



## 活性化マクロファージの形態と膜抗原表現型の特性に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森, 文美 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1439">http://hdl.handle.net/10271/1439</a>

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 162号	学位授与年月日	平成 6年 1月21日
氏名	森 文 美		
論文題目	活性化マクロファージの形態と膜抗原表現型の特性に関する研究		

医学博士 森 文 美  
論文題目

活性化マクロファージの形態と膜抗原表現型に関する研究

論文の内容の要旨

マクロファージ (Mφ) は生体防御における最も原始的かつ重要な細胞群であるが、その起源、形態、機能、膜表現型などいずれに関しても“不均一な”細胞群といわれ、その詳細な解明が待たれているところである。今回申請者は、不溶性抗原である溶連菌製剤 (OK-432) を用いて活性化したときのラット Mφ の形態学的特徴、膜抗原表現型の変化を明らかにすると共に、細胞性免疫応答調節作用の有無を *in vivo* 系で解析した。

(方法及び結果)

正常雄 DA ラット (体重150~200 g) に OK-432 (0.2 KE) を腹腔内投与し、経時的に腹腔滲出細胞 (PEC) を採取し、管底付着法で腹腔 Mφ (純度98%) を準備した。純化 Mφ について次のような観察を行った。

1. Mφ の表面構造の観察

1) Mφ をグルタルアルデヒド固定後、金蒸着法を施し、走査型電顕 (JEM-35) で SEM 像を解析した。細胞表面の形態、大きさ、微絨毛様突起、ラッフル、細胞質小突起の形と方向性などの特徴に基づき、Mφ を A 型 (小型球状)、B 型 (中型紡錘状)、C 型 (大型円盤状)、D 型 (大型扁平状) の 4 型が分類された。

2) OK-432 投与前の腹腔 Mφ (常在性 Mφ) と、OK-432 投与により活性化した Mφ (それぞれ 200~400 個) を SEM で観察分類した。その結果、常在性 Mφ は A 型が 65% 程度を占め、ついで、C 型 19%、D 型 12.1%、B 型 3.7% の順であった。これに対し、活性化 Mφ (1~8 日後) は、刺激後経時的に A 型が著減し、C, D, B 型の順で増加する傾向がみられ、特に C 型の増加が顕著で、約 50% を占めた。一般に Mφ が活性化を受けると、微絨毛様突起が減少し、細胞質小突起とラッフルが発達し、さらに、大型化かつ付着能の強い細胞へと、形態的かつ機能的性状の変化を起こすことが明らかになった。

2. Ia 抗原の膜発現性

Mφ でのクラス II 抗原 (Ia 抗原) の発現性を明らかにするため、間接型蛍光抗体法で標識し、セルソーター (EPICS-V) あるいは、デジタル蛍光顕微鏡システム (C1966, 浜松ホトニクス) を用い、生 Mφ の形態、蛍光量、相対的 Ia 抗原量、その細胞膜分布像などを解析した。Ia 抗原の分布状態により Mφ を (I) 中央分布型、(II) びまん分布型、(III) 環状分布型、(IV) 辺縁パッチ型の 4 型に分類した。前記の SEM 像分類と、Ia 抗原分類の相関を検索したところ、A 型と B 型は III 型と IV 型を示し、C 型と D 型は I 型と II 型を示す傾向がみられた。つぎに、Mφ 1 個あたりの Ia 抗原量は、OK-432 活性化後 3~5 日目で最高値 (70~85%) に達し、以後漸減した。また、Ia 抗原陽性 Mφ 数も同様の消長を示した。各型についてみると、A 型が最も少なく、B, C, D 型の順で増加する傾向がみられた。しかし、Mφ 膜表面の単位面積当りの Ia 抗原量は各型ともほぼ一定しており、有意差は認められなかった。活性化にともない Mφ が大型化しても、膜上での Ia 抗原の発現密度は一定に保たれていることが示唆された。

3. Mφ の細胞性免疫応答調節作用

T細胞の組織適合性抗原認識能を *in vivo* で最も鋭敏に検出できる  $F_1$  雑種ラットでの膝窩リンパ節肥大法 (GVH 反応法) を用い、T細胞と  $M\phi$  の相互作用を解析した。まず、OK-432投与後種々の時期に得られた  $M\phi$  を (DA  $\times$  Lewis)  $F_1$  の後肢足踵皮下に投与し、親系 DA ラット胸腺細胞の GVH 反応活性に対する添加効果を見たところ、刺激後 3~14日までの  $M\phi$  が有効で、Ia 抗原陽性亜群の割合にほぼ比例して増加した。つぎに、EPICS-V を用い、刺激後 3 日目の  $M\phi$  を Ia 抗原陽性亜群と Ia 抗原陰性亜群に分離し、その添加効果を見たところ、Ia 抗原陽性  $M\phi$  亜群の添加によってのみ有意の活性が誘導された。

(要約)

$M\phi$  は不溶性抗原刺激を受けると、経時的に形態学的変化と膜抗原表現型 (とくに、クラス II 抗原) の変化を起し、高い不均一性を示す細胞群からなることが明らかにされた。さらに、それらの  $M\phi$  亜群のうち、胸腺細胞を同種抗原反応性 T 細胞へ分化・成熟させ、GVH 反応活性を誘導する亜群は、OK-432活性化後 3~5 日目に見られる Ia 抗原陽性  $M\phi$  亜群 (Ia 分布; I 型と II 型、SEM 像; C, D 型) であることが示唆され、活性化 Ia 抗原陽性  $M\phi$  の一部が *in vivo* 系における T 細胞の細胞性免疫応答に対し、強い賦活作用を発揮することが明らかにされた。

## 論文審査の結果の要旨

(論文審査の結果の要旨)

マクロファージ ( $M\phi$ ) は細網内皮系、あるいは近年においては単核食細胞系の細胞として分類されているが、その分化、起源、分化と機能との関係、機能と形態との関係などの詳細については不明な点が少なくない。

本論文はこのような観点において、DA ラット腹腔  $M\phi$  の活性化にともなう形態的变化、膜抗原、ことにクラス II 抗原 (Ia 抗原) の発現性の変化、さらにこれらの変化と細胞性免疫応答の関係を明らかにしようとした研究である。主要な研究方法、結果と特徴はつぎの通りである。

1. 細菌性不溶性抗原である溶連菌製剤 OK-432 を成熟 DA ラット腹腔に刺激抗原として投与後、経時的に純度 98% 以上の  $M\phi$  を得て、(1) 走査電顕像による形態的分類、(2) デジタル蛍光顕微鏡・間接蛍光抗体法による生きた  $M\phi$  における Ia 抗原の発現・分布の様式と、photon 数測定による発現抗原量の比較、(3)  $F_1$  雑種ラットを利用した局所移植片対宿主 (GVH) 反応における活性化腹腔  $M\phi$  による親系 DA 胸腺細胞のアロ抗原反応性誘導効果を解析した。

2. 走査電顕所見から  $M\phi$  を小突起やラッフルなどの発達程度により小型球状 (A 型)、中型紡錘状 (B 型)、大型円盤状 (C 型)、大型扁平状 (D 型) の 4 型に分類した。

3. OK-432 の腹腔内投与により各型の絶対数が増加し、百分率において常在性  $M\phi$  の主体をなす A 型の急激な低下と B, C, D 型、ことに C 型の上昇が起こることが特徴的であることを示し、微絨毛様突起の減少、細胞小突起とラッフルの発達、細胞の大型化が  $M\phi$  活性化に伴う形態変化と考えた。

4. 生きた  $M\phi$  における Ia 抗原の分布状態を中央分布型 (I 型)、びまん分布型 (II 型) などの 4 型に分類し、同時に観察した微分干渉顕微鏡像を走査電顕像と対比検討することにより、Ia 抗原の分布様式は走査電顕的細胞形態と相当程度相関することを示した。

5. Ia 抗原量の多い  $M\phi$  は刺激後 3~5 日をピークに増加し、膜表面の単位面積当たりの抗原量をほぼ一定に保って大型化する可能性を示した。

6.  $F_1$  雑種を用いた GVH 反応において、胸腺細胞のアロ抗原反応性は OK-432 活性化後 3 日以降に

現れる Ia 抗原陽性 Mφ によって賦与されることを示唆した。

審査委員会は、上記から本論文が活性化にともなう Mφ の形態および機能の多様性と形態移行、および Ia 抗原の分布・量（相対的）、形態と機能の相互関係、細胞性免疫応答に関与する Mφ、などについて多くの新知見を示したものと評価した。

なお、論文審査の過程において論文内容に関連して、

1. Mφ の形態変化に遊走中の局面の違いを見ている可能性はないか
2. 経時的形態変化の観察に細胞総数を考慮したか
3. 固定不良や変性による形態変化を刺激による形態変化と見ていないか
4. Mφ の小突起、ラッフルなど形態学的呼称は適当か
5. in vivo の観察だけで細胞の形態移行を論じてよいか
6. 蛍光顕微鏡での Ia 抗原分布パターン・photon 数による定量の信憑性はどうか
7. photon 測定時のバックグラウンドの取り方は適当か
8. 蛍光パターンは細胞の生存能や活性と関係しないか
9. OK-432腹腔投与時に溶連菌の自然感染に基づく免疫複合体による刺激効果はないか

などにつき質疑応答があった。

これらに対する申請者の応答は概ね適切と認められ、本論文は博士（医学）の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 白 澤 春 之

副査 教授 寺 川 進 副査 教授 吉 田 孝 人

副査 助教授 古 川 福 実 副査 助教授 宮 本 愛