

マウス肝類洞構成細胞の Fc receptor. とくに類洞内皮細胞における Fc receptor の存在について

浜松医科大学病理学第二講座

室 博 之, 白 澤 春 之
高 橋 洋 平

(昭和54年10月1日受付)

緒 言

前報において、われわれは Fc receptor (FcR) の新しい組織学的検出方法を述べ、あわせて肝類洞に FcR を保有する細胞がきわめて多数存在することを観察した¹⁾。しかしながら、FcR 保有細胞が肝類洞を構成する細胞のいずれかについては未解決であった。そこで今回、組織化学的方法および各種異物の血管内投与と FcR 検出反応を組み合わせ、細胞種の同定に努めた。その結果、Kupffer 細胞とともに類洞内皮細胞も FcR を保有することを明らかにできた。

材料および方法

動物および FcR の組織学的証明

6~10 週令の ICR/SLC 雄マウス肝を対象として FcR を検索した。FcR の検出方法は前報による¹⁾。すなわち、horseradish peroxidase (HRPO) を抗原とする抗原過剰域免疫複合体 (PAPiG) を Cytokeep (isopropyl alcohol と polyethylen glycol の合剤、日本商事) 固定凍結切片と室温で30分反応させたのち、PAPiG と FcR の結合をベンチジン反応で可視的にする方法である。なお、ベンチジン反応は前回と同じく室温5分である。

FcR 検出における PAPiG の対照として PAPF (ab')₂ と単独 HRPO 溶液を使い、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーで分離し免疫電気泳動上純粋であったマウス (ICR/SLC) IgG, ウサギ IgG およびヒト IgG による抑制実験も実施した。

異物注入による類洞細胞の標識

粒子径 0.03 μ の colloidal carbon (Gunter Wa-

gner, Germany Lot-11-1431/a, 100 mg/ml)²⁾ を 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.3 (PBS) で透析した後、PBS で10倍に稀釈して 0.5ml/1 匹あて尾静脈内に注入した。別の群には 0.8 μ の Latex (Bact-latex 0.81, code 3102, Difco Labo, Detroit Mich) を PBS で5倍稀釈して 0.5ml/1 匹あて尾静脈内に投与した。colloidal carbon および Latex 投与動物のそれぞれを投与後2時間後、sodium pentobarbital (Nembutal, Abott Labo., Noth Cicago, Illinois) による麻酔下に開腹し、門脈内にヘパリン加組織培地 199 を注入して肝血管腔を洗浄した。さらに清野の方法³⁾ で調製したりチオンカルミン液を尾静脈および腹腔内に投与したマウスも準備し、同様に肝血管腔を洗浄した。これらの異物投与動物肝を細切し、アセトン・ドライアイスで凍結した。

内因性 peroxidase および acid phosphatase の組織化学的検出

内因性 peroxidase 活性は 0.005% H₂O₂ を含む 0.02 % 3-3' diaminobenzidine の 0.05M Tris HCl 加生食溶液 (PH7.6) で室温 5分, 15分, 30分, 1時間と反応時間をかえて検討した。

Acid phosphatase (Acid-Pase) は Brustone の naphthol AS phosphate 法⁴⁾ によって検出し、fast blue RR salt を使って Acid-Pase 活性陽性部を青紫色に染めた。FcR と Acid-Pase 活性を同一切片上でみる場合は PAPiG を 0.15M NaCl を含む 0.01N Tris HCl buffer, pH. 7.3 で透析した。Acid-Pase 検出時使用する組織切片洗浄液も PBS を避け、0.15 M NaCl 加 Tris HCl buffer, pH. 7.3 を使用した。

結 果

i) Colloidal carbon 投与肝

肝類洞を構成する細胞の大部分が炭粉粒子を摂取した。この炭粉摂取細胞は炭粉を大量に摂取し、一見、炭粉の塊りと化した腫大細胞とほっそりした細胞で炭粉粒子が点在するものの二種に大別できた。このうち大量摂取細胞は肝小葉周辺帯に多かった。なお、中心静脈近くのほとんどの類洞細胞は炭粉を摂取しなかった(写真1, 2)。大量炭粉摂取細胞は36%, 少量摂取細胞は47%であった(表1)。

ii) Latex 投与肝

肝類洞を構成する細胞の36%が Latex 粒子を貪食し、残りの64%の細胞には Latex 粒子をみとめなかった(写真3)(表1)。Latex 摂取細胞は炭粉大量摂取細胞と同じく小葉周辺帯に密度が高かった。

iii) リチオンカルミン投与肝

紫赤色のリチオンカルミン顆粒を大量に摂取した腫大細胞が Latex 貪食細胞と同一分布でみられ、類洞構成細胞の37%に相当した。炭粉投与でみられた少量摂取細胞にあたるものは認められなかった(写真5)(表1)。

iv) 内因性 Peroxidase

異物非投与肝および異物投与肝ともにベンチジン反応の時間が5分から15分では内因性 peroxidase は検出できなかった。しかし、30分では異物投与の如何にかかわらず類洞構成細胞の700~1000個中35~38%にベンチジン反応が陽性となり、1時間後にもその比率は変らなかった。内因性 peroxidase 陽性細胞の肝小葉内分布はいずれの条件下でも肝小葉周辺帯に密度が高く、炭粉大量摂取細胞、Latex 摂取細胞(写真3)およびリチオンカルミン摂取細胞(写真5)と一致していた。なお、炭粉を少量摂取した細長い細胞には内因性 peroxidase 活性をみとめることはできなかった。

v) Acid phosphatase

異物非投与肝および colloidal carbon 投与肝に実施し、Acid-Pase 陽性細胞は内因性 peroxidase と同一分布を示し、炭粉大量摂取細胞に活性を認めた。

vi) Fc receptor の検出

異物非投与肝および投与肝ともにほぼ類洞壁と一致してPAPIgGが結合したが、中心静脈近くの類洞細胞では陽性のは少なかつた。炭粉投与肝では炭粉大量摂取細胞および少量摂取細胞に一致して PAPIgG の結合が観察された(写真1, 2)。しかし、中心静脈近くに多数認められた PAPIgG 陰性細胞は炭粉摂取能を示さなかつた(写真1)。グリソン氏鞘に近接した類洞には1つのグ氏鞘につき1~2個程度であるが少量の炭粉を摂取し PAPIgG 陰性の細胞もあつた。Latex 投与肝およびリチオンカルミン投与肝では各々を摂取した細胞のみならず非摂取細胞にも PAPIgG の結合がみられた(写真4, 6)。中心静脈近くに PAPIgG を結合しない細胞があつたことは炭粉投与肝と同じであつた。なお、中心静脈、肝動脈および門脈内皮はわれわれの使った条件下では FcR を証明できなかった。Acid-Pase 反応とFcR検出反応とを同一切片上で実施した場合、Acid-Pase 陽性細胞のみでなく陰性細胞の多くにも PAPIgG が結合し、その分布は異物投与および非投与肝とも同一であつた。

vii) 対照実験および抑制実験

FcR 検出反応における PAPIgG の対照とした PAPF (ab')₂ と HRPO 単独は類洞壁とは結合しなかつた。

native IgG による抑制実験では PAPIgG 1.0mg につき10~5mgのマウス IgG を加えた時に完全抑制が起つた。2.5mg と 1.25mg では抑制は不完全であつた。ウサギとヒトの IgG では 10mg で完全抑制を起し、5mgから1.25mgでは不完全抑制であつた。

表 1

異物投与時の肝類洞細胞の異物摂取状態

	炭	粉	Latex (0.8μ)	リチオンカルミン
算 定 細 胞 数	8	5	0	8
多 量 摂 取 細 胞 (%)	3	6	3	6
少 量 摂 取 細 胞 (%)	4	7	0	0
非 摂 取 細 胞 (%)	1	7	6	4

考 察

肝類洞壁にFcRを保有する細胞がきわめて多数存在することは前報からも明らかである¹⁾が、今回、さらにFcRの検索対象としたマウス(ICR/SLC)のIgGで明確な抑制をみたことからFcRの存在は確かになったといえるであろう。このFcRを保有する細胞種の同定が今回の研究の目的である。

肝類洞壁を構成する細胞として内皮細胞^{5) 6)}, Kupffer 星細胞^{5) 6) 7)}, 脂肪摂取細胞(伊藤細胞)^{8) 9)}およびpit cell¹⁰⁾の4種が知られている。このうち内皮細胞とKupffer細胞の関係については諸説があり一致した見解をみていないが、二説に大別することができる。第一の説は内皮細胞とKupffer細胞は同一細胞であり、両者の違いは単なる機能表現型の差であるとする考えである。すなわち、Kupffer細胞は食食機能が亢進した内皮細胞であるというものである^{5) 8) 11)}。第二の説は内皮細胞とKupffer細胞は各々その起源を異にし、相互に移行はしないとすものである¹²⁻¹⁷⁾。van FurthらのKupffer細胞の由来を血液単球に求めるmononuclear phagocyte system説^{14) 15)}と、Wisse¹⁷⁾および小島ら^{12) 13)}による、Kupffer細胞は血管内皮、血液単球あるいはその他細胞から移行するものではなく組織球に帰属するものであるとの考えがこのなかに含まれる。しかし、Kupffer細胞と内皮細胞の起源の如何にかかわらず、その形態および機能表現にはそれぞれの特徴をみとめうとするのが現在の趨勢であろう。

Kupffer細胞は形態ならびに機能的に大食細胞としての特徴をそなえ^{13) 17)}、その形態はさまざまであるが、基本的には星状型である^{9) 13)}。一方、内皮細胞はおおむね流線型であり、その核周囲細胞質が類洞内腔に向ってわずかに隆起し、平坦な突起が類洞内面をおおうように広がっている^{9) 13) 18)}。内皮細胞は食飲によって異物を摂取するがその摂取力はKupffer細胞よりはるかに低い^{2) 13)}。さらに、光学顕微鏡で識別できる両者の相違点として摂食可能な異物の大きさ^{2) 19)}と内因性peroxidase活性^{2) 7) 20) 22)}を挙げることができる。すなわち、Kupffer細胞は 0.1μ 以上の粒状物をも摂取し、内因性peroxidase活性を持つが、内皮細胞は 0.1μ 以下のものを少量食飲し、内因性peroxidase活性を持たないことである。われわれの実験系においても内因性peroxidaseを持ち 0.8μ のラテックス粒子ないし、多量の炭粉やリチオンカルミンを摂取する細胞と内因性peroxidase陰性で炭粉

を少量摂取するものの二種が識別できた。また、内因性peroxidase陽性細胞は異物投与の如何にかかわらず類洞構成細胞のほぼ36%を占めたことはラット肝での報告^{2) 19) 20)}とも一致するものであり、それぞれをKupffer細胞と内皮細胞とみなしてよいであろう。異物投与肝にFcR検出反応を実施した結果から、積極的に異物を摂取する細胞すなわちKupffer細胞がFcRを持ち、さらに、少量の炭粉を摂取する内皮細胞も明らかにFcRを保有しているといえる。

さらに、類洞構成細胞として脂肪摂取細胞とpit細胞のFcRの有無が問題となる。脂肪摂取細胞はビタミンAを含む大量の脂質を保有する細胞であり²¹⁾、線維芽細胞のように膠原線維形成にも関係しているとされている^{23) 24)}が、異物の摂取および内因性peroxidase活性はみとめられていない²²⁾。pit細胞はWisse¹⁰⁾によって発見されたものであり、特徴的な内分泌顆粒状物を持ち異物摂取能がないことが明らかにされている程度で詳細は不明である。これら二種の細胞のFcRの有無については電顕レベルで決定されるべきであるが、炭粉投与動物肝の所見から、FcRは異物を摂取する細胞に限定される可能性が大きいいため、異物摂取能のない脂肪摂取細胞とpit細胞はFcRを持たないものと考えられる。

以上、肝類洞壁においてはKupffer細胞と内皮細胞の二種類がFcRを保有することを組織学的に証明した。Kupffer細胞のFcRについては単離生細胞を対象とした多くの研究²⁶⁻²⁸⁾と一致するものである。この細胞のFcRの存在意義については多くの問題があるがimmunological phagocytosis²⁹⁾における意義が最も重要な点であろう。しかし、われわれの知り得る限りでは肝類洞内皮のFcRの存在を明確にした報告はなく、このFcRの意義については今後の研究にまたねばならない。しかし、われわれの実験結果はこの点について若干の示唆を与える。肝内血管系の内皮細胞のうち炭粉を摂取できる類洞内皮がFcRを持つことからみて、Kupffer細胞と同じく類洞内皮のFcRも免疫学的異物食飲に関与しているのかもしれない。

結 語

前報において、組織固定剤を使った新しいFc receptor (FcR)の組織学的検索方法とともに、マウス肝類洞壁に多数のFcR保有細胞があることを述べた。このFcR保有細胞が如何なる細胞かは未解決であった。この問題を解決すべく、以下の実験を行った。

1. FcR の検索は光顕用として最も優れた方法である Cytokeep 固定凍結切片に peroxidase antiperoxidase IgG (PAPIgG) を使う方法によった。

2. 類洞構成細胞の性格を決めるために、墨汁、ラテックスおよびリチオンカルミンのそれぞれの血管内投与による異物摂取細胞の標識、acid phosphatase および内因性 peroxidase に対する組織化学を FcR 検索に合せて行った。

実験結果は以下の通りである。

文

- 1) 室博之, 白沢春之, 高橋洋平, 五藤雅博: Fc receptor の組織学的証明方法の検討. マウス肝を対象として, 日網会誌, 20: 13, 1980.
- 2) Widmann, J.J., Cotran, R.S. and Fahimi, H. D.: Mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells. *J. Cell. Biol.* 52: 159, 1972.
- 3) 清野謙次: 生体染色研究ノ現況及其検査術式, 特ニ生体色素摂取及組織球形細胞説, 3-6頁南江堂, 1921.
- 4) Pease, A.G.E.: *Histochemistry: theoretical and applied.* Churchill Livingstone, London, England, p. 731, 1972.
- 5) 今井大: シンポジウム, 肝の網内系, 肝類洞壁構成細胞の細胞学的研究, 日網会誌, 7: 79, 1967.
- 6) 武内忠男: シンポジウム, 肝の網内系, 肝網内系の組織細胞化学的観察, 日網会誌, 7: 107, 1967.
- 7) Wisse, E.: Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat Kupffer cells. *J. Ultrastruct. Res.* 46: 393, 1974.
- 8) Ito, T. and Shibasaki, S.: Electron microscopic study on the hepatic sinusoidal wall and the fat-storing cells in normal human liver. *Arch. Histol. Jap.*, 29: 137, 1968.
- 9) Wisse, E.: Ultrastructure and function of Kupffer cells and other sinusoidal cells in the liver. In *Kupffer cells and other sinusoidal cells.* Wisse, E. and Knook, L., editor. Elsevier/North-Holland Biomedical Press Ltd., Amsterdam, Netherlands, p. 33-60, 1977.
- 10) Wisse, E., van't Noordende, J.M., v.d. Meulen, J. and Daems, W.T.: The pit cells: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoides and peripheral blood. *Cell Tiss. Res.*

1. FcR は積極的に異物を摂取し acid phosphatase 活性と内因性 peroxidase 活性を持つ Kupffer 細胞と, 少量の 0.03 μ の炭粉を摂取するが acid phosphatase 活性と peroxidase 活性陰性の類洞内皮細胞の二種類の細胞にみられた。

2. 中心静脈近くの洞内皮, 肝動脈内皮, 門脈内皮および中心静脈内皮には FcR をみとめなかった。

※ 本研究の一部は文部省科学研究費 (課題番号357126) の補助による。

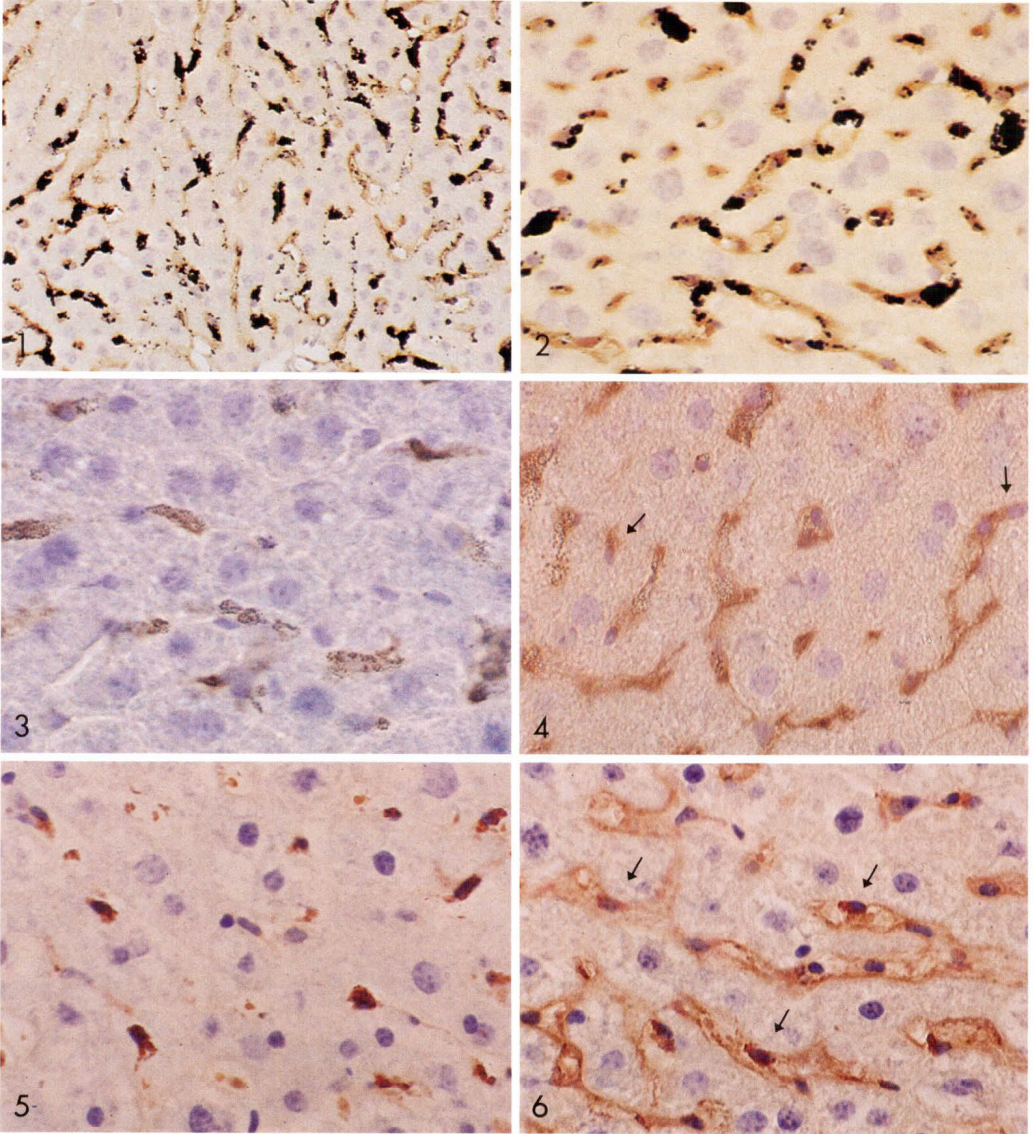
献

- 173: 423, 1976.
- 11) 赤崎兼義: 網内系研究の進歩, 日網会誌, 8: 90, 1968.
- 12) Kojima, M.: Macrophages, Reticuloendothelial system and mononuclear phagocyte system. *Recent Adv. RES Res.* 16: 1976.
- 13) 内藤真: Kupffer 細胞の形態と起源, 日網会誌, 16: 25, 1976.
- 14) van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G. and Langevoort, H. L.: The mononuclear phagocytic system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. WHO.* 46: 845, 1972.
- 15) Crofton, R.W., Disselhoff-den Dulk, M.M.C. and van Furth, R.: The origine, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in normal steady state. *J. Exp. Med.* 148: 1, 1978.
- 16) Widman, J.J. and Fahimi, H.D.: Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver. *Am. J. Pathol.*, 80: 349, 1975.
- 17) Wisse, E.: An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 58: 528, 1972.
- 18) Bloom, W. and Fawcett, D.W.: The liver and gallbladder. In a text book of histology. W.B. Saunders, Co., Philadelphia, U.S.A., p. 688, 1975.
- 19) Emeis, J.J. and Planqué, B.: Heterogeneity of cells isolated from rat liver by pronase digestion: ultrastructure, cytochemistry and

- cell culture. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 20 : 11, 1976.
- 20) Fahimi, H.D. : The fine structural localization of endogenous and exogenous peroxidase activity in Kupffer cells of rat liver. *J. Cell Biol.*, 47 : 247, 1970.
- 21) Wake, K. : "Sternzellen" in the liver : perisinusoidal cells with special reference to storage of Vitamin A. *Am. J. Anat.*, 132 : 429, 1971.
- 22) Ikejiri, N. and Tanikawam. K. : Effect of Vitamin A and estrogen on the sinusoidal cells in the rat liver. In Kupffer cells and other sinusoidal cells. Wisse, E. and Knook, L., editor. Elsevier/North Holland Biomedical Press Ltd. : Amsterdam, Netherlands, p. 83-92, 1977.
- 23) Popper, H. : Hepatic fibrosis : correlation of biochemical and morphologic investigations. *Am. J. Med.*, 49 : 707, 1970.
- 24) McGee, J. ÓD. and Patrick, R. S. : The role of perisinusoidal cells in hepatic fibrogenesis : an electron microscopic study of acute carbon tetrachlorid liver injury. *Lab. Invest.*, 26 : 429, 1972.
- 25) Burkel, W.E. and Low, F.N. : The fine structure of rat liver sinusoids, space of Dissé and associated tissue space. *Am. J. Anat.* 118 : 1966.
- 26) Munthe-Kaas, A.C., Berg, T., Segren, P.O. and Seljelid, R. : Mass isolation and culture of rat Kupffer cells. *J. Exp. Med.*, 141 : 1, 1975.
- 27) Munthe-Kaas, A.C. : Phagocytosis in rat Kupffer cells in vitro. *Exp. cell Res.*, 99 : 319, 1976.
- 28) Crofton, R.W., Disselhoff-den Dulk, M.M.C. and van Furth, R. : The origine, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J. Exp. Med.*
- 29) Rabinovitch, M. : Phagocytic recognition. In mononuclear phagocytes. van Furth, R., editor. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Great Britain, p. 299-315.

写真説明

1. Colloidal carbon 投与肝の FcR ; 類洞の炭粉摂取細胞に一致して褐色 HRPO 反応産物 (FcR) をみとめる。写真左上方は中心帯, 6μ , $\times 300$
2. Colloidal carbon 投与肝の FcR ; 炭粉を大量に摂取した Kupffer 細胞および少量点状に摂取した類洞内皮に褐色 HRPO 反応産物 (FcR) をみとめる。 6μ , $\times 600$
3. 0.8μ のラテックス投与肝の内因性 peroxidase ; ラテックス摂取細胞にのみベンチジン反応が陽性。ベンチジン反応30分。 6μ , $\times 600$
4. 0.8μ のラテックス投与肝の FcR ; ラテックス摂取細胞および非摂取類洞細胞 (\uparrow) に FcR をみとめる。 6μ , $\times 600$
5. リチオンカルミン投与肝の内因性 peroxidase ; リチオンカルミンとベンチジンの褐色反応物からなる赤褐色顆粒状物を持つ Kupffer 細胞がわかる。 6μ , 600
6. リチオンカルミン投与肝の FcR ; 赤色リチオンカルミン摂取細胞 (\uparrow) と非摂取細胞に FcR をみとめる。 6μ , $\times 600$



マウス肝類洞構成細胞の Fe receptor とくに類洞内皮細胞における Fe receptor の存在について