

## ラット大腸リンパ濾胞の形態, 並びに大腸 M 細胞 (microfold cell) における horseradish peroxidase (HRP) の取り込みに関する研究

武田 昌治

ラットを用いて, 大腸リンパ濾胞, 特に M 細胞の形態学的観察を行い, さらにその機能面を検討する目的で, 経肛門的に HRP を投与し, 大腸 M 細胞からの取り込みを電子顕微鏡的に観察した. 形態学的には, 濾胞被覆上皮の管腔面への露出面が非常に小さい点を除けば, M 細胞を含め大腸リンパ濾胞は小腸のそれと構造に差異を認めなかった. 一方, HRP の取り込みについては, M 細胞のみに取り込みから内包するリンパ球へ提示する一連の像が確認できたが, 小腸に比べて長時間を要し, 観察される HRP も非常に少なかった. 以上より, 大腸 M 細胞は形態学的には小腸 M 細胞と差異はなく, 抗原捕捉細胞として機能していると考えられたが, HRP の取り込みから提示に至るまでの過程には長時間を要し, その量も非常に少なく, M 細胞自体に多種・多量に存在する抗原物質に対する防御機構が存在するものと思われた.

(平成 7 年 10 月 24 日採用)

### Studies of Rat Colonic Lymphoid Follicle Structure and Uptake of Horseradish Peroxidase by Colon M Cells

Masaharu TAKEDA

Lymphoid patch in rat large intestine was observed histologically and ultrastructurally. Horseradish peroxidase (HRP) was administered colonically and the sequence of its uptake into the follicle associated epithelium (FAE) was monitored. The area of FAE facing the intestinal lumen was very small compared with FAE in the small intestine, but M cells in colon FAE were not structurally different from those in Peyer's patches. Although colonic M cells took HRP up and transported it to enfolded lymphocytes as do M cells in Peyer's patches, it took longer for M cells to transport HRP following uptake, and the amount of HRP taken up was very limited. These findings show that M cells have some mechanism for modulation of uptake from the large intestine lumen, where there is an excess of macromolecules and pathogens. (Accepted on October 24, 1995) *Kawasaki Igakkaishi* 21(3) : 205-213, 1995

**Key Words** ① M cell ② HRP ③ Colon ④ Electron microscopy

## 結 言

消化管は、経口摂取され体に不可欠な栄養成分の消化吸収という重要な役割とともに、細菌やウイルスなどの微生物、薬剤や食品添加物などの有害な異物と絶えず接触しており、これらに対する生体防御機構をも同時に有している<sup>1)</sup>。その防御機構には gut associated lymphoid tissue (GALT) と呼ばれる腸の局所粘膜免疫機構があり、Peyer 板はこの中で中心的な役割を果たしている<sup>2)</sup>。Peyer 板では、リンパ濾胞を覆う一層の濾胞被蓋上皮 (follicle-associated epithelium: FAE) の中に M 細胞 (microfold cell) と呼ばれる特殊な形態を有する細胞が存在する<sup>3)</sup>。M 細胞は吸収上皮細胞と比較して粗で不規則なひだ状を呈する微絨毛を有し、腸管内の抗原物質を選択的に取り込み、その情報を内包するリンパ球やマクロファージに伝達するという機能を有している。さらに最近の研究では、M 細胞内にある程度の消化分解能があること<sup>4)</sup>、また major histocompatibility complex (MHC) type II 抗原を産生していることなどから<sup>5)</sup>、抗原提示細胞としての役割を有すると認識されている。小腸 Peyer 板の M 細胞については、すでに形態面、機能面において多くの報告があり、機能面では様々な物質を捕捉し、内包するリンパ球やマクロファージに提示する抗原捕捉細胞としての役割が明らかになっている<sup>6)</sup>。しかしながら大腸 M 細胞に関しては、形態についての報告は散見されるものの<sup>7)</sup>、その機能についての報告はない。小腸に比べ多種・多量の微生物や macromolecule の存在する特殊な大腸環境下において、またワクチンやいくつかの薬剤の一経路として、大腸 M 細胞が小腸 Peyer 板 M 細胞と同様の機能を有するか否かを検討することは重要であると考えられる。

本研究では、ラットを用いて遠位大腸リンパ濾胞の形態学的観察をまず行い、次に macromolecule として horseradish peroxidase (HRP) を経肛門的に投与し、大腸 M 細胞にお

ける取り込み・輸送過程を電子顕微鏡的に観察し、その機能面を検討した。

## 実験材料及び方法

### 1) 実験動物

生後6週齢の雄性 Wister 系ラット (平均 250 g) を30匹使用した。前処置として48時間前より絶食、飲水のみとした。

### 2) 形態学的観察

エーテルによる麻酔下で摘出した標本を冷生理食塩水による洗浄後、直ちに 10%ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。走査電子顕微鏡試料は、標本を摘出、洗浄後、リン酸緩衝液加 2.5% グルタルアルデヒドにて 4°C で一晚固定し、1% オスミウム酸リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4°C で2時間後固定後、2% タンニン酸で12時間固定、さらに 1% オスミウム酸リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて1時間固定後、アルコール系列にて脱水し、凍結乾燥後、白金パラジウムを蒸着し、日立 S-570 走査電子顕微鏡にて観察した。透過電子顕微鏡試料は、標本を摘出、洗浄後、リン酸緩衝液加 2.5% グルタルアルデヒドにて 4°C で一晚固定し、1% オスミウム酸リン酸緩衝液 (pH 7.4) で2時間室温で後固定、アルコール系列にて脱水し、プロピレンオキサイドによる置換を行い、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作製、酢酸ウラニールとクエン酸鉛による二重染色を行い、日立 H-500 透過電子顕微鏡による観察を行った。

### 3) HRP 投与実験

前処置を行ったラットに、feeding tube を用いて、経肛門的に 0.5% HRP 含有生理食塩水を 2 ml 投与した。対照のラットには HRP の代わりに生理食塩水 2 ml を投与した。投与30、60、90、120、150、180と360分後にエーテル麻酔下で大腸を摘出した。実体顕微鏡下で colon patch を摘出し、2.4% グルタルアルデヒド-0.8% パラホルムアルデヒド含有 0.08 M リン

酸緩衝液 (pH 7.4) により 1 時間室温固定した。その後幅 2 mm に細切し、さらに新たな同一の固定液にて 3.5 時間の追加固定を行った。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 15 分間 2 回洗浄後、ペトリ皿上に組織を並べ、7% 寒天水溶液 (37°C) を流し包埋した。さらに、DTK 3000 マイクロスライサー (堂阪イーエム) を用いて約 60 ~ 70  $\mu\text{m}$  に薄切した。この薄切切片を 0.02% 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 含有 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 内で 15 分間攪拌し、さらに 0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  含有同液にて 30 分間反応させた後に、0.1 M リン酸緩衝液で 15 分間 2 回洗浄し、1% オスミウム酸リン酸緩衝液 (pH 7.4) で後固定した。アルコール系列で脱水し、プロピレンオキシドで置換後、エポキシ樹脂に包埋、超薄切片を作製し、クエン酸鉛で染色を行い、日立 H-500 透過電子顕微鏡にて観察した。

## 結 果

### 1) 形態学的観察

#### i) 光学顕微鏡的観察

小腸 Peyer 板は、管腔に対して絨毛間に明瞭なドーム状隆起を形成しており、一層の FAE で覆われているのが観察された (Fig. 1a)。これに対して、大腸リンパ濾胞は管腔より明瞭に認識されるような大きなドーム状隆起を認めず、その FAE は大腸上皮で形成される陰窩の間に小さく形成されていた (Fig. 1b)。しかしながら、ドームを構成するリンパ濾胞の構造は、濾胞域の中心に明るくみえる胚中心も観察され、小腸のものと差異を認めなかった。

#### ii) 電子顕微鏡的観察

走査電子顕微鏡による弱拡大の観察では、小腸リンパ濾胞は、光学顕微鏡像と同様に絨毛に囲まれるように広いドーム状隆起を形成してい

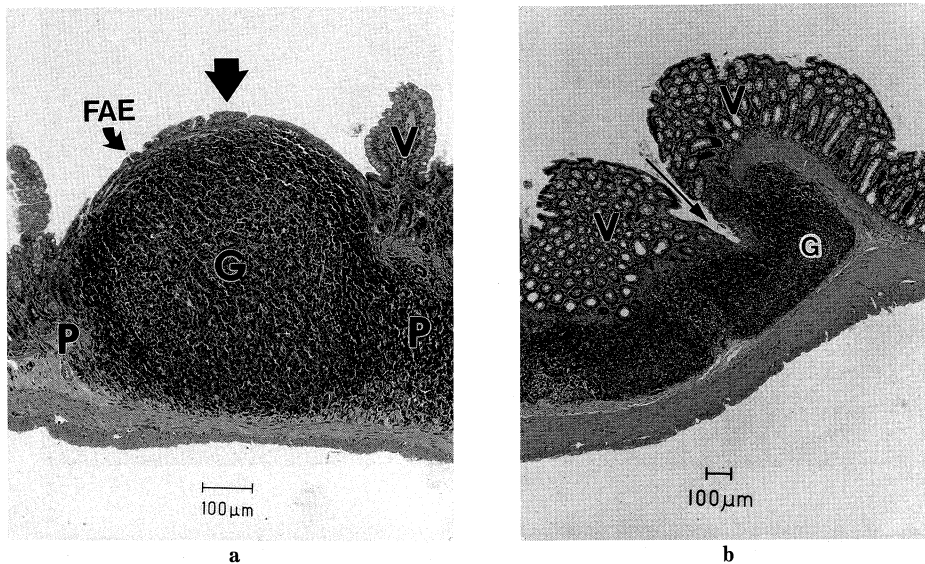


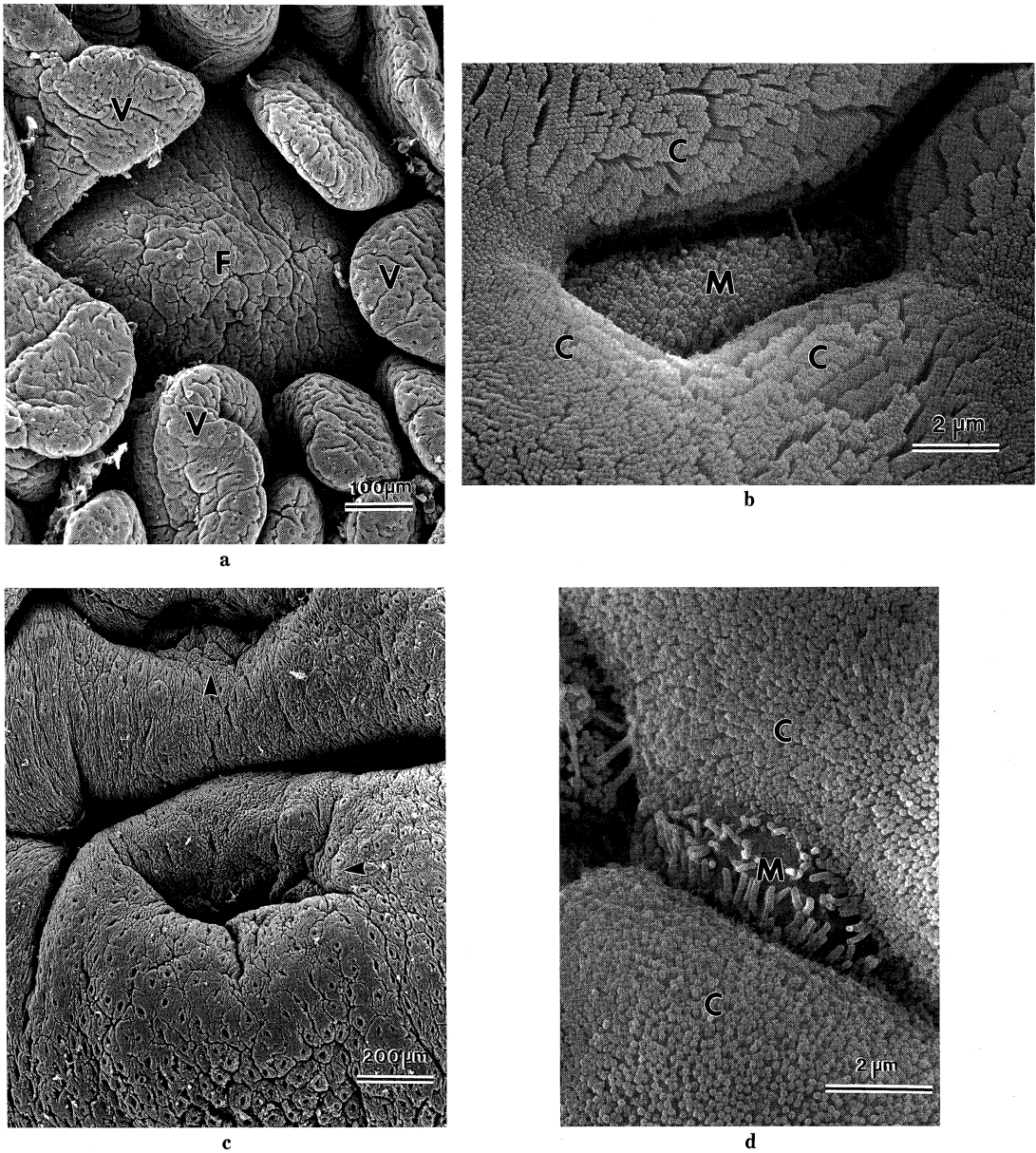
Fig. 1. a : Light micrograph of rat Peyer's patch.

Peyer's patch lymphoid follicle (arrow) is composed of a germinal center (G), parafollicular area (P), and follicle associated epithelium (FAE).

V : villi (HE.  $\times 100$ )

b : Light micrograph of rat colon patch.

Colon patch lymphoid follicle (arrow) is seen between crypts of villi, but its area facing the intestinal lumen is very limited. G : germinal center, V : villi (HE.  $\times 40$ )



**Fig. 2.** **a** : Scanning electron micrograph of rat Peyer's patch.  
The lymphoid follicle (F) is dome-shaped and surrounded by villi (V). ( $\times 130$ )

**b** : Scanning electron micrograph of Peyer's patch M cell.  
Typical M cell (M) with short and irregular microvilli is surrounded by columnar cells (C). ( $\times 8000$ )

**c** : Scanning electron micrograph of rat colon patch.  
Lymphoid follicles lie in elliptical shaped depressions (arrows) in the colonic mucosal surface. ( $\times 70$ )

**d** : Scanning electron micrograph of rat colon M cell.  
Rat colon M cell (M) with sparse, irregular, and short microvilli is surrounded by columnar cells (C). ( $\times 10000$ )

るのが認められた (Fig. 2a). 強拡大にて観察すると, ドーム表面を覆う上皮細胞層に, 通常吸収上皮細胞に比べ, やや陥凹し, 不規則で短い微絨毛を有する M 細胞を多数認めた (Fig. 2b). 一方, 大腸リンパ濾胞は, 楕円形を呈し, 腸管の長軸方向に走る中心溝を有する. この中心溝の内部に小さな FAE が存在することが確認された (Fig. 2c). 強拡大にてこの濾胞上皮を観察すると, 太く短い微絨毛を有する, 小腸の M 細胞に極めて類似した形態を示す大腸 M 細胞と思われる細胞を認めたが, その

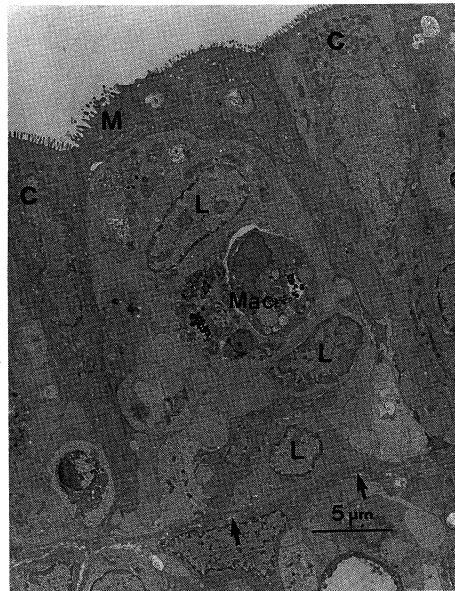


Fig. 3. Transmission electron micrograph of an M cell in rat colon patch. The M cell (M) has several enfolded lymphocytes (L) and a macrophage (Mac). Arrows show basement membrane to which the M cell is attached. C: columnar cell ( $\times 2500$ )

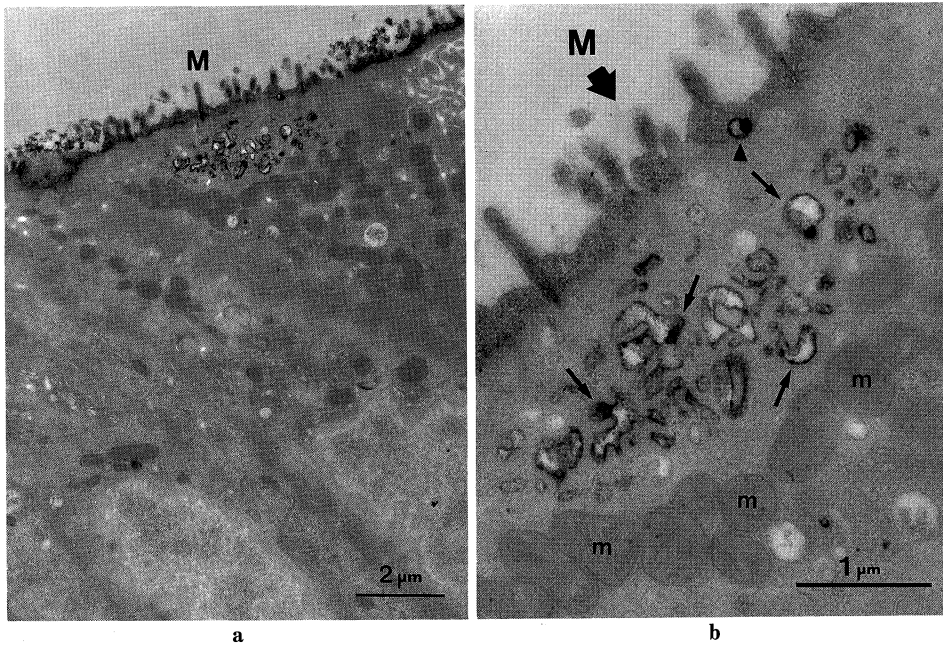


Fig. 4. Transmission electron micrographs 30 minutes after HRP exposure.  
 a: Only M cells (M) take up HRP which has produced electron dense deposits in apical vesicles of M cells. ( $\times 6000$ )  
 b: In M cells HRP is taken up and transported through apical cytoplasm in vesicles (arrows). Some HRP is taken up by pinocytosis from between their microfolds (arrowheads). m: mitochondria ( $\times 20000$ )

数は小腸に比べて少なかった (Fig. 2d). 透過電子顕微鏡にて大腸濾胞上皮を観察すると、周囲の円柱細胞の微絨毛と異なり、短く不規則な微絨毛を有し、細胞質頂部に多数の大小の小胞を認め、数個のリンパ球、マクロファージを内包する典型的なM細胞を認めた (Fig. 3). 小腸 Peyer 板に比べ、大腸リンパ濾胞は、腸管面への露出面が小さいという差はあるものの、M細胞を含め基本的構造に差異は認めなかった。

## 2) HRP 投与実験

HRP 投与30分後より、M細胞のみに HRP の取り込み像が

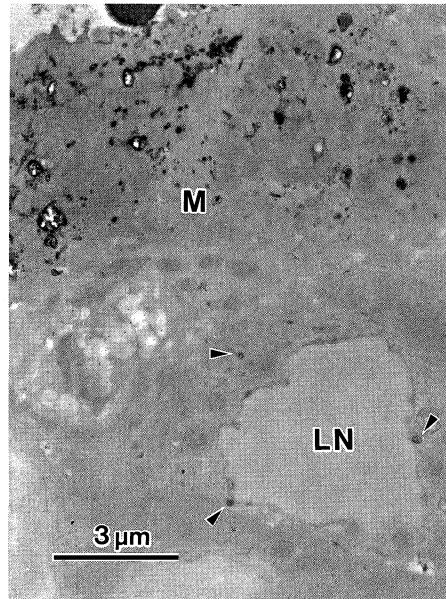


Fig. 5. Transmission electron micrograph 1 hr after HRP exposure. HRP reaction product is seen in vesicles within M cell cytoplasm and some HRP has transported deeply toward enfolded lymphocytes (arrowheads). ( $\times 5000$ )

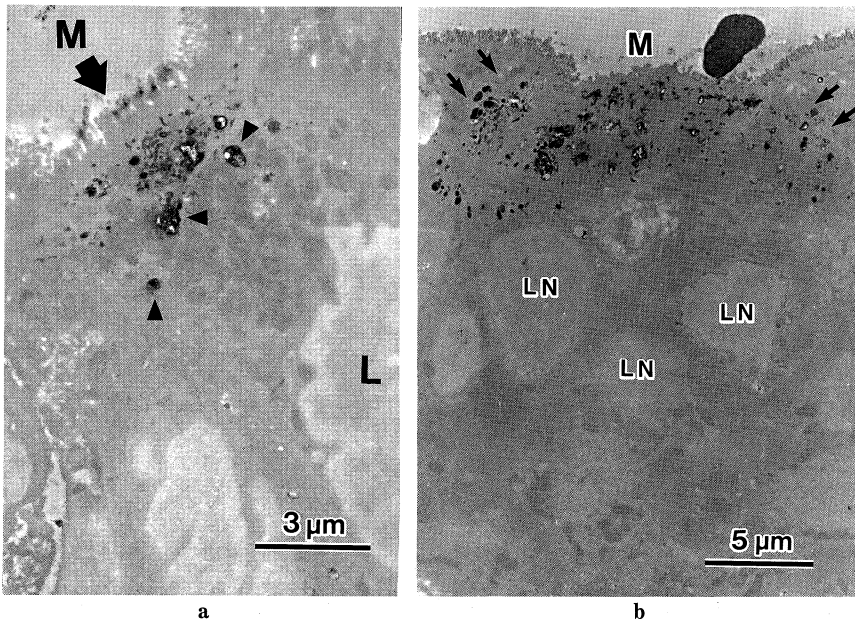


Fig. 6. Transmission electron micrographs of M cells 2 hr after HRP exposure.

- a : HRP reaction product is still seen in M cell (M) apical vesicles and some is transported toward enfolded lymphocytes. However M cells don't show much more transport, compared with 1 hr after HRP exposure. Arrows show the cell border between the M cell and adjacent columnar cells. LN : lymphocyte nucleus ( $\times 3000$ )
- b : Detail of figure 6-a, HRP taken up by M cells is transported through their cytoplasm in vesicles, and finally transported and presented to enfolded lymphocytes (arrowheads). ( $\times 6000$ )

観察された。すなわち、M細胞頂部の細胞質において、反応物を含む小胞が多数認められた(Fig. 4a, 4b)。投与60分後では、M細胞の細胞質小胞内にHRPの取り込み像と同時に、基底膜側への輸送も認められた(Fig. 5)。投与120分後では、さらに細胞深部でも反応物質を含む小胞が認められ(Fig. 6a)、内包されたリンパ球への取り込み像も認められた(Fig. 6b)。しかし、投与180分、360分後の観察では、これ以上のM細胞内のHRPの取り込み像、並びに内包されたリンパ球への輸送像は認めなかった。また、投与全過程において、濾胞上皮細胞の微絨毛に付着するHRPは、極微量であった。なお、生理食塩水投与群においては、この様な像は全く認めなかった。

## 考 察

小腸M細胞が腸管内の種々の抗原物質を選択的に取り込み、内包する免疫担当細胞に伝達することは、様々な実験モデルで明らかになっている<sup>9)</sup>。一方、大腸M細胞を含めて大腸リンパ濾胞は、Peyer板や虫垂と比較してその基本構造は類似しており<sup>9)</sup>、大腸M細胞も小腸M細胞と同様の機能を有していることが推測されている。本研究において、経肛門的に、すなわちラット遠位大腸に投与されたHRPが、M細胞からのみ選択的に取り込まれ、その細胞質内を小胞として輸送され、内包するリンパ球にまで提示される一連の像を観察、確認した。このことは大腸M細胞も小腸M細胞と同様に、少なくとも抗原捕捉細胞としての機能を有していることを示すものと思われる。

しかしながら、大腸におけるHRP投与の全過程において、濾胞上皮の微絨毛に付着するHRPは、小腸におけるHRP投与実験<sup>9)</sup>と比較して明らかに少量であった。これは、大腸が小腸に比べ多種・大量の細菌叢を持つことから、取り込み時点ですでに過剰な抗原に対するいくつかの防御機構が働いていることが推測される。その因子として、光学顕微鏡及び走査電子顕微鏡で

観察されるように、大腸リンパ濾胞上皮が陰窩の間に存在し、管腔面に実際に露出する面が非常に小さいことから、大腸濾胞上皮と腸管内抗原との直接的な過剰な物理的接触の低減がまず挙げられる。また、M細胞表面における細胞組織化学的研究では、小腸M細胞は周囲の吸収上皮細胞に比べ、アルカリフォスファターゼ活性は低く、エラスターゼ活性は高いことが<sup>10)</sup>、それに対して大腸ではM細胞よりも周囲吸収上皮細胞の方がアルカリフォスファターゼ活性が低いこと<sup>11)</sup>が報告されている。また、レクチンを用いた細胞膜表面の糖鎖の検討において、Peyer板M細胞と近位大腸M細胞では異なったパターンを示すことが報告されている<sup>12)</sup>。これらの報告は、大腸M細胞膜表面の特性によって抗原取り込みのコントロールが行われている可能性を示唆し、防御因子のひとつとして考えられる。また、小腸M細胞表面には糖衣が薄いにもかかわらず多量の分泌型IgAが局在することが報告されており<sup>13)</sup>、これはM細胞の抗原取り込みに対する標識としての役割の他に、過剰な抗原の取り込みに対する防御機構としての役割を果たしていることが推測されている<sup>14)</sup>。大腸M細胞表面においても、分泌型IgAが防御因子のひとつとして役割を果たしている可能性が推測され、今後レクチンを用いた糖鎖の検討に加えて、分泌型IgAも遠位大腸M細胞膜表面の検討に必要であると思われる。

一方、小腸におけるHRP投与実験では、5分後にはM細胞からの貪飲・貪食による選択的な取り込みが始まり、30分後にはM細胞内の小胞に著明なHRPの広がり認め、60分後には内包された細胞との間隙、及び内包されるリンパ球にHRPが提示される像が観察されている<sup>9)</sup>。それに対し、大腸M細胞においては、30分後にHRPの取り込みが始まり、120分後に極微量のリンパ球への取り込み像を認めたが、以後それ以上の取り込み・輸送像を認めなかった。この様に、大腸M細胞においては、細胞質内の輸送に明らかに長時間を要し、輸送されるHRPの量も少なかった。このことより、M細胞が抗原物

質の取り込み後から内包する免疫担当細胞に輸送・提示する過程で、免疫担当細胞への不必要な過剰の抗原物質の情報提示を細胞質内レベルで制御している可能性が推測された。しかし、どのような機序でこのような機構が働いているのかは全く不明であり、cytokine<sup>15)</sup> や cytoskeleton<sup>16)</sup> の関与もあると考えられ、今後の検討がさらに必要であると思われる。

今回の実験では、大腸 M 細胞は小腸と同様に抗原捕捉細胞として機能する一方、腸管内抗原の取り込みから提示までの過程での過度の摂取に対する防御機構の可能性も示唆され、実際の環境下では両者を巧みにコントロールすることによって、大腸に多量に存在する腸内細菌叢に対処しつつ、腸管内の様々な情報を適切に M 細胞を門戸として認識しているものと推測された。ヒト大腸リンパ濾胞上にも小腸 M 細胞と同様の形態を有する M 細胞が存在することが確認されており<sup>17)</sup>、何らかの原因により一旦このバランスが崩れ、破綻を来せば、大量の抗原物質、すなわち微生物、化学物質、食物抗原などが M 細胞から侵入し、それが感染性腸炎、或いは炎症性腸疾患の病変形成の一因となっていることも考えられる。また、最近大きな感染症のひとつであるエイズのウイルスが、直腸のリンパ濾胞の M 細胞から侵入することが動物モデルで確認されており<sup>18)</sup>、今後さらに大腸リンパ濾胞、特に腸管の局所粘膜免疫機構の最初の役割を果たす M 細胞の機能について検討する必要があるものと思われる。

## 総 括

ラットに HRP を経肛門的に投与し、大腸 M 細胞の HRP の経時的取り込みを電子顕微鏡的に検討し、以下の結果を得た。

1) 大腸リンパ濾胞は、小腸パイエル板に比べ、存在形態の違いを認めるものの、その濾胞被覆上皮には典型的な M 細胞が認められ、その基本的形態は小腸の M 細胞と明らかな差異を認めなかった。

2) 経肛門的に投与された HRP が、大腸リンパ濾胞上の M 細胞からのみ取り込まれ、その細胞質内を小胞として輸送され、内包するリンパ球へ取り込まれる一連の像が観察された。すなわち、大腸 M 細胞は、小腸 M 細胞と同様に局所粘膜免疫機構の最初の役割、すなわち抗原捕捉細胞として機能していることが推測された。

3) 大腸 M 細胞への HRP 取り込みでは、小腸モデルに比較し明らかに長時間を要し、その量もはるかに少なかった。このことは、大腸という多種・多量の腸管内抗原の物理的接触環境に対する、大腸上皮自体の持つ基本的な防御因子に加え、大腸 M 細胞自体も過度の抗原物質摂取に対する防御機構を有している可能性が推察された。

稿を終えるにあたり、ご指導ならびにご校閲賜りました川崎医科大学内科消化器部門 II 教室飯田三雄教授に慎んで感謝いたします。

本論文の要旨は1994年10月、第26回日本臨床電子顕微鏡学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) 賀来正俊：消化管における第一線生体防御機構とその発生・発達。生体防御 6：33—43, 1989
- 2) Nagura H, Sumi Y: Immunocytochemical study of the vascular endothelial cells in human Peyer's patches and solitary lymphoid follicle. *In* Recent Advances in Mucosal Immunity, ed by Strober W et al, 1987, pp 279—286
- 3) Owen RL, Jones AL: Epithelial cell specialization within human Peyer's patches—An ultrastructural



- study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 66 : 189—203, 1974
- 4) Allan CH, Mendrick DL, Trier JS : Rat intestinal M cells contain acidic endosomal-lysosomal compartments and express class II major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology* 104 : 698—708, 1993
  - 5) Nagura H, Ohtani H, Masuda T, Kimura M, Nakamura S : HLA-DR expression on M cells overlying Peyer's patches is a common feature of human small intestine. *Acta Pathol Jpn* 41 : 818—823, 1991
  - 6) Kato T, Owen RL : Structure and function of intertinal mucosal epithelium. *In Handbook of Mucosal Immunology*, ed by Ogra P, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, San Diego, Academic Press. 1994, pp 11—26
  - 7) Owen RL, Piazza AJ, Ermak TH : Ultrastructural and cytoarchitectural features of lymphoreticular organs in the colon and rectum of adult BALM/c mice. *Am J Anat* 190 : 10—18, 1991
  - 8) Hosobe M : Distribution of 'dome' type lymphoid follicles and morphology of Microfold cells (M cells) in the human Bauhin's valve, cecum and proximal Ascending colon. *Med Electron Microsc* 26 : 139—149, 1993
  - 9) Owen RL : Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine : An ultrastructural study. *Gastroenterology* 72 : 440—451, 1977
  - 10) Owen RL, Bhalla DK : Cytochemical analysis of alkaline and esterase activities and of lectine-binding and anionic sites in rat and mouses Peyer's patch M cells. *Am J Anat* 168 : 199—212, 1983
  - 11) Jepson MA, Clark MA, Simmons NL, Hirst BH : Epithelial M cells in the rabbit caecal lymphoid patche display distinctive surface characteristics. *Histochemistry* 100 : 441—447, 1993
  - 12) Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH : Differential surface characteristics of M cells from mouse intestinal Peyer's and caecal patches. *Histochem J* 26 : 271—280, 1994
  - 13) Kato T : A Study of secretory immunoglobulin A on membranous epithelial cells (M cell) and adjacent absorptive cells of rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol Jpn* 25 : 15—23, 1990
  - 14) Winner L III, Mack J, Weltzin R, Mekalanos JJ, Kraehenbuhl JP, Neutra MR : New model for analysis of mucosal immunity : Intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. *Infect Immun* 59 : 977—982, 1991
  - 15) Kato T, Owen RL : Absence of EGF receptors and of EGF uptake in Peyer's patch dome epithelium. *Adv Exp Med Biol* 355 : 295—301, 1994
  - 16) Gaidar YA : Vimentine-positive epithelial cells in the cupolas of the aggregated lymphoid noduli (peyer's patches) of the rabbit. *Arkh Anat Gistol Embriol* 97 : 84—88, 1989
  - 17) Fujimura Y, Hosobe M, Kihara T : Ultrastructural study of M cells from colonic lymphoid nodules obtained by colonoscopic biopsy. *Dig Dis Sci* 37 : 1089—1098, 1992
  - 18) Amerongen HM, Weltzin R, Farnet CM, Michetti P, Haseltine WA, Neutra MR : Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells : A mechanism for transmission of AIDS. *J Acq Immune Defic Syndr* 4 : 760—765, 1991