

血液細胞膜構築の研究

第 二 編

Freeze-etching 法によるリンパ球膜構築の検討

岡山大学医学部大学院医学研究科 (主任: 平木潔教授)

多 田 慎 也

(昭和51年1月10日受稿)

1) 緒 言

近年、動物におけるリンパ球の成績¹⁻⁴から胸腺由来リンパ球 (thymus derived lymphocyte 即ち T 細胞) と、Fabricius 嚢または骨髄由来リンパ球 (Bursa derived or bone marrow derived lymphocyte 即ち B 細胞) の大別して二種類のリンパ球 subpopulation の存在が明らかになった。ヒト・リンパ球においても膜表面の受容体や抗原を marker として T 細胞、B 細胞の区別⁵⁻⁸がおこなわれており、膜表面免疫グロブリン陽性細胞 (surface immunoglobulin bearing cell: SIBC) は補体感作ヒツジ赤血球ロゼット形成リンパ球とともに B 細胞を代表するものとされている。ヒト・リンパ球を膜免疫蛍光法により、SIBC と non-SIBC に区別し、tetron fiber column 法、freeze-etching 法⁹を用いて膜形質と膜表面構築との関連を観察し検討した。

2) 材料と方法

1) 材料: 健康人 4 名, 急性リンパ球性白血病, (以下 ALL) 2 名, 慢性リンパ球性白血病 (以下 CLL) 3 名の末梢血および胃潰瘍患者腹腔内リンパ節を材料とした。

2) リンパ球分離法: 2-a) gelatin 法: 3% gelatin 加生食液 3 ml をシリコン処理試験管に入れ, 脱フィブリン末梢血 5 ml を生食液にて 2 倍に希釈し重層, 45° に傾むけ 37°C, 30 分静置後上清を採取してリンパ球浮遊液とした。2-b) tetron fiber column 法: 再蒸留水で洗浄し, よく乾燥した tetron fiber 0.3g を 1 ml disposable 注射器の外筒に均等に充填し tetron fiber column とした。血球浮遊液 1 ml (細胞数 2 ~ 5 × 10⁵/ml) を注入し, 37°C, 60 分静置後 TCM

199 を 1 ml/min の流速で 10 分間濾過をおこない, 濾液を集める一方濾過後 column 中の tetron fiber を取り出して TCM199 10ml 中で攪拌し, 最後に fiber を絞って除き tetron fiber に附着する細胞と附着しない細胞を分離した。2-c) Conray-Ficoll 法: 33.6% Conray 400 と 9% Ficoll 溶液を 10:24 容量比の混合液に, 3 倍に希釈した heparin 加末梢血を重層し 400g, 30 分遠沈をおこない, 境界面に生じる細胞浮遊層を採取しリンパ球浮遊液とした。

3) 膜免疫蛍光法: 0.1% gelatin 加 TCM199 中に細胞数 5 ~ 6 × 10⁵/ml に調整したリンパ球浮遊液 0.1ml に, 燐酸緩衝生食液 (PBS, pH 7.2) で 10 倍希釈した FITC 標識抗ヒト免疫グロブリン家兔血清 (Behring-werke 社製) 0.1ml を加え 0°C, 30 分反応後, PBS にて 3 回洗浄, 600g にて遠沈を繰り返えし, 無蛍光 glycerin 加 PBS に浮遊させ, この一滴をスライドグラスに載せ, カバーグラスで被い, パラフィンで包埋した。観察は NIKON 蛍光顕微鏡 (一次フィルター OB, OU, 二次フィルター No 1, UV および BV 励起法) にておこない, 膜蛍光陽性細胞; SIBC と陰性細胞; non SIBC を区別した。

4) freeze-etching 法: 分離したリンパ球は TCM 199 に浮遊させ 37°C, 30 分静置後, 2.5% glutaraldehyde PBS にて 0°C, 60 分固定をおこない, 30% glycerol 生食液に浮遊させ 0°C, 10 ~ 15 時間静置したものを試料とした。リンパ節は採取直後に直方体 (1.5 × 1.5 × 5.0mm) に細切し, 0°C, 4 時間 glutaraldehyde 固定をおこない, 次いで 30% glycerol 生食液に 0°C, 48 時間静置し試料とした。液体窒素であらかじめ -150°C にした液化 Freon 12 により試料を瞬間的に凍結し, Balzer 型 freeze-etching 装置 (日本電子) に挿入し, 1 × 10⁻⁵ mmHg 真空下,

-140℃にて試料の破断 (fracture) をおこない、-100℃にて60秒間氷の昇華 (etching) をおこなった。この試料の破断面に Platinum-carbon 膜を蒸着し、さらに carbon 蒸着で補強して replica 膜を作成し、これを次亜塩素酸ソーダ溶液中で試料より分離し、蒸留水にて数回洗浄後、電子顕微鏡用 grid (300mesh) に採取した。観察は TEM-7 透過型電子顕微鏡にておこない、撮影した電子顕微鏡写真を印画紙に焼付けて freeze-etching 像とした (図 1)。

3) 成 績

1) gelatin 法による末梢血よりのリンパ球分離で

図 1 Schema of Freeze-etched Lymphocyte

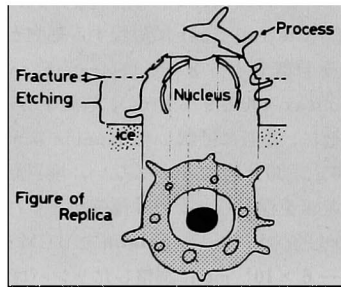
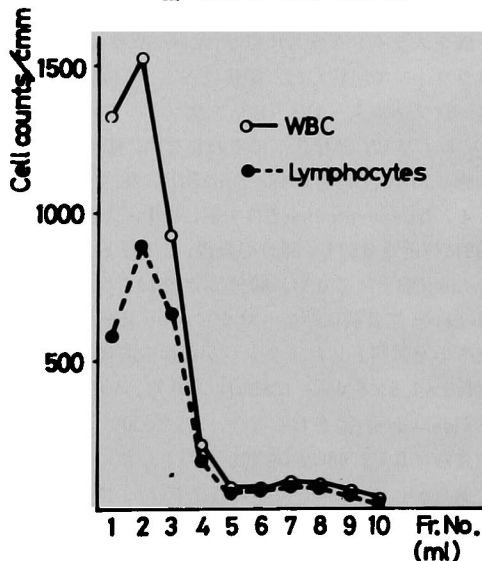


図 2 Fractionation of lymphocytes in tetron fiber column



は採血量20mlより平均 7.5×10^6 コのリンパ球が、平均85.3%の純度でえられ、その viability は98%以上であった。リンパ球の純度には変動が大きく、混入する細胞としては好中球10~30%、単球5~10%であり赤血球は $2 \sim 7 \times 10^6$ コとリンパ球と同数程度までの混入が認められた。

2) gelatin 法でえられたリンパ球浮遊液の純度を高める目的で、tetron fiber column 法をおこなった (図 2)。濾液量はリンパ球流出が止まる10mlまでとした。濾過前の平均リンパ球純度85.3%は濾過後平均85.8%と純度に変化は認められなかった。さらにリンパ球実数の比較では濾過後は濾過前の44.1%に減少し、約半数のリンパ球が fiber column 中に残留し流出しないことが判明した。

3) 被検血液 2 ml には平均 3.14×10^6 コのリンパ球

表 1a COMPARISON OF LYMPHOCYTES COUNT IN Lo, Lc & Lf

Exper. No.	1	2	3	4	5	6
Lo	11.1	12.9	15.3	13.0	15.2	17.9
Lc	2.7	4.7	5.4	5.1	7.6	7.8
Lf	2.6	4.1	4.4	2.0	1.9	3.1

($\times 10^6$)

表 1b COMPAPISON OF SIBC IN Lo, Lc & Lf

Exper. No.	1	2	3	4	5	6
Lo	18.3%	16.9	25.1	15.7	13.6	17.3
Lc	22.7	25.0	21.5	13.2	22.8	33.6
Lf	4.2	12.2	4.7	8.3	6.3	6.5

Abbreviation: Lo; original lymphocytes
Lc; lymphocytes retained in column
Lf; filtrated lymphocytes

が存在するが、Conray-Ficoll 比重遠沈法により回収されるリンパ球は平均 2.8×10^6 コ、リンパ球純度は平均91.3%、viability は98%以上で平均回収率は89.6%であった。

4) Conray-Ficoll 法で分離したリンパ球 (Lo) を tetron fiber column 法により、fiber に附着せず濾液中に出現するリンパ球 (Lf) と濾過後 fiber を TCM 199 で洗浄し遊出してくるリンパ球 (Lc) に分けた (表 1 a)。平均 14.2×10^4 コの Lo を100%とすると Lf で平均 3.14×10^4 コ、22%、Lc で平均 5.8×10^4 コ、41%となり、fiber には最終的に Lo の約37%が附着したまま残留した。さらに膜免疫蛍光法により SIBC を算出し、tetron fiber column 濾過の SIBC

に及ぼす影響を検討した(表1b)。Loで平均18%のSIBCが、Lfで平均7.0%と減少し、Lcでは23%と増加が認められた。実数においてはLoで平均 2.5×10^4 コのSIBCが、Lfで平均 0.22×10^4 コと著明に減少し、Lcでは平均 1.1×10^4 コとLoに比べて減少していたがLfよりは多くのSIBCが存在した。

5) Conray-Ficoll法で分離したリンパ球のSIBC, non SIBCを螢光顕微鏡(一次フィルターOB, 二次フィルターNo1, BV励起)で区別し、一次フィルターOU, UV励起にてmicrometerを用いて直径を測定した(表2)。SIBCの直径は平均 14.5μ , non SIBCの直径は平均 12.6μ とSIBCはnon SIBCより大きい直径を有し、直径 16μ 以上のリンパ球では82%以上がSIBC, 直径 10μ 以下では80%がnon SIBCであった。

6) ALL 2例, CLL 3例の末梢血よりConray-Ficoll法によりリンパ球を分離し膜免疫螢光法を用いてSIBCを算出した。分離したリンパ球は塗抹標本(May-Grünwalds-Giemsa染色)の観察によりALLは大部分リンパ芽球からなり, CLLはいずれも成熟小リンパ球様の細胞のみであった。SIBCはALLで0%, 3.1%といずれも低率であり, CLLでは64.3%, 98.0%, 7.8%と症例により著しい差が認められた。

7) freeze-etching法によりリンパ球膜構築の検討をおこなった。

7-a) 健康人末梢血リンパ球のfreeze-etching像ではリンパ球膜面に長短, 大小さまざまな突起が平滑な膜面に存在し, 膜面に突起密度の大きいリンパ球(写真1)と小さいリンパ球(写真2)が区別された。各々のリンパ球における突起の平均直径と密度を計測し比較した(図3)。しかし密度と直径の間には一定の関係は認められなかった。突起密度と直径の分布を各々 histogramを用いて現わした(表3)。突起直径は $1000 \sim 3000 \text{ \AA}$ の頻度が最も多く, 平均直径は $2145 \pm 992 \text{ \AA}$ であった。一方突起密度は $0 \sim 2 / \mu^2$ のリンパ球が最も多く, ついで $3 \sim 5 / \mu^2$ の密度に多い二峰性の分布を示していた。リンパ球全体の平均突起密度は $2.1 \pm 1.2 / \mu^2$ であった。突起密度を $3 / \mu^2$ 未満と $3 / \mu^2$ 以上のリンパ球に分けた場合, 前者では直径 $2254 \pm 996 \text{ \AA}$ の突起が $1.2 \pm 0.7 / \mu^2$ の密度に, 後者では直径 $2185 \pm 990 \text{ \AA}$ の突起が $3.9 \pm 0.6 / \mu^2$ の密度に存在した。また各々のリンパ球の占める割合はそれぞれ71%, 29%であった。

7-b) tetron fiber column法により分別したLf,

表2 Diameter of SIBC and non SIBC

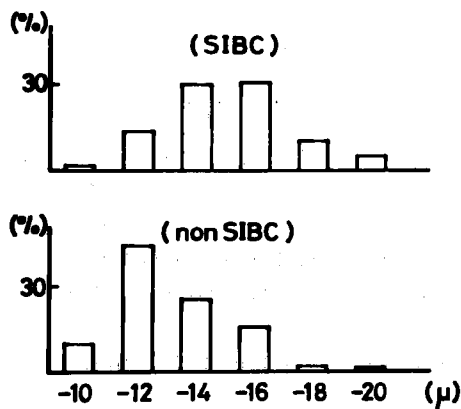


図3 Correlation of Diameter and Density of Lymphocyte Process

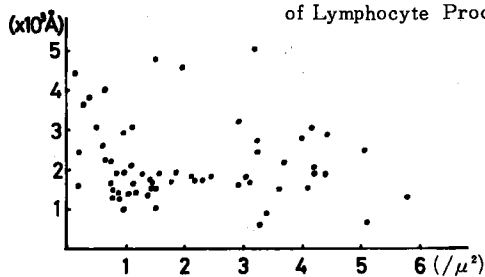
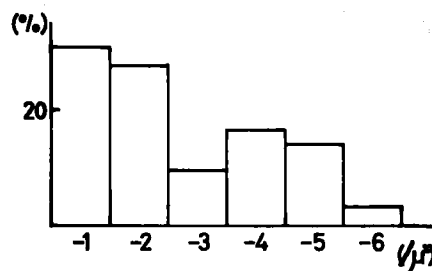
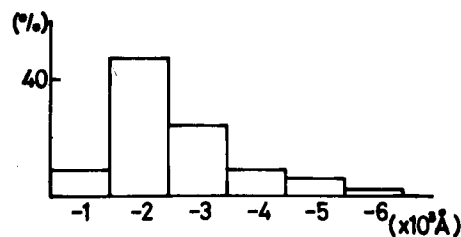


表3 Distribution of Process Density



Distribution of Process Diameter



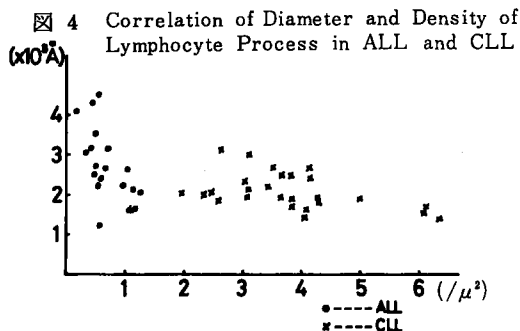
Lc の freeze-etching 像 (写真 3, 4) では Lf に表面平滑で突起の少ないリンパ球が多く, Lc には比較的突起の多いリンパ球が存在した. $3/\mu^2$ 以上の突起密度を有するリンパ球は Lf で 7.0%, Lc では 21.3% と, 突起密度 $3/\mu^2$ 以上のリンパ球は tetron fiber column 濾過により減少した.

7-c) 胃潰瘍患者腹腔内リンパ節の freeze-etching 像 (写真 5) では密集し相接するリンパ球群が認められたが, その膜表面は大部分平滑であり, 観察しえたリンパ球の 3% にのみ突起が平均 $0.7/\mu^2$ の密度に認められた.

7-d) ALL 患者末梢血リンパ球 (SIBC: 3.1%) の freeze-etching 像 (写真 6) では平滑な, あるいは波状を呈する膜面に小数の突起を有するリンパ球が認められた. この突起は直径 $2140 \pm 715 \text{ \AA}$ であり, 密度 $1.0 \pm 0.2/\mu^2$ であった.

7-e) CLL 患者末梢血リンパ球 (SIBC: 65.4%) の freeze-etching 像 (写真 7) では, ALL に比較して膜面に多くの突起を有しており, その密度はリンパ球によって差があり, 膜構築は均一ではなかった. この突起は直径 $2060 \pm 490 \text{ \AA}$ であり, 密度 $3.7 \pm 1.2/\mu^2$ であった.

7-f) ALL と CLL のリンパ球膜構築において, 突起の直径と密度の相関を検討すると共にそれらの分布を比較した (図 4). ALL の突起は直径と密度



の間に相関はなく, 密度は $0.2 \sim 1.3/\mu^2$ の狭い範囲に分布しているのに対し, 直径は $1000 \sim 4500 \text{ \AA}$ と広い範囲に分布していた. 一方 CLL の突起においても直径と密度の間に相関は認められず, 密度は $1.9 \sim 6.4/\mu^2$ と広い範囲に分布しているのに対し, 直径は $1500 \sim 3000 \text{ \AA}$ と ALL に比較してやや狭い範囲に分布していた. 健康人のリンパ球においておこな

たと同様に突起密度を $3/\mu^2$ で区切ると, $3/\mu^2$ 以上の突起密度を示すリンパ球は ALL で 0%, CLL では 72% であり, $3/\mu^2$ 未満のリンパ球はそれぞれ 100%, 28% であった.

7-g) リンパ球の freeze-etching に際して, 細胞膜表面と共に胞体内, 核表面を露出しているリンパ球において核膜構築を検討した. 健康人リンパ球核膜の freeze-etching 像 (写真 10) では, 核孔と共に核膜が細胞質に接する外膜と共に核膜が細胞膜に接する外膜と, 核内部に接する内膜の二層の膜構築を呈していた. いずれの核膜面にも小粒子が存在しており, 核孔は二層の核膜を貫通する孔として認められた. 健康人リンパ球において核孔と核膜面の小粒子各々の直径と密度を計測した. 核孔は直径 $943 \pm 114 \text{ \AA}$ であり, $4.4 \sim 7.2/\mu^2$ の密度に存在した. 核外膜には直径 $113 \pm 45 \text{ \AA}$ の小粒子が $1875 \pm 320/\mu^2$ の密度に存在し, 内膜には直径 $112 \pm 42 \text{ \AA}$ の小粒子が $1683 \pm 205/\mu^2$ の密度に存在していた.

ALL のリンパ球核膜の freeze-etching 像 (写真 11) では直径 $977 \pm 230 \text{ \AA}$ の核孔が $4.4 \pm 1.2/\mu^2$ の密度に存在し, 外膜面には直径 $149 \pm 53 \text{ \AA}$ の小粒子が $1317 \pm 334/\mu^2$ の密度に, 内膜面には直径 $129 \pm 41 \text{ \AA}$ の小粒子が $1232 \pm 360/\mu^2$ の密度に分布しており, 核孔密度がやや少ない傾向であった.

CLL のリンパ球核膜の freeze-etching 像 (写真 12) では直径 $613 \pm 119 \text{ \AA}$ の核孔が $4.6 \pm 1.5/\mu^2$ の密度に存在し, 健康人, ALL に比較してやや小さな直径であった. 外膜面には直径 $120 \pm 43 \text{ \AA}$ の小粒子が $1225 \pm 255/\mu^2$ の密度に, 内膜面には直径 $97 \pm 37 \text{ \AA}$ の小粒子が $2428 \pm 290/\mu^2$ の密度に分布しており, 核孔直径と共に小粒子直径がやや小さい傾向であった.

4) 考 案

末梢血リンパ球を膜免疫蛍光法, freeze-etching 用の材料として用いるためには, 高純度, 高回収率でしかも生物学的活性を保ったまま集める必要がある. 末梢血からのリンパ球分離法には物理的な沈降速度差^{10, 11)} glass wool¹²⁾ cotton wool¹³⁾ nylon fiber¹⁴⁾への粘着能を利用した方法が知られている. Coulson ら¹⁵⁾は gelatin を用いて赤血球沈降速度を亢進させリンパ球を 80~90%の純度で分離しようと報告している. 著者のおこなった gelatin 法では, リンパ球純度は 60~90%, 末梢血 20ml から平均 7.5×10^6 のリンパ球が回収された. リンパ球純度を高める目的でさらに tetron fiber column 濾過をおこな

たが純度の改善は認められず、かえって約56%のリンパ球が失われた。Böyum¹⁰⁾はIsopaque-Ficoll比重遠法を用い、リンパ球を純度80-90%に分離している。Conray-Ficoll比重遠沈法では末梢血2mlより純度平均90.1%, viability 98%以上のリンパ球を平均 3.6×10^6 コ分離しえた。被検末梢血2ml中には平均 3.8×10^6 コのリンパ球が存在すると計算されるので90%のリンパ球が回収されたことになる。

従来末梢血よりのリンパ球分離に際しては赤血球や好中球の混入が問題にされてきたがリンパ球のsubpopulationを検討する場合には、純度を高める種々の操作により、T細胞、B細胞の比率に変化をきたす可能性がある。Conray-Ficoll法で分離した末梢血リンパ球をtetron fiber columnで濾過すると、SIBCは濾過前に比較して濾過後著明に減少し、tetron fiberにSIBCが残留していた。Rouseら¹⁷⁾はnylon wool column¹⁸⁾を用いると、ウシ・リンパ球(SIBC 30%)がcolumn濾液中リンパ球(SIBC 2.7%)でSIBCが減少し、column中に残留するリンパ球(SIBC 73%)にSIBCが増加するという。リンパ球のfiber column濾過に際して濾過速度を規定する要因の一つにリンパ球直径の問題がある。Wilsonら¹⁹⁾は¹²⁵I標識抗ヒトImmunoglobulin血清を用いてヒト・リンパ球のSIBCを標識し、塗抹標本で直径を測定したところ、直径 7μ 以下のリンパ球にはSIBCは存在せず、 11μ 以上のリンパ球ではその80%がSIBCであると報告している。著者は蛍光顕微鏡下に浮遊状態のリンパ球直径を測定し、SIBCが平均 14.5μ 、non SIBCは平均 12.6μ と、SIBCの直径がより大きいことを確認した。この直径の差がfiber columnを通過するリンパ球のSIBC、non SIBCの分離に濾過速度、濾液量によっては関与しうると推察された。しかし今回用いたtetron fiber column濾過では、10mlの濾液でほぼリンパ球の流出が止まったことから、単にリンパ球直径に依存したフルイ効果のみではなく、膜形質としての膜表面免疫グロブリンの存在が、tetron fiberに対する粘着性を増したことに密接な関連が存在すると思われた。リンパ球の膜荷電状態と膜形質との関係について、Mehrischiら²⁰⁾はCBAマウス・リンパ球を細胞電気泳動し、泳動速度の速いリンパ球がT細胞(θ 抗原陽性)、遅いのがB細胞(マウスB細胞特異抗原陽性)に区別でき、膜表面にamino基、carboxyl基などの化学組成に明らかな差があると報告している。

形態学的に膜形質の差を追求するために、Polliackら²¹⁾は走査電子顕微鏡によりヒト・リンパ球を観察し、羊赤血球rosette形成リンパ球即ちT細胞は比較的平滑な膜面を呈し、それ以外のリンパ球は絨毛様の突起を多数有した膜面として区別され、前者80%、後者20%に存在すると報告している。この絨毛様突起の特性に関してはRayら²²⁾は逆にT細胞がB細胞よりも膜面の絨毛様突起に富んでいると報告しており、さらにHacketteら²³⁾はConray-Hypaque比重遠沈法によりヒト末梢血より分離したリンパ球を走査電子顕微鏡で観察したところ、どのリンパ球も一様に巻ヒゲ状の突起を有し、大きさについても均一なリンパ球で、羊赤血球rosette形成リンパ球と他のリンパ球の間には差を認めないと報告するなどやや混乱した成績が示されている。著者はfreeze-etching法によりglutaraldehyde固定する以外は極く自然に近い状態でConray-Ficoll比重遠沈法で分離したリンパ球膜構築の電子顕微鏡観察をおこなった。その結果、リンパ球膜上には大小、長短の突起が種々の密度で存在するが、突起密度のhistogramでは $0-2/\mu^2$ と $3-5/\mu^2$ を中心に二峰性の分布を示した。突起密度をそれぞれの最頻値の中間 $3/\mu^2$ で区切ったところ、 $3/\mu^2$ 未満のリンパ球が71%、 $3/\mu^2$ 以上のリンパ球が29%であった。同一検体の膜免疫蛍光法によるnon SIBCが82%、SIBCが18%であることからB細胞がすべてSIBCではなく²⁴⁾、補体受容体のみを膜表面に有するリンパ球がSIBCと別に存在する²⁵⁾ことが推定される。さらにtetron fiber column濾過により18%のSIBCが7.0%に減少し、これに一致して突起密度 $3/\mu^2$ 以上のリンパ球が29%から7.0%に減少したことから、この膜形質と膜構築の関連が裏付けられたと思われる。Linら²⁶⁾はヒト扁桃腺より分離したリンパ球と羊赤血球、補体感作ヒト赤血球のrosetteをそれぞれ作成し、前者をT細胞、後者をB細胞として走査電子顕微鏡で観察した。T細胞は直径 $3-4.8 \mu$ で膜表面は平滑であり、 $3/\mu^2$ 以下の密度にのみ絨毛様突起が存在するが、B細胞は直径 $4-8/\mu^2$ で、膜面には密度 $10/\mu^2$ の突起を有するリンパ球、波状の膜面を呈するリンパ球および短い突起が小数存在するリンパ球の3型に分類しうると述べている。またReyesら²⁷⁾もヒト・リンパ球をglutaraldehydeで固定後、peroxidase標識抗ヒトimmunoglobulin抗体を用いてSIBCを超薄切片法で観察し、SIBCは絨毛様突起を有し、non SIBCは平滑な膜面であ

ると述べており, freeze-etching 法による著者の成績に一致すると思われた。

Elson ら³¹⁾は Rh (D) 陽性赤血球と感作されたリンパ球の rosette 即ち B 細胞 rosette の超薄切片法による観察で, 赤血球とリンパ球の結合がリンパ球膜上の突起を介しておこなわれており, あらかじめ cytochalasin B を作用させたリンパ球膜面の突起は減少し, rosette 形成率は低下したと述べていることから形態学的に認識される膜突起と, 機能的な B 細胞との関連は密接であることが明らかである。しかし, このリンパ球膜突起が cytochalasin B で減少し, さらに観察に際して in vivo と in vitro において glutaraldehyde 固定をおこない突起密度に差を認めるなどの報告³²⁾から, この突起構築は小腸粘膜の上皮細胞に認められる刷子縁などとは異なり, リンパ球機能の発現に伴う可変的な構築の可能性がある。著者の観察したリンパ節内リンパ球の freeze-etching 像では大部分のリンパ球は平滑な膜面であり, 突起は認められなかった。流血中に存在するリンパ球が機能的に active な状態とすれば, リンパ節内のリンパ球は抗原刺激の無い条件下で機能的に inactive な状態であり, その為に突起が存在しないのではないかと推察された。また unanue ら³³⁾はマウス・リンパ球を抗マウス免疫グロブリン抗体と反応させた場合, 手鏡状の形態変化をきたしたリンパ球の鏡部分は平滑で, 柄部分は粗糙な膜面を呈することを走査電子顕微鏡で認めている。これらの事実はリンパ球膜構築の上で, 突起はリンパ球機能と表裏一体の関係にあり, 抗原刺激や環境により突起の分布, 長短, 密度が変化しうることを示唆している。

リンパ球の腫瘍性増殖を特徴とする ALL および CLL の末梢血中リンパ球は surface marker としての膜表面免疫グロブリンもしくは補体レセプターの存在, 羊赤血球結合性により ALL は T 細胞系, CLL は B 細胞系の腫瘍と推定³¹⁻³³⁾されている。著者が観察した ALL のリンパ球は 98% がリンパ芽球からなり, SIBC は 3.4% 存在していた。freeze-etching 像で膜表面の突起密度は $0.2-1.3/\mu^2$ と健康人リンパ球の non SIBC と推定したリンパ球膜突起密度と一致していた。一方 CLL のリンパ球は May-Giemsa 染色で形態的には成熟小リンパ球からなり SIBC は 64.3% に増加していた。このリンパ球膜表面の突起密度は freeze-etching 像で $1.9-6.3/\mu^2$ と広い範囲に分布していたが, ALL の突起密度

とは明らかに異なる分布 (図 3) であり, 健康人リンパ球の SIBC と推定した $3/\mu^2$ 以上の密度のリンパ球が 72% と SIBC の百分率にほぼ一致していた。Reyes ら³⁷⁾は 5 例の CLL のうち 3 例では SIBC と膜面の絨毛様突起に一致を認めているが, 2 例では平滑な膜面に免疫グロブリンの存在を認めている。さらに T 細胞系とされる Sezary 細胞³⁸⁾の膜面に一部絨毛様構造を認めるなど, 腫瘍性リンパ球では膜形質と膜構築の不一致が観察されている。また Borella ら³⁷⁾は 14 例の ALL のうち 10 例のリンパ球には膜表面免疫グロブリンも羊赤血球結合能も認めなかったと報告している。CLL においても羊赤血球 rosette 形成リンパ球が 68% の症例が報告³⁸⁾されている。著者の SIBC が 7.8% と低率の CLL の一例では同時におこなった羊赤血球ロゼット形成試験が 71% と高率であったことから T-cell CLL と考えられ, 腫瘍化したリンパ球は膜形質の分化度によっては, 従来の膜形質による T, B 細胞の区別が不可能な場合が存在することが示された。また末梢血リンパ球の約 20% が羊赤血球結合能と共に膜免疫グロブリンを合わせ持つ無 γ -グロブリン血症³⁹⁾や, 同様の double marker cell が 80-90% を占める lymphoproliferative disorder⁴⁰⁾ などがあり T, B 細胞の区別自体, 現在判明している膜受容体のみでは絶対的な指標になりえないことが推察された。

リンパ球核膜は超薄切片法でも内膜と外膜が区別され, 核孔を通じて核内と細胞質が接触している。⁴¹⁾ Freeze-etching 法による核膜の観察では健康人, ALL では核孔直径が約 1000\AA , CLL では 600\AA と小さな核孔であった。核孔密度は健康人で $4-8/\mu^2$ であり, ALL, CLL では $4-5/\mu^2$ と少ない傾向が認められた。Ruzicka ら⁴²⁾も freeze-etching 法によりリンパ球を観察し, 核孔密度の減少が CLL のリンパ球で認められたと報告しており, 腫瘍性リンパ球の代謝との関連において核孔直径, 密度の変化は重要と思われた。著者はさらに核膜の内膜と外膜面に存在する小粒子直径と密度について計測をおこなった。健康人リンパ球の核膜では内膜, 外膜ともに直径 $80-150\text{\AA}$ の小粒子が $1100-2600/\mu^2$ の密度に存在し, ALL, CLL のリンパ球との間に明らかな差は認められなかった。

5) 結 語

ヒト・リンパ球において膜形質, 特に微細膜構築を追求する目的で, 健康人, ALL および CLL 患者

末梢血よりのリンパ球分離をおこない、膜免疫蛍光法で SIBC, non SIBC を区別して tetron fiber column 法によりリンパ球の分別をし、freeze-etching 法による微細膜構築の電子顕微鏡観察をおこなった。その結果、膜表面免疫グロブリンの存在と膜表面の突起構築の間に密接な関係が認められた。即ち、突起密度 $3/\mu^2$ 以上のリンパ球が SIBC に、 $3/\mu^2$ 未満のリンパ球が non-SIBC に相当すること

が推定された。腫瘍性リンパ球である ALL と CLL のリンパ球においても同様の関係が認められた。さらに freeze-etching 法により核膜構築についても観察をおこない、健康人リンパ球核膜に比較して ALL, CLL ではやや少ない核孔密度であった。

擧筆するにあたり恩師平木潔教授の御指導、御校閲に深謝致します。

文 献

- 1) Raff, M. C.: Two distinct population of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence. *Immunol.*, **19**: 637—650, 1970.
- 2) Pernis, B., Forni, L. and Amamante, L.: Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes *J. Exp. Med.*, **132**: 1001—1018, 1970.
- 3) Rabellino, E. and Grey, H. M.: Immunoglobulin on the surface of lymphocytes. *J. Immunol.*, **106**: 1418—1420, 1971.
- 4) Basten, A., Warner, N. L., and Mandel, T.: A receptor for antibody on B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **135**: 624—627, 1972.
- 5) Lay, W. H., Mendes, N. F., Bianco, C. and Nussenzweig, V.: Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes *Nature (London)*, **230**: 531—532, 1971.
- 6) Jondal, M., Holm, G. and Wigzell, H.: Surface markers on human T and B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **136**: 207—215, 1972.
- 7) Grey, H. M., Rabellino, E. and Pirofosky, B.: Immunoglobulin on the surface of lymphocytes *J. Clin. Invest.*, **50**: 2368—2375, 1971.
- 8) Nussenzweig, V., Bianco, C., Dukor, P. and Eden, A.: Receptor for C 3 on B lymphocytes: possible role in the immune response. *Progress in immunology (first international congress on immunology, Washington D. C. 1971)* ed. Amos. B., Academic Press, New York, p 73—82, 1971.
- 9) Moor, H. and Muhlethaler, K.: Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell. Biol.*, **17**: 609—628, 1963.
- 10) Jago, M.: A simple method for the separation of living lymphocytes from normal human blood. *Brit. J. Haemat.*, **2**: 439—442, 1956.
- 11) Skoog, W. A. and Beck, W. S.: Studies of the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin method of isolating lymphocytes *Blood*, **11**: 436—438, 1956.
- 12) Brandt, L., Borjeson, J., Norden, A and Olsson, I.: Separation of lymphocytes from peripheral blood by means of a glass wool column. *Acta Med. Scand.*, **172**: 459—462, 1962.
- 13) Czerski, P., Szmigieski, S. and Litwin, J.: Simple methods for obtaining purified suspensions of lymphocytes *Vox. Sang.*, **11**: 734—737, 1966.
- 14) 宮本宏, 辻公美, 小崎正己, 吉岡孝明, 岩橋一, 伊藤元明, 照屋進, 猪木洋三, 渡久地政夫, 早田義博: ナイロンカラムを用いてのヒト末梢血よりのリンパ球採取法. *医学のあゆみ*, **62**: 882—884, 1967.
- 15) Coulson, A. S. and Chalmers, D. G.: Separation of viable lymphocytes from human blood. *Lancet*, **1**: 468—469, 1964.

- 16) Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocyte from human blood. isolation of mononuclear cells by one centrifugation and sedimentation at lg. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21** : (supple 97) 77—88, 1968.
- 17) Rouse, B.T. and Babiuk, L.A.: Host responses to infectious bovine rhinotracheitis virus. III. isolation and immunologic activities of bovine T lymphocytes *J. Immunol.*, **113** : 1391—1398, 1974.
- 18) Julius, M.H., Simpson, E. and Herzenberg, L.A.: A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3** : 645—649, 1973.
- 19) Wilson, J.D. and Nossal, G.J.V.: Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*, **2** : 788—791, 1971.
- 20) Mehrishi, J.N. and Zeiller, K.: T and B lymphocytes: striking differences in surface membranes. *Brit. Med. J.*, **1** : 360—362, 1974.
- 21) Polliak, A., Lampen, N., Clarkson, B.D. and DE Harven, E.: Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy. *J. Exp. Med.*, **138** : 607—624, 1973.
- 22) Kay, M.M., Belohradsky, B., Yee, K., Vogel, J., Butcher, D., Wybran, J. and Fudenberg, H.H.: Scanning electron microscopy of human thymus-derived rosette forming lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopath.*, **2** : 301—310, 1974.
- 23) Hackette, A.J., Springer, E.L. and Byers, V.: The surface topography of human peripheral blood lymphocytes. (Abstracts fourteenth Annual Meeting American Society for Cell Biology, 253.) *J. Cell Biol.*, **63** : 127, 1974.
- 24) Lamelin, J-P., Lisowska-Bernstein, B., Matter, A., Ryser, J.E. and Vassalli, P.: Mouse thymus independent and thymus derived lymphoid cells. I. immunofluorescent and functional studies. *J. Exp. Med.*, **136** : 984—1007, 1972.
- 25) Ross, G.D., Rabellino, E.M., Piley, M.J. and Grey, H.M.: Combined studies of complement receptors and surface immunoglobulin-bearing cells and sheep erythrocytes rosette-forming cells in normal and leukemic human lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **52** : 377—385, 1973.
- 26) Lin, P.S., Cooper, A.G. and Wortis, H.H.: Scanning electron microscopy of human T-cell and B-cell rosettes. *New Eng. J. Med.*, **289** : 548—551, 1973.
- 27) Reyes, F., Lejonc, J.L., Gourdin, M.F., Mannoni, P. and Dryfus, B.: The surface morphology of human B lymphocytes as revealed by immunoelectron microscopy. *J. Exp. Med.*, **141** : 392—410, 1975.
- 28) Elson, C.J., Bradley, J. and Howells, R.E.: The mechanism of rosette formation between Rh(D) positive erythrocytes and peripheral blood lymphocytes from Rh immunized individuals. the role of surface micro-projections. *Immunol.*, **22** : 1075—1086, 1972.
- 29) Orenstein, J.M. and Shelton, E.: Comparison of surface characteristics of macrophage, lymphocyte and mast cell in situ and in vitro. (Abstracts fourteenth Annual Meeting American Society for Cell Biology,) *J. Cell Biol.*, **63** : 252, 1974.
- 30) Unanue, E.R. and Karnovsky, M.J.: Ligand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. *J. Exp. Med.*, **140** : 1207—1220, 1974.
- 31) Cohnen, G., Kornig, E., Augener, W., Brittinger, G. and Douglass, S.D.: Lymphocytes population in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*, **1** : 259—260, 1973.
- 32) Stathopoulos, G. and Elliot, E.V.: Formation of mouse or sheep red blood cell rosettes by lymphocytes from normal and leukemic individual. *Lancet*, **1** : 600—601, 1974.
- 33) Haegert, D.G., Hallberg, T. and Coombs, R.R.A.: B and T lymphocyte subpopulation in human peripheral blood. *Int. Arch. Allergy*, **46** : 525—538, 1974.

- 34) Borella, L. and Sen, L.: T-cell surface markers on lymphoblasts from acute lymphocytic leukemia. *J. Immunol.*, **111**: 1257—1260, 1973.
- 35) Minowada, J., Han, T. and Ohnuma, T.: Identification of T- and B-lymphocytes in human lymphatic leukemia. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **14**: 81—, 1973.
- 36) Brouet, J. C., Frandrin, G. and Seligmann, M.: Identifications for the thymus derived nature of the proliferating cells in six patients with Sezary syndrome. *New Eng. J. Med.*, **289**: 341—345, 1973.
- 37) Borella, L. and Sen, L.: T- and B-lymphocytes and lymphoblasts in untreated acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, **34**: 646—654, 1974.
- 38) Sumiya, M., Mizoguchi, H., Kosaka, K., Miura, Y., Takaku, F. and Yata, J.: Chronic lymphocytic leukemia of T-cell origin? *Lancet*, **2**: 910, 1973.
- 39) Dicker, H. B., Adkinson, N. F. and Terry, W. D.: Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes both B- and T-cell markers. *Nature*, **247**: 213—215, 1974.
- 40) Sandilands, G. P., Gray, K., Cooney, A., Brouning, J. D., Grant, R. M., and Anderson, J. R.: Lymphocytes with T and B cell properties in a lymphoproliferative disorders. *Lancet*, **1**: 903—904, 1974.
- 41) Fawcett, D. W.: "An atlas of fine structure," The cell, its organelle and inclusion. W. B. Saunders company, Philadelphia and London 1966. pp 2—48.
- 42) Ruzicka, F., Huhn, D. and Steidle, C.: Lymphozyten-membrane in Gefrieratzbild. *Blut*, **28**, : 131—135, 1974.

Studies on membrane architecture of blood corpuscles
Part II: Ultrastructural study of freeze-etched lymphocyte membranes
by
Shinya TADA

The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Okayama University

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Depending on the surface immunoglobulin of the lymphocyte membrane, lymphocyte has been classified either as a surface immunoglobulin bearing cell (SIBC) or a non-SIBC.

An ultrastructural approach of the freeze-etched lymphocyte membranes of normal subjects revealed the existence of micro-processes and small particles on its surface. The density of micro-processes on the lymphocyte membrane was distributed in the range from 0.3 to $6.8/\mu^2$, and its histogram showed two peaks at 0-1 and 3-4/ μ^2 .

The lymphocytes of normal subjects, in whom SIBC was in 18 percent, were freeze-etched, and 28 percent of the lymphocytes showed higher density of micro-processes more than $3/\mu^2$. After the filtration of the lymphocytes through a tetron fiber column, the percentages of both SIBC and the lymphocytes showing the micro-processes more than $3/\mu^2$ were decreased simultaneously.

In acute and chronic lymphocytic leukemias, the examination of lymphocyte subpopulations and the membrane architectures of the leukemic lymphocytes revealed the similar tendency of membrane property as observed in non-SIBC and SIBC of normal subjects.

写真説明

矢印は shadowing の方向を示す。

- 写真1：健康人末梢血中の膜表面に突起密度の大きいリンパ球の freeze-etching 像 (X 14500)
- 写真2：健康人末梢血中の膜表面に突起密度の小さいリンパ球の freeze-etching 像 (X 17400)
- 写真3：健康人末梢血中リンパ球において、tetron fiber column 濾過後、濾液中に出現するリンパ球の freeze-etching 像 (X 9300)
- 写真4：健康人末梢血中リンパ球において、tetron fiber column 濾過後、column 中に残留するリンパ球の freeze-etching 像 (X 15000)
- 写真5：胃潰瘍患者腹腔内リンパ節の freeze-etching 像 (N：nucleus) (X 5300)
- 写真6：ALL 患者末梢血リンパ球の freeze-etching 像 (N：nucleus) (X 6700)
- 写真7：CLL 患者末梢血リンパ球の freeze-etching 像 (N：nucleus, C：cytoplasm) (X 18000)
- 写真8：健康人リンパ球核膜の freeze-etching 像 (N：nucleus, I.M.：inner membrane, O.M：outer membrane) (X 23000)
- 写真9：ALL 患者末梢血リンパ球核膜の freeze-etching 像 (X 42000)
- 写真10：CLL 患者末梢血リンパ球核膜の freeze-etching 像 (X 25000)

多田 慎也論文附図



写真 1



写真 2

多田 慎也論文附図



写真3



写真4

多田 慎也論文附図



写真5

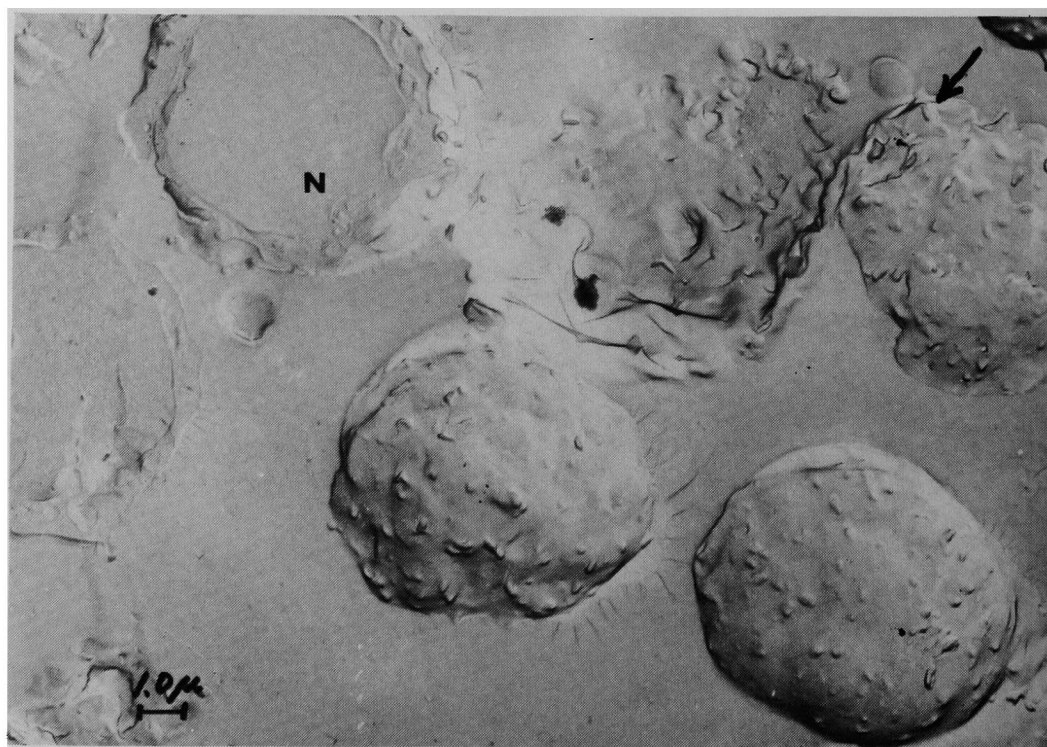


写真6

多田 慎也論文附図



写真7

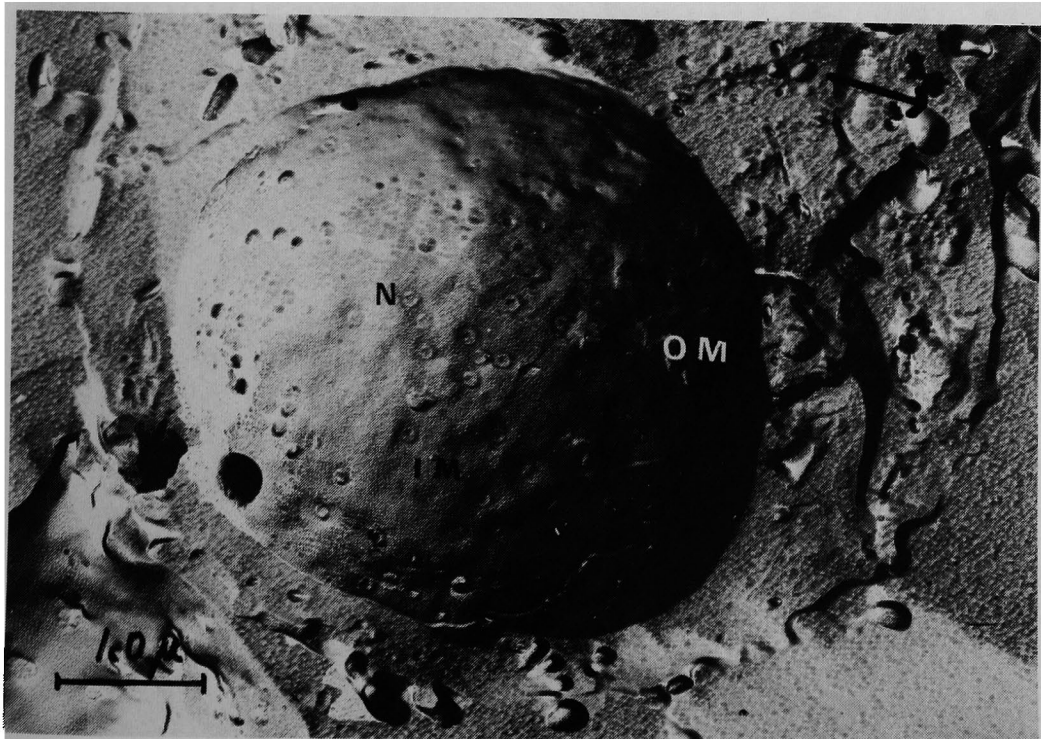


写真8

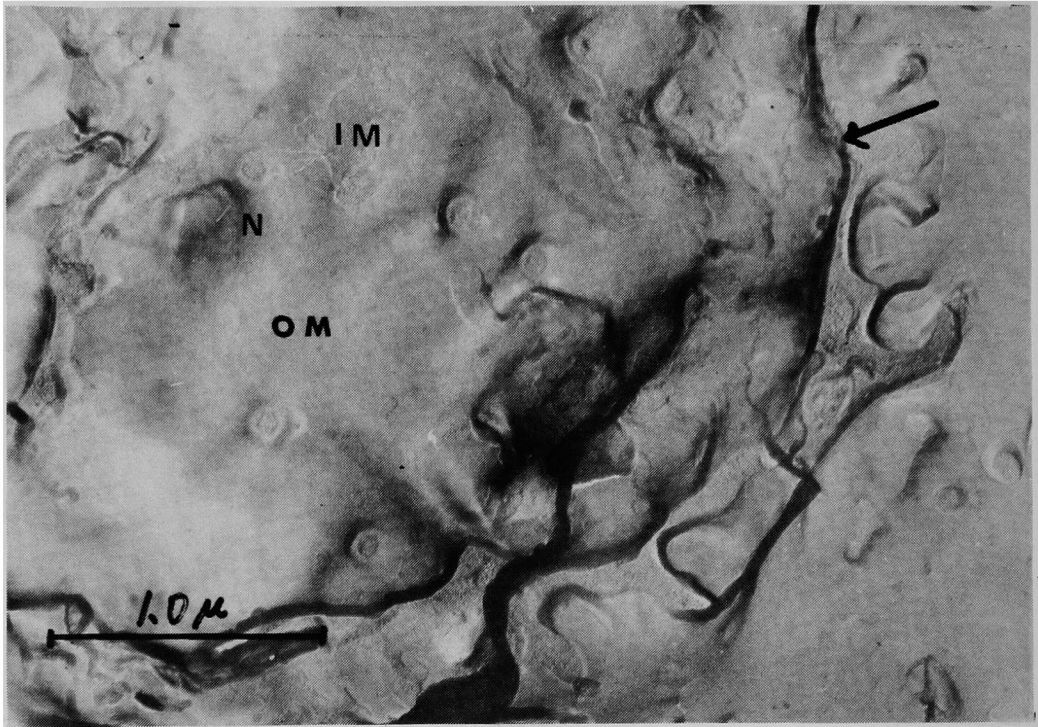


写真9

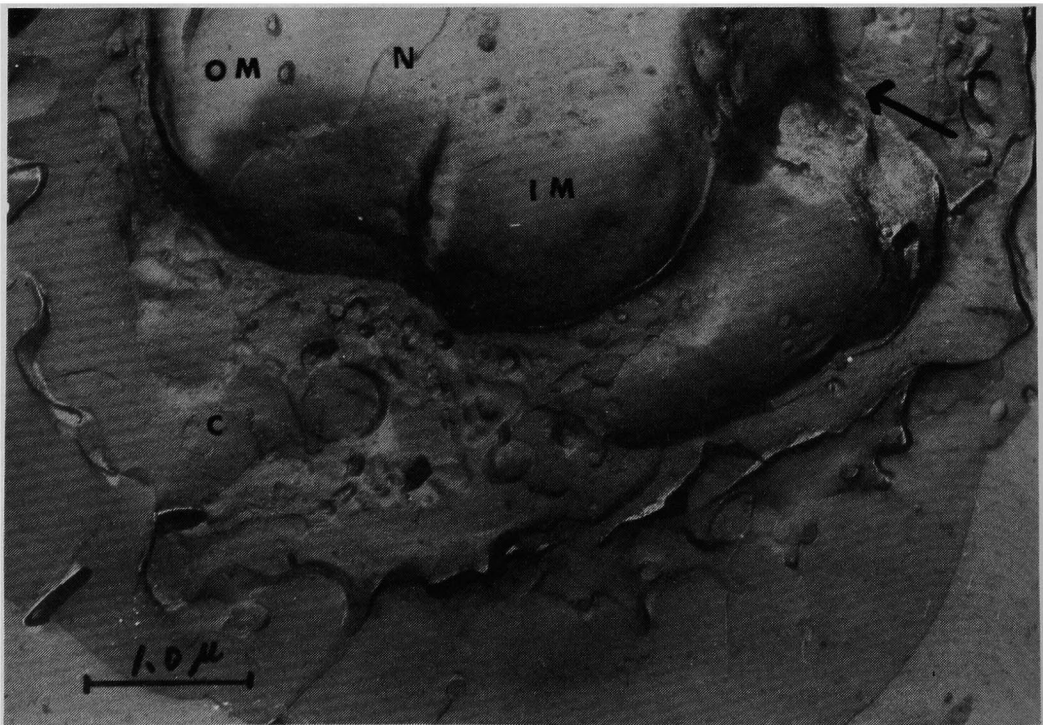


写真10