

Title	Studies on intrathyroidal lymphocyte subsets in autoimmune thyroid disease.
Author(s)	青笹, 美恵子
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36857">https://hdl.handle.net/11094/36857</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	あお	ざさ	み	え	こ
	青	笹	美	恵	子
学位の種類	医	学	博	士	
学位記番号	第	8947	号		
学位授与の日付	平成2年2月2日				
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当				
学位論文題目	Studies on intrathyroidal lymphocyte subsets in autoimmune thyroid disease. (自己免疫性甲状腺疾患における甲状腺内リンパ球サブセットに関する研究)				
論文審査委員	(主査)				
	教授	宮井	潔		
	(副査)				
	教授	垂井清一郎	教授	濱岡	利之

### 論文内容の要旨

#### (目的)

自己免疫性甲状腺疾患の病態解明には、甲状腺自己免疫の標的である甲状腺内に浸潤しているリンパ球サブセットの解析が不可欠である。すなわち、これらの浸潤リンパ球は、甲状腺特異的免疫応答の結果、活性化・増殖してきたリンパ球であり、甲状腺内で実際に effector cell として働き、結果として甲状腺上皮細胞を刺激したり（バセドウ病）、破壊したり（橋本病）していると考えられているからである。しかし、通常の一段階比重遠心法を用いた甲状腺リンパ球分離法では、リンパ球浸潤の少ないバセドウ病甲状腺から純度の高いリンパ球を分離するのは困難であり、しばしば甲状腺上皮細胞の大量混入が問題となる。そこで、本研究では、まずバセドウ病における甲状腺内浸潤リンパ球の分離精製法に関する基礎検討を行い、次にバセドウ病および橋本病の甲状腺浸潤リンパ球サブセットの解析を flow cytometry で定量的に行った。

#### (対象と方法)

バセドウ病患者7名および橋本病患者10名より甲状腺組織をそれぞれ甲状腺亜全摘術および針生検を得、同時に末梢血を採取した。甲状腺組織は約1mm<sup>3</sup>大に細切し、ステンレスメッシュ上で圧搾し、リンパ球を遊出させた。組織残渣をナイロンメッシュで除去し、洗浄後PBS<sup>-</sup>に再浮遊して、甲状腺リンパ球分画とした。しかし、バセドウ病甲状腺のリンパ球分画には甲状腺上皮細胞の混入が多いため、その混入を除去するために以下の検討を行った。

Percoll 既成自己形成比重勾配 (1.054, 20,000×g, 15min., 4°C) に上記甲状腺リンパ球分画を重層遠心 (400×g, 30min., 4°C) し、比重1.034-1.088の間の6分画中に含まれる細胞成分を形態学的に

同定した。この結果に基づき、比重1.050および1.077より成る Percoll 二段階比重勾配上に甲状腺リンパ球分画を重層遠心 (400×g, 30min., 4°C) し、バセドウ病のリンパ球分画を得た。以上の方法で得られた甲状腺および末梢血リンパ球のサブセットをCD3, CD4, CD8, CD19, CD57およびHLA-DR (DR) に対するFITCまたはphycoerythrin (PE) 標識モノクローナル抗体を用い、flow cytometer (Spectrum III) により解析した。

#### (結 果)

1. バセドウ病甲状腺浸潤リンパ球の分離；甲状腺上皮細胞は試料作製過程中に細胞質を失い裸核状となった。これらは比重1.034の分画に、単核球は1.058-1.076, 赤血球は以上の分画に存在した。これより甲状腺上皮細胞と単核球は比重1.050で分離でき、さらに赤血球を除くために比重1.077のPercollを加えて、二段階比重勾配を作成した。この二段階比重遠心法によりバセドウ病甲状腺組織1g当たり $0.1-17.7 \times 10^5$ 個の単核球が65.3-95.0%の純度で得られた。
2. バセドウ病甲状腺浸潤リンパ球のサブセット解析；通常のリンパ球分画に用いるgate windowに加えて、活性化した大型リンパ球をも含む拡大gate windowを用いてリンパ球を解析した。甲状腺内では、末梢血に比しCD3<sup>+</sup>細胞(%)の減少およびDR<sup>+</sup>細胞(%)の著増がみられたが、CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, の各細胞(%)には有意差はなかった。しかし、拡大gate windowによる解析では、甲状腺内CD4<sup>+</sup>細胞(%)とDR<sup>+</sup>細胞(%)の増加がみられた。
3. 橋本病甲状腺浸潤リンパ球のサブセット解析；Two-color flow cytometryによりCD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>およびCD57<sup>+</sup>細胞における活性化(DR<sup>+</sup>)細胞の比率を測定した。末梢血では、健康人に比し、DR<sup>+</sup>細胞(%)が増加しており、CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, およびCD57<sup>+</sup>細胞のDR陽性率の増加がみられた。甲状腺内では、末梢血に比しCD3<sup>+</sup>細胞(%)の減少およびDR<sup>+</sup>細胞(%)の著増がみられ、中でもCD8<sup>+</sup>およびCD57<sup>+</sup>細胞のDR陽性率が著明に増加していた。しかし、CD19<sup>+</sup>細胞(%)の増加はみられなかった。

#### (総 括)

1. バセドウ病甲状腺組織からの浸潤リンパ球の分離には、二段階比重遠心法(1.050および1.077)が適していた。この方法により、甲状腺細胞の混入を除去し、甲状腺浸潤リンパ球の定量的解析が可能となった。
2. バセドウ病甲状腺では、末梢血に比し、CD3<sup>+</sup>T細胞(%)の減少およびDR<sup>+</sup>細胞(B細胞および活性化Tリンパ球)(%)の著増がみられた。そして、細胞の大型化がCD4<sup>+</sup> helper/inducer T細胞でみられ、その活性化が示唆された。
3. 橋本病甲状腺でも、末梢血に比し、CD3<sup>+</sup>T細胞(%)の減少およびDR<sup>+</sup>細胞(%)の著増がみられた。しかし、活性化はCD8<sup>+</sup> suppressor/cytotoxic T細胞およびCD57<sup>+</sup>NK/K細胞でより強く、甲状腺内における細胞傷害活性の増強が示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、甲状腺組織浸潤リンパ球の分離方法を詳細に検討し、純度の高いリンパ球分画収得法を新しく確立したことに大きな特長がある。この方法により甲状腺組織浸潤リンパ球サブセットの定量的解析を行い、バセドウ病ではヘルパー／インデューサー CD4<sup>+</sup>Tリンパ球の活性化を明らかにした。一方橋本病甲状腺組織内ではCD8<sup>+</sup>Tリンパ球の浸潤の存在を明らかにした。以上本論文は医学博士の学位を授与するに値する重要な研究と考える。