

原 著

輸入リンパ管によるリンパ節内リンパ小節の限局性

関根 陽平, 大塚 裕忠, 柳澤 伸彰, 坂上 淳一
野中 直子, 中村 雅典

要旨：リンパ節は支配領域からリンパ液が流入し、その過程で異物が侵入した場合には、抗原認識と抗体産生という一連の生体防御機構を営むことが良く知られているが、支配領域は個々のリンパ節に比較して広範囲にわたる。したがって、支配領域から流入するリンパがリンパ節全体に流入するのか、あるいはその流入部位に局在性があり、各リンパ小節が領域ごとに抗体産生を行うのかについては明らかではない。本研究では、ラットを用い、口腔内領域の基本的な所属リンパ節である顎下リンパ節におけるリンパ液の回収経路を解析し、リンパ小節が領域ごとに区画化されているか否かについて検討を行う目的で、下顎臼歯歯肉および舌体部からのリンパの顎下リンパ節への流入についてトレーサーを用いて解析を行った。2種類の墨（黒、赤）それぞれを歯肉と舌体部へ各 0.02 ml 投与ではリンパ節の異なる部位にそれぞれが局在する所見が得られた。2種類の異なる蛍光色素結合免疫グロブリンの舌と歯肉への同時投与では、それぞれの蛍光色素が異なるリンパ小節内に進入している所見が観察された。以上の結果から、リンパ節内に存在するリンパ小節には異なる支配領域からのリンパが流入し、部位特異的な免疫応答に関与している可能性が示唆された。

リンパ節は主として細網組織とリンパ球から構成される実質性器官で、その基本構造は、表面を覆う密性結合組織の被膜、被膜の結合組織が実質内に侵入して形成する梁柱、被膜と梁柱の骨格に囲まれてリンパ液の流路を形成するリンパ洞、そして表層部分の皮質と深層部分の髄質からなる。皮質の表層にはBリンパ球の集団からなる多くのリンパ小節があり、その直下の深層は旁皮質であり、Tリンパ球が存在する^{1,2)}。

リンパ洞は一層の内皮細胞からなる管で、輸出リンパ管と輸入リンパ管を連絡している。リンパ液はリンパ節表面の数か所からそれぞれ単独に侵入する輸入リンパ管から被膜直下のリンパ洞である辺縁洞に流入し、中間洞、髄洞を通過してリンパ節門に位置する輸出リンパ管から排出される³⁾。細胞外を流れるリンパ液は輸入リンパ管を通して、抗原物質をリンパ節に運搬する^{4,5)}。抗原を取り込んだ樹状細胞やマクロファージは、旁皮質領域に位置するTリンパ球およびリンパ小節に存在するBリンパ球に抗原提示し、最終的にBリンパ球が形質細胞に分化して抗原特異的な抗体である免疫グロブリンを産生する^{6,7)}。リンパ節皮質には多数のリンパ小節が存在し、抗原提示細胞によって提示された抗原に対する抗体産生が活発に行われ、重要な生体防御機構として働いている^{6,7)}。

一方、リンパ液がリンパ節に輸入リンパ管から流入し

てくる領域は1個のリンパ節に比べて広範囲である。したがって、流入するリンパ液がリンパ節全体に流れ込み皮質内に存在するリンパ小節の多くに抗原が提示されるのか、或いは、開口する輸入リンパ管の位置によって、辺縁洞と中間洞によって区域化されている各皮質領域に存在するリンパ小節に局所的に優先的にリンパ液が流入し、その結果、各リンパ小節で異なる抗原に対する抗体産生反応が行われるのかについては未だ明らかとなっていない。

そこで、本研究では口腔組織の主要な所属リンパ節である顎下リンパ節に焦点を当て、支配領域であるとされる舌体部並びに下顎臼歯部歯肉部から流入するリンパ液の顎下リンパ節内における流入部位を解析し、リンパ小節の流入部位による限局性について検討を行った。

材料と方法

本研究は昭和大学動物実験委員会の承認を得たうえで行った。

1. 動物

6週齢雌性Wister系ラットを使用した。各実験ごとに3匹ずつを使用した。

2. トレーサー

墨および朱墨（呉竹）とAlexaFluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体およびAlexaFluor 594 標識ヤギ抗マウス

IgG 抗体 (INVITROGEN, Carlsbad, CA) を用いた。

墨および朱墨は硯に滅菌生理的食塩水 1 ml を滴下して 50 回刷り原液とした。実験使用時には、PBS で 50 倍に希釈した。蛍光標識抗体は希釈せずに使用した。

3. トレーサーの投与

1 種類のトレーサー投与では、エーテル麻酔下で、ラット右側舌体部粘膜固有層あるいは右側下顎第一臼歯部頬側歯肉粘膜固有層に墨をマイクロシリンジを用いて 0.1 ml あるいは 0.02 ml 投与した。投与後、1 時間、48 時間で右側顎下リンパ節を採取した。2 種類のトレーサー投与では、ラット右側舌体部粘膜固有層に朱墨あるいは Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を、右側下顎第一臼歯部頬側歯肉粘膜固有層に墨あるいは AlexaFluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を 0.02 ml ずつ投与した。投与後 1 時間で顎下リンパ節を採取した。

4. 顎下リンパ節の観察

顎下リンパ節は採取後直ちに 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。固定後、墨、朱墨投与群はエタノール脱水、キシレン透徹後、パラフィン包埋した。切片作製、ヘマトキシリン-エオジン染色後、光学顕微鏡 (ZEISS Axioskop2 plus) にて観察を行った。

蛍光標識抗体投与群は、TISSUE TEK (Sakura Finetek, Japan) とドライアイス-アセトンを用いて凍結包埋し、凍結切片作製した。風乾後、PBS でスライドガラスを洗浄、Tissue Mount (Polysciences, Warrington, PA) で封入し、落射型蛍光顕微鏡 (NIKON H600L) にて観察を行った。

結 果

1. 顎下リンパ節へのトレーサーの到達

右側舌体部粘膜固有層および右側下顎第一臼歯部歯肉粘膜固有層から注入された墨は投与後 1 時間で顎下リンパ節内に到達していた (Fig. 1)。舌体部粘膜固有層に 0.1 ml 投与した群では、墨が舌体部右側だけでなく、左側にまで拡散していた (Fig. 1A)。また、右側だけでなく左側顎下リンパ節にも墨が到達している所見が観察された (Fig. 1B)。右側臼歯部歯肉内に 0.1 ml 投与した群においても、左右両側の顎下リンパ節への墨の流入が認められた (Fig. 1C)。パラフィン切片による組織所見においても肉眼所見同様、舌体部粘膜固有層に 0.1 ml 投与した顎下リンパ節では投与後 1 時間でリンパ節内全体に墨が侵入していた (Fig. 1D)。

0.02 ml 投与群では、右側舌体部粘膜固有層並びに臼歯部歯肉内投与で共に同側の顎下リンパ節への部分的な墨の集積が認められ (Fig. 2A)、反対側リンパ節への到達は認められなかった (Fig. 2B)。組織所見においてもリンパ節に局所的に侵入している所見が認められた

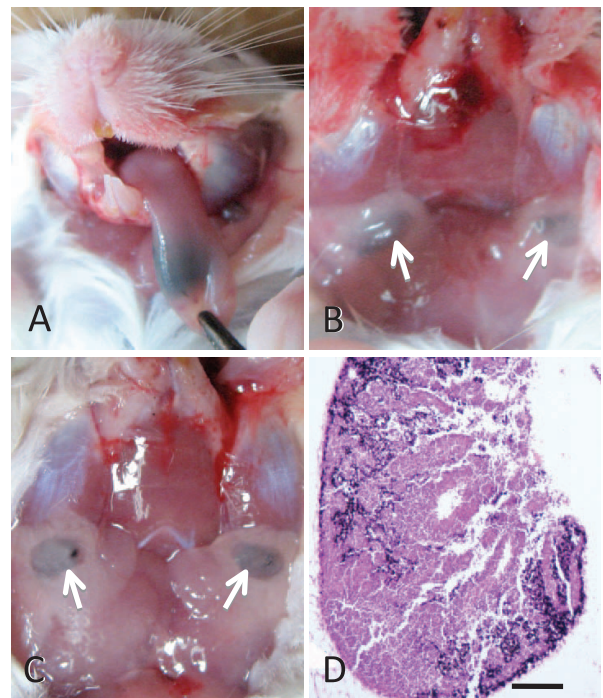


Fig. 1 Injection of 0.1 ml of black ink at 1 h. A) Diffuse distribution of ink in the whole lamina propria of the tongue. B) Localization of ink at the both side of submandibular lymph nodes by the injection from tongue. Arrows indicated submandibular lymph nodes. C) Localization of ink at the both side of submandibular lymph nodes by the injection from gingiva. Arrows indicated submandibular lymph nodes. D) Histological detection of the diffuse distribution of black ink. Bar = 100 μ m.

(Fig. 2C, D).

投与後 48 時間では 0.1 ml あるいは 0.02 ml 投与群ともにリンパ節内での墨の集積は僅かであった。したがって、2 種類のトレーサーを同時投与する際の投与量を 0.02 ml、観察を投与後 1 時間と決定し、以下の実験を行った。

2. 舌体部粘膜固有層と臼歯部歯肉粘膜層への同時投与によるトレーサーの局在

墨を右側舌体部固有粘膜層、並びに、朱墨を右側下顎第一臼歯部歯肉固有粘膜層への同時投与では、2 種類の墨が顎下リンパ節の異なる部位に集積している像が認められた (Fig. 3A)。強拡大像で、これらの墨は共に被膜直下に位置する辺縁洞並びに中間洞に流入していた (Fig. 3B, C)。

AlexaFluor 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (右側舌体部固有粘膜層)、AlexaFluor488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (右側臼歯部直下歯肉) の同時投与では、墨投与と同様に、2 種類の蛍光標識トレーサーがそれぞれ異なる部位から顎下リンパ節内に到達している像が観察され

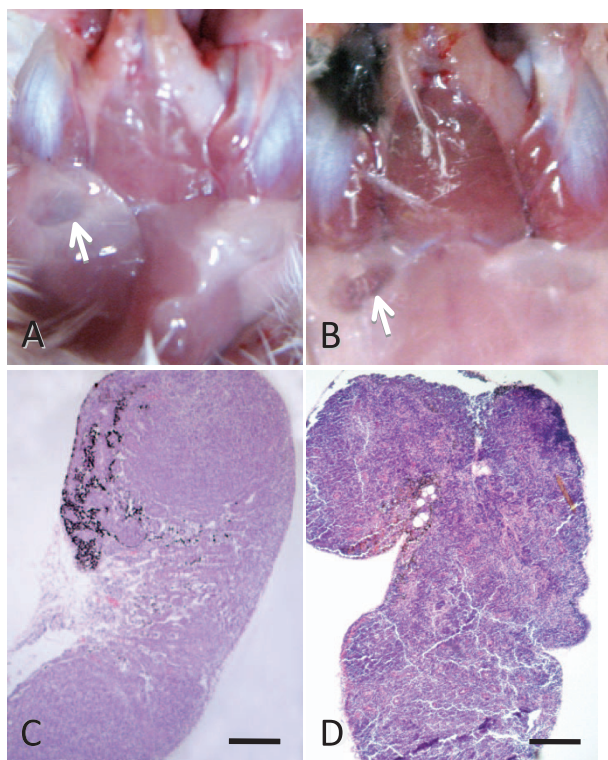


Fig. 2 Injection of 0.02 ml of black ink at 1 h. A) Localization of ink at the right side of submandibular lymph node (arrow) by the injection from tongue. B) Localization of ink at the right side of submandibular lymph node (arrow) by the injection from gingival. C, D) Histological detection of the regional localization of ink injected from tongue (C) and gingiva (D). Bar = 100 μ m.

た (Fig. 4). 更に、それぞれの蛍光標識トレーサーが異なるリンパ小節内にまで到達している像が確認された (Fig. 4).

考 察

血管腔から外へ滲出した滲出液であるリンパ液は、その 80~90% は後毛細血管静脈から血管に回収され、残りの 10~20% はリンパ管に回収される⁸⁾。すなわち、リンパ管は末梢からの回収系の脈管であり、その盲端は末梢組織中に開口した状態で存在する¹⁾。したがって、本研究で使用した異物のように、体内に侵入する種々の抗原はリンパ管からリンパ節へ到達し、リンパ節では活発な抗体産生という生体防御反応が起こる^{6, 7)}。墨の粒子径は非常に小さく (通常 50 nm)、盲端から容易にリンパ管へ流入することから、古くからリンパ管研究に用いられてきた^{8~11)}。

舌体部および歯肉からのリンパ液は同側の顎下リンパ節に流入していることが確認された。舌体部への 0.1 ml 投与群では舌体部反対側にまで墨が拡散し左側リンパ節

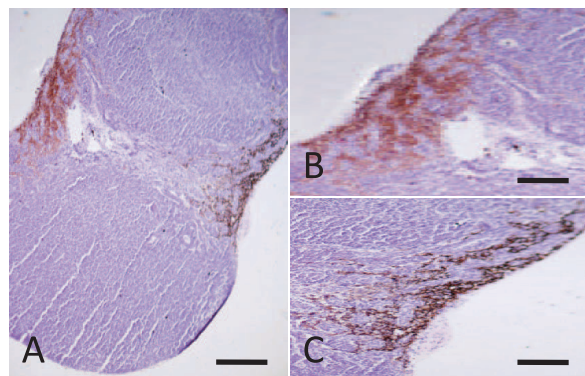


Fig. 3 A double injection of black and red inks from tongue and gingival, respectively. A) The different localization of two inks in the submandibular lymph node. Bar = 100 μ m. B, C) Higher magnification of the infiltration of red (B) and black (C) inks in the lymph node. Bar = 50 μ m.

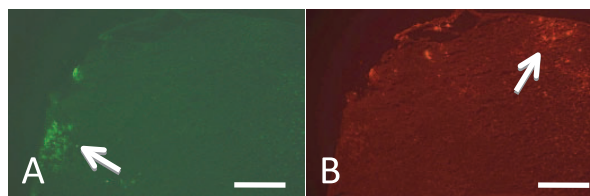


Fig. 4 Fluorescent micrographs of submandibular lymph node at 1 h after a double injection of AlexaFluor488- and AlexaFluor594-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies from gingival (A) and tongue (B), respectively. Note the distribution of two different fluorescent substrates at the different lymphoid follicles. Bar = 50 μ m.

内への到達が認められたことは、ラット舌体部粘膜固有層内にリンパ液量を超えた過剰なトレーサー量を注入したことによる結果であることが示された。したがって、その後の実験は投与量を 0.02 ml として行った。前述したように、墨の粒子径は小さく光学顕微鏡下でその分布状態を詳細に比較的広範囲で把握することは極めて困難であることから、2種類の蛍光標識トレーサーを投与し、リンパ節内での分布状態を落射型蛍光顕微鏡で検索した。その結果、2つの蛍光標識トレーサーがリンパ節内のそれぞれ異なるリンパ小節内に到達していることが明らかとなった。この結果は、異なる輸入リンパ管から運ばれた異なる抗原はそれぞれ異なるリンパ小節に運ばれ、そこで免疫応答が起こる^{12~14)}ことを示唆する。本研究では投与後1時間に試料を採取し、観察を行った。本研究で使用した蛍光トレーサーはヤギ免疫グロブリンであり、ラットに対しては抗原となる。リンパ液は投与後もっと早い時期にリンパ節に到達すると考えられるため^{15, 16)}、投与されたこの抗原がいつの段階で樹状細胞や

マクロファージに貪食され、リンパ小節内で抗原提示されるか^{17, 18)}について経時的に詳細な検討が今後必要であると考ええる。

リンパ節内に存在するリンパ小節数は一定ではなく、抗原感作された際にはその数を増やすことが知られている^{19~22)}。すなわち、抗原感作されたリンパ小節は分裂し、より大量の抗体を産生する。口腔内には数多くの細菌が常在し、常に複数の細菌による感染が起きていると考えられる。そのため、顎下リンパ節の各リンパ小節ではそれぞれの抗原特異的な免疫応答が活発に行われていることが推察される。

本研究では異なる輸入リンパ管から侵入した抗原は異なるリンパ小節に到達する可能性が示されたが、1つのリンパ小節が2つ以上の抗原にどのような反応を示すかについてはこれまで報告がない。本研究は1本の輸入リンパ管から異なる複数の抗原が侵入した際、個々のリンパ小節がどのような免疫応答を開始するかについて解析する際にも有力な方法論を提示するものであると考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、様々な観点からご助言、ご教授頂きました福原矯正歯科クリニック院長/昭和大学歯学部名誉教授 福原達郎先生に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に際し、懇切なるご指導、ご教示を頂きました歯科医学教育推進室馬谷原光織博士、並びに、口腔解剖学教室の諸先生に厚く御礼を申し上げます。本研究は文部科学省科学研究補助金基盤(C)(21592342, 20592148)、ハイテク・リサーチ・センター整備事業並びに戦略的研究基盤整備事業の助成により行った。

文 献

- 1) 大谷 修, 加藤征治, 内野滋雄: リンパ管 形態・機能・発生. 新潟, 1997, 西村書店, pp 35-52
- 2) Fujita T, Ushiki T: Scanning electron microscopic observations of the immunodefensive systems with special reference to the surface morphology of the nonlymphoid cells. *Arch Histol Cytol*, **55**: 105-113, 1992
- 3) Ushiki T, Ohtani O, Abe K: Scanning electron microscopic studies of reticular framework in the rat mesenteric lymph node. *Anat Rec*, **241**: 113-122, 1995
- 4) Sainte-Marie G, Peng FS: Diffusion of a lymph-carried antigen in the fiber network of the lymph node of the rat. *Cell Tissue Res*, **245**: 481-486, 1986
- 5) Matsuno K, Miyakawa K, Ezaki T, Kotani M: The liver lymphatics as migratory pathway of macrophages from the sinusoids to the celiac lymph nodes in the rat. *Arch Histol Cytol*, **53**: 179-187, 1990
- 6) Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I: Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Human Immunol*, **60**: 562-567, 1999
- 7) Villadangos JA, Heath WR: Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: Limitations of the Langerhans cells paradigm. *Sem Immunol*, **17**: 262-272, 2005
- 8) Terence J, Ryan TJ: Microcirculation in psoriasis: Blood vessels, lymphatics and tissue fluid. *Pharmacol Therapeutic*, **10**: 27-64, 1980
- 9) Mikata A, Rikio Niki R: Permeability of postcapillary venules of the lymph node. An electron microscopic study. *Exp Mol Pathol*, **14**: 289-305, 1971
- 10) Fukai H, Murakami M, Yoshikawa H, Takada K, Muranishi R: Studies on the promoting effect of lipid-surfactant mixed micelles (MM) on intestinal absorption of colloidal particles. Dependence on particle size and administration site. *J Pharmacobiodyn*, **10**: 236-242, 1987
- 11) Ohtani O, Ohtani Y, Carati CJ, Gannon BJ: Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatic labyrinths and Aquaporin-1 expression. *Arch Histol Cytol*, **66**: 261-272, 2003
- 12) Yoshida T, Takaya K: Follicular dendritic reticular cells in the germinal center of the rat lymph node as studied by immunoelectron microscopy. *Arch Histol Cytol*, **52**: 327-335, 1989
- 13) Dobashi M, Terashima K, Imai Y: Electron microscopic study of differentiation of antibody-producing cells in mouse lymph nodes after immunization with horseradish peroxidase. *J Histochem Cytochem*, **30**: 67-74, 1982
- 14) Cueni LN, Detmar M: New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol*, **126**: 2167-2177, 2006
- 15) Sainte-Marie G, Peng FS, Belisle C: Overall architecture and pattern of lymph flow in the rat lymph node. *Am J Anat*, **164**: 275-309, 1982
- 16) Ohtani O, Ohtani Y, Carati CJ, Gannon BJ: Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatic labyrinths and Aquaporin-1 expression. *Arch Histol Cytol*, **66**: 261-272, 2003
- 17) Ermain R, Jenkins MK: *In vivo* antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, **16**: 120-125, 2004
- 18) Richman LK, Graeff AS, Strober W: Antigen presentation by macrophage-enriched cells from the mouse Peyer's patch. *Cell Immunol*, **62**: 110-118, 1981
- 19) Hoshi H, Kamiya K, Takemoto R, Aijima H: Formation of lymph follicles and germinal centers in draining lymph nodes after local injection of phytohemagglutinin and lipopolysaccharide in mice. *Arch Histol Jpn*, **47**: 505-518, 1984
- 20) Hoshi H, Horie K, Tanaka K, Nagata H, Aizawa S, Hiramoto M, Ryouke T, Aijima H: Patterns of age-dependent changes in the numbers of lymph follicles and germinal centers in somatic and mesenteric

- lymph nodes in growing C57/Bl/6 mice. *J Anat*, **198**: 189–205, 2001
- 21) Hoshi H, Ajima H, Horie K, Nagata H, Kaneko T, Ikeda T: Lymph follicles and germinal centers in popliteal lymph nodes and other lymphoid tissues of germ-free and conventional rats. *Tohoku J Exp Med*, **166**: 297–307, 1992
- 22) Ahn HK, Hoshi H, Horie K, Nagata H: Sites of lymph follicle formation in the draining popliteal lymph nodes of mice locally injected with antigenic and mitogenic substances. *Histol Histopathol*, **5**: 493–504, 1990

Regional Restriction of Lymphoid Follicles in the Lymph Node by the Draining Lymphatic Vessels

Yohhei Sekine, Hirotada Ohtsuka, Nobuaki Yanagisawa, Junichi Sakagami,
Naoko Nonaka and Masanori Nakamura

*Department of Oral Anatomy and Developmental Biology, Showa University School of Dentistry
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142-8555 Japan*

(Received February 2, 2010 ; Accepted for publication April 14, 2010)

Abstract : Lymph nodes are small organs occurring in series along the course of lymphatic vessels. The parenchyma consists of a highly organized accumulation of lymphoid tissue, which recognizes antigens in the lymph and builds up a specific immune reaction against them especially in lymphoid follicles. Afferent lymphatic vessels come from the relatively huge area in the body and enter the node at multiple sites over its convex surface. Therefore, in this study, we investigated whether the parenchyma of the node is restricted by the afferent vessels. Two different colored tracers, inks (black and red) or fluorescent dyes (AlexaFluor® 488/594), were subcutaneously injected in the tongue and gingiva of mice. At the indicated time, submandibular lymph nodes were dissected and examined under light and/or fluorescent microscopy. Injection of 0.1 ml of a tracer at 1 h showed that the tracers entered into the whole area of the node whereas a 0.02 ml injection showed that traces localized some restricted area in the node. The lymph node at 1 h after the injection of two tracers showed that both traces penetrated into different parts of the node. Furthermore, at 48 h two different tracers were detected at the different follicles. These results indicated the regional restriction of lymphoid follicles in the node which might be regulated by the different site of afferent vessels to the node and suggest that each of the lymphoid follicles in a node respond to different antigens.

Key words : lymphoid follicles, lymph node, lymphatic vessels, submandibular lymph node.