Heavy-chain 病の肝生検組織所見 その光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡的観察について

岡山大学医学部第一内科（主任 小坂淳夫教授）

山田剛太郎 小林 敏成 幡 慶一
辻 孝夫 太田 康幸 小坂 淳夫

LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON THE LIVER OF A CASE OF HEAVY-CHAIN DISEASE

Gōtarō YAMADA, Toshinari KOBAYASHI, Keiichi HATA, Takao TSUJI
Yasuyuki ŌTA and Kiyowo KOSAKA

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Okayama
(Director: Prof. Kiyowo Kosaka)

概要 本邦初例のheavy-chain病症例の腹腔鏡下肝生検により得た肝組織について光学顕微鏡的、電子顕微鏡的に観察検討した。光学顕微鏡的には、Glisson鞘にリンパ球、形質細胞と考えられる細胞等の軽度の浸潤が認められるにすぎなかった。電子顕微鏡的観察では、肝実質細胞は、粗面小胞体が比較的少なく、しかも、核の近くに限局して存在し、一方、グリコーゲン顆粒が多く認められた。Glisson鞘に浸潤している形質細胞と考えられた細胞は、よく発達したGolgi野と、層状配列を示す粗面小胞体を有し、典型的な形質細胞として観察されたが、その粗面小胞体に付着しているpolysomeを構成しているribosomeを数え、その分布より、これらのpolysomeで合成されている蛋白質の分子量を算定すると25,000～30,000前後となり、本例のheavy-chain病蛋白の沈降係数3.7と合わせ考えて、肝内に浸潤しているかかる細胞は、heavy-chain病蛋白を合成している細胞と断定した。

緒 言

Heavy-chain 病は1964年にFranklinら¹⁾が初めて報告して以来、現在では本邦の3例²⁾³⁾⁴⁾を含めて、世界で少なくとも15余例⁵⁾があるといわれている。heavy-chain病の臨床像では報告例の約半数に肝腫大が認められているが、剖検例の肝組織学的記載は3例⁶⁾⁷⁾¹²⁾、肝生検例の報告は本例以外には2例⁶⁾⁷⁾に過ぎず、また、これらも光学顕微鏡的観察にとどまっております。電子顕微鏡レベルによる検討は行われていない。著者らは、本邦初例のheavy-chain病として辻らが詳しく報告

〔昭和46年6月14日受稿〕

した²⁾⁸⁾⁹⁾症例の腹腔鏡下に実施した肝生検により得た肝組織を光学顕微鏡的、電子顕微鏡的に観察したので報告する。

材料と方法

症例は辻ら²⁾⁸⁾⁹⁾により臨床像、臨床免疫反応、免疫化学的検討などについて詳細な報告がなされているので簡単に記載する。36才の女性で、肝疾患の既往歴は無いが、2年前に胆のう炎を指摘されたことがある。入院時現症では、肝臓は右鎖骨中央線で3横指径触知、硬度は軟で表面は平滑である。脾臓は1横指径触知。主要な検査成績は、Fig. 1に示すとおりであるが、肝機能検査で

Routin blood studies:

hemoglobin, 45% RBC 270×10^4
 WBC 2,300 with 9% segmented neutrophils, no eosinophil,
 no basophil, no plasma cell, 4% monocytes and 85% lympho-
 cytes contained 5% atypical lymphocytes
 platelet count, 12×10^4

Urinalysis:

500 mg of protein per day
 Bence-Jones protein negative on five occasions

Sternal bone marrow smears:

nucleated cells count 65,000
 erythroid series 19.0%
 myeloid series 12.4%
 lymphocyte series 33.2%
 plasma cells 36.4%

Serum proteins:

8.6 g/dl A/G 0.49
 albumin 33% α_1 -globulin 4.5% α_2 -globulin 4.5%
 β -globulin 3.5% γ -globulin 7% M-component 46%

Liver function tests:

total bilirubin 1.18 mg/dl (D. 0.49 mg/dl)
 TTT 1 Mu ZTT 2 Ku CCF (-) Co R_g
 alk-P-ase 2 Bu GOT 4 u GPT 2 u cholesterol 98 mg/dl
 bromsulphalein retention 1.2% per 45 minutes

Xray exam. of skeletal system:

no characteristic myelomatous lesions

Fig. 1. Laboratory studies on admission.

Date	May '68	July '68	Aug. '68
		1 ↓ 10 admitted	20 ↓ 1. ↓ 10 discharged
Treatment	Prednisolone Blood Transfusion		Peritoneoscopy Total 1,000mg Total 2,560ml
Laboratory studies			
Serum protein(g/dl)		8.6 8.0	7.2
M-component(%) in electrophoresis of serum protein		45.0 45.5	26.5
Plasma cell (%) in myelogram	36.4	21.9	8.2
Physical examination			
Liver (f.b.)		3 3 3	3
Spleen (f.b.)		1 0.5 0	0

Fig. 2. Hospital course

は総ビリルビン1.18mg/dl（直接型0.49mg/dl）とやや高く、コバルト反応R_gで、他の肝機能検査は異常ない。入院後経過はFig. 2に示すごとくで、入院第15日目よりprednisolone 60mg/日の投与を開始し、入院第22日目に腹腔鏡検査を実施した。腹腔鏡による観察では、肝右葉の著明な腫大と脾腫以外には異常所見を得ることができなかった。

腹腔鏡直視下で肝右葉の生検により得た肝組織

片を、光学顕微鏡用にはアルコール性Bouin液で固定、パラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン染色、マロリー・アザン染色、過ヨウ素酸シック染色、Pap鍍銀染色、ペルリンブルー反応鉄染色、およびメチル緑・ピロニン染色を施し検討した。電子顕微鏡用には、肝組織片を0.1規定燐酸緩衝液（pH 7.2～7.4）を用いて調整した。6.25%グルタルアルデヒド¹⁰⁾で氷室（4℃）にて2時間固定し、固定後1mlにつき0.058gの蔗糖を加えて等張とした同緩衝液で水洗し、さらに1%オスミウム酸固定液（0.1規定pH 7.2～7.4燐酸緩衝液1mlにつき0.045gの蔗糖を加え等張とした。）で、同様に氷室で2時間再固定し、前記等張緩衝液にて水洗後エタノール系列により脱水し、Epon 812に包埋した。包埋試料をJUM-5A型ultramicrotomeでガラスナイフを用い、超薄切片を作製し、3%酢酸ウラニールおよび水酸化鉛で二重染色を施し、HS-8型、およびHU-11型電子顕微鏡で観察し、直接倍率3,000～9,000倍で写真撮影した。

成 績

光学顕微鏡的観察ではGlisson鞘に軽度の細胞浸潤がみられ、その浸潤細胞は主としてリンパ球であるが、車輪状の核を有し、胞体が好塩基性を示す形質細胞と考えられる細胞も混在していた。また、細胆管がごく軽度に増殖して見られた。小葉内部では、肝実質細胞の胞体は明るくリポフスチン顆粒も比較的多く認められた。類洞には、Glisson鞘におけると同様な少数の単核細胞の浸潤がみられたが、Kupffer細胞の腫大・増殖は目立たなかつた（Fig. 3）。メチル緑・ピロニン染色では、核小体と同時に核周囲に局限した細胞質の部分がピロニン陽性を示す肝細胞が多く観察された。Glisson鞘や類洞には、車輪状の核を有し細胞質がび漫性にピロニン好性を示す細胞と同時に、核はリンパ球に類似するが胞体がやや広くピロニン陽性物質を細胞質内に有する細胞が散見された（Fig. 4）。

電子顕微鏡的観察では、肝実質細胞は核に著変

1

2

Fig. 3. A mild cellular infiltrate and slightly proliferated bile ducts in a portal tract. Cytoplasm of hepatic parenchymal cells are pale. H & E, 1) $\times 50$, 2) $\times 200$

Fig. 4. Arrows show methyl green-pyronin-positive cells infiltrating in a portal tract. In hepatic parenchymal cells there are methyl green-pyronin-positive granules around the nucleus. Methyl green-Pyronin. $\times 1000$

なく、細胞質ではグリコーゲン顆粒がび漫性に増加し、粗面小胞体は減少し、かつ核付近に局限して観察された。糸粒体は 1μ 前後の円形のものほとんどで形態異常は認められなかった (Fig. 6)。Golgi野はほぼ正常で、毛細胆管にも異常なく、リポフスチン顆粒がやや多く認められた (Fig. 7)。類洞上皮細胞は形態上異常なく、Kupffer細胞には吞食像以外に異常所見は認めなかった。類洞やGlisson鞘に浸潤している細胞では多く成熟したリンパ球の形態を認めたが、これらに混在して、成熟リンパ球に比較して胞体が広く、糸粒体が多く、遊離ribosomeやpolysomeの多いリンパ球 (Fig. 9) もかなり多く認められた。

Fig. 5. Ribosome count of each polysome observed on the endoplasmic reticulum of plasma cells in the liver.

また、光学顕微鏡で形質細胞と診定した細胞は、核膜および細胞表面膜に平行して著明な層状配列を示し、その内腔が一部で拡大している粗面小胞体を有するが、同時によく発達したGolgi野が認められた (Fig. 8, 10)。この細胞には細胞質内結晶、核内封入体、ビールス粒子等は認めることができなかった。さらに、Petris¹¹⁾の方法に従って、この細胞について粗面小胞体の表面が超薄切片に平行ないしは、ななめに切れている部分のpolysome 75個を選んで、それぞれのpolysomeを構成しているribosomeの数を算定してみると

(Fig. 11, 12), 8~10個のribosomeで構成されるpolysomeにピークが認められた (Fig. 5).

考 察

Heavy-chain病の肝生検組織の光学顕微鏡的観察は、第5例目⁶⁾、第6例目⁷⁾および本症例について行なわれているが、詳細な報告はない。すなわち、5例目ではリンパ球、形質細胞および細網細胞の小さな限局した浸潤がみられる以外に肝実質細胞に著変はなく、6例目では異常所見が得られていない。剖検例における肝組織像の記載は、第2例目⁹⁾、6例目⁷⁾、8例目¹²⁾でみられ、いずれも光学顕微鏡的観察であるが、2例目で形質細胞、細網細胞、リンパ球、好酸球の浸潤が認められており、6例目では悪性細網細胞の浸潤が認められているが形質細胞の浸潤は認められていない。8例目においても形質細胞の浸潤はなく、ヘモジデリンのKupffer細胞等への沈着が認められているに過ぎない。本症例の肝生検組織でも、光学顕微鏡的観察では、Glisson鞘や類洞にリンパ球および形質細胞と考えられる細胞の浸潤が軽度認められたに過ぎない。電子顕微鏡的にも以下に考察を加える変化以外に特に肝細胞、内皮細胞、Kupffer細胞に変化は見いだせなかつた。

ヘマトキシリン・エオシン染色標本で、肝実質細胞が明るくみえた所見は、肝細胞のグリコーゲン顆粒が増加していることを推定せしめたが、これは同組織の電子顕微鏡的観察で肝実質細胞内にグリコーゲン顆粒が増加していた所見からも裏づけられた。グリコーゲン顆粒が肝細胞内で増加していた所見は、肝生検時、すでに治療として総計680mgのprednisoloneを投与していたことから、glucocorticoidによるグリコーゲンの肝内貯留と考えられた。また、メチル緑・ピロニン染色標本でピロニン陽性物質が肝細胞核周囲に限局して認められた像は、電子顕微鏡的観察で肝細胞の粗面小胞体が核周囲に限局して認められた所見と一致した。しかし、かかる所見が本症に特有のものであるか、あるいは単にグリコーゲン顆粒の増加による二次的な所見であるかは明らかでない。

電子顕微鏡的にGlisson鞘や類洞に比較的多く認められた、成熟リンパ球とは異なるリンパ球、すなわち、一般のリンパ球と比較して細胞質の幅が広く、かつ糸粒体や、遊離ribosome, polysomeの多いリンパ球は、メチル緑・ピロニン染色標本で、核はリンパ球と類似するが胞体がやや広くピロニン陽性物質を細胞質内に有する細胞として観察された細胞と一致するものであろう。かかる細胞が、すでに本症例で辻ら²⁾⁹⁾が報告している、末梢血に5%出現し、かつ蛍光抗体法でその細胞質内にγ鎖の局在を証明した異型リンパ球と同様の細胞であるかどうかは興味ある問題であるが、今後の研究に譲りたい。

次に、ヘマトキシリン・エオジン染色標本でGlisson鞘ならびに類洞に観察された形質細胞と考えられる細胞は、メチル緑・ピロニン染色では細胞質がび漫性にピロニン好性を示し、電子顕微鏡的観察では、層状に著しく発達した粗面小胞体を有し、かつよく発達したGolgi装置と粗面小胞体の内腔の拡大を局所的に示す典型的な形質細胞の像を備えた細胞と同一のものと考えられた。

免疫グロブリンは、形質球系細胞やリンパ球系細胞で、そのmRNAの鎖で結び合わされたpolysome上で合成されるという¹³⁾。すなわち、Shapiro¹⁴⁾、Williamson¹⁵⁾らはマウスの形質細胞腫の腫瘍細胞を、Becker¹⁶⁾らは免疫されたラットのリンパ節や脾臓を利用して、それらのホモジネートから得られた抽出液の密度勾配超遠心法で、180~190 S前後にピークのあるpolysomeと270~300 S前後にピークのあるpolysomeを認め、その電子顕微鏡的観察から190 S前後のpolysomeは5~8個のribosomeで、270 S前後のpolysomeは12~20個のribosomeで構成されていることを形態学的に明らかにしている。さらに、ヘモグロビンの蛋白合成に際して分子量約17,000のpolypeptideは、主として5個のribosomeで構成されるpolysomeで合成されている¹⁷⁾ことより換算して、7~8個のribosomeよりなるpolysomeは分子量25,000前後のpolypeptideを、16~20個のribosomeよりなるpoly-

Fig. 6. The central region of a hepatic parenchymal cell. Nucleus and nucleolus appear normal. The glycogen particles are diffusely dispersed and the rough-surfaced endoplasmic reticulum is decreased and found in the perinuclear area. $\times 6,000$

Fig. 7. Pericanalicular region. A bile capillary and Golgi complex are normal. Lipofuscin pigments are slightly increased. $\times 6,000$

Fig. 8. Sinusoid and the space of Disse. A plasma cell and a mature lymphocyte are present in the sinusoid. $\times 3,700$

Fig. 9. A lymphocyte in the sinusoid. The cytoplasm is wide. Abundant mitochondria, free ribosomes and polyosomes as compared with those in mature lymphocyte, are contained in this lymphocyte. $\times 8,600$

Fig. 10. A plasma cell in the sinusoid contains well developed lamellar rough-surfaced endoplasmic reticulum and the conspicuous Golgi complex. $\times 8,600$

Fig. 11

Fig. 12

Fig. 11 & Fig. 12. Large magnification of a plasma cell. Membrane-bound polyosomes composed of 8 to 10 ribosomes are abundant. $\times 17,200$

someは分子量 55,000~60,000前後のpolypeptideを合成していることになり、これらはそれぞれ免疫グロブリンのL鎖・H鎖の1本のpolypeptideの分子量にはほぼ相当することを記載している。さらに、Petris¹¹⁾はマウスの皮下の形質細胞腫を電子顕微鏡的に観察し、腫瘍細胞の粗面小胞体上のpolysomeが10~16個のribosomeからなる大きなpolysomeと6~8個のribosomeからなる小さなpolysomeよりなることを超薄切片上で認め、それぞれIgG骨髄腫のL鎖・H鎖を生成するmRNAを有しているpolysomeであろうと推測している。

そこで、著者らは粗面小胞体の表面に付着したpolysomeは分泌性の蛋白を合成しているとのCampbellら¹⁸⁾の考えに基づいて、粗面小胞体に付着しているpolysomeを構成しているribosomeの数がわかれば、そのpolysomeでつくられるpolypeptideの分子量をある程度知ることができ、また、ribosomeの直径が200Å前後であり、mRNA上のribosomeの間隔は50~100Å前後であることより、polysomeが何個のribosomeで構成されているかがわかれば、そのpolysome上のmRNAの長さを知ることができ、さらに、mRNA上のnucleotideの間隔を3.4Åと考えれば¹⁷⁾、mRNAの長さを知ることにより、産生される蛋白質のアミノ酸の数もほぼ推定できると考え、本症例の肝組織で観察された形質細胞と考えられる細胞の粗面小胞体上のpolysomeについて検討した。その結果、8~10個のribosomeで構成されるpolysomeの分布にピークが認められ (Fig. 5)、mRNAの長さは2,500Å前後で、200~250個のアミノ酸よりなる分子量25,000~30,000前後のpolypeptideを合成しているものと断定しえた。ところで、辻が、すでに報告している⁹⁾ 本症例の血清および尿から得られたheavy-chain病蛋白の超遠心による沈降係数は3.7Sであり、現在までに報告されている他の症例のheavy-chain病蛋白の超遠心による沈降係数は3.0~4.1Sの間であり、55,000前後^{11,19)}の分子量に相当する。heavy-chain病蛋白はdimer型と考えられている¹⁾ので、沈降係数より算定した本例

のheavy-chain病蛋白の1本のpeptide鎖の分子量もほぼ25,000~30,000前後となり、電子顕微鏡的に観察されたpolysomeで合成される蛋白の分子量にはほぼ一致した。また著者らが提供した胸骨骨髓穿刺の材料より、木谷ら²⁰⁾が形態学的に骨髄腫細胞の特徴を備えている細胞の粗面小胞体に付着しているpolysomeを構成するribosomeについて同様に検討した結果とも、ほぼ一致した。従つて、電子顕微鏡的に形質細胞としての形態を有する細胞は、heavy-chain病蛋白を合成している細胞と考えられ、この種の細胞が、肝臓のGlisson鞘にも浸潤していることが判明した。

結 論

本邦第1例目のHeavy-chain病の症例について、腹腔鏡下に実施した肝生検により得た組織を光学顕微鏡的ならびに電子顕微鏡的に検討し、以下の結論を得た。

1) 肝実質細胞は、光学顕微鏡的にリポフスチン顆粒を比較的多く認める以外にとくに異常所見は認められなかつた。電子顕微鏡的には、核、細胞質内小器官および毛細胆管に形態上の異常は認められなかつたが、粗面小胞体が比較的少なく、しかも核の近くに局限して存在した。一方、グリコーゲン顆粒が多く、グリコーゲン野が広く認められたことは、治療のため使用したprednisoloneによるグリコーゲンの肝細胞内への貯留によるものと考えられた。電子顕微鏡的観察でも、類洞上皮細胞、Kupffer細胞に異常所見は認められなかつた。

2) Glisson鞘および類洞には、光学顕微鏡的に軽度のリンパ球と形質細胞と考えられた細胞の浸潤が認められた。電子顕微鏡的観察では、成熟リンパ球に混在して胞体が広く、糸粒体が比較的多く、遊離ribosome、polysomeの多いリンパ球が認められた。かかるリンパ球が辻らの報告した末梢血の異型リンパ球と同一のものかどうかは更に検討を要する。形質細胞と考えられた細胞は、電子顕微鏡的に著しく発達した層状配列を示す粗面小胞体を有する典型的な形質細胞として観察されたが、

よく発達したGolgi野と一部の粗面小胞体でその腔の拡大を認めた。かかる細胞内の粗面小胞体に付着しているpolysomeを構成しているribosomeは8~10個で構成されており、polysomeのmRNAの長さは2500Å前後で、200~250個前後のアミノ酸よりなる分子量25,000~30,000前後のpolypeptideを合成していることが推測され、本例のHeavy-chain病蛋白の沈降係数3.7Sであることと合わせ考えて、肝内に浸潤しているかかる細胞は、heavy-chain病蛋白を合成している細胞と考えられた。

文 献

1) Franklin, E.C., Lowenstein, J., Bigelow, B. and Meltzer, M.: Heavy chain disease—a new disorder of serum-globulins. *Amer. J. Med.*, 37: 332, 1964. —2) 辻孝夫他: Heavy-chain(Fc fragment) 病の1症例—本邦第1例目の症例について—, 日内会誌, 58: 1202, 1969. —3) 今井幸雄, 向島達, 木村禧代二: Heavy chain 病の1例(抄), 日血会誌, 32: 814, 1969. —4) 安達原賢司, 高橋隆一, 小出紀, 松橋直: Toxoplasma 感作血球凝集反応で異常を認めた Fc-fragment disease の1例. 第12回臨床血液病学会総会, 1970. —5) 小坂淳夫, 辻孝夫: 免疫グロブリン病— Heavy-chain病, 医学書院, 東京, 1971印刷中. —6) Osserman, E.F. and Takatsuki, K.: Clinical and immunological studies of four cases of heavy (H_2) chain disease, *Amer. J. Med.*, 37: 351, 1964. —7) Leberton, J. P., Rivat, C., Rivat, L., Profit, P., Guillemot, L. et Repartz, C.: Une immunoglobulinopathie meconne: La maladie des chaines lourdes, *Presse med.*, 75: 2251, 1967. —8) 小坂淳夫, 太田康幸, 辻孝夫, 宮本千鶴子: Heavy-chain病の1症例,

臨床免疫, 1: 57, 1969. —9) Tsuji T.: Heavy-chain (Fc fragment) disease-immunological reactions of the first case in Japan and the incorporation of c-amino acids into the protein in vitro, *Acta. Haema. Jap.*, 33: 89, 1970. —10) Sabatini, D.D., Bench, K. and Barnett, R.J.: Cytochemistry and electron microscopy, The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation, *J. Cell Biol.*, 17: 19, 1963. —11) Petris, S.: Polyribosomes in thin sections of 5563 plasmacytoma cells, *J. Mol. Biol.*, 23: 215, 1967. —12) Zawadzki, Z., Benedek, T.G. Ein, D. and Easton, J.M.: Rheumatoid arthritis terminating in heavy-chain disease, *Ann. Int. Med.*, 70: 335, 1969. —13) Kabat, E.A.: Structural concepts in immunology and immunochemistry, 310, Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York, 1968. —14) Shapiro, A.L., Scharff, M.D., Dazei, J.V. and Uhr, J. W.: Polyribosomes synthesizing heavy and light chains, *J. Mol. Biol.*, 56: 216, 1966. —15) Williamson, A.R. and Askonas, B.A.: Biosynthesis of immunoglobulins: The separate classes of polyribosomes synthesizing heavy and light chains, *J. Mol. Biol.*, 23: 201, 1967. —16) Becker, M.J. and Rich, A.: Polyribosomes of tissues producing antibodies, *Nature*, 212: 142, 1966. —17) Warner, J.R., Rich, A. and Holl, C.E.: Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin, *Science*, 128: 1399, 1962. —18) Campbell, P.N., Lowe, E. and Sharp M.: The morphological origin and function of the polysomes isolated from rat liver, *Biochem. J.*, 99, 22C, 1966. —19) Ein, D., Bnell, D.E. and Fahey, J.L.: Biosynthetic and structural studies of a heavy chain disease protein, *J. clin. Invest.*, 48: 785, 1969. —20) 木谷照夫, 米沢毅: 骨髓腫細胞, 代謝, 7: 9巻(電子顕微鏡シリーズ), 1970.