

# 学位論文要旨

## 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

獣医病理学教室

坂口佳菜子

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。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 (誘導組織) 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 (実効組織) にも帰巢 (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、泌尿生殖器などがヒトで知られている。

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。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。この分泌型 IgA 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。

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。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 の維持や適度な水分を補い、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。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があるが、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第Ⅱ章～第Ⅴ章の検索を実施した。

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。本検索において，舌下腺ならびに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た。また，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。

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pIgRの発現を検索した。RT-PCR法では舌下腺ならびに下顎腺からpIgRのmRNAが検出された。次に，抗ヒトpIgR抗体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蛋白の検出を行った結果，ウシのpIgR蛋白に相当する大きさ約80kDaのバンドが舌下腺ならびに下顎腺の膜画分より検出された。最終的に抗ヒトpIgR抗体陽性バンドをNano-LC-Q-TOF-MS法によってアミノ酸配列を解析した結果，ウシのpIgR前駆蛋白と同定された。ウェスタンブロッティング法において，舌下腺は下顎腺よりもpIgR蛋白をより強く発現していたことから，舌下腺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。舌下腺と下顎腺では，漿液性腺細胞ならびに導管上皮細胞において抗ヒトpIgR抗体陽性像が観察された。しかし，舌下腺と下顎腺では漿液性腺細胞におけるpIgRの局在が異なっており，舌下腺では管腔側，下顎腺では基底側に陽性像が観察された。また，抗ウシIgA抗体，抗ウシIgM抗体および抗ウシIgG抗体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結果，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 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。涙腺ならびに消化管粘膜では多数の腺ならびに粘膜上皮に pIgR 抗体陽性像が観察され、間質には多数の IgA 抗体陽性形質細胞の浸潤も認められた。肺や乳腺では、年齢や生産周期によって pIgR 抗体陽性像ならびに IgA 抗体陽性形質細胞数に差が見られた。胆嚢では pIgR 陽性像を認めるが、IgA 陽性形質細胞は極めて少なかった。また、肝臓、腎臓、膵臓組織では pIgR 陽性像は認められず、IgA 陽性形質細胞の浸潤も極めて少なかった。従って、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。

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腺によって pIgR の発現ならびに IgA 分泌能が異なることが判明した。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。