

研究報文

ラットリンパ節細網細胞のライフスパン

宮田 堅 司

Life-span of reticular cell in the rat lymph node

Kenji Miyata

I. はじめに

リンパ節の枠組みを構成する細網細胞は、必ず細胞質突起により、膠原線維および弾性線維からなる細網線維を取り囲んでおり、これを指標とすることにより電子顕微鏡下にマクロファージと区別することが可能である¹⁾。細網細胞はリンパ管経由でリンパ節に流入してきた異物あるいはリンパ節内で肥満細胞から放出された顆粒をファゴサイトーシスあるいはパイノサイトーシスにより取り込む機能を有している²⁾。したがって、細胞内に蓄積し、毒性を示さない物質を取り込ませ、これをマーカーとしてその存在を経時的に調べることにより細網細胞のライフスパンすなわち細網細胞の寿命を検討した。マーカーとしては、鉄を含み電子顕微鏡下に観察が容易で、細胞内に長期間残存することが期待されるフェリチンを用いた。

II. 実験材料・方法

3~4週齢のウイスターラット20匹(体重150~250g)を使用した。リン酸緩衝生理食塩水に1mg/mlの濃度で溶解したウマフェリチン(Cappel)を両側後肢足蹠部皮下に0.1mlずつ投与した。投与、5分、30分、2時間、24時間、48時間、14日、21日、3カ月、6カ月及び1年後にラット2匹をエーテル麻酔下に開胸し心臓より環流固定した。環流固定液は2%グルタルアルデヒド-2%パラフォルムアルデヒド溶液(10%スクロース含有0.1Mカコシル酸緩衝液)³⁾ 300mlを用いた。両側の膝窩リンパ

節を摘出、細切後同組成の固定液中、4℃で1時間固定した。10%スクロース含有0.1Mカコシル酸緩衝液で洗浄後、1%酸化オスミウム(同緩衝液)で、4℃、1時間後固定を行った。エタノールシリーズで脱水、酸化プロピレン置換後エポキシ樹脂に包埋した⁴⁾。超薄切片を作製後、常法にしたがって酢酸ウラン-クエン酸鉛の二重染色を施し電子顕微鏡で観察した。リンパ節の細網細胞とマクロファージを観察対象とした。

III. 結果

投与5分後には、少量のフェリチン粒子を取り込んだエンドソーム及び多数の飲み込み小胞を持つマクロファージが観察された。フェリチン粒子はエンドソーム膜に沿う周縁部に局在していた(写真1)。これらのマクロファージは足蹠部位よりリンパ管経由で流入したものと考えられる。細網細胞には顕著なエンドソーム及び飲み込み小胞は認められなかった。

投与30分後には、フェリチン粒子が集積したエンドソームを持つマクロファージが観察された。細網細胞にもフェリチン粒子が散在するエンドソームが出現した(写真2)。

投与2時間後には、フェリチン粒子が内腔に一樣に分布しているエンドソームを持ったマクロファージが認められた。細網細胞には多数の飲み込み小胞及びフェリチン粒子が散在するエンドソームが認められた。マクロファージ及び細網細胞内のエンドソーム数及びエンドソームに集積するフェリチン粒子共に、経時的に増加していた。

投与24時間後には、マクロファージおよび細網細

胞に、フェリチンが密に集積したエンドソームが認められた。エンドソーム間で融合が起こっている所見が得られた。

投与48時間後には、マクロファージ及び細網細胞で、エンドソームの一部のライソソーム化を示唆する所見も認められた。フェリチン粒子は、マクロファージよりもむしろ細網細胞に多く取り込まれていた。これは初期のマクロファージはリンパ節から流出し、足蹠部の組織内の残余フェリチンを取り込んだマクロファージが新たに流入してきたことを示唆している。

投与14日及び21日後には、細網細胞内にフェリチン粒子が密に集積した多数のエンドソームが存在した(写真3)が、ほとんどのマクロファージにはフェリチン粒子の集積は認められなかった。このことは、足蹠部のフェリチンがほぼ処理され取り除かれたことを示している。

投与3カ月及び6カ月後には、細網細胞内でもエンドソームがライソソーム化していることが明らかな所見が認められた。密集していたフェリチン粒子はライソソームの加水分解素によってタンパク質が分解され、鉄が主成分と思われる電子密度の高い集合体となりライソソーム内で偏在していた(写真4)。マクロファージには電子密度の高い集積物は全く認められなかった。このことは、細網細胞内の高電子密度の集積物が、足蹠部の残余物が流入し新たに細網細胞に取り込まれた可能性を否定している。また、6カ月後では、集積物を含有しない細網細胞も認められ(写真5)、このことも足蹠部残余物流入の可能性を否定している。

投与1年後でも、ライソソーム内に高電子密度の分解産物を持つ細網細胞が認められた。電子密度の高い物質が含まれない大きな空胞も観察され、残っていた鉄も徐々に処理されていることが示唆された(写真6)。

以上より、ラットリンパ節の細網細胞は少なくとも1年間のライフスパンを持つことが明らかとなった。また、6カ月後には新たに出現したと思われる細胞が観察され、細網細胞が増殖することが示唆された。

IV. 考察

リンパ節の細網細胞はリンパ節全体にわたって網の目状に配置し網工を形成している。この網工に引掛る様にしてリンパ球が密に集積した領域がリンパ髄であるとされている⁵⁾。このリンパ球の集積部を

扁平な細網細胞が取り囲み、リンパ洞との境界を形成している⁶⁾。この扁平な細網細胞に連続しリンパ洞に存在する細網細胞は、リンパ管經由で流入してきた異物を取り込む機能を有している²⁾。また、細胞質突起により細網線維を取り囲んでおり、この特徴により電子顕微鏡下に、同様にリンパ洞内に多く存在し異物を取り込むマクロファージと区別することができる⁷⁾。細網細胞のライフスパンに関しては、いかなる生物種についても報告されていないので、フェリチンをマーカーとして、ラットの細網細胞のライフスパンを検討した。

足蹠にフェリチンを接種すると直接リンパ管に入り、所属リンパ節である膝窩リンパ節に流入する。あるいは、接種部位でマクロファージに取り込まれ、このマクロファージがリンパ管經由で膝窩リンパ節に流入する。接種30分後には、細網細胞のエンドソーム内にフェリチン粒子が散在性に取り込まれていた。マクロファージのエンドソームにはフェリチン粒子が密に集積し、取り込みが初期よりおこなわれていることを、すなわち接種部位のマクロファージが流入してきたものであることが示唆された。これらの細胞にはバーベック顆粒⁷⁾は認められず表皮由来のランゲルハンス細胞⁸⁾ではなく、皮下組織の組織球由来であることが示唆される。投与48時間後では、一次ライソソームが融合し、二次ライソソームの形成されたマクロファージ及び細網細胞が認められた。外来タンパク質としてHRP(西洋わさびペルオキシダーゼ)を取り込んだエンドソームでは2時間後には酸性フォスファターゼ活性が検出されライソソームと融合していることが示されているので⁹⁾、フェリチンを取り込んだエンドソームも、より早期に一次ライソソームと融合している可能性は存在する。しかし、フェリチン粒子のタンパク質は分解処理されても、鉄は塊状の残渣となり二次ライソソーム内に局在し、以後長期間、電子顕微鏡下に追跡が可能であった。投与1年後においても、空胞構造物の中に高電子密度の塊状残存物が認められた。投与14日後には、フェリチンを取り込んだマクロファージが認められないので、この時期には既に投与部位にはフェリチン粒子は残存していないことが示唆される。したがって、この時期以降に新たにフェリチンが膝窩リンパ節内へ流入し、新たに増殖あるいは分化した細網細胞が高電子密度の物質を取り込んだとは考え難い。したがって、細網細胞のライフスパンは一年以上であると結論した。また、6カ月後の結果では細網細胞の新生が示唆された。

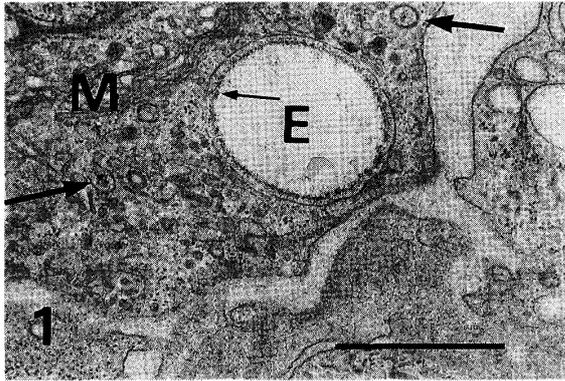


写真1 フェリチン投与5分。マクロファージ (M) 内のエンドソーム (E) 周縁部にフェリチン粒子 (細矢印) が取り込まれている。多数の飲み込み小胞 (太矢印) が認められる。スケールは1 μm を表す。

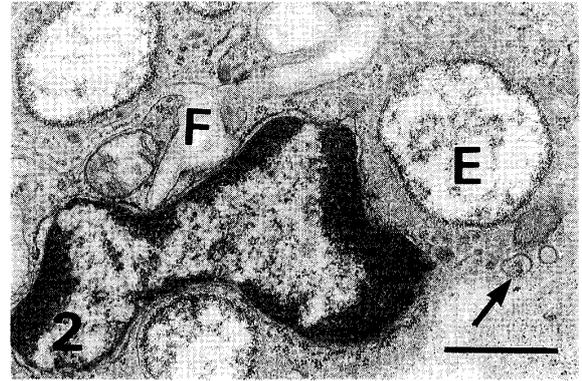


写真2 フェリチン投与30分。細網細胞内にもフェリチン粒子が取り込まれたエンドソームが認められる。この細胞は細網線維 (F) を取り囲み、細網細胞の特徴を示している。飲み込み小胞 (矢印) も認められる。スケールは1 μm を表す。

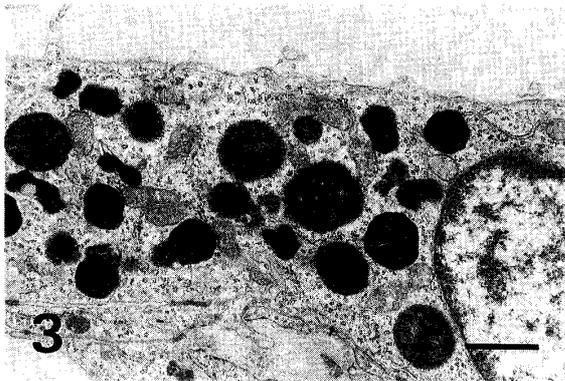


写真3 フェリチン投与14日。細網細胞内に、フェリチン粒子が密に集積した多数のエンドソームが認められる。スケールは1 μm を表す。



写真4 フェリチン投与3カ月。細網細胞のライソソーム (L) 内に電子密度の高い残滓が認められる。この残存物は偏在しライソソームが空胞化している。スケールは1 μm を表す。

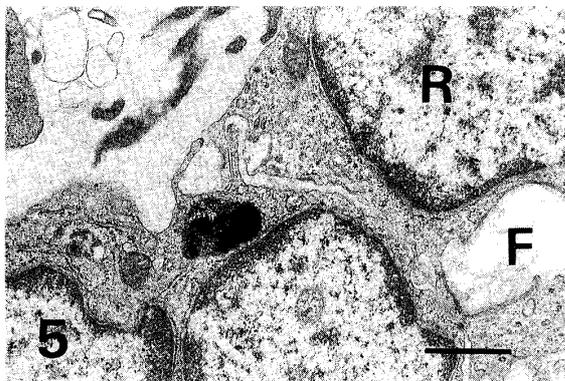


写真5 フェリチン投与6カ月。右上の細網細胞 (R) にはフェリチン残査は認められず、新たに増殖あるいは分化した細胞であることが示唆される。細網線維 (F)。スケールは1 μm を表す。

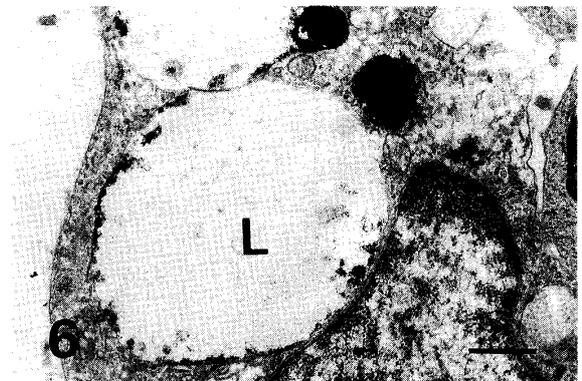


写真6 フェリチン投与1年。ほとんど空胞化したライソソーム (L) が細網細胞内に認められる。高電子密度のフェリチン残滓も減少している。スケールは1 μm を表す。

リンパ節の構造を形成する細網細胞は、その他の生理機能は余り調べられていなかった。リンパ洞に異物を取り込む細胞が存在することは良く知られていたけれども、その本体はマクロファージであるとされていた。しかし、電子顕微鏡下に細網細胞が食作用を示すことが明らかになり²⁾、細網細胞も種々の生理機能を持つことが予測される。

本報では細網細胞のライフスパンについて検討した。ラットの細胞の更新日数に関する報告はないけれども、マウスでの細胞の更新日数(生存日数)は報告されている¹⁰⁾。ライフスパンの短い細胞としては、表皮細胞、角膜上皮細胞、消化管上皮細胞で生存日数が~20日である。100日前後のライフスパンを示す細胞としては、呼吸上皮細胞、結合組織細胞(線維芽細胞を含む)などである。また、生涯ほとんど更新されない細胞としては、移行上皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、セルトリ細胞、神経細胞が報告されている。

ラットの寿命は約二年間であり、細網細胞が少なくともその1/2期間にわたる一年間のライフスパンを持つことは、この細胞がリンパ節構造の維持に適していることを示唆するものである。

IV. 要約

生後4週齢雌ラットの足蹠にフェリチンを投与し、所属リンパ節である膝窩リンパ節リンパ洞の細網細胞を電子顕微鏡で観察した。細網細胞には、フェリチン投与30分後には少量のフェリチン粒子を取り込んだエンドソームが認められた。リンパ洞に存在するマクロファージも同様にフェリチン粒子を取

り込んでいた。以後、経時的にリンパ洞の細網細胞およびマクロファージにフェリチンを含有するエンドソームあるいはライソソームが認められるかどうかを調べた結果、1年後のリンパ洞細網細胞にフェリチン粒子残滓を含有するライソソームが認められた。この結果より、ラットリンパ節リンパ洞の細網細胞のライフスパンは1年以上であることを示すことができた。

文 献

- 1) K. Miyata, K. Takaya: *Cell and Tissue Res.*, **220**, 445 (1981)
- 2) K. Miyata, K. Takaya: *Cell and Tissue Res.*, **240**, 49 (1985)
- 3) J. M. Karnovsky: *J. Cell Biol.*, **27**, 137A (1965)
- 4) H. J. Luft: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409 (1961)
- 5) D. E. Kelly, R. L. Wood, A. C. Enders: *Bailey' Textbook of Microscopic Anatomy*, **18th ed**, 438 (1984)
- 6) T. Fujita, M. Miyoshi, T. Murakami: *Z. Zellforsch.*, **133**, 147 (1972)
- 7) W. R. Sagebiel, H. T. Reed: *J. Cell Biol.*, **36**, 595 (1968)
- 8) U. Kiistala, K. K. Mustakallio: *Z. Zellforsch.*, **78**, 427 (1967)
- 9) K. Miyata, K. Takaya: *Histochemistry*, **83**, 201 (1985)
- 10) L. I. Cameron: *Texas Rep. Biol. Med.*, **28**, 203 (1970)