

－最終講義－

形態変化の計量化を目指して

川崎医科大学解剖学教室 佐々木 和信

はじめに

川崎医大で過ごした21年間で、特に後半は大学全体の研究のサポートする担当でしたから、自分の研究を積極的にアピールする機会を作りませんでした。その立場を離れた今、共同研究者達への穴埋めの気持ちで、これまでの研究テーマをお話をさせていただきます。

はじめに研究のモチベーションを与えてくれた、2枚の図を紹介します。

研究のスタート

図1は、母校である北大医学部の解剖学第三講座の伊藤 隆教授が1963年に発表した論文¹⁾からの引用で、図2は血液学教科書「WintrobeのClinical Hematology」の旧版²⁾に掲載されていたものです。

図1は実験動物マウスの胸腺のグラフです。胸腺は縦隔の上部にあり、リンパ球がぎっしりと詰まった白色の臓器で、中心部の髓質の周囲を皮質が取り囲む比較的単純な構造です(図3)。図1の棒グラフは胸腺の重量と皮質・髓質それぞれの割合の生後変化を示しています。

北大医学部では、その当時、基礎系の先生がご自分の研究を高学年の学生に紹介する授業があり、その中で伊藤隆教授が示された一つです。このグラフは、雄と雌のマウスの胸腺重量は、生後増加し35日をピークに減少する。その減少の仕方は、雄の方が雌に比べるとずっと激しい。胸腺の構造でみると、減るのは髓質ではなく皮質であるという事です。いまでこそ胸腺はT cellをつくる中枢リンパ器官であるというのはあたり前の常識ですが、この論文がでた1963年は当時胸腺がどういう器官なのかよくわからなかった時代です。胸腺は当時でも、

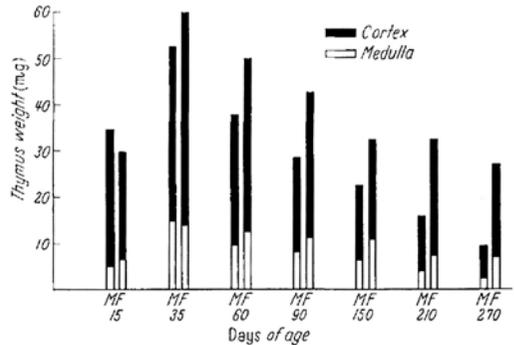


図1 雌雄マウスの胸腺重量の生後変化¹⁾

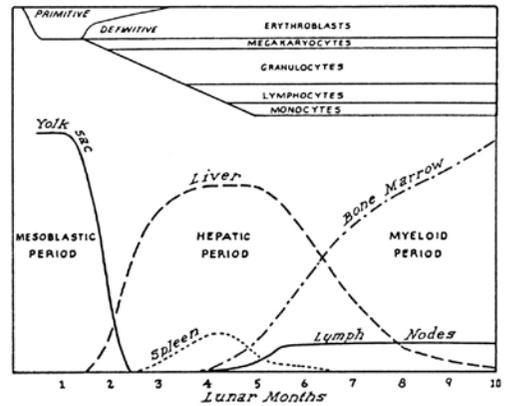


図2 胎生期・生後早期の造血組織の変遷²⁾

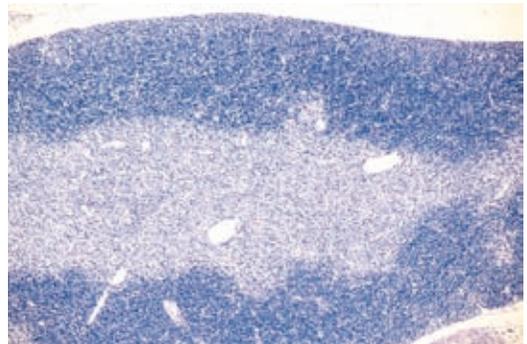


図3 マウス胸腺の顕微鏡写真

子供では大きい大人になると小さくなるといういわゆる齢退縮という現象は知られていました。しかし、胸腺の機能を検討するという立場で、実験動物で厳密に示された報告はなかった。胸腺の齢退縮における胸腺構造の変化と性との関連を、このグラフは明確に示しています。

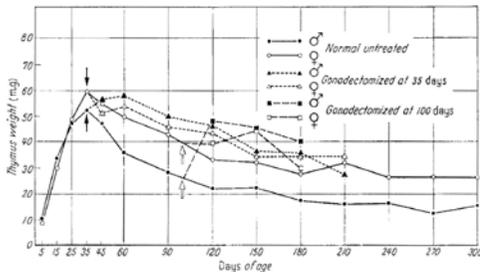


Fig. 1. Absolute weights of thymus in normal and gonadectomized mice. Values indicate mean for each group, and standard errors are omitted. Solid arrow: gonadectomy at 35 days. Open arrow: gonadectomy at 100 days.

図4 性腺除去による胸腺重量の変化¹⁾

図4も同じ論文のグラフで、マウス胸腺重量の実験による変化を示しています。正常の雄・雌マウスの生後5日から300日までの重量変化を示し、生後35日で、精巣・卵巣をとった後、さらに生後100日で性腺をとった後の重量変化から、性腺が胸腺に大きな影響を与えている事を示しています。これらのデータを基礎に、彼は胸腺リンパ球の研究を世界に先駆けて進めて行きました。そして教室員が皮質と髄質のリンパ球、胸腺上皮性細胞の形態に関する論文など、世界から注目される論文を次々と発表していました。

授業の中で彼は、「研究にはいろいろのパターンがある。だれも知らないことを世界で初めて明らかにすることが研究でなくて、よく知られてはいるものの、考えてみたら正確に把握されていない事象は実は沢山あって、それに気づき、その現象を客観的にだれもが納得できるように示すことも研究の一つ。それにもとづいて解析を進めることが大切である」というような事をはなされました。それを聞いて、そういう研究なら、私にもできるかもしれないと思っ

たのです。それが卒業後、解剖学教室に進んだ理由です。しかし、そのような研究スタイルで認められる結果を出すには、大変な努力と研究に対するセンスが必要なことに気がついたのは、ずっと後になってのことでした。ともあれ、卒業後、優秀な先輩の中に加えていただき、自分の研究をはじめました。

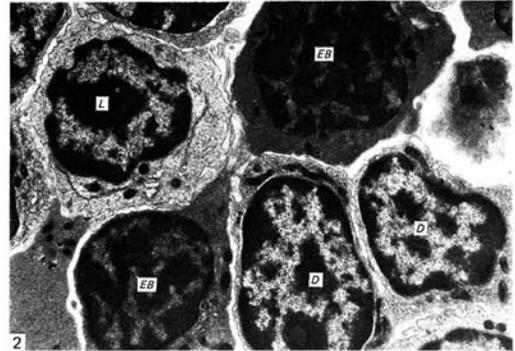


Fig. 2. Bone marrow of normal 60 days old female. Three small lymphocytes and two erythroblasts (EB) are observed. Dark small lymphocyte (D) with a narrow dark cytoplasm can be distinguished clearly from light small lymphocyte (L) with a pale abundant cytoplasm. Formalin and glutaraldehyde fixation. $\times 8000$.

図5 骨髄リンパ球の電顕写真³⁾

図5は学位のテーマとした骨髄の電顕写真です。私が研究を始めた1970年代当時、T-cell, B-cellが盛んにいわれるようになり、教室ではT-cellについて沢山の業績をだしていましたが、骨髄はテーマではなかった。そこで、私はB-cellの産生部位をテーマにしました。B-cellのBとは、もともと鳥類のファブリキウス嚢(Bursa Fabricius)の頭文字Bだったのですが、ファブリキウス嚢の無い哺乳類では骨髄が相同器官であり、骨髄(Bone marrow)のBをそのまま流用したわけです。しかし、実験動物の骨髄に形態学的にリンパ球はいるのか？存在するとして、どんな特徴を持つのか？当時、B-cellは免疫学的な視点で研究がどんどんすすんでいましたが、形態の視点での報告は少なかつた。胸腺の研究をお手伝いしていた事で、リンパ球の形態には目が慣れていましたので、骨髄の観察にスムーズに進めたと思います。電子顕微鏡で見ると、小リンパ球は確かに存在しました。その特徴は、細胞質が薄く細胞核の周囲を取り囲んでいるものと比較的広い細胞質と

小器官を持つ少なくとも二種類がいる。これを骨髄内でのBリンパ球の成熟と関連づけ、その生後の変化などを計量化してとらえていきました。リンパ球を含め他の造血系細胞の比率の変化を調べて学位論文としました。

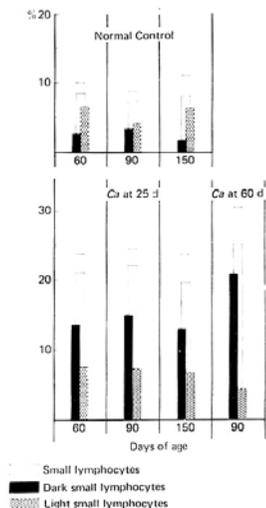


Fig. 4. Frequencies of marrow small lymphocytes in normal and castrated males. Castration was performed at the age of 25 days (Ca at 25 d) or 60 days (Ca at 60 d). Bars represent standard deviations.

図6 骨髄リンパ球の比率の生後変化³⁾

図6は性腺を除去すると、2種類の小リンパ球の比率がどう変わるか？男性ホルモンを注

射したらどうなるか？イギリスの Journal of Anatomy に投稿した論文³⁾のグラフです。この論文は原稿を編集者に送り、採用の可否についての返事を待っていたら、いきなり校正用のグラフリが送られてきて、びっくりしたけれど、たいへん嬉しかったことを覚えています。そんな事はその後の40年の研究生活の中でそのとき1回限りの事でしたが、それ以来、イギリスが大好きになりました。気を良くして、リンパ球の観察に並行して赤血球系でも観察を進めました。

「形態の変化を数値化してグラフとして提示する」というのが、伊藤隆から教わった事のひとつです。骨髄という臓器は全身に広く分散しているので、胸腺の様に全体量を求めにくい臓器です。骨髄の量を一つのマスとして捉えて見たいという目的で、マウスの全身の切片を連続で作り、骨髄、胸腺、脾臓、全身のリンパ節の体積をもとめ、胎生期から新生児期でのそれぞれの発達を比較しました⁴⁾(図7)。統計的な裏付けは当然必要ですので、こういう仕事は若い体力のあった時だからできたのだと思います。またこの頃、マイクローム替え刃の普及に



Fig. 2. Total volume of the bone marrow, thymus, spleen and lymph nodes at the 18th day of embryonic life (18d-E), at birth (0d) and at 5 days after birth (5d). BM bone marrow, Tm thymus, Sp spleen, LN lymph nodes.

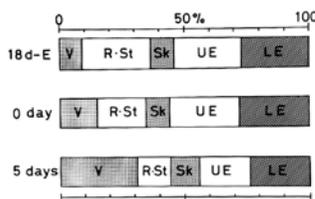
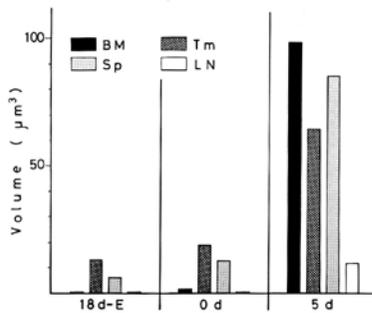


Fig. 3. Volume rate of the marrow in various parts of the skeleton. V vertebrae, R-St ribs and sternum, Sk skull, UE upper extremities, LE lower extremities. The other abbreviations are the same as in Figure 2.

図7 生後5日のマウス全身切片と造血リンパ組織の体積の比較⁴⁾

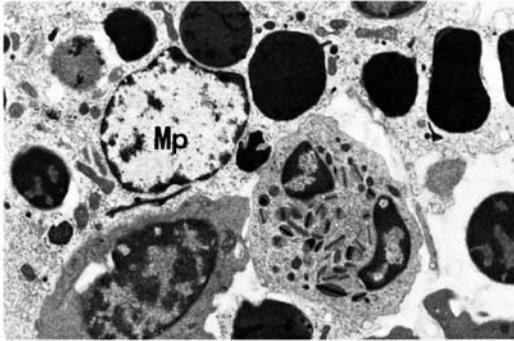


Fig. 1. Bone marrow of a young female mouse at 40 days of age. Macrophage (Mp) has a variety of inclusions, most of which appear as spherical phagolysosomes. $\times 5,000$

図8 生後40日マウス骨髄マクロファージの電顕写真⁵⁾

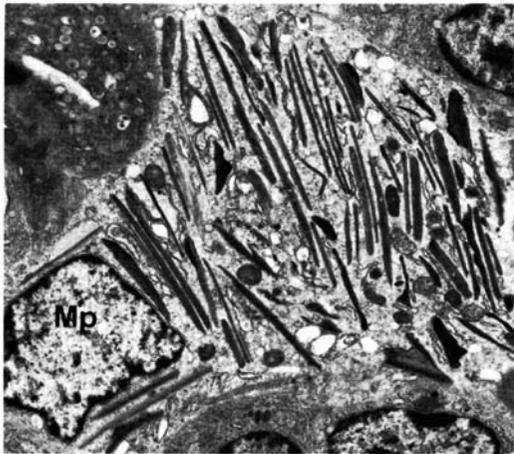


Fig. 3. Bone marrow of a 150-day-old female. Crystalloid inclusions arranged in parallel arrays occupy a large portion of the cytoplasm of macrophage (Mp). $\times 7,000$

図9 生後150日マウス骨髄マクロファージの電顕写真⁵⁾

より、薄切時の刃の状態を常時ベストに保てる様になった事が、大きな助けになりました。

骨髄の観察を続けるうち、血球系の細胞以外に、造血環境を構成する細胞としてマクロファージが必ず存在する事に注目するようになりました。骨髄のマクロファージは図8の様に造血細胞に由来する封入体を沢山持ち、その内容が加齢と共に変わっていきます⁵⁾。図8は生後40日、図9は生後150日のマウス骨髄のマクロファージで、この細長い封入体を結晶様封入体と呼んでいます。この封入体の変化の数値

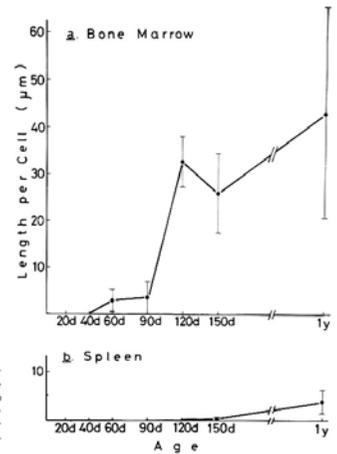


Fig. 9. Length of crystalloid per macrophage in the bone marrow (a) and red pulp (b) of female mice at various ages. Each point represents the mean \pm SD, d Days, y year of age.

図10 骨髄と脾臓の結晶様封入体の生後の計量観察⁵⁾

化を試みました。

図10は結晶様封入体の発達を骨髄と脾臓で比較したグラフです。封入体は、骨髄でも脾臓でも造血のはじまりではなく、終わりの時期にでてきます。だとすると、胎生期の造血組織がシフトする時、そこにマクロファージがいるならば、この封入体が出現するのではないだろうかと考えた次第です。

胎生期造血の研究

ここで図2に話を戻します。この図が掲載された Wintrobe の *Clinical Hematology*²⁾ は当時日本ではアジア版としてでまわり、割安の値段で学生でも手に入れる事ができました。図2は胎生期の造血組織の発生を示すと同時に、各種の血液細胞の形成の順序も同時に示し、大変示唆にとんだ図だと思えます。丁度そのころ、英国・ロンドンで胸腺の研究を精力的につづけていた Dr Marion Kendall の解剖学教室で過ごす機会を得る事ができました。マクロファージに関する興味もあって、胎生期造血とくに卵黄嚢をテーマとしたい事を相談し、約1年間を St Thomas's Hospital Medical School で卵黄嚢⁶⁾をテーマに観察しました。その後、肝臓造血、脾臓造血へと胎生造血組織を順に観察の対象としていきました。結論から言うと、卵黄嚢造血が

ら肝臓造血，肝臓造血から骨髓造血のシフトの際に，マクロファージに結晶様封入体は全く出てきませんでした。

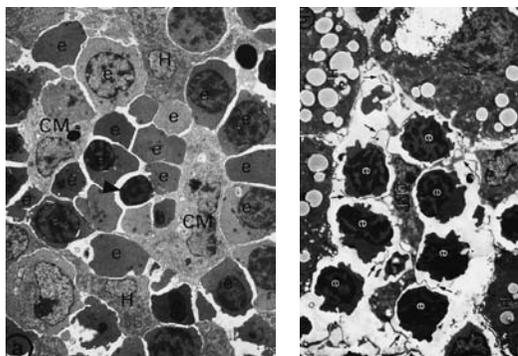


図11 肝臓赤芽球島の電顕写真
左：造血最盛期⁷⁾ 右：造血退縮期

しかし，肝臓造血を観察していくと，図11のようにマクロファージと赤芽球の間に，特徴的な構造である「赤芽球島」が形成され，造血がピークを過ぎるとその構造が大きく変化をしていく事がわかりました⁷⁾。Wintrobeのテキストの図²⁾は，一見グラフのように見えますが，実は造血の活動をイメージとして表した模式図であり，造血の変化を客観的に数値で表した図ではありません。そこで，肝臓造血の推移を数字の変化としてとらえたいと，造血細胞の広がりや面積比の変化としてもとめたのが図12です⁸⁾。

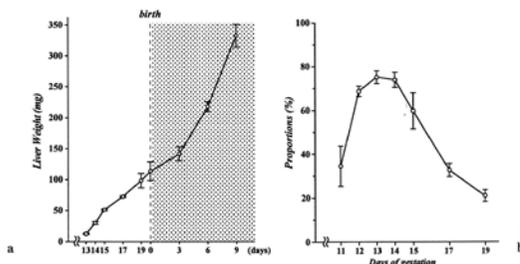


Fig. 1. Liver weight and histometry of the hematopoietic compartment. a. Liver weights from 13 days of gestation to 9 days after birth (mean±SD). b. Area proportions of hematopoietic compartments of fetal livers (mean±SD).

図12 マウス肝臓重量の変化と造血量の推移⁸⁾

これによって，胎生期の造血性肝臓で客観的なデータによる造血活動の変化をベースに研究を進める事ができるようになりました。例えば造血下降期には，造血細胞が減少するだけでなく，肝細胞も一部は細胞死をすること。その細胞死は核の変化が主体のアポトーシスではなく，小胞体などの膜変化が主体である事がわかりました⁹⁾(図13)。

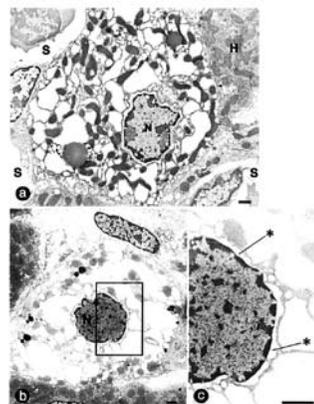


Fig. 9. Four types hepatocytes of type I cell death. Bar: 1 μm. a. Normal liver at 3 days of age. The nucleus (N) is roughly round but irregularly contoured. Due to the highly dilated sinusoid or the ER, the cytoplasm has a characteristic foamy appearance. H = intact hepatocyte. S = sinusoid. b. Normal liver at 4 days of age. Dilated sinusoids tend to form large vacuoles which fully occupy the cytoplasm. The nucleus (N) appears intact. c. A high-power micrograph of the boxed area in b. Asterisks indicate dilated perimuclear cisternae. Narrow spots of the cytoplasm contain mitochondria, and cytoplasmic ribosomes have disappeared with vacuole formation.

図13 新生子マウス肝細胞の細胞死⁹⁾

おわりに

肝臓造血の推移の数値化をベースに，共同研究者の園田先生は，肝臓の造血部で赤芽球島中心マクロファージの免疫染色の特徴が変化する事を見つけ，それを成熟マウスで肝臓に髄外造血を発生させる研究に応用しています。また熊野先生は，肝臓造血下降期に肝細胞や胆管上皮細胞が造血細胞の除去処理に加わり，造血の終息が肝内胆道の発達に関連している可能性を示しました。若手の彼らは，観察した結果を客観的に数値化したデータとしてとらえ，それぞれの研究を進展させています。今後，彼ら独自の視点で形態変化の数値化を試み，さらに研究を伸展させる事を確信しています。

謝辞

これらの研究を蔭でサポートしてくれた須田満寿美さん，板野ちか子さんに深く感謝しています。試料作成，切片観察，写真撮影など研究に関する作業は，組織・

電子顕微鏡センターで、上平賢三元副センター長や須田泰司主任によるサポートのご助力により推進する事ができました。重ねて感謝いたします。

文 献

- 1) Ito H, Hoshino T: Influence of the gonad on the thymus in the mouse. *Zeitschrift Anat. Entwickl.*123:490-497, 1963
- 2) Lee GR, Bithell TC, Foerster J *et al.*: Wintrobe's Clinical Hematology (9th ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, 1993
- 3) Sasaki K, Ito T: Effects of gonadectomy and testosterone on lymphocytes in the bone marrow of the mouse: an electron microscopic study. *J Anat* 30:429-438, 1980
- 4) Sasaki K, Matsumura G, Ito T: Light and electron microscopy of bone marrow hematopoiesis in late embryonal and early postnatal mice: A qualitative and quantitative study. *Arch histo jap* 47:239-250, 1984
- 5) Sasaki K, Matsumura G, Ito T: Crystalloid inclusion-containing macrophages in the bone marrow and red pulp of the mouse, with particular relation to age, sex and hydrocortisone administration. *Arch histol jap* 46:381-391, 1983
- 6) Sasaki K, Kendall M: The morphology of the haemopoietic cells of the yolk sac in mice with particular reference to nucleolar changes. *J Anat* 140:279-293, 1985
- 7) Sasaki K, Iwatsuki H, Suda M, Itano C: Scavenger macrophages and central macrophages of erythroblastic islands in liver hemopoiesis of the fetal and early postnatal mouse. *Acta Anat* 147:75-82, 1993
- 8) Sasaki K, Sonoda Y: Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo. *Arch Histol Cytol* 63:137-146, 2000
- 9) Sasaki K, Sonoda Y, Kumano I, Suda M: Types of programmed cell death: Two variants expressed by neonatal murine hepatocytes. *Cells Tissues Organs* 175:34-42, 2003

略 歴

《略 歴》

昭和46年 北海道大学医学部卒業
昭和48年 文部教官北海道大学解剖学助手
昭和57年 同解剖学助教授
平成2年 川崎医科大学教授（解剖学第二教室）に赴任
平成4年 同解剖学教室主任教授



