

## リンパ濾胞樹枝状細胞における Clq の合成と免疫複合体の捕捉・保持について

浜松医科大学第二病理

前 多 松 喜

(昭和60年 7 月29日受付)

### 緒 言

脾, リンパ節, バイエル板などのリンパ組織の濾胞胚中心内にはリンパ球を囲む多数の樹枝状突起を持った非リンパ球系の間葉細胞がある。この細胞は濾胞樹枝状細胞 (follicular dendritic cell :FDC) と呼ばれ<sup>32)</sup>, 抗原を捕捉し長期間細胞突起の間及びこの細胞とリンパ球との間隙に保持することが知られている<sup>10)</sup>, <sup>17)</sup>, <sup>23)</sup>。このように抗原を保持することによってリンパ球に抗原提示を行ない B memory cell の分化<sup>14)</sup> や抗体産生の feed back 調節<sup>31)</sup> に関与していると考えられている。

この FDC による抗原の捕捉, 保持について初期の Nossal ら<sup>23)</sup>, Hanna ら<sup>10)</sup> の研究により特異抗体の存在が必要であること, 捕捉された抗原は免疫複合体の形で保持されることが明らかにされている。これ以後多くの研究がなされ, 動物に投与された抗原は免疫複合体の形で, リンパ節では FDC 類似の非リンパ球系細胞を介し被膜下洞から胚中心へ, 脾ではリンパ球を介して濾胞辺縁域から胚中心へ運ばれ, 胚中心において FDC に捕捉, 保持され则认为られている<sup>6)</sup>, <sup>30)</sup>, <sup>34)</sup>, <sup>35)</sup>。この免疫複合体の捕捉, 保持には C3 の存在が必須であり<sup>4)</sup>, <sup>13)</sup>, <sup>25)</sup>, 事実 FDC が C3 リセプター (C3R) を保有することが示されている<sup>6)</sup>, <sup>12)</sup>。他方 FDC には C3R の他に Fc リセプター (FcR) 活性<sup>12)</sup>, <sup>33)</sup> 及び Clq の存在<sup>19)</sup> が示されている。免疫複合体の捕捉, 保持にこれらが関与する可能性も考えられているがこの点については不明である。従来の研究は主として動物に抗原や免疫複合体を投与しリンパ濾胞胚中心へのとりこみを観察したものである。しかしこのような in vivo の実験系では C3 の関与をうけたも

のを観察せざるをえない。

今回我々は凍結組織切片上でラットリンパ組織の胚中心に免疫複合体を直接反応させる方法で C3 の関与なしでも胚中心に免疫複合体が結合することを観察した。さらにその結合機構を検討し, FDC 由来の Clq が関与している可能性のあることを明らかにした。

### 材 料 と 方 法

#### 動物

ウィスター系ラット (200 g 前後) を通常状態で飼育し, 使用2週間前にヒツジ赤血球  $5 \times 10^8$  個を尾静脈内に投与した。脾, 頸部・腋下・腸間膜リンパ節, バイエル板をト殺後ただちに摘出し細切した後, OCT compound (Lab Tek 社) に包埋し, ドライアイスアセトンで凍結し顕微鏡観察用に供した。臓器の一部は電顕観察用に PLP (periodate, lysine-paraformaldehyde) 液<sup>18)</sup> で固定した。

#### PAPiG, PAPF (ab')<sub>2</sub>

家兎を Freund の完全アジュバントを用いて horseradish peroxidase (HRP, 東洋紡 RZ=3.4) で感作して抗血清を作製。この抗血清の 33% 硫酸分画を Sephadex G 200 でゲル濾過し IgG 分画を得た。この一部を Grey の方法<sup>9)</sup> でペプシン分解し, Sephadex G 100 でゲル濾過して F(ab')<sub>2</sub> を得た。この抗 HRPiG と抗 HRPf(ab')<sub>2</sub> から Sternberger の方法<sup>29)</sup> で抗原過剰域において可溶性の HRP 抗 HRPiG 複合体 (PAPiG) と HRP 抗 HRPf(ab')<sub>2</sub> 複合体 PAPF(ab')<sub>2</sub> を調整し, 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.3 (PBS) に溶した。PAPiG と PAPF(ab')<sub>2</sub> は HRP 含量を指標として 3 mg/ml の濃度とし, これを 50倍希釈したものを実験に用いた。なお HRP 濃度は

403 nm における吸光度係数 (0.001 OD 403 は 0.444  $\mu\text{g}$  の HRP 蛋白に相当) によった。

### monomeric IgG, 熱凝集 IgG

非感作ラットの血清50%硫酸分画を DEAE セルロースクロマトグラフィーにかけ、さらに sephacryl S 200 でゲル濾過して得た IgG を monomeric IgG とした。これを 10 mg/ml の濃度に PBS に溶して使用した。熱凝集 IgG はこの monomeric IgG 10 mg/ml (in PBS) を 63°C 20 分加熱し、10000 $\times$ g 20 分遠沈後の上清を熱凝集 IgG とした。なお蛋白量は Lowry 法<sup>16)</sup>を用いて定量した。

### 抗 Clq F(ab')<sub>2</sub>

ラットとヒトの Clq は分子量や機能においてきわめて類似し、抗原性も交叉すること<sup>11)</sup>が報告されていることから、市販の抗ヒト Clq ウサギ IgG (Dako 社) をこの実験に用いた。なお抗ヒト Clq が Yonemasu の方法<sup>37)</sup>で精製したラット Clq と交叉反応を示すことを Ouchterlony の二重拡散法<sup>24)</sup>で確かめた。(写真 1) 抗 Clq IgG をペプシン分解して抗 ClqF(ab')<sub>2</sub> を得て、5 mg/ml (in PBS) に調整した。

### 凍結組織切片上での PAPIgG の結合

光顕観察：凍結組織からクライスタットで 5  $\mu$  の組織切片を作製した。切片をスライドガラスに拾いイソプロピルアルコールで30秒固定、PBS で洗浄後 PAP IgG 液と室温中で30分反応させた。次いで PBS で洗浄後 3,3'-diaminobenzidine, 4 HCl 0.2 mg/ml 及び 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6 (DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に室温で15分反応させた。内因性ペルオキシダーゼ活性は DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液に NaN<sub>3</sub> を 0.1 M になるように添加して抑制した<sup>20)</sup>。

電顕観察：細切した臓器は電顕酵素抗体法における試料作製手順<sup>18)</sup>に準じ、PLP 液で 4°C 6 時間固定したシュクロース加 PBS で洗浄後 OCT に包埋し、ドライアイスアセトンで凍結した。この組織からの 6  $\mu$  凍結組織切片をスライドガラスにはりつけた後、PAPIgG 液と室温60分反応させた。PBS で洗浄後 NaN<sub>3</sub> 添加 DAB 液に室温30分浸し、次いで NaN<sub>3</sub> 添加 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液に室温15分反応させた。PBS で洗浄後 2%グルタルアルデヒドで 4°C 30分再固定し、2%オスミウム酸で20分処理した。この組織を型のごとく脱水し、エポンに包埋した。超薄切片は無染色のままあるいは酢酸ウラニウム、クエン酸鉛で軽く染色して電顕的に観察した。

### Clq の検出

光顕観察には新鮮凍結組織切片をイソプロピルアル

コールで固定したものを、電顕観察には 4°C 6 時間 PLP 固定した組織から作製した凍結組織切片を用い、酵素抗体間接法<sup>18), 22)</sup>で Clq の分布を観察した。一次抗体は抗 Clq ウサギ F(ab')<sub>2</sub> を二次抗体は HRP 標識抗ウサギ F(ab')<sub>2</sub> ヤギ F(ab')<sub>2</sub> (Capel 社)を用い、NaN<sub>3</sub> 添加 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液で呈色させた。なお染色の特異性は、一次抗体の代わりに PBS を用いた時及び精製したラット Clq で吸収した一次抗体を用いた時に染色されないことで確認された。

### 同一組織切片での PAPIgG と Clq の二重染色

予備実験を行ない組織に結合した PAPIgG が解離する条件を出した。PAPIgG を結合させた凍結組織切片を pH 3~6 の 0.5 M 酢酸緩衝液に室温 5 分浸し、PBS で洗浄後 NaN<sub>3</sub> 添加 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液で呈色した。その結果 pH 4.5 より酸性条件では DAB 反応産物は検出されなかった。さらに PAPIgG を反応させ pH 4.5 の 0.5 M 酢酸緩衝液で処理した組織切片に HRP 標識抗ウサギ F(ab')<sub>2</sub> ヤギ F(ab')<sub>2</sub> を反応させ DAB 反応を施した。この結果 DAB 反応産物はみられず酸処理によって PAPIgG が完全に組織から解離することが確かめられた。次に組織切片を pH 4.5 の 0.5 M 酢酸緩衝液に室温 5 分浸し PBS で洗浄後、酵素抗体法で Clq を検出し対照とした酸処理をしない組織と所見に差がないことを確かめた。

以上の結果に基づき、まず最初にイソプロピルアルコール固定凍結組織切片に PAPIgG を反応させ NaN<sub>3</sub> 添加 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液で呈色した。この組織切片を 0.5 M 酢酸緩衝液、pH 4.5 に室温 5 分浸し結合した PAPIgG を解離させた後、酵素抗体法で Clq を検出した。Clq の呈色は NaN<sub>3</sub> を添加した 0.25 mg/ml 4-Cl-1-naphthol と 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6 で青紫色に発色させた。

### PAPIgG の結合特性の検討

以下の実験には連続的に薄切した組織切片を用いた。また PAPIgG の結合は NaN<sub>3</sub> 添加 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液で呈色して観察した。

1) 対照実験：PAPIgG の代わりに PAPF(ab')<sub>2</sub>, HRP 液 (0.06 mg/ml in PBS), PBS のみを用いて対照とした。

2) ヘパリンによる抑制：PAPIgG 液 1ml に対して 0 から 250 単位のヘパリン (和光純薬) を添加し、PAPIgG の結合への影響をみた。

3) 熱凝集 IgG, monomeric IgG による抑制：PAPIgG 液 1ml に対して熱凝集 IgG, monomeric IgG の各々を 0 から 10 mg の間で添加し PAPIgG

の結合への影響をみた。

4) 抗 ClpF(ab')<sub>2</sub> による抑制：組織切片を 5 mg/ml から 0.01 mg/ml の抗 ClpF(ab')<sub>2</sub> 液で処理し PBS で洗浄後、PAPIgG 液を反応させた。

5) 熱処理による抑制：組織切片を PBS 中で 56°C 30 分熱処理しその後 PAPIgG を反応させた。

#### 生体内で胚中心に分布する免疫複合体の検出

HRP を抗原として Freund の完全アジュバントを用いて能動免疫したラット、ラットの抗 HRP 血清 3 ml (HRP 180 µg と当量) を静注して受動免疫したラット、対照として無処置のラットを用いた。それぞれに HRP 200 µg を静注し、72時間後にト殺し脾を採取した。脾における HRP の分布は Graham の方法<sup>7)</sup> に準じて酵素組織化学的に光顕、電顕観察した。

### 結 果

#### 組織切片における PAPIgG の結合

光顕所見：脾、リンパ節、パイエル板の濾胞胚中心に褐色の反応産物すなわち PAPIgG の結合がみられた。PAPIgG の結合は臓器の種類による違いはなく、いずれの濾胞胚中心においても同様に網目状にみられた。(写真 3-a, b, c) リンパ球、マクロファージにはほとんど結合はみられなかった。

電顕所見：電顕観察に先だって PLP 固定凍結組織切片上での PAPIgG の結合を光顕観察するとイソプロピルアルコール固定凍結組織切片と同じ所見を呈した。(写真 5) 電顕的に観察すると反応産物は FDC の細胞表面及び樹枝状に伸びた突起とリンパ球との間にある不定形物質に一致してみられた。(写真 6, 7, 8)

#### Clq の検出

光顕観察では脾、リンパ節、パイエル板のいずれの組織においても、濾胞胚中心に網目状に Clq がみられた。(写真 4-a, b, c) この分布は PAPIgG の結合と同じであった。また臓器の種類による分布の違いはみられなかった。電顕観察では FDC の細胞表面及び樹枝状に伸びた突起とリンパ球との間にある不定形物質に一致して Clq がみられた。(写真 9) この Clq の分布は PAPIgG の結合と同じ局在であった。また FDC のなかには細胞質内にも Clq がみられるものがあった。その Clq は外側核膜及び小胞体膜に沿ってみられ、合成像と考えられる所見であった。(写真 10, 11)

#### 同一組織切片での PAPIgG と Clq の二重染色

同一組織切片上で PAPIgG の分布は褐色に Clq の分布は青紫色に染色させた結果、濾胞胚中心において

褐色と青紫色の反応産物が重なって黒褐色の反応産物が網目状にみられた。(写真 2) すなわち Clq が存在する部位に一致して PAPIgG が結合していることが示された。

#### PAPIgG の結合特性の検討

1) 対照実験：PAPIgG の代わりに PAPF(ab')<sub>2</sub>, HRP 単独, PBS を用いると DAB 反応産物はみられなかった。すなわち PAPIgG の結合は IgG の Fc 部分を介していることになり, HRP が結合した可能性や内因性ペルオキシダーゼ活性を検出している可能性は否定された。

2) ヘパリンによる抑制：PAPIgG の結合はヘパリン添加によって濃度依存性に抑制をうけ, 125単位/ml 以上の濃度で DAB 反応産物はみられなくなった。

3) 熱凝集 IgG, monomeric IgG による抑制：PAPIgG の結合は熱凝集 IgG 添加によって濃度依存性に抑制をうけた。1.25 mg/ml 未満では対照と違いはなかったが 1.25 mg/ml 以上で抑制がみられ 2.5 mg/ml 以上では完全な抑制をうけた。一方 monomeric IgG は PAPIgG の結合を抑制せず 10mg/ml の濃度でも DAB 反応産物の量は対照と変わらなかった。

4) 抗 ClqF(ab')<sub>2</sub> による抑制：PAPIgG の結合は抗 ClqF(ab')<sub>2</sub> によって抑制された。抗 ClqF(ab')<sub>2</sub> の濃度が上がるにつれ DAB 反応産物の量は減少し, 0.04 mg/ml 以上の濃度では完全に DAB 反応産物はみられなくなった。

5) 熱処理による抑制：組織切片の 56°C 30分熱処理により PAPIgG の結合活性は失活し, DAB 反応産物はほとんどみられなかった。

#### 生体内で胚中心に分布する免疫複合体の検出

能動免疫動物、受動免疫動物ではいずれも同じ所見を示し、濾胞胚中心に HRP が網目状にみられた。(写真12) 電顕ではこの HRP の分布は FDC の細胞表面及び突起とリンパ球との間隙の不定形物質に一致してみられた。(写真13) この分布は凍結組織切片上で結合する PAPIgG の分布と同じであった。一部にはマクロファージのライソゾーム内にも HRP がみられた。無処置のラットでは濾胞胚中心に HRP はみられなかった。

### 考 察

抗原が濾胞胚中心の FDC に捕捉、保持される過程には特異抗体の存在が必要とされ、免疫複合体の形と

なった抗原が、リンパ節では FDC に似た形態の細胞を介し被膜下洞から胚中心へ<sup>30)</sup>、脾ではリンパ球を介して濾胞辺縁域から胚中心へ運ばれる<sup>6), 34), 35)</sup>と考えられている。動物にコブラ毒因子を投与し C3 を低下させておくと胚中心へ免疫複合体がとりこまれないこと<sup>4), 13), 25)</sup>から、この過程に C3 が必要とみなされている。実際、C3R が脾の濾胞辺縁域から濾胞、リンパ節のリンパ洞と皮質、バイエル板の濾胞に存在することが知られている<sup>8), 28)</sup>。FDC もまた C3R を持つことが示され、かつ電顕で免疫複合体が保持されている部位に C3 が検出されている<sup>6), 12), 36)</sup>。さらに FDC の細胞突起表面に、免疫複合体と結合していると考えられる C3 も検出されている<sup>36)</sup>。これらの観察は、少なくとも免疫複合体が胚中心に運ばれ FDC に捕捉、保持される過程に C3 が関与している可能性を示している。

一方 FDC は C3R 以外に、免疫複合体と結合できる FcR を持つこと<sup>12), 33)</sup>、細胞表面に大量の Clq が存在すること<sup>19)</sup>が知られている。しかしながら FcR と Clq については不明な点が多い。このような点をふまえ、今回の研究では凍結組織切片を使って *in vitro* の胚中心へ直接免疫複合体 (PAPiG) を反応させることにより、その結合様式を検討した。

その結果、脾、リンパ節とバイエル板の胚中心に凍結組織切片上で APIgGP が結合し、網目状に分布していた。この PAPiG の分布は生体内で胚中心にとりこまれる免疫複体の分布と同じであった。この点については Dijkstra ら<sup>5)</sup>の報告と一致するものであるが、今回の研究ではさらに電顕観察によって、凍結組織切片の胚中心に結合する PAPiG の分布と生体内で胚中心にとりこまれている免疫複体の分布がともに FDC の細胞表面及び突起とリンパ球との間隙にあることを確認した。

この *in vitro* における PAPiG の結合が C3R, FcR, Clq 等、どのような物質を介しておこっているのか問題となる。しかし少なくとも今回使用した PAPiG には作製過程から考えて C3 の混入は考えられず、まず C3R 関与の可能性は否定される。一方この PAPiG の結合分布は胚中心でみられる Clq の分布に一致しており、そして(1)対照実験からは Fc 部分のない PAPF(ab')<sub>2</sub> と HRP 単独では結合せず Fc 依存性の結合であることが示される、(2)抑制実験から PAPiG を結合させる物質は熱凝集 IgG、免疫複合体と強い親和性を示すが monomeric IgG とはほとんど親和性を示さない、(3)ポリアニオンであるヘパリ

ンや抗 ClpF(ab')<sub>2</sub> で抑制をうける。(4)易熱性である、ことが示された。このように PAPiG を結合させる物質は Clp と同じ特性<sup>2), 3), 21), 26)</sup>、同じ抗原性を持ち、さらに同じ部位に存在しており両者は同一物質と考えられる。すなわち *in vitro* で結合する PAPiG は Clq に結合していると考えられる。

次にこの Clq の由来についてであるが、山川<sup>36)</sup>は体液中の Clq が免疫複合体に結合して運ばれてきたものではないかと考えている。一方 McManus ら<sup>19)</sup>は胚中心内での Clq の合成、分泌を確認している。しかし彼らは Clq 合成細胞の細胞種は明らかにしていない。今回、Clq は細胞外のみならず FDC の外側核膜及び小胞体膜にも認められ、FDC において Clq が合成されるものと考えられた。また細胞外にみられる Clq も FDC の細胞表面から連続性であり、FDC で合成された Clq が分泌された像と考えられた。

Loos<sup>15)</sup>はマクロファージにおいて Clq が合成、分泌されることを示している。その分泌される過程で、細胞膜にくみこまれた Clq の免疫グロブリン結合部位が FcR として働く現象を明らかにしている。FDC においても Clq の合成、分泌過程において、マクロファージと同じ現象がおこっている可能性がある。すなわち FDC は FcR を持つことが示されている<sup>12), 33)</sup>がこの FDC の FcR として Clq が働いているかもしれない。また Clq は免疫グロブリンの Fc 部分との結合基を 6 個持っており<sup>27)</sup>、*in vitro* の条件では可溶性免疫複合体と Clq が結合して不溶性になる<sup>1), 21)</sup>ことが知られている。このような Clq の性質からみて Clq による免疫複合体間の架橋すなわち不溶化がリンパ濾胞胚中心でも起こり、免疫複合体保持をより安定にしている可能性も考えられる。

以上、今回の研究では FDC の表面すなわち免疫複合体が保持される部位に免疫複合体結合活性をもった Clp が大量に検出された。免疫複合体は補体結合能があり、この Clq のあるものは体液由来の Clq が免疫複合体に結合して運ばれてきたものと考えられるが、同時に FDC 自からが合成し、膜表面に保有あるいは分泌していることが明らかになった。この Clq の生物学的な真の役割割りについてはなお今後の研究を必要とするが少なくとも FDC における免疫複体の保持に関与している可能性は示されたものと考えられる。

## 結 語

ラットのリンパ組織を用い、凍結組織切片で濾胞胚中心に免疫複合体として PAPiG を直接反応させ、



その結合を組織学的に光顕ならびに電顕で観察し以下の成績を得た。

1) 脾, リンパ節, パイエル板の濾胞胚中心にはいずれも凍結組織切片上で PAPIgG の結合がみられた。

2) PAPIgG は胚中心の濾胞樹枝状細胞 (FDC) の細胞表面及び突起とリンパ球との間隙に結合していた。この結合部位は FDC が生体内で保持している免疫複合体のみられる場所に一致していた。

3) FDC が保持している免疫複合体と同じ部位に Clq が認められた。PAPIgG の結合機序を検討するとこの Clq に結合していることが明らかとなった。

## 文

- 1) Agnello V, Winchester RJ, Kunkel HG: Precipitin reaction of the Clq component of complement with aggregated  $\gamma$ -globulin and immune complexes in gel diffusion. *Immunology*, 19, 909-919, 1970
- 2) Augener W, Grey HM, Cooper NR, Müller-Eberhard HJ: The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with Cl. *Immunochimistry*, 8, 1011-1020, 1971
- 3) Burton DR, Boyd J, Brampton AD, Easterbrook-Smith SB, Emanuel EJ, Novotny J, Rademacher TW, Van Schravendijk MR, Sternberg MJE, Dwek RA: The Clq receptor site on immunoglobulin G. *Nature*, 288, 338-344, 1980
- 4) Chen LL, Frank AM, Adams JC, Steinman RM: Distribution of horseradish peroxidase (HRP)-anti-HRP immune complexes in mouse spleen with special reference to follicular dendritic cells. *J. Cell Biol*, 79, 184-199, 1978
- 5) Dijkstra CD, Velde AA, Van Rooijen N: Localization of horseradish peroxidase (HRP)-anti-HRP complexes in cryostat sections: Influence of endotoxin on trapping of immune complexes in the spleen of the rat. *Cell Tissue Res*, 232, 1-7, 1983.
- 6) Gerdes J, Stein H: Complement (C3) receptors on dendritic reticulum cells of normal and malignant lymphoid tissue. *Clin. exp. Immunol*, 48, 348-352, 1982
- 7) Graham RC, Karnovsky MJ: The early stages of absorption of injected horseradish perox-

idase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by new technique. *J. Histochem. Cytochem*, 14, 291-302, 1966

以上, 今回 FDC が Clq を合成, 分泌していることが示された。この Clq が免疫複合体結合能を有していることから FDC の免疫複合体の捕捉, 保持において Clq が関与する可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり, 懇篤なる御指導を賜りました白澤春之教授へ心からの感謝の意を表します。また直接御指導を頂いた室博之博士ならびに技術的協力を頂いた金田正昭技官に感謝いたします。

## 献

- idase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by new technique. *J. Histochem. Cytochem*, 14, 291-302, 1966
- 8) Gray D, McConnell I, Kumararatne DS, MacLennan ICM, Humphrey JH, Bazin H: Marginal zone B cells express CR1 and CR2 receptors. *Eur. J. Immunol*, 14, 47-52, 1984
- 9) Grey HM, Kunkel HG: H chain subgroups of myeloma proteins and normal 7s  $\gamma$ -globulin. *J. exp. Med*, 120, 253-266, 1964
- 10) Hanna MG, Szakal AK: Localization of  $^{125}$ I-labeled antigen in germinal centers of mouse spleen: Histologic and ultrastructural autoradiographic studies of the secondary immune reaction. *J. Immunol*, 101, 949-962, 1968
- 11) Höffken K, McLaughlin PJ, Price MR, Preston VE, Baldwin RW: Rat Clq: Similarity to human Clq in functional and compositional properties. *Immunochemistry*, 15, 409-412, 1978
- 12) Humphrey JH, Grennan D: Isolation and properties of spleen follicular dendritic cells. *Adv. exp. Med. Biol*, 149, 823-827, 1982
- 13) Klaus GGB, Humphrey JH: The generation of memory cells I. The role of C3 in the generation of B memory cells. *Immunology*, 33, 31-40, 1977
- 14) Klaus GGB, Humphrey JH, Kunkel A, Dongworth DW: The follicular dendritic cell: Its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunol. Rev*, 53, 3-28, 1980

- 15) Loos M: Biosynthesis of the collagen-like Clq molecule and its receptor functions for Fc and polyanionic molecules on macrophages. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 102, 1-56, 1983
- 16) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951
- 17) Mandel TE, Phipps RP, Abbot AP, Tew JG: Long-term antigen retention by dendritic cells in the popliteal lymph node of immunized mice. *Immunology*, 43, 353-362, 1981
- 18) McLean IW, Nakane PK: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative a new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem*, 22, 1077-1083, 1974
- 19) McManus LM, Nakane PK: Mouse Clq: Light and electron microscopic immunohistochemical localization. *J. Immunol*, 126, 1421-1427, 1981
- 20) 三井但夫: Peroxidase. 新酵素組織化学, 朝倉書店, 1980, p141-150
- 21) Müller-Eberhard HJ, Kunkel HG: Isolation of a thermolabile serum protein which precipitates r-globulin aggregates and participates in immune hemolysis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med*, 106, 291-295, 1961
- 22) Nakane PK, Pierce GB jr: Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem*, 14, 929-931, 1967
- 23) Nossal GJV, Ada GL: Antigens, lymphoid cells and the immune response. Academic Press' N. Y, 1971
- 24) Ouchterlony Ö, Nilsson LÅ: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis in hand book of experimental immunology, chapter 19. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978
- 25) Papamichail M, Gutierrez C, Embling P, Johnson P, Holborow EJ, Pepys MB: Complement dependence of localization of aggregated IgG in germinal centres. *Scand. J. Immunol*, 4, 343-347, 1975
- 26) Raeppe E, Hill H, Loos M: Mode of interaction of different polyanions with the first(C1,Ci), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement-1. *Immunochemistry*, 13, 251-255, 1976
- 27) Shelton E, Yonemasu K, Stroud RM: Ultrastructure of the human complement component, Clq. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 65-68, 1972
- 28) Shevach EM, Jaffe ES, Green I: Receptors for complement and immunoglobulin on human and animal lymphoid cells. *Transplant. Rev.* 16, 3-28, 1973
- 29) Sternberger LA, Hardy PH jr, Cuculis JJ, Meyer HG: The The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem*, 18, 315-333, 1970
- 30) Szakal AK, Holmes KL, Tew JG: Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. *J. Immunol*, 131, 1714-1727, 1983
- 31) Tew JG, Phipps RP, Mandel TE: The maintenance and regulation of the humoral immune response: Persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev*, 53, 175-201, 1980
- 32) Tew JG, Thorbecke G, Steinman RM: Dendritic cells in the immune response: Characteristics and recommended nomenclature (a report from the reticuloendothelial society committee on nomenclature) *J. Reticuloendothel. Soc*, 31, 371-380, 1980
- 33) Tsunoda R, Yaginuma Y, Kojima M: Immunocytological studies on the constituent cells of the secondary nodules in human tonsils. *Acta Pathol. Jpn*, 30, 33-57, 1980
- 34) Van Rooijian N: Immune complexes in the spleen: Three concentric follicular areas of immune complex trapping, their interrelationships and possible function. *J. Reticuloendothel. Soc*, 21, 143-151, 1977
- 35) Veerman AJP, Van Rooijen N: Lymphocyte

- capping and lymphocyte migration as associated events in the in vivo antigen trapping process. An electron-microscopic autoradiographic study in the spleen of mice. *Cell Tiss. Res*, 161, 211-217, 1975
- 36) 山川光徳：甲状腺組織内リンパ濾胞の機能と構造に関する免疫組織化学的研究。日網会誌, 25, 15-32, 1985
- 37) Yonemasu K, Stroud RM: Clq: Rapid purification method for preparation of monospecific antisera and for biochemical studies. *J. Immunol*, 106, 304-313, 1971
- 36) 山川光徳：甲状腺組織内リンパ濾胞の機能と構造

### 写 真 説 明

1. ラット Clq(a), ヒト Clq(b), 抗ヒト Clq ウサギ IgG(c); 2本の沈降線は融合する。
2. PAPIgG と Clq の二重染色; PAPIgG の結合 (DAB 反応産物, 茶褐色) と Clq の分布 (4-Cl-1-naphthol 反応産物, 青紫色) は一致し, 黒褐色の反応産物として網目状にみられる。脾胚中心,  $\times 400$
3. 胚中心に結合した PAPIgG の分布
  - a. リンパ節,  $\times 300$
  - b. 脾,  $\times 200$
  - c. バイエル板,  $\times 120$
4. 胚中心における Clq の分布
  - a. リンパ節,  $\times 300$
  - b. 脾,  $\times 200$
  - c. バイエル板,  $\times 120$
5. PAPIgG を反応させた PLP 固定凍結組織切片; PAPIgG はイソプロピルアルコール固定凍結組織切片と同じ分布を示している。  
バイエル板胚中心,  $\times 230$
6. 5の電顕像; 胚中心のリンパ球をとりまく FDC の細胞突起間に PAPIgG の結合がみられる。無染色,  $\times 7200$
7. 5の電顕像; 細胞突起を伸展させた FDC がみられ, 細胞表面及び突起間に PAPIgG の結合がみられる。  
鉛ウラニウム染色,  $\times 10000$
8. 5の電顕像; FDC 細胞突起間及びリンパ球との間隙の不定形物質に一致して PAPIgG の結合がみられる。  
無染色,  $\times 13000$
9. Clq の免疫電顕; 複雑に伸展させた FDC の突起表面及びリンパ球との間隙に Clq が分布する。脾胚中心。  
無染色,  $\times 14500$
10. Clq の免疫電顕; FDC の細胞表面のみならず細胞内において外側核膜 (▲) や小胞体膜に沿って Clq が検出される。脾胚中心, 鉛染色,  $\times 15800$
11. Clq の免疫電顕, 強拡大; FDCの外側核膜 (▲) 及び小胞体膜に沿って Clq が検出される。脾胚中心, 鉛染色,  $\times 38100$
12. 抗 HRP 血清で受動免疫したラットに HRP を静注72時間後の脾; 胚中心には網目状に HRP の分布がみられる。 $\times 230$
13. 12と同じ動物の電顕像; HRP は FDC の細胞表面及びリンパ球との間隙に分布している。無染色,  $\times 16500$

















