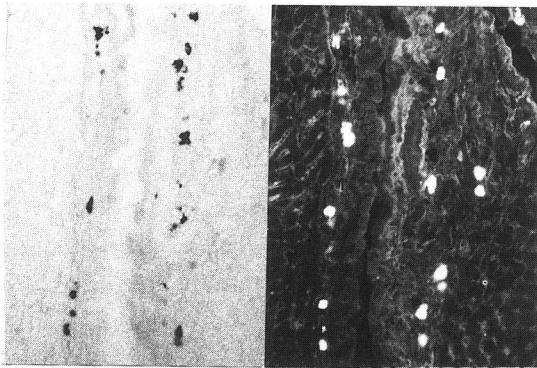


Fig. 3 Double staining of the intrahepatic bile duct from the ID-rat. Anti-HRP forming cells are demonstrated by treatment with HRP (left), whereas IgA forming cells are demonstrated by immunofluorescence staining with anti-IgA antibody (right). Most, if not all, of the anti-HRP antibody forming cells are positive for IgA. 100 \times .

有意に増加していることが確かめられた(表1)。脾臓については、IV群に比較的多くの抗HRP抗体陽性細胞がみられたがID群では少数であった。S群においては、肝内及び脾臓に抗HRP抗体陽性細胞を認めなかった。また各群ともに、総胆管、小腸、骨髄に抗HRP抗体陽性細胞は見出されなかった。

ID群肝の凍結標本を用いて、同一切片上で、抗HRP抗体活性と、間接蛍光抗体法による免疫グロブリンクラス同定のを行ったところ、ほとんどの抗HRP抗体陽性細胞が保有する免疫グロブリンは、IgAであることが確かめられた(図3)。その他に少数のIgM保有細胞が観察されたが、IgG保有細胞は認められなかった。



Fig. 2 A cross section of the intrahepatic bile duct from an ID-rat, 2 weeks after retrograde boosting with HRP into the common bile duct. Anti-HRP forming cells are demonstrated by treatment with HRP. 200 \times .

Table 1 The number of anti-HRP antibody forming cells in the liver.

S-rat (n=3) ^a	IV-rat (n=3)	ID-rat (n=3)
0 ^b ±0	┌──────────┐ ^c	
	5.8±1.7 ^b	25.2±12.6

- a) The number in parentheses indicates the number of rats examined.
 b) Mean±S.D./cm²
 c) p<0.05

3.3 増幅感作後の血清中における抗HRP抗体活性の検討

各実験群について、それぞれ血清中の抗HRP抗体活性を、Ouchterlony法で検討したところ、IV群、ID群の血清は、HRP溶液と反応して沈降線を形成した。S群においては沈降線は得られなかった(図4)。免疫電気泳動法によって、これらの血清中の抗HRP抗体活性を示す免疫グロブリンクラスを検討したところ、大部分はIgGであった(図5)。抗HRP抗体活性を示すバンドとIgAのバンドは、一致しなかった。

3.4 胆汁中の蛋白及びIgAの定量

図6に、正常対照群及びS群、IV群、ID群の胆汁を用いたSDS PAGEと、Western blottingの結果を示す。抗IgA抗血清と反応する分子量およそ58000のバンドが、IgA、 α 鎖由来のバンドと考えられた。このバンドをdensitometerでスキャンし、その波形よりDigiplanで面積を算出し、各実験群IgAの正常対照群に対する比を求めた。同時にLowry法による胆汁中蛋白濃度を示す(図7、表2)。その結果、ID群において、胆汁中の総蛋白濃度及びIgA量が上昇していることがわかった。

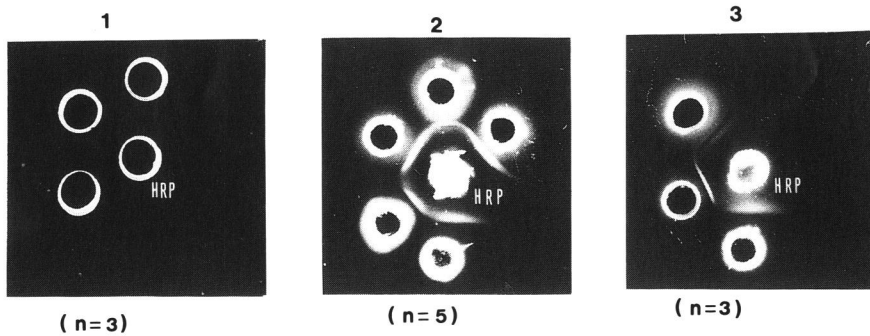


Fig. 4 Ouchterlony double immunodiffusion of serum from different experimental groups against HRP. The center well contains HRP solution (0.1 mg/ml PBS) and the surrounding wells contain serum (1; S-rat, 2; IV-rat, 3; ID-rat). Precipitation lines are observed in the IV- and ID-rat, but not in the S-rat. The number in parentheses indicates the number of rats examined.

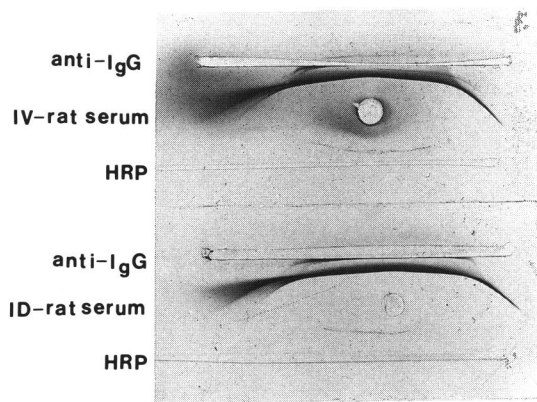


Fig. 5 Immunoelectrophoresis of serum from the IV- and ID-rat against HRP. Both sera reacted with both HRP and anti-IgG. Anti-IgG; anti-rat IgG rabbit Ig. HRP; HRP solution 1 mg/ml PBS.

3・5 胆汁中の抗 HRP 抗体活性の検定及び抗体活性を有する免疫グロブリンクラスの同定

各実験群の胆汁について、スポット法によって抗 HRP 抗体活性を検討した結果は、図 8 に示すとおりで、ID 群にのみ明瞭なスポットが形成された。PAGE, Western blotting による検索でも、胆汁中の抗 HRP 抗体活性は ID 群のみに認められ、他の群には認められなかった。これらの抗 HRP 抗体活性を有するバンドは、抗 IgA 抗体、抗 SIgA 抗体で認識されるバンドと一致した(図 9)。しかし、Western blotting で証明された抗 HRP 抗体活性は極めて弱かったので、抗 HRP 抗体が胆汁中に存在することを確認するために、胆汁と HRP を、in vitro で反応させ、HRP・抗 HRP 抗体複合体を形成した。この複合体を PAGE, Western blotting によって検索したところ、やはり ID 群にのみ Im-

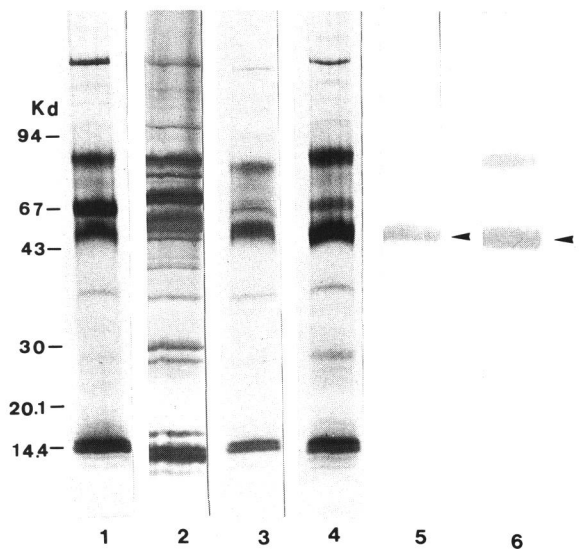


Fig. 6 SDS-PAGE analysis (Lanes 1-4) of biliary proteins. Lane 1; bile from normal rat, Lane 2; S-rat, Lane 3; IV-rat, Lane 4; ID-rat. Lanes 5 and 6 show immunoperoxidase staining of biliary proteins immunoblotted with antibodies against IgA heavy chain (α chain) (Lane 5) and anti-SIgA (Lane 6). Arrow heads indicate α chain in Lane 5 and Lane 6.

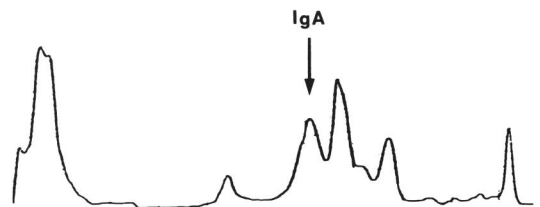


Fig. 7 Densitometry scan of SDS-PAGE shown in Fig. 6, Lane 1. Arrow indicates IgA heavy chain (α chain).

Table 2 Concentration of protein in bile

	Normal rat (n=4) ^a	S-rat (n=3)	IV-rat (n=3)	ID-rat (n=5)
Total protein concentration in bile	3.7 ^b	4.1 ^b	3.7 ^b	4.3 ^b
Ratio of IgA in bile to normal rat	—	1.2 ^b	1.2 ^b	1.6 ^b

- a) The number in parentheses indicates the number of rats examined
 b) Mean value

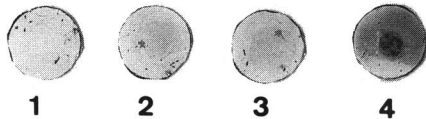


Fig. 8 Treatment of bile spotted on nitrocellulose with HRP. 1 is bile from normal rat; 2, S-rat; 3, IV-rat; 4, ID-rat. Only the bile from ID rat shows anti-HRP antibody activity.

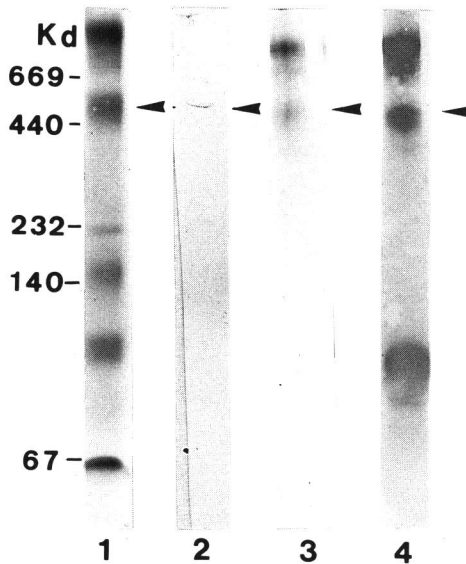


Fig. 9 Immunoblotting of the bile from ID-rat (Lanes 2-4). Lane 1 shows PAGE analysis of the bile (Coomassie Blue). Lane 2, HRP; Lane 3, anti- α chain; Lane 4, anti-SIgA. Arrow heads indicate anti-HRP antibody activity weakly observed in Lane 2, α chain in Lane 3, and α chain and SC in Lane 4.

mobilon 膜上に抗 HRP 抗体活性が認められることから、胆汁中に抗 HRP 抗体が存在することが確かめられた。また同時に、この抗体は抗 IgA 抗体で認識された (図 10)。

4 考 察

生体は外界から種々の抗原刺激を受けている。肝胆

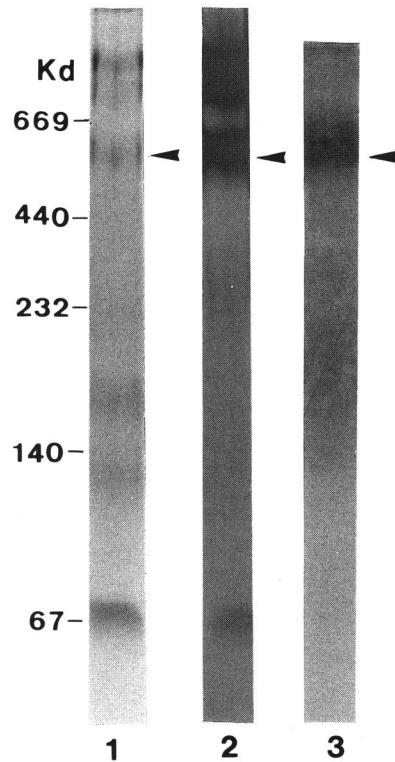


Fig. 10 PAGE analysis (Lane 1) (Coomassie Blue) and immunoblotting (Lanes 2 and 3) of the bile from ID rat incubated with HRP solution in vitro. Lane 2, HRP; Lane 3, anti- α chain. Arrow heads indicate anti-HRP antibody activity in Lane 2 and α chain in Lane 3.

道系も例外ではなく、胆管を経て抗原刺激を受けることは想像に難くない。しかも肝胆道系に分泌される蛋白の中には、局所免疫にたずさわる IgA が、分泌型 IgA (SIgA) のかたちで多量に含まれている。しかしこれまで、胆汁中の SIgA の大部分は、主にパイエル板などの腸管リンパ装置で合成され血中に入った polymer 型 IgA や^{32,33,41)}、流血中の IgA を含む免疫複合体に由来すると考えられてきた。肝胆道系が、血清中の IgA に対して IgA pump⁴²⁾、ないしは IgA scavenger³⁴⁻³⁶⁾ としての役割を果たしていることは確かであるとしても、

胆汁中の SIgA の中には, 肝胆道系局所で産生されたものが含まれている可能性も考えられる. もし適当な抗原物質を用いて, 胆道系を選択的に抗原刺激する方法があれば, この点を解明する手懸かりを得ることができるとは思われる. 今回著者らは, この点を検討するために, HRP を抗原として, これをラット総胆管に, 逆行性に注入する実験系を作製した.

4.1 抗原感作法

動物を用いた局所リンパ装置の抗原刺激法としては, GALT に対する経口的抗原投与方法^{43,44)}や, パイエル板に直接抗原を注入する方法^{31,45)}が試みられている. BALT に対しては, 抗原を吸入させる方法が用いられており, 乳腺に対しては, ヒツジの乳管に逆行性に抗原を注入した報告⁴⁶⁾がある. これらはいずれも, 抗原刺激に対する局所リンパ装置の反応をみたものであるが, その結果, 抗原に対する特異抗体が産生され, しかも抗体活性は IgA にあるとする報告¹²⁻¹⁷⁾が多い. 肝胆道系は, 抗原の侵入を受ける可能性があるにもかかわらず, 胆管の局所免疫反応に関する検討は, まだ行われていない. 胆管に抗原を逆行性に投与方法は見出されておらず, 逆行性の感作も, その手術操作が比較的難しく, 時には胆汁性腹膜炎を起こすことが, その理由の一つと考えられる. その点, 今回我々の用いた経十二指腸的な, 静脈二重針による逆行性抗原注入法は, 安全で, 再現性も高いため, 胆道感作法として有用と思われる. この方法では, 抗原性を失うことなく抗原物質を直接注入できることが利点の一つでもある.

抗原刺激の方法として, BALT に関する実験では, 1 回の抗原局所投与よりも, 頸部や足底に抗原を初回感作し, 次いで抗原を気道内に投与し増幅感作する方法⁶⁾が, 多く用いられている. そこで我々も, 足底皮下にまず抗原刺激を行い, 次いで胆道局所に増幅感作を与える方法をとった. しかし, IgA 産生細胞の前駆細胞は, GALT 特にパイエル板に多く, 末梢リンパ節には少ないとする報告^{47,48)}があるので, 初回感作を GALT に行い, 今回の結果と比較することが必要かもしれない.

4.2 各臓器での抗 HRP 抗体産生細胞の出現

初回足底感作後 2 週目の膝窩リンパ節には, 多数の抗 HRP 抗体産生細胞が出現した. この結果は, これまでの報告^{6,49)}に一致している. すなわち, Sordat *et al.* は, マウスの足底に HRP を注射し, 2-3 週後の膝窩リンパ節に, 多数の抗 HRP 抗体産生細胞を認めたと報告⁴⁹⁾している. これは, HRP をラット足底に感作した,

G. J. van der Brugge-Gamelkoorn *et al.* の結果⁶⁾とも一致する.

これらの抗原感作細胞が, いかにしてその後全身に分布するかについては, まだ不明の点が多い. パイエル板に抗原刺激を与えた場合, 抗原刺激を受けたリンパ球が血中に入り, 腸管や乳腺などに分布する, いわゆる homing⁵⁰⁾現象が知られている. このようにパイエル板は, IgA 産生細胞の中心リンパ装置と想定されている. それに対して, これまでリンパ節には, そのような機能は認められておらず, リンパ節で抗原刺激を受けたリンパ球が, 外分泌腺に到達することは少ないとされてきた⁵¹⁾. しかし, 今回の実験で, 初回足底感作後, 胆道に局所的な増幅感作を与えることによって, 肝内に多数の抗 HRP 抗体産生細胞が観察されたことは, グリソン鞘に出現するリンパ球の一部が, 膝窩のリンパ節に由来する可能性を示唆している.

十二指腸から逆行性に増幅感作した肝組織には, リンパ濾胞の形成は認められなかったが, 多数の抗 HRP 抗体産生細胞が, 明らかに他の実験群と有意の差を持って, グリソン鞘の胆管周囲に出現した. これらの抗体産生細胞が産生する免疫グロブリンの多くは, HRP と IgA の二重染色によって, IgA であることが証明された. 以上の結果から, HRP の逆行抗原刺激によって, 肝胆道系の局所で, 抗 HRP・IgA 抗体が産生されていることが明らかにされた. 腸管では, このような IgA 抗体産生細胞の増殖を促すヘルパー T 細胞の存在が知られている^{2,49)}が, 肝内にも同様のヘルパー T 細胞が存在するか否か, また腸管では, 抗原提示に関係する上皮である M 細胞が存在する⁵²⁾が, これと同様の働きをする細胞が胆管に存在するか否かは, 今後の研究課題である.

4.3 胆汁中への抗 HRP 抗体活性を持つ免疫グロブリンの出現

これまでの報告では, ラット胆汁中の総蛋白濃度は, 3-5 mg/ml^(21,31)とされている. 今回の実験でも, 各群の胆汁中の蛋白量は, この範囲内であったが, ID 群において最も高値を示した. さらに ID 群では, 胆汁中の IgA 量が他の群よりも高く, 胆汁中の蛋白量の増加の一部は, IgA 量の増加によることが示唆された. また ID 群では, 抗 HRP 抗体活性が胆汁中に確認され, その抗体活性は, SIgA にあることが確かめられた.

以上の結果は, 肝胆道系においても, 外来性抗原に対する局所免疫機構が存在し, グリソン鞘に存在するリンパ球集団が, 局所リンパ装置として働くこと, 及び, 肝胆道系の局所免疫に関与する免疫グロブリンの

主体は、消化管、気道、乳腺などの場合と同様に、IgAであることを示している。抗 HRP 抗体活性を持つ SIgA の、胆汁中への出現経路に関しては、まず抗原刺激が、胆管上皮細胞を介してグリソン鞘に存在する免疫担当細胞に働き（図 11 の 1）、次いで抗原特異的 IgA 抗体が産生され（図 11 の 2）、抗体産生細胞の分泌する IgA 二量体が、ラット肝細胞の類洞面に存在する SC と結合し（図 11 の 3）、肝細胞内を輸送され、毛細胆管に SIgA として分泌される（図 11 の 4）という機序が想定されるが、グリソン鞘で産生された IgA が、直接胆管上皮を経て胆汁中に分泌される経路についても、再検討する必要があると思われる。

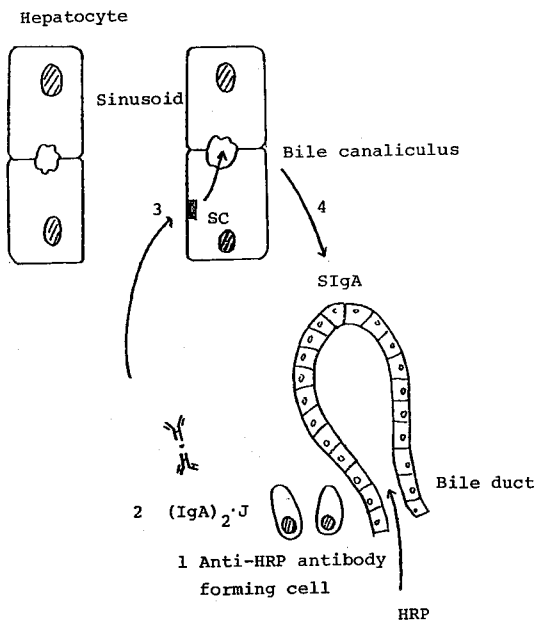


Fig. 11 Schematic representation of putative local immune system in the hepatobiliary tract. The numbers indicate the suspected sequence by which locally formed IgA is secreted into bile.

5 結 論

- 1) 肝胆道系における局所免疫機構を検索するため、HRP を Wistar 系ラットの足底に皮下注射し、8 週後、経十二指腸的に HRP を総胆管内に注入して増幅感作する実験系を作製した。
- 2) 増幅感作後の肝胆道系を、免疫組織学的に検索した結果、グリソン鞘の小葉内胆管周囲に、多数の抗 HRP 抗体産生細胞が出現し、これらの細胞の多くが生産する免疫グロブリンは、IgA であることが確か

められた。

- 3) 増幅感作後の胆汁中に抗 HRP 抗体が証明され、この抗体は、Western blotting 法による検索で SIgA に一致した。
- 4) 以上の結果から、グリソン鞘のリンパ球集団が、胆汁中への SIgA 分泌を通じて肝胆道系の局所免疫に働くことが示唆された。

謝 辞

御指導・御校閲いただきました本学第 2 病理学講座、森 道夫教授に深謝します。また、御協力いただきました写真室の方々、並びに標本作製を担当された染色室の方々に感謝いたします。

文 献

1. Guy-Grand, D., Griscelli, C. and Vassalli, P.: The gut-associated lymphoid system: Nature and properties of the large dividing cells. *Eur. J. Immunol.* 4, 435-443 (1974).
2. Kawanishi, H., Saltzman, L. and Strober, W.: Mechanisms regulating IgA class specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissue. *J. Exp. Med.* 158, 649-669 (1983).
3. Albert, L. J.: The intestinal immune system: A time for the reaper. *Gastroenterology* 87, 234-237 (1984).
4. Goodman, M. R., Link, D. W., Brown, W. R. and Nakane, P. K.: Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123, 115-119 (1981).
5. Butler, J. E., Swanson, P. A., Richerson, H. B., Ratajczak, H. V., Richards, D. W. and Suelzer, M. T.: The local and systemic IgA and IgG antibody responses of rabbits to soluble inhaled antigen. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126, 80-85 (1982).
6. van der Brugge-Gamelkoorn, G. J., Plesch, B. E. C., Sminia, and Langevoort, H. L.: Specific antibody-forming cells in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and lung of rat after intratracheal challenge with horseradish peroxidase. *Virchow Arch. B* 49, 269-276 (1985).
7. van der Brugge-Gamelkoorn, G. J., Claasse, E. and Sminia, T.: Anti-TNP-forming cells in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and paratracheal lymphnode (PTLN) of the rat after intratracheal priming and boosting with TNP-KLN. *Immunology* 57, 405-409 (1986).

8. Tomasi, T. B. and Grey, H. M.: Structure and function of immunoglobulin A. **Prog. Allergy** **16**, 81-213 (1972).
9. Lamm, M. E.: Cellular aspects of immunoglobulin A. **Adv. Immunol.** **22**, 223-290 (1976).
10. McGhee, J. R., *et al.*: Secretory immunity and infection. **Adv. Exp. Med. Biol.** **107**, 185-192 (1978).
11. McDermott, M. R. and Bienenstock, J.: Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory and genital tissues. **J. Immunol.** **122**, 1892-1898 (1979).
12. Newcomb, M. W., Normansell, D. and Stanworth, D. M.: A structural study of human exocrine IgA globulin. **J. Immunol.** **101**, 905-914 (1968).
13. Brown, W. R., Isobe, Y. and Nakane, P. K.: Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. II. Immunoelectron-microscopic localization of immunoglobulins and secretory component in human intestinal mucosa. **Gastroenterology** **71**, 985-995 (1976).
14. Nagura, H., Nakane, P. K. and Brown, W. R.: Translocation of dimeric IgA through neoplastic colon cells *in vitro*. **J. Immunol.** **123**, 2359-2368 (1979).
15. Brandzaeg, P. and Baklien, K.: Immunohistochemical studies of the formation and epithelial transport of immunoglobulins in normal and diseased human intestinal mucosa. **Scand. J. Gastroenterol.** **11** [Suppl. 36], 5-45 (1976).
16. Tomasi, T. B., Tan, E. M., Solomon, A. and Predergast, R. A.: Characteristics of an immune system common to certain external secretions. **J. Exp. Med.** **121**, 101-125 (1964).
17. Cebra, J. J. and Small, P. A.: Polypeptide chain structure of rabbit immunoglobulins. III. Secretory γ A-immunoglobulin from colostrum. **Biochemistry** **6**, 503-512 (1967).
18. Nagura, H., Smith, P. D., Nakane, P. K. and Brown, W. R.: IgA in human bile and liver. **J. Immunol.** **126**, 587-595 (1981).
19. 名倉 宏, 堤 寛, 渡辺慶一: 分泌型IgAの腸肝循環. **最新医学** **37**, 1070-1078 (1982).
20. Delacroix, D. L., Furtado-Barreira, G., de Herpinne, B., Goundswaard, J., Dive, C. and Vaerman, J. P.: The liver in the IgA secretory immune system. Dogs, but not rats and rabbits, are suitable models for human studies. **Hepatology** **3**, 980-988 (1983).
21. Orlans, E., Peppard, J., Reynolds, J. and Hall, J.: Rapid active transport of immunoglobulin A from blood to bile. **J. Exp. Med.** **147**, 588-592 (1978).
22. Jackson, D. G. F., Lamaitre-Coelho, I., Vaerman, J. P., Bazin, H. and Beckers, A.: Rapid disappearance from serum of intravenously injected rat myeloma IgA and its secretion into bile. **Eur. J. Immunol.** **8**, 123-126 (1978).
23. Socken, D. J., Jeejeebhoy, K. N., Bazin, H. and Underdown, B. J.: Identification of secretory component as an IgA receptor on rat hepatocytes. **J. Exp. Med.** **150**, 1538-1548 (1979).
24. Orlans, E., Peppard, J., Fry, J. F., Hinton, R. H. and Mullock, B. M.: Secretory component as the receptor for polymeric IgA on rat hepatocytes. **J. Exp. Med.** **150**, 1577-1582 (1979).
25. Wilson, I. D., Wong, M. and Erlandsen, S. L.: Immunohistochemical localization of IgA and secretory component in rat liver. **Gastroenterology** **79**, 924-930 (1980).
26. Takahashi, I., Nakane, P. K. and Brown, W. R.: Ultrastructural events in the translocation of polymeric IgA by rat hepatocytes. **J. Immunol.** **128**, 1181-1187 (1982).
27. Koertge, T. E. and Bulter, J. E.: Dimeric mouse IgA is transported into rat bile five times more rapidly than into mouse bile. **Scand. J. Immunol.** **24**, 564-574 (1986).
28. Chodrirker, W. B. and Tomasi, T. B.: Gammaglobulins: Quantitative relationships in human serum and nonvascular fluids. **Science** **142**, 1080-1081 (1963).
29. Lemaitre-Coelho, I., Jackson, G. D. F. and Vaerman, J. P.: Rat bile as a convenient source of secretory IgA and free secretory component. **Eur. J. Immunol.** **7**, 588-590 (1979).
30. Lemaitre-Coelho, I., Jackson, G. D. F. and Vaerman, J. P.: Relevance of biliary IgA antibodies in rat intestinal immunity. **Scand. J. Immunol.** **8**, 459-463 (1978).
31. Andrew, E. and Hall, J. G.: IgA antibodies in the rats. I. Some characteristics of the primary response. **Immunology** **45**, 169-182 (1982).
32. Vaerman, J. P. and Heremans, J. F.: Origin and molecular size of IgA in mesenteric lymph of the dog. **Immunology** **18**, 27-38 (1979).
33. Kaarting, M., Imir, T., Klockars, M. and Mekala, O.: IgA in blood and thoracic duct lymph. Concentration and degree of polymerization. **Scand. J. Immunol.** **7**, 229-232 (1978).
34. Peppard, J., Orlans, E., Payne, A. W. R. and Andrew, E.: The elimination of circulating com-

- plexes containing polymeric IgA by excretion in the bile. **Immunology** **42**, 83-89 (1981).
35. Brown, T. A., Russell, M. W. and Mestecky, J.: Hepatobiliary transport of IgA immune complexes: Molecular and cellular aspects. **J. Immunol.** **128**, 2183-2186 (1982).
 36. Brown, T. A., Russell, M. W. and Mestecky, J.: Elimination of intestinally absorbed antigen into the bile by IgA. **J. Immunol.** **132**, 780-782 (1984).
 37. Dive, C. and Heremans, J. F.: Nature and origin of proteins of bile. I. A comparative analysis of serum and bile proteins in man. **Eur. J. Clin. Invest.** **4**, 235-239 (1974).
 38. Dive, C., Nadalini, R. A., Vaermann, J. P. and Heremans, J. F.: Origin and nature of proteins of bile. II. A comparative analysis of serum, hepatic lymph and bile protein in the dog. **Eur. J. Clin. Invest.** **4**, 241-246 (1974).
 39. Delacroix, D. L., Hodgson, H. J. F., McPherson, A., Dive, C. and Vaerman, J. P.: Selective transport of polymeric immunoglobulin A in bile. Quantitative relationships of monomeric and polymeric immunoglobulin A, immunoglobulin M, and other proteins in serum, bile, and saliva. **J. Clin. Invest.** **70**, 230-241 (1982).
 40. Nagura, H., Tsutsumi, Y., Hasegawa, H., Watanabe, K., Nakane, P. K. and Brown, W. R.: IgA plasma cells in biliary mucosa: a likely source of locally synthesized IgA in human hepatic bile. **Clin. Exp. Immunol.** **54**, 671-680 (1983).
 41. Manning, R. J., Walker, P. G., Carter, L., Barrington, P. J. and Jackson, D. G. F.: Studies on the origins of biliary immunoglobulins in rats. **Gastroenterology** **87**, 173-179 (1984).
 42. Kraft, S. C.: The liver as an IgA pump. **Gastroenterology** **80**, 623-624 (1981).
 43. Bazin, H., Levi, G. and Doria, G.: Predominant contribution of IgA antibody-forming cells to an immune response detected in extraintestinal lymphoid tissue of germ-free mice exposed to antigen by oral route. **J. Immunol.** **105**, 1049-1051 (1970).
 44. Weisz-Carrington, P., Roux, M. E., McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J. M. and Lamm, M. E.: Organ and isotype distribution of plasma cells producing specific antibody after oral immunization: Evidence for a generalized secretory immune system. **J. Immunol.** **123**, 1705-1708 (1979).
 45. Dunkley, M. L. and Husband, A. J.: The induction and migration of antigen specific helper cells for IgA responses in the intestine. **Immunology** **57**, 379-385 (1986).
 46. Lascelles, A. K. and McDowell, G. H.: Secretion of IgA in the sheep following local antigen stimulation. **Immunology** **19**, 613-620 (1970).
 47. Craig, R. W. and Cebra, J. J.: Peyer's patches: An enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. **J. Exp. Med.** **134**, 188-200 (1971).
 48. McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J. M. and Lamm, M. E.: Mesenteric lymphnode B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. **J. Exp. Med.** **145**, 866-875 (1977).
 49. Sordat, B., Sordat, M., Hess, M. W., Stoner, R. D. and Cottier, H.: Specific antibody within lymphoid germinal center cells of mice after primary immunization with horseradish peroxidase: A light and electron microscopic study. **J. Exp. Med.** **131**, 77-92 (1970).
 50. Tomasi, T. B., Larson, L., Challacombe, S. and McNabb, K.: Mucosal immunity: The origin and migration pattern of cells in the secretory system. **J. Allergy Clin. Immunol.** **65**, 12-19 (1980).
 51. Reichert, R. A., Gallatin, W. M., Weissman, I. L. and Butcher, E. C.: Germinal center B cells lack homing receptor necessary for normal lymphocyte recirculation. **J. Exp. Med.** **157**, 813-827 (1983).
 52. Owen, R. L. and Jones, A. L.: Epithelial cell specialization with Peyer's patches: An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. **Gastroenterology** **66**, 189-203 (1974).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学病理学第2講座 坂内文男