



Immunoelectron microscopic study of the distribution of T cell subsets in rheumatoid synovium

黒坂, 昌弘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1983-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0434

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000434>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	くろ 黒 坂 昌 弘 （大阪府）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第396号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和58年3月31日
学位論文題目	IMMUNOELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE DISTRIBUTION OF T CELL SUBSETS IN RHEUMATOID SYNOVIUM (慢性関節リウマチ滑膜中におけるT細胞サブセットの分 布について—電顕酵素抗体法による観察—)
審査委員	主査 教授 広 畑 和 志 教授 岩 井 誠 三 教授 木 村 修 治

論文内容の要旨

慢性関節リウマチ（RA）は関節滑膜の局所的慢性炎症により引き起こされる疾患である。関節滑膜中での細胞浸潤は大部分がリンパ球，マクロファージ様細胞，形質細胞等の免疫担当細胞より成り，これらの細胞間での相互反応が滑膜組織の増殖をひきおこし，さらに滑膜中での免疫グロブリンおよび細胞性免疫に関与する chemical mediator の産生をひきおこす事が報告されている。これらの細胞浸潤のなかで，RA滑膜に特徴的に見られるリンパ球浸潤については，関節液中及び滑膜組織中にB細胞に比して多くのT細胞が存在する事から，RA滑膜の慢性炎症反応におけるT細胞の役割，ひいては細胞性免疫の働きが特に重要視されている。RA滑膜中の免疫担当細胞，特にT細胞の分布及び免疫担当細胞間の相互の関連性を調べる事はRAの病態および病因の究明に重要であり，いくつかの報告があるが，結果はまちまちであり，ことに細胞間の相互の関連性についての報告は少ない。我々は最近開発されたT細胞のサブセットに対する単クローン性抗体を用い，ペルオキシダーゼ標識抗体法を利用して，T細胞のRA滑膜中における分布，およびマクロファージ様細胞を中心とする免疫担当細胞との相互反応を光顕的，電顕的に検討したので報告する。

＜材料および方法＞

6例の definite もしくは classical RA の膝関節滑膜が使用された。滑膜は PLP 液（2%もしくは4% paraformaldehyde 0.075 M lysine, 0.01 M sodium - m - periodate）にて固定した後 -80℃にて保存した。実験に際して7-10 μの厚さの切片をクライオスタットで作製し，各々のT細胞サブセットに対する単クローン抗体で1時間処理した。この切片を高感度のアビジン-ビオチン ペ

ルオキシダーゼ法で染色し、光学顕微鏡にて観察した。次に光顕観察と電顕観察所見とを対応させる為、同一試料より電子顕微鏡用の切片を用意し、電子染色をほどこす前後に電子顕微鏡にて観察した。 T_3 細胞 (pan T), T_4 細胞 (helper / inducer), T_8 (suppressor / cytotoxic) が細胞膜の染色性により識別された。

<結果および考察>

R A 滑膜の慢性炎症における血管周囲の細胞浸潤は領域によりその成分を異にする。即ち、主として小リンパ球で占められる部分 (リンパ球集積領域), およびリンパ球, マクロファージ様細胞, 形質細胞と幼若化リンパ球の混在する部分 (移行野), さらにほとんどの細胞が形質細胞で占められている部分 (形質細胞野) である。光顕観察で見られた様に, これら細胞浸潤はその成分のみならず, 浸潤の程度, 大きさにも種々の変化が認められた。光顕観察においては陽性に染まった細胞の微細構造の観察が不可能な事に加えて, 染色されていない細胞の同定, 及び細胞相互の関連性についての観察に限界があるため, 以下の所見は免疫電顕法により得られた。

ほとんどの細胞浸潤は小リンパ球より成るリンパ球集積領域であってその頻度が最も高い。この領域では, リンパ球の多くは T_4 細胞 (helper / inducer) であり, 63 % を占めた。 T_4 細胞がリンパ球集積領域にかたまって存在するのに比して, T_8 細胞 (suppressor / cytotoxic) の数は非常に少なく (リンパ球中の 22 %) T_4 細胞 / T_8 細胞の比は 2.9 であった。この領域ではほとんどのリンパ球は幼若化しておらず, 小リンパ球として認められ, さらにマクロファージ様細胞, 形質細胞は非常に少なく, リンパ球とマクロファージ様細胞の特異的な関連性は認められなかった。リンパ球集積領域での T_4 / T_8 比 = 2.9 は数多く報告されている R A 患者の末梢血中にみられる T_4 / T_8 の比と似ており, 他の免疫担当細胞がこの領域に少ない事からも, 末梢血中 T 細胞の滑膜組織への非選択的な遊走によってリンパ球集積領域が形成されたと思われる。

一方リンパ球のみならず, マクロファージ様細胞, 形質細胞, 幼若化した大型のリンパ球の見られる移行野では T_8 細胞が T_4 細胞の数を上まわっていた (T_8 / T_4 = 0.80)。種々の免疫担当細胞が集積している事から, 移行野で活発な免疫反応が推測され, さらにこの領域で T_8 細胞が幼若化し, マクロファージ様細胞と密接な接触を持つ傾向がある。これは R A 滑膜における免疫反応中心へ関与するサプレッサー細胞の局在を示すものと思われた。

さらに T 細胞の分布と, リンパ球およびマクロファージ様細胞との相互関係を詳細に調べるため, 滑膜試料の細胞浸潤より 80 個以上の細胞を含む区域を任意に選び, これを一領域として, 各々の単クローン抗体染色 (T_3 , T_4 , T_8) につき, 個々の試料より 5 領域から 7 領域を選び (合計 86 領域) その領域中に占める細胞の割合を求めた。すなわち T 細胞のサブセットが種々の領域において占める割合と, 全リンパ球およびマクロファージ様細胞がその領域において占める割合を調べる事により次の様な結果が得られた。(論文 Fig 11~13, Table 1, II, 参照) リンパ球集積領域および移行野においては約 80 % のリンパ球は T 細胞 (T_3 , pan T) であり, 滑膜細胞浸潤中のいずれの部位においても T 細胞がリンパ球中の多数を占めていた。また T_4 細胞 (helper / inducer), T_8 細胞 (suppressor / cytotoxic) がリンパ球中において占める割合はいずれもその領域における全細胞中でリンパ球が占め

る割合に密接に関連していた。これらの領域では T_4 細胞（helper / inducer）のリンパ球中における割合と、その領域に存在するリンパ球の全細胞における割合は正の相関を示し、（ $r=0.80$, $P<0.001$ ）、反対に T_8 細胞（suppressor / cytotoxic）のリンパ球中における割合は、全細胞に対するリンパ球の割合と負の相関を示していた（ $r=-0.71$, $P<0.001$ ）。さらに免疫反応で重要な役割をはたすマクロファージ様細胞の側から検討すると、その領域においてマクロファージ様細胞の割合が高くなるのに比例して、リンパ球中における T_4 細胞（helper / inducer）の割合は低下し（ $r=-0.71$, $P<0.001$ ）、一方リンパ球中における T_8 細胞（suppressor / cytotoxic）の割合は増加していた（ $r=0.68$, $P<0.001$ ）。

<ま と め>

- 1 RA滑膜中におけるT細胞の分布と免疫担当細胞の相互関係を調べるため、T細胞サブセットに対する単クローン抗体および高感度のアビジン-ビオチン法を用いた免疫電子顕微鏡観察手法の開発を行った。
- 2 RA滑膜中の血管周囲の細胞浸潤では、その細胞組成、大きさに種々の変化が認められた。
- 3 リンパ球集積領域ではほとんどの細胞は小リンパ球よりなり主に T_4 細胞（helper / inducer）であった。この領域での T_4 / T_8 比は2.9であった。
- 4 小リンパ球、幼若化リンパ球、形質細胞、マクロファージ様細胞が浸潤し、活発な免疫反応が行われていると考えられる移行野では、 T_8 細胞（suppressor / cytotoxic）が T_4 細胞（helper / inducer）を上まわっていた。この領域での T_4 / T_8 比は0.80であった。
- 5 ある一定の領域における T_4 / T_8 の比はその領域における免疫反応のレベルに関連している事が推測され、 T_8 細胞（suppressor / cytotoxic）は免疫反応が高まるにつれて、その数を増加させているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

慢性関節リウマチ（以下RAと略す）の病因は未だ不明であるが炎症の舞台は関節の滑膜にあってそこにはリンパ球、マクロファージ、形質細胞の免疫担当細胞の浸潤が観察される。慢性関節炎の発症の引き金は滑膜における免疫異常に伴う自己抗体と免疫複合体の産生と細胞性免疫に関与するChemical mediatorと考えられている。RAの関節液及び関節滑膜中のリンパ球にはB細胞に比較してT細胞が多く見られるために自づと、T細胞の役割と機能が重要視されることになる。そこでRA滑膜中に特徴的にリンパ球浸潤巣を形成するT細胞をはじめB細胞と、形質細胞マクロファージ様細胞などの免疫担当細胞との関連性を調べることは病態及び病因を究明して行く上で、甚だ重要な研究課題となる。

今回研究者は最近開発されたT細胞のサブセットに対する単クローン性抗体を用い更にペルオキシダーゼ標識抗体法を利用してRA滑膜中のT細胞の分布および他の免疫担当細胞との相互反応を光顕及び電顕レベルで検索したのである。

材料および方法

RA 6 例の膝関節の滑膜組織を 2～4 %パラフォルマリン緩衝液で固定して－80℃で保存した。7～10 μ の厚さの切片を T 細胞サブセット T_3 , T_4 , T_8 の 3 種類に対する単クローン抗体で 1 時間処理した。この切片を更に高感度のアビジン-ビオチンペルオキシダーゼで染色し、まづ光顕で観察した。

その後同一材料を重金属染色を施さないものと染色したものを電顕で観察した。次いで、 T_3 細胞、 T_4 細胞、 T_8 細胞を細胞膜の染色性により識別してその分布を調べた。その際 80 個以上の細胞が浸潤している区域を任意に選びこれを一領域とした。個々の切片から 5～7 領域を選んで合計 86 領域についてそれぞれの細胞の占める割合を求めた。

研究結果

RA 滑膜の血管周囲における細胞浸潤は領域によりその細胞成分は異なっていた。即ちリンパ球集積領域と形質細胞群からなる領域の他にリンパ球、形質細胞、マクロファージ様細胞からなる移行領域の 3 つの部分に区別された。これら細胞成分の区別や同定は光顕レベルでは限界があるため免疫電顕法が必要であった。単クローン抗体を用いるとほとんどのリンパ球はリンパ球集積領域と移行領域では 80 %が T_3 細胞よりなっていた。更にリンパ球集積領域では T_4 細胞即ち helper 又は inducer 細胞が 63 %で T_8 細胞即ち suppressor 又は cytotoxic 細胞の数は 22 %と少く T_4 / T_8 の比は 2.9 であった。また小リンパ球、幼若化リンパ球、形質細胞、マクロファージ様細胞からなる移行部は滑膜局所における活発な免疫反応が行われている部位と考えられ、ここでは T_8 細胞即ち suppressor 又は cytotoxic 細胞が T_4 細胞即ち helper 又は inducer 細胞よりも多く見られ T_4 / T_8 の比は 0.80 であった。

以上からある一定の領域における T_4 / T_8 の比はその部位での免疫反応の程度を表現していると思われた。この結果 T_8 細胞は免疫反応が増すに連れてその数が増えるものと考えられる。

従来から RA 滑膜においてリンパ球、形質細胞などの免疫担当細胞が存在することはよく知られてきたが、このように単クローン抗体を用いて電顕酵素抗体法による T 細胞サブセットを識別して各細胞分布を明確にした研究はなく、RA の病因の究明の手がかりになる重要な知見であって、価値ある集積として評価される。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認められる。