

Title	特異な走査電顕形態（lamellipodia）を示すヒト末梢血リンパ球についての研究
Author(s)	森田, 隆子
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36022
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・（本籍）	もり 森	た 田	たか 隆	こ 子
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8 1 2 1		号
学位授与の日付	昭 和 63 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学位論文題目	特異な走査電顕形態（lamellipodia）を示すヒト末梢血リンパ球 についての研究			
論文審査委員	（主査） 教 授 木谷 照夫			
	（副査） 教 授 北村 旦 教 授 垂井清一郎			

論文内容の要旨

〔目 的〕

各種の白血球は塗沫染色標本でそれぞれ特有な形態を示すのみならず、生細胞の表面形態も特有な形態を示すことが知られている。私は、large granular lymphocyte (LGL) が増殖する LGL 白血病症例を走査電顕 (SEM) で観察したところ、一部の症例に細胞の付着した接着部のまわりに円板状に広がる膜状突起を持つ独特な形態の白血球細胞を認めた。この形態は Sundqvist ら (1982) がリンパ球を PHA, Con A などで刺激した時に観察した lamellipodia と名付けた形態に類似するが、非刺激白血球では知られていない。クローナルな増殖である白血球細胞にこのような特殊な形態がみられることは正常リンパ球中にもこの形態の細胞が存在することが考えられたので、正常末梢血リンパ球、Percoll 分離 LGL, FACS 分離 Leu 11 細胞, Leu 7 細胞などについて SEM を用いてこの形態のリンパ球がどのようなリンパ球分画中に存在するかを検索した。

〔方 法〕

1. 対象； LGL 白血球 6 例及び健常成人 7 例について検討した。
2. 細胞分離； ヘパリン加末梢血より Ficoll Hypaque 比重遠心法にて単核球を分離した。末梢血 LGL は、さらに Percoll 不連続密度勾配法を用いて分離回収した。得られた細胞分画について cyto-spin にて塗沫標本を作成し、May-Giemsa 染色にて光顕的に LGL の % を数えた。
3. リンパ球亜分画単離方法； あらかじめ透析にて NaN_3 を除去した Leu 11 a (FITC-conjugated) モノクローナル抗体を用い、単核球 1×10^6 個に対して上記抗体を $10 \mu\text{l}$ 反応させ、cell sorter (FACS IV 又は FACStar, Becton Dickinson Co.) にて Leu 7 分画及び Leu 11 分画を sorting した。

4. 走査電顕試料作製法； 単核球をHanks balanced salt solution（血清非添加，37℃）にて 1×10^6 個/mlに調整し，カバーガラス小片を入れた小容器に静かに注ぎ，細胞を37℃，大気中（CO₂非増加）で15分間培養してガラス面に付着させた後，2.5%Gutaraldehyde固定液を静かに同量加えて，室温で約1時間固定した。その後，PBSにてガラス片を洗滌し，アルコール系列にて脱水後，酢酸イソアミルに浸漬し，液状炭酸を用いて臨界点乾燥を行い，試料表面に白金を真空蒸着させて，走査型電顕で細胞表面形状を観察した。次に，lamellipodiaの形態を最も至適な状態で観察する条件を求める目的で，37℃での細胞培養時間（5，15，30，45，60分の経時的観察），付着面の処理の有無（未処理とpoly-L-lysine処理），培養時のCO₂濃度増量の有無について検討を加えた。なお，SEM形態においては，リンパ球と，単球及び顆粒球とは識別可能であるため，リンパ球のみを各条件について300個ずつ観察しlamellipodia陽性率を算定した。

[結 果]

1. lamellipodia観察のためのSEM至適条件； 細胞形態については培養時間15分のものがlamellipodiaが最も明瞭であり，ガラス面に付着している細胞分布密度は約30分でplateauに達した。Poly-L-lysine処理ガラス面では，細胞の付着数は増加せず，リンパ球の核周囲に細胞質の断片様のものを散在性に伴う変形した細胞が，3.3～19.3%認められ，観察には不適當であった。5%CO₂存在下では，大気中に比してlamellipodia陽性率が約1/2に減少した。従って，未処理のガラス面で大気中で37℃，15分間置くのが至適条件と考え，以下はこの条件で実験を行った。

2. LGL白血病： LGL白血病症例6例中3例に，末梢血白血病細胞のSEM像でlamellipodia形態が認められた。その3例の共通点は表面マーカーがLeu 11陽性を呈することであった。

3. 健常人末梢血リンパ球； 健常人末梢血中のlamellipodia形成細胞は7～11%（ $8.9 \pm 1.4\%$ ）であった。

4. 健常人末梢血Percoll fractionationによる各fractionでのLGLの比率とlamellipodia陽性細胞； LGLとSEMでのlamellipodia陽性率とは，正の相関があり，計3回の実験における相関係数は各々（exp 1） $r = 0.81$ ，（exp 2） $r = 0.95$ ，（exp 3） $r = 0.94$ であった。

5. Leu 7⁺及びLeu 11⁺亜分画細胞； Leu 11⁺分画に $29.4 \pm 3.9\%$ ，Leu 11⁻分画に $2.9 \pm 0.7\%$ ；Leu 7⁺分画に $8.8 \pm 2.4\%$ ，Leu 7⁻分画に $8.0 \pm 1.2\%$ のlamellipodia形成細胞が認められた。

[総 括]

LGL白血病症例中，Leu 11陽性を示した例の白血病細胞はlamellipodiaが陽性であった。健常人末梢血リンパ球のSEM形態の検討の結果，LGLに高率にlamellipodiaが認められ，リンパ球サブセットとの関連は，Leu 11陽性細胞と強い相関があるが，Leu 7分画とは相関がみられなかった。以上より，lamellipodia陽性細胞は，LGL分画でも特にLeu 11分画に含有され，しかも，さらにその中に亜分画を形成することが示された。また，lamellipodiaは培養液中のpHの変化（5%CO₂，15分間培養でpH7.3→6.8）により形成率が変動したことから，pHに左右される形態である。

論文の審査結果の要旨

本研究は、走査電顕を用いて白血病細胞の表面形態を観察し、large granular lymphocytic (LGL) 白血病において今までリンパ性白血病では知られていなかったlamellipodiaという特異な形態を見い出した。さらに、この形態を示す症例の細胞の共通点がLeu 11陽性であることに着目し、正常リンパ球を観察し、Leu 11陽性サブセット内に一定の比率でこの形態を示すリンパ球が存在することを明らかにしている。以上の成績は、リンパ球形態学に新たな知見を加えたものであり、学位に値する研究と考える。