



Identification of mature plasma cells in early rat yolk sac.A possible origin from the endodermal cell layer: Immunohistochemistry and immunoelectron microscopic study

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: エル-ネフィアウェイ, ナグワ エブライム アミン メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/263

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 4 3 号	学位授与年月日	平成 1 7 年 3 月 1 5 日
氏 名	El-nefiawy Nagwa Ebrahim Amin		
論文題目	<p>Identification of mature plasma cells in early rat yolk sac.A possible origin from the endodermal cell layer: Immunohistochemistry and immunoelectron microscopic study (ラットの卵黄嚢における形質細胞の同定ー内胚葉細胞層由来の可能性：免疫染色、免疫電子顕微鏡による検討)</p>		

博士(医学) El-nefiawy Nagwa Ebrahim Amin

論文題目

Identification of mature plasma cells in early rat yolk sac. A possible origin from the endodermal cell layer: Immunohistochemistry and immunoelectron microscopic study

(ラットの卵黄嚢における形質細胞の同定—内胚葉細胞層由来の可能性：免疫染色、免疫電子顕微鏡による検討)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

胎児の造血は妊娠中期以降では肝臓で行われるが、妊娠初期においては卵黄嚢で行われることが報告されている。血液幹細胞が卵黄嚢に存在することは知られているものの、卵黄嚢に分化した血液系の細胞が存在するかについては不明な点が多い。今回我々は、卵黄嚢にリンパ球系の分化した細胞が存在するかについて検討した。

〔材料ならびに方法〕

DAラットのそれぞれ雌雄(各N=15)を交配させ粘液栓を確認した日を妊娠0日とした。妊娠10から12日目に卵黄嚢のついた胎児を取り出し2分割し半分は10%ホルマリンで固定しパラフィンで包埋し、免疫組織検討用サンプルとした。残りの半分はただちに2.5% glutaraldehydeで包埋し免疫電顕用サンプルとした。

- 1) 免疫組織的検討；1次抗体は形質細胞を検出する抗ラットIgA、IgG、IgM抗体を用いABC法にて免疫染色を行い発色はDiaminobenzidine(DAB)を用いた。
- 2) 電子顕微鏡；資料作製後、2%グルタルアルデヒド(リン酸緩衝液、pH7.4)2時間の一次固定をした後、リン酸緩衝液で洗浄、二次固定を1%4酸化オスミウム水溶液で2時間行った。エタノール上昇系列で脱水後、置換剤に酸化プロピレンを用い、エポキシ樹脂にて包埋、熱重合後に超薄切片を作製し、電子染色を施して電子顕微鏡にて観察した。
- 3) 免疫電顕による検討；抗ラットIgAを切片に添加し反応させ、ABC法を行い、DABで発色後、1%4酸化オスミウム水溶液で30分固定後、エタノール上昇系列(各5分、100%は3回)で脱水した。脱水後、エポキシ樹脂(Quentol812, DDAS, MNA, DMP-30の混合液)を満たしたカプセルを切片の上に逆さまにして被せ、40℃に48時間おいて重合させた。重合後のブロックをスライドガラス下面よりアルコールランプを用いて加熱してはがし、60～90nm厚の超薄切片を作製して透過電子顕微鏡にて観察した。

〔結果〕

- 1) 免疫組織的検討ではIgA、IgG、IgMは妊娠10と11日では臓側卵黄嚢に弱い染色が見られたが、妊娠12日では臓側卵黄嚢に強い染色が見られた。特に内細胞層外側に内側よりも多くの陽性染色細胞が見られた。また卵黄嚢内の細胞にも陽性染色細胞が見られた。また卵黄嚢全体のIgA、IgG、IgM陽性細胞の数はそれぞれ7.50±2.25, 7.16±2.31, 8.33±1.96で有意差はなかった。
- 2) 電子顕微鏡による微細構造の検討では妊娠12日の卵黄嚢に形質細胞の特徴をもつ細胞が観察された。これらは内胚葉細胞層外側の細胞で顕著に観察された。細胞径は平均12μm、核の径は平均5μmであり、核は円形ないしは楕円形で形質細胞に特徴的な分散した多くの濃いクロマチン像を認めた。粗面

小胞体では平行に層状に配列した形質細胞の特徴を持っていた。内胚葉細胞層の内側では上記の特徴的所見が少ない未熟な形質細胞が観察された。

- 3) 免疫電顕による検討では電子顕微鏡所見でみられた形質細胞様細胞内にIgAの局在が見られた。特に粗面小胞体にIgAの粒子が観察された。

〔考察〕

免疫組織学的検討で妊娠12日の卵黄嚢にある細胞はIgA, IgG, IgM陽性であること、電子顕微鏡での微細構造が形質細胞の特徴を持つこと、免疫電顕でIgAが粗面小胞体に観察されたことなどから形質細胞であるといえる。妊娠12日の卵黄嚢に成熟した形質細胞が観察されたことは過去の報告にない新知見である。今までは卵黄嚢には血液幹細胞は観察されるものの、分化した細胞の存在は観察されていなかった。また卵黄嚢に存在する形質細胞の起源については明らかではないが内胚葉細胞層の内側で未熟な形質細胞、外側で成熟形質細胞が見られたことから内胚葉細胞層内側が形質細胞の起源と考えられる。形質細胞はリンパ球系の分化細胞である。従来血液幹細胞の存在しか知られていなかった卵黄嚢に分化したリンパ球系の細胞の存在を今回見出したことになる。これは卵黄嚢が免疫細胞として機能していることになる。妊娠初期から中期にかけて胎児は外来性のウイルスや細菌の侵襲を受けることがある。このような妊娠初期から中期にかけての侵襲に対して胎児は生体防御の観点から卵黄嚢のリンパ球系の分化を早く進行させているのかもしれない。また胎盤と子宮の接着面では常に母体の免疫細胞と接しており母体からの抗原刺激が存在すると考えられる。それらに対する防御機転から卵黄嚢のリンパ球系細胞が早い時期に分化している可能性もある。一方、卵黄嚢に成熟した形質細胞があるにもかかわらず母体の免疫細胞を拒否しない機序、すなわち免疫寛容機序の観点からも今回の結果は興味深い知見と考えられた。

〔結論〕

従来血液幹細胞の存在しか知られていなかった卵黄嚢内に成熟型の形質細胞が存在することを初めて証明した。内胚葉細胞層内側がこの形質細胞の起源と考えられた。

論文審査の結果の要旨

胎生期の造血は、妊娠初期では卵黄嚢で行われ、次いで肝臓、脾臓に移り、最終的に骨髄で行われる。造血幹細胞が卵黄嚢に存在し、造血の最初の部位であることは知られているが、ここで分化した血液系の細胞になるか、免疫機能、生体防御機構が働くかどうかは明らかでない。申請者らは卵黄嚢におけるBリンパ球系の分化について、光顕および電顕による免疫染色で検討した。

- 1) DAラットを交配させ、妊娠10-12日に卵黄嚢のついた胎仔を取り出し、光顕用および電顕用サンプルを作成した。光顕レベルの免疫組織学的検討では、妊娠10、11日では発現が弱い、妊娠12日に臓側卵黄嚢にIgA、IgG、IgMの強い発現力溜められた。それぞれの陽性細胞の数はほぼ同じであった。
- 2) 電顕による微細構造の検討では、妊娠12日の卵黄嚢に、多くの濃いクロマチンを含む円形あるいは楕円形の核を有し、平行層状に配列した粗面小胞体とはっきりとしたゴルジ小体を有する、形態的に成熟した形質細胞の特徴をもつ細胞が観察された。これらは内胚葉細胞層内に認められ、中胚葉層では認められなかった。内胚葉内側では、未熟な形質細胞を認めた。
- 3) 抗IgA抗体を用いた免疫電顕の所見では、形質細胞様細胞の小胞体に局在してIgAが染色された。

以上の結果は、卵黄嚢で成熟した形質細胞が存在することを形態学的に示した最初の報告である。形質細胞は内胚葉細胞層の中で認められることより、内胚葉の造血幹細胞から分化したと推測した。申請者らは別の論文で卵黄嚢にマクロファージが存在することも報告している。今まで卵黄嚢では未熟な造血細胞のみが存在すると考えられていたが、分化した血液系の細胞が生ずることを明らかにした。申請者らは妊娠初期から中期にかけて胎児は外来性の病原微生物の侵襲に対して、防御的な反応をしていると考え、さらに母体の抗原刺激に対する免疫寛容の成立にも関わっている可能性を推察した。

審査委員会では、申請者らが従来卵黄嚢では造血幹細胞の存在しか知られていなかったが、成熟型の形質細胞が存在することを初めて明らかにしたことは、胎生初期から中期における胎児の生体防御機構を考える上で重要な知見であると高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- (1) ラット、マウス、ヒトで胎生期における造血機能の発達の比較
- (2) 3 胚葉の形成と卵黄嚢の形成との関係について
- (3) 造血幹細胞の形態的および機能的同定について
- (4) 卵黄嚢における形質細胞の光顕的検出について
- (5) 卵黄嚢の内胚葉細胞と成熟形質細胞で移行像は認められたか
- (6) 母体由来の形質細胞と卵黄嚢由来の形質細胞を如何に区別したか
- (7) 形質細胞の起源が内胚葉由来か、中胚葉由来かについて分かることの意義について
- (8) 今までの研究で、なぜ形質細胞が卵黄嚢で見つからなかったか
- (9) 卵黄嚢における細胞性免疫について
- (10) 卵黄嚢の内胚葉細胞の中で、およそ何パーセントが形質細胞か
- (11) 内胚葉細胞の細胞マーカーについて
- (12) 胎盤における形質細胞の産生について

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 筒井 祥 博

副査 佐藤 康 二 副査 本郷 輝 明