

# 好中球の顆粒形成と機能に関する形態学的研究

## 第二編

### 好中球顆粒の機能に関する形態学的研究

岡山大学医学部小児科学教室（指導：妹尾左知丸教授・浜本英次教授）

大学院学生 片野 隆司

〔昭和40年12月24日受稿〕

#### 内容目次

- 第一章 緒言
- 第二章 実験材料及び方法
- 第三章 観察結果

- 第四章 考案
- 第五章 総括

#### 第一章 緒言

周知の如く好中球の機能は小さい異物、例えば細菌の如きものを哺食してこれを処理する事にある。最近、好中顆粒が異物の処理に關係があるらしい事が Hirsch その他によつて報告された<sup>1)2)3)4)5)6)7)8)</sup>。

第一編で著者は好中顆粒が他の分泌細胞の顆粒と全く同様の機序によつて形成される事を述べた。従つて好中顆粒は他細胞の分泌顆粒と類似の働きを持つている可能性がある。分泌顆粒は各々の細胞に特有な酵素或いはホルモンその他を形成するが、何れも細胞外に出されてそこで種々の作用を示す<sup>9)</sup>。好中球では顆粒は細胞から分泌される事はないかも知れないが、これがリゾソームの性格を持つつている限りに於いて豊富な酵素の存在を示すものである<sup>1)</sup>。この細胞の機能が細菌の処理にある限り、千田氏等の否定的結果にもかかわらず、顆粒が細菌の消化に役立つかも知れないという事は容易に想像される所である<sup>20)21)</sup>。依つて著者はこの細胞が消化出来ない墨粒をこの細胞に貪食させて、果してそれが好中顆粒と融合するかどうかを観察する事を企画した。細菌は消化されて不明となるかも知れないが、墨粒は顆粒と融合すればそのまま顆粒内部に見出される筈である。観察の結果、両者は細胞質内で融合するらしい所見を得たので、ここに報告する。

#### 第二章 実験材料及び方法

材料は成熟家兔血中の白血球、及び骨髓の細胞

を用いた。末梢白血球は次の様な方法で分離した。即ち、心臓穿刺により得られた血液 10 cc にヘパリン 1 mg を加えて凝血を防ぎ、これに PVP 液 (Poly Vinyl Pyrrolidone, M.W=90,000 の 3% ハンクス氏液) を加え、PVP の最終濃度を 0.3% とし、試験管に移して室温 (20~25°C) で 45 分間放置すると赤血球は沈殿し、白血球は上清に浮遊する。この上清を静かにピペットで吸い取り、100 G で 10 分遠沈して白血球のペレットを得、之をハンクス氏液に浮遊、遠沈をくり返して同液で更に洗滌後、直ちに実験に用いた<sup>8)</sup>。

得られたペレットの一部は、第一編に記載した骨髓材料と同様な方法で冷グルタールアルデヒド固定後、酸フォスファターゼ反応を行ない、さらにオスミウム後固定を施し、ついで脱水、エポンにて包埋した<sup>9)10)</sup>。

分離した白血球の他の一部は、血清 25% を含むハンクス氏液に浮遊させ、その 10cc に対して 2 滴の割に Pelikan ink (Günther Wagner) を加え、37°C で 1 時間孵育した後、上記の方法に依り電子顕微鏡で観察した。この他に予め動物に Pelikan ink を体重 100 g 当り墨粒量にして 15~18 mg になる様にハンクス氏液で薄めて静脉内に注射<sup>11)</sup>。注射後、6 時間に骨髓及び末梢血を上述の方法によって採取し、電子顕微鏡で観察した。なお、材料ははじめ塗沫標本を作製し、ギムザ染色により墨粒を充分貪喰している事を確かめた後、電子顕微鏡標本とした。

### 第三章 観察結果

先ず、材料に用いたペリカンインクを薄膜として電子顕微鏡で観察すると、200~500 Å<sup>o</sup> 大の電子密度の大きい顆粒が認められる。これ等は比較的大きさのそろつた炭素粒子と考えられ、その形態(Fig. 1 B)から、これが細胞内に侵入すれば容易に区別出来る。墨汁を1%のゲラチンで浮遊させた状態で静脈内に注射するか、又は試験管内で孵卵すると好中球がこれを捕食する事は光学顕微鏡による観察で確かめられた (Fig. 1A)。これを電顕下で観察すると、捕食の初期段階に於いては細胞表面によつて捕えられ、やがて喰胞の中に取込まれて行く像が認められる (Fig. 2)。炭素粒子は数ヶずつ凝集した形で取込まれて行き、喰胞内でもそのままの形を保つてゐる。細胞には他に墨粒を含まない空胞を認めるが、その中のあるものは小さい顆粒を持つており、これが喰胞である事を示している (Fig. 2, v)。これ等の喰胞のあるものでは好中顆粒がこれに接して存在し、一部喰胞内に侵入して行く過程を示すらしい像に接した (Fig. 2, v')。この様な細胞で酸フォスファターゼ反応を行うと喰胞のあるものでは反応陰性であるが (Fig. 3v)，あるものでは陽性に現れ、しかもその内部には明らかに好中顆粒と認められる電子密度の高い物質がみられた (Fig. 3v')。しかし、顆粒は一般に酸フォスファターゼ反応陰性である。

喰胞と好中顆粒が融合した場合に酸フォスファターゼ反応が陽性となる事に注意して観察すると空胞内に顆粒が取込まれた関係を明瞭に認める事が出来る。Fig. 4 に於ける細胞にみられる空胞は墨粒を持つてないが、明らかにその反応性からみて好中顆粒を容れた喰胞であり、その内部に残つてゐるもののが好中顆粒である事は疑問の余地はない。ある喰胞ではその中に全く好中顆粒を認めず、而も酸フォスファターゼ反応が陽性に現われている。この様な像は喰胞と融合した顆粒はやがて消失して行く事を示している (Fig. 5)。又 Fig. 5 では、同時に喰胞周辺に集つて、後にこれと融合しようとする顆粒の集団が見られる。類似の像は墨汁を注入した家兔の骨髄好中球に於いても認められた (Fig. 6) (Fig. 7)。墨粒を貪喰した細胞の喰胞に於いてもそれが顆粒と合しない限り、酸フォスファターゼ反応陽性とならない事は、この場合にも *in vitro* の観察結果とほぼ同じ様に認められた。

尚、骨髄では、墨粒を盛んに貪喰した細網細胞を

認める (Fig. 8)。これ等の細胞も好中顆粒に似た顆粒を含んでいるが、この顆粒は元来、酸フォスファターゼ反応陽性のものが多く見受けられる。しかしこの場合にも墨粒を食した喰胞では酸フォスファターゼの反応は陰性であり (Fig. 8 v)，これが顆粒と融合すると著しく強い酸フォスファターゼ陽性反応が現れる (Fig. 8, v')。

### 第四章 考 素

以上の観察から明らかにされる事は好中球顆粒は喰胞と融合して喰胞内部の物質を消化するに役立つらしいと云う事である。少なくとも両者は融合し、融合と同時に喰胞には強い酸フォスファターゼ反応が現れる様になる。ゴルデ野に酸フォスファターゼ反応が陽性に現れるので、そこを通つて分泌される好中顆粒は、恐らく他の酵素と共に酸フォスファターゼを所有しているものと思われるが、それは喰胞と融合した時に、はじめて活性化されるものと思われる。この関係は骨髄の細網細胞に於いても同様である。第一編に述べた如く、好中球顆粒の中には酸フォスファターゼ反応陽性のものが少數存在するのが認められるが、これ等は恐らく喰胞と融合した後の顆粒であると考えられる。反応陽性の喰胞が見出される事があるが、これらは恐らく、中に含んでゐる好中顆粒が消失したか、又はそれが切片の面に現れなかつたかのいずれかであろう。あるいは Gordon の云う様にこれ等は内容の減少と共に縮少して再びリゾームとして働くかも知れない<sup>12)</sup>。その様なものがあるいは細網細胞内に認められる著しく高い酸フォスファターゼの活性をもつ顆粒であるかもしれないが、今回の実験ではこれを明らかにし得なかつた。

ラットの静脈内にカラシ菜のペルオキシダーゼを注射して喰胞の形成を観察した Straus に依れば、細網細胞に 0.1~0.5 μ のペルオキシダーゼ反応陽性の顆粒の出現を認め、この顆粒は高濃度の加水分解酵素を含んでいる事を報告し、恐らくこれが de Duve 及び Cohn, Hirsch の云うリゾームと相同的のものであろうと結論している<sup>13)14)15)</sup>。著者の観察からすれば、この顆粒はペルオキシダーゼを食した細網細胞の喰胞が顆粒と融合して生じたものである事はほぼ確実であり、加水分解酵素は顆粒から由來したものと考えられる。

顆粒に含まれる酵素の活性が喰胞との融合によつて活性化される機構は明らかでないが、Bitensky に

よれば、リゾソームの酵素を不活性状態に保つために、リピド蛋白構造が重要な役割を果しており、熱、フォルマリン、TritonX-100 等によつてこれを破壊する様な操作を加えると活性化されるので、細胞処理に注意すれば酵素活性をもたないリゾソームが観察されると云う<sup>18)</sup>。彼のリゾソームなるものが果して何か不明であるが、好中球ではその反応陰性なものは顆粒に相当し、いわゆるリゾソームと呼ばれるものは、喰胞と顆粒の融合によつて生じたものであろう。バクテリアのストレプトリデンにリゾソーム酵素の活性化作用の認められている事は著者の知見とよく一致するものである<sup>19)</sup>。

### 第五章 総 括

家兎を用いて骨髄と末梢血の好中球顆粒の機能を異物の捕食、並びに酸フォスファターゼ反応を中心にして観察した。その結果、好中顆粒は喰胞と融合してその酵素を活性化し、異物を処理するであろう

と考えられる知見を得た。即ち、形態学的に好中顆粒は喰胞と融合する像が認められた。好中顆粒は酸フォスファターゼ反応が陰性であり、喰胞も又同様に酸フォスファターゼ反応陰性である。しかし、両者が融合すると強い陽性反応が現れる。この関係は、骨髄細網細胞にも認められるが、この細胞の顆粒は酸フォスファターゼ反応陽性のものが多い。しかし、喰胞との融合に依つて酸フォスファターゼ反応は著しく活性化される。これ等の結果から好中球はその顆粒内に分解酵素を有し、食した細菌その他の処理を行うものと考えられる。

稿を終るにのぞみ、御指導、御校閲を賜わつた妹尾教授、浜本教授に深甚の謝意を表わすとともに、本実験について種々御指導、御援助を賜わつた横村英一先生に感謝いたします。

(本論文の要旨は第27回日本血液学会総会において発表した。)

### 文 献

- 1) Cohn, Z. A., and Hirsch, J. G.: The isolation and properties of the specific granules of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, 112, 983, 1960.
- 2) Hirsch, J. G., and Franklin, D. Z.: Degranulation of polymorphonuclear leukocytes following phagocytosis an electron microscopic study. *Blood*, 22, 824, 1963.
- 3) Rogers, D. E., and Melly, M. A.: Further observations on the behavior of staphylococci within human leucocytes. *J. Exp. Med.*, 111, 533, 1960.
- 4) Hirsch, J. G., and Cohn, Z. A.: Degranulation of polymorphonuclear leucocytes following phagocytosis of microorganisms. *J. Exp. Med.*, 112, 1005, 1960.
- 5) Cohn, Z. A., and Hirsch, J. G.: The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, 112, 1015, 1960.
- 6) Cohn, Z. A.: The fate of bacteria within phagocytic cells. I. The degradation of isotopically labeled bacteria by polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *J. Exp. Med.*, 117, 27, 1963.
- 7) Cohn, Z. A.: The fate of bacteria within phagocytic cells. II. The modification of intracellular degradation. *J. Exp. Med.*, 117, 43, 1963.
- 8) Byum, A.: Separation of white blood cells. *Nature*, 204, 793, 1964.
- 9) Sabatini, D. D., Bensch, K., Barrnet, R. J.: Cytochemistry an electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 19, 1963.
- 10) Pearse, E.: *Histochemistry* 2nd ed.
- 11) 柴田整一、三村信英：網内系機能検査法としての墨汁クリアランスの検討：日新医学，40巻，259，昭和32年。
- 12) Gordon, G. B., et al.,: Studies on the intracellular digestive process in mammalian tissue culture cells. *J. Cell Biol.*, 25, 41, 1965.
- 13) De Duve, et al.,: Tissue fractionation studies. VI. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.*, 60, 604, 1955.
- 14) De Duve, : The Lysosome. *Scientific American* 64-72p. May 1963.
- 15) Straus, W., : Cytochemical investigation of phagosomes and related structure in cryostat

- sections of the kidney and liver of rats after intravenous administration of horseradish peroxidase. *Exp. Cell Res.*, 27, 80, 1962.
- 16) Bitensky, L.: The demonstration of lysosomes by the controlled temperature freezing sectioning method. *Quarterly Journal of Mic. Science*, 103, 205, 1962.
- 17) Hirsch, J. G., Church, A. B.: Studies of phagocytosis of group A Streptococci by polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J. Exp. Med.*, 111, 309, 1960.
- 18) Robertis, E.: *General Cytology Third Edition*. 1963. Saunders.
- 19) Weissmann, G., Keiser, H., and Bernheimer, A. W.: Studies on Lysosomes. III The effects of streptolysins O and S on the release of acid hydrolases from A granular fractions rabbit liver. *J. Exp. Med.*, 118, 205, 1963.
- 20) Senda, N., et al.: The behavior of cell membrane of leukocytes in phagocytosis. *Annual Report of the Center for Adult Disease* 4, 1, 1964.
- 21) Senda, N.: The phagocytosis by leukocytes. *Annual Report of the Center for Adult Disease* 2, 124, 1962.

#### 写 真 説 明

- Fig. 1 A. 分離した家兎白血球をペリカンインクと共に 37°C 1 時間 Incubate した後の光学顕微鏡写真。好中球はかなり良く墨粒を捕食している。
- Fig. 1 B. 材料に用いたペリカンインクの電子顕微鏡写真。大きさは 200~500 Å の比較的大きさがそろつた粒子であり、形態も均一で区別し易い ( $\times 25,000$ )
- Fig. 2. Fig. 1 A の電子顕微鏡写真。細胞表面に附着した墨粒と、喰胞の中に存在する墨粒がみられる。炭素粒子は数ヶずつ凝聚した形でとりこまれていく。v: 嘉胞, v': 嘉胞に好中顆粒が侵入していく像, ( $\times 12,500$ )
- Fig. 3 酸フォスファターゼ反応を行うと、喰胞には反応陰性の喰胞 (v) と、陽性で内部に好中顆粒を入れている喰胞 (v') がみられる。しかし一般の顆粒には反応はみられない ( $\times 35,000$ )
- Fig. 4. 嘉胞内の好中顆粒。喰胞にとりこまれた好中顆粒は酸フォスファターゼ反応が陽性になつてている ( $\times 20,000$ )
- Fig. 5. やがて喰胞内の顆粒は消失し、空胞となるのが認められる。喰胞内壁に沿つて酸フォスファターゼ反応がみられる。他の部分では喰胞に近づいて融合しかけている好中顆粒がみとめられる。内部にはとりこまれた物質がみられる ( $\times 50,000$ )
- Fig. 6. 家兎の静脈内にペリカンインクを注射して 6 時間後の骨髄の電子顕微鏡写真。末梢血と同様に喰胞とそれに融合しようとしている好中顆粒がみとめられ、その一つには酸フォスファターゼ反応陽性顆粒がみとめられる。( $\times 17,500$ )
- Fig. 7. 同じく家兎骨髄の喰胞を示す ( $\times 16,000$ )
- Fig. 8. 同じ方法で得た家兎骨髄の細網細胞の電子顕微鏡写真。好中顆粒と同じ大きさ、形、電子密度の顆粒があり、異物捕食に際して同じ様な反応がみとめられた。v: 嘉胞とその内部にとりこまれた墨粒。v': 顆粒と融合した喰胞。酸フォスファターゼ反応は陽性化する。( $\times 12,500$ )
- Fig. 9. 以上の電顕写真をもとに喰胞と顆粒との関係を示した模式図。第一編で示した様に顆粒は一般的の分泌顆粒と同じくゴルチ装置により作られ、それが細胞内を inactive の状態で加水分解酵素を運び、喰胞と融合した際に始めて活性化され、異物の消化に当る事を示している。

Morphologic Studies on the Formation and Function of  
Neutrophile Granules.

Part II. Morphologic Studies on the Function of  
Neutrophile Granules.

By

Takashi Katano

Department of Pediatrics, Okayama University Medical School  
(Director : Prof. S. Seno, E. Hamamoto, )

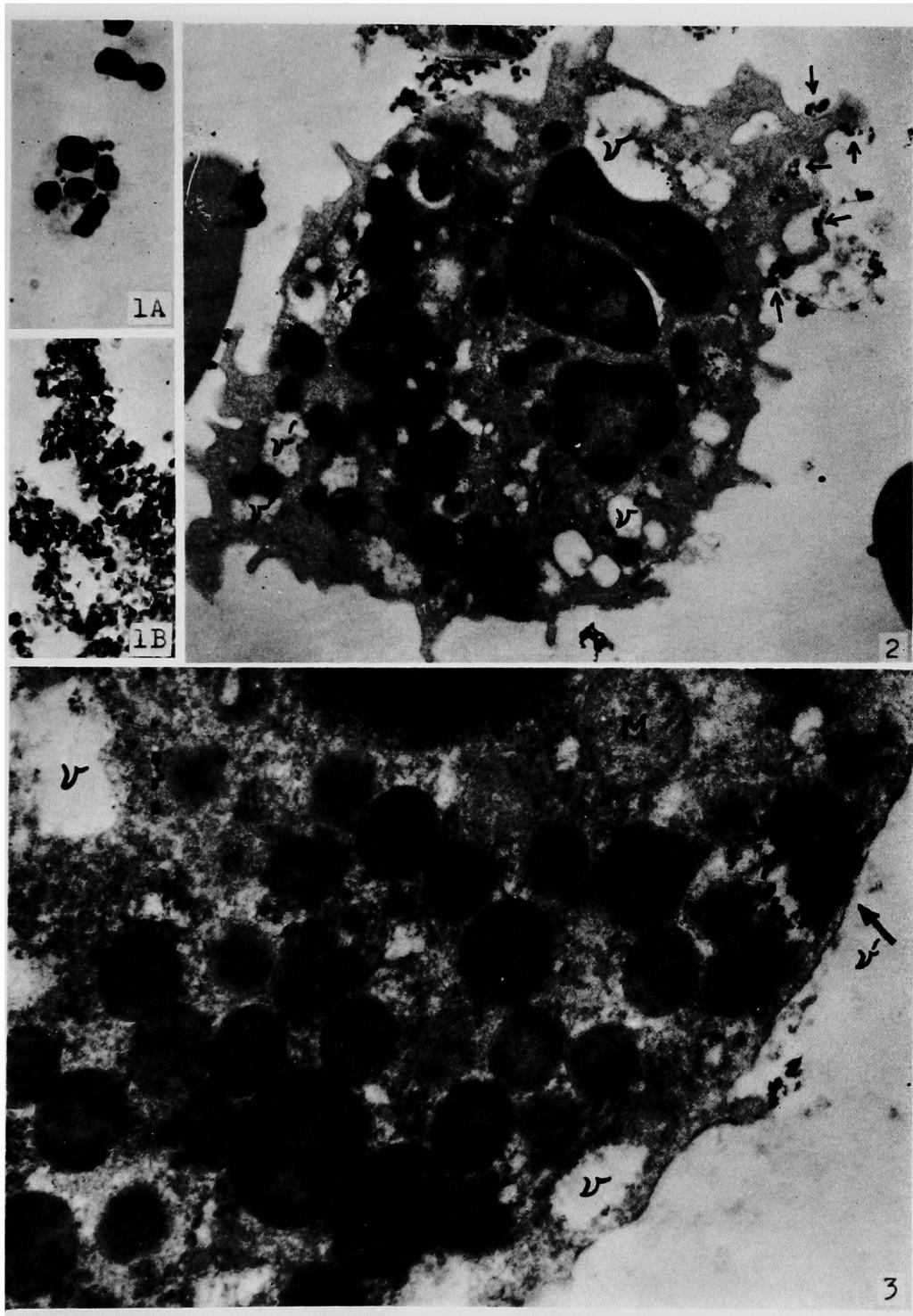
For the purpose to clarify the function of neutrophile granules the mature neutrophiles in the circulating blood and bone marrow of rabbit were fed with carbon particles and the relation of phagocytosized carbon particles and neutrophile granules were observed on the sections with or without acid phosphatase reaction.

The pictures demonstrate that the phagocytosized carbon particles fuse with neutrophile grnules and by this fusion the acid phosphatase is strikingly activated in the phagocyjotic vesicles. The similar process was also observed in both phagocytotic vesicles and the granules of the bone marrow.

The picture suggest that neutropnile granules possess many hydrolytic enzymes inside the granules and release them into the phagocytotic vesicles to lyse the phgocytosized foreign bodies.

---

片野論文附図



## 片野論文附図

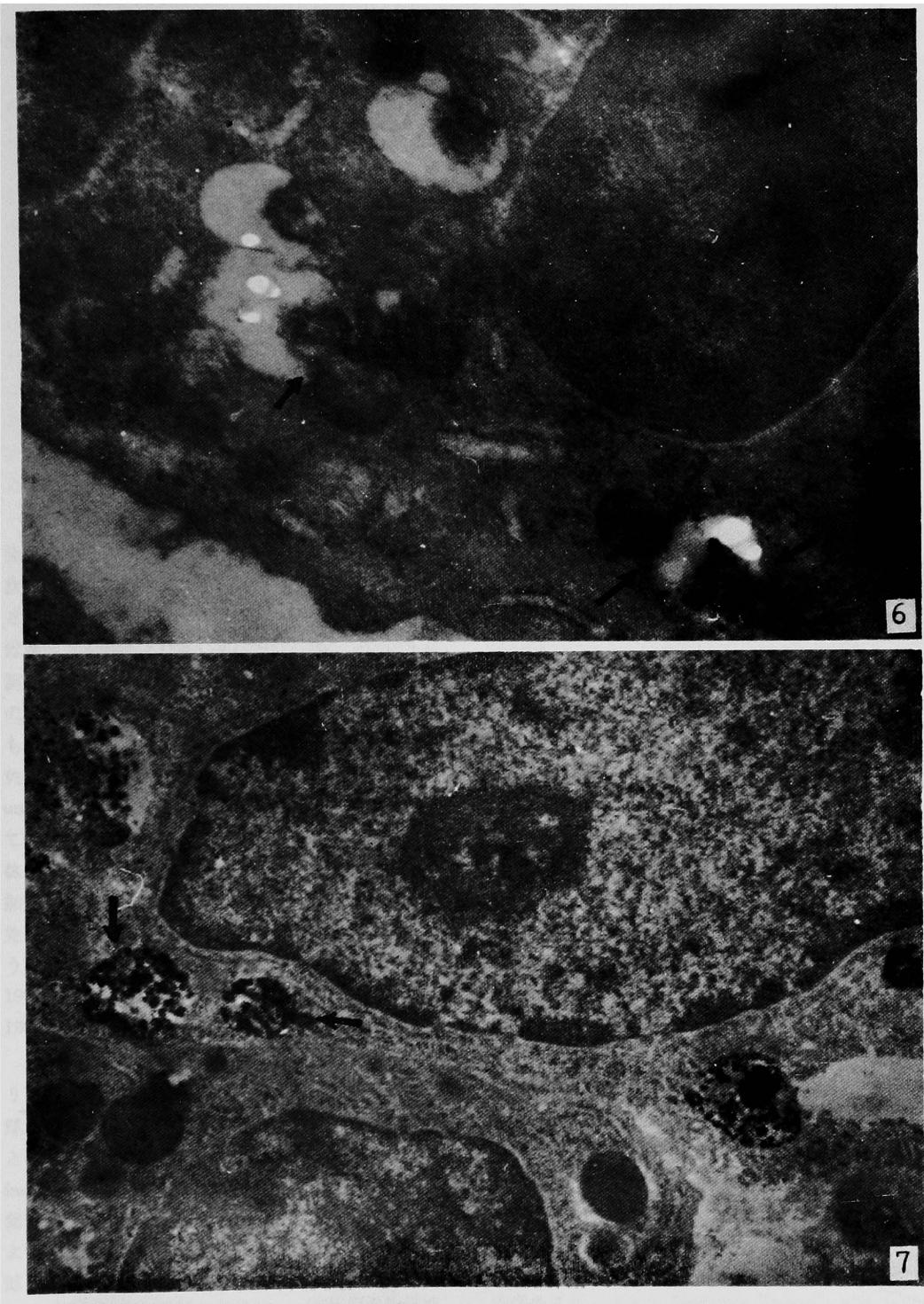


4



5

片野論文附図



片野論文附図

