

FUNCTIONAL MORPHOLOGY OF THE PHAGOCYtic ACTIVITY OF A NEUTROPHIL IN A NASAL SECRETION

Kazuyoshi Ueno, Shinya Matsunaga, Motoko Kouno and Masaru Ohyama

Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, Kagoshima University

Through the back scattered electron mode, the cellular activity can be detectable. Human neutrophils isolated from a nasal secretion have been incubated with iron carbonyl particles. The surface structures are observed in the secondary electron image, and the ingested iron carbonyl particles of the same neutrophil are detectable in the back sca-

tted electron image. The back scattered electron mode of the scanning electron microscope has appeared very useful in clarify the correlation between the surface morphology and the phagocytic activity of the neutrophil and as a new morphometric indicator of the defence mechanism.

白血球貪食能の機能形態学的検索

鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科学教室

上野 員 義・松 永 信 也

河野 もと子・大山 勝

はじめに

白血球貪食能は、遊走能、殺菌能とあわせ細胞の最も本質的な機能の一つである。19世紀のMethnikof以来、白血球の生体防御機構における重要な役割をめぐって多くの研究が行われ、これまでに、世に出された優れた新知見は、枚挙にいとまがない程である。¹⁾

白血球貪食能の生化学的指標としては、1) アイソトープで標識した顆粒または細菌を食べさせた後、白血球を分離し、放射活性を測定する方法、2) ポリスチレンラテックスやポリビニールトルエン顆粒等を食べさせ、これらの物質を抽出して、分光光度計によって定

量する方法がある。最近では、3) 白血球が異物を貪食する際、生じる活性酸素²⁾に発光物質(ルミノールなど)を反応させ、生じる化学発光を測定し、白血球貪食能を定量化する方法が開発され、日常臨床における好中球機能検査の手段としても注目されている。我々も、鼻汁中及び静脈血中の好中球の貪食能を、本手技を用いて測定し、慢性副鼻腔炎鼻汁中の好中球が、静脈血中のそれと比較し、高い貪食能を持つことを報告している。

形態学的手技を用いての貪食能の定量化として、白血球にとりこまれた細菌や顆粒を光学顕微鏡で教える方法もあるが、細胞の外側

に付着しているのか、細胞内に取込まれているのかを、明確に判別し難く、かつ定量性に乏しかった。

そこで、著者は、好中球にリンパ球分離用の鉄カルボニール粒子を貪食させた後、二次電子像にて表面形態を、また、同時に反射電子像にて鉄粒子の局在を観察することを試み⁵⁾た。反射電子の特性から、表面の鉄粒子はもちろん、貪食された好中球内部の鉄粒子についても三次元的に明瞭に観察できることが判った。好中球の貪食能を機能と形態の両面から客観的に観察し、しかも、貪食の際の細胞の形態の変化を立体的に解析し得ることになる。以上の如く、本手技は、白血球をはじめとする各種細胞の貪食能に関する新たな機能形態学的指標として、活用し得るものと考えられる。ここに、これらの研究手法と成果を述し、若干の考察を加えて報告する。

研究 方 法

慢性副鼻腔炎鼻汁約0.5gと0.1Mリン酸緩衝液(PB)を約8mlを十分に攪拌後、約130Gで遠沈し、上清を除去し、PBで希釈した。再度この操作を繰返した後、好中球濃度を計測し最終的に 1×10^6 個/mlとなるように調節した。好中球浮遊液1mlに鉄カルボニール粒子(WAKO社製、 4.6×10^7 イオン粒子/ml)を26ゲージの注射針にて10滴、滴下し、37°C 30分間反応させた。反応後、予めリジンにて処理しておいたスライドガラス上に反応液を滴下し、好中球を接着させた。接着後2.5%グルタルアルデハイドにて30分間固定を行い。PBにて洗浄後、型の如くエタノール系列にて脱水、臨界点乾燥を行った。カーボン蒸着後、日立SEM S-570にて観察した。加速電圧は、15-25KV、特に反射電子像の観察には25KVを用いた。

研究成績と考察

リンパ球分離用の鉄カルボニール粒子は、大小さまざまな球形状構造を呈し、平均粒子

直径は約 $1.2 \mu\text{m}$ であった(図1)。組織内から上皮を通り抜け鼻腔に遊出してきた好中球の表面には、多くのmicroridge, ruffleが観察でき、活発に進展、接着し、鼻腔の好中球は高い活性を示すことが窮われた(図2)。

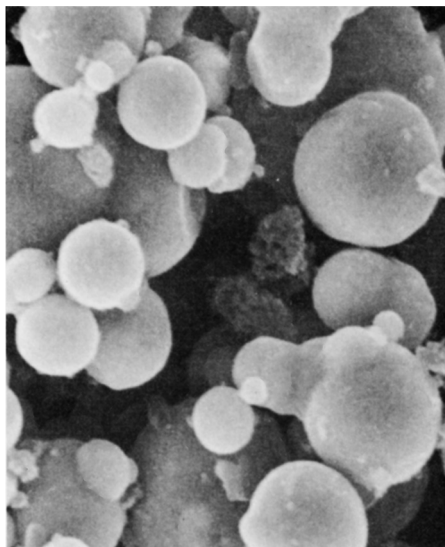


Fig. 1. iron carbonyl particles

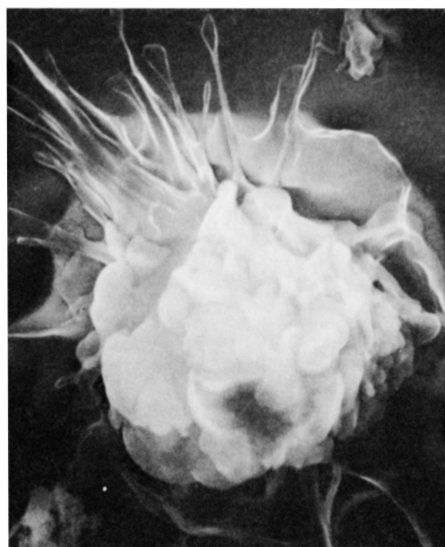


Fig. 2. A neutrophil in a nasal secretion with chronic sinusitis

二次電子像(SE)にて、白血球の表面形態を観察し、同時に、反射電子像(BSE)にて表面に接着した鉄粒子はもちろんのこと、

白血球の食胞中に貪食された鉄粒子も観察できた。試料には、カーボン蒸着を施してあり、鉄の原子番号は26で、原子番号効果を持つ反射電子の特性から、極めて高いコントラスト

が得られた(図3)。しかし、白血球内部に深く貪食された鉄粒子は、接着及び表面に近い鉄粒子と比較して、多少コントラストが低下していることが判明した。

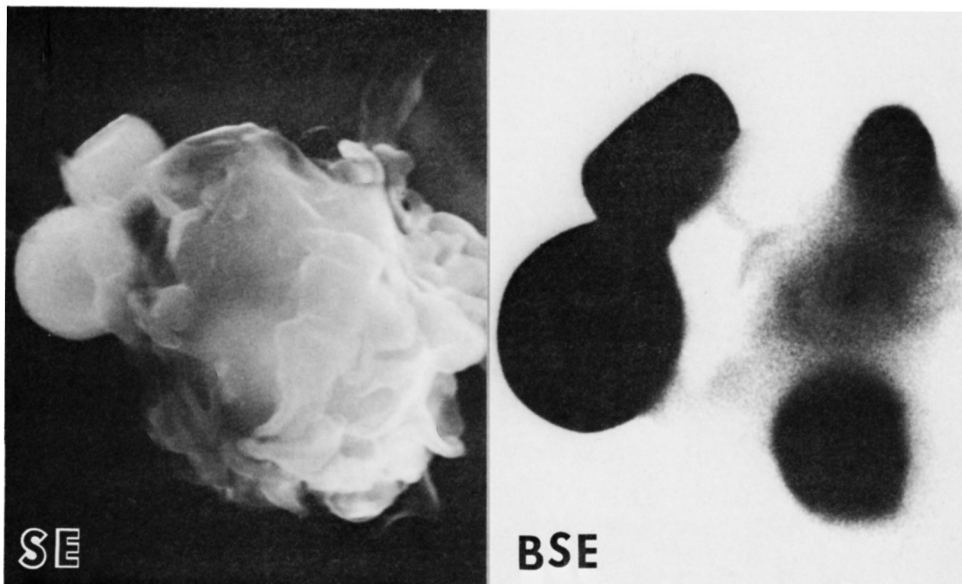


Fig. 3. A neutrophil phagocytosed iron carbonyl particles.

SE : Secondary electron image

BSE : Back scattered electron image

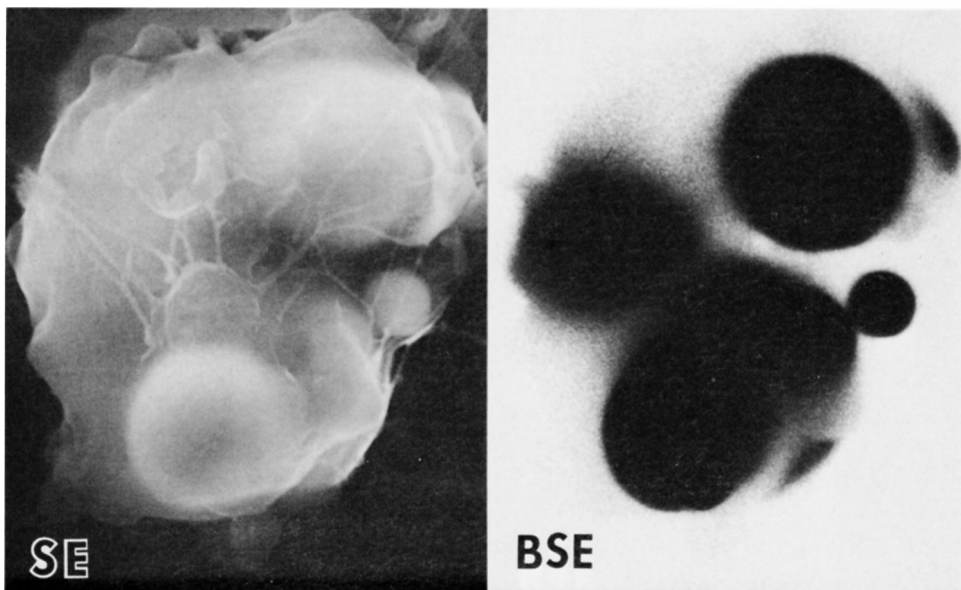


Fig. 4. A neutrophil phagocytosed many iron carbonyl particles.

貪食の際の形態学的変化を観察すると、好

中球中に貪食された鉄粒子の量が増すにつれ、

好中球表面のmicroridgeは減少していた。そして、多数の鉄粒子を貪食した好中球では、最早、表面のmicroridgeやruffleはすべて消失して、全体的に平滑、球状化する像が観察された(図4)。

このように、白血球の表面形態と同時に、食胞中に貪食された鉄粒子は電子ビームの変換スイッチひとつで容易に識別観察できた。貪食の程度が増すにつれ、白血球表面の突起は少なくなったが、これらは、貪食の際、食胞という形で細胞膜が消費され、その代償過程で、全体的に球状化、縮小化することが考えられた。Palade⁶⁾らは、細胞内の空胞が細胞膜と融合し、その収支を補うという報告をしているが、今回は、細胞膜の消費が補充を上回っており、細胞膜の収支は、貪食される異物の量に左右されるものと考えられた。

走査電子顕微鏡の二次電子像のみでは、白血球の同定、選別が困難なことが時にある。例えば、リンパ球細胞表面のmicroridgeの形態で、T,B細胞の分類が一時論ぜられ、脚光を浴びたが、現在は、否定的な見解が一般的である。それは、細胞の代謝、およびcell cycleにより表面構造に違いがみられ、また、固定等の操作による変異が膜表面構造の変化の原因になるものと考えられている。だが、今回は、反射電子を応用することで、白血球内部からの情報を引出すことに焦点を絞って、貪食能という観点から、好中球の機能形態学的観察を行ったが、本手法が各種遊走細胞の識別にも充分応用し得るものと思われる。

今後、各種重金属を応用し、物質の局在のみならず、細胞の機能と形態をからめた研究がさらに進展することは疑いない⁷⁾。また、白血球数、及び、鉄粒子数を一定にする事により、貪食能の新しい形態学的定量化も不可能

ではない。各種疾患への応用も含めて、将来の本手技の改良、発展が大いに期待される。

ま と め

1. 遊走好中球に、鉄粒子を貪食させ、反射電子の応用で好中球貪食能を機能形態学的に検索し得た。
2. 好中球の貪食の亢進に伴い、細胞表面の突起が減少し、平滑化、球状化した。
3. 好中球貪食能の新しい形態学的指標の可能性が考えられた。

参 考 文 献

- 1) 水上茂樹, 柿沼カツ子, 編: 白血球と食作用。講談社, 1984
- 2) 柿沼カツ子: 白血球のNADPH酸化酵素によるスーパーオキシド生成。炎症3, supplement 1: 64-69, 1983
- 3) 揚井正紀, 森 剛一, 福田友子, 他: ルミノール添加による好中球の化学発光測定法 炎症3, supplement 1: 82-87, 1983
- 4) 古田 茂, 松永信也, 大山 勝, 他: 慢性副鼻腔炎とCHEMOTAXIS. 日耳鼻感染症研究会会報, 2: 1-5, 1984
- 5) 上野員義, 松永信也, 大山 勝, 他: 白血球貪食能の機能形態学的検索-反射電子を用いた走査電顕的観察-。医生物走査電顕, 14: 85-88, 1985
- 6) Palade GE, Bruns RR et al: Structural modulation of plasmalemmal vesicles. J Cell Biol 37: 633-649, 1968
- 7) Soligo D, Harven ED, et al: Ultrastructural cytochemical localization by back scattered electron imaging of white blood cells. J Histochem Cytochem 29: 1071-1079, 1981

質 疑 応 答

質問 西澤芳男（真正会病院）

静脈血に比較して慢性副鼻腔炎患者鼻汁での好中球の貪食能，生化学的活性，形態学的機能が亢進しているのは慢性副鼻腔炎において補体系，抗体系その他の活性化のためか。

応答 上野員義（鹿大）

化学発光を用いた検索により，慢性副鼻腔炎鼻汁中の好中球の貪食能が亢進されていることが示された。静脈血中の好中球も貪食が亢進するにつれ，細胞表面が平滑化することも機能形態学に明らかになっている。

鼻汁好中球の貪食の亢進は，補体，ファイブロネクチン，抗体などが関与しているものと思われる。