

ウシ唾液腺組織における
免疫機構の解明

坂口佳菜子

ウシ唾液腺組織における 免疫機構の解明

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

坂口佳菜子

獣医病理学教室

指導教員 教授 谷山弘行

2012 年度

目次

1 目次

2 凡例

3 第 I 章 緒言

4 第 II 章 ウシ唾液腺の組織学的検索

1. 序文

2. 材料と方法

2-1. 供試動物

2-2. 組織学的検索

2-3. 免疫組織学的検索

2-4. 統計解析法

3. 結果

3-1. 組織学的所見

3-1-1. HE 染色

3-1-2. PAS 反応, AB 染色

3-1-3. MGP 染色ならびに形質細胞数の計測

3-2. 免疫組織化学的所見

4. 考察

5. 小括

5 第III章 ウシ唾液腺における pIgR 発現の分子生物学的検索

1. 序文
2. 材料と方法
 - 2-1. 組織材料の採取
 - 2-2. RT-PCR 法
 - 2-3. ウェスタンブロッティング法
 - 2-4. ゲル内消化法
 - 2-5. Nano-LC-Q-TOF-MS 法
3. 結果
 - 3-1. RT-PCR 法による結果
 - 3-2. ウェスタンブロッティング法による結果
 - 3-3. Nano-LC-Q-TOF-MS 法による結果
4. 考察
5. 小括

6 第IV章 ウシ唾液腺における pIgR を介した IgA 分泌能

1. 序文
2. 材料と方法
 - 2-1. 供試動物
 - 2-2. 免疫組織化学的検索
 - 2-3. 統計解析法
3. 結果
 - 3-1. 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的所見
 - 3-2. 抗ウシ IgA 抗体, 抗ウシ IgM 抗体および抗ウシ IgG 抗体を用いた免疫組織化学的所見
4. 考察
5. 小括

7 第V章 ウシ全身粘膜ならびに腺組織における pIgR を介した IgA 分泌能

1. 序文

2. 材料と方法

2-1. 供試動物

2-2. 組織学的検索

2-3. 免疫組織化学的検索

2-4. 抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞数の計測

3. 結果

3-1. 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的所見

3-2. 抗ウシ IgA 抗体を用いた免疫組織化学的所見

4. 考察

5. 小括

8 総括

9 謝辞

10 文献

凡例

AB : alcian blue

ABC : avidin-biotinylated peroxidase complex method

BALT : bronchial-associated lymphoid tissue

CBB: coomassie brilliant blue

cDNA : complementary DNA

CK : cytokeratin

CMIS : common mucosal immune system

dNTP : deoxynucleotide triphosphate

DTT : dithiothreitol

GALT : gut-associated lymphoid tissue

HE : hematoxylin and eosin

HRP : horseradish peroxidase

IFN : interferon

IgA : immunoglobulin A

IgG : immunoglobulin G

IgM : immunoglobulin M

IHC : immunohistochemistry

IL : interleukin

MAMPs : microbial-associated molecular patterns

MGP : methyl green-pyronin

mRNA : messenger RNA

NALT : nasal cavity-associated lymphoid tissue

Nano-LC-Q-TOF-MS : nano-liquid chromatography quadruple time-of-flight mass spectrometry

PAS : periodic acid-Schiff

PBS : phosphate-buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

pIgR : polymeric Immunoglobulin receptor

PVDF : polyvinylidene difluoride

RT-PCR : reverse transcription-PCR

SC : secretory component

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

TAE : tris-acetate-EDTA

TLR : toll-like receptor

TNF : tumor necrosis factor

VFA : volatile fatty acids

WB : western blotting

第 I 章 緒言

ヒトや動物には、外敵から身体を守るために免疫系が備わっている。多くのウイルスや病原菌の侵入口である粘膜面には効果的な「粘膜免疫」が存在し、抗原特異的な分泌型 IgA の応答や細胞障害性 T 細胞を誘導する [33, 56].

各々の粘膜組織は共通粘膜免疫機構 (CMIS) により関連性を持ち、ある粘膜組織で誘導された IgA 産生形質細胞や細胞障害性 T 細胞は他の粘膜組織にも帰巢 (ホーミング) する [13, 14, 18, 29, 33, 56]. 特に分泌型 IgA 産生形質細胞は、鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) , 気管支関連リンパ組織 (BALT) , 腸管関連リンパ組織 (GALT) などの誘導組織で誘導され、実効組織にホーミングする。実効組織には唾液腺を含め、涙腺、呼吸器粘膜、腸管粘膜、乳腺、泌尿生殖器などがある [13, 14, 18, 29]. 抗原により直接暴露された粘膜組織においては最も強いホーミングおよび免疫応答がみられ、それに準じた免疫応答が隣接する腺ならびに粘膜組織にも波及する。鼻咽頭や腸管粘膜からの抗原は、それぞれパイエル板や NALT/BALT の M 細胞に取り込まれ、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に送られ、その後、抗原提示細胞によって局所の B 細胞および T 細胞に提示される。感作された B 細胞および T 細胞はホーミングを開始し、体内を循環した後に再び各実効組織に到達する [13, 14].

形質細胞によって合成、分泌された多量体 IgA は、上皮細胞の基底側の細胞膜に発現する polymeric Ig receptor (pIgR) と結合し、細胞内輸送により粘膜・管腔側に移動する [4, 13, 14]. 粘膜・管腔側に移動した多量体 IgA と pIgR の複合体は、pIgR の細胞外領域が切断され、分泌型 IgA として管腔内に分泌される。分泌型 IgA の一部である pIgR は secretory component (SC) と呼ばれる。多量体 IgA と複合体を形成しない pIgR もまた、基底側から管腔側に移動し free-SC として分泌され、この分泌型 IgA ならびに free-SC は侵入したウイルス、細菌、細菌毒素、アレルゲンなどと免疫結合体を作り、これらを排除する機能を持つ [4, 13, 14, 18, 29].

ヒトやラットでは、3 大唾液腺 (舌下腺、下顎腺および耳下腺) における免疫グロブリン産生形質細胞の分布ならびに唾液腺における pIgR 発現が確認され、いず

れの唾液腺からも唾液中に IgA を分泌している [12, 16, 34, 52, 59]. ヒトと同様, ウシにおいても Mach と Pahud (1971) により口腔内の混合唾液, 鼻汁, 涙液において分泌型 IgA が豊富に含まれていることが報告されており, ウシの下顎腺組織培養において分泌型 IgA の合成も確認されている [27, 37]. しかし, Cripps et al. (1976) はヒツジの下顎腺は IgA を分泌するが, 耳下腺は分泌していないと報告しており, 唾液腺の種類によって IgA 分泌の仕組みが異なる可能性が示唆されている [19].

ウシはヒトやラット, マウスと異なり, 4つの胃を有する複胃動物であり, 食物の消化方法も単胃動物と大きく異なる. このうちルーメンと呼ばれる第一胃が最も大きく, ルーメン内には多くの種類の細菌や原生動物などの微生物が棲んでいる. この微生物の中にはセルロースを分解する酵素 (セルラーゼ) を持つものがおり, ウシが食べた草やデンプンを発酵分解し, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸を主体とする揮発性脂肪酸 (VFA) を産生する [20]. VFA はルーメン壁から吸収され, ウシのエネルギー要求量の 60~80%をこの VFA が賄っていると考えられている [20]. このように, ルーメン内微生物との共生は, ウシを初めとする反芻動物に見られる栄養学的特性であり, 消化管から吸収されるブドウ糖を主なエネルギー源として利用している単胃動物とは大きく異なる.

ウシは1日におよそ 100~180L もの唾液を分泌し, ルーメン内 pH の維持, 適度な水分を補い, ルーメン内微生物による発酵消化を円滑に行い, 自身の健康を維持するために重要な役割を果たしている [6-8, 20, 32]. このように唾液の機能は特に反芻動物では重要であり, かつ自然免疫あるいは獲得免疫の実効器官として重要であることは論をまたない. しかし, ウシの唾液腺における研究は乏しく, 下顎腺と耳下腺の唾液中の分泌型 IgA の有無についての研究報告はあるが, 舌下腺を含めた3大唾液腺における免疫学的役割について組織学, 免疫組織化学, 生化学および分子生物学的分析手法を用いて多角的に検討した報告はされていない. 本研究では, ウシの3大唾液腺 (舌下腺, 下顎腺および耳下腺) の免疫機能を明らかにするため以下の研究を行った. なお, 第II章~IV章の検索に用いた各症例の臨床情報は Table 1 にまとめて示した.

第Ⅱ章ではウシの舌下腺, 下顎腺および耳下腺の組織学的特徴を明確にするため, 頭部に病変を認めない成牛 16 頭の 3 大唾液腺組織を用いて組織学的ならびに免疫組織化学的検索を行った。また, 各唾液腺に分布する形質細胞数の差を明らかにするために, 特殊染色 (MGP 染色) により形質細胞を染色し, 一視野 (×400) 当りにおける平均形質細胞数を求め統計解析を行った。

第Ⅲ章ではウシの舌下腺, 下顎腺および耳下腺における IgA の分泌能を検討するため, 成牛の各唾液腺組織乳剤を用いて多量体免疫グロブリンの輸送を行う pIgR の発現を検索した。まず, RT-PCR 法により各唾液腺組織における pIgR mRNA の発現を解析した。続いて抗ヒト pIgR 抗体 (SC-300, Santa Cruz) を用いてウェスタンブロッティング法により各唾液腺組織における pIgR 蛋白の検出を行い, 最終的に抗ヒト pIgR 抗体陽性蛋白を Nano-LC-Q-TOF-MS 法によるアミノ酸配列の同定を行った。

第Ⅳ章では, 前述の抗ヒト pIgR 抗体を用いて免疫組織化学的に唾液腺組織における pIgR の分布と細胞内局在を検索した。また, 抗ウシ IgA 抗体, 抗ウシ IgM 抗体, 抗ウシ IgG 抗体 (すべて Bethyl Laboratories) を用いて各唾液腺組織に分布する形質細胞が発現する免疫グロブリンのアイソタイプを確認し, 第Ⅱ章と同様, 一視野 (×400) 当りにおける各アイソタイプの平均免疫グロブリン陽性形質細胞数を求め統計解析を行った。

第Ⅴ章では, ウシの唾液腺以外の全身粘膜ならびに腺組織における pIgR を介した IgA の分泌能を検討するため, 前述の抗ヒト pIgR 抗体ならびに抗ウシ IgA 抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った。

Table 1. 検索に用いた症例

No.	年齢	雌雄	主訴, その他の所見	(2)*	(3)*		(4)*
					PCR	WB	IHC
1	2y	F	第四胃変位術創部の線維性癒着	+			+
2	2y	F	壊死性乳房炎		+	+	+
3	3y	F	仙椎骨折, 肺炎	+			+
4	3y	F	股関節脱臼	+		+	+
5	4y	F	後肢筋断裂		+		
6	4y	F	仙椎骨折, 化膿性子宮内膜炎		+		
7	4y	F	大腿骨頭靭帯断裂	+			+
8	4y	F	股関節脱臼	+			+
9	4y	F	後肢皮下膿瘍	+			
10	4y	F	化膿性子宮内膜炎	+			+
11	4y	F	化膿性乳房炎, 肋骨骨折	+			+
12	5y	F	大腿骨頭靭帯断裂	+		+	+
13	5y	F	肺膿瘍	+			+
14	5y	F	浅趾屈筋・腓腹筋線維化	+		+	+
15	5y	F	浅趾屈筋・腓腹筋断裂, 腹腔内膿瘍	+		+	+
16	6y	F	腓腹筋断裂	+			+
17	6y	F	第四胃変位術創部の線維性癒着	+			+
18	7y	F	大腿骨頭靭帯断裂	+			+
19	7y	F	膀胱粘膜ポリープ状腫瘤	+			+
20	10y	M	頸部皮下組織に間葉系腫瘤		+		
21	15y	F	第四胃変位術創部の線維性癒着			+	+

* (2), (3), (4) はそれぞれ第II章, III章, IV章で用いた症例 (+) を記している. 症例 No. 20 を除くすべてがホルスタイン種の乳牛 (雌) である. No. 20 は繁殖用牛として飼育されていたホルスタイン種の種牛 (雄) である. WB, ウェスタンブロッティング法. IHC, 免疫組織化学的検索.

第II章 ウシ唾液腺の組織学的検索

1. 序文

ほ乳類の唾液腺は大唾液腺と小唾液腺に大別される。大唾液腺は長い導管系によって腺体は導管の開口部位から離れた場所に大きな腺塊を作る [21, 62]。その存在部位によって、舌下腺，下顎腺および耳下腺と呼ばれ，これらをまとめて3大唾液腺と呼ぶ。一方，小唾液腺は導管系の発達がさほど著明でなく，導管開口部に近い粘膜固有層または粘膜下組織内に局在する。小唾液腺もその存在部位によって口唇腺，前舌腺または前突腺，舌根腺，小舌下腺，口蓋腺，頬腺などが区別される。唾液腺実質は導管と腺房からなり，それらを構成している細胞には導管上皮細胞，腺細胞（粘液性ならびに漿液性），筋上皮細胞および導管基底細胞の4種類がある [62]。特に3大唾液腺は組織構築上，次に示すような共通する特徴を有している。

- 1) 終末部と導管が区別され，両者を合わせて小葉という顕微鏡的なまとまりを作る。
- 2) 終末部は1または2種の腺細胞より成る。2種の場合，両細胞種は無秩序に混在せず，漿液性腺細胞が腺房の辺縁に集まり，半月を作り非漿液性（粘液性）腺細胞が中心部に集まる。
- 3) 導管は小葉内で介在部，線条部に分化する。
- 4) 腺房終末部と導管には筋上皮細胞がある。

また，以前は筋上皮細胞と基底細胞は混同されていたが，超微形態，免疫組織化学技術の進歩により，これらの細胞は形態，機能的に異なることが明らかにされ，現在では筋上皮細胞と導管基底細胞に区別されている [42, 62, 63]。

ウシの唾液腺組織は，腺房を構成する腺細胞の HE, PAS および mucicarmine の染色性によって，漿液性腺，粘液性腺および混合腺に分類されている [32, 62]。漿液性腺の腺房は小さく，腺細胞の細胞質は PAS ならびに mucicarmine 陰性を示し，腺組織の中に粘液細胞はみられない。一方，粘液性腺の腺房は漿液性のものよりも大きく，腺細胞の細胞質は PAS ならびに mucicarmine 陽性顆粒が細胞内に広がる。そして混合腺は漿液性腺と粘液性腺が混在し，PAS ならびに mucicarmine 陽性顆粒

を含む大きめの粘液性腺細胞は、PAS ならびに mucicarmine 陰性の漿液性半月細胞で覆われる。ウシの耳下腺は漿液性腺細胞のみからなり、下顎腺は漿液性と粘液性腺細胞が均一に存在するが、舌下腺は漿液性腺細胞が少なく粘液性腺優位である。すなわち、耳下腺は漿液腺、下顎腺および舌下腺は混合腺に区分される。

唾液腺は唾液中の主な免疫グロブリンの供給源として、口腔内免疫において重要な役割を果たしており、ヒトやラットではいずれの大唾液腺からも免疫グロブリンが分泌されている [12, 16, 34, 52, 59]。形質細胞は、主に外来抗原刺激に反応して B リンパ球から分化し、炎症の局所やリンパ節、扁桃、脾臓といった二次リンパ組織に分布するが、一部は粘膜関連リンパ組織と呼ばれる消化管上皮、粘膜組織など外界に直接暴露されている広大な粘膜面にも移動する [13, 14, 18, 29, 33, 56]。粘膜関連リンパ組織を主体とする粘膜免疫系で刺激されたリンパ球は、特異的な接着分子の発現により全身の特定の粘膜免疫系組織に移動することができ、唾液腺もその一つの間と考えられている。

本章では、頭部に炎症や腫瘍性病変などの異常を認めないウシ（ホルスタイン種）16 頭の舌下腺、下顎腺および耳下腺について組織学的に観察した後、形質細胞の RNA 活性を利用した MGP 染色により、形質細胞を特異的に染色し各唾液腺組織に分布する形質細胞数を計測した。各唾液腺組織の一定範囲内に分布する形質細胞数の平均値を求め統計学的に解析を行い、それぞれの唾液腺における免疫機能について考察した。また抗 Keratin (AE1/AE3)、抗 cytokeratin14 (CK14) および抗 α -smooth muscle chain (α -SMA) 抗体を用いた免疫組織化学的検索により正常なウシの唾液腺構造を検索した。

2. 材料と方法

2-1. 供試動物

本学で剖検に供されたホルスタイン種ウシ, 2-7 歳の 16 頭からそれぞれ舌下腺, 下顎腺および耳下腺を採取し, 検索に用いた (Table 1). いずれの症例も病理解剖学的ならびに病理組織学的に, 唾液腺やその周囲組織において炎症または腫瘍などの病変は認められなかった.

2-2. 組織学的検索

全ての症例の唾液腺組織は 10%ホルマリン緩衝液で固定, アルコール脱水後パラフィンに包埋した. パラフィン包埋組織を 4 μm に薄切し, 常法に従い HE 染色を施した. また, 唾液腺の腺房内ならびに導管上皮細胞内の粘液基質を観察するため PAS 反応ならびに AB 染色 (pH 2.5) を行った. さらに, 形質細胞を識別しその細胞数を計測するため DNA と RNA を染め別ける MGP 染色を行った. MGP 染色では DNA はメチルグリーンにより青緑色に, RNA はピロニンによりピンク色にそれぞれ選択的に染め出され, RNA 活性が高い形質細胞は特に細胞質が濃いピンク色に染まる.

2-3. 免疫組織化学的検索

免疫組織化学的検索には酵素抗体法 (ABC 法) を用いた. 一次抗体およびそれぞれの前処置は Table 2 に示す. 免疫組織化学染色を行うにあたり, 作製したパラフィン切片をキシレンで十分に脱パラフィンした後, エチルアルコールを通し, 水洗した. 抗原賦活の目的で 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し, 電子レンジ (microwave, 500 W) を用いて 15 分間の煮沸処理を行った. 内因性ペルオキシダーゼ除去には 0.3% H_2O_2 加 PBS に 5 分浸漬した. 十分に水洗後, 非特異反応除去の目的で 10%ヤギ正常血清を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間のブロッキング処置を行った. 一次抗体を PBS で希釈して切片上にのせ, 保湿箱内で 4 $^{\circ}\text{C}$, 16 時間反応させた. 反応終了後, PBS で洗浄し, 二次抗体 (ビオチン標識抗マウス IgG 抗体, Vector

Laboratories) を切片上へのせ、室温、30 分間反応させた。その後 PBS で洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories) を切片上へのせ、室温、30 分間反応させた。反応終了後、PBS で洗浄し、0.05% 3,3-diaminobenzidine 水溶液に 5% H₂O₂ を最終濃度が 0.005% になるように加えた発色液に室温、10 分間浸漬して発色反応を行った。すべての組織の対比染色には Mayer のヘマトキシリン染色をおこなった。陰性対照では、一次抗体を省いた。

2-4. 統計解析法

MGP 染色を施した舌下腺、下顎腺および耳下腺組織は、×400 視野で 3 カ所、腺細胞周囲に分布する形質細胞数を計測した。計 16 頭の各唾液腺組織を計測し、それぞれ平均値±標準偏差を求めた。舌下腺、下顎腺および耳下腺の 3 つのグループ間の比較には SPSS 15.0J を用いて、二元配置分散分析法 (パラメトリック法) により検定を行った。P 値に関しては P < 0.05 を有意差ありとした。

Table 2. 免疫組織化学的検索に使用した抗体

抗体名(クローン名)	抗体の種類	希釈倍率	前処置	製造元
ヒト Keratin (AE1/AE3)	mAb	1:1	microwave	Nichirei, Tokyo, Japan
ヒト CK14 (LL002)	mAb	1:50	microwave	AbD serotec, Oxford, UK
ヒト α -SMA (1A4)	mAb	1:100	microwave	Dako, Denmark

mAb, モノクローナル抗体

3. 結果

3-1. 組織学的所見

3-1-1. HE 染色

舌下腺，下顎腺および耳下腺組織の導管系は共通して小葉内導管と小葉間導管が観察された．小葉内導管のうち腺房から続く介在部は背の低い単層立方上皮で構成され，基底側に円形から楕円形核が位置していた (Figs. 1, 2, 3 [i])．線条部は背の高い単層円柱上皮で構成され，円形の核が中央から管腔側に位置し，基底部に明瞭な線条構造が認められた (Figs. 1, 2, 3 [s])．舌下腺では腺房から続く介在部導管は少なく不明瞭であった．一方，下顎腺および耳下腺では比較的長く発達した介在部導管が明瞭に観察された．

HE 染色において舌下腺の腺房は主に粘液性と漿液性の2種類の腺細胞より構成されていた (Fig. 1)．粘液性腺細胞は弱好酸性の泡沫状細胞質を有し，核は扁平で基底側に偏在していた．漿液性腺細胞は好酸性細胞質で，管腔側によりエオジン好性の小顆粒が観察された．核は円形から楕円形で，粘液性腺細胞と混合し，腺房の奥に位置し不明瞭な半月状を形成していた．線条部導管周囲に局限して漿液性腺細胞のみから成る腺房も認められるが，数は2種混合の腺房に比べると圧倒的に少なかった．また，舌下腺の腺房や導管周囲には多数の形質細胞浸潤が認められた．形質細胞は線条部導管周囲の腺房に分布する傾向が認められた．

下顎腺の腺房もまた，粘液性ならびに漿液性の2種類の細胞より構成されていた (Fig. 2)．粘液性腺細胞は舌下腺のものよりも明るく，泡沫状の微弱好酸性細胞質を有し，核は扁平で細胞の基底側に偏在していた．漿液性腺細胞は，腺房の奥に明瞭な半月状を成して存在し，漿液性腺細胞の細胞質は好酸性顆粒状に染まるのが観察された．核は円形から楕円形で細胞の基底側に偏在していた．下顎腺においても腺房や導管周囲間質に形質細胞の浸潤が認められるが舌下腺よりは少なかった．

耳下腺腺房は好酸性細胞質を有する漿液性腺細胞のみからなる (Fig. 3)．耳下腺では形質細胞は舌下腺や下顎腺とは異なり，腺房や導管周囲間質において稀に数個認められる程度であった．

3-1-2. PAS 反応, AB 染色

舌下腺の粘液性腺細胞は細胞質内のほとんどが網目状に PAS 強陽性に染まり、基底側にわずかに PAS 弱陽性を示す細胞質が観察された (Fig. 4). また、この網目状物質は AB 染色に陽性であった (Fig. 5). 漿液性腺細胞は細胞質が PAS 弱陽性、管腔側に PAS 強陽性を示す顆粒が見られた (Fig. 4 の矢頭). AB 染色は細胞質にわずかに陽性または陰性を示し、顆粒は陰性であった (Fig. 5 の矢頭).

下顎腺の粘液性腺細胞もまた網目状に PAS 陽性に染まり AB 染色においても同様に網目状に陽性を示していた (Figs. 6, 7). 漿液性腺細胞は細胞質が顆粒状に PAS 強陽性に染まるが、AB 染色は弱陽性であった.

耳下腺では、腺細胞の細胞質は PAS に弱陽性反応を示し、AB 染色は陰性であった (Figs. 8, 9).

3-1-3. MGP 染色ならびに形質細胞数の計測

舌下腺では多数の MGP 陽性形質細胞の浸潤が認められた (Fig.10A). 下顎腺においても腺房や導管周囲間質に MGP 陽性形質細胞の浸潤が認められた (Fig.10B). 耳下腺では腺房や導管周囲間質において、MGP 陽性形質細胞は稀に数個認められる程度であった (Fig.10C).

舌下腺、下顎腺および耳下腺に分布する一視野 ($\times 400$) 当りの形質細胞数 (平均値 \pm 標準偏差) は舌下腺 (126.9 ± 17.5) で最も多く、下顎腺 (29.1 ± 8.0) ならびに耳下腺 (3.0 ± 2.4) に比べて有意な差が得られた ($P < 0.05$). また下顎腺においても、一視野当りにおける形質細胞数の平均は耳下腺に比べて有意に多かった ($P < 0.05$). 耳下腺における一視野当りの平均形質細胞数は 3 大唾液腺のなかで最も少なかった. 各唾液腺における MGP 陽性形質細胞数の一視野当りにおける平均値をグラフに表した (Fig. 10D).

3-2. 免疫組織化学的所見

舌下腺，下顎腺および耳下腺組織において，上皮細胞マーカーの Keratin (AE1/AE3) は導管上皮の細胞質に瀰漫性に陽性を示し，特に介在部の上皮に強く染まっていた (Figs. 11, 12, 13). また，舌下腺ならびに下顎腺の漿液性腺細胞は，細胞質辺縁部 (細胞膜) に陽性像を認めたが，粘液性腺細胞では陽性像は認められなかった. 耳下腺の腺細胞は細胞質に瀰漫性に弱陽性像が認められた.

舌下腺，下顎腺および耳下腺組織の小葉間導管から小葉内線条部導管にかけて，導管基底側に CK14 陽性細胞が多数認められた (Fig. 14). また，舌下腺ならびに下顎腺では介在部の上皮基底側に CK14 陽性細胞が認められた (Fig. 15).

平滑筋マーカーである α -SMA は舌下腺，下顎腺および耳下腺組織において腺房終末部から介在部導管にかけて腺房や導管の基底側に，それらを取り囲む扁平細胞に陽性像が認められた (Figs. 16, 17, 18). 一方，線条部から小葉間導管では α -SMA 陽性細胞は認められなかった.

また，一次抗体を省いた全ての陰性対照の組織では陽性像は認められなかった.

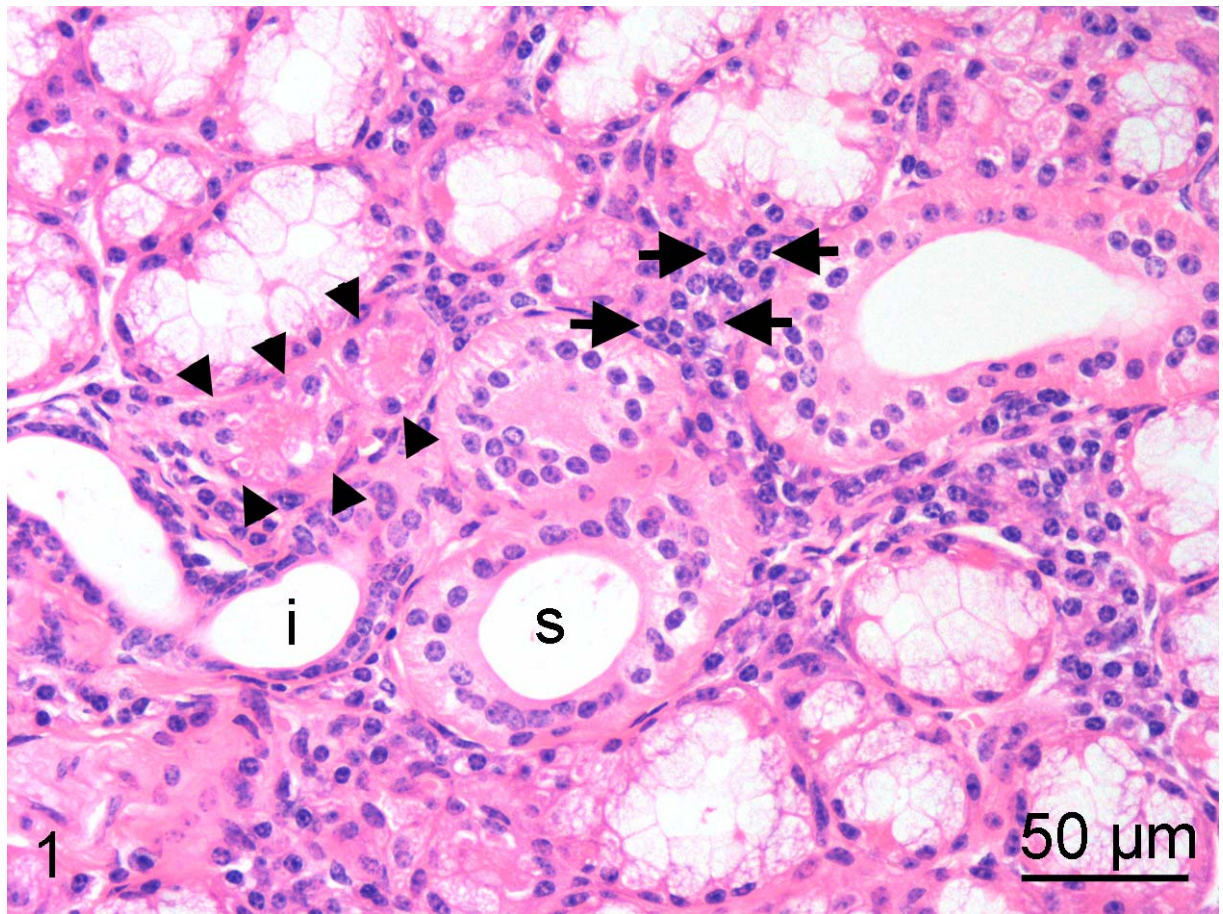


Fig. 1. ウシの舌下腺. HE 染色.

介在部導管 (i) は背の低い単層立方上皮, 線条部導管 (s) は背の高い単層円柱上皮で基底部に明瞭な線条構造を認める. 舌下腺の腺細胞は明るい細胞質を有する粘液性と好酸性細胞質を有する漿液性の2つの細胞から成る. 漿液性腺細胞は腺房の奥に位置し, 漿液半月は不明瞭である. 線条部導管周囲に局限して漿液性腺細胞のみから成る漿液性腺房が観察される (矢頭). 腺房ならびに導管周囲間質には多数の形質細胞浸潤が認められる (矢印).

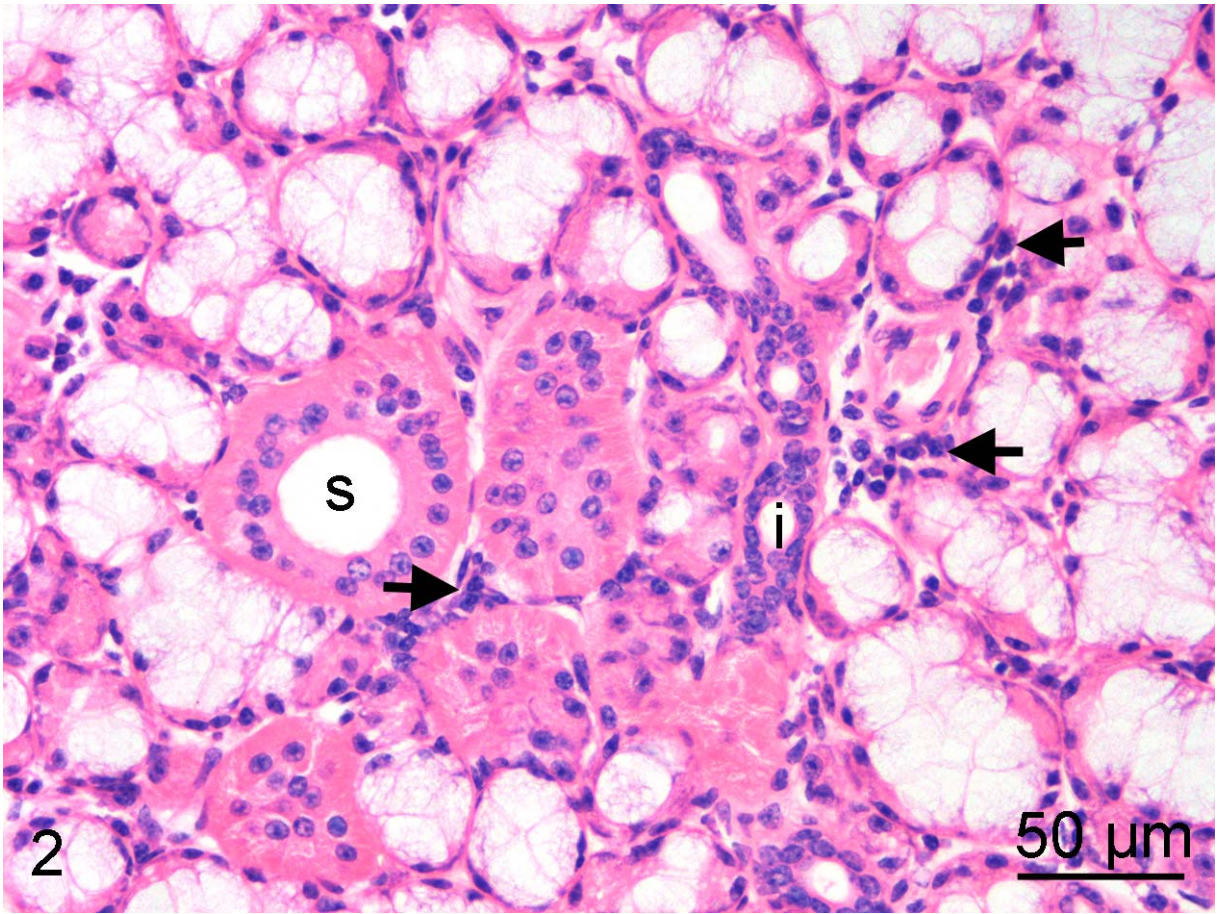


Fig. 2. ウシの下顎腺. HE 染色.

介在部導管 (i) は背の低い単層立方上皮, 線条部導管 (s) は背の高い単層円柱上皮で基底部に明瞭な線条構造を認める. 下顎腺の腺房は舌下腺よりも明るい粘液性腺細胞と好酸性顆粒状細胞質の漿液性腺細胞からなる. 漿液性半月は明瞭である. 腺房ならびに導管周囲間質には形質細胞の浸潤が見られる (矢印).

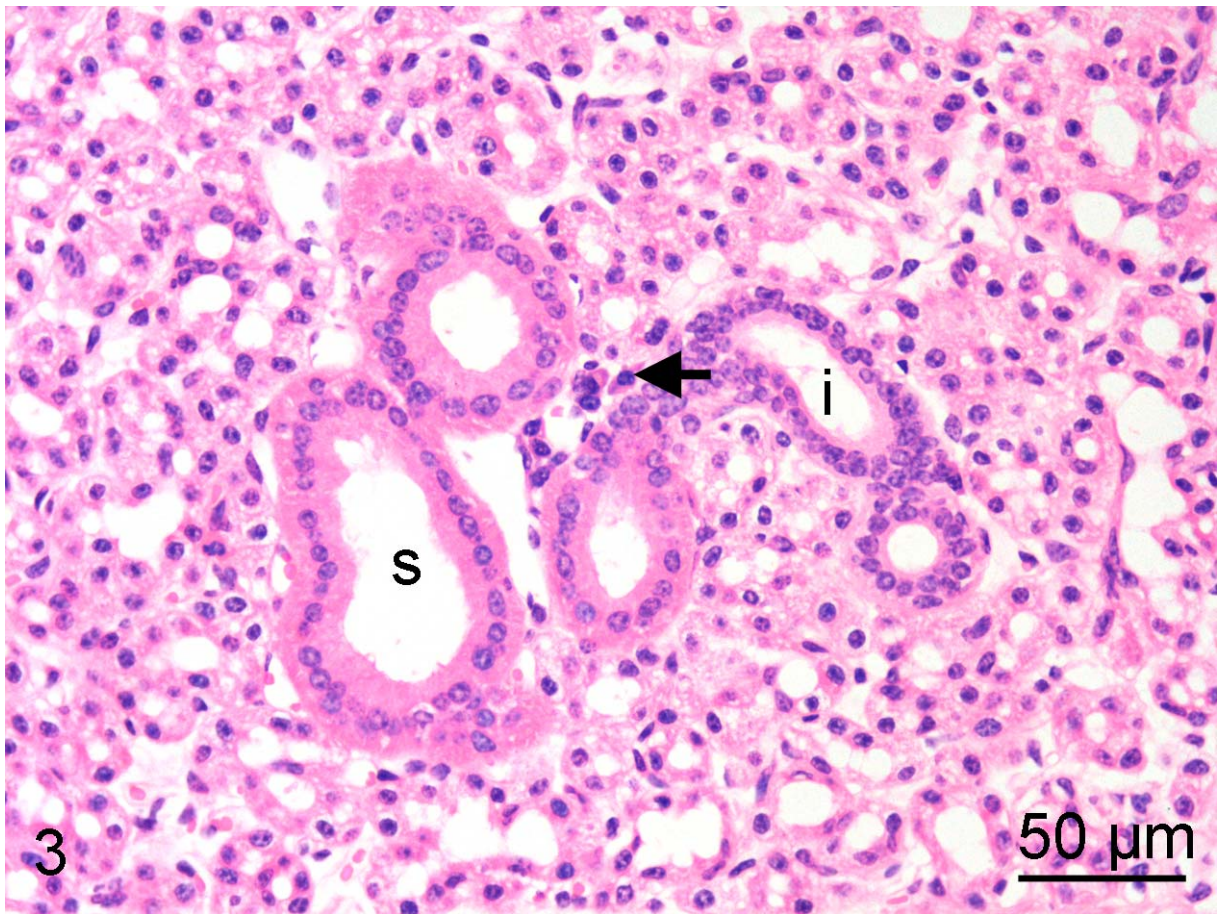


Fig. 3. ウシの耳下腺. HE 染色.

介在部導管 (i) は背の低い単層立方上皮, 線条部導管 (s) は背の高い単層円柱上皮で基底部に明瞭な線条構造を認める. 腺房は好酸性細胞質を有する漿液性腺細胞のみからなる. 間質には少数の形質細胞が観察される (矢印).

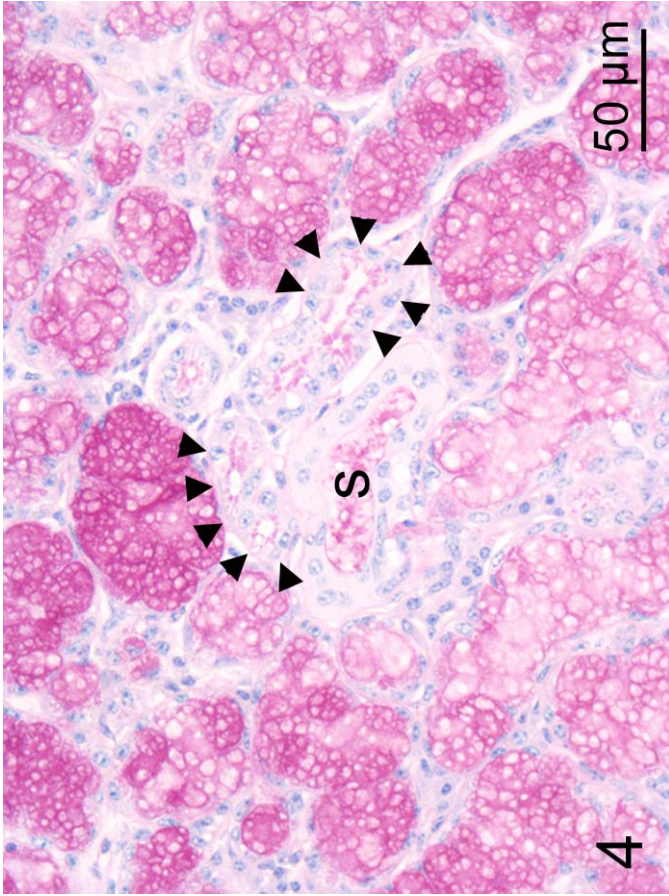


Fig. 4. 舌下腺. PAS 染色.

粘液性腺細胞は細胞質が網目状にPAS強陽性に染まる．漿液性腺細胞の細胞質はPAS弱陽性，管腔側にPAS強陽性を示す顆粒が見られる（矢頭）．（s）は線条部導管を示す．

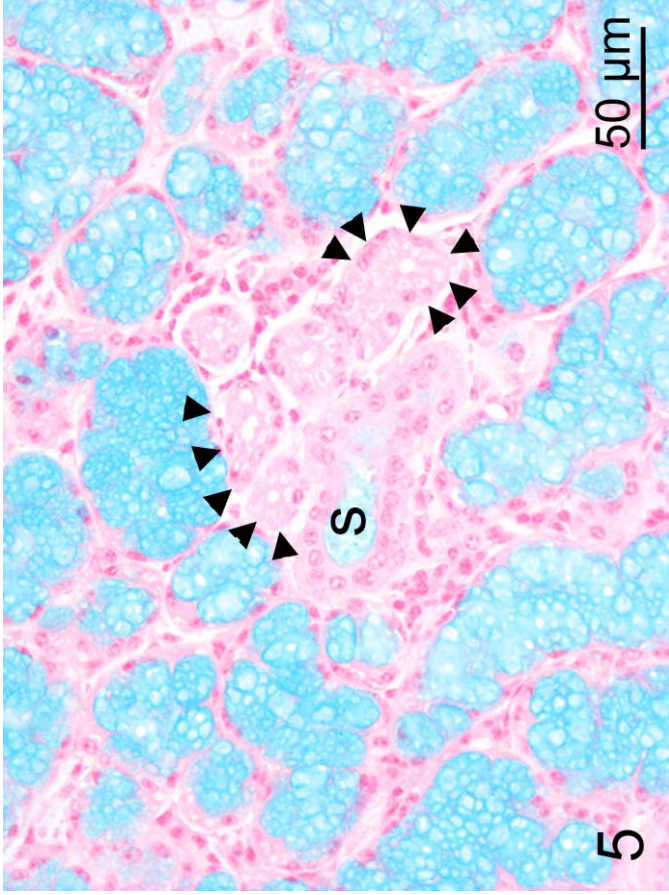


Fig. 5. 舌下腺. AB 染色.

粘液性腺細胞の細胞質は網目状にAB染色陽性である．漿液性腺細胞の細胞質，管腔側の顆粒はともに陰性である．（s）は線条部導管を示す．

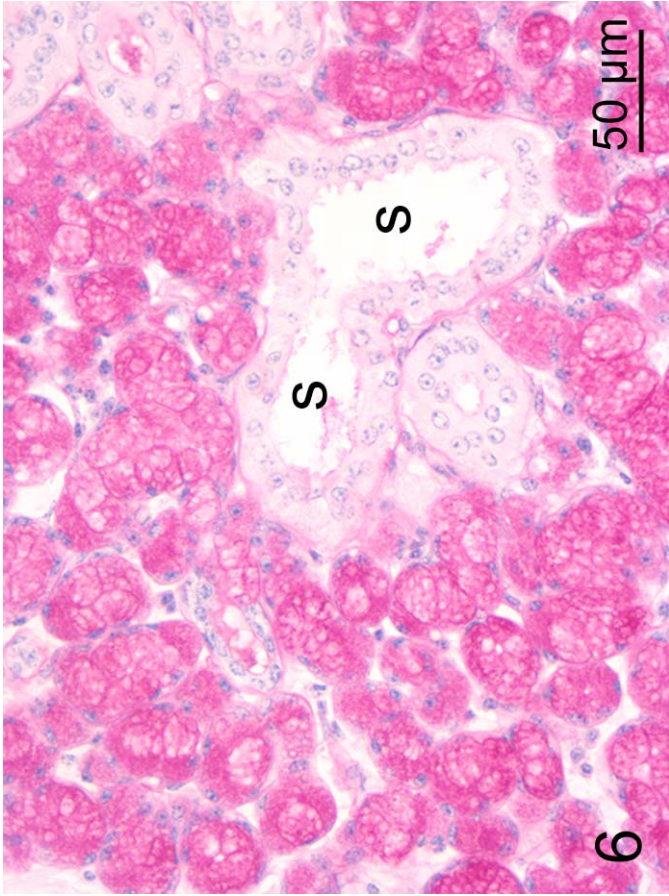


Fig. 6. 下顎腺. PAS 染色.

粘液性腺細胞は網目状に PAS 陽性に染まる. 漿液性腺細胞は細胞質が顆粒状に PAS 強陽性. (s) は線条部導管を示す.

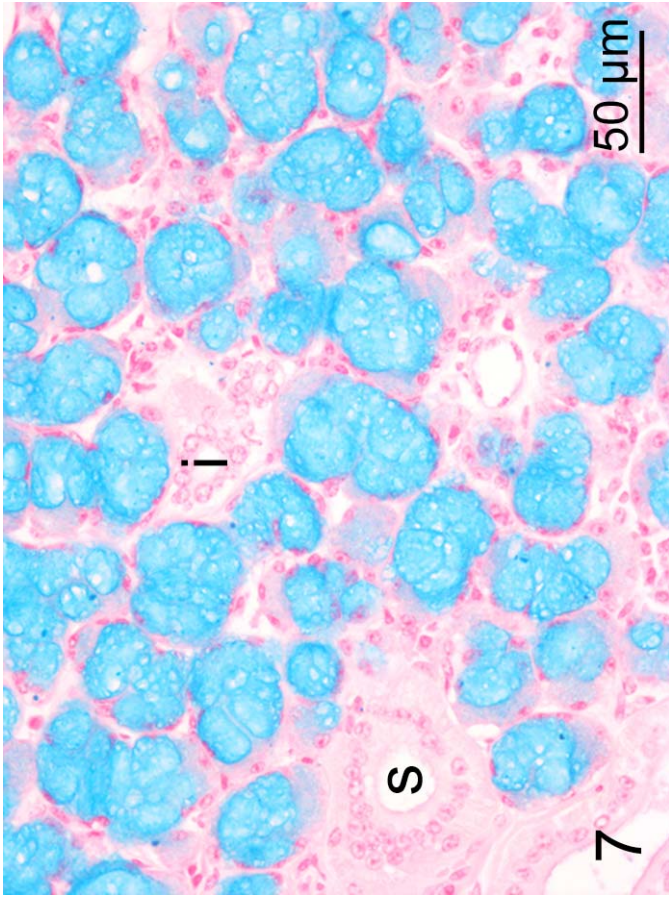


Fig. 7. 下顎腺. AB 染色.

粘液性腺細胞の細胞質は網目状に AB 染色陽性, 漿液性腺細胞の細胞質は弱陽性を呈している. (i) は介在部導管, (s) は線条部導管を示す.

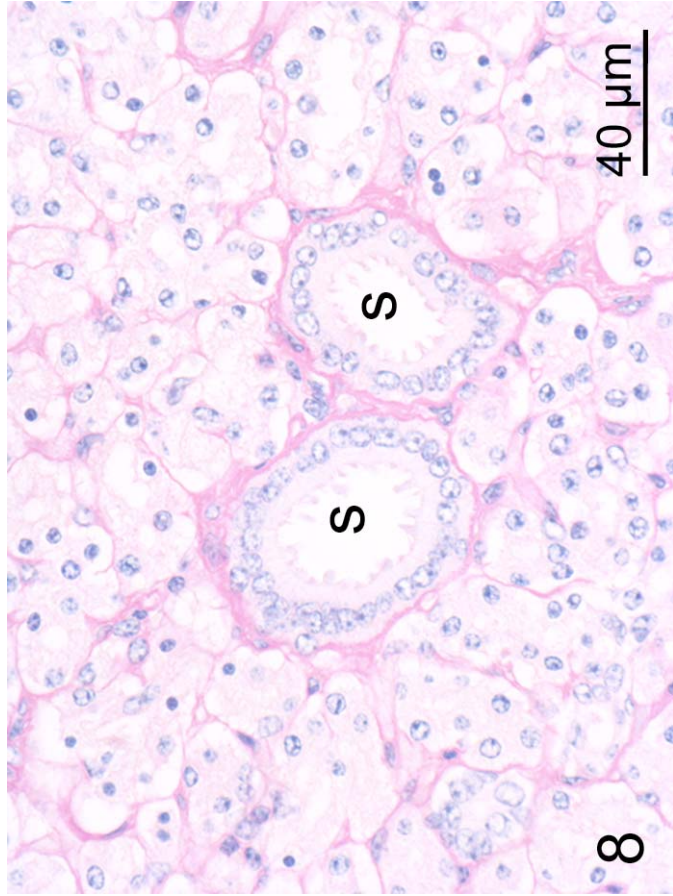


Fig. 8. 耳下腺. PAS 染色.

腺細胞の細胞質は PAS に弱陽性反応を示す. (s) は線条部導管を示す.

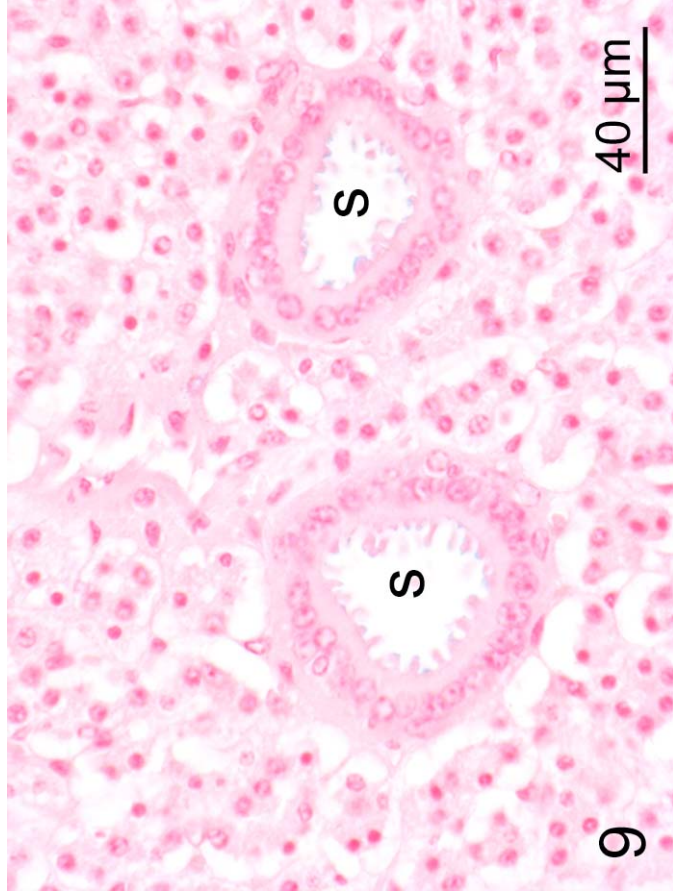


Fig. 9. 耳下腺. AB 染色.

腺細胞は AB 染色に陰性である. (s) は線条部導管を示す.

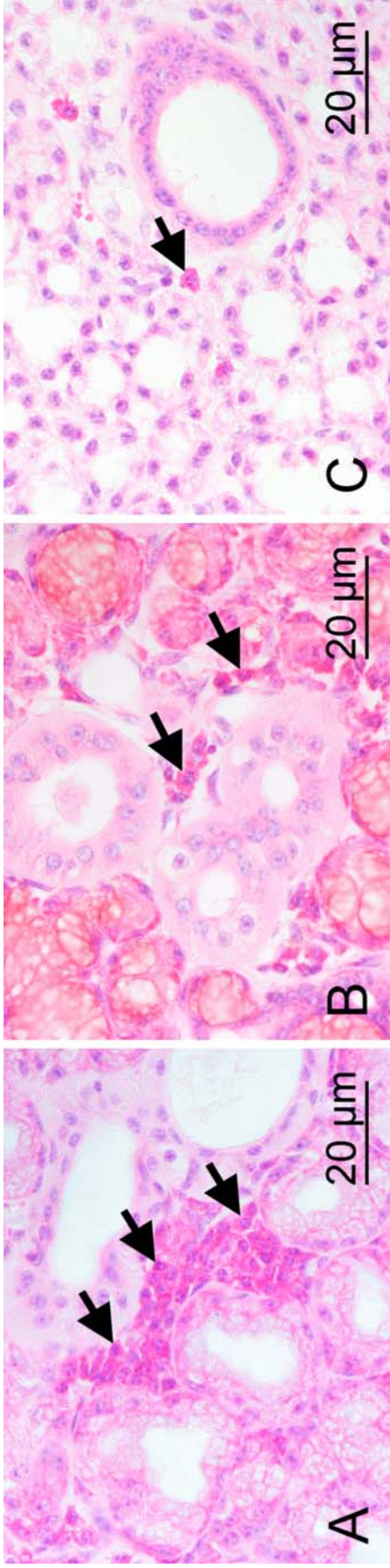
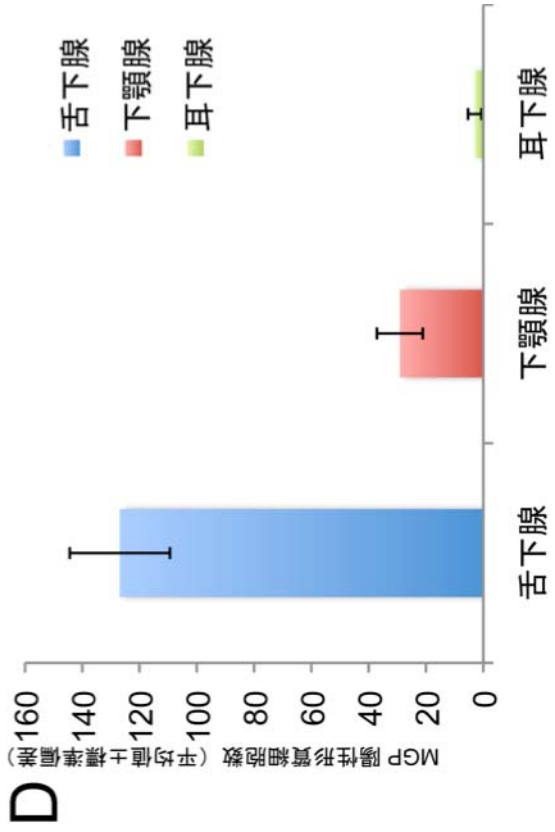


Fig. 10. 各唾液腺組織における形質細胞数の比較. MGP 染色.
 MGP 陽性形質細胞 (矢印) の浸潤は舌下腺 (A) で著しく, 下顎腺 (B) においても多数認められるが, 耳下腺 (C) は少ない.
 各唾液腺における MGP 陽性形質細胞数 (平均値±標準偏差) の比較をグラフ (D) に示す. 一視野 (×400) 当りの MGP 陽性形質細胞数は 3 大唾液腺のなかで舌下腺 (n=16) が最も多く 126.9 ± 17.5 である (P<0.05). 下顎腺 (n=16) ならびに耳下腺 (n=16) の平均値±標準偏差はそれぞれ 29.1 ± 8.0 と 3.0 ± 2.4 であり, 下顎腺は耳下腺よりも有意に多い (P<0.05).



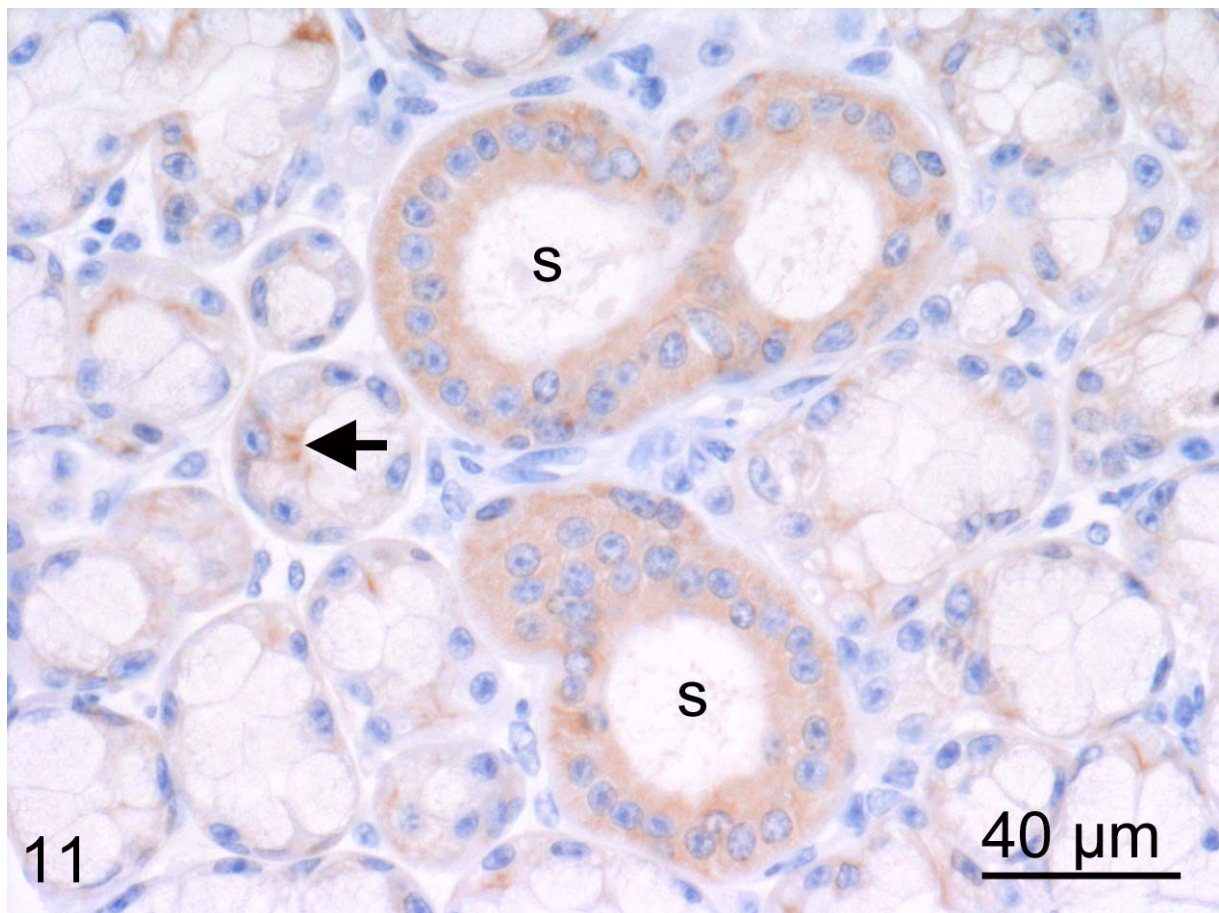


Fig. 11. 舌下腺. 抗 Keratin (AE1/AE3) 抗体を用いた免疫組織化学染色.
上皮細胞マーカーの Keratin (AE1/AE3) は線条部導管 (s) の上皮細胞質に瀰漫性に陽性を示す. 漿液性腺細胞では, 細胞質辺縁部 (矢印) に明瞭な陽性像が認められる.

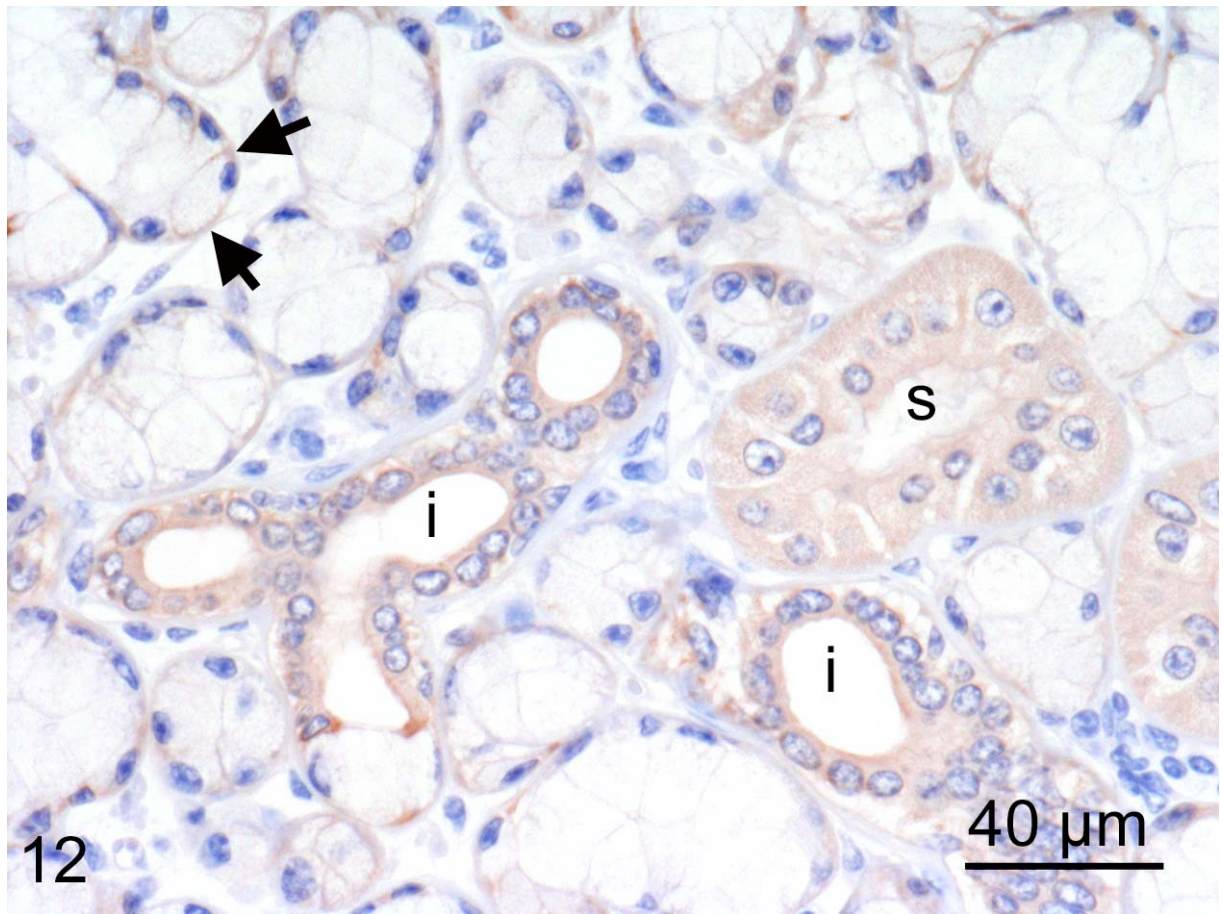


Fig. 12. 下顎腺. 抗 Keratin (AE1/AE3) 抗体を用いた免疫組織化学染色.
上皮細胞マーカーの Keratin (AE1/AE3) は線条部導管 (s) の上皮細胞質に瀰漫性に陽性を示し, 特に介在部導管の上皮 (i) に強い陽性像が認められる. 漿液性腺細胞では, 細胞質辺縁部 (矢印) に陽性像が認められる.

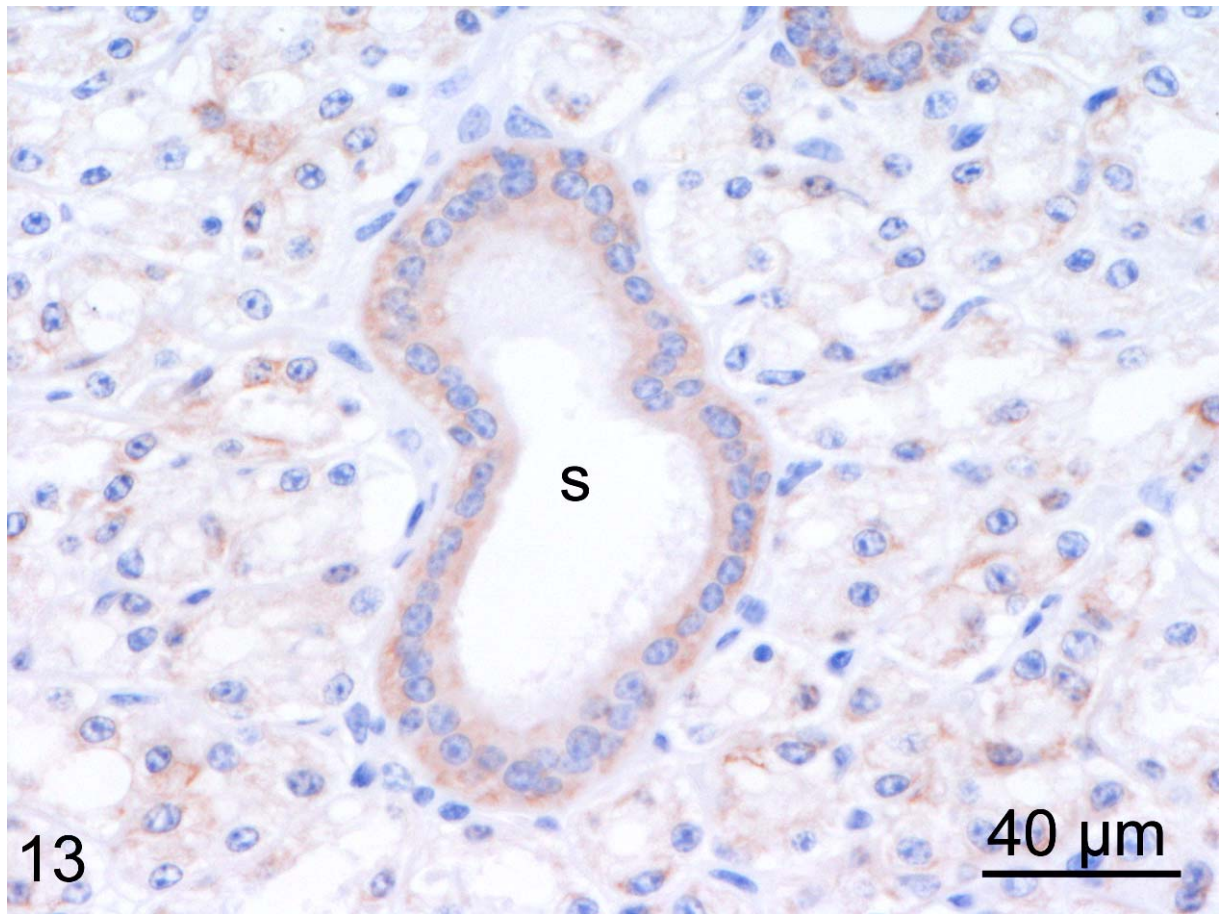


Fig. 13. 耳下腺. 抗 Keratin (AE1/AE3) 抗体を用いた免疫組織化学染色.
上皮細胞マーカーの Keratin (AE1/AE3) は線条部導管 (s) の上皮細胞質に瀰漫性に陽性を示す. 腺細胞の細胞質が瀰漫性弱陽性～辺縁部の強陽性像と様々であり, 染色性はまばらである.

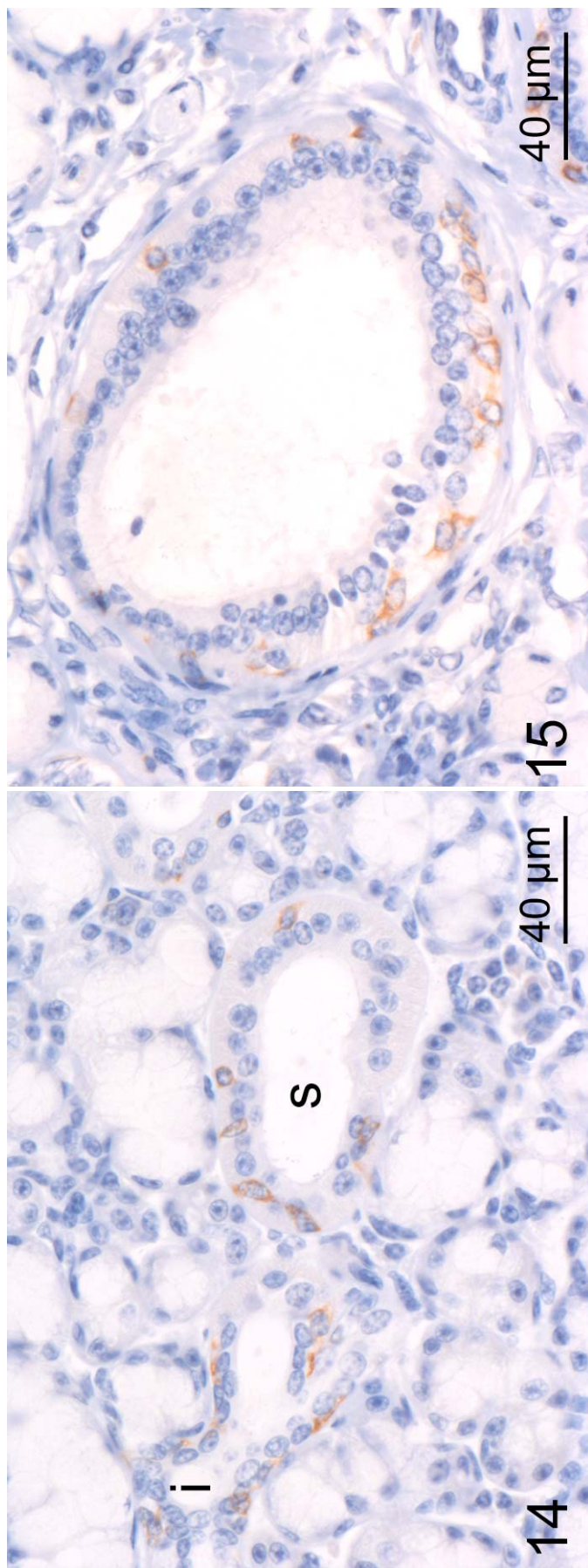


Fig. 14. 舌下腺. 抗CK14抗体を用いた免疫組織化学染色.

介在部導管 (i) ならびに線条部導管 (s) の基底側にCK14陽性細胞が多数認められる.

Fig. 15. 下顎腺. 抗CK14抗体を用いた免疫組織化学染色.

小葉間導管においても基底側にCK14陽性細胞が多数認められる.

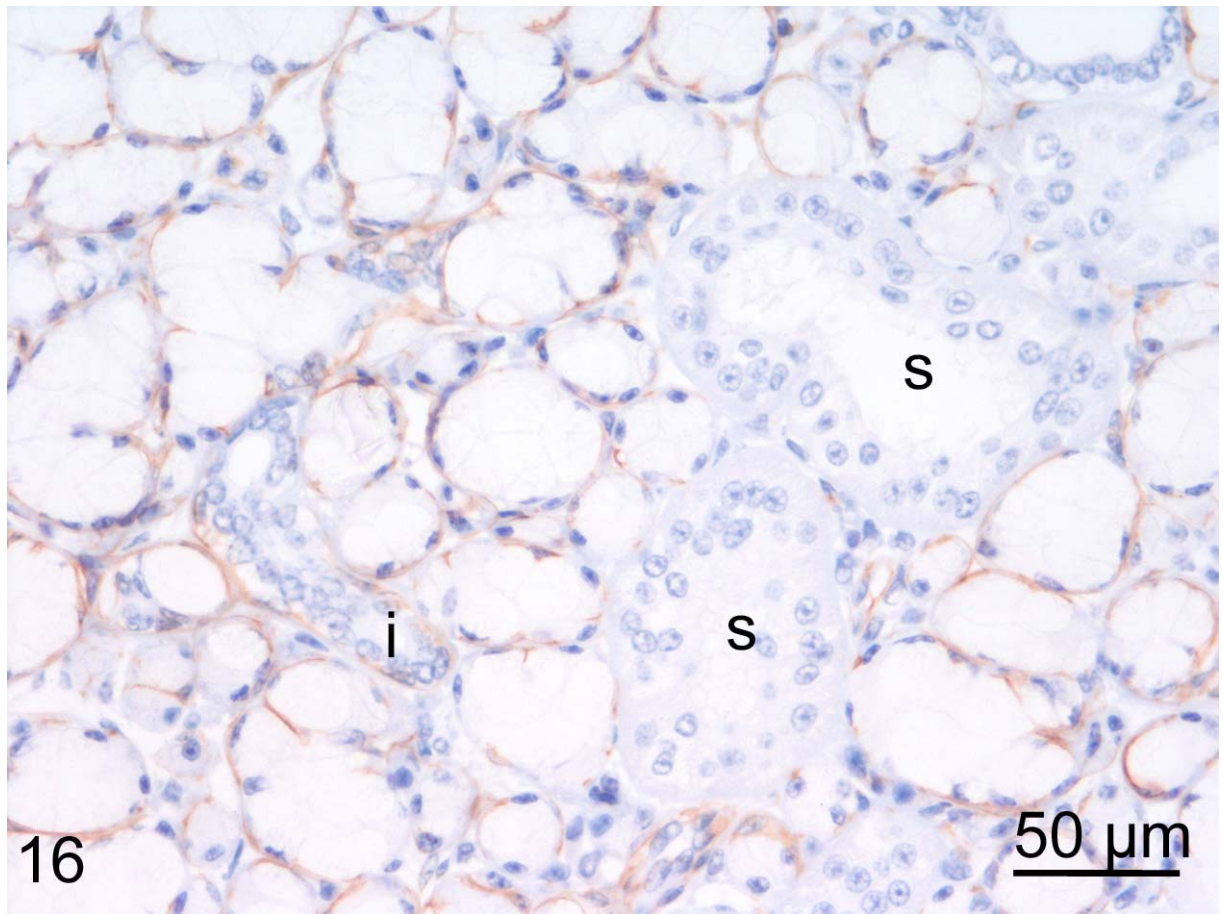


Fig. 16. 舌下腺. 抗 α -SMA 抗体を用いた免疫組織化学染色.

平滑筋マーカーである α -SMA は腺房終末部から介在部導管 (i) にかけて, それらを取り囲む扁平状細胞に陽性像を認める. 線条部導管 (s) では同様の陽性細胞を認めない.

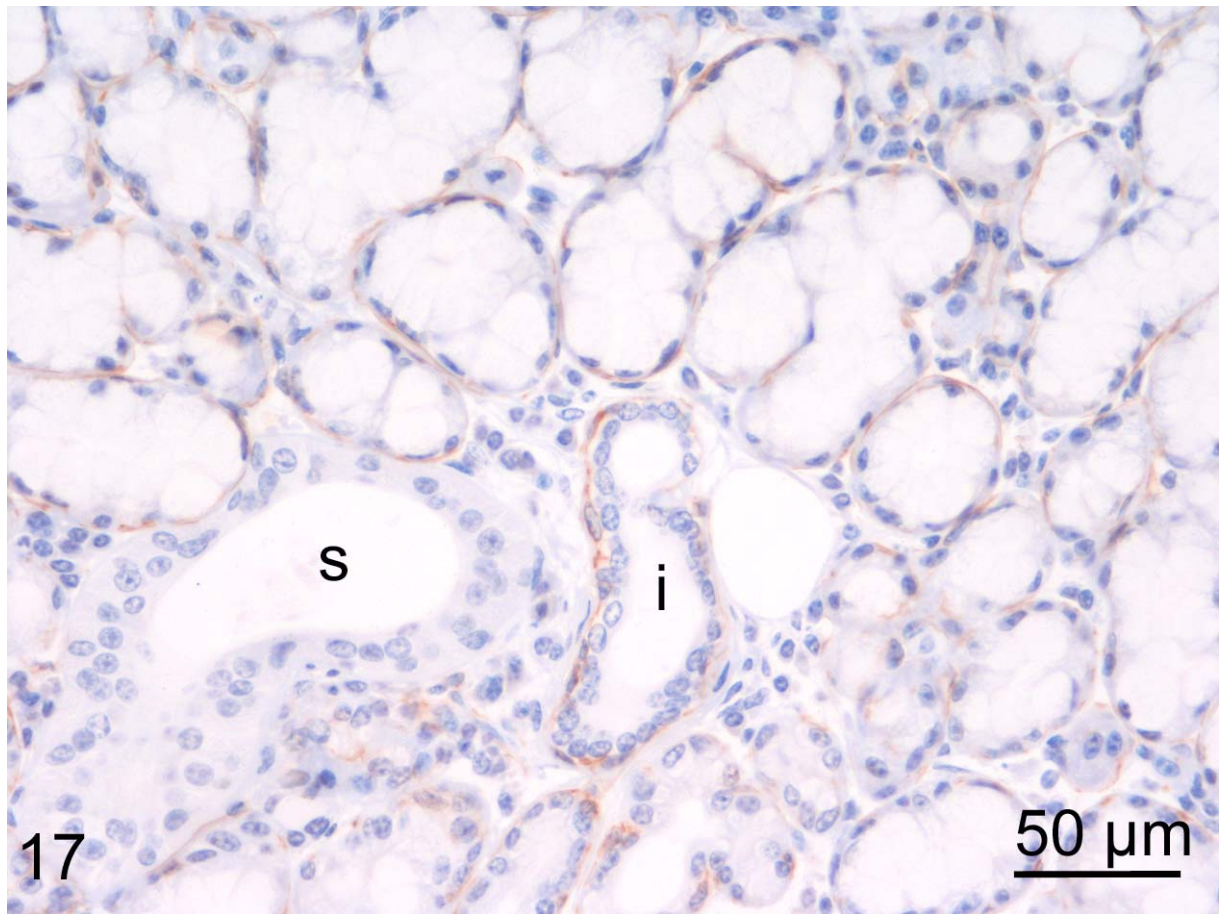


Fig. 17. 下顎腺. 抗 α -SMA 抗体を用いた免疫組織化学染色.

舌下腺と同様，腺房終末部から介在部導管 (i) にかけて腺房や導管の基底側に，それらを取り囲む扁平細胞に陽性像が認められる．線条部導管 (s) では陽性像を認めない．

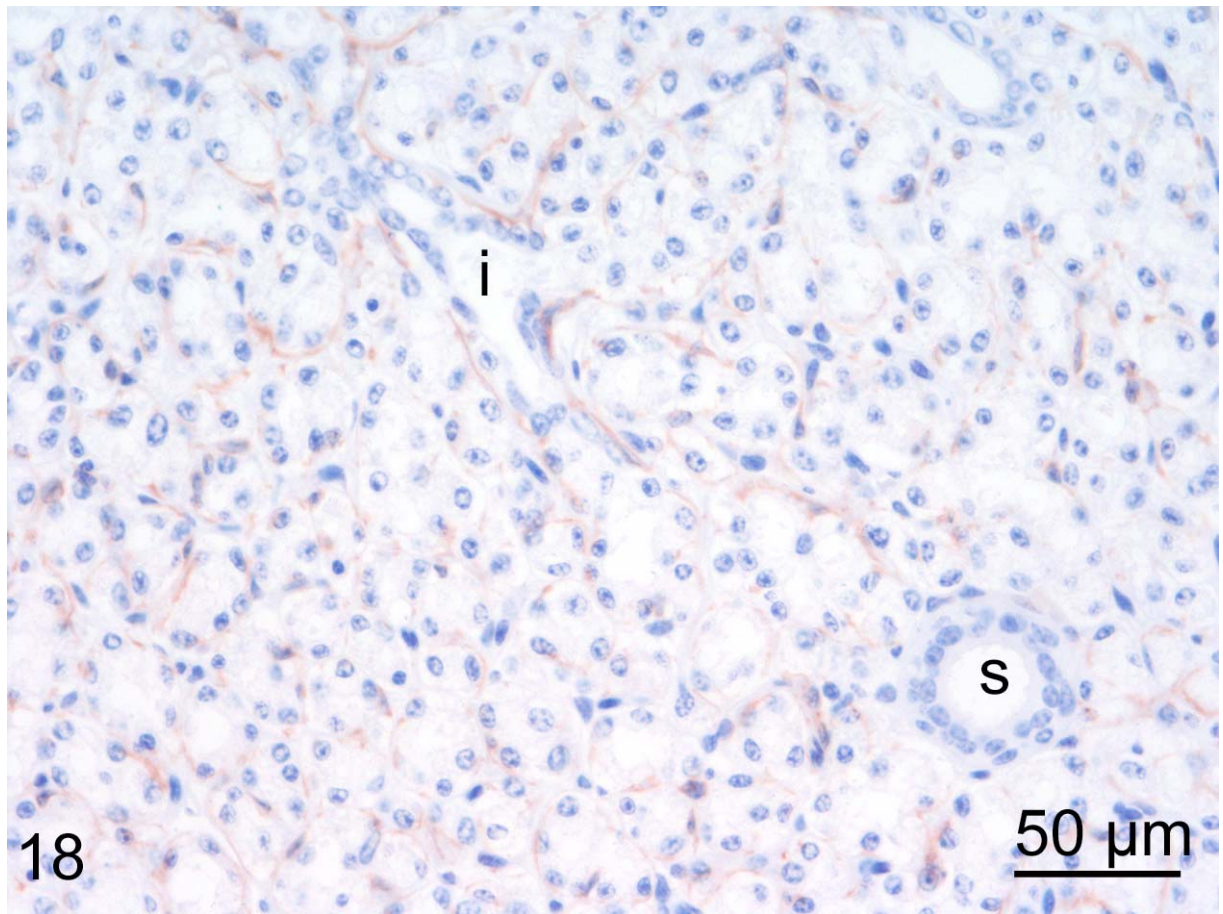


Fig. 18. 耳下腺. 抗 α -SMA 抗体を用いた免疫組織化学染色.

舌下腺, 下顎腺と同様, 腺房終末部から介在部導管 (i) にかけて腺房や導管の基底側に, それらを取り囲む扁平細胞に陽性像が認められる. 線条部導管 (s) では陽性像を認めない.

4. 考察

3大唾液腺のうち、舌下腺ならびに下顎腺の導管は平行に走って舌の下側のほぼ同一部位に開口する [21, 62]. 一方、耳下腺は一般的にそれらとは離れた頬の内側に開口する. 3大唾液腺は肉眼解剖学的に舌・下顎腺グループと耳下腺グループに大きく別けられ、組織学的にも漿液性と粘液性の2種の腺細胞を含む混合腺と、漿液性腺細胞のみを含む漿液腺でそれぞれ肉眼解剖学的分類と合致する [62]. さらに反芻動物の唾液腺は腺房を構成する腺細胞の種類によって舌下腺、下顎腺、耳下腺はそれぞれ粘液豊富な混合腺、混合腺、漿液腺と特徴づけられている [32, 62]. 本組織学的検索においても、これらの特徴と一致していることが確認された.

ウシやヒツジでは本検索と同様、下顎腺ならびに耳下腺において形質細胞の分布が確認されており、さらに耳下腺唾液よりも下顎腺唾液の方が IgA を多く分泌していると報告されている [19, 27, 36, 37, 60]. 今回の検索では、新たにウシの舌下腺は下顎腺よりも多くの形質細胞が間質に分布していることが明らかとなった. ヒトやラットではいずれの大唾液腺からも免疫グロブリンが分泌されており、大きな差は見られていない [12, 16, 34, 52, 59]. しかし、本検索においてウシの大唾液腺は部位によって分布する形質細胞数に著しい差が見られ、それぞれの免疫機能にも違いがある可能性が見いだされた. 今回の検索でウシの唾液における免疫グロブリンの主な供給源はこれまで報告されている下顎腺 [19, 27, 36, 37, 60] ではなく、舌下腺である可能性が新たに見いだされた.

ケラチンは上皮細胞の主な構造蛋白で約 20 種類のサブタイプが知られている. 分子量による分類では低分子ケラチン (40~54 kDa: CK7, 8, 17-20) と高分子ケラチン (48~67 kDa: CK1-6, 9-16) に、等電点による分類では酸性の Type I ケラチンと塩基性~中性の Type II ケラチンに分類される [44]. AE1/AE3 のうち AE1 が Type I の CK10/12/14/15/16/19 を、AE3 が Type II の CK1/3/4/5/6/7/8 を認識するため Keratin (AE1/AE3) 抗体はすべての上皮細胞や癌に反応する [44, 55, 57, 61]. イヌでは通常、舌下腺、下顎腺および耳下腺の導管上皮や舌下腺の漿液性腺細胞、筋上皮細胞、導管基底細胞が複数のケラチン (CK5/6/8/17/19) を認識する抗体に陽性を示すが、

一方ですべての大唾液腺の粘液性腺細胞，下顎腺ならびに耳下腺の漿液性腺細胞は陰性を示すことが報告されている [54]．本検索において，Keratin 抗体は舌下腺，下顎腺および耳下腺すべての漿液性腺細胞ならびに導管上皮細胞に陽性像が確認されたが，イヌの唾液腺と同様，舌下腺ならびに下顎腺における粘液性腺細胞では明瞭な Keratin 抗体陽性像は認められなかった [54]．

筋上皮細胞は汗腺，乳腺，涙腺，唾液腺，気管支腺および食道腺で認められ，籠細胞 (basket cell) とも呼ばれている [42, 62, 63]．筋上皮細胞は豊富な平滑筋アクチン (α -SMA) を有し，それらが収縮することにより外分泌腺の分泌物放出が促進すると考えられている．導管基底細胞 (basal cell) もまた多くの外分泌導管の基底層において認められる [42, 62, 63]．ヒトやラットの唾液腺組織では，筋上皮細胞ならびに導管基底細胞はともに CK14 陽性，また α -SMA は筋上皮細胞のみに陽性を示すことが報告されている [42]．一方，Zedda と Frarina (1995) は，本検索と同様，ウシの唾液腺において CK14 は導管基底細胞のみ陽性を示し，筋上皮細胞は陰性を呈し，ウシの乳腺組織では筋上皮細胞は CK14 陽性であると報告している [63]．よって，ウシの唾液腺組織における筋上皮細胞は乳腺組織とは異なる可能性が考えられるが，詳細については不明である．

5. 小括

大唾液腺は哺乳動物に独特な構造であり，大唾液腺には主に舌下腺，下顎腺および耳下腺がある．これら唾液腺は3大唾液腺と呼ばれ，肉眼解剖学的ならびに組織学的特徴により，一般に舌・下顎腺グループならびに耳下腺グループに大きく分けられている．さらに，免疫学的特徴に関してもこれらの2グループ間でヒトやラットでは大きな差は見られていない．しかし，ウシやヒツジなどの反芻動物では，これまでヒトやラットと同様，唾液中にIgAが分泌されていることが確認されているにも関わらず，耳下腺からのIgAの分泌は確認されていない．さらに，本検索においても，舌下腺や下顎腺と比較して耳下腺に分布する形質細胞数は極めて少ないことが判明し，今回新たにウシの3大唾液腺のなかでも舌下腺が最も多く形質細胞が分布していることが判明した．すなわち，ヒトやラットと異なり，ウシの3大唾液腺では腺によって免疫機能に大きな違いがある可能性が見いだされた．

第Ⅲ章 ウシ唾液腺における pIgR 発現の分子生物学的検索

1. 序文

ウシ, ヒト, ラットおよびマウスを含めた多くの哺乳動物の唾液中には, 豊富な IgA が含まれている [12, 15, 16, 33, 52, 56, 60]. この IgA は抗原特異的な免疫応答により, 口腔内液性免疫において重要な役割を担っている [13, 14, 18, 29]. IgA には, IgA と同じく形質細胞より合成される J 鎖と呼ばれるアミノ酸によって 2 量体を形成する多量体 IgA と, 単量体で存在する単量体 IgA が存在し, ヒトでは唾液中 IgA の大部分が多量体 IgA を占める. 一方, 血清中では多量体 IgA よりも単量体 IgA が多いことが知られている [13, 14, 18, 29, 53].

ヒトやラットと同様, ウシの pIgR は 5 つの Ig-like 構造を有する細胞外領域, 細胞膜を貫通する細胞膜領域および細胞質内領域の 3 つの領域から構成される 1 回貫通型膜蛋白である [4, 9-11, 53]. ウシやウサギでは, これに加えて細胞外領域である Ig-like 構造の 2, 3 番目を欠く short type の pIgR mRNA の存在が確認されている [23, 24, 35, 40, 50].

ウシとヒト, ラットおよびマウス間の pIgR 蛋白 (NCBI database Accession Nos. P81265, NP_002635, NP_036855, AAA67440) のアミノ酸相同性はそれぞれ 67%, 61%, 60%である. また, ヒトとラット, マウス間の pIgR 蛋白のアミノ酸相同性はそれぞれ 64%と 65%である. すなわち, ウシとヒト間ではマウスやラットよりもアミノ酸配列の相同性が高いことが明らかにされている.

本章では, 5 つの Ig-like domain を有する long form と, 一部の Ig-like domain を欠く short form を同時に検出するプライマーを設計し, RT-PCR 法を用いて, ウシの舌下腺, 下顎腺および耳下腺における long type ならびに short type の pIgR mRNA 発現の有無を検索した. また, ウシとアミノ酸配列の相同性が最も高かったヒトの pIgR 蛋白の細胞質内領域を認識する, 抗ヒト pIgR 抗体を用いて, ウシの舌下腺, 下顎腺および耳下腺組織乳剤より細胞質内可溶性画分ならびに細胞膜画分を抽出し, ウェスタンブロッティング法により各唾液腺組織の異なる分画における pIgR 蛋白

の発現について検索した。ウェスタンブロッティング法を用いて確認された抗ヒト pIgR 抗体陽性蛋白のアミノ酸配列を Nano-LC-Q-TOF-MS 法を用いて明らかにした。

2. 材料と方法

2-1. 組織材料の採取

採取した唾液腺は、直ちに液体窒素で急速凍結し、使用時まで -30°C にて保存した。

2-2. RT-PCR 法

検索には4頭のウシの舌下腺、下顎腺および耳下腺組織を用いた (Table 1)。凍結保存した組織 10 mg から mRNA を抽出した。抽出は自動核酸抽出機 (MagNA Pure LC, Roche) を用い、MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Roche) の操作手順書に従って行った。得られた mRNA 抽出液 12 μL を用いて、cDNA を合成した。合成は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) の操作手順書に従った。mRNA 抽出液 12 μL に Anchored-Oligo (dT) 18 Primer (50 pmol/mL) 1.0 μL を加え、サーマルサイクラーを用いて 65°C で 10 分間インキュベートした後、Transcriptor RT Reaction Buffer 4.0 μL , Protector RNase Inhibitor (40 U/ μL) 0.5 μL , dNTP Mix (10 mM each) 2.0 μL Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/ μL) 0.5 μL を加え、サーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad) を用いて 50°C で 60 分間インキュベートして cDNA を合成し、 85°C , 5 分間インキュベートして反応を停止させた。これを cDNA 溶液とした。

合成した cDNA 溶液を用いて PCR を行った。PCR にはサーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad) を用い、Expand High Fidelity^{Plus} PCR System (Roche) の操作手順書に従った。反応液は 5 倍希釈の Buffer (with MgCl_2) 5.0 μL , cDNA 1.0 μL , dNTPmix (2.5 mM each) 0.5 μL (最終濃度 200 μM), F-primer (10 pmol/ μL) 1.0 μL (最終濃度 0.4 μM), R-primer (10 pmol/ μL) 1.0 μL (最終濃度 0.4 μM), Expand High Fidelity^{Plus} (5 U/ μL) 0.25 μL (最終濃度 2.5 U), PCR-grade water 16.25 μL を混和した。使用したウシの pIgR 遺伝子に対するプライマーは既報の遺伝子配列 (GenBank Accession No. BC149032) より、R-primer 5'-TGAAGAGTCCCATCTTCGGT-3'; と F-primer 5'-TTGAGGATGACGGTGTAGGT-3' (Hokkaido System Science Co. Ltd.) を設計した。

予測される PCR 産物は 1231 bp および 574 bp で、それぞれウシの long pIgR mRNA ならびに short pIgR mRNA に相当する [35]。PCR の条件には 94 °C で 2 分間、プレインキュベートした後、94 °C, 20 秒間, 55 °C, 30 秒間, 72 °C, 30 秒間を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、72 °C, 7 分間で伸長させる方法を採用した。

1.5%TAE アガロースゲルを作製し、PCR 産物を電気泳動した。泳動したゲルをエチジウムブロマイドに反応させ、UV トランスイルミネーターで発光させ、暗室にて観察した。

2-3. ウェスタンブロッティング法

検索には6頭のウシの舌下腺, 下顎腺および耳下腺組織を用いた (Table 1). 凍結保存した組織 200 μg に4倍量の PBS を加えホモジナイズ後, 9000 $\times\text{g}$, 20 分間, 4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離し, その上清をさらに 154000 $\times\text{g}$, 60 分間, 4 $^{\circ}\text{C}$ で超遠心分離した. その上清を可溶性画分, 沈渣に PBS を 100 μL 加えホモジナイズしたものを膜分画とし, SDS-PAGE 法, ウェスタンブロッティング法, CBB 染色に用いた. サンプルは使用時まで - 30 $^{\circ}\text{C}$ で保存した.

サンプルを等量の DTT 入試料緩衝液と混和後, 室温から温め, 5 分間煮沸した. その後, 30 $^{\circ}\text{C}$, 210 $\times\text{g}$, 30 分間遠心し上清をサンプル液とした. 14 穴ゲル板を泳動槽に取り付け, SDS-PAGE 用電極液を満たした後, サンプル液 10 μL を 1 well にアプライし, ゲル 1 枚につき濃縮ゲル (4.5%) および分離ゲル (10%) を 500 V, 15 mA で泳動を行い, CBB 染色またはウェスタンブロッティング法に用いた.

泳動後のゲルは, PVDF 膜 (ATTO) にセミドライブロッティング装置を用いて転写 (2 nA/cm², 90 分間) した. 転写後のメンブレンを 1.5 %スキムミルクに 4 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間浸漬した. 一次抗体は 200 倍に希釈した抗ヒト pIgR 抗体 (H-300, Santa Cruz) を用い, メンブレンを室温 2 時間反応させた後, PBS-T (0.05% Tween20 加 PBS) で 15 分間洗浄を 4 回行った. 二次抗体は PBS で 5000 倍に希釈した二次抗体 (抗ウサギ IgG 抗体, Bio-Rad) に室温で 1 時間反応させた後, PBS-T で 15 分間洗浄を 4 回行った. その後, Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて化学発光させ, Ez-Capture II Image Saver 5 (ATTO) を用いて画像を取り込んだ.

CBB 染色の際に, 固定液 (50%エタノール, 10%酢酸) で, 1 時間振とうした後, 固定液を除き, CBB 染色液 (0.25% CBB R250, 5%メタノール, 7.5%酢酸) を加えて 30 分間振とうした. CBB 染色液を除き, CBB 脱色液 (25%メタノール, 7.5%酢酸) で背景の色が落ちるまで脱色した. 染色後のゲルは保存液 (10%酢酸, 3%グリセロール) に入れ 4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した.

2-4. ゲル内消化法

Nomura et al. (2009) によるゲル内消化法を参考に、次に述べる方法にてゲルより蛋白の抽出を行った [41]。ウェスタンブロッティング法にて抗ヒト pIgR 抗体に陽性を示すバンドに相当する位置の CBB 染色ゲルを切り出した。切り出したゲル片を、脱色液 (50% MeOH, 50 mM NH_4HCO_3) で 10 分間震盪を 2 回繰り返して、遠心後、脱色液を除去し、100%アセトニトリルを加えて 10 分間震盪し、脱水した。遠心後、上清を除去し次に示す方法で還元アルキル化を行った。還元液 (10 mM DTT, 25 mM NH_4HCO_3) に 56 °C で 1 時間反応後、溶液を除去し、25 mM NH_4HCO_3 で洗浄した。続いて遮光下にてアルキル化液 (50 mM ヨードアセトアミド, 25 mM NH_4HCO_3) に室温で 45 分間震盪し、溶液を除去し 25 mM NH_4HCO_3 で 10 分間、震盪させ溶液を除去した。脱水液 (50%アセトニトリル, 25 mM NH_4HCO_3) で 10 分間、震盪を 3 回繰り返して、遠心後、溶液を除去した。100%アセトニトリルでゲル片を収縮させ、溶液を除去し、ゲルにトリプシン溶液 (10 ng/ μL , 50 mM NH_4HCO_3) および 100 mM Tris-HCl を等量注入し、37 °C で 15 時間反応させた。

2-5. Nano-LC-Q-TOF-MS 法

分析機器には Easy-nLC システム, micrOTOF-QII time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics), captive spray ionization を使用した (すべて Bruker Daltonics)。サンプルを分析するための分離カラムには L-column micro (C_{18} , 75 μm x 150 mm, 粒子径 3 μm) を用い、サンプルを吸着するためのカラムには直径 300 μm x 5 mm, 粒子径 5 μm のものを用いた (いずれも化学物質評価研究機構)。サンプル注入量は 1 μL , 分離カラムにて 300 nL/min の流速でポジティブイオンモードにて分析した。移動相の溶媒組成は (A) 水/蟻酸 (99.5/0.05, 体積比), (B) アセトニトリル/水/蟻酸 (95/4.95/0.05) であり、分離にはアセトニトリル濃度を上げるグラジエント溶出にて行った。グラジエント条件は B 液を 60 分間で 8%から 60%に増加させ、さら 5 分間で 95%に到達させた。解析にはポジティブイオンを用いて、走査範囲 50~2500 m/z , オート MS/MS モード, キャピラリー電圧を 1500 V, ドライガス流量を 3.0 L/min, ガ

ス温度を 160 °C にそれぞれ設定し行った.

得られたデータは MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) を用いて Swiss-Prot のデータベースに照合し解析した. 全てのデータ解析は Data analysis 4.0 ならびに biotools 3.2 software (いずれも Bruker Daltonics) により行った.

3. 結果

3-1. RT-PCR 法による結果

検索した4検体全ての舌下腺, 下顎腺において設計したプライマーから予測された1231 bpならびに574 bp, すなわち long と short type の pIgR mRNA に相当するバンドが検出された. 一方, 4検体全ての耳下腺からは舌下腺と下顎腺で検出されたいずれのバンドも認められなかった. 3検体(症例 Nos. 5, 6, 20)の舌下腺, 下顎腺および耳下腺の結果を Fig. 19 に示す.

3-2. ウェスタンブロッティング法による結果

検索した6頭全ての舌下腺ならびに6頭中4頭の下顎腺組織の膜画分より, 大きさ約80 kDaのバンドが検出された. また, 下顎腺で認められた大きさ約80 kDaのバンドは舌下腺よりも発色がいずれも弱かった. 症例 No. 20の結果を Fig. 20 に示す. 一方, 6頭全ての耳下腺組織の膜画分サンプルにおいてバンドは検出されなかった. また, 検索した6頭の舌下腺, 下顎腺, 耳下腺全ての可溶性画分からはバンドは検出されなかった (Fig. 20).

3-3. Nano-LC-Q-TOF-MS 法による結果

舌下腺膜画分の SDS-PAGE ゲルから, 抗ヒト pIgR 抗体に陽性を示すバンドに相当する位置の CBB 染色陽性バンドを切り出し, トリプシンによるゲル内酵素消化の後, Nano-LC-Q-TOF-MS 法で分析し, 得られたデータを MASCOT により, Swiss-Prot のデータベースに照合し解析した結果, polymeric immunoglobulin receptor precursor [*Bos taurus*] が同定された (Fig. 21). Protein Score は 223 で, この蛋白質が pIgR であると判断できる. この Score は結果として得られた相同が偶然おこる確率から算出される値で, 66 以上で $P < 0.05$ となる. 検索結果の配列から計算された整数質量は 83717 Da, 等電点は 7.07, 得られたペプチドがその配列のどれだけの範囲を網羅しているかを示した Protein sequence coverage は 9%であった (Fig. 21).

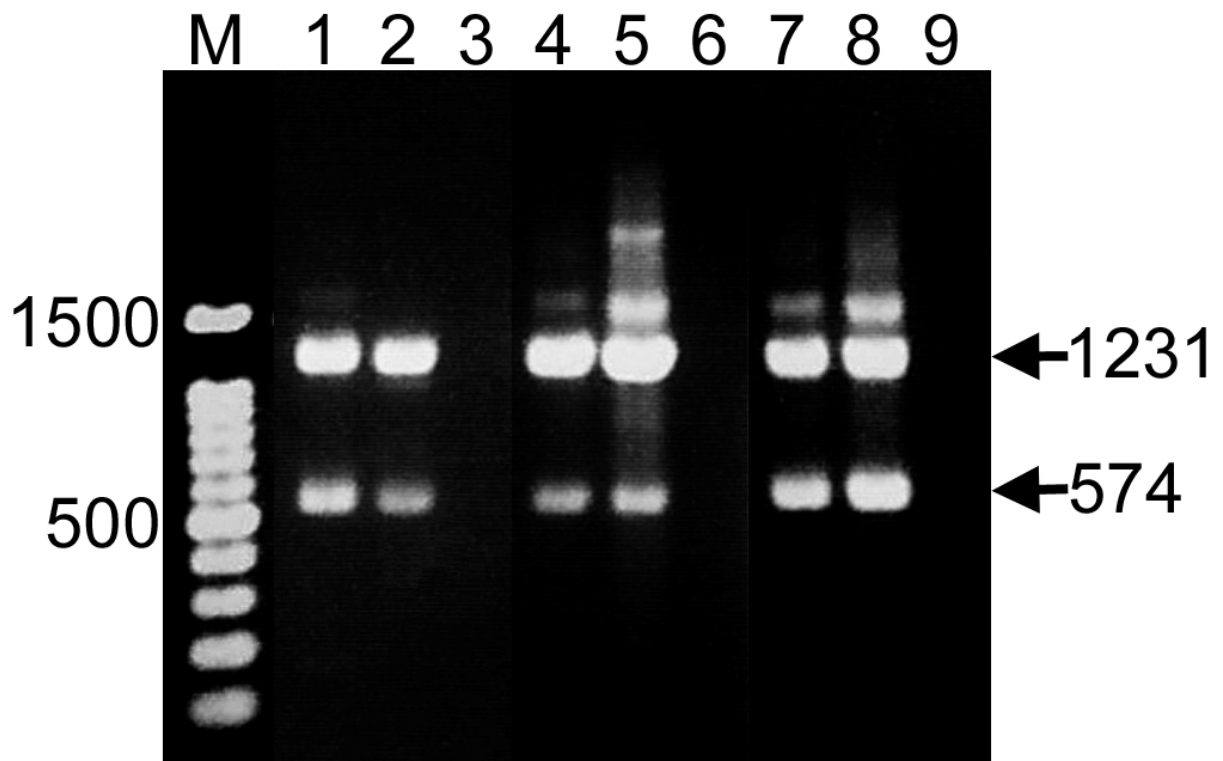


Fig. 19. 各唾液腺組織における pIgR mRNA の発現.

M, 100 bp ラダーマーカー (左側に 1500 bp と 500 bp を示す). Lines 1, 4, 7 は舌下腺, lines 2, 5, 8 は下顎腺, lines 3, 6, 9 は耳下腺を示す. サンプル 1-3, 4-6, 7-9 はそれぞれ症例 No. 5, 6, 20 から得られた唾液腺サンプルである. 3 検体のウシ舌下腺ならびに下顎腺からは 1231 bp ならびに 574 bp の位置にバンドが確認される (黒矢印). 2 本のバンドの大きさは設計したプライマーから予測され, それぞれ long と short の pIgR mRNA に相当する.

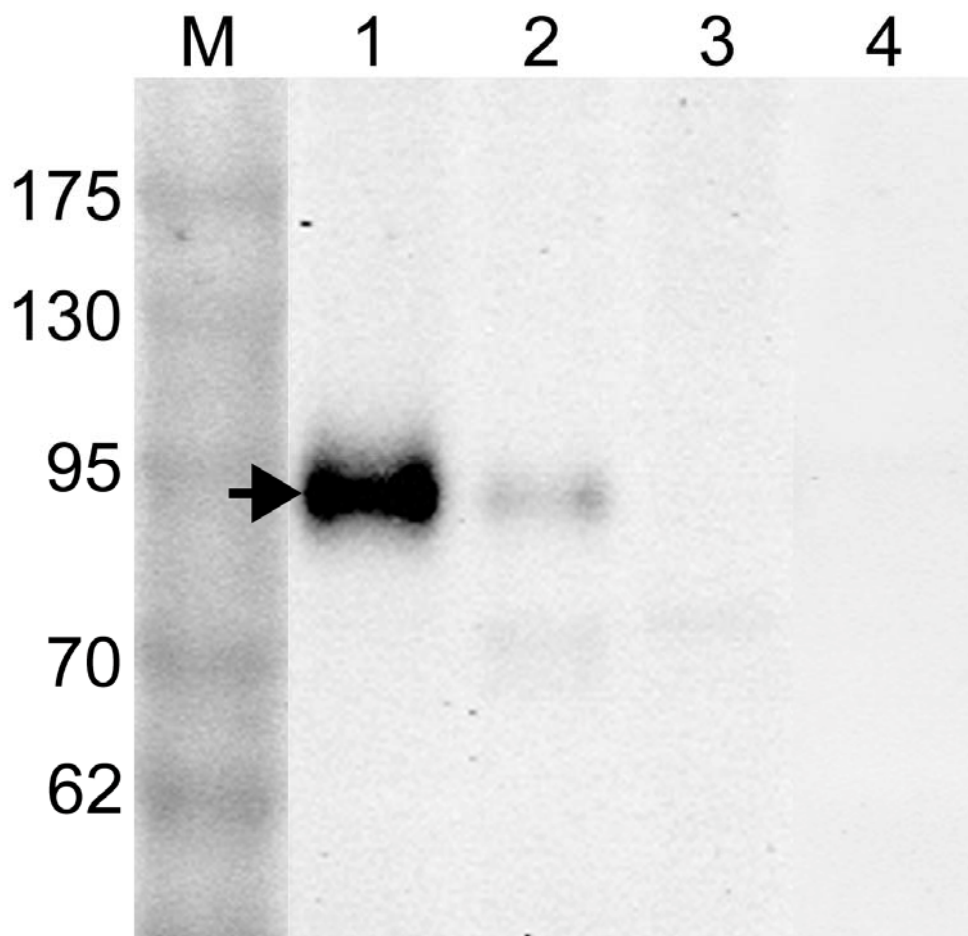


Fig. 20. 各唾液腺における pIgR 蛋白の発現.

M, マーカー (kDa, 左側に大きさを示す). Line 1 は舌下腺膜画分, line 2 は下顎腺膜画分, line 3 は耳下腺膜画分, line 4 は舌下腺可溶性画分を示す (サンプルは全て症例 No. 20). 舌下腺ならびに下顎腺膜画分には大きさ約 80 kDa のバンド (黒矢印) が確認される (lines 1, 2). 一方, 耳下腺膜画分 (line 3) ならびに舌下腺可溶性画分 (line 4) からは同様のバンドは認められない.

{MATRIX} SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: PIGR_BOVIN

Polymeric immunoglobulin receptor OS=Bos taurus GN=PIGR PE=2 SV=1

Database: SwissProt
Score: 223
Nominal mass (M_r): 83717
Calculated pI: 7.07
Taxonomy: [Bos taurus](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of PIGR_BOVIN against nr.](#)

Search parameters

MS data file: DATA.TXT
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
Variable modifications: [Oxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 9%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MSRLFLACLL	AIFPVVSMKS	PIFGPEEVTS	VEGRSVSIKC	YYPPTSVNRH
51	TRKYWCRQGA	QGRCTTLISS	EGYVSDDYVG	RANLTNFPES	GTFVVDISHL
101	THKDSGRYKC	GLGISSRGLN	FDVSLEVSQD	PAQASHAHVY	TVDLGRTVTI
151	NCPFTRANSE	KRKSLCKKTI	QDCFQVVDST	GYVSNSYKDR	AHISILGTNT
201	LVFSVINRV	KLSDAGMYVC	QAGDDAK ADK	INIDLQVLEP	EPELVYGDLR
251	SSVTFDCSLG	PEVANVPKFL	CQKKNNGACN	VVINTLGKKA	QDFQGR IVSV
301	PKDNGVFSVH	ITSLR KEDAG	RYVCGAQPEG	EPQDGWPVQA	WQLFVNEETA
351	IPASPSVVKG	VRGGSVTVSC	PYNPKDANSA	KYWCHWEEAQ	NGRCPLVES
401	RGLIKEQYEG	RLALLTEPGN	GTYTIVLNQL	TDQDTGFYWC	VTDGDTRWIS
451	TVELKVVQGE	PSLKVPKNVT	AWLGEPLKLS	CHFPCKFYSF	EKYWCKWSNR
501	GCSALPTQND	GPSQAFVSCD	QNSQVVSLNL	DTVTKEDEGW	YWCGVKEGPR
551	YGETAAVYVA	VESRV KGSQG	AKQVKAAPAG	AAIQSR AGEI	QNKALLDPSF
601	FAKESV KDAA	GGPGAPADPG	RPTGYSGSSK	ALVSTLVPLA	LVLVAGVVAI
651	GVVRRARHRKN	VDRISIRSYR	TDISMSDFEN	SRDFEGRDNM	GASPEAQETS
701	LGGKDEFATT	TEDTVESKEP	KKAKRSSKEE	ADEAFTTFLL	QAKNLASAAT
751	QNGPTEA				

Unformatted sequence string: [757 residues](#) (for pasting into other applications).

Fig. 21. MASCOT 検索の結果。

ウェスタンブロットにおいて抗ヒト pIgR 抗体陽性バンドに相当する舌下腺膜分画の SDS-PAGE ゲルより切り出したゲル片を、Nano-LC-Q-TOF-MS 法 によって解析を行い、MASCOT によって Swiss-Prot のデータベースに照合した結果、polymeric

immunoglobulin receptor precursor, pIgR [*Bos taurus*] が同定された。下の段は pIgR のアミノ酸配列であり、同定時に検出できたペプチドが対応する部分を赤の太字で示しており、配列全体の 9%を占める。

4. 考察

ウシの pIgR は 5 つの Ig-like 構造を有する細胞外領域、細胞膜を貫通する細胞膜領域、細胞質内領域の 3 つの領域から構成されることが明らかにされている [4, 9-11, 53]. この pIgR は long type と呼ばれ、ウシを含めヒト、ラット、マウスおよびウサギにおいて確認されているが、ウシとウサギではさらに short type の pIgR の存在が確認されている [23, 24, 35, 40, 50]. さらにウシでは空腸ならびに乳腺において long ならびに short type の pIgR 両型の発現が確認されている [35]. 本検索において、実験に用いた 4 頭のウシは年齢、性別、臨床所見の全てが異なっていたが (第 I 章, Table 1 参照), 同一結果が得られたことから、ウシでは年齢、性別、健康状態に限らず、恒常的に舌下腺と下顎腺において long pIgR mRNA と short pIgR mRNA が発現していると考えられた.

ウシの long type の pIgR 蛋白は大きさ約 80 kDa の膜 1 回貫通型蛋白であり、ウェスタンブロッティング法では RT-PCR と同様、舌下腺と下顎腺の膜分画においてウシの long type の pIgR 蛋白に相当する大きさ約 80 kDa のバンドが確認された [10, 11, 53]. RT-PCR において mRNA の発現が確認された、short type の pIgR 蛋白に相当するバンドは、いずれのサンプルにおいても確認されず、ウェスタンブロッティング法で検出するのに十分な量の蛋白が発現していない可能性が考えられた. また、舌下腺ならびに下顎腺組織の可溶性画分ならびに耳下腺組織の膜ならびに可溶性画分においてもバンドは検出されなかった. 検索に用いた抗ヒト pIgR 抗体は pIgR 蛋白の細胞質内領域を認識する抗体であり、本抗体がウシの唾液腺組織の膜分画に局在する pIgR 蛋白の細胞質内領域を特異的に認識していると考えられた. さらに、6 頭中 4 頭の下顎腺において、舌下腺と同様、ウシの long type の pIgR 蛋白に相当する約 80 kDa のバンドが確認されたが、下顎腺のバンドは発現強度が弱く、また、6 頭中 2 頭ではバンドが確認できなかったことから、舌下腺に比べて発現している pIgR 蛋白の量が少ないと考えられた.

ウェスタンブロッティング法に続いて行った Nano-LC-Q-TOF-MS 法では、本検索で用いた抗ヒト pIgR 抗体陽性蛋白がウシの long type の pIgR 蛋白であることが確

認され、ウェスタンブロッティング法に用いた抗ヒト pIgR 抗体の特異性が証明された。この抗体の特異性によって免疫生化学的にウシの舌下腺ならびに下顎腺において pIgR が発現していることが確認された。

これまでもウシやヒツジでは腸管、乳腺、肝臓、腎臓、肺において pIgR の発現が報告されている [22, 35, 46, 47, 58]。Kulseth et al. (1995) らは、ノーザンブロット法によりウシの唾液腺における pIgR mRNA の検出を試みたが、その発現は確認されなかったと報告している [35]。また、ウシではヒトやラットと同様、唾液中に IgA が豊富に存在することは知られているが、その産生部位に関してはあまり知られていない [12, 15, 16, 37, 52, 60]。本検索により初めてウシの唾液腺において pIgR の発現が確認されたと同時に、舌下腺、下顎腺および耳下腺においては pIgR の発現に差があることが明らかにされた。そして、舌下腺は下顎腺よりも多く pIgR を介して IgA を分泌している可能性が示された。

5. 小括

ウシの pIgR は 5 つの Ig-like 構造を有する細胞外領域，細胞膜を貫通する細胞膜領域，細胞質内領域の 3 つの領域から構成されており，この pIgR は long type と呼ばれ，ウシを含めヒト，ラット，マウスおよびウサギにおいて確認されている。ウシではさらに Ig-like 構造の 2, 3 番目の構造を欠く short type の pIgR の存在が確認されている。本検索では，long type pIgR ならびに short type pIgR の両型の mRNA を検出するよう設計したプライマーを用いて RT-PCR 法を行った。その結果，実験に用いた 4 頭のウシ全てにおいて，舌下腺ならびに下顎腺において両型の mRNA が検出された。検索に用いた 4 頭の年齢，性別，臨床所見は全て異なっているにも関わらず，同一の結果が得られたことから，ウシの唾液腺では，年齢，性別，健康状態に関わらず，恒常的に舌下腺と下顎腺において long type pIgR mRNA と short type pIgR mRNA が発現していると考えられた。また，ウェスタンブロッティング法では，舌下腺は下顎腺よりも pIgR 蛋白をより多く発現していたことから，舌下腺では下顎腺よりも多くの IgA を唾液中に分泌している可能性が示唆された。一方，耳下腺では RT-PCR 法ならびにウェスタンブロッティング法，いずれの検索においても pIgR の発現が認められなかったことから，ウシの耳下腺では pIgR を介した IgA の分泌がなされていないことが示唆された。

第IV章 ウシ唾液腺組織における pIgR を介した IgA 分泌能

1. 序文

ヒトやラットの唾液中 IgA は、主に大唾液腺である舌下腺、下顎腺ならびに耳下腺から分泌されている [12, 16, 34, 52]. ヒトの唾液腺における pIgR を介した IgA の分泌メカニズムは次に説明する通りである.

- 1) 唾液腺の腺房周囲に分布する形質細胞から産生された多量体 IgA を腺細胞の基底側に発現する pIgR が受け取る.
- 2) pIgR は多量体 IgA を受け取り、複合体を形成すると、細胞内トランスサイトosisにより基底側から管腔側に輸送される.
- 3) 管腔側に輸送された複合体は pIgR の細胞外領域の一部 (SC) が切り離され、SC と多量体 IgA の複合体として分泌される.
- 4) また、形質細胞によって局所産生された、もしくは血清由来の単量体 IgA ならびに単量体 IgG は pIgR による細胞内輸送ではなく、傍細胞経路により唾液中に拡散する.

ヒトの舌下腺、下顎腺ならびに耳下腺では、それぞれの漿液性腺細胞ならびに導管上皮細胞に pIgR が発現していることが報告されているが、著者の知る限り、ウシの唾液腺における pIgR の発現に関する報告は見当たらない [12, 34].

ヒトと同様、ウシにおいても口腔内の混合唾液を含めた鼻汁および涙液において分泌型 IgA が豊富に含まれていることは以前から報告されている [15, 37, 60]. また、ウシの下顎腺の組織培養によって分泌型 IgA が合成されることも確認されている [27, 37]. さらには、Cripps と Lascelles (1976) は、ヒツジの下顎腺唾液分泌量は耳下腺組織のおよそ 1/7 倍と少ないが、IgA の分泌量は耳下腺の約 34 倍も多いと報告している [19]. すなわち、これまでウシやヒツジといった反芻動物では唾液中 IgA の分泌に関して、下顎腺と耳下腺のみが研究対象とされおり、下顎腺は IgA の分泌能を有しているが耳下腺では IgA の分泌能がほとんどないことを報告している.

本検索では、ウシ 17 頭の舌下腺、下顎腺および耳下腺組織を用いて、第III章で

使用した抗ヒト pIgR 抗体による免疫組織化学的検索を行い, 各唾液腺における pIgR の発現と分布について検索を行った. また, 同 17 頭の舌下腺, 下顎腺および耳下腺組織を用いてウシの各免疫グロブリンアイソタイプを特異的に認識する抗ウシ IgA 抗体, 抗ウシ IgM 抗体および抗ウシ IgG 抗体による免疫組織化学的検索を行い, 異なる唾液腺における免疫グロブリン産生形質細胞の分布を比較し IgA, IgM, IgG の分泌能を検討した.

2. 材料と方法

2-1. 供試動物

本学で剖検に供されたウシ（ホルスタイン種）17頭の舌下腺，下顎腺および耳下腺を免疫組織化学的検索に用いた（Table 1）. いずれの症例も病理解剖学的ならびに病理組織学的に唾液腺とその周囲組織における炎症または腫瘍などの病変は認められなかった.

2-2. 免疫組織化学的検索

免疫組織化学的検索には ABC 法を用いた. 用いた一次抗体およびそれぞれの前処置は Table 3 に示す. 免疫組織化学染色を行うにあたり，作製したパラフィン切片をキシレンで十分に脱パラフィンした後，エチルアルコールを通し，水洗した. 抗原賦活の目的で使用直前に作成したトリプシン溶液に 37 °C にて 10 分間インキュベートを行った（トリプシン処置）. 内因性ペルオキシダーゼ除去には 0.3% H₂O₂ 加 PBS に 5 分浸漬した. 十分に水洗後，非特異反応除去の目的で 10% ヤギ正常血清を用いて 37 °C で 30 分間のブロッキング処置を行った. 一次抗体を PBS で希釈して切片上へのせ，保湿箱内で 4 °C，16 時間反応させた. 反応終了後，PBS で洗浄し，二次抗体（ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体，Vector Laboratories）を切片上へのせ，室温，30 分間反応させた. その後 PBS で洗浄し，西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（Vector Laboratories）を切片上へのせ，室温，30 分間反応させた. 反応終了後，PBS で洗浄し，0.05% 3,3-diaminobenzidine 水溶液に 5% H₂O₂ を最終濃度が 0.005% になるように加えた発色液に室温，10 分間浸漬して発色反応を行った. すべての組織の対比染色には Mayer のヘマトキシリン染色をおこなった. 陰性対照では一次抗体を省いた.

2-3. 統計解析法

免疫組織化学染色を施した舌下腺，下顎腺および耳下腺組織を×400 視野で 3 カ所，腺房周囲に分布する抗ウシ IgA 抗体, IgM 抗体および IgG 抗体陽性の形質細胞数を計測した．計 17 頭の各唾液腺組織を計測し，それぞれ平均値±標準偏差を求めた．舌下腺，下顎腺および耳下腺の 3 つのグループ間の比較には，SPSS 15.0J を用いて，二元配置分散分析法（パラメトリック法）により検定を行った．P 値に関しては $P < 0.05$ を有意差ありとした．

Table 3. 免疫組織化学的検索に使用した抗体

抗体名 (クローン名)	抗体の種類	希釈倍率	前処置	製造元
ヒト pIgR (SC300)	pAb	1:200	無し	Santa Cruz, CA, USA
ウシ IgA (α -chain)	pAb	1:2000	トリプシン	Bethyl Laboratories, TX, USA
ウシ IgM (μ -chain)	pAb	1:2000	トリプシン	Bethyl Laboratories, TX, USA
ウシ IgG* (heavy-chain)	pAb	1:500	トリプシン	Bethyl Laboratories, TX, USA

* HRP 標識抗体; pAb, ポリクローナル抗体

3. 結果

3-1. 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的所見

検索した全ての舌下腺組織において、多くの漿液性腺細胞ならびに介在部導管上皮細胞に抗ヒト pIgR 抗体に対する陽性像が観察された。特に漿液性腺細胞ならびに介在部導管上皮細胞の管腔側細胞質において強い陽性像が観察された (Fig. 22A)。一方、粘液性腺細胞では明らかな陽性像は観察されなかった。17 検体中 12 検体の下顎腺組織において、漿液性腺細胞とそれに続く介在部導管上皮細胞において pIgR 陽性像が確認された。下顎腺では抗ヒト pIgR 抗体に陽性を示す細胞は比較的太い主要な小葉内線条部導管の周囲に位置する腺房に限られており、検索した腺組織全体のごく一部でしか陽性像は観察されなかった。さらに、下顎腺の漿液性腺細胞における pIgR 陽性像はおもに細胞質の基底側において観察された (Fig. 22B)。下顎腺の介在部導管上皮細胞における pIgR 抗体陽性像は舌下腺と同様、管腔側細胞質に認められたが、極まれにしか観察されなかった。また、残り 5 検体の下顎腺組織ではいずれの細胞も陽性像を認めなかった。耳下腺では検索した全ての組織において pIgR 抗体陽性像は観察されなかった (Fig. 22C)。また、一次抗体を省いた全ての陰性対照の組織では陽性像は認められなかった。

3-2. 抗ウシ IgA 抗体, 抗ウシ IgM 抗体および抗ウシ IgG 抗体を用いた免疫組織化学的所見

舌下腺や下顎腺では腺細胞や導管上皮細胞の細胞質管腔側に抗ウシ IgA 抗体陽性像が観察された (Figs. 23A, B)。抗ウシ IgM 抗体や抗ウシ IgG 抗体においても同様の陽性像が舌下腺や下顎腺の腺細胞ならびに導管上皮細胞の細胞質管腔側において観察されたが、抗ウシ IgA 抗体に比べると陽性像は弱い傾向にあった。しかし、このような上皮細胞における抗ウシ IgA 抗体, 抗ウシ IgM 抗体および抗ウシ IgG 抗体陽性像はいずれの耳下腺組織においても観察されなかった (Fig. 23C)。

舌下腺, 下顎腺および耳下腺に分布する抗ウシ IgA 抗体, 抗ウシ IgM 抗体および抗ウシ IgG 抗体陽性形質細胞数の一視野当りにおける平均値±標準偏差を

Table 4 に示す. 免疫グロブリン陽性形質細胞の総数は舌下腺 (一視野当り平均 77.5 個) が最も多く, 下顎腺ならびに耳下腺に比べて有意な差が得られた ($P < 0.05$). 一方, 耳下腺の免疫グロブリン陽性形質細胞の総数 (一視野当り平均 1.6 個) は最も少ない結果が得られた. 舌下腺における抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞数 (53.2 ± 8.7) は他の唾液腺に比べて有意に多い結果となった ($1.1 \pm 0.7 \sim 22.5 \pm 7.0, P < 0.05$). 抗ウシ IgM 抗体ならびに抗ウシ IgG 抗体陽性形質細胞数もまた舌下腺は他の唾液腺よりも有意に多い結果が得られた (抗ウシ IgM 抗体陽性形質細胞数の平均 17.8 ± 6.0 , 抗ウシ IgG 抗体陽性形質細胞数の平均 $6.5 \pm 2.1, P < 0.05$). また, 抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞はいずれの唾液腺においても他の免疫グロブリン陽性細胞よりも多いという結果が得られた. さらに, 舌下腺ならびに下顎腺では, 抗ウシ IgG 抗体陽性形質細胞よりも抗ウシ IgM 抗体陽性形質細胞が多いという結果が得られた.

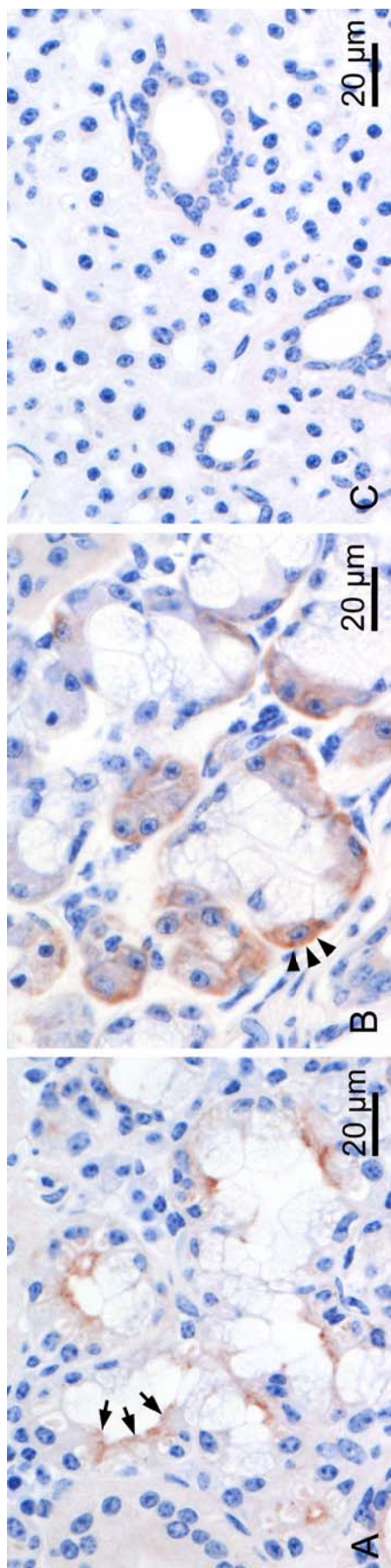


Fig. 22. 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索.

舌下腺 (A) では漿液性腺細胞の細胞質の管腔側に主に抗 pIgR 抗体陽性像が観察される (矢印). 一方, 下顎腺 (B) では一部の漿液性細胞の細胞質において基底側に抗 pIgR 抗体陽性像が認められる (矢頭). 耳下腺 (C) ではいずれの細胞も抗 pIgR 抗体に陰性を示す.

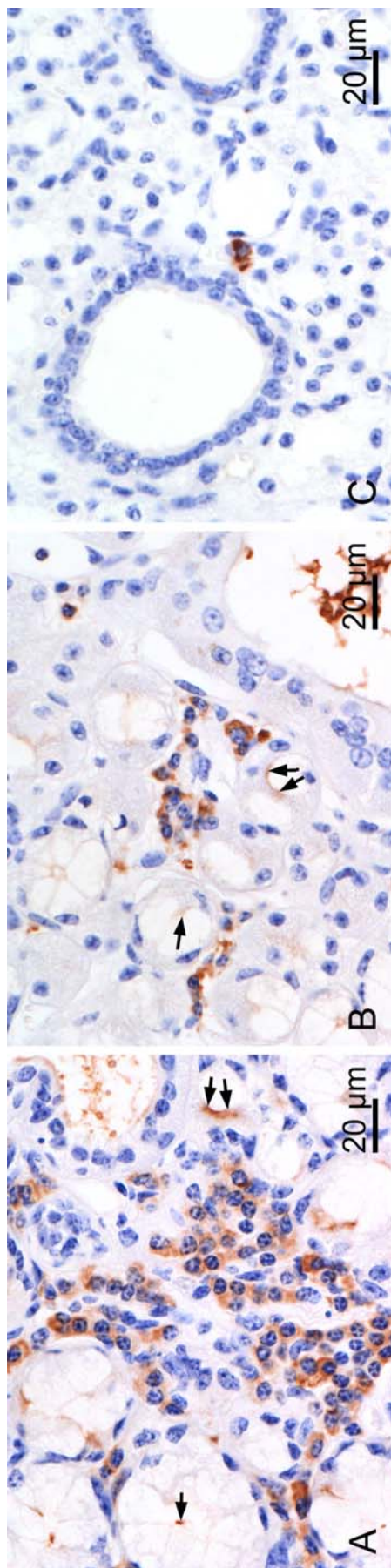


Fig. 23. 抗ウシ IgA 抗体を用いた免疫組織化学的検索.

舌下腺 (A) では腺房ならびに導管周囲間質において多数の抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞が観察される。下顎腺 (B) では、舌下腺よりは少ないが間質に抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞が観察される。耳下腺においても抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞は認められるが、舌下腺、下顎腺よりは顕著に少ない。また、舌下腺 (A) および下顎腺 (B) の腺細胞において細胞質管腔側に抗ウシ IgA 抗体陽性像 (矢印) が観察されるが、耳下腺では認められない。

Table 4. 唾液腺一視野当りにおける免疫グロブリン陽性形質細胞数の平均

	IgA	IgM	IgG	合計
舌下腺	53.2 ± 8.7	17.8 ± 6.0	6.5 ± 2.1	77.5
下顎腺	22.5 ± 7.0	5.2 ± 2.4	3.1 ± 1.4	30.8
耳下腺	1.1 ± 0.7	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.5	1.6

舌下腺，下顎腺および耳下腺（いずれも n=17）における一視野当りの抗ウシ IgA 抗体，抗ウシ IgM 抗体および抗ウシ IgG 抗体陽性形質細胞数（平均値±標準偏差）ならびに各抗体陽性形質細胞数の平均値の合計を示す．舌下腺の抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞の平均数は3つの異なる唾液腺のなかで最も多い．また，舌下腺と下顎腺では抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞数が抗ウシ IgM 抗体陽性形質細胞や抗ウシ IgG 抗体陽性形質細胞よりも有意に多い．耳下腺は唾液腺のなかで，各抗体陽性形質細胞数がもっとも少ない．

4. 考察

免疫組織化学的に、ヒトの舌下腺、下顎腺および耳下腺では、それぞれの漿液性腺細胞、介在部導管上皮細胞および線条部導管上皮細胞に pIgR の発現が確認されており、一方、粘液性腺細胞では pIgR の発現は認められなかったと報告されている [34]。本検索では、検索した全ての舌下腺ならびに一部の下顎腺組織において、漿液性腺ならびに介在部導管上皮細胞に pIgR 陽性像が観察されたが、線条部導管上皮細胞では確認されなかった。また、すべての唾液腺における粘液性腺細胞においても、ヒトと同様、明らかな pIgR 陽性像は認められなかった。さらに、ウシでは検索した全ての耳下腺組織において、ヒトの耳下腺とは異なり、腺ならびに導管上皮細胞において pIgR 陽性像は認められなかった。

反芻動物であるウシやヒツジのルーメンでは、多量の飼料を貯蔵し、ルーメン内に生息する微生物によって飼料を分解している。ルーメン内容物の約 9 割は水分であり、微生物による発酵を充分に行えるよう、主に耳下腺からアルカリ性に富んだ唾液を絶えず分泌し、微生物発酵による pH の上昇を抑え、なおかつ適度な水分を補給している [6-8, 20, 32]。過去の報告では、ヒツジの耳下腺唾液は持続的かつ多量に分泌されるため、外来抗原の刺激が妨げられ、IgA が局所産生されないといった考察がなされている [60]。しかし、全身の粘膜ならびに腺組織におけるリンパ球のホーミングは各組織の上皮細胞が産生する種々のケモカインとリンパ球が発現する種々のケモカインに対するリガンドによって調節されている [14, 33]。従って、反芻動物と単胃動物であるヒトやラットでは、ルーメン内微生物による発酵消化という決定的な消化システムの違いが少なくとも耳下腺における免疫機能に影響を与えている可能性は否定できないが詳細については不明である。

pIgR を介した IgA 分泌メカニズムは、イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株 (Madin-Darby canine kidney cell) を用いた *in vitro* 実験で詳細に解明されている [4]。さらに、近年では腸管における IgA 分泌活性因子や pIgR の発現またはトランスサイトosis の増加機序が明らかにされつつある [13, 14, 18, 28, 29]。しかしながら、pIgR の発現調節は臓器ごとに特異的な調節因子が存在し、腸管における pIgR 発現

調節機構がすべての臓器に当てはまるとは言い難い。また, Carpenter et al. (2004) の報告では, ラットの唾液腺における IgA 分泌活性機序について, 自律神経刺激が唾液腺の腺細胞に発現する pIgR の動員を亢進させ, 結果, IgA 分泌量の増加をもたらすということを明らかにしている [16].

本検索では, 免疫組織化学的に舌下腺の多くの漿液性腺細胞の細胞質において管腔側に pIgR 陽性像が認められ, さらに同部位に抗ウシ IgA 抗体陽性像も観察された。これらの結果から, 舌下腺では IgA が積極的に分泌されていると考えられた。一方, 下顎腺では抗ウシ IgA 抗体陽性像は舌下腺と同様, 管腔側細胞質において観察されたにもかかわらず, pIgR 陽性像は少数の漿液性腺細胞の細胞質の主に基底側でしか認められなかった。すなわち, 積極的に IgA を分泌している舌下腺とは異なり, 下顎腺では発現している pIgR は主に基底側に留まり, これらの pIgR が管腔側に移動するためには何らかの刺激が必要である可能性が考えられた。ウシやヒツジの舌下腺ならびに耳下腺は断続的に唾液を分泌しており, 特に反芻時に最も多く唾液を分泌しているが, 下顎腺はこれらの唾液腺と異なり, 摂食時のみに限って唾液を分泌している [6-8, 32]。本検索において, 下顎腺の漿液性腺細胞における抗ヒト pIgR 抗体陽性像が, 舌下腺と異なり, 細胞質の基底側に観察されたのは, pIgR を介した IgA の輸送には, 少なくとも唾液の分泌刺激が必要である可能性が考えられたが, 詳細については不明な点が多い。

5. 小括

ヒトやラットの唾液中 IgA は、主に大唾液腺である舌下腺、下顎腺および耳下腺から分泌されている。ヒトでは、免疫組織化学的に、これら全ての大唾液腺において、漿液性腺細胞に pIgR 陽性像が確認されている。本検索においても、ヒトと同様、免疫組織化学染色においてウシの舌下腺と下顎腺の漿液性腺細胞に抗ヒト pIgR 抗体陽性像が観察された。しかし、これら唾液腺における漿液性腺細胞では、抗ヒト pIgR 抗体陽性部位が異なるという結果が得られた。さらに、ウシの舌下腺は、一視野当りにおける抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞の平均数が下顎腺よりも有意に多いことから、舌下腺は下顎腺よりも IgA 分泌能が高いと考えられた。本検索において、下顎腺の腺細胞における抗ヒト pIgR 抗体陽性像が主に基底側に観察されたことに関しては、その解釈には不明な点が多いが、少なくともウシの下顎腺では pIgR を介した IgA の輸送には何らかの刺激が必要である可能性が考えられた。よって、ウシでは、ヒトやラットと異なり、舌下腺、下顎腺および耳下腺における pIgR の発現ならびに分布に大きな差が見られ、これらの唾液腺における pIgR 発現制御ならびに IgA 輸送機構は非常に興味深い。反芻動物の唾液腺、特に下顎腺では、どのような pIgR 制御因子が存在するのか今後も検索を進める必要がある。

第V章 ウシ全身粘膜ならびに腺組織における pIgR を介した IgA 分泌能

1. 序文

近年、ヒト、ラットおよびマウスにおいて、全身粘膜ならびに腺組織における pIgR の発現調節機構に関して多くの制御因子が解明されている [13, 14, 16, 18, 28, 29, 31]. ヒトでは、腸管を中心に pIgR 発現調節機構が明らかとされつつある. ヒトの腸管内における共生微生物叢が有する MAMPs と呼ばれる特徴的な分子群は、腸管上皮細胞における pIgR の発現を刺激し、分泌型 IgA の産生を増加させることが知られている [13, 14, 18, 28, 29]. すなわち 2 本鎖 RNA や lipopolysaccharide が、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に重要な役割を担っている TLR-3 や TLR-4 のリガンドとなって腸管上皮細胞内での pIgR 発現を亢進する. また、腸管上皮細胞における pIgR の発現は様々な宿主サイトカイン、例えば IFN- γ , TNF, IL-1, IL-4 などによっても上方制御されている. さらに、pIgR は多量体 IgA と複合体を形成しなくても本質的トランスサイトシスは起きており、粘膜側に free-SC を供給することが知られているが、粘膜上皮細胞の基底側において pIgR と多量体 IgA が結合することで上皮細胞内における pIgR と多量体 IgA の複合体のトランスサイトシス率が増加することも報告されている [28]. しかし、臓器によってはホルモンや自律神経系などといった、腸管で明らかにされている pIgR の発現制御因子とは異なる調節機構の存在もまた明らかにされている [1, 5, 16, 31, 45-47]. すなわち、ヒト、ラットおよびマウスにおいても、全身粘膜ならびに腺組織における pIgR 発現調節機構の全体像はよくわかっていない.

著者は、第 II -IV 章において、ウシでは大唾液腺の種類によって免疫応答の違いがあることを明らかにした. 本章では第 III 章においてウシの pIgR 蛋白を特異的に認識することを確認した抗ヒト pIgR 抗体を用いて、唾液腺以外のウシの全身粘膜ならびに腺組織における pIgR の局在について免疫組織化学的検索を行い、また、同組織における IgA 産生形質細胞の分布を調べ、各組織における pIgR を介した IgA 分泌能について比較、検討した.

2. 材料と方法

2-1. 供試動物

ウシ（ホルスタイン種）の涙腺，消化管，肺，乳腺，胆嚢，肝臓，腎臓，膵臓の各組織を採取し，10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを常法に従い作製した．なお，病理解剖学的ならびに組織学的に炎症ならびに腫瘍等を認めない標本を検索に用いた．検索に用いた症例の年齢，性別，主訴・死因および免疫組織化学的検索に用いた組織を Table 5 に示す．

2-2. 組織学的検索

全ての症例の唾液腺組織は10%ホルマリン緩衝液で固定し，アルコール脱水後パラフィンで包埋した．パラフィン包埋組織を4 μm に薄切し，常法に従いHE染色を施した．

2-3. 免疫組織化学的検索

第Ⅲ，Ⅳ章で用いた抗ヒト pIgR 抗体ならびに抗ウシ IgA 抗体を用いて，ABC法により免疫組織化学染色を行った．免疫組織化学染色を行うにあたり，作製したパラフィン切片をキシレンで十分に脱パラフィンした後，エチルアルコールを通し，水洗した．抗ウシ IgA 抗体は，その後，抗原賦活化の目的でトリプシンによる37°C，10分間の酵素反応を行った．次に，内因性ペルオキシダーゼ除去のため0.3% H_2O_2 加PBSに5分浸漬した．十分に水洗後，非特異反応除去の目的で10%ヤギ正常血清を用いて37°Cで30分間のブロッキング処置を行った．一次抗体をPBSで希釈して切片上へのせ，保湿箱内で4°C，16時間反応させた．反応終了後，PBSで洗浄し，二次抗体（ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体，Vector Laboratories）を切片上へのせ，室温，30分間反応させた．その後PBSで洗浄し，西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（Vector Laboratories）を切片上へのせ，室温，30分間反応させた．反応終了後，PBSで洗浄し，0.05% 3,3-diaminobenzidine 水溶液に5% H_2O_2 を最終濃度が0.005%になるように加えた発色液に室温，10分間浸漬して発色反応を

行った。すべての組織の対比染色には Mayer のヘマトキシリン染色をおこなった。陰性対照として一次抗体を省いた。

2-4. 抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞数の計測

抗ウシ IgA 抗体を用いて免疫組織化学的染色を施した各組織は、第IV章と同様、一視野 (×400) で3カ所、腺房周囲間質または粘膜固有層に分布する抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞数を計測し、それぞれの平均値±標準偏差を求めた。

Table 5. 免疫組織化学的検索に用いた症例

No.	年齢	性別	主訴, その他所見	免疫組織化学的検索に用いた臓器								
				涙腺	腸管	肺	乳腺	胆嚢	肝	腎	膵	
1	4m	M	異常なし	+	+	+	-	+	+	+	+	
2	4m	M	異常なし	+	+	+	-	-	+	+	+	
3	4m	M	異常なし	-	+	+	-	+	+	+	+	
4	4m	M	異常なし	-	+	+	-	-	+	+	+	
5	4m	F	異常なし	+	+	+	-	+	+	+	+	
6	4m	F	異常なし	+	+	+	-	-	+	+	+	
7	4m	F	異常なし	+	+	+	-	+	+	+	+	
8	4m	F	異常なし	+	+	+	-	+	+	+	+	
9	4m	F	異常なし	+	-	-	-	+	+	+	+	
10	4m	F	異常なし	+	-	+	-	+	+	+	+	
11	4y	F	飛節周囲炎	-	+	+	-	+	+	+	+	
12	2y	F	腰椎損傷	-	+	+	-	+	+	+	+	
13	4y	F	飛節周囲炎	-	+	+	-	+	+	+	+	
14	5y	F	起立不能症	-	-	-	+ ^a	-	-	-	-	
15	6y	F	橈骨神経麻痺	-	-	-	+ ^b	-	-	-	-	
16	5y	F	後肢筋変性	-	-	-	+ ^c	-	-	-	-	
17	4y	F	坐骨神経麻痺	+	+	+	+ ^d	+	+	+	+	
18	4y	F	飛節周囲炎	-	-	-	+ ^c	-	-	-	-	
19	4y	F	異常なし	+	-	+	-	+	+	+	+	
計				10	12	14	5	12	15	15	15	

m: 月齡, y: 年齢, M: オス, F: メス

+: 検索に用いた, -: 検索には用いていない

^a 分娩後 30 日, ^b 分娩直後 (当日), ^c 生産周期は不明, ^d 分娩後 20 日

3. 結果

3-1. 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的所見

涙腺組織 (n=10) ; 検索した 10 検体全てにおいて, 多くの腺ならびに導管上皮細胞において pIgR 陽性像が認められた. pIgR 陽性像は主に細胞質の管腔側に認められ, 特に導管上皮で強い陽性像が観察された (Fig. 26).

消化管粘膜組織 (n=12) ; 第四胃から大腸にかけて, 幽門部, 小腸および大腸の多くの粘膜上皮細胞に pIgR 陽性像が認められた (Fig. 27). pIgR 陽性像は主に細胞質の管腔側に観察された. 第四胃底粘膜上皮細胞ならびに幽門腺細胞, 十二指腸腺細胞では pIgR 陽性像は認められなかった.

肺組織 (n=14) ; 4 ヶ月齢の子ウシ 9 検体中 8 検体において, 一部の気管支粘膜上皮ならびに多くの気管支腺細胞の管腔側に pIgR 陽性像が認められた (Figs. 28, 29). また, 2-4 歳齢の成牛では, 5 検体中 2 検体において, 一部の気管支腺細胞における pIgR 陽性像が認められた. 成牛では 5 検体中全ての肺組織において気管支粘膜上皮における pIgR 陽性像は認められなかった.

乳腺組織 (n=5) ; 分娩後 20 日ならびに 30 日の 2 検体 (症例 Nos. 14, 17) において, 一部の乳腺細胞に pIgR 陽性像が認められた (Fig. 30). pIgR 陽性像は主に細胞質の管腔側で認められた. 検索した他の 3 検体 (症例 Nos. 15, 16, 18) ではいずれの乳腺細胞も pIgR 抗体陽性像を認めなかった.

胆嚢組織 (n=12) ; 検索した 12 検体全ての胆嚢組織において, 一部の粘膜上皮細胞に pIgR 陽性像が認められ, 特に粘膜陰窩の上皮細胞において強い陽性像が観察された (Fig. 31).

肝臓, 腎臓および膵臓組織 (いずれも n=15) ; 検索した 15 検体全ての肝臓, 腎臓および膵臓組織において, 実質細胞における pIgR 陽性像は認められなかった (Figs. 32, 33).

3-2. 抗ウシ IgA 抗体を用いた免疫組織化学的所見

各々の腺組織ならびに粘膜組織における抗ウシ IgA 抗体陽性細胞数(平均値±標準偏差)を Fig. 34 に示した.

涙腺組織 (n=10) ; 小葉間結合組織において多数の抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞が観察された (23.7 ± 7.1).

消化管粘膜組織 (n=12) ; 空腸粘膜固有層において多数の抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞が観察された (56.6 ± 14.9).

肺組織 ; 子牛 (4 ヶ月齢, n=9) の検体において気管支粘膜固有層 (10.3 ± 2.1) ならびに気管支腺周囲 (11.3 ± 2.1) に抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞が認められた. 一方, 成牛 (2-4 歳齢, n=5) の検体では気管支粘膜固有層 (3.4 ± 1.0) ならびに気管支腺 (6.0 ± 1.4) において抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞が認められた.

乳腺組織 (n=5) ; 乳腺小葉内の腺腔周囲間質に浸潤する形質細胞の一部に抗ウシ IgA 抗体陽性像が認められた (2.5 ± 2.9).

胆嚢組織 (n=5) ; 粘膜下固有層における腺周囲において抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞は極めて少なく, 稀に観察される程度であった (0.7 ± 0.6).

肝臓, 腎臓および膵臓組織 (いずれも n=5) ; 肝小葉間結合組織, 腎尿細管周囲間質ならびに膵小葉間結合組織では少数の抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞が認められた (肝臓 : 1.7 ± 1.3 , 腎臓 : 1.7 ± 1.5 , 膵臓 : 1.0 ± 0.8).

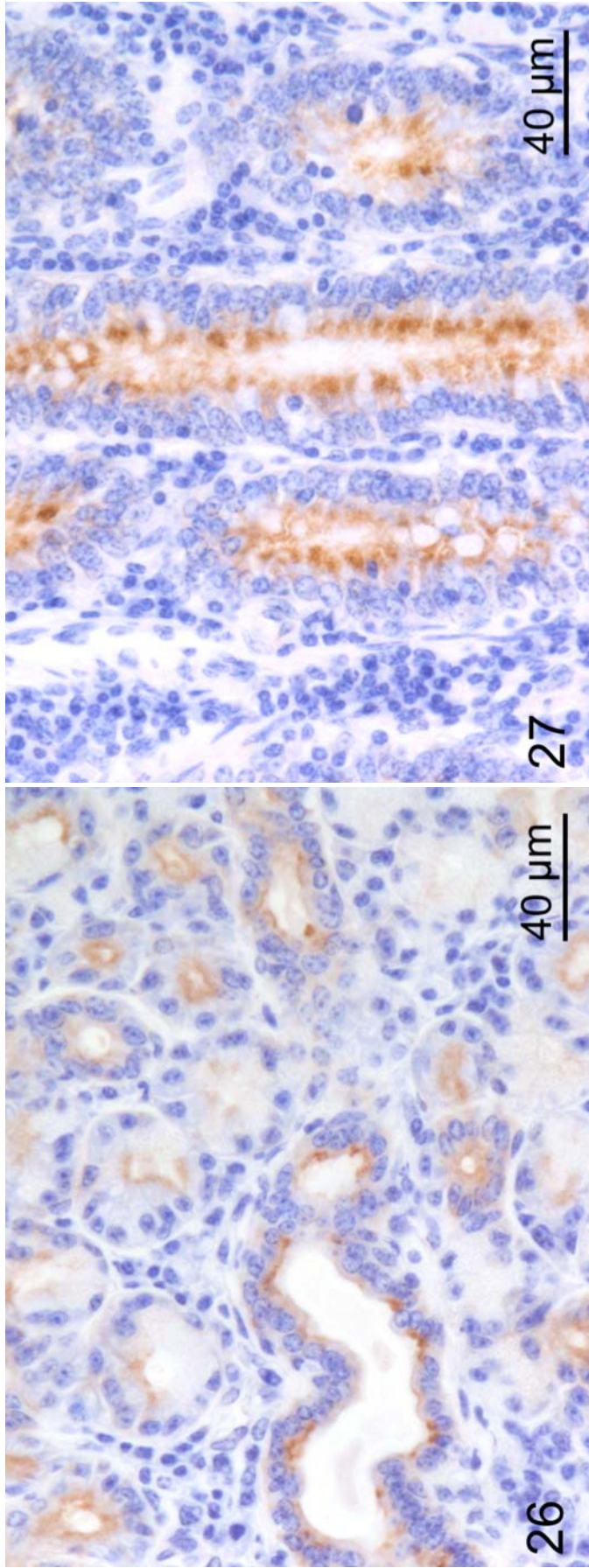


Fig. 26. 涙腺 (症例 No. 17). 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索.

多くの腺上皮細胞ならびに導管上皮細胞において pIgR 抗体陽性像が観察される. 陽性像は主に細胞質の管腔側の管腔側で認められ, 腺細胞よりも拡張した導管上皮細胞でより強い陽性像が観察される.

Fig. 27. 消化管 (空腸, 症例 No. 13). 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索.

多くの粘膜上皮細胞において, 主に細胞質の管腔側に抗ヒト pIgR 抗体陽性像が認められる.

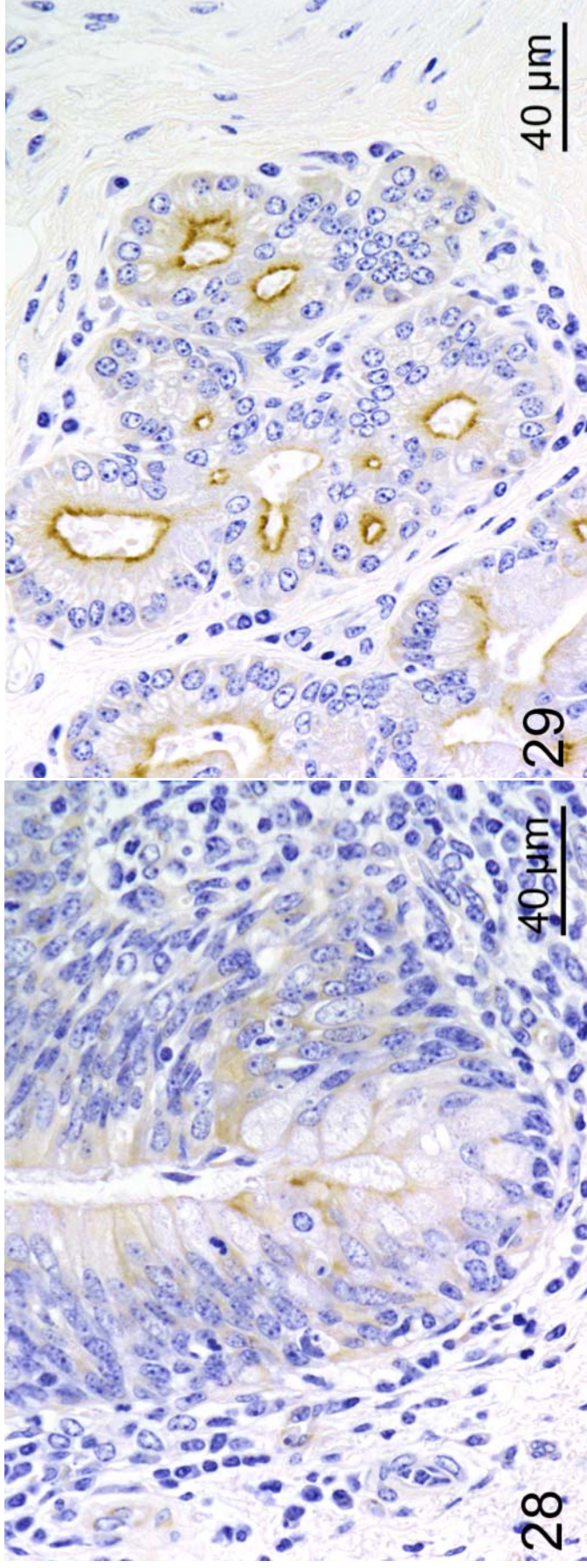


Fig. 28. 肺（子牛，症例 No. 4）.

一部の気管支粘膜上皮細胞において抗ヒト pIgR 抗体陽性像が認められる．抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索．

Fig. 29. 肺（子牛，症例 No. 4）.

気管支腺では，多くの腺細胞の細胞質管腔側に強い抗ヒト pIgR 抗体陽性像が観察される．陽性像は気管支粘膜上皮細胞よりも強い．抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索．

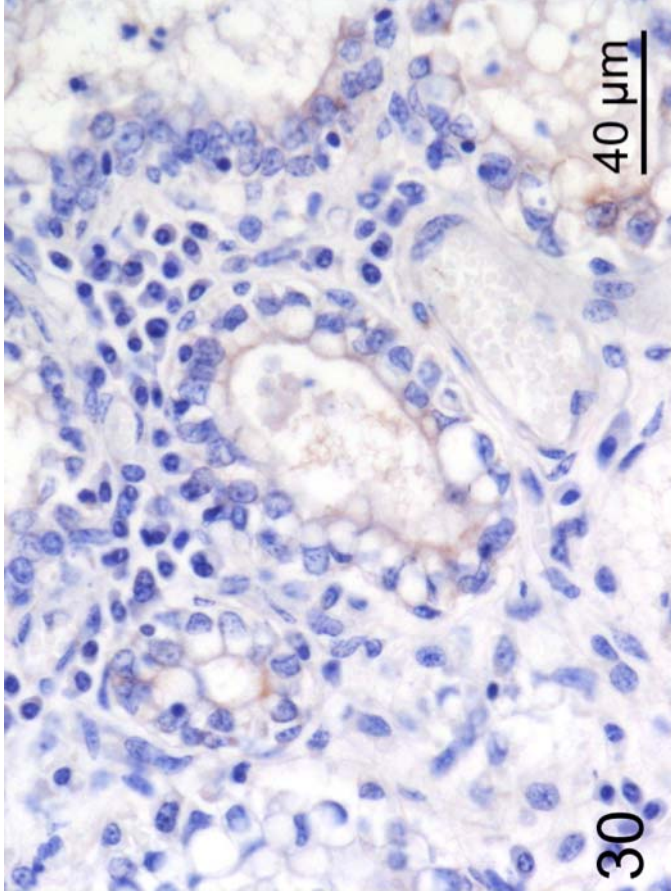


Fig. 30. 乳腺 (症例 No. 17).

乳腺上皮細胞の主に細胞質管腔側に陽性像が観察される. 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索.

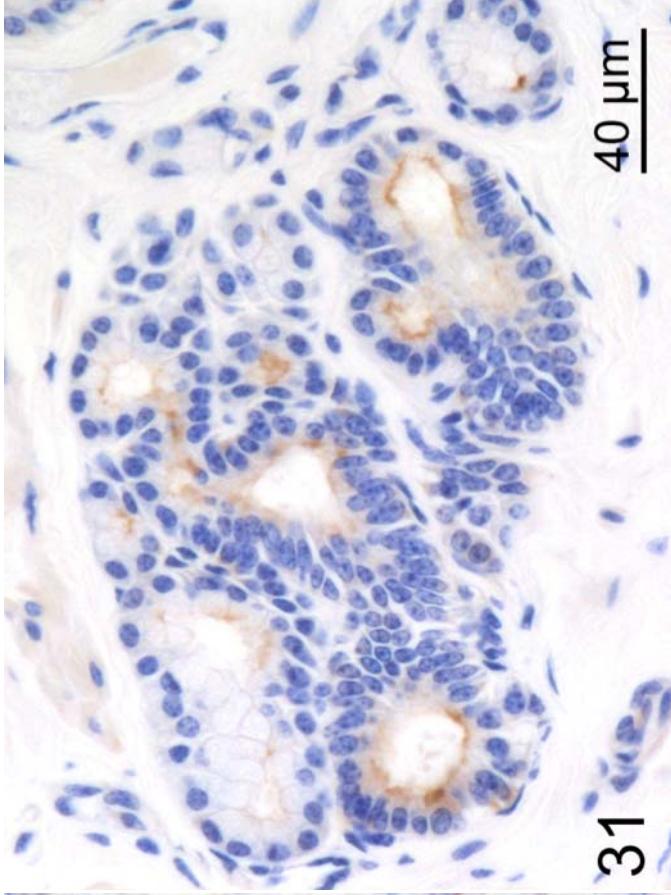


Fig. 31. 胆嚢 (症例 No. 19).

胆嚢では陰窩の多くの粘膜上皮細胞の細胞質管腔側に陽性像が観察される. 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索.

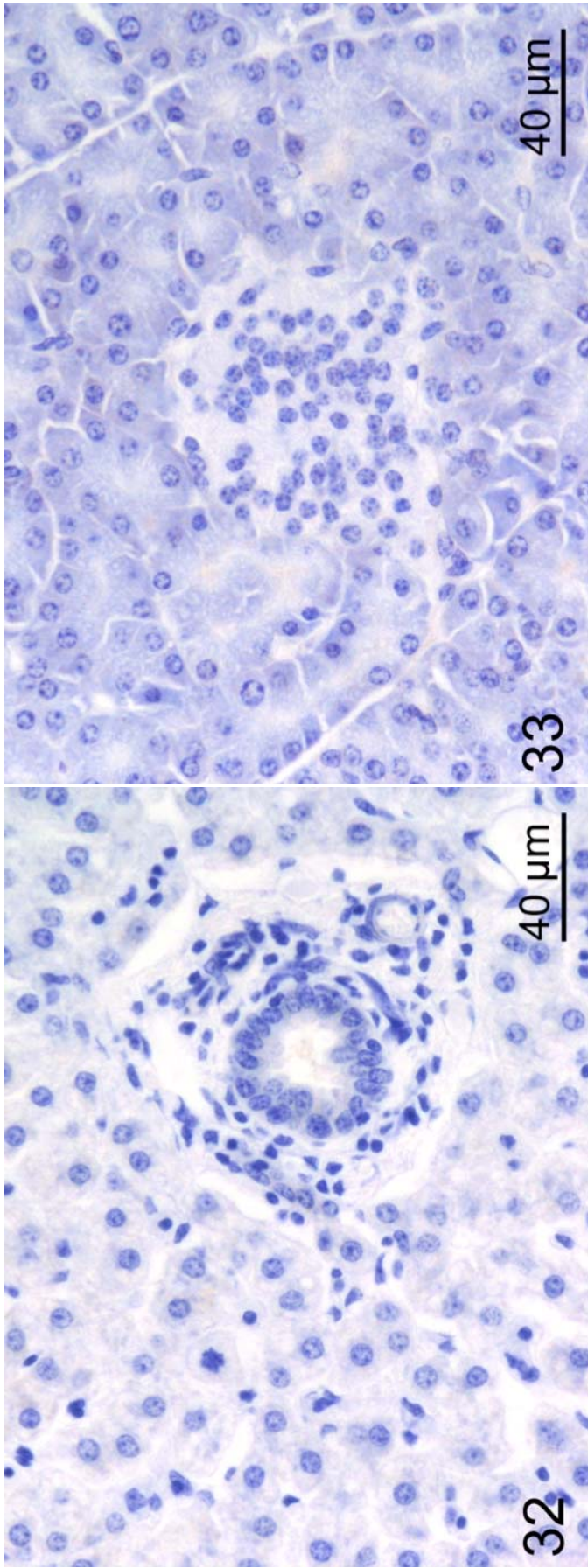


Fig. 32. 肝臓 (症例 No. 17).

肝細胞ならびに小葉間胆管上皮細胞はいずれも抗ヒト pIgR 抗体陽性像を認めない. 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索.

Fig. 33. 脾臓 (症例 No. 17).

内分泌部の脾島細胞ならびに外分泌部の腺細胞はいずれも抗ヒト pIgR 抗体陽性像を認めない. 抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索.

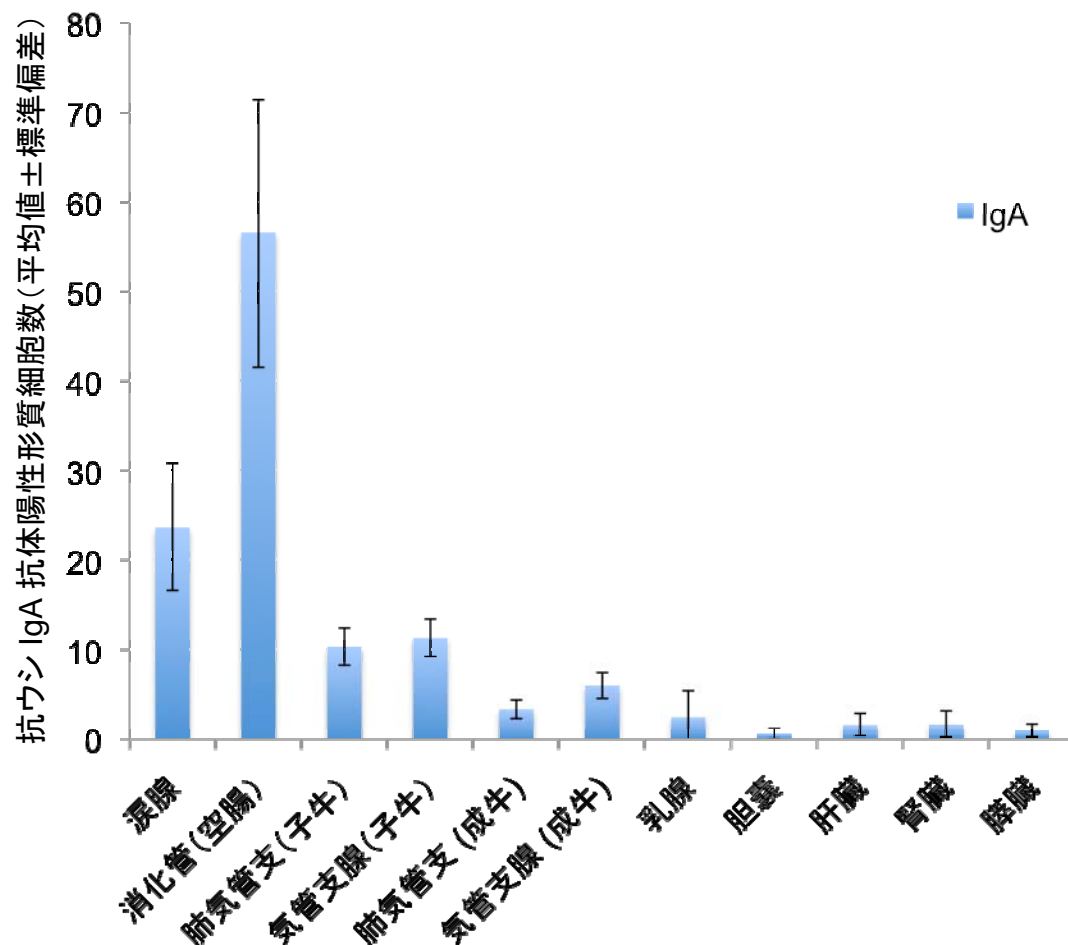


Fig. 34. 腺組織ならびに粘膜組織一視野当りにおける平均抗ウシ IgA 抗体産生形質細胞数.

各組織 (n=5-12) の一視野当り (×400) における形質細胞数 (平均値+標準偏差) をグラフに示す. グラフより, 抗ウシ IgA 抗体産生形質細胞数は涙腺ならびに消化管 (空腸) において他の腺ならびに粘膜組織と比較して多い. また, 子牛と成牛の肺では, 気管支粘膜固有層ならびに気管支腺に分布する抗ウシ IgA 抗体産生形質細胞数はそれぞれ子牛の方が成牛よりも多い.

4. 考察

IgA はヒト, ラットおよびマウスの粘膜表面に分泌される免疫グロブリンアイソタイプの中で最も多く, 腸管分泌液, 鼻腔ならびに気管分泌液, 尿生殖管分泌液中, 涙液, 唾液および乳汁に含まれている [33, 56]. ヒトでは消化管, 上下気道, 子宮頸管, 結膜を覆う粘膜上皮細胞ならびに涙腺, 唾液腺, 乳腺などの外分泌腺細胞において pIgR の発現が報告されており, pIgR を介した多量体 IgA の分泌が確認されている [13, 14, 18, 29, 33, 56].

ウシにおいても, ウェスタンブロット法による消化管組織の膜成分より SC が検出されたという報告や, ノーザンブロット法による pIgR mRNA の発現報告がなされており, pIgR の発現と IgA 分泌の関連性が以前より報告されてきた [10, 11, 35, 58]. 涙液を分泌する腺組織には涙腺, マイボーム腺, 瞬膜腺があり, Schlegel et al. (2003) によって免疫組織化学的にウシの瞬膜腺における pIgR 陽性像ならびに IgA 分泌能に関する報告がなされているが, 涙腺における pIgR ならびに IgA に関する報告はない [51]. 本検索では, 検索したウシの全ての涙腺ならびに第四胃幽門部以下の消化管組織に抗ヒト pIgR 抗体陽性像が確認され, また, これらの組織では腺周囲間質組織ならびに粘膜固有層において多くの抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞の分布が観察された. よって, ウシの涙腺ならびに消化管粘膜では, 本研究の第IV章におけるウシの舌下腺と同様, pIgR を介して IgA が積極的に分泌されていると考えられた.

Anderson et al. (1986) は, 子牛は 18 ヶ月齢に至るまで肺気管支樹における免疫グロブリン抗体産生細胞の数は上昇し, その後年齢の経過とともに下降し, 年齢の経過に関わらず免疫グロブリン抗体産生細胞の多くを抗 IgA 抗体陽性形質細胞が占めると報告している [2, 3]. さらに, 4 ヶ月齢の子牛の肺における IgA の割合は 66%と最も高い [2, 3, 39]. 本検索では, 主に子牛 (4 ヶ月齢) の気管支粘膜上皮ならびに腺細胞に抗ヒト pIgR 陽性像が認められ, 成牛 (2~4 歳齢) の肺では 2 検体のみ, 一部の気管支腺細胞に認められたただけであった. また, 抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞の分布は子牛で多く, 成牛では少ないという結果であった. すなわち, 今

回検索に用いた子牛の年齢は、肺の免疫機構が最も発達している時期で、子牛は成牛よりも pIgR を介して IgA が盛んに分泌されていると考えられた。

乳用牛は、生産周期として分娩、泌乳期、乾乳期を繰り返しており、中でも泌乳期はさらに4ステージに分かれ、特に分娩後51～100日を泌乳最盛期という[30]。乳用牛の乳腺は分娩してから泌乳最盛期まで拡張していき泌乳量を増大させ、そして泌乳最盛期を過ぎると、徐々に乳腺は退縮し泌乳量を減少させる。近年、反芻動物であるヒツジでは、乳腺の発達を促すプロラクチンホルモンが pIgR の発現を誘起させ、生産周期によって乳腺における pIgR の発現が異なることが報告されている[47]。すなわち、ヒツジの乳腺は分娩後3日から pIgR mRNA の発現が認められ、泌乳最盛期（分娩後70日）でさらに発現が増加する。本検索においても同様に、泌乳初期の成牛2検体（分娩後20、30日）のみで乳腺細胞における抗ヒト pIgR 陽性像が確認された。また、一般的に IgA が豊富なヒトやマウスの乳汁と異なり、ウシの乳汁は IgG1 が主体を占め、IgA は少なく、ウシの乳腺細胞には pIgR とは別に FcRn を介した血清 IgG1 の選択的輸送機構が存在することが知られおり、ウシの乳腺ではヒトやラットの乳腺と異なり、IgA による免疫機構は IgG1 の補助的な役割を果たしているため、今回検索したウシの乳腺組織の間質に分布する抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞の分布が少なかったと考えられた [15, 38, 46, 48, 49]。

本検索に用いたウシの胆嚢では、涙腺や消化管、また第IV章で検索した舌下腺と同様の抗ヒト pIgR 陽性像が見られたにもかかわらず、抗ウシ IgA 抗体陽性形質細胞の分布は、これらの組織とは異なり、極めて少なかった。すなわち、本検索により、ウシの胆嚢では形質細胞による多量体 IgA の局所産生が少ないと考えられる。ヒトの血中 IgA は主に単量体であるが、ウシの血中 IgA は主に2量体を形成している多量体 IgA である[15]。ウシの胆汁からは IgA が検出されていることから、後述のような肝臓の毛細胆管を介して胆汁中に分泌されている、もしくは胆嚢粘膜上皮細胞が血中の多量体 IgA を取り込み分泌している可能性が考えられた [15, 37, 60]。

ウシの肝臓では、Beale と Hopley (1987) は肝細胞の膜成分から SC 蛋白を検

出したと報告しているが、Kulseth et al. (1995) は肝組織から pIgR mRNA の検出を試みるも、発現は見られなかったと報告している [10, 11, 35]. 近年、肝細胞における pIgR の発現は動物によって異なり、ラット、ウサギおよびニワトリの肝細胞膜には pIgR が発現し、門脈を通過して肝臓に運ばれた多量体 IgA と結合し、毛細胆管に分泌することが明らかとされている [17, 25, 26, 53, 56]. 一方、この経路はヒトや反芻動物、イヌ、ブタの肝臓では極めて少ないことが報告されている [43, 56]. また、ヒトやラットでは正常〜軽度の異常を示す程度の腎尿細管では pIgR を発現しないが、ある程度の障害を有する腎臓では主に遠位およびヘンレ尿細管上皮に pIgR が発現することが報告されている [1, 5, 45]. ウシの腎組織においても pIgR mRNA が検出されている [35, 58]. そして、膵臓では、ラットのみ膵腺細胞における pIgR の発現が認められているが、他の動物種での報告はない [26]. 本検索では肝臓、腎臓、膵臓のいずれの細胞も抗ヒト pIgR 陽性を示さなかったことから、ウシではこれらの臓器における pIgR を介した IgA の分泌能が低いか、もしくは発現していないと考えられる.

5. 小括

哺乳動物の粘膜面には多くのウイルスや病原菌から身を守るための効果的な「粘膜免疫」が存在する。その主体的役割を担っているのが、腺や粘膜上皮に発現する膜蛋白 pIgR の一部と多量体 IgA との複合体である分泌型 IgA である。本検索により、ウシの涙腺および第四胃幽門部以下の消化管粘膜では、舌下腺と同様、pIgR を介して IgA が積極的に分泌されていると考えられた。また、肺気管支粘膜や乳腺では、それぞれ年齢や生産周期によって pIgR を介した IgA の分泌が変化し、さらに胆嚢では局所産生 IgA よりも血中もしくは肝細胞由来の IgA を分泌している可能性が考えられた。一方、肝臓、腎臓、膵臓組織では pIgR を介した IgA 分泌能が極めて少ないか、もしくは行われていない可能性が考えられた。従って、本検索によりウシの全身粘膜ならびに腺組織における分泌型 IgA による粘膜防御機構は組織によって異なる可能性が示唆された。

総括

唾液には大量の免疫グロブリンが含まれ、特に分泌型 IgA は口腔内の粘膜免疫機構の主役を果たしている。全身の粘膜ならびに腺細胞の基底膜側には、 pIgR と呼ばれる大きさ約 80～100 kDa の膜 1 回貫通型糖蛋白が分布している。この pIgR は、主に間質に分布する形質細胞より合成された多量体 IgA と結合し複合体を形成すると、トランスサイトシスにより管腔側に輸送され、その後、 pIgR の細胞外領域の一部が切断され、分泌成分 SC として分泌される。この SC と多量体 IgA の複合体は分泌型 IgA と呼ばれ外界からの抗原を排除する。ヒトやラット、マウスでは、多くの研究者によって唾液腺を含め、涙腺、呼吸器粘膜、腸管粘膜、乳腺、泌尿生殖器と全身における pIgR の発現ならびに、 pIgR による多量体 IgA の分泌能が調べられている。しかしながら、ウシでは唾液腺における pIgR の発現に関する検索はない。

反芻動物であるウシにとって、特に唾液は第一胃（ルーメン）内微生物による発酵消化を円滑に進め、自身の生命を維持して行く上で重要な役割を果たしている。また、唾液の産生部位である唾液腺は、自然免疫あるいは獲得免疫の実効器官としても極めて重要である。しかし、ウシの唾液腺における研究は乏しく、特に IgA の分泌に関する検索はこれまで下顎腺と耳下腺のみしか扱われていなかった。よって、本研究では舌下腺を含めたウシの 3 大唾液腺（舌下腺、下顎腺および耳下腺）の免疫機能を明らかにするため、組織学、免疫組織化学、生化学ならびに分子生物学的分析手法を用いて多角的に検討した。

1. ウシ唾液腺の組織学的検索

哺乳動物の大唾液腺は一般に、共通の特徴を有することで知られている。すなわち、大唾液腺には主に舌下腺、下顎腺および耳下腺があり、これら唾液腺は肉眼解剖学的ならびに組織学的特徴により、舌・下顎腺グループと耳下腺グループに大きく分けられる。組織学的特徴として前者は混合腺、後者は漿液腺である。ヒトやラットでは、多少の差はあるものの、免疫担当細胞はいずれの唾液腺でも分布が認められており、各唾液腺における IgA の分泌能に大きな差は見られていない。しか

し、本検索ではウシの3大唾液腺のなかでも舌下腺が最も多く、次いで下顎腺に多くの形質細胞が分布しているが、耳下腺では極めて少ないことが判明した。よって、ヒトやラットと異なり、ウシの3大唾液腺では腺によって免疫機能に大きな違いがある可能性が見いだされた。

2. ウシ唾液腺における pIgR 発現の分子生物学的検索

ウシの pIgR 蛋白はヒト、ラットおよびマウスと同様、5つの Ig-like 構造を有する細胞外領域、細胞膜を貫通する細胞膜領域、細胞内領域の3つの領域から構成されることが明らかにされている。さらにウシでは5つの Ig-like 構造のうち、2、3番目の Ig-like 構造を欠く short 型の pIgR が確認されている。本検索では、RT-PCR によって、ウシの舌下腺ならびに下顎腺では、恒常的に long type pIgR ならびに short type pIgR 両型の mRNA が発現していることが確認された。さらにウェスタンブロッティング法により舌下腺は下顎腺よりも pIgR 蛋白の発現が多いことが確認され、舌下腺は下顎腺よりも IgA をより多く分泌していると考えられた。また、耳下腺では RT-PCR 法ならびにウェスタンブロッティング法において、いずれも pIgR の発現が認められなかったことから、ウシの耳下腺では pIgR を介して IgA が分泌されていないことが判明した。

3. ウシ唾液腺組織における pIgR を介した IgA の分泌能

本検索により、ウシの大唾液腺は腺によって IgA の分泌能が異なることが判明した。すなわち、3大唾液腺のなかでも、pIgR を介した IgA の分泌は舌下腺が主体であることが判明した。下顎腺では pIgR の発現ならびに IgA 産生形質細胞の分布を認めるも、腺細胞における主な pIgR 局在部位が舌下腺と異なり、細胞質内の基底側で観察され、下顎腺では pIgR を介した IgA の分泌には何らかの刺激が必要である可能性が示唆された。

4. ウシ全身粘膜ならびに腺組織における pIgR を介した IgA の分泌能

全身粘膜ならびに腺組織において、pIgR を介した IgA の分泌機構は組織によって異なることが判明した。すなわち、涙腺ならびに第四胃幽門部以下の消化管では舌下腺と同様、間質に分布する IgA 産生形質細胞によって合成された IgA を pIgR によって積極的に管腔側に分泌していると考えられた。また、肺や乳腺に関しては、年齢や生産周期によって pIgR を介した IgA の分泌能が異なる可能性が示唆された。さらに、胆嚢では間質には IgA 産生形質細胞の分布は見られず、pIgR は血中の多量体 IgA を取り込み分泌しているか、もしくは肝細胞由来の IgA を分泌している可能性が考えられた。一方、肝臓、腎臓および膵臓では、pIgR を介した IgA の分泌は極めて少ないもしくはないと考えられた。

近年、多くの研究者らによって pIgR の発現調節機構が解明されつつあるなか、動物種や臓器ごとにその発現は異なり、ホルモンや炎症性サイトカインによっても pIgR の発現に影響が及ぶことが明らかとされている。本検索により、ウシでは大唾液腺の種類によって pIgR の発現が異なることが判明した。さらに抗ヒト pIgR 抗体を用いた免疫組織化学的検索では、舌下腺漿液性腺細胞では細胞質管腔側に、下顎腺の漿液性腺細胞では細胞質基底側に主な抗ヒト pIgR 抗体陽性像が認められ、舌下腺と下顎腺で抗ヒト pIgR 抗体陽性部位が異なることが判明した。また、全身の粘膜ならびに腺組織では涙腺の腺細胞ならびに導管上皮細胞、消化管粘膜上皮細胞、肺気管支粘膜上皮ならびに気管支腺細胞、乳腺細胞および胆嚢粘膜上皮細胞のいずれも細胞質内管腔側に陽性像が認められた。すなわち、唯一、下顎腺のみ腺細胞の細胞質内基底側に pIgR の陽性像認められたことは非常に興味深い。よって、ウシの唾液腺、特に下顎腺における pIgR の発現調節機構の解明は、粘膜免疫における pIgR を介した IgA 分泌機構の全体像を明らかにする鍵となると考えられた。

ウシやヒツジといった産業動物は我々人間に良質な蛋白源すなわち乳製品や肉製品を提供しており、これらの動物における粘膜免疫機構の解明は、より健康で良質な産業動物の育成に大いに役立つことが期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり，終始ご指導を賜りました本学獣医病理学ユニット谷山弘行教授ならびに獣医生化学ユニット横田博教授に感謝致します．また，常にご協力，ご助言を賜りました本学獣医保健看護学類動物栄養学ユニット宮庄拓先生，食肉科学技術研究所前田尚之先生，本学獣医病理学ユニット松田一哉准教授，平山和子先生，獣医免疫学ユニット岡本実准教授，獣医栄養生理学ユニット翁長武紀教授，生産動物内科学Ⅱユニット小岩政照教授，獣医ウイルス学ユニット萩原克郎教授，獣医生化学ユニット岩野英知准教授に深謝いたします．最後に，大学院生活を支え励ましてくださった獣医病理学ならびに獣医生化学ユニットの諸氏に心よりお礼を申し上げます．

文献

1. Abramowsky, C. R. and Swinehart, G. L. 1986. Secretory immune responses in human kidneys. *Am. J. Pathol.* **125**: 571-577.
2. Anderson, M. L., Moore, P. F., Hyde, D. M. and Dungworth, D. L. 1986a. Bronchus associated lymphoid tissue in the lungs of cattle: relationship to age. *Res. Vet. Sci.* **41**: 211-220.
3. Anderson, M. L., Moore, P. F., Hyde, D. M. and Dungworth, D. L. 1986b. Immunoglobulin containing cells in the tracheobronchial tree of cattle: relationship to age. *Res. Vet. Sci.* **41**: 221-227.
4. Asano, M. and Komiyama, K. 2011. Polymeric immunoglobulin receptor. *J. Oral. Sci.* **53**: 147-156.
5. Asano, M., Saito, M., Suguro, H., Nomura, H., Inage, T. and Moro, I. 2004. Active synthesis of mouse polymeric immunoglobulin receptor in the epithelial cells of the distal urinary tubule in kidney. *Scand. J. Immunol.* **60**: 267-272.
6. Bailey, C. B. 1961. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 3. The rate of secretion of mixed saliva in the cow during eating, with an estimate of the magnitude of the total daily secretion of mixed saliva. *Br. J. Nutr.* **15**: 443-451.
7. Bailey, C. B. and Balch, C. C. 1961a. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 1. The composition and rate of secretion of parotid saliva in a small steer. *Br. J. Nutr.* **15**: 371-382.

8. Bailey, C. B. and Balch, C. C. 1961b. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. *Br. J. Nutr.* **15**: 383-402.
9. Banting, G., Brake, B., Braghetta, P., Luzio, J. P. and Stanley, K. K. 1989. Intracellular targeting signals of polymeric immunoglobulin receptors are highly conserved between species. *FEBS Lett.* **254**: 177-183.
10. Beale, D. 1987. The structure of bovine secretory component. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **17**:37-49.
11. Beale, D. and Hopley, J. 1986. A bovine epithelial membrane protein that binds polymeric immunoglobulin and has a structure related to that of bovine secretory component. *Biochem. J.* **233**: 37-40.
12. Brandtzaeg, P. 2007a. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann. NY. Acad. Sci.* **1098**: 288-311.
13. Brandtzaeg, P. 2007b. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* **25**: 5467-5484.
14. Brandtzaeg, P. 2009. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand. J. Immunol.* **70**: 505-515.
15. Butler, J. E. 1998. Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. *Rev. Sci. Tech.* **17**: 43-70.

16. Carpenter, G. H., Proctor, G. B., Ebersole, L. E. and Garrett, J. R. 2004. Secretion of IgA by rat parotid and submandibular cells in response to autonomic stimulation in vitro. *Int. Immunopharmacol.* **4**: 1005-1014.
17. Chintalacheruvu, K. R., Tavill, A. S., Louis, L. N., Vaerman, J. P., Lamm, M. E. and Kaetzel, C. S. 1994. Disulfide bond formation between dimeric immunoglobulin A and the polymeric immunoglobulin receptor during hepatic transcytosis. *Hepatology* **19**: 162-173.
18. Corthésy, B. 2010. Role of secretory immunoglobulin A and secretory component in the protection of mucosal surfaces. *Future Microbiol.* **5**: 817-829.
19. Cripps, A. W and Lascelles, A. K. 1976. The origin of immunoglobulins in salivary secretion of sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **54**: 191-195.
20. Cunningham, J. G. 1997. 第2版. 獣医生理学 (高橋迪雄 監訳). 文永堂出版. 東京.
21. Dyce, K. M., Sack, W. O. and Wensing, C. J. G. 1998. 第2版. 獣医解剖学 (山内昭二, 杉村 誠, 西田隆雄 監訳). 近代出版. 東京.
22. Dzidic, A., Mohr, A., Meyer, K., Bauer, J., Meyer, H. H. and Pfaffl, M. W. 2004. Effects of mycophenolic acid (MPA) treatment on expression of Fc receptor (FcRn) and polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) mRNA in adult sheep tissues. *Croat. Med. J.* **45**: 130-135.
23. Frutiger, S., Hughes, G. J., Fonck, C. and Jaton, J. C. 1987a. High and low molecular

- weight rabbit secretory components. Evidence for the deletion of the second and third domains in the smaller polypeptide. *J. Biol. Chem.* **5**: 1712-1715.
24. Frutiger, S., Hughes, G. J., Hanly, W. C., Kingzette, M. and Jaton, J. C. 1987b. Structural variability of rabbit secretory components. Allotype-associated differences in the third, fourth, and fifth domains. *J. Biol. Chem.* **5**: 10463-10469.
25. Giffroy, D., Langendries, A., Maurice, M., Daniel, F., Lardeux, B., Courtoy, P. J. and Vaerman, J. P. 1998. In vivo stimulation of polymeric Ig receptor transcytosis by circulating polymeric IgA in rat liver. *Int. Immunol.* **10**: 347-354.
26. Havaux, X. B., Vaerman, J. P., Maldague, P. and Courtoy, P. J. 1995. Detection of IgA and its receptor in the exocrine pancreas and the extrahepatic bile duct of the rat. *Adv. Exp. Med. Biol.* **371**: 1067-1070.
27. Hurlimann, J. and Darling, H. 1971. In vitro synthesis of immunoglobulin-A by salivary glands from animals of different species. *Immunology* **21**: 101-111.
28. Johansen, F. E. and Kaetzel, C. S. 2011. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* **4**: 598-602.
29. Kaetzel, C. S. 2005. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol. Rev.* **206**: 83-99.
30. 柏村文郎, 古村圭子, 増子孝義. 2012. 改訂版. 乳牛管理の基礎と応用. Dairy Japan 社. 東京.

31. Kaushic, C., Frauendorf, E. and Wira, C. R., 1997. Polymeric immunoglobulin A receptor in the rodent female reproductive tract: influence of estradiol in the vagina and differential expression of messenger ribonucleic acid during estrous cycle. *Biol. Reprod.* **57**: 958-966.
32. Kay, R. N. 1960. The rate of flow and composition of various salivary secretions in sheep and calves. *J. Physiol.* **150**: 515-537.
33. 清野宏. 2010. 臨床粘膜免疫学. 株式会社シナジー. 東京.
34. Korsrud, F. R. and Brandtzaeg, P. 1982. Characterization of epithelial elements in human major salivary glands by functional markers: localization of amylase, lactoferrin, lysozyme, secretory component, and secretory immunoglobulins by paired immunofluorescence staining. *J. Histochem. Cytochem.* **30**: 657-666.
35. Kulseth, M. A., Krajci, P., Myklebost, O. and Rogne, S. 1995. Cloning and characterization of two forms of bovine polymeric immunoglobulin receptor cDNA. *DNA Cell Biol.* **14**: 251-256.
36. Kyuma, T., Tanaka, S., Takahashi, M. and Yonai, M. 1986. Development of secretory IgA production in the salivary glands of calves. (in Japanese) *Jpn. J. Zootech. Sci.* **75**: 568-574.
37. Mach, J. P. and Pahud, J. J. 1971. Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. *J. Immunol.* **106**: 552-563.
38. Mayer, B., Doleschall, M., Bender, B., Bartyik, J., Bosze, Z., Frenyó, L. V. and

- Kacs Kovics, I. 2005. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. *J. Dairy. Res.* **72**: 107-112.
39. Mayer, B., Kis, Z., Kaján, G., Frenyó, L. V., Hammarström, L. and Kacs Kovics, I. 2004. The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **98**: 85-89.
40. Mostov, K. E., Friedlander, M. and Blobel, G. 1984. The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature* **308**: 37-43.
41. Nomura, S., Miyasho, T., Maeda, N., Doh-ura, K. and Yokota, H. 2009. Autoantibody to glial fibrillary acidic protein in the sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy. *Proteomics* **9**: 4029-4035.
42. Ogawa, Y. 2003. Immunocytochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. *Prog. Histochem. Cytochem.* **38**: 343-426.
43. Perez, J. H., Wight, D. G., Wyatt, J. I., Van Schaik, M., Mullock, B. M. and Luzio, J. P. 1989. The polymeric immunoglobulin A receptor is present on hepatocytes in human liver. *Immunology* **68**: 474-478.
44. Quinlan, R. A., Schiller, D. L., Hatzfeld, M., Achtstätter, T., Moll, R., Jorcano, J. L., Magin, T. M. and Franke, W. W. 1985. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **455**: 282-306.
45. Rice, J. C., Spence, J. S., Megyesi, J., Goldblum, R. M. and Safirstein, R. L. 1999.

Expression of the polymeric immunoglobulin receptor and excretion of secretory IgA in the postischemic kidney. *Am. J. Physiol.* **276**: 666-673.

46. Rincheval-Arnold, A., Belair, L., Cencic, A. and Djiane, J. 2002a. Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor mRNA in mammary epithelial cells by IFN-gamma. *Mol. Cell. Endocrinol.* **194**: 95-105.
47. Rincheval-Arnold, A., Belair, L. and Djiane, J. 2002b. Developmental expression of pIgR gene in sheep mammary gland and hormonal regulation. *J. Dairy. Res.* **69**: 13-26.
48. Salmon, H. 1999. The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Vet. Immuno. Immunopathol.* **72**: 143-155.
49. Sayed-Ahmed, A., Kassab, M., Abd-Elmaksoud, A., Elnasharty, M. and El-Kirdasy, A. 2010. Expression and immunohistochemical localization of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the mammary glands of the Egyptian water buffalo. *Acta. Histochem.* **112**: 383-391.
50. Schaerer, E., Verrey, F., Racine, L., Tallichet, C., Reinhardt, M. and Kraehenbuhl, J. P. 1990. Polarized transport of the polymeric immunoglobulin receptor in transfected rabbit mammary epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **110**: 987-998.
51. Schlegel, T., Brehm, H. and Amselgruber, W. M. 2003. IgA and secretory component (SC) in the third eyelid of domestic animals: a comparative study. *Vet. Ophthalmol.* **6**: 157-161.
52. Seemann, R., Hägewald, S. J., Sztankay, V., Drews, J., Bizhang, M. and Kage, A. 2004.

- Levels of parotid and submandibular/sublingual salivary immunoglobulin A in response to experimental gingivitis in humans. *Clin. Oral Investig.* **8**: 233-237.
53. Snoeck, V., Peters, I. R. and Cox, E. 2006. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet. Res.* **37**: 455-467.
54. Sozmen, M., Brown, P. J. and Eveson, J. W. 1998. Cytokeratin immunostaining in normal dog major and minor salivary glands. *Vet. Res.* **29**: 457-465.
55. Sun, T. T., Eichner, R., Cooper, D., Schermer, A., Nelson, W. G. and Weiss, R. A. 1984. Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: a unifying model. pp. 169-176. *In: Cancer cells 1 transformed phenotype.* (Levine, A., Topp, W., Vande-Woude, G. and Watson, J. D. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
56. Tizard, I. R. 2011. 第7版. イラストでみる獣医免疫学 (多田富雄, 古澤修一, 保田昌宏 監訳). Interzoo. 東京.
57. Tseng, S. C., Jarvinen, M. J., Nelson, W. G., Huang, J. W., Woodcock-Mitchell, J. and Sun, T. T. 1982. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell* **30**: 361-372.
58. Verbeet, M. P., Vermeer, H., Warmerdam, G. C., de Boer, H. A. and Lee, S. H., 1995. Cloning and characterization of the bovine polymeric immunoglobulin receptor-encoding cDNA. *Gene* **164**: 329-333.
59. Vigneswaran, N., Peters, K. P., Diepgen, T. L., Wahlich, C., Hornstein, O. P. and

- Haneke, E. 1991. Phenotyping of immunocompetent cells in normal labial and palatal salivary glands and in non-autoimmune sialadenitis. *J. Oral. Pathol. Med.* **20**: 337-344.
60. Watson, D. L. and Lascelles, A. K., 1971. IgA in the body fluids of sheep and cattle. *Res. Vet. Sci.* **12**: 503-507.
61. Woodcock-Mitchell, J., Eichner, R., Nelson, W. G. and Sun, T. T., 1982. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J. Cell. Biol.* **95**: 580-588.
62. 山本寅男, 渡辺洋之輔. 1987. 人体組織学 消化器, 唾液腺. pp. 11-64. 朝倉書店. 東京.
63. Zedda, M. and Farina, V. 1996. Basket and basal-duct cells in domestic animals: different cytokeratin expression and shape. *Anat. Histol. Embryol.* **25**: 257-262.