

## アレルギー性炎発現の機構に関する細胞学的研究

## 第 3 編

## 感作家兔腹腔単球に対する抗原の作用に関する電子顕微鏡的観察

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾左知丸教授)

専攻生 林 弘

〔昭和34年1月28日受稿〕

此の研究は文部省科学研究費の補助を受けた。

## 結 言

第1編<sup>1)</sup>に於いて感作家兔からの腹腔単球が抗原と接触する場合に細胞の急激な膨化, 超生体染色々素の拡散及び擬足の退縮等を報告した。此の様な細胞変化は細胞膜の障碍による透過性の亢進に伴う細胞外液の細胞内流入によるものと考えた。

第2編<sup>2)</sup>に於いては顕微分光測光法により, 直接個々の細胞内に入っている色素量を定量して実際の程度の膜透過性の変化が起るかを観察し, 細胞はその直径を約2.2~2.8 $\mu$ 増し, 色素の透過性は約1.71~2.22倍増加する事を示した。此の様な変化は当然細胞内小器管の破壊とそれに伴う分解酵素の活性化を起すであろう事が想像される。

本編に於いては, 之等腹腔単球の細胞内小器管が抗原の作用により, どの様な変化を起すかを電子顕微鏡的に観察した結果について報告する。

## 実験材料並びに実験方法

実験材料は成熟家兔を用い, 牛血清を3cc宛隔日に5回皮下又は腹腔内に注射して感作し, 最後の注射から2~4週間の間の腹腔単球を使用した。此の期間の腹水抗体価は2<sup>2</sup>~2<sup>4</sup>であった。

之等の家兔から得られた腹水は3本の小試験管に分け, 1部はそのまま, 二つは超生体染色を施し, それ等の各々について抗原を作用させた前後の標本を作った。超生体染色には0.1%中性赤及び0.1%ヤーヌス緑Bの各ハンクス溶液を家兔腹水と等量加えて約15分間37°C 孵卵器中にて超生体染色した。感作家兔腹水の採取, 超生体染色法は第1編<sup>1)</sup>に述べたと同様である。無処置のもの, 或は超生体染色したもの, 或は

又, 之等に抗原を作用させたものは夫々遠心沈澱して細胞を集め, 東<sup>3)</sup> Epstein<sup>4)</sup> Poter<sup>5)</sup> 等<sup>6)</sup>の方法を改良して, 1%オスミウム酸液で15分間固定した。固定後はハンクス氏溶液で洗滌し余分のオスミウム酸液を除いた後, 70, 80, 90, 95, 100, 100%の酒精にて順次5分宛作用させて脱水, 次いでメタクリレート・モノマアルコール(等量混合液)モノマー各5分処理後メタクリル樹脂に包埋した。

超生体染色々素は酒精に溶解するから操作は出来るだけ速に行い, 脱水後光学顕微鏡で色素顆粒の残っている事を確かめた後包埋した。重合には2% Benzoylperoxide を加えたモノマーを使用し, 約1時間前より45°Cで半重合状態にしたものの中に投入, 45°C, 24~36時間で包埋を完了, 超薄切片製作には島津マイクローム(Type K)を使い200Å程度に切り切片はユロチウム膜に貼り, 電子顕微鏡は明石AU50型を使用した。

## 実 験 結 果

正常家兔腹腔単球の電子顕微鏡像は諸家<sup>7)~10)</sup>の報告の如く, 細胞膜は薄く一層にして周囲に細長い擬足を有している。細胞質内には略々円形乃至楕円形のミトコンドリアを認める。(Fig.1.)之等は二層の膜とクリステを有する事が認められる。小胞体は胞状を示し, Parade顆粒は明瞭ではない。(Fig.2.)細胞質内には1~2個乃至数個の種々の大きさの空胞を認めるものが多い。之れは食胞に相当するものであろう。核は不規則な彎入を示すが切片の切り方に依つて楕円形或は多核状に現われることもある。核膜は二層からなり核質は緻密である。

0.05%中性赤で超生体染色した腹腔単球に於いても、或は又ヤーヌス緑の場合に於いても共に細胞質の突起の状態に変化はない。(Fig. 3, 4) 中性赤の時には細胞質に空胞が見られる事が多い様であるが、常に見られる現象ではない。ヤーヌス緑染色の場合はミトコンドリアの中に所々空胞形成を認めるが、之は教室の中本<sup>20)</sup>が示している様にヤーヌス緑で染つたミトコンドリアから色素の脱出した像と理解される。ゴルジ装置には両者共変化はない。核にはヤーヌス緑超生体染色の場合は時にクロマチンの凝集を思わせる像がある。之等の所見を通じて言えた事は超生体染色によつて細胞は全体として大した障害を未だ受けて居らず擬足の運動も保たれ、又細胞質構造も全体として乱れてはいないと言う事である。

次に細胞に抗原を作用させた場合を観察すると細胞の膨化が著明に認められる。(Fig. 5.) 之等膨化した細胞は原形質突起を失い、表面は平坦となりその上に空胞状になつた擬足の膨化しているものを附着しているものもある。細胞質内は非常に構造が疎になり水分の浸入した事を示している。この様な変化と共にミトコンドリアは膨化し円形となり、そのクリステも破壊されている。(Fig. 6) この様な変化は超生体染色細胞にも全く同様に認められる。(Fig. 7, 8) 従つて細胞が抗原と接した場合に起る色素の細胞内拡散はミトコンドリアの完全な破壊ではなく膜を残して内部の成分が外部へ漏出した事を示している。細胞質の変化を尙些細に観察すると、小胞体が著しく膨化して、あるものではその構造が不鮮明になつていものが見られる。又あるものでは、その形が不鮮明となり均等な物質に迄とけてゆく様な像が認められる。ヤーヌス緑で染色したものでは、中性赤で染色したものに比し、ミトコンドリアの膨化は弱く小胞体も膨化したものが再び凝集する様な傾向が認められる。(Fig. 9) 中性赤で染めたものは、その壊れ方が寧ろ無染色の細胞に抗原を作用させた場合に非常によく似ている。(Fig. 10) この様な像から見るとヤーヌス緑は抗原抗体反応によつて壊れた細胞質のミトコンドリア以外の構造に親和性をもつてくる様になると思われると同時にミトコンドリアは予め超生体染色されていると抗原抗体反応に依る膨化をある程度まぬかれる様である。

### 考 按

感作された家兎の腹腔単球が抗原に接触すると、急激に膨化してその体積を増し、予め細胞を超生体染色しておくと同様に色素の細胞内拡散が起る事は第1編に於いて述べた通りであり、之れは細胞が先ず

抗原を表面に吸着してその膜の透過性が亢進し外液から親水性イオン  $\text{Na}^+$   $\text{Cl}^-$  等が細胞内に浸入して之れに伴つて水が細胞内に浸入し細胞内のイオン環境が急激に変化し、諸種酵素の活性化による自家融解と分解産物の細胞外への游出が原因であると結論したが、電子顕微鏡により同様の実験を観察した結果は位相差顕微鏡所見と同様に感作家兎腹腔単球は抗原との接触によつて膨化、球形化し擬足は失われて表面が平滑になり、又、屢々擬足そのものが細胞の表面に球状の囊として認められる様になる事が明らかにされた。又細胞内では、ミトコンドリアは膨化して、そのクリステが破壊され小胞体も膨化して不明瞭になる傾向が認められた。中性赤で超生体染色していてもこの変化には殆んど変りがなく、色素が反応と同時に胞体内に拡るのは小胞体の破壊によつて、その限局化が失われるものと考えられる。教室の中本<sup>21)</sup> 其他<sup>22)</sup> が示している様に中性赤は細胞の特別の小器管に親和性をもつ様な色素ではなくして、只喰細胞の喰喰現象と同じ様な過程で細胞質内に入つていので、その抗原抗体反応と同時に起る色素の拡散は細胞質構造の破壊によると考える外なく、又これが細胞質内に拡がっても別に特別な物質と結合して凝集を起す様な性質のものではない。然るに一方ヤーヌス緑は中本等<sup>23)~25)</sup> の示す如くミトコンドリアに特別の親和性をもつており、これで超生体染色した細胞が抗原に会つた場合に起る変化は中性赤の場合と著しく異なる。即ち、ミトコンドリアの膨化はそれ程強く起らない。この事は既に超生体染色により、その中の分子排列に一定の変化が起つていて、これが細胞質の抗原抗体反応にあまり影響を受けない様な状態になつていものと考えられる。光学顕微鏡で見ると色素は中性赤の時と同じ様に抗原の作用によつて細胞質内に拡散するのであるから、この場合は中性赤の時と異り、抗原抗体反応によつて細胞質成分のヤーヌス緑親和性が変化した事を示すものかも知れない。中性赤の場合と異り細胞質に可成り著明な凝集が起つている事は此の事を示している様に思われる。この事は多分に抗原抗体反応により、リボプロテインその他の分子排列に変化が起る事を示唆する。前に報告した様に、此の様な反応が之れに引続いて起るアレルギー性炎を惹起する細胞障害の一つの特質であるかも知れないし、又急激な分解酵素の活性化に関連している様に思われる。

### 総 括

感作家兎腹腔単球に抗原を作用させると、細胞の膨化、擬足の退縮、ミトコンドリア、小胞体の膨化が認

められる。細胞を予め超生体染色しておいた場合で中性赤の場合は、無染色の場合と殆んどその変化に変わりはないが、ヤーマス緑で超生体染色してある場合には、ミトコンドリアの膨化が無染色の場合程強く起らず、又細胞質の凝集が可成り著明に起る。この事は反応と同時にミトコンドリア以外の細胞質のヤーマス緑親和性が亢進した為と考えられ、小胞体の膨化崩解

と共に、その分子排列に変化を来した結果と考えられる。

稿を終えるに臨み、終始御懇切な御指導と御校閲を賜つた恩師妹尾左知丸教授に深甚の謝意を表します。併せて不断の御教示を忝うせし本病理学教室小田啄三助教授並に教室員各位に深謝します。

## 文

## 献

- 1) 著者：第1編
- 2) 著者：第2編
- 3) 東昇：生物組織及び微生物乃至遊離細胞の電子顕微鏡用超薄切片を作る最も新しい方法，*Virus* 6, 1, 昭31.
- 4) Epstein, M. A., : The fine structure of the cell in mouse Sarcom 37 astitic fluid. *Tb-bc*, 4, 567, 1957.
- 5) Poter, K. R., and Kallman, F. L., : The properties and effects of Osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. *Exper. Cell. Reserch.*, 4, 127, 1953.
- 6) Hillier, J., Mudd, S., Smith, A. G., and Beutner, E. H., : The fixation of electron microscopic specimens by the electron beam. *G. Bact.*, 60, 641, 1950.
- 7) Palade, G. E., : The endoplasmic reticulum. *G. Bio-phys. & Biochem. Cytol.*, 2, 4, (Suppl.), 85, 1956.
- 8) 東昇：電子顕微鏡による超微細構造の研究，*綜合臨床*，7，8.
- 9) 滝川清治：電子顕微鏡学的に見た血液学，*綜合臨床*，7，8.
- 10) 山田英智：細胞の微細構造について，*福岡医学会誌*，47, 1292,
- 11) 渡辺陽之輔：血球の電子顕微鏡的観察，*日本血液学会誌*，19, 4,
- 12) 土肥清一，花岡正男，天野重安：形質細胞の電子顕微鏡的微細構造について，*日本血液学会誌*，19, 1,
- 13) 天野重安，他：形質細胞の電子顕微鏡的微細構造について，小胞体，コルチ体，中心小体及び染色系，*日本血液学会誌*，19, 3, 1956.
- 14) 花岡正男：ゴルチ体の細繊維構造とその発現，*細胞化学シンポジウム*，5, 71, 1957.
- 15) 妹尾左知丸，吉沢浩洋：脾細胞の凍結乾燥による電子顕微鏡学的研究，本誌，印刷中，
- 16) 妹尾左知丸，吉沢浩洋，中本孝，他：網赤血球の内部構造と網状物質について，*日本血液学会誌*，20, 311, 1957. (*Acta Haematol. Jap*)
- 17) Darton, A. J., and kahler, H. : Fine structure of hepatic, intestinal and renal cells of the mouse as revealed by electronmicroscop. *J. Natl. cancer. Inst.*, 11, 439, 1950.
- 18) Sjöstrand, F. S., : The ultrastructure of mitochondria : Symposium on fine structure of cells 16-30, 1956., at the 8th Congress of cell Biology, P. Noodhoff Ltd, Publisher-groninger-the netherland.
- 19) Watanabe, Y., : Observations of white blood cells with electron microscope. *J. electron microscop.*, 5, 46, 1957.
- 20) 中本孝：超生体染色顆粒の電子顕微鏡的研究，第1編，電子顕微鏡的研究の為の超生体染色々素固定方法並に此の方法に依るヤーマス緑顆粒の観察，本誌，印刷中。
- 21) 中本孝：超生体染色顆粒の電子顕微鏡的研究，第2編，中性赤による超生体染色顆粒の電子顕微鏡的研究，本誌，印刷中。
- 22) 妹尾左知丸，羽場喬一，横木輝男，中本孝：A methode to Fix the Dyes for Supravital staining and the Observation of cell organellae by this methode. *日本血液学会誌*，21, 2, 補冊.
- 23) Bensley, R. R., : On the so called altmann granules in normal aus pathological tissue. *Soc.*, 8, 78, 1910.
- 24) Lazarrow, A, and Cooperstein, S., : Studies on the enzymatic bassis for the Janus green staining reaction. *J. Cytochem. & histochem.*, 1, 234, 1953.
- 25) 滝川清治，木村喜代次，伊藤勉，加藤順吉郎，吉田照夫：分離糸粒体の細胞化学的研究，*日本血液学会誌*，18, 4,

## 写 真 説 明

- Fig. 1. : 牛血清で感作した家兎腹腔より得られた単球. 多数のミトコンドリアと少数の空胞及び密に存在する小胞体を認める. *Chitoplasma* には紐状の擬足が見られる.
- Fig. 2. : 同様な他の細胞の細胞質の拡大像. ミトコンドリアにはクリステ及び微かに二重膜構造が見られる. 空胞は一定の膜により細胞質と境される. 小胞体は不定形の小空胞乃至二重膜構造として現われている. V : 空胞, M : ミトコンドリア, ER : 小胞体.
- Fig. 3. : ヤーヌス緑で超生体染色された同様の条件下の単球. 正常のものと殆んど変化はないが, ミトコンドリアの少数のものには空胞の形成を認める.
- Fig. 4. : 中性赤で超生体染色した同様条件下の単球. 大きな空胞が現われているが, 擬足は正常に認められる.
- Fig. 5. : 牛血清感作家兎腹腔単球. 抗原を5分間作用させて超薄切片としたもの. 細胞は著しく膨化して各構造はあらかくなっている. 擬足は退縮し, そのあるものは細胞表面に小空胞状に附着している. ミトコンドリアは, 大多数が膨化してそのクリステは破壊されている. 細胞構造は粗となり小空胞は膨化或は不明瞭になっている.
- Fig. 6. : 同様の条件下に置かれた細胞の細胞質の一部を示す. ミトコンドリアは球形化し, クリステは破壊, 小胞体は膨化しその像は不明瞭になっている. N : 核, M : 膨化したミトコンドリア, ER : 膨化した小胞体.
- Fig. 7. : 牛血清感作家兎腹腔単球をヤーヌス緑で超生染した後, 抗原を5分間作用させた場合の電子顕微鏡像. 細胞は膨化, 球形化している. 擬足を失っている事は超生染していない細胞と同様であるがミトコンドリアの膨化はそれ程著しくない. 細胞構造は粗になっているが, 無染色のものに比して可成り著明な凝集の起っているのが見られる.
- Fig. 8. : 中性赤で超生染した細胞に抗原を働かしたものの電子顕微鏡像. 此の場合の変化は本質的に超生染しないで抗原を働かした場合と殆んど異なる所はない. 即ち, 細胞の膨化, ミトコンドリアの膨化, 細胞質の膨化, 擬足の退縮等は Fig. 5 と全く同一である.
- Fig. 9. : ヤーヌス緑超生染後, 抗原を作用させた単球の細胞質の像. ミトコンドリアは膨化していないが, その内部構造は全く不明瞭で様に電子密度の高い構造物として現われている. 小胞体は膨化しているが一部に於いて可成り著明な凝集を起しているのが見られる. N : 核, M : ミトコンドリア, ER : 小胞体, ER' : 凝集した小胞体.
- Fig. 10. : 中性赤で超生染したものに抗原を作用させた単球. ミトコンドリアの著明な膨化と小胞体の膨化破壊が見られる. N : 核, M : 膨化したミトコンドリア, ER : 小胞体.
-

## Cytological Studies on the Mechanism Inducing Allergic Inflammation

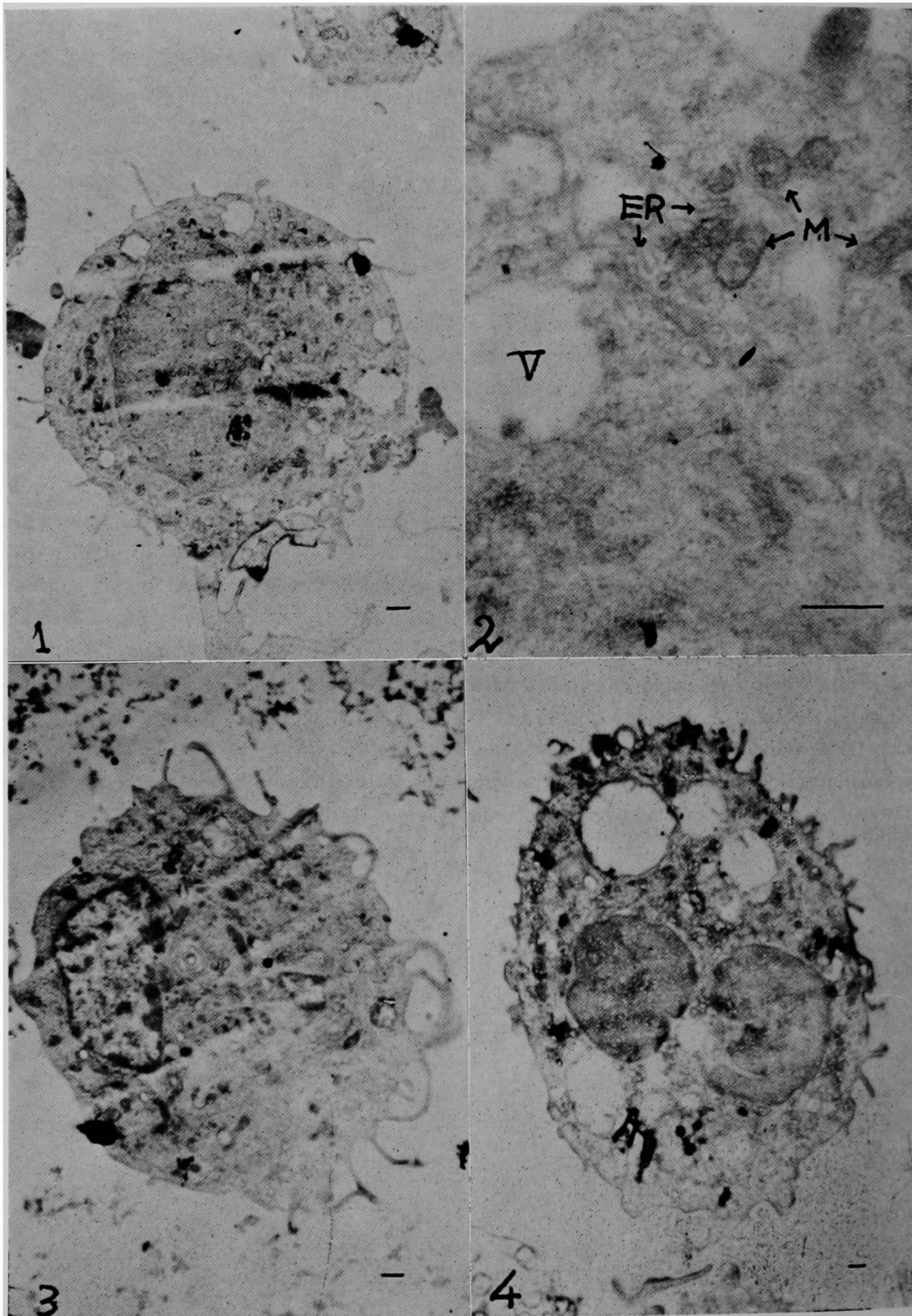
### Part 3. The Electronmicroscopic Observation on the peritoneal Monocytes from the Sensitized Rabbits after Exposing to Antigen

Hiroshi HAYASHI

Department of Pathology, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Satimaru Seno)

The change occurring at the time when antigen is acting on the peritoneal monocytes in the rabbits sensitized with bovine serum was observed under an electronmicroscope. By the action of antigen monocytes become swollen and devoid of pseudopodia, at the same time mitochondria also swell up and cristae are destroyed. Likewise endoplasmic reticulum swelling up, grow indistinct. Moreover, when antigen is made to act on the supra-vitally stained cells, in the case of Neutral Red there is no significant difference in the cell picture from that of cells receiving no supra-vital staining. As has previously been clarified, since Neutral Red is the substance existing in the cell as the dye droplets showing no affinity to any one of cell organellae, the dispersion of dye particles seem to be due to the destruction of endoplasmic reticulum, which is supposed to keep the dye as droplets. Janus Green has been proved to have a special affinity to mitochondria, and in the cells previously stained supra-vitally when they come in contact with antigen, their mitochondria do not expand as much as in the case of unstained cells, but the cells show a marked agglomeration of cytoplasm. This seems to be due to the concomitant acceleration in the affinity of Janus Green to organellae other than mitochondria, and also due to the changes in molecular arrangement in the cell at the time of the swelling of endoplasmic reticulum.

---



林論文附图

