

Title	粘膜固有層リンパ球の小腸微小血管における接着の生体観察
Sub Title	
Author	藤森, 斉(Fujimoro, Hitoshi) 石井, 裕正(Ishii, Hiromasa)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.4 (2003. 12) ,p.T297- T309
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20031201-0297

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

粘膜固有層リンパ球の小腸微小血管における接着の生体観察

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

ふじ しみ ひとし
藤 森 齊

(平成 15 年 3 月 25 日受付)

Key Word lamina propria lymphocytes, adhesion molecules, microvessels, migration

リンパ球はリンパ組織のみならず非リンパ組織内をも循環し、その循環動態は免疫現象の中で重要な役割を担っている^{1,2)}。抗原感作を受けていないナイーブリンパ球は恒常的に血管系・リンパ系を介して二次リンパ組織間を循環しており、リンパ球が二次リンパ組織において抗原と出会う確率を高めている。ナイーブリンパ球はリンパ節やパイエル板内の背の高い内皮細胞を持つ高内皮細静脈 (HEV: high endothelial venule) の血管壁を通り抜けてリンパ節及びパイエル板内に移動し、リンパ管から胸管を経て大循環に戻り、体内を再循環する。このようなリンパ組織への回帰現象をホーミングと呼ぶ。リンパ球のホーミングはランダムにおこるものではなく、明確な特異性を有しており、それはリンパ球-血管内皮細胞間の認識機構により緻密に制御されている^{3,4)}。一方、メモリーリンパ球やエフェクターリンパ球は非リンパ組織の血管内皮に migration することが知られている^{5,6)}。

消化管粘膜は腸管内の微生物や食物由来の抗原物質による生物学的侵襲のみならず、物理・化学的傷害作用からも生体を保護するとともに、必要な栄養物を選択的かつ積極的に吸収し、また生体内にある有害な物質を排除するという、高度に分化したバリア機能を有している。粘膜表面が暴露されている微生物抗原や食物抗原に対して、免疫反応を誘導する担当リンパ装置を腸管関連リンパ組織 (GALT: gut-associated lymphoid tissue) と呼ぶ。腸管由来の免疫芽球が腸管壁および GALT に特異的に migration することが、動物の生体観察により

これまで報告されてきた⁶⁻⁸⁾。しかし、腸管リンパ球がパイエル板や腸管粘膜にどのように migration するか、そしてその際にどのような分子機構が働くかに関しては解明されていない。

一般的に、白血球の血管内皮細胞への結合から浸潤に至る過程は4つのステップからなると考えられている。すなわち、1) L-セレクチンによる弱い結合から rolling に至るステップ、2) ケモカインなどによるインテグリンの接着機能活性化のステップ、3) 活性化されたインテグリンによる強い接着のステップ、4) 内皮細胞間をすりぬけ組織へ浸潤するステップ、である。パイエル板の傍濾胞域 T 細胞領域には postcapillary venule (PCV) がありリンパ球の侵入門戸となっている。マウス腸管リンパ系では、リンパ球表面の $\alpha 4\beta 7$ インテグリン及び血管内皮上の mucosal addressin cell-adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) との結合が特異的ホーミングレセプターとして機能することが知られている⁹⁻¹¹⁾。MAdCAM-1 はパイエル板 HEV へのリンパ球の接着を阻害する MECA-367 抗体が認識する HEV 上の mucosal addressin として同定された免疫グロブリンスーパーファミリーに属する糖蛋白質である。VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) や ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) と相同性のある免疫グロブリン様ドメイン I で $\alpha 4\beta 7$ インテグリンと結合し、ムチン様ドメインで L-セレクチンと結合するユニークな構造をもっている。しかし、リンパ球の migration では、単一の接着分子が全ての機能を担ってい

本論文は、Fujimori H, Miura S, Koseki S, Hokari R, Komoto S, Hara Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Ishii H: . Intravital observation of adhesion of lamina propria lymphocytes to microvessels of small intestine in mice. Gastroenterology 122: 734-744, 2002 の一部を含む。

るのでなく、複数の接着分子がお互い補い合いながら機能していると考えられており、腸管におけるリンパ球と HEV 内皮との反応には、L-セレクトイン及び CD11a/CD18 分子も関与していることが明らかにされてきた¹²⁻¹⁴⁾。さらに最近、好中球の血管内皮上における rolling に、L-セレクトインのみならず、P-セレクトインおよび E-セレクトインが関わることを報告された¹⁵⁾。

バイエル板は腸管免疫機構の誘導部位 (inductive site) であるが、その実効部位 (effector site) を構成するのが粘膜固有層や腸管上皮の免疫担当細胞群である。小腸粘膜固有層は、病的な状態でないにもかかわらず、リンパ球が豊富に存在して免疫応答のエフェクター機能を発揮しており、いわゆる生理的な条件下で炎症細胞浸潤が常にみられている部位である。粘膜固有層はバイエル板で感作され分化した IgA⁺B 細胞が IgA 形質細胞に最終分化する場所であり、その際には Th2 細胞から分泌される IL-5, IL-6, IL-10 などのサイトカインが関与している。粘膜固有層 T 細胞はバイエル板で受けたと同じ感作抗原の刺激を再び受けるとサイトカインを産生したり、直接的に細胞傷害性 (cytotoxic) に働き、エフェクター機能を発揮する。粘膜固有層 T 細胞は末梢血中とは相違し、増殖反応性が低く、高度に分化したものと考えられている。同時に活性化された状態にあり、サイトカインの産生能や細胞傷害性が非常に強いといわれている¹⁶⁾。Jalkanen ら¹⁷⁾は、粘膜固有層から分離されたリンパ球のうち、小径のリンパ球は腸粘膜及び末梢リンパ節の双方の HEV に接着するが、immunoblast は主に腸粘膜の HEV に接着する傾向があることを報告した。さらに最近、彼らは、immunoblast の腸粘膜 HEV における接着が、抗 $\beta 7$ インテグリンモノクローナル抗体により、ほぼ完全に抑制されることを示した¹⁸⁾。しかし、粘膜固有層リンパ球の接着に関する彼らの実験は凍結切片を用いた *in vitro* のアッセイであり、浮遊細胞中のリンパ球が本来の生理的な migration を反映しない可能性がある¹⁹⁾。これまでに粘膜固有層リンパ球 (LPLs) が腸管のバイエル板及び粘膜固有層自体にどのようにホーミングするか *in vivo* で観察した報告はない。

今回の実験は、リンパ球の migration を生体顕微鏡を用いて観察することにより、(1) 脾臓 T リンパ球と粘膜固有層 T リンパ球という由来の異なるリンパ球が、腸管バイエル板および粘膜固有層にどのように migration するか、(2) $\alpha 4$ インテグリン、 $\beta 7$ インテグリン、CD11a, MAdCAM-1, 及び L-セレクトインがどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

対象および方法

1. リンパ球採取と T 細胞の分離

実験には標準 chow diet で飼育した BALB/c 雌性マウス (8 週齢) を使用した。実験動物の取り扱いには慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに準拠し、これを遵守した。

脾臓リンパ球 (SPL) は Barret らの報告に従って分離した²⁰⁾。すなわち、脾臓を機械的に破碎し、赤血球を lysis buffer (リン酸/塩酸アンモニウム) で溶血させ、残った細胞浮遊液を洗浄し実験直前まで 5% fetal calf serum を含む RPMI 1640 (pH 7.4, GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) 溶液を含む氷冷試験管内で保存した。粘膜固有層リンパ球 (LPL) は Davies らの報告による方法を使用し分離した²¹⁾。すなわち、反転した小腸を 4 等分し、バイエル板を切除した後、5% fetal calf serum を含む 45 ml の Ca²⁺, Mg²⁺-free Hanks' balanced salt solution (HBSS; GIBCO) 溶液 (50 ml チューブ) に移し、37°C の恒温室で 45 分間、150 rpm で振盪させた。振盪後、細胞浮遊液を除去し、残った小腸を 90 U/ml の コラゲナーゼ type 1 (Sigma, St Louis, MO) を含んだ HBSS に移し、37°C で 25 分間、緩徐に攪拌した。攪拌後の細胞浮遊液をナイロンメッシュで濾過し、遠沈した。LPL は 44% と 70% の Percoll (Pharmacia, Sweden) の比重遠心により採取した。20°C, 1800 rpm で 20 分間遠心した後、44% と 70% Percoll の境界に集積した細胞を採取し、洗浄後、RPMI に再浮遊した。

T 細胞分画の分離は、ナイロンウールカラム (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を用いて行った。1% fetal calf serum 加 RPMI 3 ml 中に 2×10⁷ 個のリンパ球を含んだ懸濁液を 1 g のナイロンウールカラムに添加し 37°C で 1 時間 incubation して、T cell rich 分画を得た。

2. リンパ球の Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) による蛍光標識

Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDSE; Molecular Probes, Eugene, OR) 15.6 mM の濃度で dimethylsulfoxide に溶解し、実験に使用するまで、-80°C で 300 μ l ずつ保存した。リンパ球 1×10⁷ 個を、保存溶解液 20 μ l を 20 ml の RPMI で希釈した溶液中 37°C の恒温槽で 30 分間 incubation し、標識した。標識されたリンパ球を遠心沈殿させ、2 度洗浄し

た後、0.2 ml の溶液に再浮遊させ 30 分以内に使用した。CFDSE は細胞質の esterase で加水分解された後、安定な蛍光色素 carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) となり細胞質蛋白と結合することにより細胞内に留まる²²⁾。

3. 小腸パイエル板及び絨毛粘膜におけるリンパ球 migration の観察

マウスを sodium pentobarbital (50 mg/kg) 腹腔内麻酔下に正中切開にて開腹した。パイエル板観察には、回腸末端 5 cm を選んでプラスチック板上に展開した。腸管は 37°C の生理食塩水を持続的に滴下することで温度と湿度を保った。小型電気メスにて小腸に 2 箇所の小切開を加えた後、Krebs-Ringer 液 (pH 7.4) を管腔に注入し、食物残渣を取り除いた。小腸の管腔内圧はループの口側から vinyl tube を通して 37°C の Krebs-Ringer 液を注入することで 15 cmH₂O を維持し、小腸の可動性を最小限にし解像度の良い観察画面を得た。パイエル板の微小循環を漿膜側から TV ビデオ記録装置を装着した倒立型生体顕微鏡 (Diaphot, TMD-2s; Nikon, Tokyo, Japan) で、10 倍または 20 倍の対物レンズを用いて観察し、S-VHS のビデオテープに記録した²³⁾。周辺腸管及び腸間膜は Krebs-Ringer 液を浸した綿ガーゼで覆った。蛍光標識したリンパ球は蛍光を 470~490 nm で励起し 520 nm のフィルターを通して contrast-enhancing unit 付の silicon-intensified target image tube camera (C-2400-08, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu city, Japan) を装着した蛍光顕微鏡にて TV モニター上に映し、観察した。CFSE で標識したリンパ球 (1×10⁷個/0.2 ml) を同系マウスの頸静脈から 3 分かけて注入した。標識された T 細胞とパイエル板の微小血管との interaction は経時的に最初の 20 分間、以後 10 分間隔で 40 分まで観察した。血管壁に沿って転がるリンパ球を 'rolling lymphocytes' と定義した。注入 10 分後、postcapillary venule に流入するリンパ球を 1 分間観察し、rolling したリンパ球の割合を計測した。血管壁に接着し 30 秒以上同一部位に留まるものを 'sticking lymphocytes' と定義し、1 mm² あたりの数を計測した。

また、小腸絨毛におけるリンパ球の migration を粘膜面から観察した。回腸の腸間膜付着面の対側に沿って小型電気メスで切開し、プラスチック板に展開して粘膜面から観察し、蛍光標識されたリンパ球の動態を蛍光顕微鏡下に観察した²⁴⁾。この方法により、小腸粘膜絨毛頂部が楕円形に描出され、微小血管が観察された。血管壁

に沿って転がるリンパ球を 'rolling lymphocytes' と定義し、リンパ球注入 10 分後に 1 分間観察して、rolling したリンパ球の割合を計測した。パイエル板観察と同様、30 秒以上同一部位に留まるリンパ球を 'sticking lymphocytes' と定義した。

4. 抗接着分子抗体と百日咳毒素の関与

次にリンパ球を各種接着分子の中和抗体と incubation し、微小血管における循環動態を観察した。各種接着分子に対する中和抗体 L-セレクチン (MEL-14)、 α E インテグリン (M 290)、 β 7 インテグリン (Fib 27)、CD11a (M17/4) は PharMingen Co. (San Diego, CA) から、 α 4 インテグリンに対する中和抗体 (PS/2) は American Type Culture Collection (Manassas, VA) からそれぞれ購入した。またコントロールとして、ラット IgG (R35-95, Pharmingen) を同条件で使用した。1×10⁷個のリンパ球を抗体 100 μ g/ml の濃度の抗体とともに注入前に 30 分間 incubation した。別の実験では抗 MAdCAM-1 抗体 (MECA 367, Pharmingen, 2 mg/kg) を 0.2 ml 生理食塩水に溶解し、リンパ球注入 30 分前に頸静脈より投与した。また抗 MAdCAM-1 抗体 F(ab)₂ fragment の効果も検討し、コントロールとしては非中和抗体である MECA-89 (PharMingen) を使用した。さらにリンパ球を百日咳毒素 (PTX, 100 ng/ml; List Biological Lab, Campbell, CA) と 37°C で 2 時間 incubation し、PTX 感受性シグナル伝達系がリンパ球と微小血管との反応にどのように関与しているかを検討した。

5. 組織学的検査

小腸粘膜における MAdCAM-1 の表出を LSAB (labeled streptavidin biotin) 法を用いて免疫組織学的に検討した。小腸を取り出し、PLP (periodate, lysine-paraformaldehyde) 溶液固定した後 OCT (optimum cutting temperature) コンパウンド (Miles Inc., Elkhart, IN) に浸漬して凍結した。6 μ m のクリオスタット切片を poly-L-Lysin コートされたスライドガラスに貼付し 20°C で 1 時間乾燥した。切片を 1% の Triton X を含んだ Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 内で 5 分間洗浄した後、5% ヤギ血清入り PBS 内で incubation した。抗 MAdCAM-1 モノクローナル抗体を PBS で 50 倍希釈し、4°C で一晩反応させた。切片はビオチン化された抗ラット IgG 抗体 (Amersham International plc., Buckinghamshire, England) 室温 1 時間 incubation した後、FITC 結合

streptavidin (Amersham International plc) と室温で30分間反応させた。それぞれの段階で切片は1% bovine serum albumin を含んだPBSで洗浄した。切片はグリセロールゼリーで封入し、蛍光顕微鏡(BX60, Olympus, Tokyo)で観察した。

6. Tリンパ球の接着分子解析

T細胞浮遊液を0.2%ウシ血清アルブミン及び0.1% NaN₃ を含むHBSSで洗浄した。以後の細胞処理には、この溶液を使用し4°Cが保たれるようにした。蛍光免疫染色は、25 µl 溶液中2×10⁶個のリンパ球を含む浮遊液をリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体1 µg と incubation した。使用したモノクローナル抗体はL-セレクチン(MEL-14)、α4インテグリン(R1-2)、αEインテグリン(M290)、β7インテグリン(FIB27)、CD11a(M17/4)、α4β7インテグリン(DATK-32)、CD4(RM4-5)、CD8(53-6.7)、CD69(H1.2F3)、CD45RB(16A)、γδTCR(GL3)(PharMingen)を使用した。30分間の incubation 後、リンパ球を400 µl のHBSSで2000 rpm、5分間の遠心で3回洗浄した。コントロールには、アイソタイプを一致させた関連のない抗体を使用した。1次抗体結合リンパ球をFITC結合抗ラット/ハムスターIgG抗体で標識した。Flow cytometry の解析はFACSsort (Becton Dickinson, Mountain View, CA)を使用した。検体解析の際には propidium iodide を5 µg/ml の濃度で加えて、陽性の細胞を死細胞として解析から除外した。

7. 統計解析

全ての結果は平均値±標準偏差で示した。統計はANOVAとFisher's post-hoc testを用いた。p<0.05を統計学的有意差ありとした。

結 果

1. リンパ球表面接着分子の解析

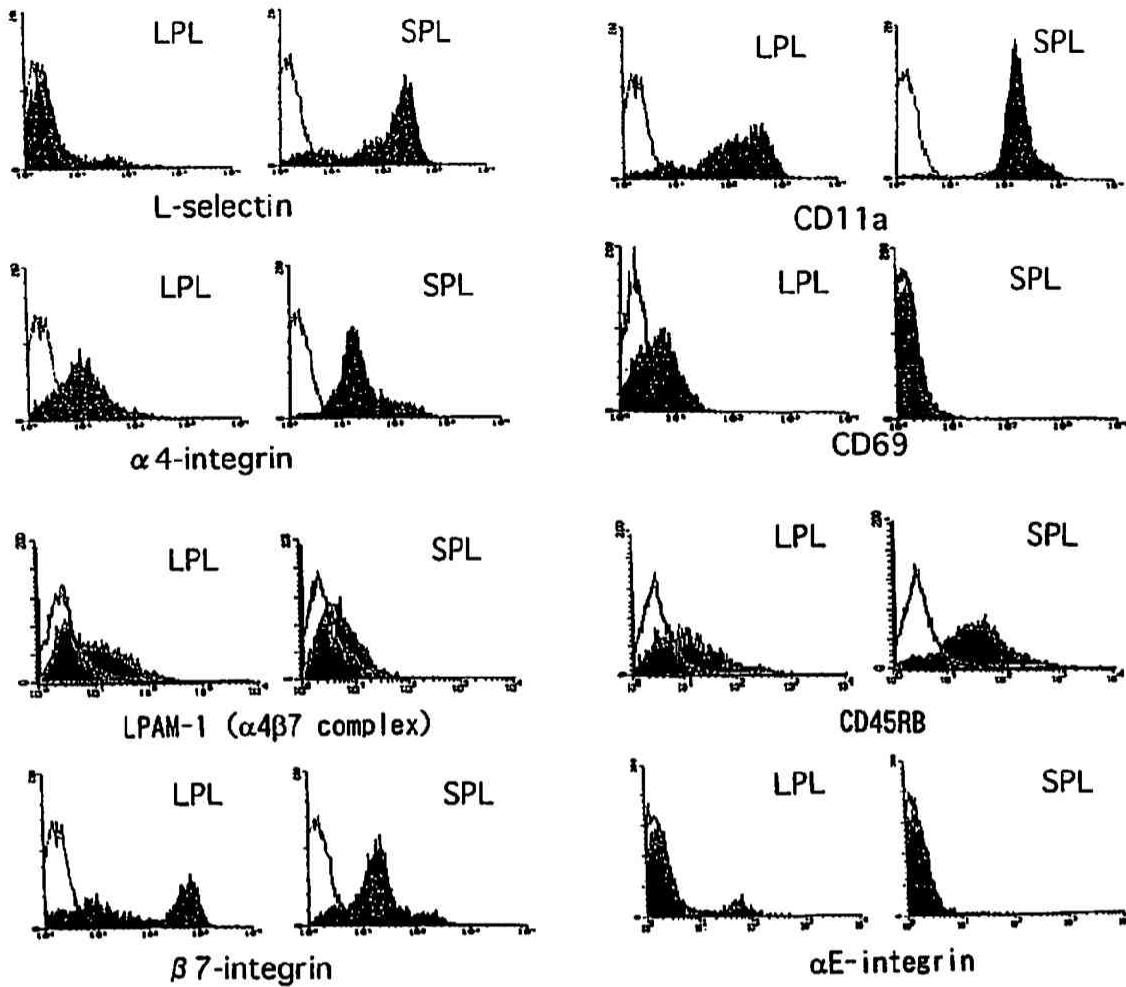
LPL及びSPLにおけるCD69とCD45RB及び各種細胞接着分子(L-セレクチン、α4インテグリン、αEインテグリン、β7インテグリン、CD11a)の表出を特異的モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーにより解析した。LPLは54.4%がCD4陽性、33.9%がCD8陽性で、SPLでは56.1%がCD4陽性、31.1%がCD8陽性であった。LPLの10%にαEインテグリンが、3%にγδTCRの発現がみられ、上皮間リンパ球(IEL)の混入が考えられたが、SPLでは発現を認めなかった。

第1図に示したように、L-セレクチンはSPLにおいてLPLより強く発現していたが、β7インテグリン及びvery-early-activation antigen(CD69)の表面発現は、LPLにおいてSPLより強く発現がみられた。ナイーブマーカーであるCD45RBはLPLでは弱発現であったが、SPLでは強く発現していた。また、LPLではCD11aの発現がSPLより弱かった。α4インテグリンの発現に有意差はなかったが、α4β7インテグリンのcombinatorial epitopeに対する抗体DATK-32の解析ではLPLで有意に強発現していた。

2. パイエル板 postcapillary venule における Tリンパ球の interaction

小腸パイエル板におけるTリンパ球とpostcapillary venule(PCV)との反応を蛍光顕微鏡で観察した。観察中、少数のSPLが短時間血管壁と反応し(rolling)、それらは血管壁から離れて血流中に戻るか、血管壁に強固に接着した。第1表に示した如く、リンパ球注入10分後に流入するリンパ球数は、SPLとLPLとの間で有意差は認めなかった。SPL注入10分後のrolling lymphocytesの割合は約70%で、この割合は20分後まで持続した。67%のrolling SPLはその後に血管壁から離れた。これに対して、リンパ球注入10分後のrolling LPLの割合はSPLの場合より著明に低値であった(第1表)。パイエル板PCVにおけるrolling SPLの割合は、L-セレクチン、α4インテグリン、β7インテグリンに対するモノクローナル抗体の処理により著明に減少した。また、rolling SPLの割合は抗MAdCAM-1抗体の処理においても著明に減少した。抗CD11a抗体に対する抗体処理ではPCVにおけるrolling SPLの割合は変化を認めなかったが、rollingしたリンパ球のほとんどが(約93%)が血管壁から離れていった。第2図は注入30分後にパイエル板の微小血管に接着したリンパ球の顕微鏡写真の像である。SPLがパイエル板PCVに選択的に接着するのに対して、LPLではほとんど接着が見られていない。第3図Aはパイエル板PCVにおけるSPLとLPLの接着数の経時的変化を示したものである。リンパ球数は微小血管中及び血管壁に沿って接着したものを含んでいる。接着するSPLの数はリンパ球注入10分後まで増加し、30分後以降は細胞が血管壁を通りぬけてしまうためプラトーとなる。それに対してPCVに接着するLPLの数は少数で、観察期間中に増加することはなかった。

各種接着分子がリンパ球のパイエル板PCVにおける接着にどのように関わっているかを明らかにするために、



第1図 粘膜固有層Tリンパ球、及び脾臓Tリンパ球表面における各種接着分子（L-セレクトリン、 $\alpha 4$ インテグリン、 $\beta 7$ インテグリン、CD11a、及び αE インテグリン）とCD69及びCD45RBの発現をフローサイトメトリーで解析した。2×10⁶個のリンパ球をまず抗マウス抗原に対するモノクローナル抗体（L-セレクトリン(MEL-14)、 $\alpha 4$ インテグリン(R1-2)、 $\beta 7$ インテグリン(FIB27)、LPAM-1(DATK-32)、CD11a(M17/4)、CD69(H1-2F3)、CD45RB(16A)、及び αE インテグリン(M290)とincubateした。それらを1 μ gのFITC標識した抗ラットIgGもしくは抗ハムスターIgGと反応させた。FACSsort(Becton Dickinson, Mountain View, CA)を用いてフローサイトメトリーを施行した。生細胞のデータをCONSORTソフトウェアを用いて解析した。最低4匹のT細胞を検討し、代表的データを示した。(Fujimori H et al: Gastroenterology 122: 734-744, 2002のFigure 1.を許可を得て転載)

接着分子に対する中和抗体の抑制効果を検討した。第3図Bはリンパ球注入20分後において接着したSPLの数と抗接着分子抗体の効果を示したものである。パイエル板PCVにおけるSPLの接着数は、抗L-セレクトリン、抗 $\alpha 4$ インテグリン、抗 $\beta 7$ インテグリン、抗CD11a抗体の処理により有意に減少した。また接着リンパ球数はレシピエントのマウスに抗MAdCAM-1抗体をあらかじめ投与することにより著明に減少した。

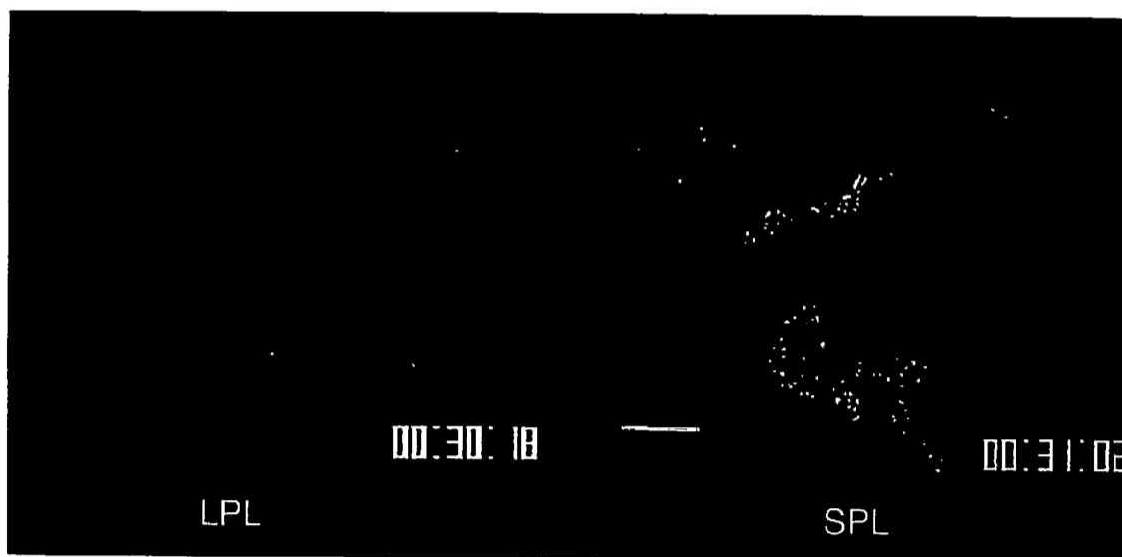
3. 小腸絨毛粘膜におけるTリンパ球の微小血管への接着

次に小腸絨毛粘膜におけるSPLとLPLの微小血管へのinteractionを粘膜側から観察した第4図は回腸粘膜絨毛の頂部の微小血管に接着したTリンパ球の顕微鏡写真である。左の写真の如く、多数のLPLが注入20分以内に絨毛頂上の微小血管に接着した。それに対して右の写真に示したように同時間帯ではSPLはほとんど接着しなかった。第2表に示したように、注入10分間

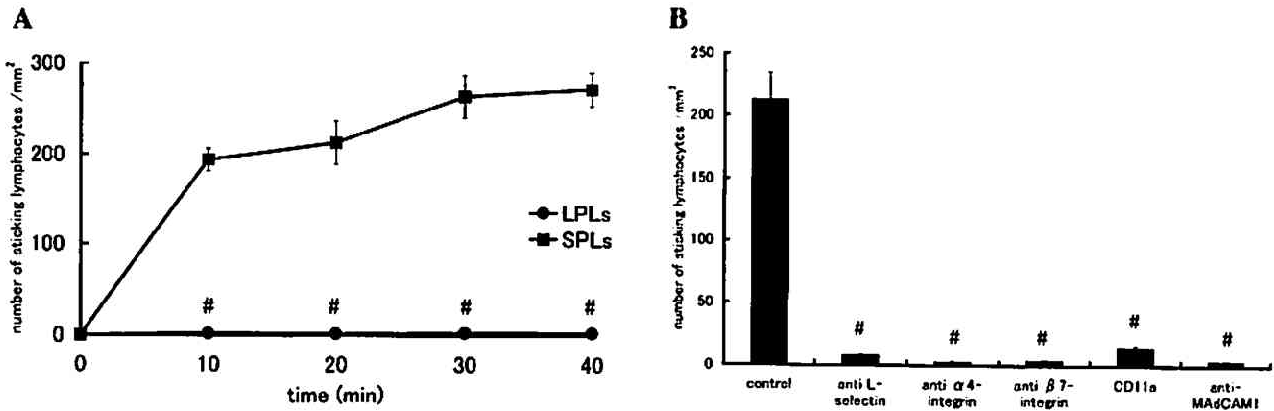
第1表 バイエル板 postcapillary venule と T リンパ球との相互作用と抗接着分子抗体の影響

	バイエル板 PCV に流入した リンパ球数 (counts/min)	PCV 上を rolling した リンパ球の割合 (%)	Rolling したリンパ球の うち血管壁を離れたリン パ球の割合 (%)
LPLs	42.8±6.4	8.0±4.1	92.5±7.8
SPLs	51.1±5.5	69.6±4.6*	67.4±8.2*
SPLs+anti-L-selectin mAb	52.6±4.5	2.0±0.2 [†]	53.0±6.3
SPLs+anti-α4-integrin mAb	45.1±4.7	5.2±0.2 [†]	88.8±1.8*
SPLs+anti-β7-integrin mAb	53.6±9.8	9.9±1.3 [†]	92.6±4.0*
SPLs+anti-CD11a mAb	41.5±6.0	60.5±8.2	92.6±3.6*
SPLs+anti-MAdCAM-1 treatment	50.0±7.9	4.5±0.5*	88.9±8.2*

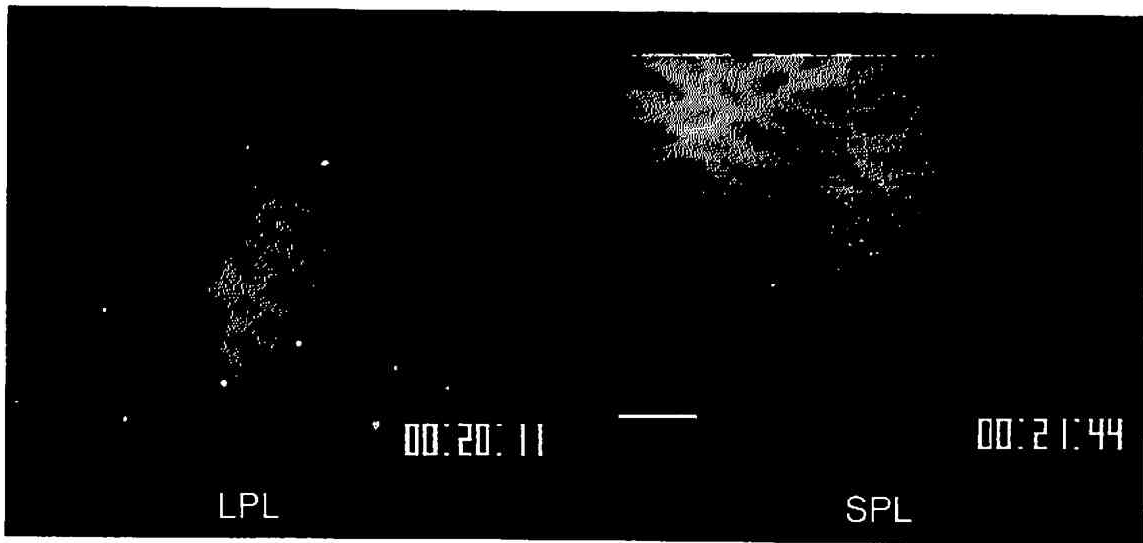
1×10⁷個のリンパ球をレシピエントマウスの頸静脈より3分以上かけて注入した。バイエル板におけるリンパ球の動態及び微小血管壁との相互作用をS-VHSビデオテープで経時的に記録した。血管壁に接触するが壁に沿って動くリンパ球をrolling lymphocytesと定義した。リンパ球注入10分後にpostcapillary venuleに流入した細胞数を1分間計測し、rolling lymphocyteの割合を算出した。Rolling lymphocytesのうち再び血管壁を離れたリンパ球の割合も測定した。また、リンパ球を、接着分子に対する中和抗体100 µg/mlとあらかじめ30分間反応させた後にレシピエントに注入し、観察をおこなった。中和抗体には、L-セレクトリン(MEL-14)、α4インテグリン(PS/2)、β7インテグリン(FIB27)、CD11a(M17/4)を使用した。さらに抗MAdCAM-1抗体(MECA-367, PharMingen, 2 mg/kg)を0.2 mlの生理食塩水に溶解して、リンパ球注入30分前にレシピエントの頸静脈から注入して観察を行った。*P<0.05 vs SPL, [†]P<0.05 vs LPL。平均値±標準誤差で表した(n=6)。(Fujimori S et al: Gastroenterology 122: 734-744, 2002のTable 1.を許可を得て転載)



第2図 CFSEで標識した粘膜固有層Tリンパ球(左)及び脾臓Tリンパ球(右)1×10⁷個注入30分後のマウスバイエル板 postcapillary venule 観察画面。Bar: 100 µm (Fujimori H et al: Gastroenterology 122: 734-744, 2002のFigure 2.を許可を得て転載)



第3図 A) マウスパイエル板 postcapillary venule に接着した LPL 及び SPL の数の経時変化。観察画面の 1 mm² において血管内と血管壁に接しているリンパ球数を計測した。*P<0.05 vs SPL. 平均値±標準誤差で示した (n=6)。B) 注入 20 分後のパイエル板 postcapillary venule における SPL の接着に対する各種接着分子抗体の効果。SPL をあらかじめ L-セレクトリン (MEL-14), α4 インテグリン (PS/2), β7 インテグリン (FIB27) に対するモノクローナル抗体 (100 μg/ml) で処理した。別の実験ではリンパ球注入 30 分前レシビエントマウスに抗 MAdCAM-1 抗体 (体重 1 kg あたり 2 mg) を投与した。*P<0.05 vs コントロール。平均値±標準誤差で示した (n=6)。(Fujimori H et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Figure 3. を許可を得て転載)

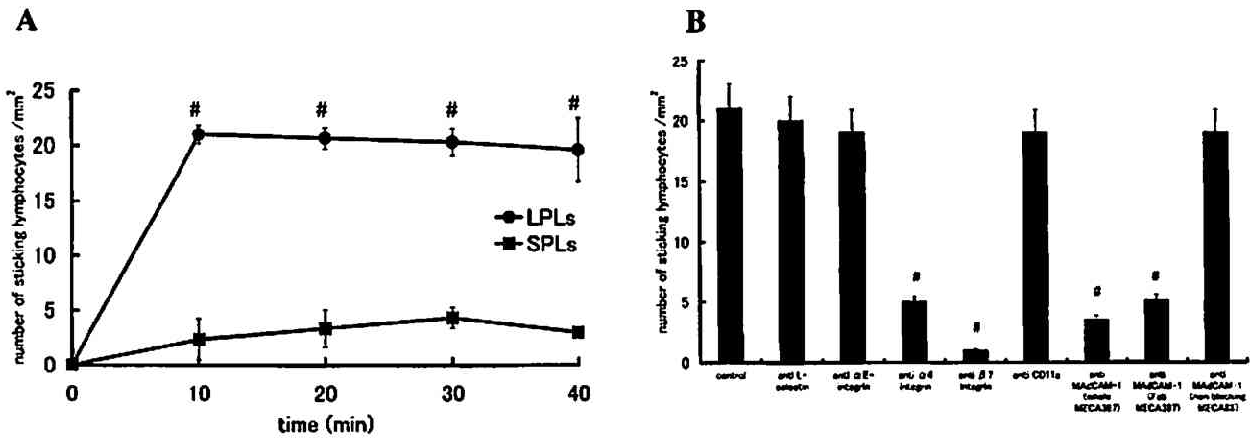


第4図 CFSE で標識した粘膜固有層 T リンパ球 (左) 及び脾臓 T リンパ球 (右) 1×10⁷個注入 20 分後のマウス小腸粘膜微血管観察画面。絨毛頂部毛細血管を粘膜面から観察した。Bar : 100 μm (Fujimori H et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Figure 4. を許可を得て転載)

第2表 小腸絨毛粘膜微小血管へのTリンパ球の接着と抗接着分子抗体の影響

	粘膜微小血管に流入する リンパ球数 (counts/min)	Rolling するリンパ球 の割合 (%)	Rolling したリンパ球の うち血管壁を離れたリン パ球の割合 (%)
SPLs	32.2±8.7	14.6±2.0	93.4±5.0
LPLs	29.0±6.2	37.0±5.6*	79.4±4.9*
LPLs+anti-L-selectin mAb	25.0±5.6	36.2±4.6	79.8±3.4
LPLs+anti- α E-integrin mAb	28.7±3.7	33.4±4.2	79.4±6.1
LPLs+anti- α 4-integrin mAb	26.9±8.8	10.3±1.0*	80.0±9.0
LPLs+anti- β 7-integrin mAb	26.9±1.0	14.0±2.3*	96.2±3.1*
LPLs+anti-CD11a mAb	23.4±4.2	30.5±6.0	76.4±6.9
LPLs+anti-MAdCAM-1 treatment	26.0±3.0	9.0±1.4*	86.2±3.4

1×10⁷個のリンパ球をレシピエントマウスの頸静脈から3分以上かけて注入した。粘膜微小血管におけるリンパ球の動態及び微小血管壁との相互作用をS-VHSビデオテープで経時的に記録した。血管壁に接触するが壁に沿って動くリンパ球をrolling lymphocytesと定義した。リンパ球注入10分後に粘膜微小血管に流入した細胞数を1分間計測し、rolling lymphocytesの割合を算出した。Rolling lymphocytesのうち再び血管壁を離れたリンパ球の割合も測定した。また、リンパ球を、接着分子に対する中和抗体100 µg/mlとあらかじめ30分間反応させた後にレシピエントに注入した。中和抗体には、L-セレクトリン(MEL-14)、 α Eインテグリン(M290)、 α 4インテグリン(PS/2)、 β 7インテグリン(FIB27)、CD11a(M17/4)を使用した。さらに抗MAdCAM-1抗体(MECA-367, PharMingen, 2 mg/kg)を0.2 mlの生理食塩水に溶解して、リンパ球注入30分前にレシピエントの頸静脈から注入して観察を行った。*P<0.05 vs SPL.*P<0.05 vs LPL 単独。平均値±標準誤差で示した(n=6)。(Fujimori S et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Table 2.を許可を得て転載)



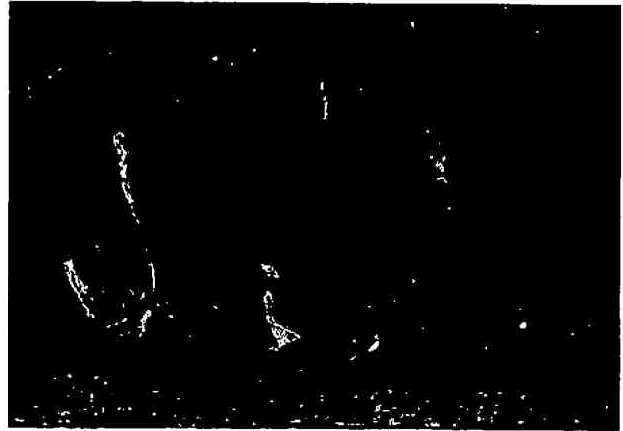
第5図 A) 粘膜絨毛頂部微小血管に接着したSPL及びLPLの数の経時変化。*P<0.05 vs SPL。平均値±標準誤差で示した(n=6)。B) 注入20分後の絨毛頂部微小血管におけるLPLの接着に対する各種接着分子抗体の効果。LPLをあらかじめL-セレクトリン(MEL-14)、 α Eインテグリン(M290)、 α 4インテグリン(PS/2)、 β 7インテグリン(FIB27)及びCD11a(M17/4)に対するモノクローナル抗体(100 µg/ml)で処理した。別の実験ではリンパ球注入30分前レシピエントマウスに抗MAdCAM-1抗体(体重1 kgあたり2 mg, MECA367及びF(ab)₂フラグメント)を投与した。同条件で、MAdCAM-1に対する非中和抗体(MECA-87)も使用した。*P<0.05 vs コントロール。平均値±標準誤差で示した(n=6)。(Fujimori H et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Figure 5.を許可を得て転載)

に粘膜微小血管に流入するリンパ球数は SPL と LPL とで有意差はなかった。注入後 10 分後の rolling SPL の割合は約 15%であったのに対し、LPL の場合は高値であった。その後、約 79%の rolling LPL が粘膜微小血管から離れて血流に戻った。それに対して SPL の絨毛粘膜微小血管における接着は一過性であることが多く、そのほとんどは血管壁から離れた。第 5 図 A は小腸絨毛粘膜における SPL と LPL の接着数の経時的変化を示したものである。注入 40 分後には LPL の接着は 19.7 ± 2.9 cells/mm² に対して、SPL では 3.0 ± 0.3 cells/mm² であった。百日咳 (PTX) 毒素で処理した LPL では絨毛微小血管上を rolling する割合に有意な変化は認めなかったが (29.4 ± 2.8 %), 40 分後の LPL の接着はほとんど認めなかった (0.4 ± 0.2 cells/mm²)。

リンパ球を接着分子に対するモノクローナル抗体で処理した場合も LPL が注入 10 分後に流入する数は有意差を認めなかった (第 2 表)。腸粘膜で rolling する LPL の割合は、抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体及び抗 $\beta 7$ インテグリン抗体による処理で著明に減少した。抗 MAdCAM-1 抗体をレシピエントに投与した際にも rolling LPL の割合は減少した。また抗 $\beta 7$ インテグリン抗体処理の場合には rolling LPL が血管壁から離れていく割合が顕著に増加した (約 96%)。第 5 図 B は LPL の絨毛粘膜における接着に対する各種接着分子の中和抗体の効果を示したものである。注入 20 分後の LPL の接着数はコントロールで 21.2 ± 2.1 cells/mm² であったが、抗 $\beta 7$ インテグリン抗体の処理によりその数は著明に減少した。また抗 MAdCAM-1 抗体の MECA-367 投与の場合、完全型および F (ab')₂ フラグメント抗体のいずれにおいても、LPL の interaction は著明に抑制された。 $\alpha 4$ インテグリンをブロックする抗体 PS/2 の処理でも LPL の接着は抑制された。それに対し、 αE インテグリン、L-セレクチン及び CD11a に対する抗体処理では LPL の接着に変化を認めなかった。また、MAdCAM-1 の非中和抗体である MECA-89 も LPL の接着に変化を与えなかった。

4. 免疫組織化学による MAdCAM-1 の局在

小腸における MAdCAM-1 分子の発現を組織学的に検討したところ、MAdCAM-1 は主に粘膜筋板直上の粘膜固有層の血管内皮に認められた。しかし、第 6 図に示したように、絨毛の突出部の微小血管にも MAdCAM-1 の表出が認められた。ただし、MAdCAM-1 は絨毛の微小血管に均一に認められたのではなく、血管の一



第 6 図 小腸絨毛における MAdCAM-1 発現を免疫組織化学的に観察した。1 次抗体には MECA 367 を使用した。次に切片をビオチン化した抗ラット IgG と反応させ、FITC-ストレプトアビジンで標識し、蛍光顕微鏡下に観察した。MAdCAM-1 は主に小腸粘膜筋板直上の粘膜固有層の血管に発現したが、絨毛突起の微小血管にも明らかな発現が観察された。(Fujimori H et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Figure 6. を許可を得て転載)

部分が MAdCAM-1 陽性となる所見であった。

考 察

今回の実験で我々は粘膜固有層リンパ球の小腸粘膜におけるホーミングが脾臓リンパ球と明らかに相違することを示した²⁵⁾。この違いは腸粘膜におけるナイーブリンパ球とメモリー/エフェクターリンパ球の分布の違いに関連している可能性がある^{3,26)}。抗原によるリンパ球の刺激はナイーブリンパ球の動態を変化させ、例えば腸管由来免疫芽球が小腸に migration するように、エフェクターリンパ球が非リンパ組織や他の特異的実効組織に効果的に migration するようになる。今回の実験では粘膜固有層リンパ球のほとんどが CD69 陽性であったのに対し、脾臓 T リンパ球は CD69 陰性かつ CD45RB 陽性であり、この結果はこれまでの報告と合致する^{27,28)}。最近の in situ の実験でリンパ球がパイエル板に、メモリー/エフェクターリンパ球が粘膜固有層のような非リンパ組織に migration する機構が解明されたが、使用されていたのは腸管由来の細胞でなく、マウスのリンパ節由来のリンパ球もしくは TK1 リンパ腫細胞であった^{13,29)}。

パイエル板 HEV 特有のフェノタイプ (L-selectin ligand³⁰⁾, MAdCAM-1³¹⁾, ICAM-1³²⁾) とそれに対応

するナイーブリンパ球のフェノタイプ (L-selectin^{hi}, $\alpha 4\beta 7^{\text{low/med}}$, LFA-1⁺) はパイエル板 HEV をリンパ球が通過するのに必要な関係を築いている²⁹。Bargatzte ら¹³⁾ はナイーブリンパ球がパイエル板 PCV に接着するには、L-セレクチンによる rolling, $\alpha 4\beta 7$ インテグリンによる減速, それに続いて活性化された LFA-1 による停止という一連の過程があることを示した。また彼らは MAdCAM-1 が $\alpha 4\beta 7$ インテグリンとも L-セレクチンとも相互作用することを示した。今回の実験において無刺戟脾臓 T リンパ球のパイエル板における動態はナイーブリンパ球の動態と一致している。脾臓リンパ球とパイエル板 HEV との相互作用が、L-セレクチン, $\alpha 4$ インテグリン, $\beta 7$ インテグリン及び MAdCAM-1 に対する抗体によりほぼ完全に抑制されることは HEV における複数の接着分子が関与していることを示している。一方、粘膜固有層リンパ球が $\alpha 4\beta 7$ インテグリンを表面発現しているにもかかわらずパイエル板 HEV とほとんど相互作用しないことは注目に値する。この結果は、LPL とフェノタイプが類似する TK-1 cell (L-selectin^{low/med}, $\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}$, LFA-1⁺) がパイエル板 HEV に強固に接着するというこれまでの報告と一致しない。これはリンパ球の HEV における接着が接着分子の表面発現以外の要素に影響を受けていることを示している。これに関しては接着を誘発するケモカインが *in vivo* におけるリンパ球の migration を制御していることが示されているが³⁰⁻³²⁾、ケモカインの正確な機能はいまだ不明である。また、リンパ球がパイエル板 HEV に接着した後、HEV をすり抜けて間質に移動し、やがてはリンパ管に流入する動態を *in vivo* で観察した報告は極めてまれである。後者に関しては永田らの貴重な報告があり³³⁾、本実験系においても一部リンパ管に流入する様子が観察された。

小腸粘膜固有層の微小血管において MAdCAM-1 が表面発現しているが、L-セレクチンリガンドの発現は欠如していることが知られている^{9, 27, 29)}。今回の実験において小腸粘膜固有層の微小血管における MAdCAM-1 の表面発現は、Streeter ら⁹⁾によるこれまでの報告と一致しており、MAdCAM-1 が LPL のホーミングに重要な役割を果たしていることを示している。MAdCAM-1 と $\alpha 4\beta 7$ との結合は、腸粘膜由来免疫芽球が小腸粘膜固有層に migration する特性を説明する^{13, 27, 34)}。粘膜固有層リンパ球が絨毛粘膜の微小血管に選択的に接着することが本実験で観察されたが、脾臓リンパ球は同部位ではほとんど接着しなかった。このことは小腸粘膜のリンパ球が腸管にホーミングするという特徴と合致する。絨毛粘膜の微小血管における LPL の接

着が生理的なホーミングではなく毛細血管における mechanical trapping によるものである可能性があるが、リンパ球を PTX で処理した場合この接着が抑制されたことから、LPL の接着は cell trapping というより PTX 感受性の G 蛋白を介した細胞内伝達に関与していることが示唆された。また小腸から細胞を分離する際のコラゲナーゼ処理が LPL の表面抗原を変化させることにより LPL のホーミングパターンに影響を与えている可能性があるが、著者の予備実験では、脾臓切片をコラゲナーゼ処理した後に採取した場合も脾臓リンパ球のパイエル板 PCV への接着に変化はなかった。またリンパ球が粘膜固有層に侵入した後に接着分子発現に変化が起こり、LPL と SPL の接着パターンの差を導いているという可能性も考えられた。

今回の実験結果は LPL の粘膜固有層微小血管との接着に $\alpha 4$ インテグリンが関与していることを示している。しかし、抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体はパイエル板 PCV の場合とは異なり LPL と絨毛微小血管との相互作用をパイエル板 PCV との場合とは異なり、完全には抑制しなかった。この事実は粘膜固有層における TK1 細胞の接着が抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体により完全に抑制されたとされる Berlin らの報告とは異なっている。それと同様に抗 MAdCAM-1 抗体が LPL と粘膜微小血管との相互作用を完全には抑制しなかった。抗 αE インテグリン抗体処理では接着の抑制が見られなかったことから、抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体、および抗 MAdCAM-1 抗体処理の実験において LPL に $\alpha E\beta 7$ 細胞の混入はなかったものと考えられた。 $\alpha 4$ インテグリンおよび MAdCAM-1 以外の接着分子が LPL T 細胞と粘膜固有層微小血管との相互作用に関与している可能性がある。著者らは以前、ラット腸管リンパ管由来の T リンパ球が LPS 処理した腸粘膜の粘膜下血管に接着し、その接着は $\alpha 4$ インテグリン、そして一部 $\beta 2$ インテグリンを介していることを報告した²⁴⁾。これらの実験や本実験結果からリンパ球と血管内皮の相互作用は、小腸における観察部位 (パイエル板 PCV, 粘膜下組織の血管および粘膜絨毛の微小血管) により多様性があることが示された。

GALT の形成には、 $\beta 7$ インテグリンが重要な役割をはたしていることが指摘されている。Wagner ら³⁵⁾は $\beta 7$ インテグリン欠損マウスの小腸粘膜固有層では CD4+ 細胞が著明に少数であることを報告した。本実験において小腸絨毛突起の微小血管における LPL の相互作用には $\beta 7$ インテグリンが深く関与していることが示された。粘膜の微小血管に流入したリンパ球数に有意差はなく、 $\beta 7$ インテグリン抗体による接着抑制は生体

内でLPLが死活してしまったためではないと考えられた。腸粘膜ではリンパ球の $\beta 7$ インテグリンの発現や機能がMAdCAM-1への接着を決定する主要な因子であるが、 $\beta 7$ インテグリンの表面発現のレベルだけではMAdCAM-1に接着する傾向は説明できない。この $\alpha 4\beta 7$ インテグリンの発現レベルとMAdCAM-1との接着との矛盾が顕著に見られるのはNK細胞においてである。NK細胞は中等度のレベルの $\alpha 4\beta 7$ インテグリンを発現しているが、他のリンパ球と比べるとMAdCAM-1との接着力は弱い³⁶⁾。今回の生体観察では細胞数が不足するため粘膜固有層Tリンパ球をさらにサブタイプに分離して観察することはできなかったが、サブセットによるmigrationの相違はいずれ比較する必要があると考えられる。

今回著者は、リンパ球が脾臓由来か小腸粘膜固有層由来か、及び腸管関連リンパ組織の血管内皮か非リンパ組織における血管内皮かにより、リンパ球と血管内皮細胞との相互作用が明らかに相違することを*in vivo*での実験で示した。LPLは小腸絨毛突起の微小血管に主に $\alpha 4\beta 7$ インテグリンとMAdCAM-1の結合を介して選択的に接着するが、SPLは主にパイエル板のpostcapillary venuleに接着する。この接着反応の選択性は、リンパ球及び血管内皮における特有の接着分子の表面発現により一部説明できる。しかし、*in vitro*における表面発現は*in vivo*の状況と必ずしも一致しているとはいえず、リンパ球のmigrationの機構を正確に理解するためには、ケモカインの関与を含めさらなる研究が必要と考えられた。

総 括

今回の実験で著者は、マウスリンパ球の腸管微小血管への接着を生体顕微鏡で観察することにより、パイエル板と粘膜固有層との間では、さらにLPLとSPLの間ではリンパ球の微小血管内皮への接着に大きな相違があることを明らかにした。すなわち

1. FACS解析によるLPLとSPLの表面分子発現の比較検討では、L-セレクチン、CD45RB、CD11aはSPLで強く発現がみられたが、 $\beta 7$ インテグリン、CD69はLPLにおいて強く発現が見られ、LPLがより活性化された状態であることが示唆された。また $\alpha 4\beta 7$ インテグリンのcombinatorial epitopeはLPLで有意に強発現が見られた。

2. パイエル板postcapillary venuleでの生体観察では、SPLは有意なrollingおよび接着数増加を認めたが

LPLではほとんど認めなかった。またSPLをL-セレクチン、 $\alpha 4$ インテグリン、 $\beta 7$ インテグリン、CD11aに対するモノクローナル抗体で処理した場合、またはマウスを抗MAdCAM-1抗体で前処置した場合には、接着数は著明に減少し、SPLのパイエル板への接着にはこれらの分子の共同作用が必要であることが示唆された。

3. 一方小腸絨毛粘膜における観察では、LPLはSPLに比べて有意に多く絨毛頂部の微小血管にrollingおよび接着を認めた。同部位でのrolling LPLの割合および接着数は抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体や抗 $\beta 7$ インテグリン抗体での抑制、あるいは抗MAdCAM-1抗体での前処置によってのみ有意に減少を示し、腸粘膜固有層での $\alpha 4\beta 7$ インテグリン-MAdCAM-1の組み合わせの重要性が示唆された。

4. 小腸におけるMAdCAM-1発現を組織学的に検討したところ、小腸粘膜固有層内の粘膜筋板直上の血管内皮に発現していたが、絨毛頂部の微小血管にも表出が認められた。

以上より、LPLは小腸粘膜固有層の微小血管に、 $\alpha 4\beta 7$ インテグリンとMAdCAM-1の結合を介して選択的に接着することが生体観察にて明らかにされた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深謝いたします。また、本研究を直接御指導頂きました防衛医科大学校内科学第二講座三浦総一郎教授に深甚なる謝意を表します。さらに解析に御協力を頂きました東京大学農学部農学生命科学研究科上野川修一教授、八村敏志助教に感謝いたします。

本論文の要旨の一部は、99th American Gastroenterological Association (1998年New Orleans)、20th European Conference on Microcirculation (1998年Paris)、10th International Congress of Mucosal Immunology (1999年Amsterdam)において発表した。

また本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金、慶應義塾大学医学部研究症例費および厚生労働省食物アレルギー基金によった。

文 献

- 1) Pabst R, Westermann J: Lymphocyte traffic to lymphoid and non-lymphoid organ in different species is regulated by several mechanisms. Adhesion Molecules, Chemokines and Lymphocyte Trafficking. (ED) Hamann A, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1997
- 2) Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian

- UH : Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 187 : 205-216, 1998
- 3) Butcher EC, Picker LJ : Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272 : 60-66, 1996
 - 4) Girard J-P, Springer TA : High endothelial venules (HEVs) : specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 16 : 449-457, 1995
 - 5) Mackay CR : Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5 : 423-427, 1993
 - 6) Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P : The gut-associated lymphoid system : nature and properties of the large dividing cells. *Eur J Immunol* 4 : 435-443, 1974
 - 7) Rose ML, Parrott DMV, Bruce RG : Migration of lymphoblasts to the small intestine. II. Divergent migration of mesenteric and peripheral immunoblasts to sites of inflammation in the mouse. *Cell Immunol* 27 : 36-46, 1976
 - 8) Smith ME, Martin AF, Ford WL : Migration of lymphoblasts in the rats. Preferential localization of DNA-synthesizing lymphocytes in particular lymph nodes and other sites. *Monogr. Allergy* 16 : 203-232, 1980
 - 9) Streeter PR, Berg EL, Rouse BTN, Bargatze RF, Butcher EC : A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 331 : 41-46, 1988
 - 10) Briskin MJ, McEvoy LM, Butcher EC : MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and IgA1. *Nature (Lond.)* 363 : 461-464, 1993
 - 11) Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC : $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74 : 185-195, 1993
 - 12) Arbones ML, Ord DC, Ley K, Rotech H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon DJ, Tedder TF : Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin (CD62L) deficient mice. *Immunity* 1 : 247-260, 1994
 - 13) Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC : Distinct roles of L-selectin and integrins $\alpha 4\beta 7$ and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ : The multistep model confirmed and refined. *Immunity* 3 : 99-108, 1995
 - 14) Steeber DA, Green NE, Sato S, Tedder TF : Lymphocyte migration in L-selectin-deficient mice. Altered subset migration and aging of the immune system. *J Immunol* 157 : 1096-1106, 1996
 - 15) Robinson SD, Frenette PS, Rayburn H, Cumiskey M, Ullman-Cullere M, Wagner DD, Hynes RO : Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96 : 11452-11457, 1999
 - 16) Kelsall, B. and Strober, W : *Mucosal Immunology* (ED) Ogra, PL. et al, Academic Press, San Diego, p293-317, 1999
 - 17) Jalkanen S, Nash GS, de los Toyos J, MacDermott RP, Butcher EC : Human lamina propria lymphocytes bear homing receptors and bind selectively to mucosal lymphoid high endothelium. *Eur J Immunol* 19 : 63-68, 1989
 - 18) Salmi M, Andrew DP, Butcher EC, Jalkanen S : Dual binding capacity of mucosal immunoblasts to mucosal and synovial endothelium in humans : Dissection of the molecular mechanisms. *J Exp Med* 181 : 137-149, 1995
 - 19) Walter S, Micheel B, Pabst R, Westermann J : Interaction of B and T lymphocyte subsets with high endothelial venules in the rat : binding *in vitro* does not reflect homing *in vivo*. *Eur J Immunol* 25 : 1199-1205, 1995
 - 20) Barret TA, Gajewski TF, Danielpour D, Chang EB, Beagley KW, Bluestone JA : Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. *J Immunol* 149 : 1124-1130, 1992
 - 21) Davies MD, Parrott DM : Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. *Gut* 22 : 481-488, 1981
 - 22) Suematsu M, Delano FA, Poole D, Engler RL, Miyazaki M, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW : Spatial and temporal correlation between leukocyte behavior and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation. *Lab. Invest.* 70 : 684-695, 1994
 - 23) Miura S, Tsuzuki Y, Fukumura D, Serizawa H, Suematsu M, Kurose I, Imaeda H, Kimura H, Nagata H, Tsuchiya M, Ishii H : Intravital demonstration of sequential migration process of lymphocyte subpopulations in rat Peyer's patches. *Gastroenterology* 109 : 1113-1123, 1995
 - 24) Miura S, Tsuzuki Y, Kurose I, Suematsu M, Shigematsu T, Kimura H, Higuchi H, Serizawa H, Yagita H, Okumura K, Granger DN, Ishii H : Endotoxin stimulates lymphocyte-endothelial interactions in rat intestinal Peyer's patches and villus mucosa. *Am J Physiol* 271 : G282-G292, 1996
 - 25) Fujimori H, Miura S, Koseki S, Hokari R, Komoto S, Hara Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Ishii H : Intravital observation of adhesion of lamina propria lymphocytes to microvessels of small intestine in mice. *Gastroenterology* 122 : 734-744, 2002
 - 26) Mackay CR : Immunological memory. *Adv Immunol* 53 : 217-265, 1993
 - 27) Picker LJ, Butcher EC : Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10 : 561-591, 1992
 - 28) Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR : The activa-

- tion antigen CD69. *Stem Cells* 12 : 456-465, 1994
- 29) Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC : $\alpha 4$ integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80 : 413-422, 1995
- 30) Campbell JJ, Butcher EC : Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12 : 336-341, 2000
- 31) Warnock RA, Campbell JJ, Dorf ME, Matsuzawa A, McEvoy LM, Butcher EC : The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med* 191 : 77-88, 2000
- 32) Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, Agace WW : Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment : Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 192 : 761-768, 2000
- 33) Nagata H, Miyairi M, Sekizuka E, Morishita T, Tatemichi M, Miura S, Tsuchiya M : *In vivo* visualization of lymphatic microvessels and lymphocyte migration through rat Peyer's patches. *Gastroenterology*. 106 : 1548-1553, 1994
- 34) Schweighoffer T, Tanaka Y, Tidswell M, Erle DJ, Horgan KJ, Luce GEG, Lazarovits AI, Buck D, Shaw S : Selective expression of integrin $\alpha 4\beta 7$ on a subset of human CD4+ memory T cells with hallmarks of gut-tropism. *J Immunol* 151 : 717-729, 1993
- 35) Wagner N, Löhler J, Kunkel EJ, Ley K, Leung E, Krissansen G, Rajewsky K, Muller W : Critical role for $\beta 7$ integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382 : 366-370, 1996
- 36) Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, Berg EL, Butcher EC : A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with $\beta 7$ integrins and memory differentiation. *J Immunol* 156 : 3727-3736, 1996
-