



Title	抗体産生機構に関する免疫病理学的研究：第5報 卵白アルブミン感作兔のリンパ節培養細胞による抗体産生
Author(s)	奥山, 春枝; OKUYAMA, Harue; 浜田, 栄司 他
Citation	結核の研究, 27-28, 53-61
Issue Date	1968-03-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26786
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_28_P53-61.pdf



抗体産生機構に関する免疫病理学的研究

第5報 卵白アルブミン感作兎のリンパ節培養細胞による抗体産生

奥山春枝 浜田栄司 森川和雄

(北海道大学結核研究所病理部)

生体に抗原刺戟を与えた時におこる免疫反応を、*in vitro* の環境下で再現しようとする試みが、この約20年間続けられてきている。即ち、人間あるいは動物の、抗体産生組織とみなされている脾、リンパ節及び骨髓や、末梢血内リンパ球を、組織片としたり、或いは細胞浮游液として培養し、感作血球凝集反応、中和抗体測定、更に鋭敏な方法として isotope 標識アミノ酸のとり込みをみる方法などで、抗体産生の証明がなされている。この様に、実験方法が多彩であることは、この実験が如何に困難であるかを物語っているといえる。抗原刺戟を *in vivo* で行なった後にとり出した組織では、培養中の抗体産生が明らかに証明されているが、正常細胞を *in vitro* で初めて抗原刺戟をした場合は、殊に細胞浮游液培養においては殆んど陽性例をみていない。

in vitro の抗体産生実験は、抗体産生細胞の同定と、その細胞の origin の決定ということが大きな目的となっている。従って、培養細胞の形態的变化の追及と細胞内の抗体の証明が、培養液上清内の抗体証明と共に大切な手段となってくる。この細胞内抗体の直接的証明法としては、Coons¹⁾により創始された蛍光抗体法の利用と、Jerne²⁾により報告された寒天内溶血斑形成法がある。後者は最近、Bussardら³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾が羊赤血球感作マウスの脾、リンパ節や腹腔細胞で詳細な観察を報告しているが、この方法では抗体産生細胞を光学的によく観察するには困難であり、その点では蛍光抗体法の利用がより適当と思われる。

蛍光抗体法利用により培養細胞内に抗体を証明した報告は少なく、Elvesら⁷⁾が人間の末梢血で、Pattersonら⁸⁾は鶏の脾片培養で証明している。我々も、本法を用いて培養細胞内の抗体を証明しようとしたが、この方法で陽性反応をうるには細胞内にかなりの抗体量を必要とし、*in vitro* での初感作では証明出来る程の抗体量の産生が望めないことから、*in vivo* であらかじめ兎を感作後、所属リンパ節をとり出して細胞浮游液として培養し

たものについて、細胞内抗体の証明を、培養上清内抗体証明、培養細胞の形態的变化と比較しつつ追及した。

実験材料及び実験方法

動物：体重2乃至4kgの家兎を用いた。

抗原：卵白から、硫酸塩析法でアルブミンを結晶性にとり出し、5回再結晶をくり返して精製したものを抗原とした。

なお、再感作兎の初感作には、カリミョウバン沈降卵白アルブミン液を、Porter法⁹⁾により作製して用いた。

蛍光抗体液：卵白アルブミン10mg/1ml生食水溶液に、等量のDrackeol：Arlacel9：1のadjuvantをまぜて乳液とし、兎筋肉内に5日間隔で3回注射して、最終注射2週間後に採血し、沈降反応重層法による抗体価128倍稀釈以上陽性のものを、直ちに全採血して血清を分離し、硫酸 $\frac{1}{8}$ 飽和で γ -globulinを精製した。蛍光色素の標識は浜島ら¹⁰⁾の方法により、1% γ -globulin溶液を $\frac{1}{100}$ 量のFluorescein isothiocyanateで標識し、Sephadex G50及びDEAE-cellulose columnを通して蛍光抗体液を精製し、使用まで-25℃に保存した。

培養液：Eagleの培養液に、10～15%の割合に仔牛血清を加え、更に1ml当りPenicillin 100単位、Streptomycin 100 μ g加えたものを用いた。

細胞培養法：正常兎及び、あらかじめカリミョウバン沈降卵白アルブミン5mg宛、四肢の足蹠に注射して感作後4週間以上たった感作兎の足蹠に、卵白アルブミン食塩水溶液(蛋白量5mg/0.5ml)を注射した。(前者を初感作群、後者を再感作群と称する)。初感作群では抗原注射後1、2、3、4、5及び7日後、再感作群では1、2、3、4及び5日後に所属リンパ節を無菌的に摘出し、1部を組織学的検索のために切除して固定し、残りは、直ちに鉗で細切し、Hanks液に浮游して、glass woolをつめた1.5×10cmのガラス管を通した。この濾過の操作を2回くり返して、貪食細胞及び多形核

白血球を出来るだけ除いた。この細胞浮游液を1000回転10分遠心後、培養液に再浮游した。細胞数を算定して、 $10\sim 35\times 10^6$ 細胞 / 1 ml を、 35×10 mm のシャーレ内に 9×18 mm のカバーガラス 3 枚おいた上に注ぎ、5%CO₂ 環境下、37 °Cで培養した。尚、4日以上培養する場合は、上清の抗体価を測定する実験を除き、3日目に培養液を交換した。

抗体価測定法：リンパ節摘出直前に採血して分離した血清と、培養後初感作群 7日迄、再感作群では4日までの培養上清について抗体価を測定した。タンニン酸処理赤血球に卵白アルブミンを吸着（0.5%血球液 50ml を、250 mg の抗原で室温10分間処理）させた、感作血球凝集反応で測定した。

細胞数測定：培養液内細胞数の変動をみるために、細胞浮游液 1 ml を、小型培養角瓶内でシャーレと同条件下で培養し、経日的に、0.001 M EDTA を加えて5分後、よく振盪して細胞を浮游させて、細胞数を血球計算板で算定した。

蛍光抗体染色：培養前のリンパ節は、95%エタノール低温固定し、パラフィン切片を作製して、直接法で抗原を、間接法で抗体を染色した。又、培養シャーレ内カバーガラスに密着した細胞の染色には、カバーガラスを磷酸緩衝生食水（PBS）で洗滌後、95%エタノール低温固定し、同じく抗原及び抗体を染色した。

組織学的及び細胞学的検索：培養前リンパ節は、蛍光抗体染色に用いたと同様にしてパラフィン切片を作製して、hematoxylin-eosin 染色、methylgreen-pyronin 染色をして組織学的変化を観察した。

培養細胞の観察は、シャーレ内カバーガラスのうち2枚を PBS で洗滌後、メタノール固定をして、1枚は Giemsa 染色し、1枚は methylgreen-pyronin 染色をして検鏡した。

なお、培養液内浮游細胞は遠心によって上清を分離し、Hanks 液で1回洗滌後塗沫標本を作製して、メタノール固定し、Giemsa 染色及び methylgreen-pyronin 染色をして観察したが、変性崩壊する傾向が強く、細胞の正確な形態的観察が不可能であったので、この論文ではカバーガラスに密着した細胞の変化についてのみ記載した。

電子顕微鏡的観察：培養細胞浮游液及びシャーレの底面に密着した細胞をゴムではぎとって一緒に遠心し、Milloning 固定液で15分間固定後、Epon 812 で包埋し、超薄切片を作製し、酢酸ウラニール・鉛染色後電子顕微鏡で観察した。

成 績

1. 培養細胞数の変動

リンパ球はガラス面に附着する力が弱く、静置培養では底に沈んだ形で保たれ、その大部分は速やかに変性崩壊を示した。図1にあるように、培養1日目に40~50%

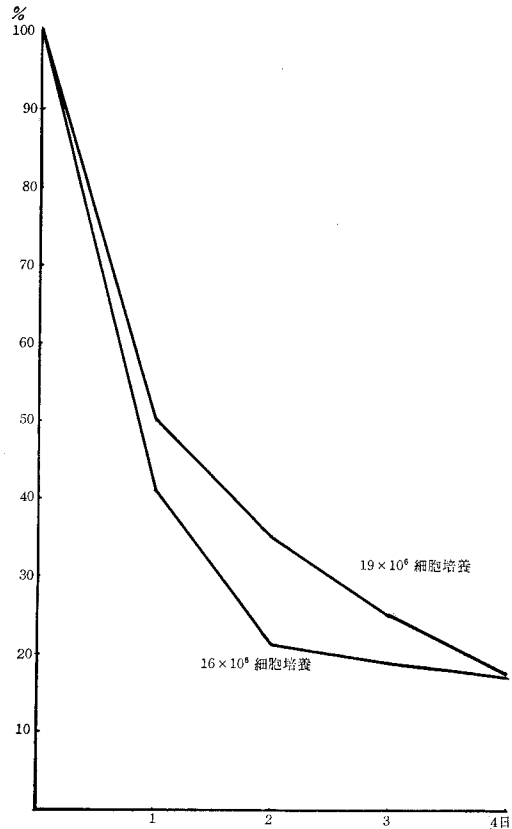


図 1 培養細胞数の推移

になり、その後減少度は弱まるが、しかし測定した4日目まで漸減した。培養液の交換を行わない場合の細胞数の推移を見たので、栄養条件の悪化も考えられるが、培養細胞に mitosis が殆んどみられないことから、培養した細胞の分裂増値が少ないこともその一因と考えられる。なおこの数の減少は、初感作動物細胞でも、再感作動物細胞でも同じ傾向を示した。

2. リンパ節の組織学的変化

a) 初感作群の変化

注射1日後、皮質の小リンパ球の減少が著明で、皮質内細網細胞及び髄洞内の貪食細胞の膨化がみられた。2日目から、皮質内に散在性に大型の pyronin 好性芽細胞

が出現し始め、次第に増加を示した。特に3日目よりみえ始めた芽中心の周囲に多数みとめられた。小リンパ球は3日目頃より徐々に恢復し始めた。5日目から、皮質周辺及び髄索に形質細胞がふえ始め、逆に芽細胞は急激に数を減少した。

b) 再感作群の変化

抗原注射1日後、皮質の小リンパ球の減少が高度で、細網細胞が露出してみられ、その変性膨化が強くみられた。辺縁洞及び髄洞では、多数に滲出した貪食細胞が変性膨化を示すものが多く、多形核白血球の浸潤が高度にあり、エオジンに染まる無構造物質の沈着がみられた。この無構造物質は、蛍光抗体染色で抗原が陽性に染まることから、この中に抗原が含まれることは明らかである。細網細胞の変性膨化は2日目も強く、3日以後には大小のリンパ球及び芽細胞が増加してきた。皮質内には、1日後からすでに大型の pyronin 好性芽細胞が中等量に散在し、2日目には急激に数を増してきて、それと共に中等大や小型の類リンパ球も次第に増加し、皮質全体は種々の大きさの細胞でうずめられた。3日目より増大した髄索内に形質細胞が増加し始め、4日を過ぎると、皮質の周辺にも形質細胞の豊富な増加がみられた。一般に初感作群に比し、反応経過が早く、しかも量的に強い反応を示した。

3. 培養細胞所見

a) 培養前細胞浮游液所見

培養前の細胞を塗抹標本でみると、初感作群の細胞は、1日目すでにやや大きく、直径7 μ 前後のものが多く、大部分は細胞質が少なく、核は小型リンパ球よりやや明るくて、僅かの陥凹を示すものが多くみられた。その他に細胞質が好塩基性にそまるものがまざっているが、この細胞が直径8 μ をこすものはなかった。2日以後になると、直径10 μ 前後の、細胞質が好塩基性に強くそまるものがふえ始めたが、全体を通じ5%以上にはみられなかった。この好塩基性細胞は pyronin に好染した。注射後日数の経過と共に細胞は次第に大型化するが、直径12 μ 以上の細胞は全細胞の1%をこえなかった。この大型細胞は、細胞質が明るく、核網も繊細で、細網細胞とみなされる。

電子顕微鏡的に、初感作群1日目の培養前の細胞をみると、大半の細胞は、核は円形乃至楕円形で、陥凹があり、核小体はみとめられず、細胞質には小器官が少なく、小胞体のみられないリンパ球とみられるものであった。その他に、やや大型で核陥凹が強く、ゴルジ装置の発達した細網細胞が僅かにあり、時に遊離リボソームの多い、明瞭な核小体をもった芽細胞が混入していた。

b) カバーガラス上の細胞所見

カバーガラスに密着した細胞は、Giemsa 染色所見から次の様に大別した。① 小型で細胞質は殆んどなく、円形でクロマチンの濃い核をもった類リンパ球、② 中等大から大型で、細胞質は塩基性にこくそまり、細胞質突起が少なく、核は円形乃至楕円形で、多くは核小体が不明瞭で、細胞質が pyronin によく染まる好塩基性細胞、③ 一般に大型で、細胞質は明るく豊富で、時に長い突起をのぼしており、核は楕円形で陥凹があり、核小体は明瞭なものが多い。細胞質は pyronin に中等度又はうすくそまる細胞。長く突起をのぼした細胞は、線維芽細胞とかがえられるが、我々は一応これらを細網細胞としてまとめた、④ 細胞は大きく、核及び細胞質共明るく、胞体内に崩壊物をもっている貪食細胞。培養経過を追って、これらの細胞の変動を観察した。

i) 初感作群

初感作群は、全体としてカバーガラスに密着する細胞数が少なく、特に初感作2日後までの1日培養では少なく、しかも大半は小型の類リンパ球であった。貪食細胞及び細網細胞は全くみられないか、時に僅かにみられることがあるのみであり、好塩基性細胞の数も少なかった。感作3日以後には、附着細胞が数をまし始める。類リンパ球の形が多いが、大きさは日数の増加と共にましてきた。特に大きさをました細胞は、好塩基性の細胞質の増大を示した。一方貪食細胞や細網細胞は僅かしかみられず、感作後7日の細胞の1日培養に、形質細胞が2、3個みられた。培養日数が経過すると、類リンパ球は次第に大きさをまし、細網細胞や好塩基性細胞の増加がみられた。培養初期の小型類リンパ球の多い時期に、突起をのぼした細網細胞に附着した細胞や、類リンパ球が集団をなした所の細胞の一部が、中等大の大きさとなり、増量した細胞質が好塩基性に染まっているものがよくみとめられた。このやや増大した類リンパ球や、大型の好塩基性細胞の細胞質は pyronin 好性を示した。感作後日数の経過及び培養日数の経過につれて、小型類リンパ球から、大型の好塩基性細胞へ至る各段階の細胞が数をましていくのがみとめられた。貪食細胞は崩壊しているものが多く、培養日数の経過と共に、細胞質は明るい貪食像がなく、細胞質突起をのぼした線維芽細胞の形をとるものが多くなる傾向がみられた。又多核の細網細胞が、特に5日以上培養例にみとめられた。なお、突起を長くのぼした細胞は、お互に突起間が接着しているが多いが、好塩基性細胞は孤立性にみとめられた。又、培養全体を通じて、カバーガラス上の細胞に mitosis はみつけれなかった。

ii) 再感作群

細胞の形の変動の傾向は初感作群と同じであるが、経過が早く、カバーガラスに密着する細胞数が多く、しかも大型の好塩基性細胞の割合が多くみられた。再感作後初期の細胞は、小型リンパ球が多いが、3日以後は密着細胞の増加と共に、細胞質の明るい細胞も、好塩基性細胞と同時に増加してきた。しかし、培養日数の経過と共に、大型好塩基性細胞の増加が著明で、密着細胞の大半が好塩基性細胞に変わるのがみられた。貪食細胞は崩壊するものが多く、培養経過と共に減少し、逆に貪食像がなくて、長い突起をのばした線維芽細胞様細胞がふえてくるのは、初感作群と同様であった。又この様な細胞は、初期には1時的に細胞質の pyronin 好性を示すことができるが、培養後期には一様に pyronin 好性が低下した。中乃至大型好塩基性細胞は pyronin に好染した。

4. 蛍光抗体法染色所見 (表1)

表1 培養細胞の蛍光抗体染色所見

	感日 作 後数 (日)	リンパ節		培養細胞 (培養日数)								
		抗 原	抗 体	抗原	抗 体							
					0	1	2	3	4	5	6	
初 感 作	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-	+	+				
	6	-	-	-	-	-	+	+				
	7	-	-	-	±	±	±	±				
再 感 作	1	±	-	+	±	±	±					
	2	+	±	-	±	+	+					
	3	-	+	-	+	+	±	±				
	4	-	±	-	±	±	±	±				
	5	-	±	-	-	-	+					

a) リンパ節染色所見

初感作群の所属リンパ節では、7日まで、抗原も抗体も証明出来なかった。

再感作群のリンパ節の抗原染色では、1日目に、辺縁洞内に無構造にそまる抗原染色陽性物質が入っており、又洞内貪食細胞内にも抗原が証明された。又濾胞間洞内や、髄洞内の貪食細胞にも多量の抗原がみられた。この

様に抗原が証明される所には、多数の多形核白血球の浸潤を伴っていた。皮質内抗原量は非常に少なく、2日目の濾胞周囲にごく僅かに細網細胞に貪食されて残っているのがみられた。間接法で抗体をそめると、リンパ節内にまだ抗原の証明される1、2日には抗体はみとめられず、3日以後から髄索内及び皮質周辺に出現し始め、初期には大型で細胞質の割合少ない細胞がみられ、4日以後になると殆んどが形質細胞の形をとり、光度も増強を示した。

b) 培養細胞所見

初感作群では抗原陽性細胞は全くみられなかった。抗体染色では、感作2日目までの細胞は、抗体陽性細胞は殆んどなく、7日培養に光度の弱い細胞が初めて陽性であった。感作3日後の細胞の5日培養及び感作5日後の細胞の3日培養に明らかに陽性細胞が出現し始めた。陽性細胞は中型乃至大型のものが多く、一般に突起の少ない或いは全くない円形の細胞であった。核は全く染まらず、細胞質だけが均等に染まり、時に非特異的の蛍光を示す顆粒を核周辺にもっているのがみられた。

再感作群では、再感作1日後の培養前の細胞に抗原をもった貪食細胞が僅かにみられたが、培養細胞には全く抗原は証明されなかった。抗体染色では、再感作注射1日後の細胞培養では、強い蛍光を示すような陽性細胞はみられず、稀に形質細胞が1個みられる程度であるが、感作2日後の2日培養、感作3日後の1日培養から陽性細胞がみられた。特に感作3日以後の細胞の培養では、培養日数の経過と共に陽性細胞の数がふえ、又光度も次第に増強を示した。感作4日以後の培養細胞では、円形乃至楕円形の突起の少ない細胞は殆んど抗体陽性で、中にやや小型となり、核の偏在した形質細胞がみられた。又培養日数が長く、陽性細胞の多いものでは、蛍光抗体染色で強く陽性に染まる、大小不同の顆粒が散在したり、形質細胞の中に1、2個入っているのがみられた。又この顆粒は貪食細胞にとられ、顆粒状のまま核の周辺に集まっているのがよくみられた。この陽性顆粒は、対照染色によって特異的に染まるものであることを確かめた。突起をのばした大型細胞は抗体陰性であった。再感作5日後の細胞培養では、リンパ節では抗体陽性細胞が非常に沢山みられるのに、培養細胞では殆んど陰性で、3日培養のものに2、3個の光度の弱い陽性細胞がみられたのみであった。

5. 培養上清の抗体価

タンニン酸処理感作血球凝集反応は鋭敏な血清反応であるので、この方法で測定した。初感作兎の血清内には、7日後に初めて40倍稀釈陽性の低い抗体価がみられ

表2 培養上清の抗卵白アルブミン抗体価
(タンニン酸処理感作血球凝集反応)

	感作後 日数(日)	細胞培養 数 (10 ⁶)	血清 培養時	培養後日数(日)					
				1	2	3	4	5	6
初感作	1—5	15—35	0	0	0	0	0	0	0
	7	37	40	0	0	0	0	0	
再感作	1	19	1,280	0	0	0	0		
	2	18	5,120	0	10	20	20		
	3	18	5,120	40	80	160	160		
	4	20	5,120	40	80	80	80		
	5	15	20,480	0	0	10			

注 0: <10

たが、培養上清では全例とも陰性であった。再感作兔の血清抗体価は、1,280倍から20,480倍の高い価がえられたが、洗滌した細胞を培養した上清では、再感作1日後の細胞培養上清では陰性であった。しかし、再感作2日以後の細胞の培養上清では、低いながら抗体が証明され、又培養日数の増加と共に僅かながら上昇がみられた。ただ、感作後5日の細胞培養では、蛍光抗体染色所見と全く一致して、3日培養の上清に低い抗体価をみとめたのみで他は全部陰性であった。

総括及び考按

in vitro における抗体産生の試みは、抗体産生機構の解明を志すものにとっては魅力的な方法であるが、*in vitro* での初めての抗原刺激により抗体産生を成功させることは Dutton¹¹⁾ が最近まとめている様に非常に困難のようである。近年、isotope が応用される様になって、合成された DNA, RNA 及び蛋白の中への isotope 標識アミノ酸のとり込みでみている実験が多いが、免疫学的・血清学的反応で証明する程の抗体を産生することは、培養技術のむずかしさにより未だ困難である。ただ、脾或いはリンパ節を臓器片の形で培養した場合には、抗体グロブリンが合成されたという報告⁴⁾⁵⁾¹²⁾ があるが、臓器片の形では、その上清に抗体を証明したり、現に抗体を産生している、又は保有している細胞を証明することは出来るが、その細胞がどのような形態的变化をだどったか、そのもとの形は何であるかを確かむことは出来ない。そこで細胞浮游液の状態に培養する必要がある。

細胞浮游液培養による抗体産生実験の報告は数多くあるが、*in vitro* の初感作による成功例は少ない。僅かに、Bussard³⁾⁶⁾ らの semisolid medium 内培養法による溶血斑測定法のような、巧妙な手技で証明しているのが目立つのみである。この様に成功例に乏しいのは、細胞を浮游状態で長く生存させ、或いは分裂増殖させることがむずかしいことによるのであろう。

in vitro で抗原を作用させた時に、培養細胞が幼若化をおこすことは Pearmain¹³⁾ が結核症の末梢血白血球にツベルクリンを加えて培養すると、幼若化と mitosis をおこすことを報告して以来、更に phytohemagglutinin に同じ作用があることが知られて、多数のこれら幼若化現象への究明に関する報告がなされている。しかしこれらは何れも、幼若細胞の証明或いは isotope 標識アミノ酸の DNA や RNA へのとり込みでみえており、短期間の変化であって、細胞内抗体を直接証明しているのではない。特に、PHA による刺激は70~80%に幼若化をおこすが、大半はそのまま崩壊してしまい、抗体産生との直接的結びつけは現在の所なされていない。従って、細胞浮游液培養法で実際に *in vitro* で抗体を産生させて細胞内に証明し、又、血清学的反応で証明するには大量の抗体を産生させる方法をとる必要があることから、*in vivo* であらかじめ抗原刺激をした細胞を培養したものについて先ず検査してみるのが第一の方法と考え、我々は、初感作或は再感作動物の所属リンパ節をとり出して細胞浮游液として培養した。

我々が目的としたのは、抗体産生細胞の形態、及び培養上清の抗体の証明と、その細胞の origin を究明する

ことであるが、前述した様に、浮游細胞は速やかに変性崩壊してしまうために、浮游細胞の塗抹標本では変性細胞が主で、細胞の正確な同定は非常に困難であった。従って、細胞形態の観察には培養シャーレ内に入れたカバーガラスの上に密着した細胞について行なった。この細胞は、核崩壊物などを細胞内にとり込んだ貪食細胞以外は変性傾向が少なく、Giemsa、或いは methylgreen pyronin 染色でよくそまる。又蛍光抗体法によっても、その胞体内に抗体が証明出来る。我々がこのカバーガラス上にみた抗体陽性細胞は、Giemsa 染色では、細胞質は好塩基性に強くそまり、突起が少なく、ガラス面に附着してやや大きく、核小体は不明瞭な細胞であって、貪食細胞や細網細胞とは明らかに異なる形態を示している。この様な培養細胞に蛍光抗体法で抗体が証明される時期と、培養上清に抗体が証明される時期とが全く一致することから、培養上清中に抗体が放出されていることを示している。上清中に浮游している細胞は速やかにこわれるし、又ここには記さなかったが、上清細胞の塗抹標本では抗体陽性細胞がみつけれなかったこと、及び培養中に抗体価の上昇がみられること、感作初期或いは培養初期には陽性細胞がないか少ないのに、培養日数の経過と共に数がふえ、光度もますということなどから、カバーガラスに密着した細胞が培養中に抗体産生細胞へと成熟し、積極的に抗体を産生していることを示している。特に再感作後3、4日後の細胞を培養した場合には上清の抗体価の上昇がみられるのに反し、5日後の細胞を培養した時には抗体価も低いし、又蛍光抗体法による抗体陽性細胞も少ない。以上のことは、リンパ節内では未だ幼若で、抗体産生も弱いか、又は行っていない細胞が、培養中に活潑に抗体を作る細胞に成熟したことを裏付けると共に、すでに抗体を産生し、胞体内に多量の抗体を保有している細胞は、そのまま崩壊の一途をたどることをも示唆している。このことは、培養上清に抗体が多く証明される時期に、カバーガラス上に蛍光抗体染色陽性の顆粒が沢山証明され、貪食細胞にも多数とられていることから推定され、胞体内に多量の抗体をかかえこんだ細胞はそのままこわれて上清内に分散してしまうと考えられる。

蛍光抗体法で培養細胞に抗体を証明しているのは、緒言にものべたように、Patterson⁸⁾らが鶏を牛血清アルブミンで感作し、その脾小片を培養して、カバーガラス上にのびて来た細胞を蛍光抗体法で染色している。線維芽細胞や貪食細胞の間に、特異的に染色される形質細胞を証明している。しかし組織片の培養であるために、いろいろな細胞が含まれていて、抗体陽性細胞の origin

をみつけることは困難であるが、Elves⁷⁾らは、あらかじめ免疫した人の末梢血リンパ球を培養し、72時間後に蛍光抗体法で特異的に、デフテリア毒素に対する抗体を培養細胞内に証明しており、小リンパ球から抗体産生細胞へ変わったことを示唆している。我々の実験でも、抗体陽性細胞は、好塩基性の細胞突起の少ない中乃至大型の細胞に限られており、培養経過を追うと、小型の類リンパ球から、好塩基性の細胞質を増量しつつ次第に大きさを増し、同時に蛍光抗体染色における光度を増強していく一連の変化がみとめられることから、小型類リンパ球が抗体産生細胞の origin であると推定される。しかしここで考慮しなければならないことは、光学顕微鏡的に小型類リンパ球と判定したものが、均一な細胞集団であったかどうかということである。即ち、我々の実験においては、初感作1日目の培養前の細胞浮游液の細胞構成が問題となってくる。抗体産生過程に貪食細胞が密接な関係をもっていることが Fishman¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾らの T₂ bacteriophage に対する *in vitro* 抗体産生の報告以来、多くの証明がなされていることから、リンパ球浮游液から貪食細胞を完全に除くことが望ましい。そこで我々は、Böjeson¹⁷⁾らがのべた glass wool をつめた column を通す方法を利用した。たしかに培養前の塗抹標本をみると細網細胞数は非常に少なく、貪食試験をしても陽性細胞はみられない。しかし培養すると、カバーガラス上には核崩壊物を貪食している細胞が現われ、又細胞質の明るく核網の繊細な細網細胞や、突起を長くのばし、核小体の明瞭な線維芽様細胞が出てくる。電顕的に初感作1日後の培養前の細胞をみると、リンパ球と明らかに同定されるものの他に、小空泡を僅かながら含むもの、遊離リボソームの多いものなどがあって、均一な細胞浮游液とみなすことが無理なようである。従って細網細胞や線維芽細胞は勿論、抗体陽性の好塩基性細胞も、小型リンパ球集団の中の限られた特定の細胞から変ってくる可能性がある。この意味において、*in vitro* の実験において、同一の細胞から種々の細胞に変わりうると結論する前に、種々の細胞がある条件下では、少なくとも光顕的にみる場合の小型リンパ球の形をとりうる可能性があることを吟味する必要があると考える。

結 論

兎に結晶性卵白アルブミンを注射し、一次及び二次反応をおこさせ、その所属リンパ節を摘出し、細胞浮游液として培養した。その後経日的に、培養シャーレ内カバーガラスに密着した細胞の形態的变化の観察及び培養上清抗体価を測定し、蛍光抗体染色法による特異的抗体陽

性細胞と比較検討した。

蛍光抗体染色陽性細胞は、初感作5日以後の細胞培養及び再感作2日以後の細胞培養で証明された。これらの抗体陽性細胞の出現は、培養上清の抗体の出現と平行した。光顕的に抗体陽性細胞は、中型乃至大型の好塩基性の細胞質をもった、細胞質突起の少ない円形の細胞で、これらの細胞は小型顆リンパ球から変化してくることが推定された。

文 献

- 1) Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. & Berline, E. : J. Immunol., **45**, 159 (1942)
- 2) Jerne, N. K. & Nordin, A. A. : Science, **140**, 405 (1963)
- 3) Bussard, A. E. : Science, **153**, 887 (1966)
- 4) Hannoun, C. & Bussard, A. E. : J. Exp. Med., **123**, 1035 (1966)
- 5) Bussard, A. E. & Hannoun, C. : J. Exp. Med., **123**, 1047 (1966)
- 6) Bussard, A. E. & Lurie, M. : J. Exp. Med., **125**, 873 (1967)
- 7) Elves, M. W., Roath, S., Taylor, G. & Israëls, M. C. G. : Lancet, I, 806 (1963)
- 8) Patterson, R. & Suszko, I. M. : J. Immunol., **90**, 836 (1963)
- 9) Poter, R. R. : Biochem. J., **59**, 405 (1955)
- 10) 鈴江懐, 浜島義博 : 蛍光抗体法, 医学書院 (1963)
- 11) Dutton, R. W. : Advances in Immunol., **6**, 254 (1967)
- 12) Tao, T. W. & Uhr, J. W. : Science, **151**, 1096 (1966)
- 13) Pearmain, G., Lycette, R. P. & Fitzgerald, P. H. : Lancet, 638 (1963)
- 14) Fishman, M. : J. Exp. Med., **114**, 837 (1961)
- 15) Fishman, M. & Adler, F. L. : J. Exp. Med., **117**, 595 (1963)
- 16) Fishman, M., Hammerstrom, R. A. & Bond, V. P. : Nature, **198**, 549 (1963)
- 17) Böjeson, J., Reisfeld, R., Chessin, L. N., Welsh, P. D. & Douglas, S. D. : J. Exp. Med., **124**, 859 (1966)

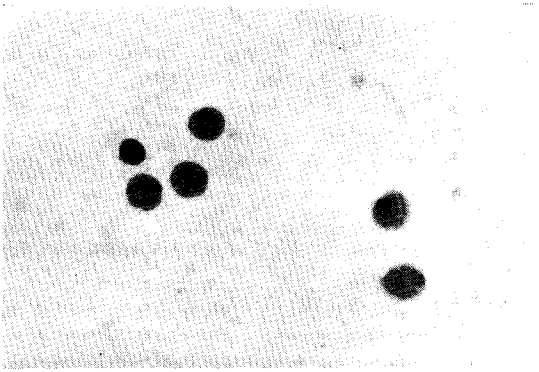


写真1 初感作1日目リンパ節細胞培養1日目。均一な小型類リンパ球が大半を占めている。ギムザ染色。

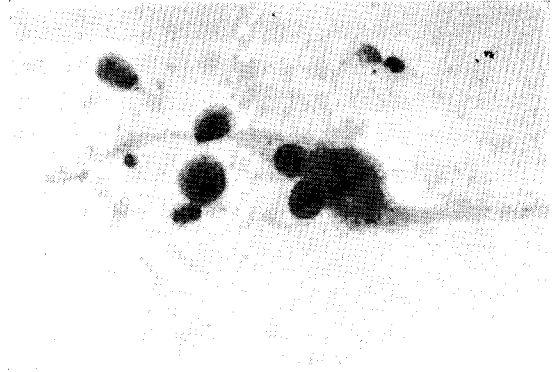


写真2 初感作2日目リンパ節細胞培養2日目。細胞突起をもった細網細胞に接した類リンパ球の大型化がみられる。ギムザ染色。

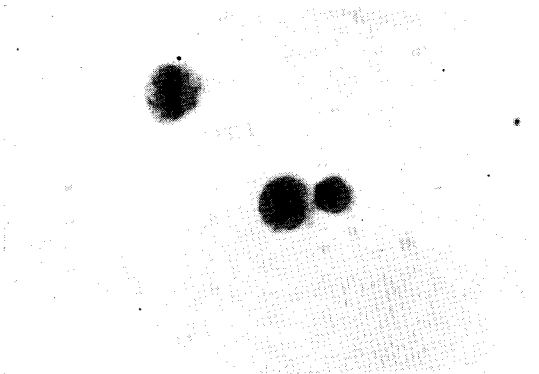


写真3 初感作7日目リンパ節細胞培養2日目。胞体が好塩基性に染まる大型細胞が増加している。ギムザ染色。

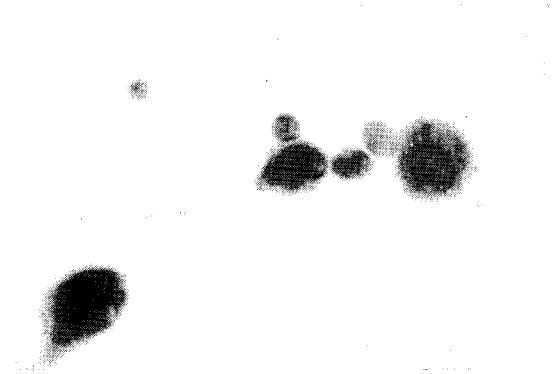


写真4 再感作2日目リンパ節細胞培養3日目。好塩基性大型細胞が小型類リンパ球にまぎって増加している。ギムザ染色。

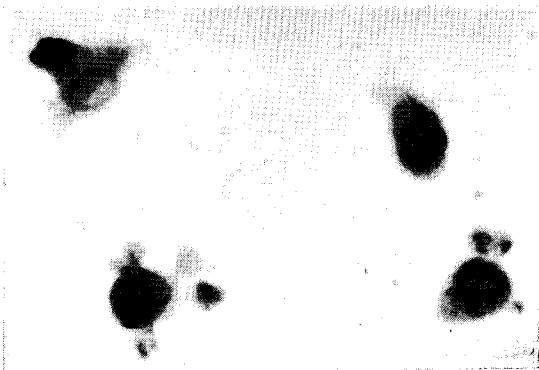


写真5 再感作4日目リンパ節細胞培養6日目。ほとんどの細胞が好塩基性大型細胞であり、核偏在の著明な形質細胞もみられる。ギムザ染色。

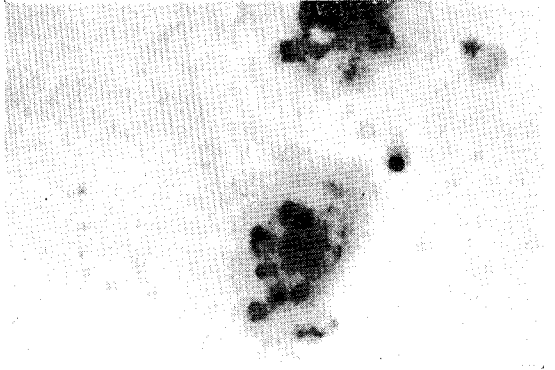


写真6 再感作4日目リンパ節細胞培養6日目。貪食細胞が多量の細胞破壊物を貪食している。ギムザ染色。

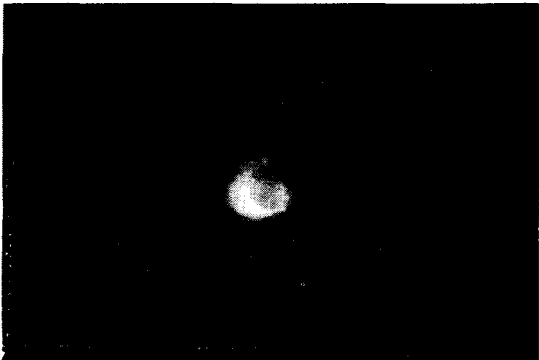


写真7 初感作7日目リンパ節細胞培養3日目。大型細胞の細胞質に抗体が証明される。この様な陽性細胞の数は少ない。蛍光抗体染色。

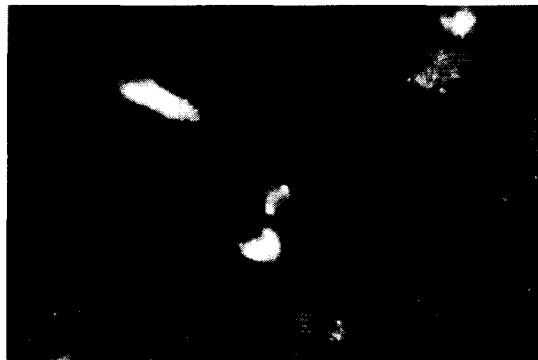


写真8 再感作3日目リンパ節細胞培養4日目。抗体陽性細胞が多数みられる。光の強いものと弱いものが混在している。蛍光抗体法染色。



写真9 再感作4日目リンパ節細胞培養6日目。形質細胞の細胞質に抗体が多量に含まれている。蛍光抗体法染色。

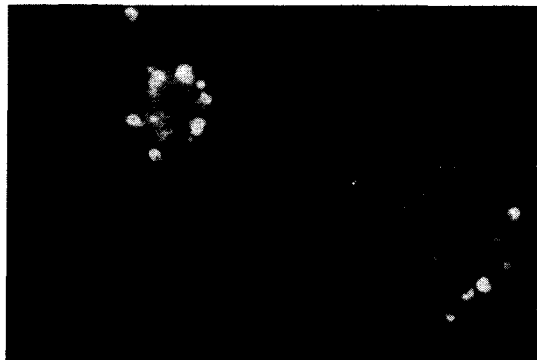


写真10 再感作4日目リンパ節細胞培養6日目。貪食細胞の細胞質には、蛍光抗体染色陽性(特異的)物質が顆粒状に光ってみられる。蛍光抗体法染色。

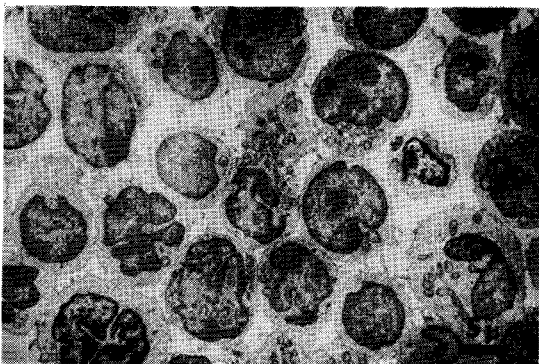


写真11 初感作1日目リンパ節細胞浮游液の培養前。ほとんどの細胞は均一なリンパ球からなっていることがわかる。電顕写真。



写真12 再感作3日目リンパ節細胞培養3日目。リンパ球の他に、芽細胞及び貪食細胞が混在している。電顕写真。