

Title	ランゲルハンス細胞, CD8陽性T細胞およびCD68陽性マクロファージ密集の部位差: 高齢献体を使用した調査
Author(s)	大峰, 悠矢
Journal	歯科学報, 118(3): 210-214
URL	<a href="http://doi.org/10.15041/tdcgakuho.118.210">http://doi.org/10.15041/tdcgakuho.118.210</a>
Right	
Description	

## 解説 (学位論文 解説)

## ランゲルハンス細胞, CD8陽性T細胞および CD68陽性マクロファージ密集の部位差： 高齢献体を使用した調査

Regional differences in the density of Langerhans cells, CD8-positive  
T lymphocytes and CD68-positive macrophages：  
a preliminary study using elderly donated cadavers

大峰 悠矢  
Yuuya Omine

東京歯科大学解剖学講座

略歴 平成23年東京歯科大学歯学部卒業, 平成24年東京歯科大学臨床研修修了,  
平成25年大学院海外研修基礎コース修了, 平成28年東京歯科大学大学院歯学研究  
科修了(解剖学), 平成29年歯内療法学講座臨床専門専修科生, 日本歯内療法学会  
会員。

キーワード：ランゲルハンス細胞, CD8, CD68, 口腔底, 口唇

Key words：Langerhans cells, CD8, CD68, oral floor, lip

(2018年1月22日受付, 2018年2月21日受理, 歯科学報 118:210-214, 2018.)

<http://doi.org/10.15041/tdcgakuho.118.210>

**研究目的：**局所免疫系の理解を供するためにCD1a陽性ランゲルハンス細胞, CD8陽性サプレッサーT細胞とCD68陽性マクロファージについて検討を行った。

**方法：**研究には高齢男性献体8体を用いた。組織固定については10%ホルマリン溶液+50%エタノール溶液を使用した。摘出した試料に対し, 通法に従いパラフィン包埋を行い, 10 $\mu$ mの連続切片を作成後, H-E染色ならびに免疫組織化学的染色を施した。

**結果：**ランゲルハンス細胞の密度は下唇と口腔底においてそれぞれ10倍以上の違いが認められた。粘膜下や表皮下サプレッサーリンパ球は特に口腔底と陰茎皮膚において豊富であり, 肛門管を除いた4部位の上皮に集積していた。結膜における上皮のマクロファージの集積は8検体すべてで認められた。サプレッサーリンパ球の密度は, 口腔底と口唇で有意に高かった( $r=0.78$ )。

**結論：**局所免疫応答は高く部位依存性がある事が明らかとなった。

### はじめに

扁平上皮におけるCD1a陽性ランゲルハンス細胞は抗原発現に重要な働きをしていることは周知であるものの, 定量的にランゲルハンス細胞の部位差について評価した研究は少ない。一般的にランゲルハンス細胞は, 基底部, 時に上皮の基底層上に優位に存在している。口腔底, 口唇, 舌背においても上皮の長さに沿って発見される。ランゲルハンス細胞の分布と密度, 働きについては健常人の頬粘膜と硬口蓋, 舌背, 口腔底, 下唇において, 突然死後の解剖から生検され確立されてきた。Cruchleyらの研

究ではランゲルハンス細胞はCD1, HLADR, HLADQおよびHLADPに対するモノクローナル抗体で, 免疫アルカリフォスファターゼの手法を用いた凍結切片の中で同定された。頬粘膜や口蓋, 口腔底(16.7細胞-17.6細胞)における低い密度と比較し, 舌背においては最も高い密度を示した(28.3細胞/mm上皮面長)ことを, 口腔粘膜の部位差として報告している<sup>1)</sup>。

炎症は腫瘍の増大, 浸潤, 血管新生に関わる。Lindeらの研究ではマクロファージの分布と腫瘍の進展のための極性をVEGF-A誘発性皮膚発癌モデルで調査した。この結果として生じる腫瘍は広範囲

の血管化, 侵襲性発育と悪性表現系の定着に決定的に寄与するようなM2極性マクロファージの高値によって特徴づけられる。担瘤実験動物からのマクロファージの減少は, 腫瘍発育の縮小, 浸潤の阻害, 増殖の減少と血管新生を縮小させるような結果となった<sup>2)</sup>。In vitroではVEGF-Aはマクロファージの化学誘引効果に及ぼすものの, M2極性化を引き起こさなかった。IL-4とIL-10が因子としてM2極性化に関係することが同定されたのである。

Muthupalaniらの研究ではマクロファージはマウスにおいてヘリコバクター・ビリス誘発性盲腸結腸炎を進行させる決定的な炎症性細胞メディエーターであると示唆している<sup>3)</sup>。しかしながら, 扁平上皮と関係する周囲の結合組織中のCD8陽性サプレッサーTリンパ球の分布については全くといっていいほど情報がない。同様に, 通常の扁平上皮に沿ったCD68陽性マクロファージの分布については, 局所防御と炎症においてランゲルハンス細胞やマクロファージが関係し, 活性的な役割を担う<sup>2-5)</sup>もしくは制御する役割<sup>6,7)</sup>を担うところであるがほとんど知られていない。

本研究においては細胞の集積は肛門管を除き4部位においては明らかであり, 口腔底における集積細胞の最大量は50%に達した。この豊富な浸潤は炎症性やアレルギー反応の可能性の証拠を表すものとは考えられない。なぜなら通常, 粘膜下や皮下血管の周囲に沿った形よりは細胞密度は上皮内においてより高くなるからである。尚, 本研究では固定献体からの標本を使用したCD4抗体の免疫染色は困難を伴うため使用されていない<sup>8)</sup>。

本測定は各部位において陽性構造(高い密度を持つ部分)として検出された。これは担瘤患者から転移性リンパ管標本の外科的採取を行ううえでの通常の評価法である<sup>9)</sup>。口腔底上皮においては形状では円錐形よりはむしろ球状である豊富なタイプ2ランゲルハンス細胞を含む。この分類はJaitleyとSaraswathi<sup>10)</sup>によって作成されている。ランゲルハンス細胞に特異的なマーカーであるランゲリンは上皮のヒト免疫不全ウイルス1受容体になり<sup>11)</sup>, これまで多くの研究者は口腔粘膜と外性器についてのランゲルハンス細胞の分布について興味を持たれてきた。細胞分配の別の研究側面では, 周囲切開後の免

疫の変化の可能性に焦点を当て<sup>12-15)</sup>, 陰茎のマイクロバイオームでのこの変化の詳細について報告した。しかしながら多くの球状細胞は上皮内に点在し, 多くはCD8かCD68に陽性となる。対照的に, 他の白血球の量はこの陽性細胞よりさらに低かったことが推測された。サプレッサーリンパ球は上皮基底膜に沿って配列される傾向があるためリンパ球とランゲルハンス細胞の間の相互作用は免疫寛容を構成する可能性があると考えられた<sup>16)</sup>。

## 結果の紹介など

口腔組織を中心に各粘膜組織に焦点を当て, CD1a陽性ランゲルハンス細胞, CD8陽性Tリンパ球, CD68陽性マクロファージについて組織学的評価を行い, その出現数と部位による有意差を検索した。なお当研究は1995年のヘルシンキ宣言の条項に則り, 東京歯科大学倫理委員会の承認を得て行われた。

## 手法と目的

献体試料 動脈より保存処置を行った高齢(平均年齢89歳)の8体のヒト男性保存遺体を対象に検索を行った。組織固定については10%ホルマリン溶液と50%エタノール溶液を使用した。

組織検索部位 舌下線付近の口腔底, 下唇, 眼瞼結膜, 歯状縁より2cm下の肛門管, 陰茎皮膚の冠状溝を観察した。採取した標本は通法に従いパラフィン包埋を行い, 10 $\mu$ mの連続切片を作成した。すべての試料についてH-E染色を行ったのち, 免疫組織化学的染色を行った。

免疫染色 通法に従い下記のごとく行った。

マウスモノクローナル抗ヒトCD1a抗体  
(1:100; Dako N1616; Dako, Glostrup, Denmark)

マウスモノクローナル抗ヒト抗体CD8  
(1:100; Dako N1592)

マウスモノクローナル抗ヒト抗体CD68 KP1  
(1:100 Dako M0814)

二次抗体(Dako Chem Mate Envision Kit, Dako)はHRP標識され, 抗原抗体反応はHRP触媒反応があるジアミノベンジジンを介して追跡された。すべての試料はヘマトキシリンにて対比染色された。一次抗体のない陰性対象群は各々の標本に応じて作製

された。

**観察方法** Nikon社製電子顕微鏡Nicon Eclipse 80(Nicon, Tokyo, Japan)を用い、対物20倍の切片画像から、細胞が高密度に存在する0.8mm四方を決定し、その部位の細胞密度を算出した。CD8陽性細胞などは粘膜下や皮下組織に限定されることが多いため、検出は上皮基底から0.2mm以内と設定し、この間にある組織内の細胞数について測定した。

**結果** 統計解析についてPASW version 18(SPSS Inc., Chiago, IL, USA)で行われた。細胞密度のデータはTukey's testで分析された。各粘膜に分布するランゲルハンス細胞については、すべての部位の細

胞密度に有意差は認められなかった。粘膜に存在するサプレッサーT細胞は、肛門管粘膜では極端に少なく、口腔底と下唇、口腔底と肛門管、下唇と陰茎、眼瞼結膜と肛門管、肛門管と陰茎の間に有意に差を認めた。各部位におけるマクロファージ数は、口腔粘膜、下唇、眼瞼結膜に多く、その他には少ないことがわかった。口腔底と下唇のサプレッサーT細胞の密度は有意(相関係数 $r=0.78$ )だった。口腔と下唇粘膜のランゲルハンス細胞の密度は個人差が大きく、最大で10倍以上の差が認められた。以上の結果より、細菌とマクロファージの数には正の相関があることが示唆された。

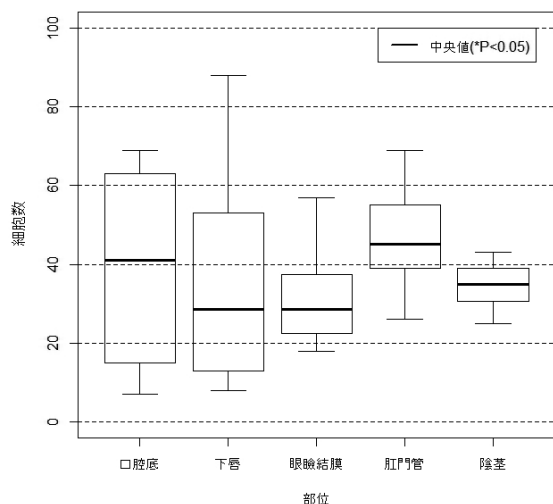


図1 CD1a陽性ランゲルハンス細胞

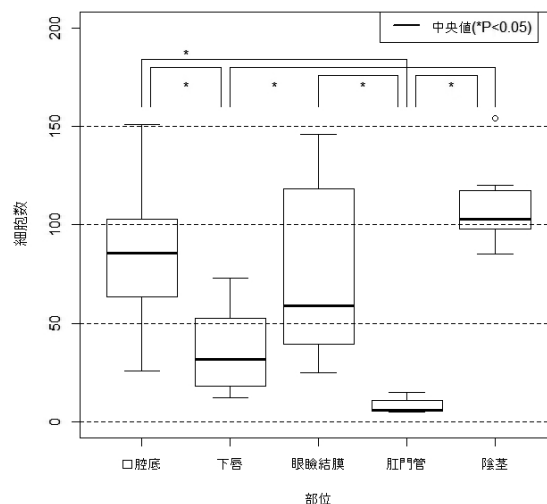


図2 CD8陽性T細胞

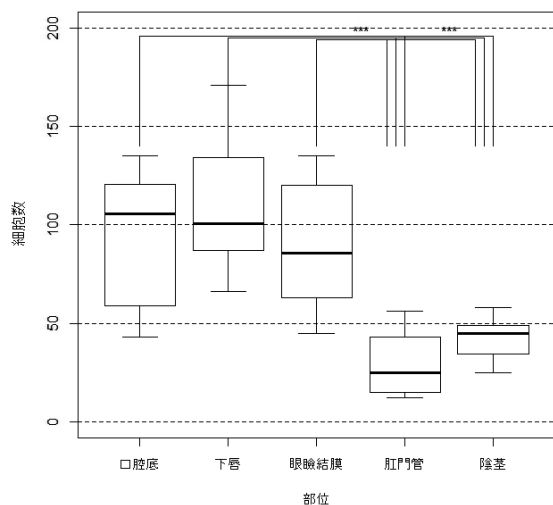


図3 CD68陽性マクロファージ

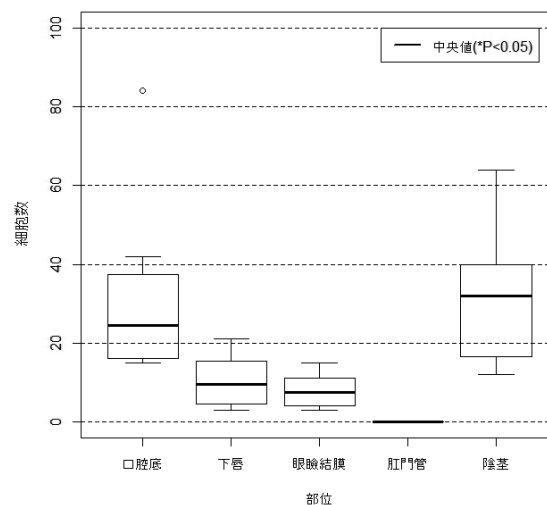


図4 CD8陽性T細胞のうち上皮に集積した細胞数

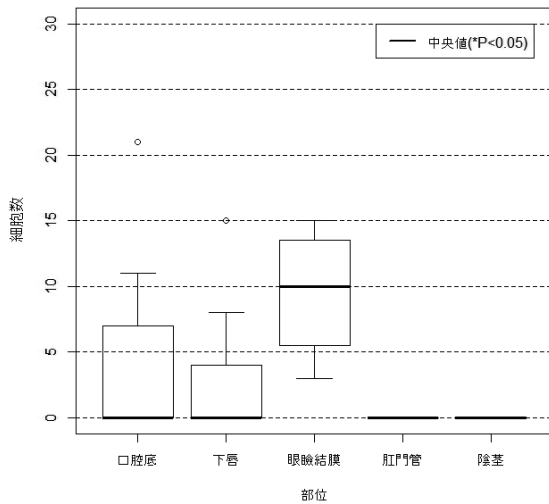


図5 CD68陽性マクロファージのうち上皮に集積した細胞数

まとめ

粘液のランゲルハンス細胞の形態の差は樹状突起を伸長させる性質があることによる。今回、CD8抗原を強く発現する細胞をサプレッサーT細胞に限局し、その染色状態を観察した。眼瞼は重層扁平上皮と重層円柱上皮、肛門管は円柱上皮と重層扁平上皮で構成されている。その中で、本研究ではすべて重層扁平上皮の部位を選択的に採取した。この理由は口腔の主な上皮は重層扁平上皮であることから、上皮の類似構造を検索することを目的としている。粘膜下や表皮下サプレッサーリンパ球は特に口腔底と陰茎皮膚において豊富であり、肛門管を除いた4部位の上皮に集積していた。結膜においては上皮へのマクロファージ移動は8検体全てで認められた。今回の結果からランゲルハンス細胞、マクロファージ、サプレッサーT細胞による口腔の免疫機能の反応性と局所の防御機能が示唆された。

文献

- 1) Cruchley AT, Williams DM, Farthing PM, Lesch CA, Squier CA : Regional variation in Langerhans cell distribution and density in normal human oral mucosa determined using monoclonal antibodies against CD 1 , HLADR, HLADQ and HLADP. *J Oral Pathol Med*, 18 : 510 - 516, 1989.
- 2) Linde N, Lederle W, Depner S, van Rooijen N, Gutschalk CM, Mueller MM : Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and activation of macrophages. *J Pathol*, 227 : 17 - 28, 2012.
- 3) Muthupalani S, Ge Z, Feng Y, Rickman B, Mobley M, McCabe A, Van Rooijen N, Fox JG : Systemic macrophage depletion inhibits Helicobacter bilis-induced proinflammatory cytokine-mediated typhocolitis and impairs bacterial colonization dynamics in a BALB/c Rag 2 - / - mouse model of inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, 80 : 4388 - 4397, 2012.
- 4) Zhou D, Chen YT, Chen F, Gallup M, Vijimasi T, Bahrami AF, Noble LB, van Rooijen N, McNamara NA : Critical involvement of macrophage infiltration in the development of Sjogren's syndrome-associated dry eye. *Am J Pathol*, 181 : 753 - 760, 2012.
- 5) Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC, Holden JA, Brammer GC, Walsh KA, McNaughtan JE, Rowler DK, Van Rooijen N, Reynolds EC : Macrophage depletion abates Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone resorption in mice. *J Immunol*, 193 : 2349 - 2362, 2014.
- 6) Schneider C, Nobs SP, Herr AK, Kurrer M, Klinke G, van Rooijen N, Vogel J, Kopf M : Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection. *PLoS Pathog*, 10 : e1004053, 2014.
- 7) Zastona Z, Przybranowski S, Wilke C, van Rooijen N, Teitz-Tennenbaum S, Osterholzer JJ, Wilkinson JE, Moore BB, Perters-Golden M : Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. *J Immunol*, 193 : 4245 - 4253, 2014.
- 8) Hwang SE, Kim JH, Yu HC, Murakami G, Cho BH : Lymphocyte subpopulations in the liver, spleen, intestines, and mesenteric nodes : an immunohistochemical study using human fetuses at 15 - 16 weeks. *Anat Rec (Hoboken)*, 297 : 1478 - 1489, 2014.
- 9) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J : Tumor angiogenesis and metastasis : correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 324 : 1 - 8, 1991.
- 10) Jaitley S, Saraswathi T : Pathophysiology of Langerhans cells. *J Oral Maxillofac Pathol*, 16 : 239 - 244, 2012.
- 11) de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MA, de Gruijl T, Piguat V, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB : Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med*, 13 : 367 - 371, 2007.
- 12) Morelli AE, Ronchetti RD, Secchi AD, Cufre MA, Paredes A, Fainboim L : Assessment by planimetry of Langerhans' cell density in penile epithelium with human papillomavirus infection : changes observed after topical treatment. *J Urol*, 147(5) : 1268 - 1273, 1992.
- 13) Balat A, Karakök M, Güler E, Uçaner N, Kiber Y : Local defense systems in the prepuce. *Scand J Urol Nephrol*, 42 : 63 - 65, 2008.
- 14) Qin Q, Zheng XY, Wang YY, Shen HF, Sun F, Ding W : Langerhans' cell density and degree of keratinization in

- foreskins of Chinese preschool boys and adults. *Int Urol Nephrol*, 41 : 747–753, 2009.
- 15) Price LB, Liu CM, Johnson KE, Aziz M, Lau MK, Bowers J, Ravel J, Keim PS, Serwadda D, Wawer MJ, Gray RH. The effects of circumcision on the penis microbiome. *PLoS One*, 5 : e8422, 2010.
- 16) Polak ME, Newell L, Taraban VY, Pickard C, Healy E, Friedmann PS, Al-Shamkhani A, Ardern-Jones MR : CD 70-CD27 interaction augments CD 8 + T-cell activation by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol*, 132 : 1636–1644, 2012.
- 本論文は、下記学位論文の内容を解説した。  
Omine Y, Hinata N, Yamamoto M, Kasahara M, Matsunaga S, Murakami G, Abe S : Regional differences in the density of Langerhans cells, CD 8-positive T lymphocytes and CD68-positive macrophages : a preliminary study using elderly donated cadavers. *Anatomy & Cell Biology*, 48 (3) : 177–187, 2015.
- 連絡先：〒101-0061 東京都千代田区神田三崎町2-9-18  
東京歯科大学解剖学講座 山本将仁