

原 著 VIII

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

森 文美¹⁾, 服部 祐一¹⁾, 藤分 秀司²⁾
山下 昭¹⁾

1) 浜松医科大学解剖学第二講座

2) 浜松ホトニクス中央研究所

(平成4年9月30日受付)
(平成4年10月28日受理)

Study on the morphological nature of activated macrophages and their membrane associated antigenic phenotypes

Fumiyoshi Mori¹⁾, Yuuichi Hattori¹⁾, Hideji Fujiwake²⁾ and Akira Yamashita¹⁾

1) 2nd Department of Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine

2) Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K. K.

We investigated the heterogeneity of the surface morphology and cellular distribution of Ia antigen molecules in macrophages activated with a bacterial antigen OK-432 using scanning electron microscope, digitized fluorescent microscope, and flow cytometer.

Four types of rat peritoneal macrophages were identified by scanning electron microscopy, namely; small and oval cells (type A), medium size cells with long processes (type B), large dish-like cells with processes (type C), and large flat cells with processes (type D).

An intraperitoneal injection of OK-432 resulted in the marked reduction of type A and the gradual increase of types C and D.

Digitized fluorescence microscopy showed that four types of cellular distribution of Ia antigen molecules on the macrophage surface were distinguishable by the contrast-enhanced video image analysis; central type, diffuse type, ring type, and peripheral patch type. A and B type cells tended to show ring or peripheral patch type-Ia antigen distribution. In contrast, type C and D cells showed central or diffuse type-Ia antigen distribution.

The expression of Ia antigen molecules on macrophages increased in proportion to the surface area of the cells, while for the four types of macrophages the relative amount of Ia antigen per unit surface area was almost constant.

The local graft-versus-host reaction assay revealed that the addition of Ia antigen

positive macrophage subset activated with OK-432 resulted in a significant increase in the graft-versus-host reactivity of parental thymocytes, while Ia antigen negative macrophages exerted no such effect.

The results suggest that Ia antigen positive macrophages show a great heterogeneity in both morphology and phenotypic expression, and play an essential role in the acquisition of alloantigen reactivity by immature thymocytes in vivo.

Key words : Macrophages, Morphology, Ia antigen, Activation, Accessory cell function

はじめに

生体内で起こる多くの免疫応答の成立には、リンパ球に抗原情報を提示する抗原提示細胞 (antigen presenting cells; APC)¹⁾が必要である。マクロファージ (M ϕ) は、強い補助細胞活性を持つ APC の 1 つであり、免疫応答の成立とその調節に関与する免疫細胞として、種々の重要な役割を担っている。とくに、細胞性免疫応答において、M ϕ は膜表面に発現する Ia 抗原とサイトカインによって免疫担当細胞相互間の反応における遺伝的特異性 (拘束性) の賦与作用や、移植片や腫瘍細胞に対する細胞障害性 T 細胞の誘導や、自己免疫病の発症の調節作用などに重要な役割をはたしている²⁾。

この Ia 抗原陽性 M ϕ (Ia⁺M ϕ) 自身も抗原刺激や各種のサイトカインの影響で動的に変化し、その形態や機能の多様性を示すことが予想されており、その多様性を介して、免疫応答の微妙な調節作用を発揮すると考えられている。

そこで我々は、不溶性抗原の 1 つである溶連菌製剤 (OK-432) の刺激により M ϕ を活性化した際、M ϕ がどのような表面形態学的変化を示すかを走査型電顕により観察し、さらに、Ia⁺M ϕ における Ia 抗原分子の細胞局在と Ia 抗原量の変化をデジタル蛍光顕微鏡にて観察した。また、T 細胞の細胞性免疫応答に対する Ia⁺M ϕ の調節機能の有無を in vivo 系で解析した。

材料ならびに方法

1. 動物

近交系雄 DA ラット (RT1^a) (6~8 週齢), 雄 Lewis (RT1^b) (4~5 週齢), および雄 (DA \times Lewis) F₁ 雑種 (4~5 週齢) を用いた。動物は、いずれもオーストラリア国立大学ジョン・カーチン医学研究

所 Dr.P.McCullagh より分与され、当教室で繁殖系統維持したものである。オリエンタル MF 固形飼料と飲料水 (市水道) を自由に与え、室温 24 \pm 1.5 度、湿度 55 \pm 5% で飼育した。

2. マクロファージの準備

DA あるいは (DA \times Lewis) F₁ ラットに溶連菌製剤 OK-432 (中外製薬, 東京) を 1KE (streptococcus pyogenes A 群 3 型 Su 株ペニシリン処理凍結乾燥粉末 2.8mg 相当) 腹腔内に注射し, 1, 3, 5, 7, 14 日後にハンクス-MEM 培養液による腹腔洗浄により腹腔滲出細胞を採取し, 洗滌したのちガラス製平板培養皿 (直径 50mm) に移し 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養器内で 1 時間培養した。ついで、浮遊細胞を洗滌により除去して、管底付着法により付着性 M ϕ を分離した²⁾。M ϕ は既報³⁾と同様にして抗ラット M ϕ 単クローン抗体 (Mar1 あるいは Mar3) による免疫組織化学的方法 (間接的ペルオキシターゼ染色法) とフローサイトメトリーにより検定した。その純度は 98% 以上であった。また、生存率はトリパンプル一法で検定し, 95% 以上であった。

3. 走査型電顕的観察

腹腔滲出細胞を付着性のよいスライドガラス上で 37 $^{\circ}$ C 1 時間培養したのち, 付着した M ϕ (2 \times 10⁵ 個) を 2% グルタルアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて 4 $^{\circ}$ C, 2 時間固定した。洗浄ののち 1% 四酸化オスミウム酸-0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて後固定し, アルコール上昇列にて脱水の後, 酢酸イソアミル溶液に浸漬し臨界点乾燥を行い, 金属台に載せ金コーティングを施して, 走査型電顕 JSM35 (日本電子, 東京) を用いて加速電圧 30KV で観察し撮影した。

4. フローサイトメトリーによる検索

腹腔滲出 M ϕ について, 各種のマクロファージ膜抗原を認識する単クローン抗体 (mAb) を一次抗体

として用い、さらに二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG ウサギ F(ab')₂ (Zymed 社, San Francisco, USA) を用いて標識し、フローサイトメーター EPICS-V (Coulter 社, Hialeah, USA) で解析した³⁾。一次抗体としては、当教室で開発した Mar3 および Mar1 (抗ラット M ϕ mAb)³⁾と、OX6 (抗ラット Ia 抗原 mAb), OX18 (抗ラット RT1AmAb) (いずれも Sera lab 社, Sussex, UK) を用いた。なお、対照としては、一次抗体を省略したもの、一次抗体のかわりに 197 (抗ヒツジ汎 T 細胞 mAb) あるいは W3/13 (抗ラット汎 T 細胞 mAb) を用いた。

5. デジタル蛍光顕微鏡による検索

デジタル蛍光顕微鏡 (Digital fluorescent microscope, DFM, C1966-20, 浜松ホトニクス社, 浜松) を用いて生きた M ϕ の形態と Ia 抗原分布を同時観察した。DFM は光学顕微鏡に高性能小型 TV カメラを接続し、低コントラスト像と極微弱光像をとらえ、イメージプロセッサ (画像処理回路としてビデオフレームメモリーを内蔵) をとおして映像信号はコントラスト増強され、さらにデジタル化され、ビデオフレームメモリーへ記憶することができる。

腹腔 M ϕ (5×10^5 個) をスライドガラスチャンバー ($10 \times 20 \times 3$ mm 大) に入れ、ハンクス培養液中で 37°C, 1 時間培養したのち、OX6 と第二抗体により標識したのち洗滌し、さらにハンクス培養液を用い 37°C, 5% CO₂ 培養器内にて 1 時間培養し、生きた M ϕ の形態を微分干渉顕微鏡で観察し、同時に同一細胞の細胞膜上に発現された FITC 標識 Ia 抗原の分布と抗原量 (Photon 数計測, 2 秒間集積) を DAM でそれぞれ観察した。なお、生 M ϕ の生存を維持するため、スライドガラスチャンバー内に、37°C 加温ハンクス培養液を一定速度 (5 ml/分) で還流させた。

6. 局所移植片対宿主反応活性

膝窩リンパ節 (PLN) 肥大による局所移植片対宿主 (GVH) 反応法⁴⁾により、胸腺細胞のアロ抗原反応能を検索した。正常 DA ラット胸腺細胞 (50×10^6 個) を (DA \times Lewis) F₁ 雑種の両側足蹠皮下に投与し、同時に OK-432 活性化腹腔 M ϕ (5×10^6 個) を右側に生食液 (0.1 ml) を左側にそれぞれ投与し、10 日目に PLN 重量を測定し相対的 GVH 反応指数⁵⁾を算定した。

一部の実験では、親系胸腺細胞と M ϕ の直接的投与効果を見るため、宿主側の M ϕ とリンパ球の反応性を前もってコロイドカーボン注射と X 線全身照

射 (700 rad) によりブロックしておいた F₁ 宿主を用い、上記と同様に局所 GVH 反応を検索した⁵⁾。

結 果

1. OK-432 活性化腹腔 M ϕ の経時的变化

OK-432 (1.0 KE) 投与後腹腔内へ滲出する M ϕ 数の経時的变化をみると、総数は投与 1 日目で投与前の値の約 7 倍に急増し、3 日目で約 10 倍になり、以後は漸減し 35 日後に投与前の値に戻った (図 1)。また、その際 OX6 を用いた EPICS-V 解析により Ia⁺M ϕ を検出したところ、投与前は 25~30% が陽性であるが、投与後しだいに増加し、3~5 日目で最高値 (70~80%) に達し以後漸減した。また、Ia⁺M ϕ の絶対数も総数の消長とはほぼ一致して推移した (図 1)。

2. 活性化 M ϕ の走査型電顕による分類

走査型電顕で OK-432 活性化後の M ϕ の表面の形態学的変化を観察した。付着能と貪食能を有する M ϕ は細胞表面の形態学的特徴から、A, B, C, D 型の 4 型が区別された (表 1, 図 2)。

A 型: 小型 (直径 $> 12 \mu\text{m}$) で膜表面に微絨毛様突起が豊富で、ラッフルや小突起が少ないもの (図 2, A),

B 型: 中型 (直径 $> 15 \mu\text{m}$) で小突起とラッフルが中等度に発達し、一方向性にのびる細長い突起がみられるもの (図 2, B),

C 型: 大型 (直径 $> 20 \mu\text{m}$) で円盤状を呈し、中央部の核部が凸状に突出し周辺に小突起とラッフルを出したもの (図 2, C),

D 型: 全体として平板状を呈し、大型で周囲によく発達した小突起とラッフルをもつもの (図 2, D)。

表 1 は各型の M ϕ の形態学的特徴をまとめたものである。

つぎに、OK-432 投与後の腹腔 M ϕ の形態学的諸型の出現頻度をみると、投与前の常在性腹腔 M ϕ は A 型が約 60% 以上を占めており、C, D, B 型の順で少なくなるが、OK-432 を腹腔内投与すると 1 日目より A 型が 20% 以下まで著減し、反対に C, D, B の順で、その割合が増加した (図 3)。

このような傾向は 8 日目まで認められた。すなわち、OK-432 で活性化されると腹腔内へ滲出する M ϕ の形態は比較的短期間で大型化し、ラッフルと小突起が発達し平板状となる傾向がみられた。

3. クラス I 抗原および Ia 抗原陽性 M ϕ の経時

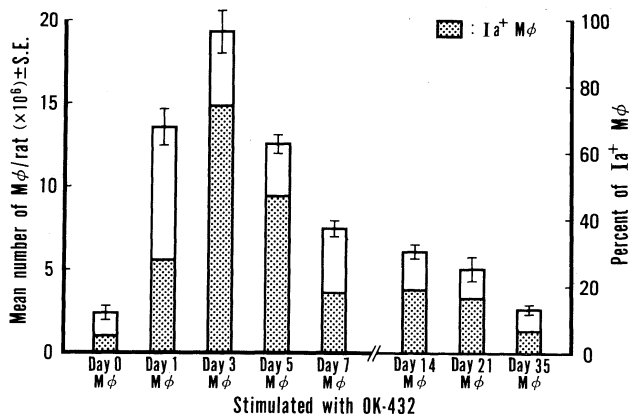


図1 OK-432活性化腹腔マクロファージの経時的変化
OK-432 (1.0KE) を (DA×Lewis) F₁ラットの腹腔内へ投与し、経時的に腹腔滲出細胞を採取し含まれる Mφ の総数、および Ia⁺群 (EPICS-V による解析) の出現率を測定した。Mφ 総数は投与後 3 日でピークに達し、Ia⁺Mφ の比率も約 80% に達する。

□ : 腹腔滲出 Mφ の総数 (Mean ± S.E. 各 6 匹の検索)
▨ : Ia⁺Mφ 群の比率

的变化

DA ラット Mφ のクラス I 抗原 (RT1A 抗原) の発現を EPICS-V で解析したところ、常在性 Mφ は約 70% が陽性であるが、OK-432 投与後 1 日目で約 95% 以上が陽性となり、しかも蛍光強度の強い、いわゆる抗原量の豊富な Mφ の比率が 3～5 日目をピークとして増加し、14 日以降しだいに漸減した (データ省略)。

つぎに、Ia 抗原の発現性を検索した。図 4 は OK-432 刺激後 1 日目と 4 日目の Ia⁺Mφ の EPICS-V 解析例である。1 日目の Mφ と比べ 4 日目の Mφ には Ia⁺Mφ 群が増加し、しかも細胞の大型化がみられた。図 1 に示されたように Ia⁺Mφ 群の比率の経時の変化をみると、OK-432 投与後 3 日目でピークとなり以後漸減し 1 ヶ月後にもとのレベルにもどった。

4. Ia 抗原の細胞局在

DFM により、OK-432 活性化 Mφ の膜上にみられる Ia 抗原の局在をビデオコントラスト増強像で観察したところ、Ia 抗原の細胞局在の違いから、少





なくとも 4 型が区別された (図 5)。

- I 型：中央型 (central type)；Ia 抗原が中央部に集中して分布するもの。
- II 型：び慢型 (diffuse type)；細胞全体にび慢性に均一に分布するもの。
- III 型：リング型 (ring type)；細胞の辺縁にリング状に分布するもの。
- IV 型：辺縁パッチ型 (peripheral patch type)；細胞の辺縁部にパッチ状に数カ所に分布するもの。

生きた Mφ の形態を走査型電顕により分類された A, B, C, D 型の各型に準じて、微分干渉顕微鏡でも観察し、同時に DFM で同一細胞における Ia 抗原の細胞膜局在を観察することにより、各型の Mφ における Ia 抗原分布型の出現頻度を解析した (図 6)。

小型球状の A 型、および中型紡錘状の B 型の Mφ では、主にリング状の III 型と辺縁パッチ状の IV 型が多く、反対に大型円盤状の C 型、および大型平板状の D 型の Mφ では、中央分布型の I 型および、

表1 ラット腹腔マクロファージの走査型電顕的観察による分類

Cell types	Appearance of cell surface	Development of		
		Microvilli	Ruffle	Process
A	 small size & spherical	+++*	±	±
B	 medium size with long process	++	++	+(uni directional)
C	 Large size with disk like process	+	+++	++(multi directional)
D	 large size with flat process	+	+++	++(multi directional)

* : ± ; very weak, + ; weak, ++ ; moderate, +++ ; remarkable

び慢性に分布するII型が多い。とくに、D型Mφは大型で扁平状を呈するためか、Ia抗原は細胞全体にび慢性に広く分布する傾向がみられた。Mφが活性化されると微絨毛様突起が減少し、大型化し付着性の強い扁平状へと形態変化するとともに、膜表面のIa抗原は細胞辺縁より細胞中央部、あるいは細胞全体に移動する傾向がみられた。

5. 各マクロファージ諸型のIa抗原量

OK-432活性化1日目の腹腔Mφについてその形態を微分干渉顕微鏡で観察し、さらにDFMで単位時間当りのphoton数をそれぞれ計測して相対的なIa抗原量を測定した時の実際の解析例{(び慢型(図左), およびリング型(図右))を図7に示す。形態観察で、A, B, C, D各型に分類し各型各々100個につき細胞の直径を検索すると同時に、細胞1個当りのIa抗原量(蛍光量で表示)を測定した(図8)。腹腔Mφ1個当りの相対的Ia抗原量は、A, B, C, D型の順で多く、表面積の広さにほぼ比例していた(図8)。しかし、単位表面面積(100μm²)当りの抗原量は4型ともほぼ同量で一定していた。

6. Ia抗原陽性マクロファージ添加によるアロ抗原反応性T細胞の誘導

PLN肥大法(局所GVH反応法)によって、親系

T細胞前駆細胞(胸腺細胞)と活性化Mφ間の細胞間共同作用の有無を解析した。

常在性MφとOK-432活性化Mφ(投与後1, 3, 5, 7, 14日)を前もって準備しておき、その一定量(20×10⁶個)を親系胸腺細胞(50×10⁶個)のGVH反応開始にひきつづき正常(DA×Lewis)F₁ラット後肢足蹠皮下に投与し、その添加効果を検索した。胸腺細胞単独投与では、有意のGVH反応活性がみられないのに対し、OK-432投与後3, 5, 7, 14日目のMφを投与すると有意のGVH反応活性(平均指数4.0以上)が誘導された(図9)。とくに5日目および7日目のMφ添加では、指数6.0以上のきわめて高い活性がみられた。

図1で示されたOK-432投与後3日以降の腹腔滲出Mφでは、約60%以上がIa抗原陽性のMφであり、細菌性抗原刺激によりIa抗原の膜発現と、活性化に伴う性状変化を遂げたMφによって、胸腺細胞のGVH反応活性がin vivoにおいて誘導されることが示唆された。そこで、OK-432活性化Mφ添加による胸腺細胞のアロ抗原反応能誘導が、Ia⁺とIa⁻のどちらのMφ群によって惹起されるかを明らかにするため、EPICS-VでMφをIa⁺群とIa⁻群に分離・分取し、各群の添加効果を検索した。この実験

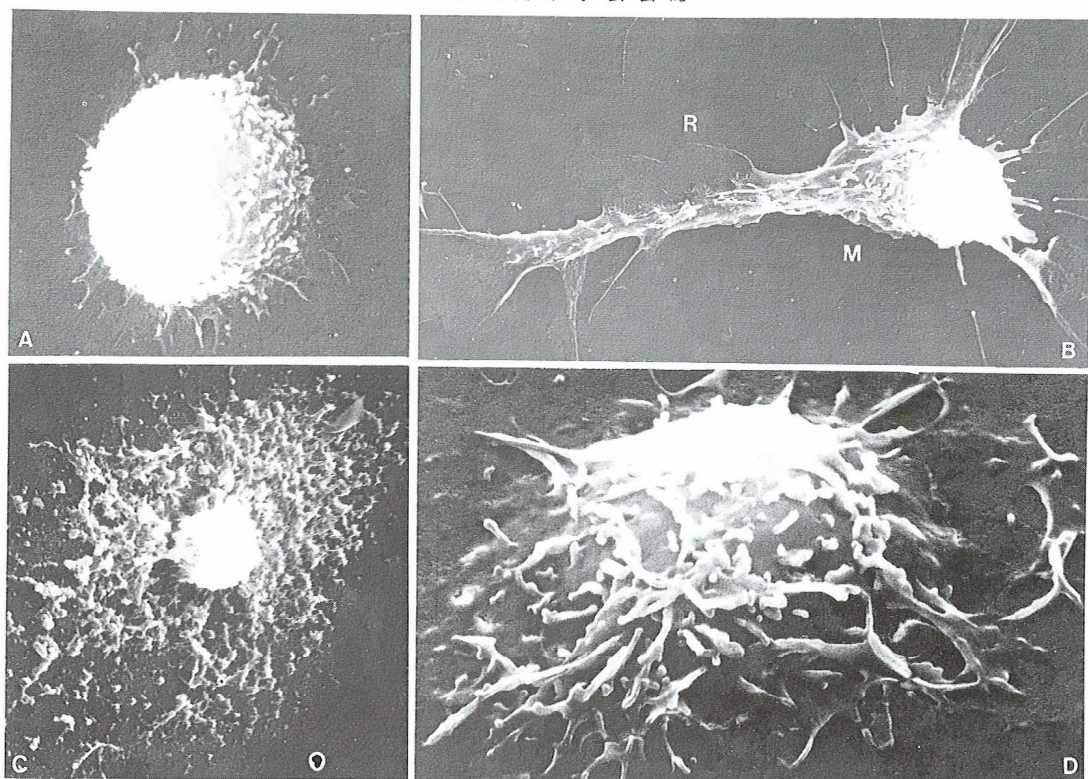


図2 活性化腹腔マクロファージの走査型電子顕微鏡像

OK-432をDAラットの腹腔内に投与し2日目の腹腔滲出Mφを管底付着法で純化し、走査型電顕で観察した。形態学的特徴により、小型球状のA型(A)、中型紡錘状のB型(B)、大型円盤状のC型(C)、および大型平板状のD型(D)の4型が区別された。図は各々典型的な走査型電顕像を示す。

M: 多数の微絨毛様突起 R: ラッフル

では添加Mφの直接的な効果をみるために、F₁宿主側のMφとリンパ球の反応性を前もってブロックし、その関与を除去しておいたF₁宿主を用いた⁵⁾。親系DAラット胸腺細胞(50×10⁶個)を投与し、同時に分離したIa⁺あるいはIa⁻Mφ群(それぞれ5×10⁶個)を同時に添加したのち10日目にGVH反応活性を測定したところ、胸腺細胞単独、Ia⁺あるいはIa⁻Mφ単独投与では、いずれもそのPLN重量は生理的重量と有意の差はみられなかった(表2)。それに対し、胸腺細胞とともにIa⁺Mφ群を投与した際には、指数4.0以上の有意の活性が誘導された。Ia⁻Mφ群投与でも指数2.5の活性がみられたが、PLNの組織学的検索では特有のGVH反応像は認められなかった。すなわち、胸腺細胞をアロ抗原反応性T細胞へ分化・成熟させるMφは、OK-432活性化後3日以降に現れるIa抗原陽性群に存在することが示唆さ

れた。

考 察

生体に広く分布するMφの形態は、その所在部位によりかなり不均一性を示す^{6)~9)}。しかし本研究では、腹腔滲出Mφについてのみ観察した。これまでの腹腔Mφの形態の観察は透過型電顕によるものが大部分で^{9)~11)}、走査型電顕による観察はきわめてすくない。今回我々は、細菌性抗原の腹腔内投与によりラット腹腔滲出細胞を採取し、そこから付着能と貪食能を示すMφを純化し、その形態とIa抗原の発現性とIa⁺Mφのin vivo機能をそれぞれ解析した結果、Mφは活性化にともない形態と機能の面において不均一性を示すことが明らかになった。

まず走査型電顕による型分類の結果、MφはA型、B型、C型、D型の4型に分類できることが明ら

かになった。常在性の腹腔 $M\phi$ は A 型が60%以上を占め、C, D, B 型の順であったが、OK-432で刺激すると1日目より総数が投与前の値の約7倍に急増するとともに、A 型が20%以下に著減し、反対に C, D, B 型の順でその割合が増加した。すなわち、 $M\phi$ は細菌性抗原で刺激されると微絨毛が減少し、大型化し、ラッフルと突起を伸ばした付着性の強い平板型へと形態変化することが明らかになった。このような A 型→D 型への変化は、血液単球が組織遊出して $M\phi$ へ形態変化する過程を呈するものとして興味深い。また、Daems⁹⁾らのいう内因性ペルオキシターゼの局在様式の変化と A 型→B 型への変化との相関は、細胞の成熟過程の違いによるものと考えられる。このような腹腔 $M\phi$ の形態学的特徴に基づく型分類が、その他の各組織内すべての $M\phi$ に適用されるか否かは明らかでない。おそらく、各組織の特有な環境因子、分化成熟段階の違い、活性化の程度、などによって各型の割合が異なることが予想される。しかし、割合の違いはあるにせよ、基本的にはこの型分類は各組織内の $M\phi$ にも適用されると考えられる。

リンパ球の免疫応答における $M\phi$ の主要組織適合抗原による遺伝的特異性(拘束性)の賦与作用は、 $M\phi$ の膜表面へのクラス1抗原、およびクラス2抗原の発現の程度によって調節されている¹²⁾。ラット $M\phi$ の場合、常在性 $M\phi$ はマウス $M\phi$ ¹³⁾と同様に、クラス1抗原は約70%が陽性であるが、OK-432で刺激すると1日目で95%以上が陽性となり、しかも $M\phi$ 1個当たりの抗原量も3~5日目で最大となり以後漸減した。すなわち、 $M\phi$ のクラス1抗原は刺激後直ちに発現され、ほとんど全てのものが陽性となる。これに対し、クラス2抗原(Ia抗原)の発現をみると、常在性 $M\phi$ は約25%が陽性であるが、OK-432を1回腹腔内投与するとしだいに陽性細胞が増加し、3~5日目で最高値(70~80%)に達し、以後漸減し1ヵ月後に元の値に戻った。

クラス1抗原と比べIa抗原は定常時では発現量が低く、組織内での $Ia^+M\phi$ の比率はほぼ一定している¹⁴⁾。刺激をうけると比較的ゆっくりと出現し、しかも長期間持続する傾向がみられる。Ia抗原の代謝回転速度がクラス1抗原と比べより緩慢であると考えられる。

従来の報告¹⁴⁾¹⁵⁾では、 $Ia^+M\phi$ 群と $Ia^-M\phi$ 群には形態学的相違はみられないし、免疫学的機能以外の各種の性状にも両群間に有意の差はみられない。本

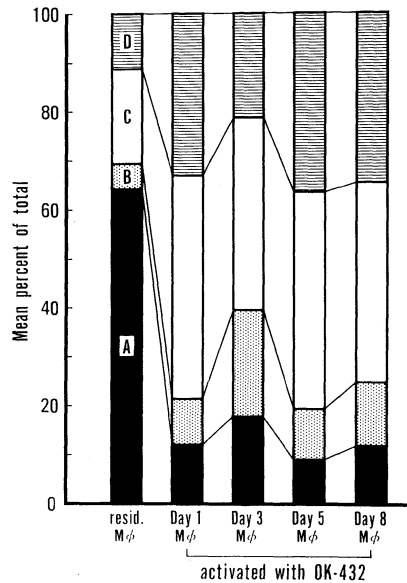


図3 腹腔マクロファージの経時的形態学的変化

活性化されたDAラット腹腔内滲出 $M\phi$ を走査型電顕で経時的に観察した。OK-432投与前、および投与後1, 3, 5, 8日目の各 $M\phi$ (各400個) について、A型(■), B型(▨), C型(□), D型(▤)の4型に分類し、その出現比率を算定した。

研究でも同様の所見を見出ししている。Ia抗原がどのように $M\phi$ 膜上へ表出され、その後どのように回転するかその詳細は明らかではない。Unanue¹⁴⁾は $M\phi$ におけるIa抗原の発現は、 $M\phi$ の活性化の程度、免疫学的ならびに非免疫学的刺激、サイトカインや局所ホルモンなどの組織環境因子、分化段階の違い、などによって調節されていることを提唱している。in vivo 系の研究¹⁴⁾では、投与刺激物の種類によって腹腔 $Ia^+M\phi$ の出現の程度は異なるといわれ、ペプトン、ミネラルオイル、チオグリコレートなどの投与では $M\phi$ 総数は投与前の約10倍に達するが、そのほとんどは $Ia^-M\phi$ 群であり $Ia^+M\phi$ 群は増加しない。それに対し、リステリア菌、結核菌など細菌性抗原の投与では $Ia^+M\phi$ 群が著増する¹⁴⁾。

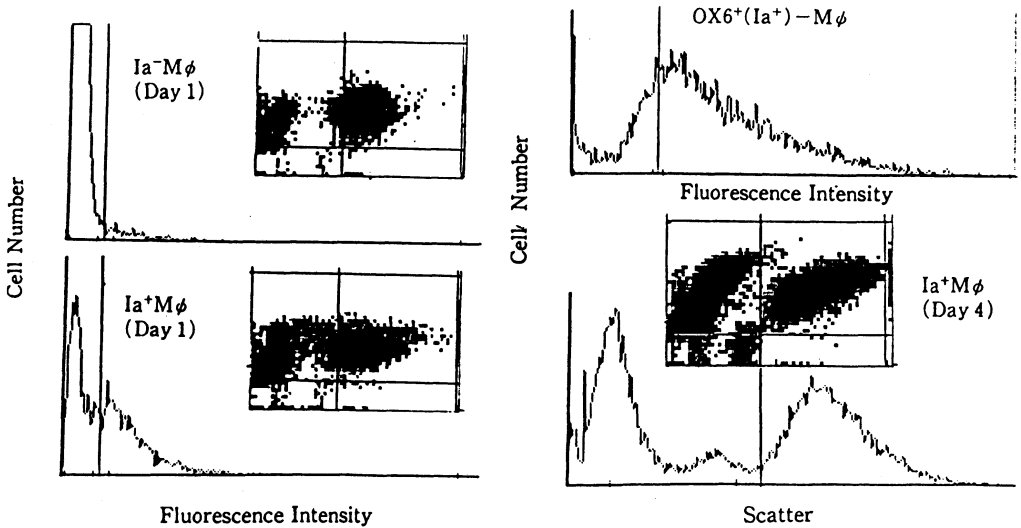


図4 Ia抗原陽性腹腔マクロファージのEPICS-V解析例

図はOK-432活性化1日目のDAラットのIa⁻およびIa⁺Mφ (Day 1)と、4日目のIa⁺Mφ (Day 4)のEPICS-V解析例である。4日目のIa⁺Mφはそのプロファイルからみて、抗原量が1日目のIa⁺Mφと比べ増加し、大きさにも不均一性がみられ右方移動していることに注目。

我々の用いた溶連菌製剤 (OK-432) はリステリア菌などと同様、Ia⁺Mφ 群の誘導にきわめて有効であった。また、最近我々はIL-2によってIa⁺Mφ 群が脾、肝、腹腔内で増加することを見い出しており¹⁶⁾¹⁷⁾、不溶性抗原刺激とともにIL-2などサイトカインの関与でIa抗原の発現が相乗的に増幅されることが考えられる。OK-432によるIa⁺Mφの誘導作用の機序としては、OK-432活性化Mφから分泌されるIL-1によりT細胞が刺激され、その結果IL-2の産生分泌が促され、IL-2はIa⁺Mφ群前駆細胞、あるいはIa⁻Mφ群に作用してIa⁺Mφ群への分化成熟を促進する可能性が考えられる。その他に、OK-432投与により局所に惹起された炎症反応の結果、MCFc¹⁸⁾¹⁹⁾、C5a²⁰⁾、MCFS-1²⁰⁾²¹⁾などMφの遊走因子が局所に産出され、それによって血管系からIa⁺Mφ群、あるいはその前駆細胞が腹腔内へ滲出する可能性も考えられる。現在のところ、その機序の詳細は明らかでないが、OK-432は形態学的変化を惹起するとともに、クラス1抗原⁺、Ia⁺の大型Mφを効率よく誘導する強力なtriggerとして働くと考えられる。

一方in vitro系の実験では、MφのIa抗原表出時間は比較的短く数時間であり、培養初日はその合成は著しいが、その後しだいに減少する²²⁾。しかし、その細胞局在と分子密度に関しては不明である。本研究では、最近開発されたFDMを用いることによりIa⁺MφにおけるIa抗原分子の膜局在とPhoton計測による相対的Ia抗原分子密度の計測に成功した。Mφ膜上のIa抗原の分布は決して一定しておらず、その局在性の違いから少なくとも4型が区別された(図5)。この所見はMφにおけるIa抗原分布の不均一性を示唆している。この不均一性は細胞の分化段階や機能状態の違いを反映している可能性も否定できないが、図6に示されたように、Mφが活性化されるとA型やB型が大型の平板型(C、D型)への形態変化するとともに、膜上のIa抗原もリング状や辺縁パッチ状分布から中央型やび慢性分布を示すことから、この不均一性分布は、A、B、C、D型の形態学的変化をほぼ反映し、特有の分布形式を示すものと考えられる。

Ia抗原の細胞局在の特徴としては、細胞体や細長く伸びた細胞質突起上には多数認められるが、ラッ

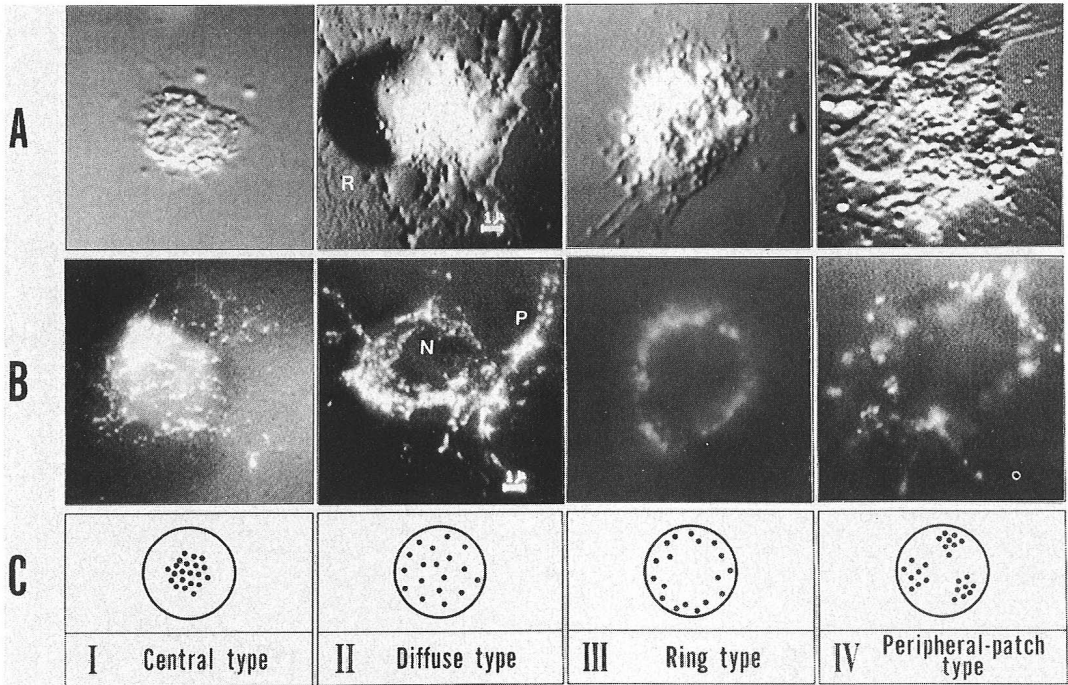


図5 OK-432 活性化マクロファージの Ia 抗原局在性のビデオコントラスト増強像

OK-432 活性化 4 日目の腹腔渗出 Mφ を抗 Ia 抗原単クローン抗体 (OX6) と FITC 標識二次抗体により標識し、同一の生 Mφ の形態(A)を微分干渉顕微鏡で、膜上の FITC 標識 Ia 抗原の分布(B)を DFM でそれぞれ観察した。Ia 抗原分布様式の違いにより I ~ IV 型に分類した(C)。

Ia 抗原分子は細胞体や細胞質の突起(P)上には認められるが、ラッフル(R)や核(N)上には明確にはみられないことに注目。

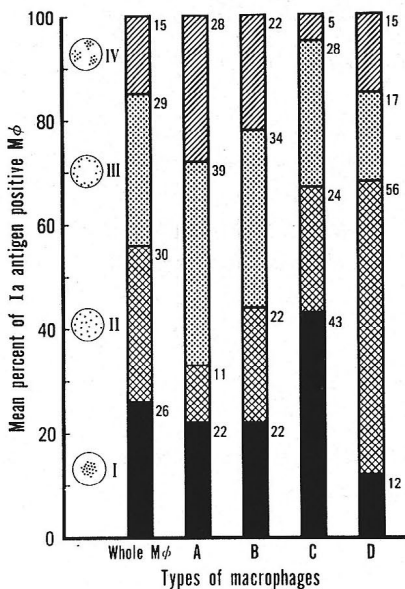


図6 Ia 抗原陽性マクロファージの走査型電顕の分類(形態)と、DFM 的分類(Ia 抗原の細胞膜分布) との関係

Ia 抗原の細胞分布に関しては、小型球状 A 型～中型紡錘状 B 型の Mφ では、リング状～辺縁パッチ状 (III 型と IV 型) が多く、大型円盤状 C 型～大型平板状 D 型の Mφ では、中央分布型～びまん分布型 (I 型と II 型) が多い。細胞型の違いで、Ia 抗原は特有な分布を示す。各数字は各型の比率 (%) を示す。

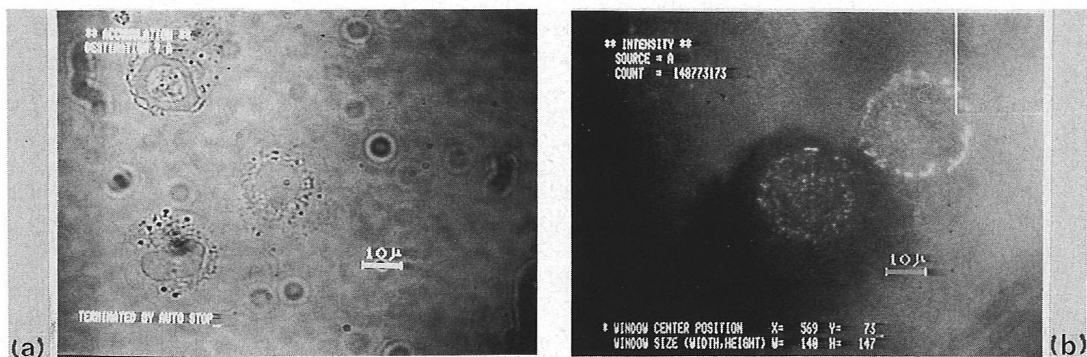


図7 OK-432活性化1日目の腹腔滲出マクロファージのIa抗原量の測定例

OK-432投与1日目の腹腔滲出MφのIa抗原をOX6とFITC標識二次抗体で標識し、その形態(a)を微分干涉顕微鏡で観察し、同時に膜上のIa抗原の分布と抗原量(Photon数計測)(b)をDFMで測定した。(b)は、Ia抗原分布がび慢型(左側の細胞)のものと、リング型(右側の細胞)のものの典型例である。形態学的には両細胞に違いはみられない。

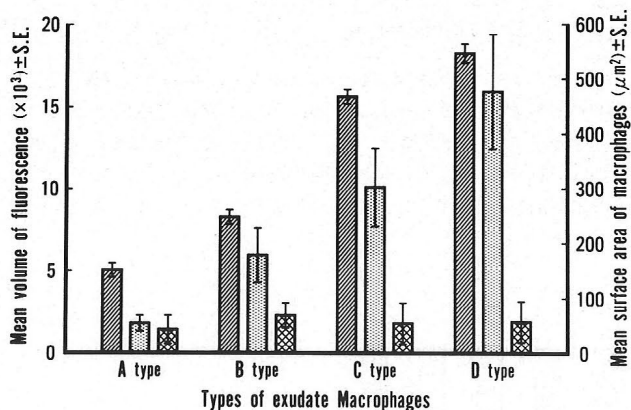


図8 各マクロファージ諸型のIa抗原量

OK-432活性化1日目の腹腔滲出MφのIa抗原をOX6とFITC標識二次抗体で標識し、形態学的に分類したA型, B型, C型, D型の4型のMφ(各100個)について、Ia抗原量(Photon数計測)をDFMで測定した。各型のMφの相対的なIa抗原量が細胞の単位表面積当たりの蛍光量で表わされている。

▨; 各型のMφの平均表面積

[Mean (μm^2) \pm S.E.]

▤; 各型のMφの平均蛍光量

[Mean ($\times 10^3$) \pm S.E.]

▩; 各Mφの単位表面積($100 \mu m^2$)当たりの平均相対蛍光量

[Mean ($\times 10^8$) \pm S.E.]

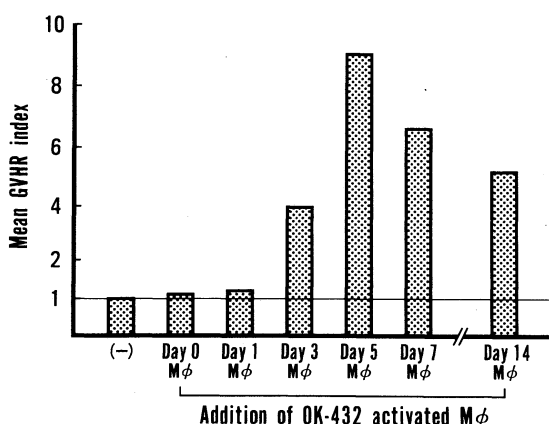


図9 OK-432活性化マクロファージによる胸腺細胞のアロ抗原反応能の誘導

正常DAラットの胸腺細胞 (50×10^6 個) を (DA \times Lewis) F_1 雑種の後肢足蹠皮下に投与し、ひきつづきOK-432腹腔内投与後0, 1, 3, 5, 7, 14日目の腹腔滲出Mφ (それぞれ 20×10^6 個) を同所に投与し、10日目の膝窩リンパ節 (PLN) 重量を測定し相対的GVH反応指数 (表2を参照) を算定した。いずれも8~10例の測定例の平均指数である。(一)はPLNの生理的重量を基準にしたときの指数を1.0とした。

フル上や凸状に盛り上がった核上にはほとんど認められないことである。つぎに、形態学的に4型に分類された $Ia^+M\phi$ における細胞1個当りのIa抗原分子の膜上密度をみると、A, B, C, D型の順で増加し、ほぼ表面積の広さに比例した。しかし、単位表面積当りの量は4型ともほぼ同量で一定していた。したがって、Ia抗原分子の産生と膜表出は細胞の大小とは関係なく、一定のIa抗原分子を膜上に表出するべく細胞固有のリズムで合成→膜表出→遊離分解が進行していることが示唆される。Bellerら¹⁵⁾²²⁾の報告では、Ia抗原の発現時間は比較的短く数時間であり、培養初日はIa抗原合成は活発だが、その後漸減するといわれる。このように培養によるIa抗原量の減少所見と我々の結果は一見矛盾するようであるが、その違いは培養時間、培養条件の違いだけでは説明できない。むしろ、細胞の形態学的変化と単位表面積当りの相対的Ia抗原量の観点から検索した我々の結果とフローサイトメトリーの解析結果だけにに基づいているBeller¹⁵⁾らの見解との違

いによるものと考えられる。

$Ia^+M\phi$ 群の免疫学的機能を局所GVH反応法で検索した結果、 Ia^+ 群は胸腺細胞のアロ抗原反応能誘導作用を発揮することが明らかになった。すなわち Ia^+ 群の添加によってのみ有意のGVH反応活性が誘導された (表2)。この現象は宿主側のリンパ球とMφの機能を前もってブロックしておいた F_1 宿主において認められたことから、この誘導作用への宿主側の細胞の関与は少ないと考えられる。一般に、胸腺細胞の分化に関しては、アロ抗原反応能を示さない前駆細胞が細胞性および液性胸腺内微小循環因子、たとえばストローマ細胞、ナース細胞、Mφなどとの直接的細胞接触や、胸腺ホルモンやIL-1などの液性因子の作用をうけて成熟し、negative selectionの過程を経て非自己反応性クローンが適応分化すると考えられている¹⁵⁾²³⁾²⁴⁾。本実験系で示されたように、大部分 (95%以上) 未成熟T細胞からなる胸腺細胞を F_1 宿主の足蹠皮下に投与し、ひきつづき活性化 $Ia^+M\phi$ 群を共存させると、未成熟T細胞

表2 Ia 抗原陽性マクロファージによる胸腺細胞のアロ抗原反応能の誘導

Parental cells assayed (dose)	Macrophages(Mφ) supplemented (dose) ^a	Mean PLN weight (mg) ± S.E.	GVHR index ^b	P	No. of assays
Thymocytes (50×10 ⁶)	None	4.5±0.2	1.0	—	8
Thymocytes (50×10 ⁶)	Ia ⁺ Mφ (5×10 ⁶)	19.6±2.3	4.1	<0.001	4
Thymocytes (50×10 ⁶)	Ia ⁻ Mφ (5×10 ⁶)	7.4±0.3	2.5	<0.01	4
None	Ia ⁺ Mφ (5×10 ⁶)	3.3±0.3	—	—	6
None	Ia ⁻ Mφ (5×10 ⁶)	3.2±0.4	—	—	5
None	Saline (0.1ml)	2.3±0.3	—	—	11

a : OK-432腹腔内投与 4 日目の DA ラット腹腔 Mφ を OX6 と FITC 標識二次抗体で標識し、EPICS-V で Ia⁺, および Ia⁻分画に分離しソーティングを行った。ついで、正常 DA ラットの胸腺細胞 (50×10⁶個) を (DA×Lewis) F₁ 雑種の後肢足蹠皮下に投与し、ただちに Ia⁺, あるいは Ia⁻Mφ 分画 (それぞれ 5×10⁶個) を同所に投与し、10 日目の膝窩リンパ節 (PLN) 重量を測定し、ついで相対的 GVH 反応指数 (GVHR index) を算定した。なお、本実験では F₁ 宿主に対して、コロイドカーボン注射 (3 週間前) と X 線 (700rad) 全身照射 1 日前を行い、宿主側の局所 Mφ とリンパ球の反応性を前もってブロックしておいた。対照として、Ia⁺, あるいは Ia⁻Mφ 分画の単独投与、および生食水投与を行った。

b : 相対的 GVHR 指数は下記の式で算定した。

$$\frac{(\text{移植片} + \text{M}\phi) \text{ 投与側 PLN 重量} - \text{M}\phi \text{ 単独投与側 PLN 重量}}{(\text{移植片} + \text{生食水}) \text{ 投与側 PLN 重量} - \text{生食水単独投与側 PLN 重量}}$$

が反応局所において Ia⁺Mφ との間で相互の細胞接着を起こし、直接あるいは間接的な影響をうけアロ抗原反応性 T 細胞へ最終成熟化を起こす可能性が考えられる。我々はこれまでに、Mφ の共存に依存して GVH 反応活性を獲得する胸腺細胞は、おもに皮質に分布する高比重でコルチゾン感受性、CD8⁺・CD4⁺ の未成熟 T 細胞であることを明らかにし報告した²⁵⁾²⁶⁾。これらの成績と本実験結果から考えると、胸腺の未成熟 T 細胞を末梢組織においてアロ抗原反応性 T 細胞へと分化を成熟させる Mφ は、不溶性抗原刺激後 3 日目以降に出現する Ia⁺Mφ 群であることが示唆された。その際、未成熟 T 細胞と細胞接着する Mφ がどのような型の Ia⁺群 (I 型~IV 型) か明らかでないが、Ia 抗原分子の膜上での分布密度が同一であるところから、おそらく、IL-1 産生能の強い細胞型であることが予想される。さらに今後の

検討が必要である。

結 語

マクロファージ (Mφ) について、抗原刺激後の細胞表面形態学変化、ならびに膜抗原表現型 (とくに Ia 抗原) の特性を明らかにし、さらに Ia⁺Mφ と同種抗原反応性 T 細胞との in vivo における共同作用の有無を検索し、以下の結果を得た。

1. 細菌性抗原 (溶連菌製剤 OK-432) のラット腹腔内投与により滲出する腹腔 Mφ は、その総数、および Ia⁺Mφ 分画ともに投与後 3 日目で最高となり、以後漸減し約 1 ヶ月後に元の値に戻った。つぎに、表面形態の特徴から、Mφ は小型球状の A 型、中型紡錘状の B 型、大型円盤状の C 型、大型扁平状の D 型の 4 型が区別された。OK-432 で刺激すると A 型と B 型がしだいに減少し、ラッフルと小突起の

発達した大型平板状のC型とD型が増加した。

2. Ia抗原の細胞局在は、その分布の違いから、中央分布型(I型)、び慢性分布型(II型)、リング状分布型(III型)、辺縁パッチ状分布型(IV型)の4型が区別された。A型とB型のM ϕ は、主にIII型とIV型のIa抗原分布様式を示し、C型とD型のM ϕ は主にI型とII型の様式を示した。Ia抗原は細胞の形態や表面構造の違いにより特有の分布を示し、その不均一性が示唆された。

3. M ϕ 1個当たりのIa抗原量はA, B, C, D型の順に多く、ほぼ表面積の広さに比例した。しかし、単位表面積当りの抗原量は4型ともほぼ同一で一定

していた。

4. OK-432活性化後3日以降に出現するIa⁺M ϕ 分画は胸腺細胞のGVH反応能誘導活性を示したことから、胸腺細胞とIa⁺M ϕ は生体内で細胞間共同作用を発揮することが強く示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご助言を頂いた宮本愛助教授、三戸まさよ先生に心から感謝申し上げます。また、技術面において御援助下さった佐野次男、村中祥悟各技官に対し深謝致します。

文 献

- 1) Rosenthal AS, Blake JT, Ellner JJ, Greineder DK, Lipsky PE: Macrophage function in antigen recognition by T lymphocytes. Immunobiology of the macrophage function (ed. Nelson DS) Academic Press New York 131-160 1976
- 2) Yamashita A, Miyamoto M, Hattori Y, Kimura H: Collaborative role of macrophages in interactions between parental and F₁ hybrid strain lymphocytes. Transplant 26: 426-429 1978
- 3) Yamashita A, Hattori Y, Kotani M, Miyasaka M, Fukumoto T: A novel monoclonal antibody, Marl, directed specifically against mononuclear phagocyte system cells in rats. Immunol 70: 262-271 1990
- 4) Ford WL, Burr W, Simonsen M: A lymph node weight assay for the graft-versus-host activity of rat lymphoid cells. Transplant 10: 258-266 1970
- 5) Yamashita A, Hattori Y, Fukumoto T: Augmenting effect of exogenous macrophages on the graft-versus-host reaction in F₁ hybrids depleted of macrophages. Transplant 30: 122-127 1980
- 6) Daems W Th, Koerten HK, Soranzo MR: Differences between monocyte derived and tissue macrophages. The reticulo-endothelial system in health and disease: Functions and characteristics. (ed. Richard SM, Escobar MR, Friedman H) Plenum Press, New York-London 27-40 1976
- 7) 渡辺慶一: 生体内マクロファージの形態。マクロファージの分化と機能(山下昭, 高田明和, 増田徹編) MRC 東京 1-29 1982
- 8) 山下昭: Ia 陽性細胞の分布・形態。臨床免疫 18: 505-519 1986
- 9) Enzan H: Electron microscopic studies of macrophages in early human yolk sacs. Acta pathol Jpn 36: 49-64 1986
- 10) Swartzendruber DC, Congdon CC: Electron microscope observations on tingible body macrophages in mouse spleen. J Cell Biol 19: 641-646 1963
- 11) Steinman RM, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med 137: 1142-1162 1973
- 12) 山下優毅: 抗体産生におけるマクロファージとリンパ球の相互作用。マクロファージの分化と機能。(山下昭, 高田明和, 増田徹編) MRC 東京 137-163 1982
- 13) Poutsika DD, Yogeewaran G: Turnover and fate of I-AK antigen on the murine macrophage cell surface. Biochem Biophys Res Commun 131: 216-221 1985
- 14) Unanue ER: The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. II. Symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. In: Advances in immunology. (ed. Kunkel HG and Dixon FJ) Academic Press New York 31: 1-136 1981
- 15) Beller DI, Unanue ER: Ia antigens and antigen-presenting function of thymic macrophages. J.

- Immunol 124 : 1433-1440 1980
- 16) 山下昭：サイトカインから見た炎症病理。炎症とサイトカイン（日本炎症学会編）日本医学館 東京 23-31 1987
 - 17) Konno H, Yamashita A, Tadakuma T, Sakaguchi S: Inhibition of growth of rat hepatoma by local injection of liposomes containing recombinant interleukin-2. *Biotherapy* 3: 211-218 1991
 - 18) 本多三男, 吉村禎造, 三浦和典：液性因子によるマクロファージ動負機構の解析。炎症の化学伝達(2)。一細胞性因子—（山下昭, 吉永秀, 高田明和 編）MRC 東京 19-42 1984
 - 19) Honda M, Yoshimura T, Watanabe T, Hayashi H. Chemotactic macrophage subpopulations defined by macrophage chemotactic factors from delayed hypersensitivity reaction sites. *J Immunol* 131 : 2989-2994 1983
 - 20) 神原武, 上田啓司, 川口哲, 中村正, 久木田一郎：液性因子による遅延型アレルギー反応 (DTH) の発現と抑制。炎症の化学伝達(2)—細胞性因子—（山下昭, 吉永秀, 高田明和 編）MRC 東京 43-70 1984
 - 21) Kambara T, Ueda K, Maeda S: The chemical mediation of delayed hypersensitivity skin reactions. I. Purification of a macrophage-chemotactic factor from bovine γ -globulin-induced skin reactions in guinea pigs. *Am J pathol* 87 : 359-374 1977
 - 22) Beller DI, Kiely JM, Unanue ER: Regulation of macrophage populations. I. Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunologic stimuli. *J Immunol* 124 : 1426-1432 1980
 - 23) Wekerle H, Ketelsen UP, Ernst M: Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: Morphological and serological characterization. *J Exp Med* 151 : 925-943 1980
 - 24) Longo DL, Schwartz RH: T cell specificity for H-2 and Ir gene phenotype correlates with the phenotype of thymic antigen-presenting cells. *Nature* 287 : 44-46 1980
 - 25) Yamashita A, Hattori Y, Mori F, Kosaka A. Acquisition of graft-versus-host reactivity by immature thymocytes in the coexistence of activated macrophages. *Transplant* 33 : 80-86 1982
 - 26) 山下昭：GVH 反応における T 細胞-マクロファージの相互作用。マクロファージとその周辺。（小島瑞, 斎藤和久, 花岡正男 編）羊土社 東京 301-318 1985