

## 3D 可視化解析システムを駆使した加齢に伴う粘膜 関連リンパ組織の形態変化に関する組織学的研究

### [1] 組織

代表者：野地 智法  
(東北大学大学院農学研究科)  
対応者：小笠原 康悦  
(東北大学加齢医学研究所)  
分担者：馬場 柚里  
(東北大学大学院農学研究科)

研究費：物品費 20 万円

### [2] 研究経過

腸内の免疫・微生物環境に与える加齢の影響は大きく、そのことは、腸管での免疫誘導を目的とした高齢者用ワクチンや、腸内の微生物環境の向上を目的とした高齢者用プロバイオティクス開発が容易でない大きな要因とされている。我々は、組織学的手法を駆使したこれまでの研究を通して、腸管での免疫システムの中核として機能する、パイエル板の組織学的解析を精力的に行ってきた。組織学的解析とは、通常、顕微鏡下で観察した 2 次元画像から、臓器内に存在する各種細胞の局在を解析するための手法である。我々は、組織学的解析から得られた画像を、さらにコンピューター技術 (Amira) を駆使して立体構築 (3D 可視化) することで、パイエル板の形態をより具体的に解析することを目指してきた。また、若齢マウスと加齢マウスのパイエル板の組織構造を、本 3D 可視化技術を駆使して比較解析することで、加齢に伴う腸管免疫機能を評価することを目的とした。

具体的には、若齢マウスおよび加齢マウスよりパイエル板を採取、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン切片を作成した。その後、パイエル板全てを 5 $\mu$ m 厚で薄切し (約 150 枚/パイエル板)、5 枚に

1 枚を選抜し、T 細胞を染色するための抗 CD3 抗体および、B 細胞を染色するための抗 B220 抗体を用いて免疫組織学的に染色を行った。T 細胞および B 細胞の局在は、加齢医学研究所の共通機器室に設置されている共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像解析を行い、さらには、全ての画像を解析ソフト (Amira) を用いて連結させることで、立体構築を試みた。この時、またはその前後にメールで随時、加齢研対応者である小笠原教授と観察結果等の意見交換、今後の研究の方向性について打ち合わせを行った。

図 1

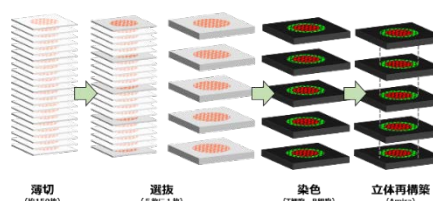


図 1 : 3D 可視化解析のためのフローチャート

Amira には、上下のパラフィン切片間の微妙なずれを微調整可能なアルゴリズムが備わっており、臓器内の微細構造 (例：濾胞の形態) を三次元解析可能である。

図 2

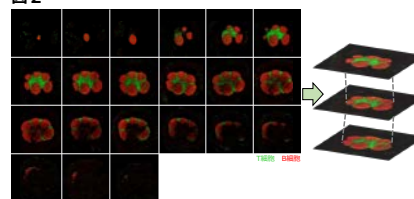


図 2 : 立体再構築に用いる組織画像

パイエル板を腸管腔側から基底膜側にかけて薄切し、それを T 細胞 (緑) および B 細胞 (赤) で識別するための免疫組織化学染色を行い、Amira に供した。

図 3

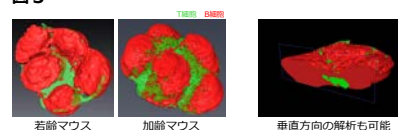


図 3 : Amira によって立体再構築されたパイエル板

全ての画像を Amira を用いて連結させることで、パイエル板の“かたち”を明らかになった。また、水平および垂直方向の解析も、同一画像を用いて解析可能となった。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

疑似色として T 細胞領域（傍濾胞領域）を緑色、B 細胞領域（濾胞領域）を赤色とし、パイエル板を Amira を用いて立体再構築した結果、球形をしていると思われた B 細胞領域は、隣接する濾胞との間に連結部が認められることが明らかとなった。また、T 細胞領域は、特にパイエル板の中央部に豊富に発達しており、B 細胞領域を取り囲む様に発達していた。これらの画像は、濾胞領域に存在する B 細胞は、各濾胞間を行き来できる自由度を有していること、また傍濾胞領域に存在する T 細胞も、必要とされる濾胞領域に自由にアクセスできる Flexibility を有していることが示唆された。また、これらの形態学的特徴は、Amira 上での垂直方向解析でも明確に示され、データの信頼性も実証された。一方で、若齢マウスと加齢マウスでの比較では、濾胞数に有意差は認められなかった。また、Amira の機能を用いて算出した各濾胞の体積は、有意差はないものの、加齢に伴い増加する傾向にあった。これらの結果は、加齢に伴うパイエル板での免疫機能変化とパイエル板の濾胞構造変化には、何等かの関係性があることを示唆するものであった。

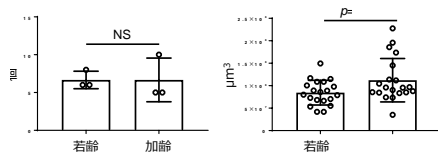


図4：加齢に伴う濾胞数および各濾胞体積変化

Amira を用いて 3D 可視化したパイエル板より濾胞数および各濾胞体積を産出した。その結果、加齢に伴う濾胞数に変化はないものの、各濾胞体積は増加する傾向にあった。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、粘膜免疫システムに備わる免疫臓器を組織学的に解析するための解析基盤が確立された。現在は、濾胞領域、傍濾胞領域のみならず、パイエル板内の血管走行にも着目した組織学的解析を開始しており、本年度の成果を発展させたそれ

らの課題は、平成 31 年度の東北大学加齢医学研究所共同利用・共同研究課題の継続採択にも結び付いており、今後のさらなる発展が期待されるものである。

#### [4] 成果資料

本年度より開始した共同研究であり、現在、Amira を用いた免疫臓器の 3D 可視化に関する論文を作成中であることから、直接的な成果論文（原著論文）は無いが、以下の学会で口頭発表を行っている。

1. **馬場柚里**、古川睦実、新實香奈枝、宇佐美克紀、佐々木志保、伊藤駿、渡邊康一、麻生久、**野地智法**：3D 可視化技術を用いたパイエル板の濾胞・傍濾胞領域の形態学的解析、第 161 回日本獣医学会、2018 年 9 月 11-13 日、つくば

また、粘膜免疫に関連する、本研究の発展につながる、以下の論文を平成 30 年度に発表している。

1. Niimi K, Usami K, Fujita Y, Abe M, Furukawa M, Suyama Y, Sakai Y, Kamioka M, Shibata N, Park EJ, Sato S, Kiyono H, Yoneyama H, Kitazawa H, Watanabe K, **Nochi T**, Aso H. Development of immune and microbial environments is independently regulated in the mammary gland. *Mucosal Immunol.*, 11: 643-653, 2018