第一編

正常細胞

岡山大学医学部第三内科教室(主任:大藤 真教授)

西 谷 皓 次

(昭和53年3月15日受稿)

I緒 言

In vitro における免疫現象の解明へのアプローチ には種々の手段が駆使されているが、形態学的手段 としては光顕レベル,電顕レベルで研究がなされて きた.しかし電顕レベルにおいては従来,透過型電 顕を用いての研究が主体を占めてきた.近年,立体 的表面像を観察する手段として走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy, SEM) があら ゆる生物試料に対して応用可能となってきた. しかし、免疫学の分野における応用は発展途上の段

階であり、報告し数少ない.

免疫関与細胞の細胞膜形態は種々の免疫反応下に おいては流動的に千変万化する能力を有し,ある特 定の条件下で合目的的に特徴的な形態を呈すると考 えられる.そこで著者は SEM を用いて免疫関与細 胞が織りなす表面形態の変化を克明に観察し,その 免疫現象を解析することを目的として以下の実験を 行った.

II 方法、並びに材料

1) 末梢血からの多核白血球,リンパ球,単球の分 離

健康人よりヘパリン加末梢静脈血を約9 ml 採血 し, Dextran を6% (W/V) になるように Hanks' BSS(Balanced Salt Solution) に溶解した液を 1 ml 加えてよく混和し、37℃60分間静置. 上清の白血 球に富む Buffy Coat をパスツールピペットで注意 深く採取して Ficoll - Conray 液¹¹ (9% Ficoll :33.4% Angio-Conray =24:10)の上に体積比2 :1の割合で重層する. 400 G, 20分間遠沈後, 管 底に顆粒球と若干の赤血球,中間の白層に単核球を それぞれ得る.得られた単核球は20% FCS(Fetal Calf Serum)を含む Hanks'BSS 中に浮遊し,底 に大きさ24×24mmのカバーグラスをガラスシャーレ に入れて37℃,30分間放置後,あらかじめ37℃に温 めた Hanks'BSS にてピペッティング,洗滌を行 い,液中に純粋なリンパ球,カバーグラス上に単球 を得る.

2) 単球による赤血球喰食現象

直接クームステスト陽性で不完全抗体が IgG 1 型であることが証明された自己免疫性溶血性貧血患 者²¹から静脈血1 ml 採血し,生食にて3回洗 縦 後 0.5% (V/V) 赤血球浮遊液を作製する. あらかじめ ガラス板上に単層で得た単球に赤血球浮遊液1 ml を混じ, 5% CO₂培養器中で37℃15分,又は60分反 応後観察した.

3)単球の補体レセプター

Mollison & Polley の方法"に準じ,補体を抗体 の非存在下で赤血球に付着させた. (以下, EC と 呼ぶ)すなわち, O型の正常人より静脈血を得,生 食で3回洗滌後,50%赤血球浮遊液として,その0.4 mlを0.3 MSucrose 3.4 ml,自己新鮮血清0.2 ml と混じ,37℃30分間反応後生食で3回洗滌し最終的 に0.5%(V/V)赤血球浮遊液とし,2)と同様に単 球と反応させた.

4)リンパ球の Phytohemagglutinin(PHA) に対す る反応

末梢血より Ficoll – Conray 比重遠沈法"にて 得られた,20%仔牛血清を含む TC 199 Medium に 浮遊させたリンパ球3×10⁵ cells/ml に PHA-P (Difco 社製) 30y/ml を添加し,72時間培養した. 5) Spontaneous Rosette Formation⁴⁾

Ficoll-Conray 比重遠沈法により得られた単核球 浮遊液を Hanks' BSS 中で5×10⁶ cells/ml に調 整し,20% FCS を含む Hanks' BSS 中で作製し た0.5% (V/V) 異種赤血球浮遊液をそれぞれ0.2 ml づつ混和し180 G、5分間遠沈後4 ℃、3時間反応 させ、浮遊液1~2滴をスライドドグスに取り、カ バーグラスをかけて 検鏡した.リンパ 球200 個以上 かぞえて赤血球3 個以上付着した細胞を陽性とした. 混入せる単球はラテックス喰食法により、リンパ球 と識別した⁵⁾. 又、反応後再びビペッティングによ り浮遊液とし、再度 Ficoll-Conray 比重遠沈法に より管底のヒツジ赤血球ロゼット形成細胞(SRBC - RFL)と中間層の非ロゼット形成細胞とに分離 し、観察に供した.

6) 膜表面免疫グロブリン保有細胞の同定

と同様に分離したリンパ球と FITC を標識した抗ヒト IgG, IgM, IgA 血清 (Hyland 社製) を用い膜蛍光抗体法⁶¹ にて観察した。

7) SEM による観察

それぞれの試料を Cacodylate Buffer (PH 7.4, 0.1 M)で作製した1%グルタールアルデヒドにて室 温で30分以上固定した. 試料が細胞浮遊液の場合は Poly- L- lysine (40µg/ml) で処理したガラス板 上に付着させ,エタノールで脱水し酢酸イソアミー ルに置換して臨界点乾燥"した後金パラジウムで蒸 着し, JSM-U 3型走査電子顕微鏡にて観察した (加速電圧25 KV).

Ⅲ 結果

 3 多核白血球, Polymorphonucledr cells(PMN) Fig 1の如くほぼ純粋に PMN を分離できた. 細胞の形は球状を保ち,大きさは5.0~6.8 μ(平均5.56 μ) であった. 表面構造は個々の細胞により相異が あり, 平滑なものから突起に富むものまで様々であ る. 突起の長さは比較的短かく0.1~0.3 μ 程度であ り, 細胞膜への基底部は広く, 先端になる程先細り 像を呈す(ridge-like). 中には所々に小さな blebs をもつ細胞(Fig 2の左下) もみとめられる. Fig 3, 4 は密に突起を有する PMN の拡大像であ

る.

2)単球

ガラス板上に付着した細胞は約98%が単球であっ た(Fig 5).細胞の形は付着の度合により半球状 のものから平担なものまで存在する(Fig 6). したがって,大きさは約6.0~14.0 μ で広がりの程 度によりそれぞれ異なる.表面構造は波状の細胞質 突起をもち ruffled,又は ridge-like membrane を 呈する. PMN の突起に比して巾広く,長い. 核の 存在を示唆するほぼ中心の膨隆部では突起は密であ り,逆に veil 状に伸びた末端の偽足部には粗であ る.分離過程で混入した血小板は単球に付着しやす く,Fig 7,8 では大きさ1.5~2.0 μ の血小板 が 認められる.Fig 9 では突起の密に集合した細胞を 示した.リンパ球のガラス板への付着態度は異なり, Fig 10の如く細く長い microvilli (0.4~3.0 μ)が 伸びている.10%ペプトンを腹腔に注入し得たモル モット,マウスの腹 腔浸出マクロファージも Fig 18,19の如く ruffle な細胞膜表面を有し喰食細胞 の種による表面構造の相異はなかった.

3) 単球による赤血球喰食現象

単球の Fc-receptor を介する赤血球との接触 は 先ず, Fig 12の如くロゼット形成から始まる. 付着 部で単球の膜表面構造の変化はみられず、赤血球は 球状化し付着部でしばられるような変形を示してい る. 更に、単球からは触手が伸び始め、赤血球を包 み込むように喰食が展開してゆく、その際、単球表 面の細胞質突起は粗である(Fig 13, 14), 喰食過程 が進行してゆくにつれて赤血球は次第に視野から消 滅し単球の細胞質に取り込まれる.喰食された未融 解の赤血球は単球外からその形が観察される。単球 の喰食,許容量は数ケの赤血球と思われるが、Fcreceptor が細胞表面に残存していれば2~3ケの 赤血球をすでに喰食していても次の赤血球へと喰食 がすすんでゆく(Fig 14, 15). 更に喰食が進むと 許容量に達した単球では喰食された4~5ケの赤血 球の形が単球の外形より想像され、新たな赤血球の 付着はみとめられない (Fig 16). 喰食された赤血 球は単球内で細胞融解が起る。融解は単球の部分的 透明性によって知られる.融解過程にある単球の表 面は以前の段階にある細胞に比して細腹質突起 (cytoplasmic processes) が増加し密に存在してい る (Fig 17).

単球の補体レセプターを介する EC との付着は同 様のロゼット形成で観察される. Fig 21に示した単 .球は反応時間が 180分と長いために紡錘状(spindle shape)を呈している.赤血球の球状化などの変 形はみられない. 付着部は一点ではなく比較的広く, 赤血球が単球表面にさし込むように接触している (Fig 22).

870

4	リリ	ン	パ球
	-		~

Table 1. Density and Length of Microvilli on the Surface of Human Peripheral Lymphocytes.

Size(µm)	Number(%)	Number of Microvilli /4μm²	Length of Microvilli (nm)
4.0<-≤ 4.5	1 (2.1)	10	200
4.5<-≦ 5.0	12 (25,0)	11.5± 3.3	233.4±85.5
5.0<-≦ 5.5	18 (37.5)	16.3± 3.2	255.7±67.4
5.5<−≦ 6.0	16 (33.3)	17.6 ± 6.5	275.1±96.7
6.0<-≦ 7.0	1 (2.1)	19	600

Table 2. Rosette Formation between Peripheral Lymphocytes and Red Blood Cells in Various Species.

RBC	Human	Dog	Guinea pig	Rat	Mouse
Human	0 (%)	0	0	0	0
Dog	37.1±10.0	N.D \star	0	0.8	0
Guinea pig	0	2.4	N. D.	0	0
Rat	0	0	3.0	N. D.	0
Mouse	2.9±1.0	0.6	0	1.0	0
Ox	0	N. D.	N. D.	N. D.	0
Pig	46.1±10.7	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Sheep	66.1±6.6	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

Peripheral Lymphocytes

Table 3. Subpopulation of human peripheral lymphocytes foming rosette with mouse erythrocytes.

Lymphocytes Donors	MRBC-RFL *	MIg-bearing cells **	MIg-bearing cells formig MRBC rosette IgG IgA IgM Total			
1	4.9 (%)	15. 5	33. 3	12.5	35.3	31.6
2	4.0	17.3	50.0	5.9	11.8	23. 1
3	1.5	9.5	4.8	16.8	25.0	15.8

* Mouse Red Blood Cells-Rosette Forming Lymphocytes

** Membrane Immunoglobulin-bearing cells

末梢血リンパ球は表面の microvilli を密に有す ものから平滑なものまでその程度はまちまちで ある. 一応,従来の如く Fig 23に示すリンパ球に類 似した細胞を平滑型 (Smooth type), Fig 24のリン パ球を中間型 (intermediate type), Fig 25のリン パ球を絨毛型 (villous type) と分類した. 大きさは 4.0~7.0 μ であり円形を保つ.単位表面積(4 μ m²). 当りの microvilli の数と長さを比較してみると Table 1の如く大きい細胞程 microvilli の数も多 く,長いものを有するという結果を得た.

PHA という非特異的刺激物質が加わると中には

Fig 26に示す如く、刺激しない時にはびまん性に存 在していた表面の microvilli は局在性に一つの極に 集合してくる.又、一部のものは Fig 27に示す如く、 その microvilli が細く長い(約1.0 μ)ものもある. T-細胞である SRBC-RFL は Fig 28の如くほぼ純 粋に分離可能であった. SRBC-RFL を前述の三型 に分類してみると smooth type 58.8%、 intermediate type 29.4%、 villous type 11.8% であっ た. Fig 29に villous type の細胞を示したが、一 部のものでは長さが 1.2 μ にも達する microvilli を有する. リンパ球への SRBC の付着態度には

^{*} N.D. : Not Done

cap 型, ring 型があるが Fig 30では cap 型で付着 している。赤血球は洗滌過程に変形したと思われる spheroechinocyte transformation をしているもの が多い、リンパ球膜表面構造には変化はないように 思えた. Fig 31に示す SRBC-RFL は細胞膜の破 壊像と考えられる無数の小穴が表面にみられるが, なおかつ SRBC の付着した状態を保っている. 一方, non-rosette forming cells では smooth type 28.6%, intermediate type 31.4%, villous type 40.0%であった. ヒトリンパ球はSRBC という 特定の赤血球に対する receptor を有するが SRBC の他には Table 2に示す如く、イヌ、ブタ、マウ ス赤血球ともロゼットを形成する. イヌ赤血球は Fig 32、33の如くリンパ球に比し大きく約9.0 µ 程 度であり biconcave 状で変形が少なく付着部で 突出がみられ,付着態度が point 型であることを示 している. リンパ球は intermediate type に属す る、マウス赤血球とロゼットを形成するリンパ球は Table 3に示す如く膜表面免疫グロブリン保有細胞 すなわち、B-細胞に属しその約23.5%に認められ る. リンパ球は Fig 34の如く smooth type に属し 付着態度も前二者と同様に point 型である.

Ⅳ考 按

免疫反応に関与する免疫担当細胞はそれぞれ異なった機能を反応の場において果している。例えばマクロファージや多核白血球は喰食能を有し,生体内に侵入してきた細菌や抗原を喰食し細胞内で済化融解させ,あるいは抗原情報をリンパ球に与える。一方リンパ球は大きく胸腺由来リンパ球(T-細胞)と骨髄由来リンパ球(B-細胞)の二つの subpopulation に区別され,その中でも機能,膜表面形質などにより細分化されている。 T-細胞は Helper, suppressor, killer などの多岐にわたる免疫機能を有し,B-細胞は抗体産生という液性免疫と強い関連性を有している。さてそのような別々の機能を有した細胞がどのような表面形態をもち反応の場においてどのように変化するのかということは大変興味ある点である。

SEM 観察において観察している細胞がいかなる 細胞であるかを知る手段として Hattori⁹らはSEM 観察後 Giemsa 染色をして固定している。又,田村 ら⁹は SEM 観察前に位相差顕微鏡を用いて観察し 固定している。しかし glutaraldehyde 固定後では 染色性が悪く,細胞内顆粒などを含めて固定があい

まいである. 又位相差顕微鏡で区別出来ない場合は 不可能であるなどの問題点を含んでいる。本実験に おいては特定の population を純粋に分離して SEM 観察をしているために細胞の固定は確かなものにな る。しかし純化する方法論にも限界があり、純化の 過程で表面形態が変化する可能性もあるなどの難点 がある. ヒト末梢血臼血球を多核白血球,リンパ球, 単球の三者に分離可能であったが、多核白血球を好 中球,好酸球,好塩基球に分離することは出来なか った. Hattori[®])、Clarke¹⁰) は前三者の表面形態の 相異を述べている. しかし Michaelis ら¹¹⁾ は類似性 を指摘している、これらの意見の不一致は技術面と くに染色、同定の時期、乾燥の方法などに問題があ るように思える、本実験の結果では細胞突起にかな り特徴的なものがあり、突起を有する細胞において は比較的識別が容易であるが、表面平滑な細胞(と くに、PMN とリンパ球にみられる)間では区別が 容易でない、細胞突起の特徴は免疫学的に何らかの 意味をもつものであろうか. 喰食細胞であるPMN. 単球は類似した突起 (ridge-like) をもっている (PMN の突起は短かく小さい)がリンパ球の突起は いくぶん形が違う. 又,リンパ球の突起は Fig 26 に示したように国点に集合するものもあり、かなり 流動的で外来刺激に呼応して変化してゆくと想像さ れうる.

膜表面構造の流動性変化の最も激しいのは単球で ある。刺激の加わっていない時と何らかの外因性刺 激が加わり活動性を帯びた単球は特徴的変化が現わ れる. すなわち Carr ら¹²⁾によるとマウス腹腔浸出 細胞でglyceryl trioleate により刺激された大部分 のマクロファージは正常の細胞と変化はみられない が、一部の細胞では円形状から著明に変形し ridgelike processesは増加し巾広くなり、大きなflangelike processes と finger-like processes かみられ るようになる. Albrecht ら¹³⁾はmineral oilにより マウス腹腔マクロファージを取り、化学物質による 固定を行わず freeze-drying して観察した結果,刺 激されないマクロファージに比し細胞膜全体に ridge が増すことを示している. 又, Polliack ら¹⁰は thioglycollate で刺激されたマクロファージは広が りが早く, 著明な ruffled membrane と filopodia をもつと述べている.本実験ではヒト末梢血単球, 10%ペプトンを注入して得たマウス,モルモットの 腹腔マクロファージを観察したが根本的には種は異 なっても類似の表面構造をもっていた。そして細胞

はガラス板への付着の度合により veil-like membraneous pseudopodia, foot-like, flange-like, finger-like, ridge-like processes には違いがあ った.赤血球喰食中の単球は ruffling が目立たない ことより外因性の刺激の種類, 性質により膜表面の 変化は左右されるとも考えられる.

リンパ球の表面形態は大きく smooth type, intermediate type, villous type に分けられるが1973年 polliack ら¹⁵ が表面形態の相異により, T-細胞とB-細胞との鑑別の可能性を述べて以来,リンパ球 subpoulation の同定への可能性が議論の的となっている. T-細胞の標識として最も一般的なのは spoutaneous SRBC rosette formation なる現象を利用した、い わゆる E-rosette と呼ばれているものがある. 本実 験では SRBC-RFL を Ficoll-Conray 法により単 離し(Fig 28), リンパ球表面形態により3型に分 類すると,約90%は Smooth type と intermediate type に属するものであり,約10%のリンパ球はvillous type にあてはまるものであった。分離過程に おける細胞表面形態の変化は否定しえないが少なく ともある T- 細胞は villous な表面形態を呈するこ とがあるといえる. Lin ら¹⁶⁾, Polliack ら¹⁷⁾も同 様に villous type の T- 細胞の存在を示唆している. 又, T-細胞由来で継代培養化された Molt 4 cells においても SRBC ロゼット形成前と後では変化す るとの報告もある¹⁸⁾. 更に Alexander ら¹⁹⁾は T-, B-細胞表面形態の類似性を述べている。 又 Baur ら²⁰⁾は T-cells の欠損している nude mice と正常 の CBA/J mice との比較において表面形態だけ で subpopulation 同定の困難性を述べている. Polliackら²¹ はマウスにおいて T-cell の多くは smooth type, B-cell の多くは villous type であると述べ ている、ヒトリンパ球に関して言うならば、少なく とも本実験によって明らかになったことは T-cell の大半は smooth type で,B-cell の大半は villous type であるがその逆の細胞もかなり存在するという ことである、すなわち、表面形態だけで subpopulation を同定するのは困難である。しかしながら、リンパ 球の microvilli が免疫学的意味を有しているとす れば、今後その機能が明らかとなるならば表面形態 による subclass の同定の可能性も出てくると考え られる. 例えば、マウス赤血球とロゼット形成する リンパ球 (MRBC-RFL) は Table 3に示したよう に膜表面免疫グロブリン保有細胞, すなわち B- 細 胞に属しその約23.5%を占めている. すなわち

MRBC-RFL は B- 細胞の subclass といえるが, その免疫学的意義は未だ不明である. B- 細胞の EAC との付着態度についていうならば, B- 細胞の 膜突起は赤血球にくい込む程の強い接触となってい る¹⁶¹. しかし MRBC-RFL についてはリンパ球表面 は smooth type で, E-rosette と同様 point attachment を示していた. 又, DRBC-RFL については 既報^{41,221}の如く SRBC-RFL とは多少 population は異なるが,赤血球との付着態度においては相異を 認めていない. このように spontaneous rosette formation はその赤血球の種により付着するリンパ 球 population は違うけれど, 付着態度には共通性 があるといえる.

さて,単球の喰食現象の SEM による観察は Goodall 5²³⁾ KLZ Acanthamaeba castellani K よる latex bead の喰食から始まる. Polliack S 11)は腹腔マクロファージに polystyrene latex bead(1 µm)、ホルマリン固定ウサギ赤血球を喰食 させている. latex は半球状の部に多く付着し, 喰 食が終了すると細胞の円形化する傾向を認めている. 又ウサギ赤血球の喰食部には crater をみとめてい る. Parakkal ら**)は単球を7日間培養したマクロ ファージの表面形態の特徴を3型に分類している. すなわち ① lamellipodia or undulating ruffled membrane (2) filopodia (3) microvilli である. そして非特異的な candida spores と,単球より大 きな18 µmもの Aminex beads の喰食現象を観察し ている. Aminex beads のような大きな物体には最 初多くの filopodia が伸びて,喰食し終るとふくれ あがったマクロファージには filopodia はなく2. 3の microvilli だけが表面にみられるだけとなる. 単球は無限に喰食能力があるわけではなく,このよ うに最高に達すると filopodia は消失するので喰食 能の残存する細胞の表面は ruffled, filopodic であ ると推測している。単球の赤血球喰食、細胞内融解 現象は大きく三段階に分けられる. すなわち attachment, engulfment, cell lysis である. 従来, 単球 には Fc-receptor, C₃-receptor の存在は示唆され ており²⁵⁾, Fc-receptor を介する喰食現象も透過電 顕を用いての報告はなされている²⁶'. しかし, SEM による細胞外からの立体的観察はこの現象をより明 解なものにした.本実験においては filopodia はみ られず, lamellipodia も変化なく, 喰食終了後に ridge-like の細胞質突起が増加した像が観察された (Fig17).以上本実験においては単球のFC-receptor

を介して行われる erythrophagocytosis が AIHA における溶血機序の一端を担うことを表面形態の観 察により明解なものにした。

Ⅴ結 論

1. SEM によりヒト末梢血白血球, PHA に反応し たリンパ球,異種赤血球とロゼットを形成したリン パ球,単球による赤血球喰食現象などの免疫現象の 表面形態を観察した.

2. ヒト末梢血中の多核白血球,単球,リンパ球は それぞれ特徴的な突起を細胞表面に有し,大部分は 表面形態により識別可能である.

3. ヒト末梢血リンパ球は大きいものほど表面突起 はより密で,長い傾向を示した.

4. SRBC-RFL の大半は smooth type かあるいは intermediate type であるが約10%は villous type である.

5. nou SRBC-RFL の約40%が villous type である.

6. MRBC-RFL は膜表面免疫グロブリン保有B-細胞 に属し,表面形態は smooth type で赤血球の付着 態度は SRBC-,DRBC-RFL と同様の point attachment である.

7. 単球の FC- receptor を介する赤血球喰食現 象は表面形態の観察により,その細胞内溶血機序が より明確なものになった.

稿を終るにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りまし た恩師大藤真教授,並びに山名征三先生,鈴木信也先生, 太田善介助教授に深謝致します.御助力いただいた教室 員各位に深甚の謝意を表わします.また技術的援助をい ただいた共同実験室の林,才原両技官に深謝致します.

参考文献

- Böyum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21 (suppl.97), 77-89, 1968.
- 2) 鈴木信也,河野勝昭,西谷皓次,原郁夫,太田善介,大藤真:自己免疫性溶血性貧血患者赤血球の in vitro における単球による喰食の検討,臨床血液,17,851-858,1976
- 3) Mollison P.L. and Polley M.J.: Uptake of γ globulin and complement by red cells exposed to serum at low ionic strength. Nature, 203, 535-536, 1964
- 4) Nishiya K., Yamana S., Yano K., Ensako K., Fujiwara T. and Ofuji T.: Studies on the population of human peripheral lymphocytes forming rosette with dog erythrocytes. Acta Med. Okayama, 28, 373-375, 1974
- 5) 西谷皓次,山名征三,藤原唯朗,三宅晋,大藤真:ヒト T-リンパ球測定法の標準化についての検討…… ラテックス粒子喰食による単球除去の試みについて,臨床免疫.1977投稿中
- 6)山名征三,矢野啓介,佐藤慶一郎,遠迫克英,西谷皓次,藤原唯朗,大藤真:全身性紅斑性狼瘡(SLE)に おける細胞性免疫能血中抗体との関連において,日内会誌,64,535-544,1975
- 7) Anderson T. F.: The techniques for the preservation of three-dimentional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans. N. Y. Acad. Sci. 13, 130-134, 1951
- 8) Hattori A.: Scanning electron microscopy of human peripheral blood cells. Acta Haem. Jap.,
 35, 457-482, 1972
- 9)田村宏,近藤慶一,山本玲子:同一細胞の位相差顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察. J. Clin Electron Microscopy, 8, 155-164, 1975
- 10) Clarke J. A., Salsbury A. J. and Rowland G.F.: Surface ultrastructure of human leukocytes, mouse macrophages and rat liver cells, and of isolated nuclei and nucleoli. Brit. J. Haemt., 14, 533-542, 1968

874

- 11) Michaelis T.W., Larrimer N.R., Metz E.N. and Balcerzak S.P.: Surface morphology of hu human leukocytes. Blood, 37, 23-30, 1971
- 12) Carr I., Clarke J.A. and Salsbury A.J.: The surface structure of mouse peritoneal cells a study with the scanning electron microscope. J. Micros., 89, 105-111, 1968
- 13) Albrecht R.M., Hinsdill R.D., Sandok P.L., Mackerrzie A.P. and Sachs I.B.: A comparative study of the surface morphology of stimulated and unstimulated macrophages prepared without chemical fixation for scanning EM. Exptl. Cell Res., 70, 230-232, 1972.
- Polliack A. and Gordon S.: Scanning electron microscopy of murine macrophage surface characteristics during maturation, activation, and phagocytosis. Lab. Invest., 33, 469-477, 1975.
- 15) Polliack A., Lampen N., Clarkson B.D. and Harven E. DE: Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy. J. Exp. Med., 138, 607-624, 1973.
- 16) Lin P.S., Cooper A.G. and Wortis H.H. : Scanning electron microscopy of human T-cell and B-cell rosettes. N. Engl. J. Med., 289, 548-551, 1973.
- 17) Polliack A., Fu S.M., Douglas S.D., Bentwich Z., Lampen N. and Harven E. DE : Scanning electron microscopy of human lymphocyte-sheep erythrocyte rosettes. J. Exp.Med., 140, 146-158, 1974.
- 18) Lin P.S. and Wallach D.F.H. : Surface modification of T-lymphocytes observed during rosetting. Science, 184, 1300-1301, 1974.
- Alexander E.L. and Wetzel B. : Human lymphocytes, similarity of B and T cell surface morphology. Science, 188, 732-734, 1975.
- Baur P.S., Thurman G.B. and Goldstein A.L.: Reappraisal of lymphocyte classification by means of surface morphology. J. Immunol., 115, 1375-1380, 1975.
- Polliack A., Hammerling U., Lampen N. and Harven E.DE : Surface morphology of murine B and T lymphocytes: a comparative study by scanning electron microscopy. Eur. J. Immunol., 5, 32-39, 1975.
- 22) 西谷皓次,山名征三,大藤真:ヒトリンパ球の赤血球ロゼット形成からみた subpopulation. アレルギー, 24, 826-832, 1975.
- 23) Goodall R.J. and Thompson J.E.: A scanning electron microscopic study of phagocytosis.
 Extl. Cell Res., 64, 1-8, 1971.
- 24) Parakkal P., Pinto J. and Hanifin J.M. : Surface morphology of human mononuclear phagocytes during maturation and phagocytosis. J. Ultrastruct. Res., 48, 216-226, 1974.
- 25) Huber H., Polley M.J., Linscott W.D., Fudenberg H.H. and Müller-Eberhard H. J.: Human monocytes: distinct receptor sites for the third component of complement and for immunogl globulin G. Science, 162, 1281-1283, 1068.
- 26) Lobuglio A.F., Cotran R.S. and Jandl J.H.: Red cells coated with immunoglobulin G: blnding and sphering by mononuclear cells in man. Science, 158, 1582-1585, 1967.

Legends

- Fig. 1 Purified polymorphonuclear cells(PMN) from peripheral blood, prepared by cytocentrifugation.(May-Giemsa stain. x 400)
- Fig. 2 PMN showed spherical shape and had smooth surface(by SEM. x 6000)
- Fig. 3 A PMN had many short projections which based broaly on the cytoplasm and were tapering.(by SEM. x 10000)
- Fig. 4 High magnification.(by SEM. x 20000)

Fig. 5 Purified monocytes from peripheral blood, adhered on a glass. (May-Giemsa stain. x 400)

- Fig. 6 Monocytes had ruffled, ridge-like membranes. A part of them showed hemispherical shape and were spreading on a glass flatly.(by SEM. x 3000)
- Fig. 7 High magnification of a hemispherical monocyte.(by SEM. x 6000)
- Fig. 8 High magnification of flatly spreading monocytes(by SEM. x 6000)
- Fig. 9 A monocyte had very dense cytoplasmic projections(by SEM. x 10000)
- Fig.10 A lymphocyte adhered on a glass, extending very fine, long microvilli.(by SEM. x 10000)
- Fig.11 Erythrophagocytosis by monocytes. (May-Giemsa stain. x 400)
- Fig.12 The attachment of erythrocytes to monocytes after incubation for 15 min. Erythrocytes showed spherical shape and deformed on a point of attachment.(by SEM. x 6000)
- Fig.13 High magnification.(by SEM. x 10000)
- Fig.14 Broad cytoplasmic protrusion of a monocyte was going to envelope a red cell (by SEM. x 3000)
- Fig.15 Some monocytes finished the engulfment. Ingested erythrocytes were observed from external side.(by SEM. x 3000)
- Fig.16 Erythrophagocytosis after incubation for 60 min. Five ingested erythrocytes were observed. (by SEM. x 6000)
- Fig.17 The cytolysis was proceeding in some ingesting monocytes. Their veils seemed to be increased in number.(by SEM. x 3000)
- Fig.18 Guinea pig peritoneal macrophage.(by SEM. x 10000)
- Fig.19 Mouse peritoneal macrophage.(by SEM. x 10000)
- Fig.20 EC rosette formation by monocytes.(May-Giemsa stain. x 400)
- Fig.21 Human erythrocytes which were coated with complement in absence of antibody, keeping biconcave shape, attached to monocytes.(by SEM. x 1000)
- Fig.22 High magnification.(by SEM. x 3000)
- Fig.23 A lymphocyte, smooth type.(by SEM. x 10000)
- Fig.24 A lymphocyte, intermediate type.(by SEM. x 10000)
- Fig.25 A lymphocyte, villous type.(by SEM. x 10000)
- Fig.26 A cultured lymphocyte with PHA condensed microvilli on the area of a pole.(by SEM. x 10000)
- Fig.27 Some cultured lymphocytes with PHA had very fine, long microvilli.(by SEM. x 10000)
- Fig.28 Purified SRBC-REL from peripheral blood, prepared by cytocentrifugation. (May- Giemsa stain. x 400)
- Fig.29 A SRBC-RFL had the villous surface structure.(by SEM. x 10000)
- Fig.30 A SRBC-RFL showed cap-form attachment with SRBC..(by SEM. x 3000)
- Fig.31 A degenerating lymphocyte kept a rosette with SRBC. (by SEM. x 6000)
- Fig.32 A DRBC-RFL showed the point attachment.(by SEM. x 10000)
- Fig.33 High magnification.(by SEM. x 10000)
- Fig.34 A MRBC-RFL showed smooth surface and the point attachment.(by SEM. x 10000)



Fig. 1



Fig. 2









Fig. 5



Fig. 6



Fig. 8



Fig. 7



Fig. 9







Fig.11



Fig.12



西谷皓次 西谷皓次論文附図







Fig.15



Fig.**16**



Fig.18



Fig.17



Fig.19

880



Fig.20





Fig.22











Fig.25



Fig.26



Fig.27



Fig.**28**



Fig.29



Fig.30

西谷皓次

西谷皓次論文附図



Fig.**31**



Fig.32



Fig.33



Scanning electron microscopic observation of the cells related to immunological phenomena

Part I. normal cells

Koji NISHIYA

3rd Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Okayama

(Director : Prof. T. Ofuji)

Human lymphocytes, granulocytes and monocytes were purified from normal human peripheral blood, using Ficoll-Conray gradient sedimentation and glass adherent activity of monocytes. The characteristics of surface structure among them were easily shown by SEM observation, e.g. monocytes had ruffled, granulocytes had ridge-like and lymphocytes had finger-like projections on their surface.

Most of purified SRBC-RFL (T-cells) had smooth surface structure. However, the approximate ten percentage of them showed the villous one. A MRBC-RFL which belonged to surface immunoglobulin bearing cells (B-cells), showed the smooth one. It was concluded from the results that it was difficult to judge only from their surface characteristics whether the lymphocytes were T- or B-cells.

Erythrophagocytosis by human monocytes bia Fc-receptor consisted of attachment, engulfment and cytolysis. SEM observation clarified the surface morphological changes of monocytes and erythrocytes in each stage. This phenomenon indicated that erythrophagocytosis might play a role in hemolysis of patient with autoimmune hemolytic anemia.