



ラット卵黄囊胚葉細胞の形態・機能と胎生マクロファージとの関連性

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 戴, 冀斌 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1377

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	医博論第 100号	学位授与年月日	平成 3年 3月15日
氏 名	戴 冀 斌		
論文題目	ラット卵黄嚢内胚葉細胞の形態・機能と胎生マクロファージとの関連性		

論文の内容の要旨

主要な免疫細胞の1つマクロファージ(Mφ)の起源に関しては、これまで統一的な見解がなくその解明が待たれている。個体発生の早期において分化する卵黄嚢内胚葉細胞は、胎生早期において“肝機能”、“吸収能”、“造血能”など、多彩な機能を発揮するが、とくに造血系細胞の分化の場として最近注目されている。そこで内胚葉細胞と胎生Mφとの関連性の有無を明らかにしMφの分化起源を追究するため、ラット卵黄嚢と胎仔について形態学的、並びに免疫学的方法で基礎的検索を行なった。

〔方法〕 近交系DAラット(胎生8～16日齢)の胎仔と卵黄嚢について、ラットMφ膜抗原特異的単クローン抗体(Mar1・Mar3)を用いた間接型免疫組織化学的染色標本(免疫アルカリ性フォスファターゼ法)、透過型及び走査型電顕標本、及び各種の組織化学的染色標本(SudanⅢ, オイルレッド染色)を作り検索した。さらに、卵黄嚢の内胚葉上皮細胞のlatex粒子(2μm, 0.8μm)貪食能とMar1・Mar3抗原発現性を、*in vivo*系及び*in vitro*系で光顕及び電顕(透過型及び走査型)と免疫アルカリ性フォスファターゼ法によって検索した。遊離内胚葉細胞浮遊液はHoganらの方法により準備した。

〔結果〕

1. 胎生8～16日齢の卵黄嚢内胚葉層の細胞は、トルイジンブルーの染色性と、細胞質内の細胞小器官の形態、及び遊離面の微絨毛様突起の形態などから見て、2種類の細胞群(約10%の明調細胞と約90%の暗調細胞)からなることが明らかになり、内胚葉上皮細胞の不均一性が示唆された。
2. 胎生13日齢の内胚葉上皮細胞の細胞質には、多数の被覆小胞、水解小体、ファゴソーム、脂肪小滴、封入体、空胞等が主に核上部に見られ遍在性が認められた。また、明調細胞類似の細胞が肝臓内の類洞にも存在することが明らかにされた。明調細胞と暗調細胞との細胞間結合はゆるく、広い細胞間隙がみられ、しばしば間葉層への明調細胞の離脱像が見られた。
3. 胎生14日の妊娠ラットにおいて、子宮壁を通して卵黄嚢腔にlatex粒子(2.0μm)を投与すると、10時間後に一部のMar3⁺内胚葉上皮細胞において、その遊離面及び細胞質内に貪食粒子が認められた。同時に肝内にもMar3⁺-latex粒子貪食細胞が認められた。
4. 遊離内胚葉細胞(胎生14日)を準備し、10%牛胎児血清添加-RPMI-1640培養液中で37℃、5%CO₂培養器内にて1時間培養し、付着細胞に対しlatex粒子を添加してさらに1時間培養したところ、Mar3⁺-latex粒子貪食細胞が認められた。
5. 胎生8～16日齢ラットの卵黄嚢内胚葉上皮細胞は、Mar3抗原陽性で成熟Mφとの共通抗原を発現していた。

〔結論〕

以上の所見から、胎生8～16日齢ラットの卵黄嚢内胚葉層は、Mφとの共通抗原と、Mφ類似の特徴(形態学的、並びに機能的)を有する2種類の細胞群(明調細胞と暗調細胞)からなることが明らかにされ、さらに、胎生肝内のMφ様細胞と明調細胞との類似性が見いだされた。本研究結果をラットの胎生Mφの起源の立場から考えると、近位内胚葉由来の卵黄嚢上皮細胞は胎生Mφとその前駆細胞の一部の分化に密接に関係していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

重要な免疫細胞の1種であるマクロファージの起源に関して、卵黄嚢に起源するという研究成果が最近受け入れられてきたにもかかわらず、卵黄嚢を構成する内胚葉性上皮細胞からか、間葉および中胚葉細胞からかまだ明らかにされておらず、論議的になっている。

そこで本申請者は近交系DAラットを用いて、検索可能な胎生早期の8日齢より16日齢にかけての卵黄嚢と胎仔の組織（とくに肝臓と結合組織）について次の3つの方法を駆使して検討した。

- 1) 形態学的には光顕（組織化学的染色）と電顕（透過型及び走査型）による観察
- 2) 成熟マクロファージの膜抗原に対して特異性の高いMar1と、単核食細胞系細胞と反応するMar3という単クローン抗体を用いての免疫組織化学的方法（間接型免疫アルカリ性ホスファターゼ法）
- 3) ラテックス粒子（ $2\mu\text{m}$, $0.8\mu\text{m}$ ）を用いてのin vitro系及びin vivo系での貪食能測定などである。

その結果、形態学的所見とマクロファージ関連抗原の発現性の面から、さらに貪食能の発現の面から、次の4つの新しい知見を得ることによって、卵黄嚢の内胚葉性細胞は胎生マクロファージの分化と密接に関連するという考えに到達し、マクロファージの起源を間葉由来だとする従来の考え方とは異なる新たな見解を展開する研究の端緒を築いた点は、評価に値すると判断された。

- 1) 胎生8～16日齢の卵黄嚢内胚葉層をトルイジンブルーで染色したところ、2種類の細胞群、すなわち約10%の明調細胞と約90%の暗調細胞とからなることを見いだした。さらに電顕により、前者は電子密度が低く細胞小器官も発達しており、かつ自由表面に微絨毛様突起もよく発達しているが、後者は電子密度が高く細胞小器官や微絨毛様突起の発達も前者と比べ低いことを明らかにし、内胚葉層細胞の形態学的不均一性を明らかにした。
- 2) 胎生8～14日齢の内胚葉細胞の自由表面と食小体限界膜は単クローン抗体Mar3で陽性に強く染め出され、成熟マクロファージとの共通抗原をすでに発現していた。Mar1単クローン抗体で染めだされる抗原の出現は胎生14.5日以後であった。
- 3) 一部の内胚葉細胞がラテックス粒子（ $2.0\mu\text{m}$ ）を貪食することを走査型電顕で確認するとともに、細胞内に取り込まれた状態も観察できたこと、また、ラテックス粒子を貪食した細胞が、Mar3抗体によって染色されることから、内胚葉細胞の貪食能を証明した。さらに、卵黄嚢腔内にラテックス粒子を注入するin vivo実験系と、内胚葉細胞浮遊液の培養系にラテックス粒子を添加するin vitro実験系によっても同様のことを確認した。
- 4) ラテックス粒子を貪食しMar3抗原陽性で、形態学的にも明調細胞類似の細胞が胎仔肝臓内に存在することを示した。

これらの研究論文報告に対し、次のような質問がなされた。

- 1) PAS 染色法で明調細胞と暗調細胞を染めだせるか。
HE染色では明暗の染色性が逆にならないか。中間的に染まる細胞はないか。
- 2) 明調細胞と暗調細胞でMar3の染色性に差はないか。Mar3染色の極性はなぜ生じるか。
- 3) 酸性ホスファターゼ法での染色性は如何。また、Mar3抗原と酸性ホスファターゼとの異同について
- 4) 内胚葉細胞の微絨毛様突起の長いものだけがラテックス粒子を捕捉するのか。また、短い指状突起の機能は何か。
- 5) 胎仔肝臓内で、Mar3抗原陽性・ラテックス粒子貪食陽性の細胞が卵黄嚢の内胚葉細胞由来である直接的証拠があるか。
- 6) 内胚葉細胞がMHCクラスII陰性であったという意味について。FcレセプターとC3レセプターの発現性について
- 7) 暗調細胞が明調細胞へ移行する可能性はあるか。
- 8) 内胚葉細胞の間葉層への移動像や、血島内皮を貫いて血管へ遊走する像を観察したか。

以上の点について、申請者の応答は概ね適切であった。

審議の結果、本審査委員会は本論文が学位授与に値する内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	吉田孝人		
	副査	教授	白澤春之	副査	教授
	副査	助教授	右藤文彦	副査	助教授
					馬場正三
					宮本愛