胎児モルモットにおけるリンパ系組織の免疫学的発育に関する研究

疋田 美直

日本医科大学第2産婦人科学教室 (指導: 室岡 一教授)

日本医科大学微生物学免疫学教室 (指導: 木村義民教授)

緒言

モルモットは遅延型過敏症などの研究にはすぐれた動物であるが、胎児の発育に伴う免疫学的研究はマウスに比しきわめて少ない。

近年, Reid ら¹⁾は phytohemagglutinin (PHA) に対する反応性からモルモット胎児の胸腺細胞や脾細胞が免疫担当細胞としての機能を獲得するのは、胎生30日以降であろうと報告した。また, Davie ら²⁾はモルモット胎児の脾細胞中に胎生 50 日より Dinitrophenyl (DNP) 基に対して特異的に反応する Ig-bearing cell が出現し, 54 日には IgM-bearing cell が成熟動物と同じ位に存在 (IgM-bearing-DNP-binding cell も IgM-bearing cell 全体に対する比を比較すると成熟動物のそれとほぼ同様である。) し, 分娩予定日になると IgG₂-bearing-DNP-binding cell が出現することを示した。さらに, Ruuskanen ら³⁾は胸腺細胞のマーカーとして Alkaline-phosphatase (Al-p) を用いて, モルモット胎児の胸腺組織の発育と胸腺細胞の分化に検討を加えた。その結果, 胸腺には3つの発育段階のあることを報告した。すなわち, 胎生23日頃の胸腺原基の辺縁部 (皮質に相当する部位) に Al-p 活性が集中している時期, 28日頃の胸腺全体に Al-p 陽性細胞, Al-p 陰性細胞が一樣に分布している時期, そして 31~33日頃の胸腺の皮質と髄質の分化が開始する時期である。

しかしながら, モルモットではマウスの θ 抗原に匹敵するようすぐれた T 細胞 (thymus derived lymphocyte: T-cell) のマーカーが知られていなかったため, T細胞, B細胞 (bone marrow derived lymphocyte: B-cell) の各リンパ組織における量的, 機能

的発達などに関する満足すべき研究がほとんどない。

近年, Siegel ら⁴⁾はモルモットの胸腺細胞にウサギ赤血球 (rabbit red blood cell: RRBC*) が非特異的に膠着することを報告した。さらに, Wilson ら⁵⁾はこれがモルモットの T細胞マーカーとなりうる可能性を示唆した。横室ら⁶⁾はこの現象に注目し, さらに追試を重ねこの現象がすぐれた T細胞マーカーとなることを確認した。よってこれにもとづいて本研究では, モルモット胎児の各リンパ系組織においてその個体発生に伴うところの, A) T細胞, B細胞の量的発達, B) リンパ球の機能的成熟状況として, 胸腺細胞および脾細胞の mitogen に対する反応性の発達, C) 光学顕微鏡レベルにおける組織学的発達, などの3点について研究した。なお, A) に関しては, T細胞は未感作ウサギ赤血球との間にロゼットを形成する細胞 (RRBC*-rosette forming cell: RRBC-RFC**) として検出し, B細胞はその補体に対するレセプターと感作ヒツジ赤血球に補体成分を結合させた sheep erythrocyte sensitized with hemolysin and complement (EAC***) とが膠着することによりロゼットを形成する細胞 (EAC-rosette forming cell: EAC-RFC****) として検出した。

実験材料および方法

1) 使用動物: Hartley 系モルモットを交配させ, その胎児を適宣帝王切開にて取り出し使用した。使用胎児数は 43 匹である。さらに生後0日, 1日目, 9日目, 19日目の新生児をおのおの3匹ずつと, 成熟モルモット (250 g 以上) を5匹使用した。また, ウサギ赤血球の採血用として約 2.5 kg のウサギを用い

HIKITA, MINAO: Studies on the immunological development of the lymphoid organs in the foetal guinea-pig.

本論文に用いた略語: * RRBC: rabbit red blood cell, ** RRBC-RFC: RRBC-rosette forming cell, *** EAC: sheep erythrocyte sensitized with hemolysin and complement, ****EAC-RFC: EAC-rosette forming cell

た。

2) 在胎日数の決定：毎朝雌モルモットで陰栓の有無を調べ、それが認められた場合にその日を受精日（胎生0日）とした。また、陰栓が認められなかった場合は Draper⁷⁾ のモルモット胎児重量表を参照して決めた。

3) 細胞浮遊液の作成：胎児モルモットの胸腺、脾臓、腋窩リンパ節、鼠径リンパ節および腸間膜リンパ節をおのおの別個に取り出す。Eagle 液中でそれらに付着している脂肪組織などを除去し、先の細いピンセットで細砕し、プラスチック製注射器（5ml）を使用してさらに細かくし、金属メッシュを通し細胞成分を与える。これを Eagle 液にて2回洗浄（100 G, 8分）し、Eagle 液に浮遊させた。つぎにこの細胞浮遊液を培養瓶に入れ 5% CO₂ incubator 中で 37°C, 30 分間培養し、さらに培養瓶の底面を変えて 30 分間培養しガラス面に膠着するマクロファージや多核白血球などを除去しリンパ球をえた。

脾細胞は培養瓶に入れる前の段階で 0.83% NH₄Cl を適当量加えて水中に10分間放置して混在する赤血球を溶血させ、Eagle 液で2回洗浄後培養瓶に入れた。

末梢血中リンパ球は心臓穿刺によってえたヘパリン加血液（ヘパリン：日本薬局方ヘパリンナトリウム注射液「シミズ」を 100 unit/ml で加えたもの）から、辻⁸⁾の方法にしたがい Conray 400-Ficoll 液（60% Conray：第一製薬、Ficoll：Pharmacia Fine Chemicals, Sweden）にてリンパ球を分離した。

4) ウサギ赤血球浮遊液の作成：実験のつどウサギの耳動脈より Alsver 液 2 ml を入れた注射器にて血液を 3 ml 採血する。生理食塩水で 250 G, 10 分の遠心で3回洗浄し、5%の仔牛血清を含む Eagle 液に浮遊し、最終濃度を 8×10^7 cells/ml とした。仔牛血清は使用に先立って 56°C, 30 分間の加熱により非働化し、ウサギ赤血球で吸収し凍結保存したものを再溶解させて用いた。

5) EAC の作成：矢田、橋らの方法⁹⁾に準じた。ヒツジ赤血球（E：日本生物材料センター）を生理食塩水で3回洗浄（250 G, 10 分）して生理食塩水にて 5% ヒツジ赤血球浮遊液 10 ml を作成し、つぎに E と凝集をおこさないところの最大濃度（200 倍稀釈）の 19 S 抗体（A：ウサギ抗ヒツジ赤血球抗体）10 ml を作成し、これらと一緒にして 37°C で 30 分間 incubate する。このようにしてえた感作ヒツジ赤血球（EA）を生理食塩水で 2 回洗浄（250 G, 10 分）

し、最後に veronal buffer solution (VBS) で1回洗浄する。この沈渣に VBS を加え 5% EA 浮遊液 10 ml を作成する。これに EA がわずかに溶血する程度の、VBS で稀釈（200 倍稀釈）したモルモット血清（C：南海製薬研究所）10 ml を加え、37°C, 30 分間 incubate して感作赤血球補体結合物（EAC）を作成する。VBS で3回洗浄し最後に Eagle にて 1×10^8 cells/ml に調整した。

6) RRBC-ロゼット形成方法：5% 仔牛血清を含む Eagle 液 1 ml あたり 8×10^7 個の RRBC を含む浮遊液 0.5 ml と、同様の培養液 1 ml 中 8×10^6 個の各リンパ球を含む浮遊液とを、37°C, 20 分間 incubate する。つぎに 200 G, 5 分遠心して水中に 1 時間放置する。上清と沈渣を毛細管ピペットにて静かに混和して、この 0.2 ml に crystal violet (1 mg/ml in Eagle's) 一滴を加えてリンパ球を染色し血算板に移す。リンパ球 400 個以上を数えて RRBC が 3 個以上付着したものをロゼット陽性とし、百分率を求めた。

7) EAC-ロゼット形成方法：Lay らの方法¹⁰⁾に準じた。Eagle 液 1 ml あたり 1×10^8 個の EAC を含む浮遊液 0.5 ml と、Eagle 液 1 ml あたり 2×10^6 個の各リンパ球を含む浮遊液 0.5 ml とを、直径 12 mm, 長さ 12 mm のプラスチック製容器に入れ、ゴム栓をして水が入らないようにビニールテープを巻いておく。これを 37°C のウォーターバス中で 30 分間、水平方向軸で 20 rpm の割合で回転させる。その後水中に 5 分間おき、この 0.2 ml に crystal violet を一滴加え血算板にてリンパ球を 400 個以上数え、3 個以上の EAC が付着したものをロゼット陽性として百分率を求めた。

8) 培養方法：滝口らの方法¹¹⁾に準じた。mitogen として concanavalin A (Con A: Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) および phytohemagglutinin-p (PHA-p: DIFCO Laboratories, Detroit, Mich. U.S.A.) を用いた。培養液として 5% 仔牛血清を含む Eagle 液を用いた。リンパ球 4×10^6 cells/ml を 0.5 ml と、mitogen 0.1 ml (PHA-p は胸腺細胞、脾細胞とも 10 μ g/0.1 ml, Con A は胸腺細胞で 2.5 μ g/0.1 ml, 脾細胞では 10 μ g/0.1 ml を至適濃度として使用した。) とに、培養液 0.9 ml を混合して 5% CO₂ incubator 中にて 37°C で培養する。24 時間後、³H-thymidine 0.4 μ ci/ml を 0.5 ml 加えて、さらに 24 時間培養を続ける。その後、Tyrode 溶液で 2 回洗浄（100 G 10

分) し沈渣に Hyamine (日本無線医理学研究所) 0.6 ml を加えさらに一晚 incubator 中に放置する。つぎに Toluene scintisol (和光純薬株式会社) 10 ml を加え Packard Tricarb liquid scintillation counter で5分間測定する。対照としてリンパ球浮遊液 0.5 ml, 培養液 1.0 ml のみで mitogen を加えないものを用いた。なお, 培養は3本を一組として行い, 値はその平均値を使用した。mitogen に対する反応性はつぎの式で計算した。

$$\text{(比)} = \frac{\text{mitogen を加えた時の } ^3\text{H-thymidine}}{\text{mitogen を加えない時の } ^3\text{H-thymidine}} \times \frac{\text{の取込み (cpm)}}{\text{の取込み (cpm)}}$$

9) 組織標本の作成: 胸腺, 脾臓, 腋窩リンパ節, 腸間膜リンパ節のそれぞれについて, Hematoxylin-Eosin (HE) 染色, Periodic Acid Schiff (PAS) 染色そして Reticular Fiber (RF) 染色を行って鏡検した。

10) 胸腺髄質部の 胸腺全体に対する 面積比の出し方: 胸腺組織標本作成時になるべく臓器の中心部における切片を作成し, 顕微鏡下において Eyepiece-micrometer を使用して胸腺の小葉全体と髄質部分をおのおの3か所につき面積を測定しその平均値を算出して比をとった。

結果

1. モルモット胎児における各リンパ組織中の RRBC-RFC, EAC-RFC の割合の変化

Table 1 The proportion of RRBC-RFC and EAC-RFC in the guinea pig lymphoid organs (presented by the percentages of RRBC-RFC and EAC-RFC)

cell RFC	foetal age (days)											neonatal age (days)					adult
	36	41	44	48	54	56	59	64	67	68		0	1	9	19	30<	
TYC ^{a)} RRBC	90.3	76.1	93.2	95.8	91.2	94.7	90.0	84.3	82.7	92.5		91.5	91.9	85.9	86.7		87.0
EAC	0.9	0.6	0.2	0.0	0.7	0.2	0.4	0.2	1.4	1.2		0.5	0.9	1.2	1.4		0.3
SPC ^{b)} RRBC	3.5	18.9	9.6	21.6	15.9	21.0	23.3	25.7	57.8	42.6		50.6	58.8	45.3	29.3		36.6
EAC	2.4	1.2	3.2	2.1	4.7	5.1	7.1	9.1	11.6	29.6		6.3	13.6	24.7	36.7		30.7
LNC ^{c)} RRBC	— ^{f)}	ND	17.5	50.7	71.2	74.2	72.7	39.8	58.1	41.2		51.8	53.4	47.2	45.0		49.7
EAC	—	ND ^{g)}	ND	ND	ND	4.0	6.3	7.8	3.0	21.9		20.0	3.0	17.3	32.3		19.9
M-LNC ^{d)} RRBC	—	—	—	—	ND	63.5	66.5	57.1	60.0	69.1		54.9	68.8	43.9	42.5		38.8
EAC	—	—	—	—	ND	7.4	6.8	6.6	11.5	15.5		12.2	12.4	12.1	27.2		32.8
PB-L ^{e)} RRBC	ND	ND	11.3	22.6	11.2	30.3	42.8	46.8	53.6	48.4		47.3	61.0	49.9	50.0		61.9
EAC	ND	ND	ND	ND	ND	1.3	2.4	4.5	ND	28.0		2.8	4.7	5.1	ND		10.6
weight (g)	5.3	11.3	17.0	23.7	40.1	44.9	54.4	78.0	105.3	107.0							
length (cm)	4.0	5.4	6.6	7.1	8.7	9.8	10.1	10.3	12.3	12.5							

a: thymocyte, b: spleen cell, c: lymph node cell (axillar, inguinal), d: mesenteric lymph node cell, e: peripheral blood lymphocyte, f: not seen, g: not done

表1に胎児期, 新生児期の各時期と, 対照としての成熟時の各リンパ組織における RRBC-RFC (T細胞), EAC-RFC (B細胞) の比率を百分率で表わし, また胎生期の各時期における重量と身長とを示した。

図1では表1よりの実測値を plot し, そこから推測される発達曲線を求めた。

(1) 胸腺細胞 thymocyte: TYC (図1-a)

胸腺は胎生 36 日頃より肉眼的に認められ, かつ実験に必要なリンパ球がほぼえられた。RRBC-RFC は 36 日目にすでに成熟期とほぼ等しい割合の 90.3% という高値を示した。EAC-RFC も 36 日頃に 0.9% 存在し, これら両細胞の比率は胎児期, 新生児期を通してほぼ一定であった。

(2) 脾細胞 spleen cell: SPC (図1-b)

脾臓も胎生 36 日頃より肉眼的に認められ, 細胞浮遊液の作成が可能であった。RRBC-RFC は 36 日目には 3.5% とすでに存在し, この割合は胎児期中次第に上昇し 67 日目には 57.8% と高値を示した。生後 9 日目頃より減少し, 19 日目前後で成熟期の値 (36.6%) に近づいた。EAC-RFC は胎児期中は 全般に低値であるが, 次第に増加し, 生後 9 日目前後に成熟期の値 (30.7%) に達した。

(3) 腋窩, 鼠径リンパ節 lymph node cell: LNC (図1-c)

両リンパ節はともに胎生 41 日頃に肉眼的に認められた。データーは両細胞を一緒にした場合のものであるが, 細胞浮遊液は 44 日頃に作成可能となった。44 日目では RRBC-RFC は 17.5% であったが, その後

(a) Thymocyte

(b) Spleen cell

(c) Lymph node cell

(d) Mesenteric lymph node cell

(e) Peripheral blood lymphocyte

Fig. 1 The developmental curves of RRBC-RFC and EAC-RFC in the guinea pig lymphoid organs

急激に増加して胎生 54~59 日頃では 73%前後と高値を示した。出生前後に減少して生後 9 日目頃より成熟期 (49.7%) とほぼ等しい割合となった。EAC-RFC は 56 日目に 4.0%であったが、その後増加傾向を認めるものの、かなり個体差が認められ早いものでは胎生 68 日頃で成熟期の値 (19.9%) とほぼ等しい値を有したものがあつた。

(4) 腸間膜リンパ節細胞 mesenteric lymph node cell: M-LNC (図 1-d)

腸間膜リンパ節は胎生 54 日頃に透明な帽針頭大のかたまりとして出現し、56 日頃に初めて細胞浮遊液を作成することができた。RRBC-RFC は 56 日頃にすでに 63.5%と高値を示し、胎生期は比較的一定であり、生後徐々に減少し 9 日目前後で成熟期の値 (38.8%) に近づいた。EAC-RFC は 56 日目で 7.4% であり、その後増加し生後 19 日頃に成熟期の値 (32.8%) を示すようになった。

(5) 末梢血中リンパ球 peripheral blood lymphocyte: PB-L (図 1-e)

胎生 40 日頃まではリンパ球を分離できるところの十分な血液を採血することはほとんど不可能であり、44 日目になって多少のリンパ球を分離することができた。しかし、胎児期の末梢血では実験に必要な十分なリンパ球数をえることは困難であつた。RRBC-RFC は 44 日目に 11.3% 検出され、以後この割合は急速に増加し出生前後には 50%前後とほぼ成熟期の値 (61.9%) に近い割合を示すようになった。EAC-RFC は他のリンパ組織のそれと比べて全般に低値であり胎生 56 日目には 1.3%に過ぎない。胎生期、新生児期を通じてまったく徐々に増加して成熟期の値 (10.6%) に移行していった。

2. モルモット胎児の胸腺細胞と脾細胞の mitogen に対する反応性の発達

(1) PHA-p, Con A の至適濃度の決定

1) 胸腺細胞に対する至適濃度の決定 (表 2-A) : 胎生 56 日目の胎児の胸腺細胞 2×10^6 cells/0.5 ml の DNA 合成を最大にする PHA-p, Con A の至適濃度を決定した。表 2-A のように 1.0 μ g/0.1 ml から 50.0 μ g/0.1 ml までの各濃度における 3 H-thymidine の取込みを検討した。最大の取込み量を示すのは Con A が 2.5 μ g/0.1 ml, PHA-p が 10.0 μ g/0.1 ml の時であつた。よって以後の実験にはこれらの値を至適濃度として使用した。

2) 脾細胞に対する至適濃度の決定 (表 2-B) : 生後 9 日目の新生児の脾細胞 2×10^6 cells/0.5 ml の DNA 合成を最大にする至適濃度を決定した。取込みは表 2-B のように, Con A 10.0 μ g/0.1 ml, PHA-p 10.0 μ g/0.1 ml の時に最大であつた。よって以後の実験にはこの値を至適濃度として使用した。

Table 2 Determination of the optimal doses of mitogens

A. Thymocyte^{a)}

tube No.	mitogen	dose of mitogen (μ g/ 2×10^6 cells)	uptake of 3 H-thymidine (cpm $\pm$ S. E.)	experiment control
1	control	0	3,754.4 $\pm$ 1,838.5	1.0
2	Con A	1.0	4,835.3 $\pm$ 1,208.3	1.3
3	"	2.5	6,133.6 $\pm$ 547.3	1.6
4	"	5.0	5,786.0 $\pm$ 363.7	1.5
5	"	10.0	4,022.9 $\pm$ 1,549.2	1.1
6	"	50.0	566.9 $\pm$ 252.0	0.2
7	PHA	1.0	5,670.7 $\pm$ 1,174.7	1.5
8	"	2.5	6,045.7 $\pm$ 432.6	1.6
9	"	5.0	6,847.7 $\pm$ 167.0	1.8
10	"	10.0	8,590.0 $\pm$ 356.5	2.3
11	"	50.0	6,839.2 $\pm$ 104.4	1.8

a: cells of 57 days-foetus were used.

B. Spleen cell^{a)}

tube No.	mitogen	dose of mitogen (μ g/ 2×10^6 cells)	uptake of 3 H-thymidine (cpm $\pm$ S. E.)	experiment control
1	control	0	301.5 $\pm$ 41.7	1.0
2	Con A	1.0	4,097.8 $\pm$ 346.3	13.5
3	"	2.5	4,159.7 $\pm$ 646.5	13.7
4	"	5.0	4,899.2 $\pm$ 282.2	16.2
5	"	10.0	6,026.9 $\pm$ 692.1	19.9
6	"	50.0	3,051.8 $\pm$ 421.5	10.1
7	PHA	1.0	4,668.4 $\pm$ 428.3	15.4
8	"	2.5	5,721.5 $\pm$ 330.8	18.9
9	"	5.0	3,867.2 $\pm$ 1,407.1	12.8
10	"	10.0	6,515.8 $\pm$ 375.4	21.6
11	"	50.0	3,586.2 $\pm$ 18.2	11.8

a: cells of 9 days-neonate were used.

2) 胸腺細胞の Con A および PHA-p に対する反応性の発達 (表 3-A)

mitogen を添加しない対照群の 3 H-thymidine の取込みは幼若な時期ほど高く、成熟するにしたがって減少する傾向にある。いずれの mitogen に対しても胎生 56 日目よりわずかながら反応するようになり、以後反応性は徐々に増加し出生直前に最高となった。

Table 3 Responsiveness for mitogens of thymocyte and spleen cell

A. Thymocyte

days	uptake of ^3H -thymidine (cpm $\pm$ S.E.)						PHA Con A
	control	(ratio)	Con A ^{a)}	(ratio) ^{b)}	PHA ^{c)}	(ratio) ^{b)}	
foetus 41	17,717.2 $\pm$ 507.4 (1.0)		16,198.2 $\pm$ 1,476.5 (0.9)		15,468.2 $\pm$	587.9 (0.9)	1.0
48	6,582.2 $\pm$ 149.0 (1.0)		3,738.3 $\pm$	484.7 (0.6)	5,668.9 $\pm$	593.7 (0.9)	1.5
56	1,016.3 $\pm$ 18.0 (1.0)		1,215.9 $\pm$	60.3 (1.1)	1,534.0 $\pm$	83.2 (1.5)	1.4
59	826.8 $\pm$ 100.4 (1.0)		909.7 $\pm$	94.8 (1.1)	1,205.3 $\pm$	74.6 (1.5)	1.4
67	1,345.9 $\pm$ 53.4 (1.0)		1,773.6 $\pm$	107.2 (1.3)	3,629.2 $\pm$	90.2 (2.7)	2.1
neonate 0	1,003.7 $\pm$ 211.7 (1.0)		2,890.1 $\pm$	198.2 (2.9)	5,548.7 $\pm$ 1,216.6 (5.5)		1.9
9	539.1 $\pm$ 45.9 (1.0)		925.6 $\pm$	69.9 (1.7)	2,034.3 $\pm$	223.6 (3.9)	2.3

a : 2.5 $\mu\text{g}/2 \times 10^6$ cells, b : experiment/control, c : 10.0 $\mu\text{g}/2 \times 10^6$ cells

B. Spleen cell

days	uptake of ^3H -thymidine (cpm $\pm$ S.E.)						PHA Con A
	control	(ratio)	Con A ^{a)}	(ratio) ^{b)}	PHA ^{c)}	(ratio) ^{b)}	
foetus 44	934.9 $\pm$ 32.1 (1.0)		nd ^{d)}		1,017.2 $\pm$	7.0 (1.2)	—
56	539.5 $\pm$ 68.6 (1.0)		583.3 $\pm$	50.6 (1.1)	937.4 $\pm$	94.6 (1.7)	1.5
59	544.1 $\pm$ 53.6 (1.0)		1,137.4 $\pm$	168.5 (2.1)	1,016.5 $\pm$	42.2 (1.9)	0.9
67	312.4 $\pm$ 5.0 (1.0)		2,493.4 $\pm$	118.7 (7.9)	3,600.5 $\pm$	103.4 (11.5)	1.5
neonate 9	301.5 $\pm$ 41.7 (1.0)		6,026.9 $\pm$	692.1 (19.9)	6,515.8 $\pm$	375.4 (21.6)	1.1

a : 10.0 $\mu\text{g}/2 \times 10^6$ cells, b : experiment/control, c : 10.0 $\mu\text{g}/2 \times 10^6$ cells, d : not done

Con A と PHA-p の反応性を比較すると mitogen に対する反応性が最大となる出生前後では, Con A よりも PHA-p に対して約 2 倍の反応性を有した。

(3) 脾細胞の Con A および PHA-p に対する反応性の発達 (表 3-B)

胸腺細胞の場合と同様, 対照群の ^3H -thymidine の取込みは幼若な時ほど高かった。PHA-p に対する反応性は胸腺細胞より早期の胎生 44 日目ですでにその傾向が認められた。Con A, PHA-p に対する反応性は脾細胞の場合も成熟するにしたがって上昇するが, 出生後もさらに上昇した点や, Con A と PHA-p に対する反応性がほぼ等しい点は胸腺細胞の場合と異なる点である。

3. 組織学的検索

(1) 胸腺

胎生 20 日頃の胎児において頸部全体の連続切片を作成し鏡検したが, 胸腺らしきものは発見できなかった。胎生 34 日目の胸腺は数葉からなりその中にはリンパ球が充満し, 所々に赤血球がみられた (写真 1)。胎生 40 日目になると, 皮質と髄質の分化の開始がみられ, 髄質中に Hassall 小体が出現した (写真 2)。胎生 45 日目では皮質と髄質の分化は明らかであり, Hassall 小体には角化が認められた (写真 3)。以後,

所見に著変は認められないが, 胸腺全体に対する髄質の占める割合が徐々に増加した。そこで髄質の占める割合を経時的に測定してみると, 図 2 のごとく胎生 40 日目には 4.7% であったものが, 胎生日数の進むにつれて増大し生後 0 日では 40.0% と最大となり当初の約 9 倍近くに達した。このように生後 0 日の胸腺では髄質部分が非常に大きく, かつ皮質と髄質との境界はきわめて明瞭となった (写真 4)。

(2) 脾臓

胎生 40 日頃では脾臓全体に赤血球とリンパ球が混

Fig. 2 The development of thymic medulla

在し(写真5), その中に中心動脈となると思われる血管が数本認められたが, 白脾髄の形成は明瞭でなくそれらの血管周囲に多少のリンパ球の集合が認められたにすぎない(写真6). 胎生 45 日目になると白脾髄の形成が認められたが, 赤脾髄にはまだ静脈洞がみられない(写真7). 胎生 54 日目では白脾髄に細い好銀線維がわずかに出現するが, 赤脾髄にはやはり静脈洞, 好銀線維ともに認められない. 65 日目, 白脾髄では中心動脈を囲むように好銀線維が走り, 赤脾髄では静脈洞が比較的多く認められるようになり脾索の発育も良好になる. しかし, 静脈洞周囲に好銀線維は相変わらずみられない(写真8). 生後 0 日目では白脾髄にリンパ球が密に集合しているが, その中には一次リンパ小節や胚中心などの形成はみられなく, また静脈洞の発達は良好であるが好銀線維はやはり認められなかった(写真9). 生後 9 日目でも生後 0 日目の所見と同様であった. このようにモルモットの脾臓では胎生期, 新生児期を通して赤脾髄には好銀線維がほとんど認められなかった(ヒトでは赤脾髄に好銀線維が認められるといわれる).

(3) リンパ節(腋窩部, 鼠径部, 腸間膜部)

写真 10 は胎生 45 日目の腋窩リンパ節であるが, 周縁洞と髄洞とが認められかつ皮質と髄質の分化がすでに開始している. 鼠径リンパ節も胎生 45 日にすでに上記の所見が認められた. 腸間膜リンパ節も肉眼的に認められるような胎生 54 日頃にはすでに皮質と髄質の分化が認められた. 以後の各リンパ節の所見には著変はなく, 生後 9 日目になっても胚中心も認められなかったが, ただこの間に一次リンパ小節が時期により出現したり消失したりした.

考察

モルモットは小動物にしては妊娠期間が 68.8 ± 1.6 日¹³⁾と比較的長く, 生下時にはすでに免疫学的に成熟しているといわれる¹⁾. 本研究において, 頸部全体の連続切片の組織学的検索によって胎生 20 日目の胎児に胸腺原基を発見することはできなかったが, 34 日目ではすでにリンパ球を満ちた数葉に分れた胸腺を認めることができた. しかし, いまだ皮質と髄質との分化や Hassall 小体の出現は明らかではなく, これらは 40 日目に至って初めて明瞭に認められるようになった. 以後成熟期に至るまで髄質の増大, Hassall 小体の角化とその増大などが進むが組織学的所見に著変は生じなかった. そこで胎生 33~35 日以降の胸腺の

構造, 細胞構成などに著明な変化を認めないという Ruuskanen ら⁹⁾の報告を考慮すると, モルモット胎児の胸腺は胎生 35~40 日頃に形態学的にはほぼ成熟するものと思われる.

この時期に一致する胎生 36 日の脾臓では, T 細胞が 3.5%認められ, かつ末梢のリンパ節中の T 細胞も測定可能となり, 以後胸腺の成熟に伴って末梢のリンパ組織中の T 細胞は増加していく. マウスの T 細胞の発生に関する Cohen ら¹⁴⁾の研究や, X線照射を受けたマウスにおいてリンパ球が出現するのはまず胸腺であり, その後初めて脾臓やリンパ節に T 細胞が認められるようになるという Blomgren ら¹⁴⁾の報告は末梢リンパ組織の T 細胞が胸腺に由来する可能性を示唆するものである. 一方, ネコでは胸腺内にいまだリンパ球が出現しない胎生 30 日目にすでに末梢リンパ節内にリンパ球を認めるという Ackerman¹⁵⁾の報告は末梢のリンパ節内でもリンパ球の産生が生ずる可能性を示唆している. モルモットで末梢リンパ組織にリンパ球が出現するのは本研究で明らかのように胸腺にリンパ球が出現した後であり, その起源はマウスの場合と同様に胸腺に由来するものと考えられる.

胎生 48 日から 54 日頃の腋窩, 鼠径リンパ節内の T 細胞の割合は末梢血中の T 細胞の割合に比しいちじるしく大きい. このことは胸腺内でリンパ球が成熟する間に "specific lymph node receptor" を獲得するというマウスでの Jacobsson ら¹⁶⁾の報告から考えると, モルモットでも T 細胞がこれらのリンパ節に選択的に homing する可能性があることを想像させる. 同じリンパ節でも腹腔内にある腸間膜リンパ節では, T 細胞の出現する時期が腋窩, 鼠径リンパ節と異なるがその機作は明らかではない.

脾臓におけるリンパ球様細胞のうち, T, B 両細胞の占める割合はおおよそ胎生 44 日頃まで 10%前後, 48~56 日頃までは 20%台, 59~64 日頃で 30%前後であるので, T, B いずれの細胞にも属さない有核細胞がかなり高率に存在する. このことは胎生期の脾臓が造血臓器であることと深く関係するものと思われる.

一般にモルモット胎児の(免疫学的な)末梢リンパ組織における T 細胞の割合は発生が進むにつれて増加し, 出生前後で最高になり, 出生後徐々に減少し生後 9 日頃より成熟期の値に近づくものが多い. 一方, B 細胞は末梢リンパ組織に出現以来徐々に増加し続け, 出生後も減少することなく生後 9 日頃より 19 日頃にかけて成熟期とほぼ等しい値となった.

つぎに胎児リンパ球の機能的成熟状況についてであるが、胸腺細胞は Con A に対しては胎生 67 日頃で明らかな反応性を示したが、PHA-p に対してはやや遅く生後 0 日に至って初めて明瞭な反応が認められるようになった。脾細胞の mitogen に対する反応性の出現は胸腺細胞に比しやや早期にみられ、Con A、PHA-p とも胎生 59 日頃であった。両細胞のこのような差は両組織におけるリンパ球の成熟度の相違によることも考えられる。いずれにしてもモルモットの T 細胞は mitogen に対しての反応性を獲得する以前にウサギ赤血球と膠着する性質を有している。

さらに mitogen に対する反応性に関して PHA-p/Con A 比は胸腺細胞では約 2 であるが、脾細胞では約 1 でありほぼ等しい。Mosier¹⁷⁾ はマウスの胎児胸腺では発生の進むにつれて、まず PHA-p に対する反応性が高まり、その反応性が減少した頃に Con A に対する反応性が高まるということから、成熟時期を異にする 2 つの胸腺細胞群が存在することを示唆している。一方、Claman¹⁸⁾ は新生児マウスの脾細胞は PHA にはあまり反応せず Con A に比較的良好に反応することを報告しているが、モルモットの場合は本実験から知りうる限りこのような現象を認めなかった。

結論

モルモット胎児の免疫学的発育を明らかにするため個体発生に伴う各リンパ組織の、① T 細胞、B 細胞の量的変動、② mitogen に対する胸腺細胞と脾細胞の応答性の発達、③ 光学レベルにおける組織学的発育などの観察を行った。

1) 胸腺は胎生 36 日頃より細胞浮遊液の作成が可能となり、この時にすでに RRBC-RFC は 90.3%、EAC-RFC は 0.9% 認められ以後成熟期に至るまでほぼ一定の値を示した。mitogen に対する反応性は胎生 56 日頃よりわずかにみられるようになり、出生直後に最大となった。また、出生直後では Con A よりも PHA-p に対して約 2 倍の反応性を示した。組織学的には胎生 40 日頃に皮質と髄質の分化、Hassall 小体の出現が認められ、その後髄質は徐々に増大して生後 0 日には胸腺全体の約 40% を占めるに至った。

2) 脾臓は胎生 34 日頃ではほとんど痕跡程度であり、36 日目に細胞浮遊液の作成が可能となった。この時の RRBC-RFC は 3.5% であり以後増加して出生前後には約 50% に達し、生後 9 日頃より減少して、19 日頃より成熟期の値に近づいた。EAC-RFC は胎

生期には全般に低値であるが、次第に増加して生後 9 日頃より成熟期の値に近づいた。mitogen に対する反応性は PHA-p に対しては胸腺細胞よりも早期の胎生 44 日頃にその出現傾向がみられた。Con A、PHA-p に対する反応性は成熟するにしたがって上昇したが、PHA/Con A 比は約 1 でありほぼ等しかった。組織学的には胎生 45 日頃に白脾髄の形成が認められた。

3) 腋窩、鼠径リンパ節は胎生 41 日頃より肉眼的に認められ、44 日頃には RRBC-RFC は 17.5% にすぎないが、胎生 50 日台には約 70% と急激に増加し、60 日頃より減少して出生時には成熟期とほぼ等しい値を示した。EAC-RFC は 56 日頃には 4% であるが、以後徐々に増加して出生時には 20% 台となりほぼ成熟期の値と等しくなった。組織学的には胎生 45 日頃に周縁洞と髄洞とが認められ、かつ皮質と髄質の分化が認められた。

4) 腸間膜リンパ節は他のリンパ組織より出現が遅く、胎生 56 日頃より細胞浮遊液の作成が可能となった。この時に RRBC-RFC は 63.5% とかなり高率に存在し、この値は出生前後までほぼ一定であり生後 9 日頃より成熟期の値に近づいた。EAC-RFC は 56 日頃には 7.4%、以後徐々に増加して生後 19 日頃に成熟期の値となった。組織学的所見は腋窩リンパ節などと同様であった。

5) 末梢血中リンパ球は胎生 44 日頃より量的に測定可能となり、RRBC-RFC は 44 日で 11.3%、EAC-RFC は 56 日頃で 1.3% であった。RRBC-RFC は急速に増加して出生前後には 50% 前後とほぼ成熟期の値に近づいた。EAC-RFC は全般に低値であり成熟期の値に近づくのは比較的遅く生後 20 日すぎであった。

稿を終るに臨み、本研究にご懇切なるご指導を賜った本学微生物学免疫学教室横室公三助教授に深甚なる謝意を表します。また、終始ご助言、ご協力頂きました本学老人病研究所金子仁教授はじめ所員各位に深く感謝致します。最後に本学微生物学免疫学教室の馬淵綾子助手ならびに教室員各位のご協力に謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第 43 回日本医科大学医学会総会、第 25 回日本アレルギー学会総会において発表した。

文献

- 1) Reid, T.M.S., Leiper, J., Inglis, J.R., and Solomon, J.B.: Phytohaemagglutinin-induced transformation of thymus and spleen cells from foetal guinea-pigs cultured in vitro or in diffusion chambers. *Immu-*

- nology, **24**, 203-210, 1973.
- 2) Davie, J.M., Paul, W.E., Asofsky, R., and Warren, R.W. : Ontogeny of immunoglobulin-bearing lymphocytes and DNP-specific antigen-binding cells in guinea pigs. *J. Immunol.*, **112**, 2202-2209, 1974.
 - 3) Ruuskanen, O., and Kouvalainen, K. : Differentiation of thymus and thymocytes. *Immunology*, **26**, 187-195, 1974.
 - 4) Siegel, I., and Sherman, W.B. : The interaction of lymphocytes with autologous red cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **50**, 65-74, 1972.
 - 5) Wilson, A.B., and Coombs, R.R.A. : Rosette-formation between guinea pig lymphoid cells and rabbit erythrocytes—a possible T cell marker. *Int. Arch. Allergy*, **44**, 544-552, 1973.
 - 6) 横室公三, 馬淵綾子, 木村義民 : モルモットのT細胞及びその subpopulation の単離とその性状, 特に細胞性免疫における役割について. 第4回日本免疫学会総会記録, 114-116, 1974.
 - 7) Draper, R.L. : The prenatal growth of the guinea pig. *Anat. Rec.*, **18**, 369-392, 1920.
 - 8) 辻公美 : 比重遠沈法によるリンパ球の分離, Conray 400-Ficoll 法. “免疫実験操作法 I” (日本免疫学会編), pp. 265-268, 1971.
 - 9) 矢田純一, 橋武彦 : ヒトリンパ球 subpopulation の分別. “免疫実験操作法 II” (日本免疫学会編), pp. 473-476, 1972.
 - 10) Lay, W.H., and Nussenzweig, V. : Receptors for complement on leukocytes. *J. Exp. Med.*, **128**, 991-1007, 1968.
 - 11) 滝口智夫 : マウス脾細胞の in vitro PHA 反応及び白血球混合培養試験. “免疫実験操作法 I” (日本免疫学会編), pp. 315-321, 1971.
 - 12) Phoenix, C.H. : Guinea pig. “Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals” (Ed. by Hasez, E.S.E.) Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 244-257, 1970.
 - 13) Cohen, M.W., Thorbecke, G.J., Hochwald, G.M., and Jacobson, E.B. : Induction of Graft-Versus-Host reaction in newborn mice by injection of newborn or adult homologous thymus cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**, 242-244, 1962.
 - 14) Blomgren, H., and Andersson, B. : Reappearance and relative importance of immunocompetent cells in the thymus, spleen and lymph nodes following lethal X-irradiation and bone marrow reconstitution in mice. *J. Immunol.*, **106**, 831-834, 1971.
 - 15) Ackerman, G.A. : Developmental relationship be-

tween the appearance of lymphocytes and lymphopoietic activity in the thymus and lymph nodes of the foetal cat. *Anat. Rec.*, **158**, 387-400, 1967.

- 16) Jacobsson, H., and Blomgren, H. : Studies of the recirculating cells in the mouse thymus. *Cellular Immunology*, **5**, 107-121, 1972.
- 17) Mosier, D.E. : Transient appearance of PHA-reactive thymocytes in the foetal mouse. *Nature New Biol.*, **242**, 184-185, 1973.
- 18) Claman, H.N. : Bone marrow T cells. I. Response to the T cell mitogens, phytohemagglutinin and Concanavalin A. *J. Immunol.*, **112**, 960-964, 1974.

(受付 : 1975 年 12 月 24 日)

写真略語

Co : 皮質	RP : 赤脾髄
Me : 髄質	SC : 脾索
H : ハッサル小体	VC : 静脈洞
CA : 中心動脈	MS : 髄洞
WP : 白脾髄	RS : 周縁洞

写真説明

- 写真1 胎生 34 日目の胸腺: 数葉に別れており, リンパ球が充満し所々に赤血球がみられる. 10×10 , HE 染色.
- 写真2 胎生 40 日目の胸腺: 皮質と髄質の分化の開始. Hassall 小体の出現が認められる. 10×10 , HE 染色.
- 写真3 胎生 45 日目の胸腺: 皮質と髄質の分化は明瞭であり, Hassall 小体に角化がみられる (矢印↓). 10×10 , HE 染色.
- 写真4 生後 0 日目の胸腺: 髄質部が非常に大きく, 皮質と髄質の境界がきわめて明瞭である. 10×10 , HE 染色.
- 写真5 胎生 40 日目の脾臓: 全体に赤血球とリンパ球が混在している. 10×10 , HE 染色.
- 写真6 写真5の拡大像: 中心動脈が認められ, 周囲にリンパ球が集合し始めているが, 白脾髄の形成は明らかでない. 10×40 , HE 染色.
- 写真7 胎生 45 日目の脾臓: 白脾髄の形成が認められる. しかし, 赤脾髄にはまだ静脈洞がみられない. 10×10 , HE 染色.
- 写真8 胎生 65 日目の脾臓: 白脾髄では中心動脈に沿って好銀線維が走り, 赤脾髄では静脈洞が比較的多く認められ, 脾索の発育も良好となる. 静脈洞周囲には好銀線維が認められない. 10×10 , RF 染色.
- 写真9 生後 0 日目の脾臓: 白脾髄にはリンパ球が密に集合し, 静脈洞の発達も良好であるが, 好銀線維はやはり認められない. 10×20 , RF 染色.
- 写真10 生後 45 日目の脾臓: リンパ節: 皮質と髄質の分化, 周縁洞と髄洞の存在が認められる. 10×10 , HE 染色.

疋田論文付図(1)

正田論文付図(2)