

ヒト胸腺における抗アデノウイルス抗体保有細胞の 分布について。—蛍光抗原法を用いての検索—

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

磯 辺 善 成

〔原稿受付：昭和49年8月31日〕

Localization of Anti-Adenovirus Antibody- Containing Cells in Human Thymus

by

YOSHINARI ISOBE

The 2nd Surgical Department, Kyoto University Medical School

(Director ; Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

Abstract ; Infantile intussusception, appendicitis and non-specific mesenteric lymphadenitis have been noted to occur in conjunction with virus infection, especially adenovirus infection.

It has been suggested by our recent studies that anti-adenovirus antibody-containing cells appear in thymus after 3 to 5 days of oral immunization of mice with mouse adenovirus.

The present experiment was designed to study the existence of anti-adenovirus antibody-containing cells in human thymus. Thymic tissues from patients with congenital heart diseases were examined by the immunofluorescent antigen technique using FITC-labeled soluble A-antigen of adenovirus 12.

It was found that 51 of 67 cases had anti-adenovirus antibody-containing cells in thymus. They were found mainly in the medulla, interstitial connective tissue and corticomedullary junction. Almost all of the anti-adenovirus antibody-containing cells were identified as plasma cells by post-staining the same sections with Hematoxylin and Eosin.

These same plasma cells were found to contain IgG as evidenced by staining with FITC-or Rhodamine-labeled anti IgG.

第1章 緒 言

腹部外科領域疾患である小児腸重積症、軽症虫垂炎、非特異的腸間膜リンパ節炎の際に、発症に先だち上気道感染が認められることがある¹⁾。また、これら疾患の腸間膜リンパ節はしばしば腫脹していることが認め

られている¹⁻⁹⁾。

1955年にKjellen¹⁰⁾は非特異的腸間膜リンパ節炎の腸間膜リンパ節よりアデノウイルスを分離するのに成功し、その後小児腸重積症、虫垂炎の際の腸間膜リンパ節からもアデノウイルスが分離されるようになった¹⁻⁹⁾。更に、これら疾患の手術時にアデノウイルスに

対する血清抗体を測定すると、抗体価が上昇していることも明らかにされてきた¹⁻⁹⁾。

こうした事実から、上記疾患群とアデノウイルス感染との関連が次第に注目されるようになってきた。

一方、戸部¹¹⁾はこれらの報告とは別個に、サイトメガロウイルスによる乳児虫垂炎症例を報告し(1961)、更に、戸部・浜田¹²⁾近年虫垂炎の病像が変化して軽症虫垂炎が増加していることから、軽症虫垂炎の発症を検討している。その過程で、軽症虫垂炎の患者に有意の差でエンテロウイルス群、あるいはアデノウイルス群の補体結合抗体価が上昇することを示し¹²⁾(1963)、蛍光抗体法でエンテロウイルス群及びアデノウイルス群抗原を実証して¹³⁾(1965)、虫垂炎の trigger としてウイルス感染を無視出来ないことを提唱している¹³⁾⁻¹⁵⁾。同時にコクサツキ-B₅型ウイルスをカニクイザルに¹⁶⁾⁻¹⁸⁾(1967)、マウス由来のアデノウイルスをマウスに¹⁹⁾(1968)、それぞれ経口接種して、これらのウイルスの経口感染が腹部外科領域での虫垂炎、腸間膜リンパ節炎、小児腸重積症の病理組織学的主徴ともいふべき腸管壁及び腸間膜のリンパ節腫脹の原因となり得ることを提唱している。

次いで、児玉²¹⁾²²⁾(1968)、アデノウイルス群共通抗原である可溶性A抗原に fluorescein isothiocyanate (FITC) を標識し、アデノウイルス抗体保有細胞を組織細胞レベルで確認し得る独創的ないわゆる蛍光抗原法を開発し、アデノウイルスに関して、その感染病理と同時に抗体産生機序の解明をも可能とした。

正木・児玉²³⁾(1972)、従来のウイルス学的検索と同時に、本法を用いてマウスにマウス由来アデノウイルスを経口接種し、マウスアデノウイルスの感染病理と抗体産生機序を検索し、腸管が脾や腸間膜リンパ節と同様に、アデノウイルス感染では主要な抗体産生場であることを明らかにした。更に、正木²⁴⁾(1972)アデノウイルスを経口接種したマウスでは、接種後早期に胸腺にアデノウイルス抗体保有細胞、あるいはアデノウイルス抗原・抗体複合物を貪食したと思われる細胞が出現するという興味ある事実を見出した。

そこで、著者はヒト胸腺におけるアデノウイルス抗体保有細胞の分布を検索し、その意義について若干の考察を加えることとした。

第2章 検索対象及び方法

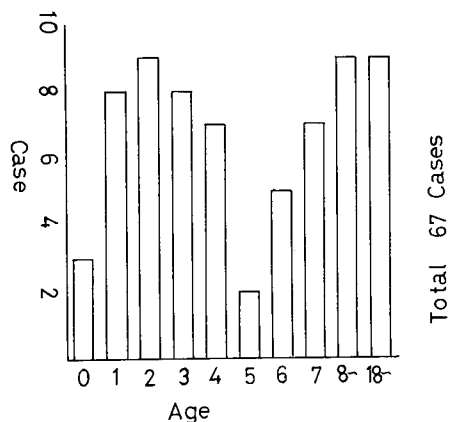
第1節 検索対象

検索対象であるヒト胸腺では表1の如く、主に先天

性疾患患者の胸腺である。というのも開心術に際して従来はただ放棄していた胸腺の小さなブロックを利用することが可能であったからである。

対象となったものは生後10ヶ月の症例1から58才の症例67の計67例である。男性30例、女性37例であり、年齢分布は図1の通りである。

Fig.1 Age Distribution of Human Thymus Examined Anti-Adenovirus Antibody Containing Cells



この他に、カニキュレーションの際にソケイ部リンパ節を6症例で入手することができたので、胸腺と同じ方法で検索した。

なお、これらの胸腺については各年齢層のものを相互に比較検討したが、肉眼的及びヘマトキリン・エオジン染色による光顕学的検索では著明な病的差異はそれらの間に全く認めなかった²⁴⁾⁻²⁷⁾。

第2節 染色標本の作成

生検を行った胸腺を直ちに冷95%²⁵⁻²⁸⁾エタノールで24時間固定する。この際標本の厚さ5mm以下とし、充分に固定が行われるように注意する。次いで、冷98%エタノールで24時間、更にあらかじめ無水硫酸銅を入れて作っておいた冷無水エタノールで48時間固定する。この間数回冷エタノール水を交換する。更に冷キシロールに3回通してエタノールを駆逐し、次いで56°C~58°Cのパラフィン溶液で包埋した。これをストッカー内に保存し、必要に応じてマイクロームで3~4μの厚さに切り、無蛍光ガラスに附着させ、37°Cの孵卵器内に30分間入れ、染色標本を作製した。また当日染めない切片標本は、標本箱に入れセロテープで封をし、冷蔵庫内に保存した。染色の際には、この標本箱

を冷蔵庫からとり出し、充分に室温になじましてから箱をあけて染色に供した。

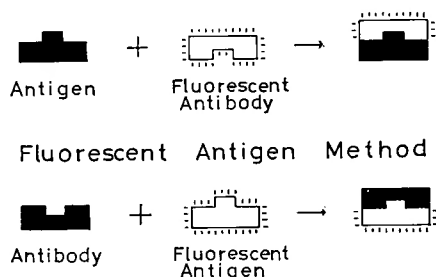
第3節 蛍光抗原法の手技

1) 蛍光抗原法の原理

組織切片上のアデノウイルス抗体保有細胞を蛍光抗体法によるよりも簡単に、而も正確に観察する目的で、児玉²¹⁾らによって考案された蛍光抗原法を用いて、ヒト胸腺におけるアデノウイルス抗体保有細胞の検索をおこなった。

蛍光抗原法の原理は児玉らにより詳しく報告されている。図2はその概略を示すものである。すなわち、

Fig.2 Fluorescent Antibody Method



ある抗原に対する特異抗体保有細胞を組織切片上で観察しようとするもので、抗原に直接蛍光色素を標識しておき、これを組織切片と反応させて特異抗体保有細胞を蛍光顕微鏡下で観察しようとするものである。この原理に従って、胸腺におけるアデノウイルスに対する特異抗体保有細胞の検索をおこなう為に、児玉らと同様に抗原としてアデノウイルスの群共通抗原であり^{29)~30)}、同時にアデノウイルスの主要構成成分である可溶性のA抗原を用いた。

2) 蛍光抗原液の作製

目的とする蛍光抗原液の作製の為には、i) アデノウイルス12型の培養、ii) A抗原液の精製、iii) A抗原液に対する蛍光物質 FITC の標識といった3つの段階の操作を必要とする。

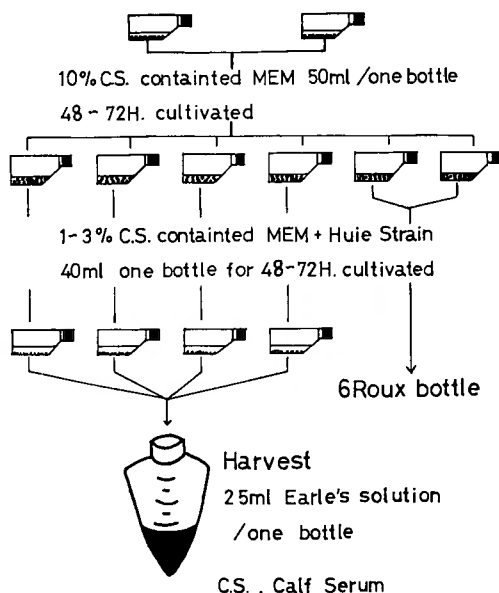
蛍光標識するための抗原液として、アデノウイルス12型のA抗原を用いた。A抗原は可溶性の群共通抗原であるので、どの型のアデノウイルスから精製しても同じであるけれども、特にアデノウイルス12型を用いた理由は、DEAE-Cellulose Column を用いて抗原を溶出するもので、いわゆる tailing effect がなく、他抗原の混入を比較的容易に避けることができるからである³¹⁾。

i) アデノウイルス12型の培養

KB細胞³²⁾を用いてアデノウイルス12型 (Huie 株) (以下Ad-12と略す。)の培養をおこなった。Ad-12 (Huie株) 及びKB細胞は京都大学ウイルス研究所浜田忠弥博士 (現新潟大学細菌学教室教授) の御厚意により提供していただいたものを使用した。培養液としては、Eagle's MEM (minimun essential medium) を使用した。MEM に抗生物質として100単位の penicillin と100r の streptomycin を加えた。また、使用前に glutamine を1%加え、NaHCO₃ で pH の補正をおこない、pH 7.5 に調整した。更に、KB細胞の継代培養のときには10%の calf serum を、Ad-12 培養のときには、1~3%の calf serum を加えた。

培養の順序は図3に示すように、まず単層培養され

Fig.3 Culture Method of Adenovirus-12



ている2本の Roux 培養瓶よりKB細胞の回収をおこなった。つまり、Roux 培養瓶の培養液を注意深く除去し、これに0.02% EDTA を加えて20~30分間放置したあと、10mlの駒込めピペットでピペッティングをおこなって、KB細胞を回収した。回収されたKB細胞はRoux瓶1本につき10⁷個であった。次に、このKB細胞をRoux瓶1本につき50mlになるようにMEMに浮遊させ、6本のRoux瓶に分注した。3~4×10⁶KB細胞を植え、37°Cで48~72時間静置培養をおこなうと、Roux瓶底にほぼ全面に単層にKB細胞

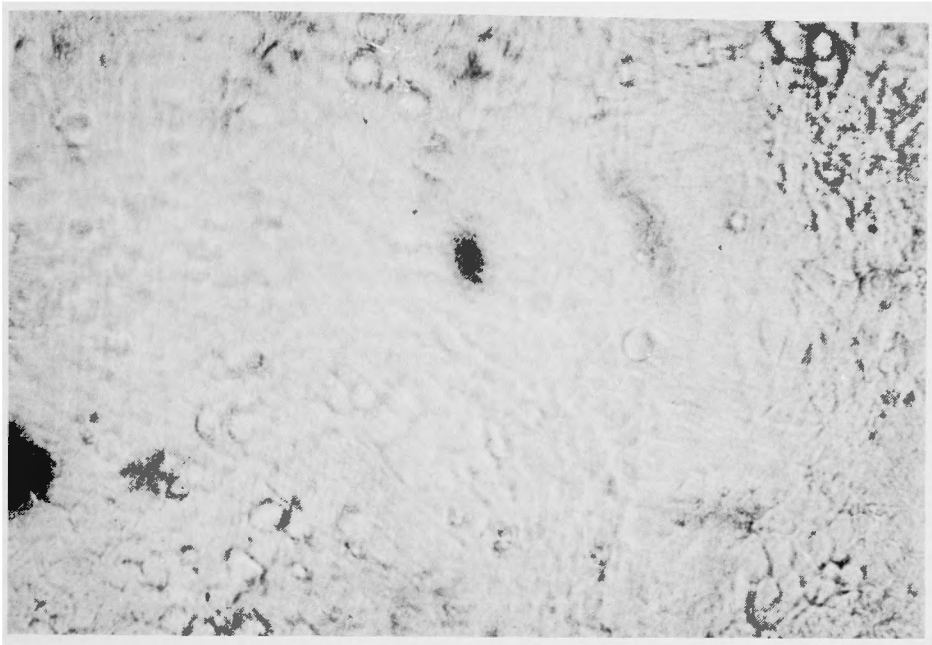


図 4. Roux 瓶底一面に増殖した KB 細胞

が分裂増殖する。倒立顕微鏡で充分な細胞の繁殖が認められない場合には、72時間後に培養液の交換をおこなって、ほぼ全面に増殖するのを待って次の段階にうつった。10⁷KB細胞繁殖の4本のRoux瓶の培地を注意深く除去し、Ad-12 1ml と MEM 9mlの浮遊液を作り、各 Roux 瓶に2.5mlづつ分注し、KB細胞にAd-12の吸着をおこなった。60分後に MEM (1~3% calf serum 加) 40ml を各々の Roux 瓶に加えてAd-12の接種を終えた。残りの2本の Roux 瓶より同じようにKB細胞の回収をおこない、6本の Roux 瓶に分注してKB細胞を繁殖させた。

Ad-12を接種されたKB細胞は、ほとんどの場合48時間でアデノウイルスに特徴ある細胞変性を示すようになった。これはKB細胞の核内でAd-12の増殖がおこなわれたことを示すもので、倒立顕微鏡で観察すると、1個1個の細胞が丸くなっているのがわかる。この細胞変性がほぼ100%おこなっていることを確かめ、10mlの駒込めピペットでピペッティングをおこない、40mlの大遠沈管に移し、これを2,000r.p.m.で10分間遠沈し、その沈渣を Roux 瓶1本あたり2.5mlの Earle 氏液³⁵⁾に浮遊させた。このまま20°Cに貯蔵して置き、50ml以上になってから抗原液の精製に使用した。図4は Roux 瓶底に全面に増殖したKB細胞を示し、図5は Ad-12の感染によりほぼ100%の細胞変性を

示すに至ったことを示す。

ii) A抗原の精製

図6はDEAE-cellulose column chromatographyでAd-12感染材料からA抗原²⁹⁻³²⁾、を精製し³⁶⁻⁴⁰⁾、これに螢光物質 FITCを標識するまでの過程を示したものである。

Earle 氏液に浮遊させた Ad-12感染KB細胞をまず5回凍結融解し、感染KB細胞を完全に破壊し、Ad-12を溶出させたあと、2,000r.p.m.で10分間遠沈し、その上清を粗 Ad-12液として回収した。この粗 Ad-12を Gessler の方法⁴¹⁾でフロロカーボン処理し、リボ蛋白を除去し、Kohn の方法⁴²⁾でこれを濃縮し蛋白濃度がほぼ1.0mg/dlとなるようにした。蛋白濃度の測定には Folin-phenol 法⁴³⁾を用いた。なお蛋白濃度測定に先だち、脱アミノ酸をおこなった。即ち0.5mlのウイルス液に2.5% HClO₄ 9.5mlを加えたのち、3,000r.p.m.で10分間遠沈して沈渣をとり、0.1 NaCl 1mlを加えて溶解したものについて蛋白定量をおこなった。

次に、DEAE-cellulose column の作製をおこなった。即ち、蒸留水であらかじめ DEAE-cellulose (0.8 mEq/gr)を膨化させ、IN HClで洗滌し、つづいてこれを蒸留水中性にし、更に1N NaOHで溶性化したのち、pH7.0、0.01Mの phosphate buffer^{44), 46)}で完

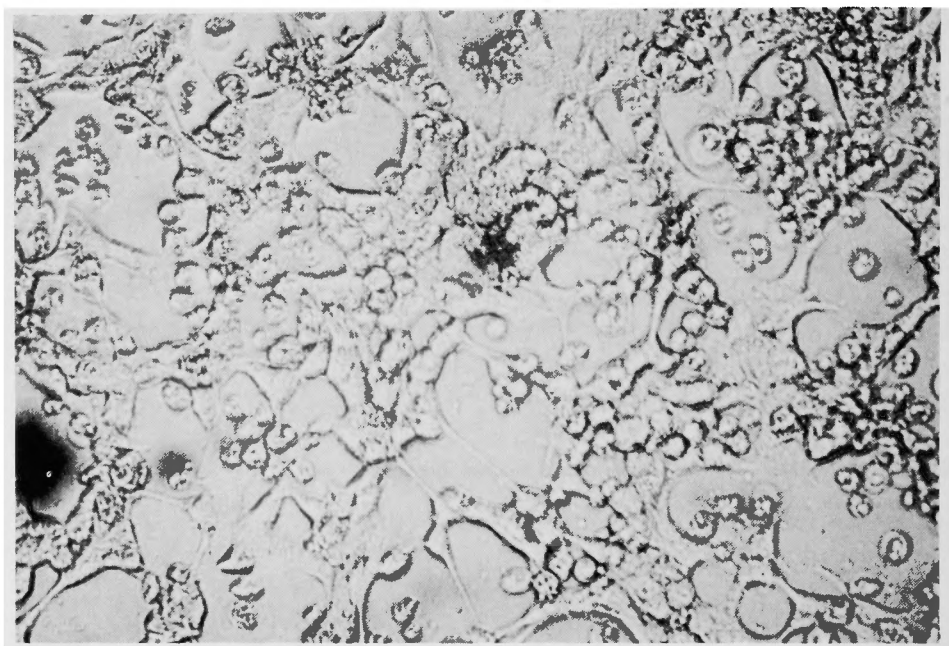


図 5. Ad-12 感染ではば 100% 特異的な細胞変性を起こした KB 細胞 (Ad-12 が KB 細胞の核内で増殖し, KB 細胞全体が丸くなっている).

Fig.6 Preparation of Adenovirus A-Antigen Labelled with FITC

Freezing-thawing of infected cells 5 times
 Centrifugation at 2,000 r.p.m. for 10 min.
 Fluorocarbon treatment by Gessler's method
 Concentration with polyethylenglycol by Kohn's method
 Dialysis to 0.01 phosphate buffer
 Chromatographic separation of A-antigen by Hubner's method
 A-antigen in 0.01-0.025 NaCl fraction
 Dialysis to pH 8.7 Veronal buffer
 Labelling with FITC (protein to dye ratio of 50:1)
 Dialysis to pH 7.2 PBS

全に飽和した。この活性化した DEAE-cellulose を内径 1.0、高さ 20cm のコック付ガラス管に 10 cm の高さまで充填し、同じ phosphate buffer で充分洗滌し、滴下して来る液が pH 7.0 になったあと液面が column 上面に近ずいたところで、あらかじめ phosphate buffer

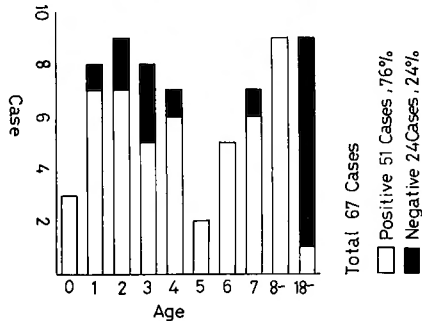
で充分透析しておいた資料 10ml を気泡が生じないように静かに注ぎ、溶出の前段階を終えた。つづいて、溶出は 0.01M, 0.025M, 0.05M, 0.075M, 0.1M, 0.15M 及び 0.2M NaCl を含む 0.01M phosphate buffer 10 ml でそれぞれ段階的に起こった。各分画液について、抗アデノウイルス 12 型ウサギ血清との間に補体結合反応 (CF) 及び Ouchterlong 法をおこない A 抗原分画であることを決定した。Hubner³²⁾らと同様に、A 抗原の大部分は 0.01~0.025M NaCl 分画に含まれていることがわかった。このうちで、標識に用いたものは 0.01M NaCl 分画に含まれるものだけであり、これを更に同じ方法で再溶出して標識に供した。

iii) 標識 A 抗原液の作製

分離精製した可溶性 A 抗原液に蛍光物質を標識する方法は、蛍光抗体法の場合と全く同じである^{44), 46), 47)} 蛍光物質は FITC (fluorescein isothiocyanate Baitcore Biological Laboratories) を使用した。

まず、A 抗原液を veronal buffer⁴⁴⁻⁴⁷⁾ で 24 時間透析し、pH 8.7 に調整した。Folin-phenol 法で蛋白定量をおこない、蛋白と FITC との量比を 50:1 として標識した。あらかじめ少量の veronal buffer で溶解しておいた FITC を、マグネツスターラーで攪拌されている A 抗原液中に徐々に滴下し、24 時間放置した。そ

Fig 7 Incidence of Positive and Negative Anti-Adenovirus Antibody Containing Cells in Human Thymus on Age Difference (Fluorescent Antigen Method)



の後, staining buffer ^{44), 47)} で2日間透折をおこない遊離の FITC を完全に除去して, FITC 標識 A 抗原液の作製を完了した。以上のような A 抗原液の精製から蛍光物質標識までの操作は全部 4℃ の暗所でおこなった。

第3章 染色方法及び観察方法

第1節 染色方法

蛍光抗原法の染色は蛍光抗体法の直接法^{44), 47)}の場合と全く同じである。即ち, 3~4 μ の厚さに切り, 無蛍光ガラスに附着させた組織切片をキシロールによって脱パラフィンし, 無水, 95%, 75%, 45%, のエタノールに次々と通し, 次いで cold staining buffer で十分に洗滌し, 前記精製蛍光抗原液を一滴滴下し, wet chamber の中で 2~3 時間室温で反応せしめる。反応後, 無反応の余分の抗原液を cold staining buffer で洗滌し, glycerin buffer を一滴滴下し, カバーガラスをかけ, 余分な液を注意深くふきとり, マニキュアで封入して蛍光顕微鏡下で観察する。

以上の操作の中で特に注意を要すべきことは, pH7.2 の staining buffer で十分に透折した標識 A 抗原液を用いるわけであるが, この staining buffer を作製するたびに pH が 7.1~7.2 であることを充分確かめておくこと, conjugate は染色ごとに 2,000 r.p.m 遠沈して使用すること, 染色液が常に切片を被い, 染色中切片が絶体乾燥しないようにすること, 反応後は十分に cold staining buffer で洗い, 余分な蛍光抗原液を洗い流しておくことの4点である。なおここで glycerine buffer と称するものは, glycerine 9 と staining buffer 1 とを混合した液のことである。

蛍光抗体法染色の際に用いた家兎抗アデノウイルス A 抗原血清は京都大学ウイルス研究所浜田忠弥教授の御厚意により, また本研究に使用した学兎抗ヒト IgG, IgM, IgA 血清はコロラド大学病理学教室陳世沢博士の御厚意により提供していただいたものである。

第2節 観察方法

上記染色標本を蛍光顕微鏡を用いて観察するわけであるが, 蛍光顕微鏡としては Carl-Zeiss microscope with a Carl-Zeiss burner and-65×41 filter) を使用した。また必要に応じて蛍光顕微鏡で観察したあと, カバーガラスを注意深くはずしヘマトキシリ・エオジン染色をおこない細胞の同定をおこなった。蛍光抗体法の場合も亦同様である。

写真撮影はフジカラーフィルム ASA100 及びコダック Tri X フィルムでおこなった。

第4章 実験成績

第1節 蛍光抗原法による知見

図1'a 及び2'a はヒト胸腺の蛍光抗原法による染色である。ヒト胸腺に蛍光抗原法をほどこし, 蛍光顕微鏡下で観察すると, 図のように細胞質に局在して特異蛍光を有する単核の円形細胞が認められる。このような特異蛍光保有細胞は, 表1に示すように胸腺の髄質, 小葉間結合組織及び皮質一髄質の移行部に認められる。稀に, 皮質及びハッサル小体の周囲にも認められる。数個から10数個がグループをなしているものもみられる。便宜上 3~5 個程度集っているものを G₁, 5~10 個程度集っているものを G₂ 及び 10 数個以上集っているものを G₃ とした。図3', 4' 及び 5' はそれぞれ G₁, G₂ 及び G₃ に相当するものを示す。また G₁~G₃ のように集団を作ることなく, 蛍光保有細胞が標本全体に散在しているものもあり, これを S (scattering) とした。

図6' は S に相当する。こういった特異蛍光保有細胞は血管の近くに存在する症例も認められるので, そういった症例は V (Vessel) と記入した。以上の分類に従って 67 症例を検索した結果をまとめたものが表1である。しかしながら, S, G₁, G₂ 及び G₃ の差異の意味づけは困難である。蛍光保有細胞の有無を年齢差別にみたのが図7であり, 疾患別にみたのが表2である。この図7からもわかるように, 18才を過ぎると特異蛍光を保有する症例が極端に少なくなる。しかし, 最年少の10ヶ月の症例1から17才の症例58までは一様に特異蛍光を有する細胞が認められる。この特異蛍光

Table1 Case, Localization and Degree of Appearance of Anti-Adenovirus Antibody Containing Cells in Human Thymus

No.	Case	Age	Disease	Med.	I.C.T.	CM.J.	No.	Case	Age	Disease	Med.	I.T.C.	CM.J.
1.	U. S.	10 M.	V S D	G ₂ V	—	—	35.	M. Y. [♂]	4 Y.	V S D	G ₂ V	—	—
2.	T. Y. [♂]	11 M.	V S D	—	—	G ₂ V	36.	O. H. [♂]	5 Y.	V S D	G ₂	—	—
3.	N. N.	11 M.	V S D	—	—	G ₂ V	37.	K. I.	5 Y.	V S D	G ₂	G ₂ V	—
4.	F. M. [♂]	1 Y.	T F S	—	—	—	38.	A. M.	6 Y.	A S D	G ₂ V	—	—
5.	M. M. [♂]	1 Y.	T F	—	—	—	39.	K. A.	6 Y.	A S D	G ₁	—	—
6.	Y. T.	1 Y.	V S D	G ₁	G ₂ V	—	40.	M. Y.	6 Y.	A S D	—	G ₂ V	—
7.	H. A.	1 Y.	V S D	G ₂	G ₂	—	41.	H. Y.	6 Y.	A S D	S V	—	—
8.	S. J. [♂]	1 Y.	V S D	G ₂	G ₂	—	42.	M. M.	6 Y.	A S D	G ₂ V	G ₁	—
9.	N. K.	1 Y.	T F	G ₂	G ₂ V	—	43.	H. H. [♂]	7 Y.	A S D	—	G ₂	G ₁
10.	K. K.	1 Y.	T F	—	G ₂	—	44.	K. N. [♂]	7 Y.	P D A	—	—	G ₂
11.	M. U.	1 Y.	V S D	G ₂ V	G ₂ V	—	45.	K. H.	7 Y.	V S D	—	—	S
12.	M. S. [♂]	2 Y.	A S D	—	—	—	46.	H. Y. [♂]	7 Y.	A S D	—	—	—
13.	Y. A. [♂]	2 Y.	V S D	—	—	G ₂	47.	Y. S.	7 Y.	A S D	G ₁ V	G ₁	—
14.	O. M. [♂]	2 Y.	T F	G ₂ V	G ₂ V	—	48.	T. S.	7 Y.	P D A	S	—	G ₂
15.	K. Y. [♂]	2 Y.	A S D	S	—	—	49.	O. T.	7 Y.	T F	G ₂	—	—
16.	M. A.	2 Y.	V S D	—	—	G ₁	50.	K. T. [♂]	8 Y.	A V F	G ₂ V	—	G ₁
17.	N. Y. [♂]	2 Y.	T F	—	S V	—	51.	O. A.	10 Y.	T G V	—	—	G ₁ V
18.	Y. Y.	2 Y.	V S D	—	G ₂ V	—	52.	Y. N. [♂]	10 Y.	A S D	G ₂ V	G ₂	—
19.	H. J. [♂]	2 Y.	V S D	S	—	—	53.	Y. O. [♂]	11 Y.	V S D	—	—	G ₂
20.	T. M.	2 Y.	A S D	—	—	—	54.	H. M.	12 Y.	T F	G ₁ V	G ₁	—
21.	N. T.	3 Y.	A S D	—	—	—	55.	O. M.	12 Y.	V S D	—	G ₁ V	—
22.	M. K. [♂]	3 Y.	T F	—	—	—	56.	I. S. [♂]	13 Y.	V S D	—	—	G ₂ V
23.	F. A.	3 Y.	T F	G ₂ V	—	—	57.	O. A.	14 Y.	V S D	—	G ₂	—
24.	M. A. [♂]	3 Y.	A S D	S V	—	—	58.	M. T. [♂]	17 Y.	A S D	G ₂ V	—	—
25.	Y. M. [♂]	3 Y.	A S D	—	—	G ₂ V	59.	H. H. [♂]	18 Y.	A S D	—	—	—
26.	M. Y. [♂]	3 Y.	A S D	—	—	—	60.	T. Y. [♂]	21 Y.	A S D	—	—	—
27.	T. T. [♂]	3 Y.	V S D	G ₁ V	G ₂	—	61.	M. T.	23 Y.	A A S	—	—	—
28.	O. Y.	3 Y.	V S D	G ₂	—	—	62.	T. Y.	25 Y.	T F	—	G ₁ V	—
29.	T. S. [♂]	4 Y.	V S D	G ₂	—	G ₂ V	63.	A. S. [♂]	29 Y.	M S	—	—	—
30.	K. M.	4 Y.	T F	—	G ₁ V	—	64.	U. Y.	33 Y.	M S	—	—	—
31.	Y. Y.	4 Y.	A S D	—	G ₂	—	65.	W. T.	33 Y.	M S	—	—	—
32.	I. H.	4 Y.	A S D	—	—	—	66.	Y. M.	48 Y.	M S	—	—	—
33.	K. T.	4 Y.	A S D	S V	—	—	67.	S. K. [♂]	56 Y.	M S	—	—	—
34.	N. T.	4 Y.	A S D	S V	—	—							

Med.: Medulla

I.C.T.: Interstitial Connective Tissue

CM.J.: Cortico-Medullary Junction

G₁: 3-5 Grouping Anti-Adenovirus Antibody Containing CellsG₂: 5-10 "G₃: over 10 "

S: Scattering

V: Antibody Containing Cells exist near the Vessel

♂ Male

VSD: Ventricular Septal Defect

ASD: Atrial Septal Defect

T F: Tetralogy of Fallot

M S: Mitral Stenosis

PDA: Patent Ductus Arteriosus

AAS: Aortic Arch Syndrome

TGV: Transposition of the Great Vessels

AVF: Arteriovenous Fistula



図 1'a ヒト胸腺髄質に認められる抗アデノウイルス抗体保有細胞—左上方に血管が認められる。症例54, 蛍光抗原法×320.

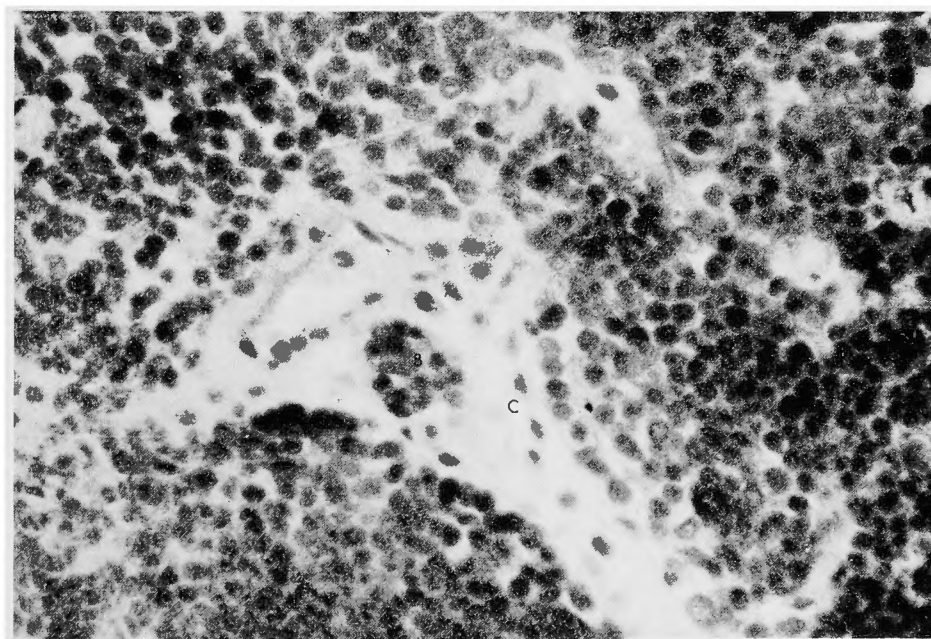


図 1'b. 1'a のヘマトキシリン・エオジン後染色。形質細胞と思われる。×320.

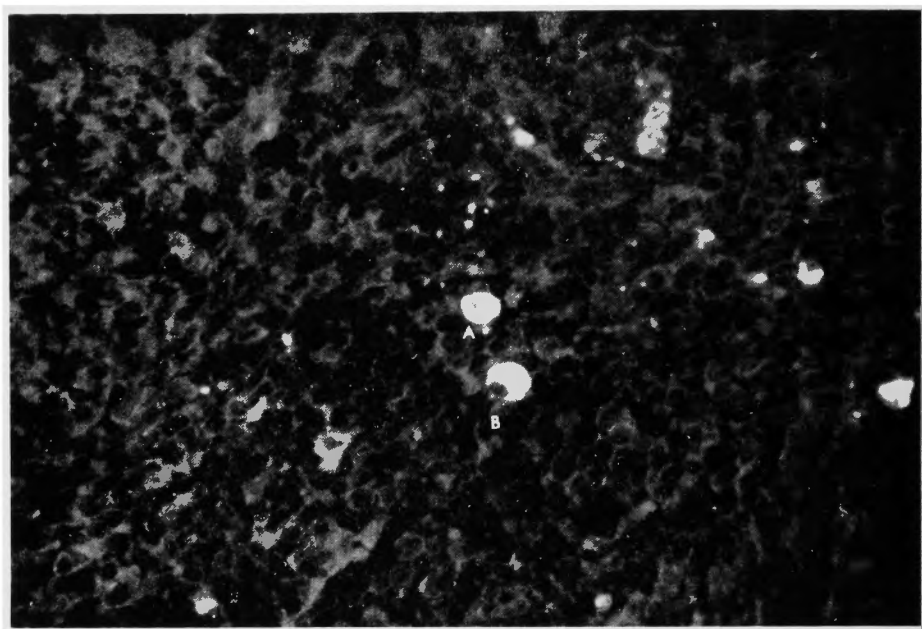


図 2 a ヒト胸腺髄質に認められる抗アデノウイルス抗体保有細胞一症例54, 蛍光抗原法×320,

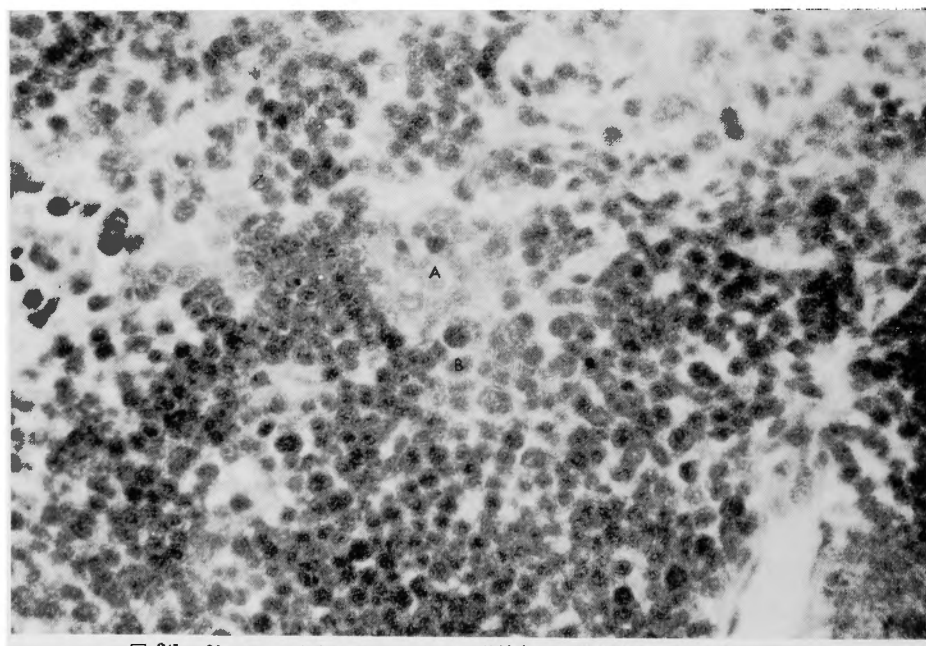


図 2' b. 2' a のヘマトキシリン・エオジン後染色。細胞好酸球と思われる, ×320,

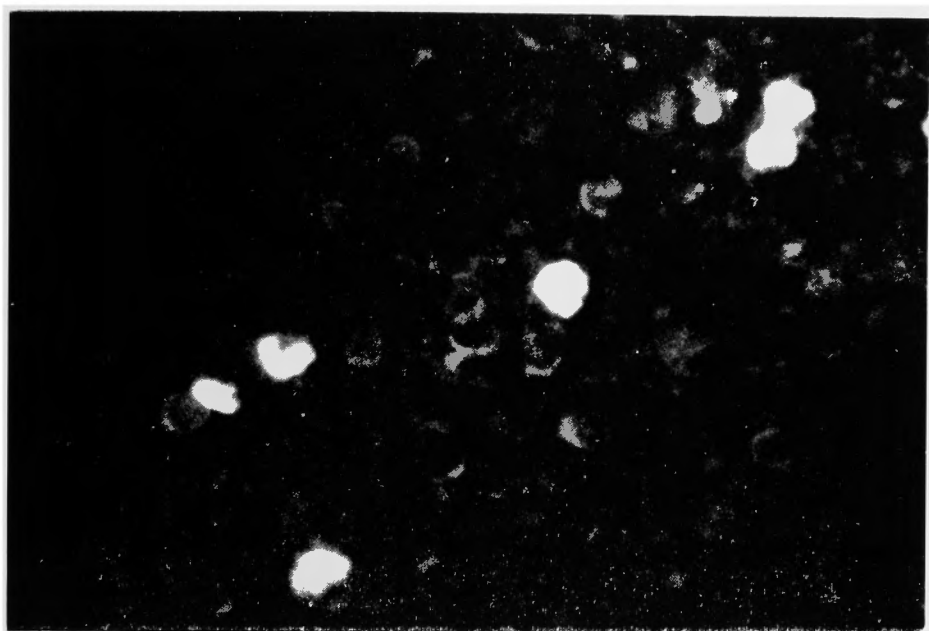


図 3'. ヒト胸腺の皮髄移行部に認められる抗アデノウイルス抗体保有細胞で, G_1 に相当する. 症例51, 蛍光抗原法×400

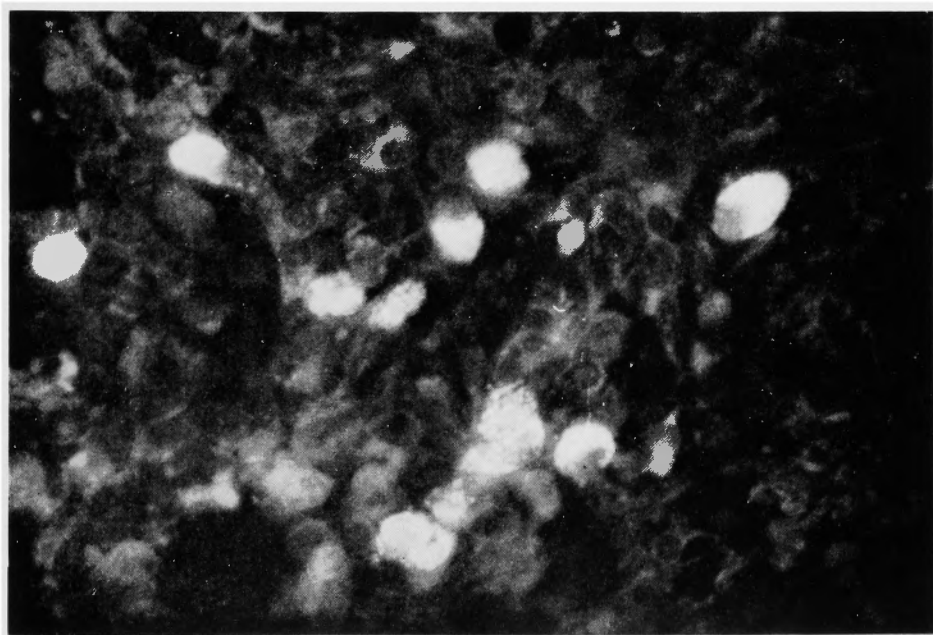


図 4'. ヒト胸腺の髄質に認められる抗アデノウイルス抗体保有細胞で, G_2 に相当する. 症例8, 蛍光抗原法×400.

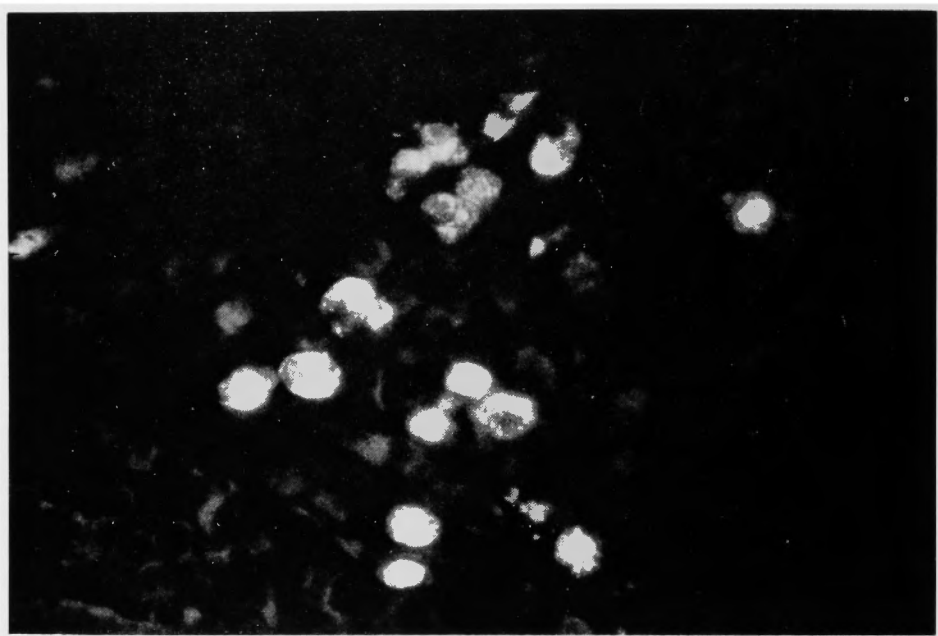


図 5. ヒト胸腺の小葉間結合組織に認められる抗アデノウイルス抗体保有細胞で, G_3 に相当する. 症例43, 蛍光抗原法 $\times 400$.

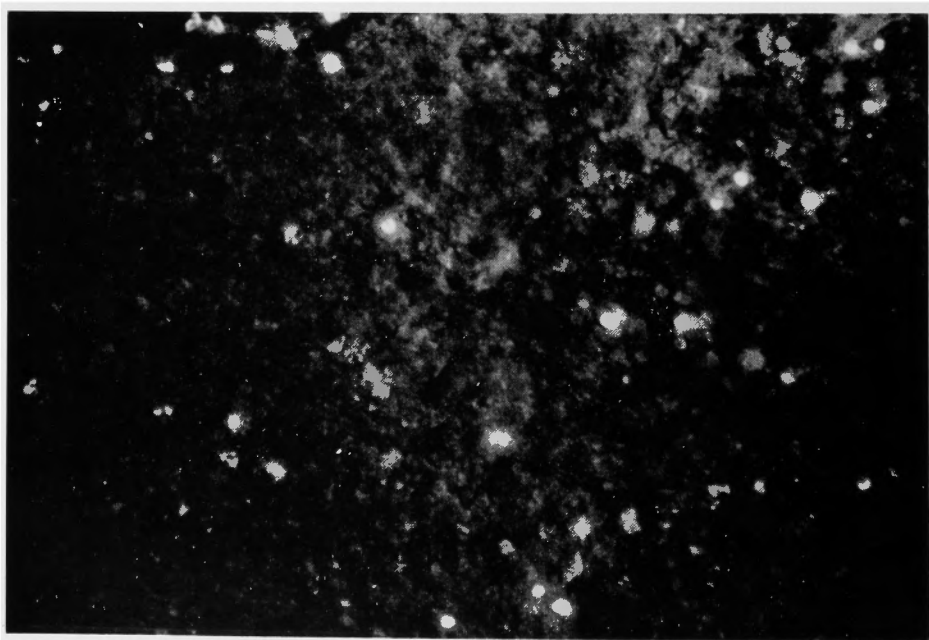


図 6. ヒト胸腺の髄質に散在して認められる抗アデノウイルス抗体保有細胞で, S に相当する, 症例48, 蛍光抗原法 $\times 160$.

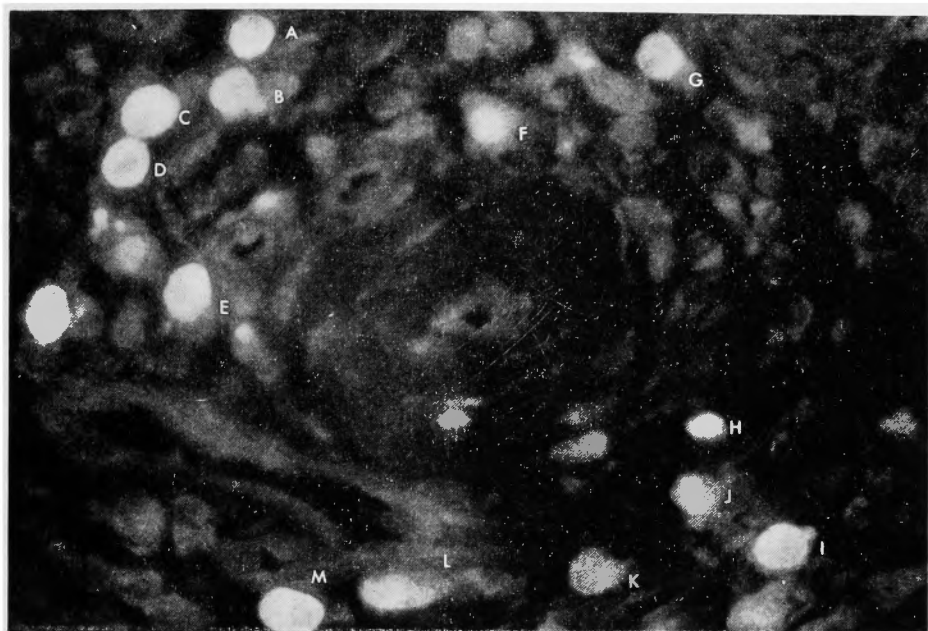


図 7 a. 症例 1 の胸腺のハシサル小体のまわりに認められる抗アデノウイルス抗体保有細胞. 蛍光抗原法×400.

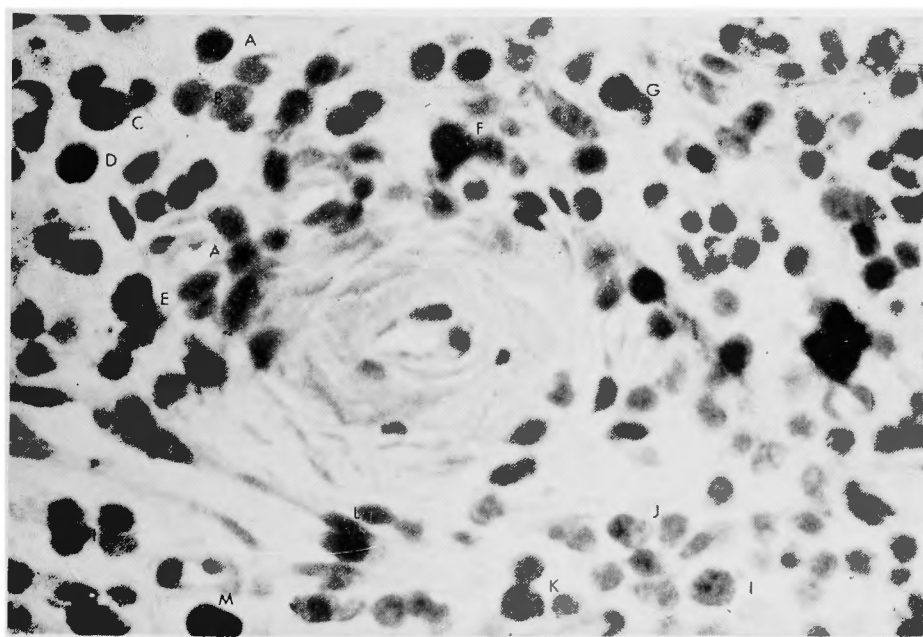


図 7 b. 7'a のヘマトキシリン・エオジン後染色. ×400.

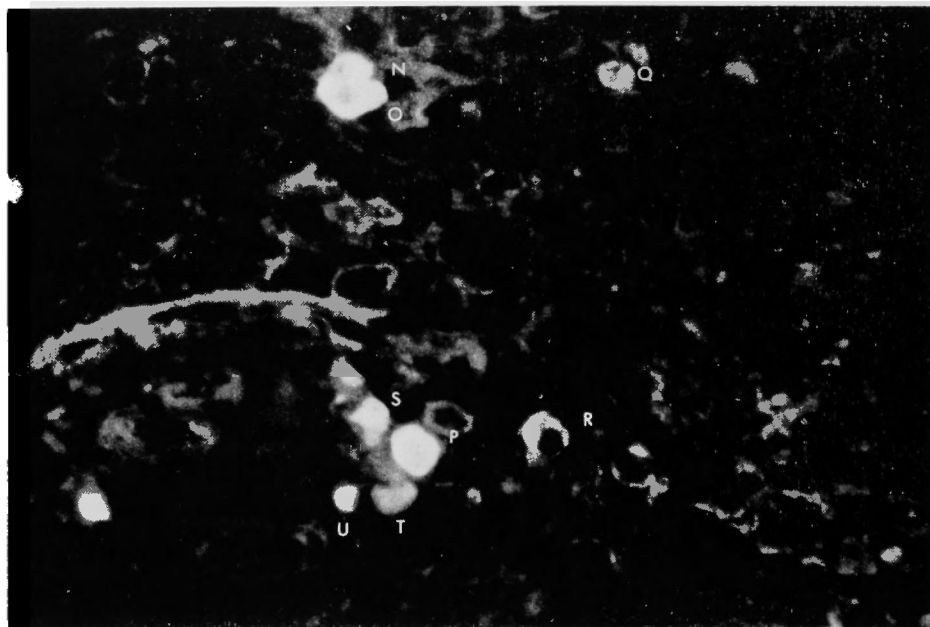


図 8. 症例39の臓質に認められる抗アデノウイルス抗体保有細胞及び IgG 保有細胞。(蛍光抗原法で染色のあとローダミン標識抗ヒト IgG で、いわゆる 2 重染色したもので、N, O, P は抗アデノウイルス抗体保有細胞で中間色を示し、Q, R, S, T, U は IgG 保有細胞であることが確認された。)×400

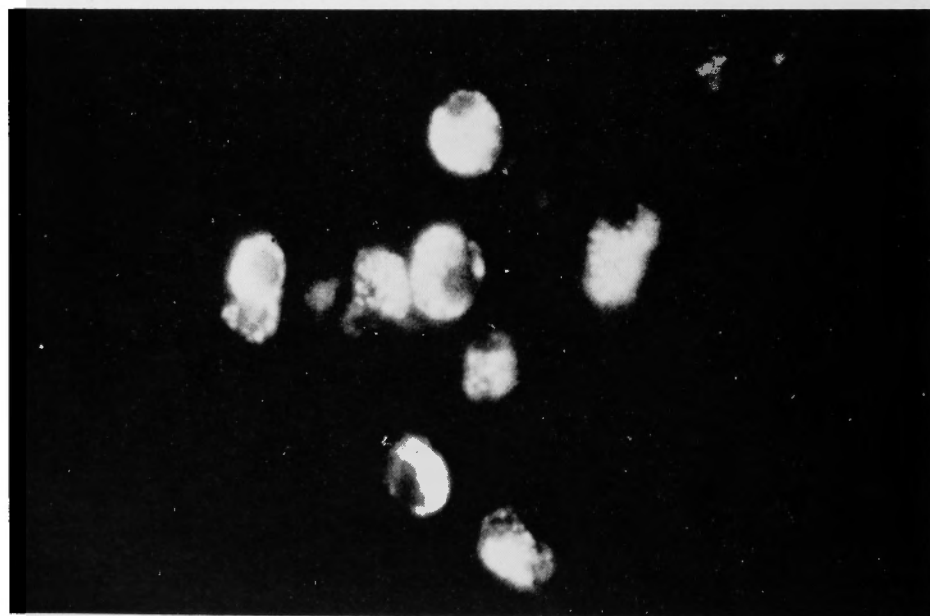


図 9'a. 症例27の蛍光抗原法による染色であり、小葉間結合組織に抗アデノウイルス抗体保有細胞が認められる。×800,

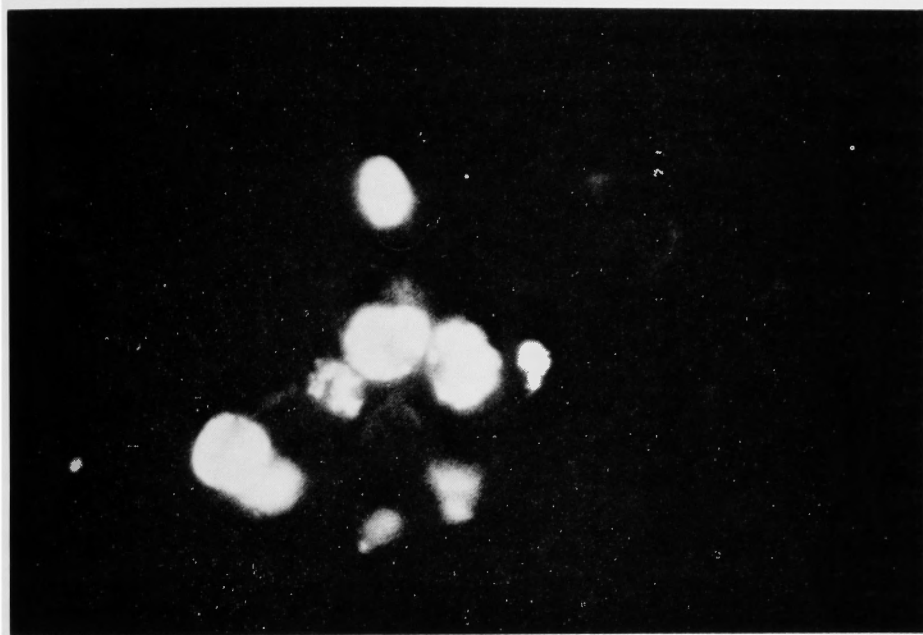


図 9b. 9'a の連続切片を FITC 標識家兎抗アデノウイルス A 抗原血清で染色したもの。×800.

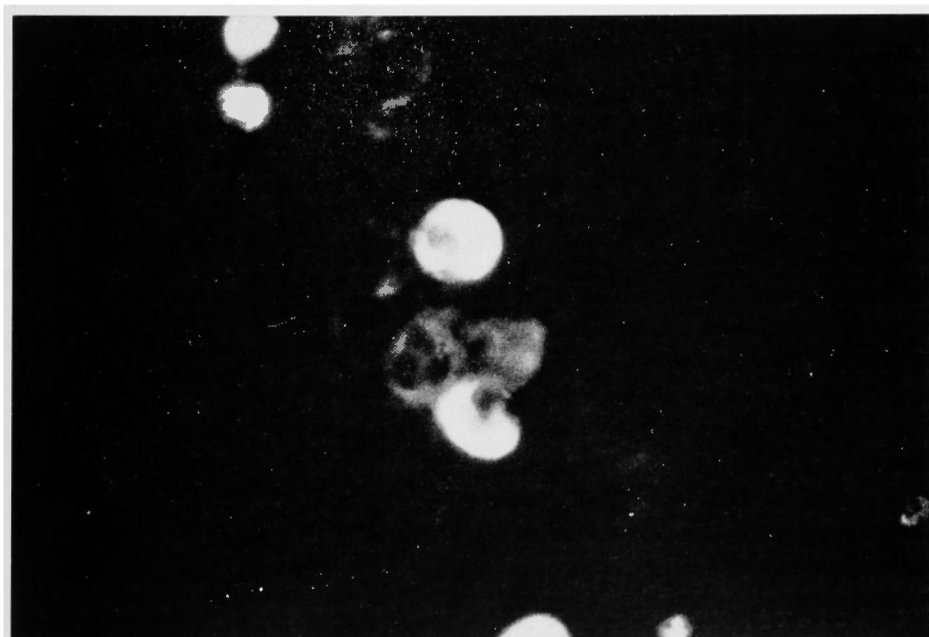


図 9c. 9'a, 8b の連続切片を FITC 標識家兎抗ヒト IgG 血清で染色したもの。いずれも、小葉間結合組織に認められた。×800.

保有細胞には2種類あり、図1'aのように周囲の細胞と大きさにあまり差がなく、単核で、核の偏在が認められ、大小の顆粒が融合したようになり、細胞質全体が染色されるものと、図2'aのように単核であるが、周囲の細胞に比べて大型で、比較的均一な顆粒状に染色されるものがある。この2種類の細胞は各標本に認められる。

この細胞の種類を同定する為に蛍光顕微鏡下で観察したあと、プレパラートのカバーガラスを注意深くはがし、ヘトマキシリン、エオジン後染色をして同一場所を光学顕微鏡で観察した。図1'b及び図2'bはそれぞれ図1'a及び図2'aの標本をヘトマキシリン・エオジンで後染色し、同一場所を観察したものである。蛍光抗原法の影響による染色の異常を避ける為に連続切片を作製し、ヘトマキシリン・エオジン染色をおこない、同一場所と思われるところにある細胞を更に念のために再検討するように努めた。それによれば、図1'bの細胞は形質細胞であり、図2'bのそれは顆粒の状態からみて組織好酸球と考えられる。

Table. 2 The Percentage of Positive and Negative Anti Adenovirus Antibody Containing Cells in Each Heart Disease

Disease	Positive (Cases)	Negative (Cases)
Ventricular Septal Defect	100% (22)	
Atrial Septal Defect	65% (15)	35% (8)
Tetralogy of Fallot	83%	(2)
Mitral Stenosis		(5)
Miscellaneous	(4)	(1)

次に興味ある所見は表2に示すように、VSD 症例では全例にアデノウイルス抗体保有細胞が認められたのに対し、ASD では65%、TF では83%にしか認められなかったことである。このことは何を意味するものであるかについては全く不明である。なお図7'aはハツサ小体の近くに認められた特異抗体保有細胞であり、図7'bはそのヘトマキシリン・エオジンによる後染色標本である。大半は形質細胞と思われる。図8'は蛍光抗原染色後ローダミン標識抗ヒトIgG血清で染色したいわゆる2重染色標本である。以上の所見から、蛍光抗原法によっても、蛍光抗体法によっても共によく染色される細胞が認められるが、IgG保有細胞なるものはなおその外にも存在していることが判明した。

第2節 蛍光抗体法による知見

標識アデノウイルスA抗原と反応するこのような細胞の性質を検討する為に、家兎抗アデノウイルスA抗原血清、家兎抗ヒトIgG、IgM及びIgA血清で連続切片を染色し、蛍光顕微鏡下に観察した。

図9'aは蛍光抗原法による染色標本であり、図9'bは連続切片でのFITC標識家兎抗アデノウイルスA抗原血清による蛍光抗体法染色標本である。同血清を使用した目的はヒト胸腺内にウイルス抗原が存在するか否かを検討するためである。

連続切片であるので、完全な一致は困難であるが、図9'aと図9'bの可染されている細胞は、その場所及び大きさが互に相似しており、而も図2'aの細胞にも似ている。更にヘトマキシリン・エオジンによる後染色をおこなって検討すると、組織好酸球と考えられる。

次に、蛍光抗原法によって観察される特異蛍光保有細胞の抗体の性質を検討する為に、FITC標識家兎抗ヒトIgG、IgM及びIgA血清で染色をおこなった。

図9'cは、蛍光抗原法染色標本図9'aの連続切片を家兎抗ヒトIgG血清で染色したものである。抗IgM血清による染色では、標本全体で数個の細胞が染色されるにとどまり、抗IgA血清では染色される細胞はほとんど認められないから、胸腺内に存在する抗アデノウイルス抗体保有細胞はほとんど大半がIgG保有細胞ということになる。また、蛍光抗原法とグロブリン分画蛍光抗体法とを対比した結果、分布の場所と数から蛍光抗原法により可染される細胞が保有している抗体は、IgGであると考えて差支えないように思われ、IgAは関与していないものといってもよい。

著者らは、更に詳細にヒト胸腺におけるIgG、IgM及びIgA保有形質細胞の分布等を検討したが、同様にIgG保有形質細胞が大部分を占めていることを確認し得た⁴⁹⁾。

第3節 ソケイ部リンパ節に対する検討

人工心肺カニキュレーションの際にたまたま得られたソケイ部リンパ節を同じ方法で固定して、蛍光抗原法及び蛍光抗体法で検討した。

その結果、蛍光抗体法ではIgG、IgM及びIgA保有細胞が認められたにもかかわらず、蛍光抗原法では特異蛍光保有細胞は全く認められなかった。因みに、この6症例の胸腺では全例においてアデノウイルス抗体保有細胞が認められている。

第4節 特異性の確認

蛍光抗原法で認められた特異蛍光保有細胞がアデノ

ウイルス抗体保有細胞であることを確かめるために、更に次のような染色をおこなって検討した。即ち特異性の確認は、児玉らもそれをおこない報告している²¹⁾
²²⁾ 次のような方法によった。

- ① Blocking test
- ② Sandwich method (間接法)
- ③ Autofluorescence
- ④ Staining with FITC-Conjugated antigestrin rabbit serum

① Blocking test⁴⁸⁾

蛍光抗原法で明らかに蛍光保有細胞が認められた症例の連続切片をあらかじめ非標識A抗原液と一定時間反応させたあとと十分に Staining buffer で洗ったあとと蛍光標識A抗原液で染色をおこなったが、block されて蛍光を認めることができなかった。Blocking test であまり非標識A抗原液の濃度が高い場合には、prozone⁷⁹⁾の為かえってうまく block されないようである。

② Sandwich method⁴⁶⁾⁴⁸⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾

ある抗原に対する特異抗体保有細胞を組織切片上でみつけたそうとする場合には、まずその非標識抗原液と一定時間反応させ、Staining buffer で十分に洗ったあと、その抗原に対する標識特異抗体液と反応させるサンドウィッチ法を利用する。従って、この場合はまず非標識A抗原と反応させたあと、A抗原に対する抗血清で染色をおこなったが、蛍光抗原法で染色されてくる細胞はサンドウィッチ法でも染色され得る。

③ Autofluorescence

いかなる染色操作もおこなっていない標本を蛍光顕微鏡下で観察したが、ヒト胸腺で蛍光抗原法により蛍光を有する細胞に自家蛍光は認められなかった。

④ FITC 標識抗ガストリン家兎血清による染色

たまたま合成ヒトガストリンに対する標識特異抗血清を得たので、ヒト胸腺を同抗体血清で検索してみた。蛍光抗原法で認められた特異蛍光保有細胞は同血清では染色されない。更に、抗ガストリン血清で一度反応させたあとのプレバートについて蛍光抗原法で染色をおこなったところ、蛍光保有細胞が観察された。

以上により、蛍光抗原法で認められた特異蛍光保有細胞は抗アデノウイルス抗体保有細胞であることが証明され得たことになる。

第5章 考 案

1953年、Rowe⁵²⁾ らは human adenoid tissue を培

養中、特異的に細胞変性を起こす物質をみつけ、“adenoid degeneration agent” 略して“A.D. agent”と名付け、アデノウイルスに関する最初の報告をおこなっている。

このアデノウイルスが腹部外科領域疾患と密接な関係を有するのではないかと考えられるようになったのは、小児腸重積症、非特異的腸間膜リンパ節炎でしばしば呼吸器感染が先行し、腸間膜リンパ節の腫脹を来すようになるからである。

事実、1955年、Kjellen¹⁰⁾は非特異的腸間膜リンパ節炎患者の腸間膜リンパ節よりアデノウイルスを分離することに成功している。そして、その後も小児腸重積症患者の咽頭ぬぐい液や糞便はもとより、腫大した腸間膜リンパ節からアデノウイルスを分離しようとする努力がはられ、Ross²⁾ ら、Bell⁵⁾ ら、Gardner¹³⁾ ら、Potter⁷⁾ ら、White⁶⁾ らはそれぞれ対照に較べて遙かに高度にアデノウイルスを分離し得ることを明らかにすると共に、血中のアデノウイルス抗体も亦上昇していることを立証した。これによって益々このような疾患の成因として、アデノウイルス感染が注目されるようになってきた。

一方緒論で述べたように、戸部はこれらの報告とは別個に、サイトメガロウイルスによる乳児虫垂炎症例を報告し、更に、戸部、浜田は、近年虫垂炎の病像が変化して軽症虫垂炎が増加してきたことから、軽症虫垂炎の発症を検索する過程で、軽症虫垂炎患者において有意の差を以てエンテロウイルス群、或るいはアデノウイルス群の補体結合価が上昇していること¹²⁾、蛍光抗体法でエンテロウイルス群或るいは、アデノウイルス群抗原を認め¹³⁾、虫垂炎の trigger としてのウイルス感染の無視され得ないことを提唱した¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。同時に、コクサツキ-B₃型ウイルスをカニクイザル¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾に、マウス由来のアデノウイルスをマウスにそれぞれ経口接種して¹⁹⁾、これらウイルスの経口感染が腹部外科領域疾患の虫垂炎、腸間膜リンパ節炎、小児腸重積症の病理学的主徴ともいふべき腸管壁、或るいは腸間膜リンパ節の腫脹の原因となり得ることを明らかにした。

Bornard⁵³⁾も軽症虫垂炎の虫垂と腸間膜リンパ節からアデノウイルスを分離し、戸部の意見を肯定し、Yauis⁵⁴⁾らも小児腸重積症患者の虫垂を incidental に切除し、その虫垂を電子顕微鏡で検索して、アデノウイルスの同定をおこなっている。

しかしながら、上述のような事実の積みあげにもか

かわらず、アデノウイルスの感染発症病理はほとんど不明のまま残されてきた。

即ち、上述疾患に対しての原因的役割としてアデノウイルスが分離されるばかりでなく、正常人の呼吸気道、糞便からもそれが分離され得ることから、上記疾患の直接的原因と果たしてそれがなり得るか、なお多くの議論のあるところである。アデノウイルスの中にはこういった腹部外科領域疾患ばかりでなく、Ginsberg⁵⁴⁾は他の臨床部門の疾患とも密接なかわりあいがあるしている。更に、ヒトから分離されたアデノウイルス12型によって新生ハムスターに腫瘍肉腫が形成されるに至ることを Eddy⁵⁶⁾ら、Trentin⁵⁷⁾らが明らかにするに及んで、アデノウイルスが悪性腫瘍の発生にも密接な関係をもつものとされるに至った⁵⁸⁾⁵⁹⁾。こういったことから、アデノウイルスの感染病理と宿主との反応、ないしは抗体産生機序を解明することには重要な意義があるものと思われる。

浜田、戸部¹⁹⁾はヒトアデノウイルスの感染発症病理を考究する目的で、Hartley⁶⁰⁾らにより、Friend mouse leukamia virus の研究中に発見された M-Ad を用いて、マウスの腹腔内、あるいは経口及び吸入感染実験をおこない、経口的にアデノウイルスの分離をおこなうと共に、蛍光抗体法によるアデノウイルス抗原の検索、更に血中抗体の推移を調べている。それによると、経口及び腹腔感染実験では接種3日目より14日目までの、主として回腸末端を中心とする消化管および腸間膜リンパ節からウイルスを分離し、蛍光抗体法でも接種3日目より回腸の Lieberkuhn 氏腺窩上皮細胞の核内に特異蛍光が認められるようになり、7～14日目にはそれが腺窩全域に及ぶとしている。また10日目頃からは腸間膜リンパ節腫脹が益々著明となり、この頃より血中のアデノウイルス抗体価は上昇し、その後約1ヶ月間に亘りそれは持続するという。Hashimoto ら⁶¹⁾も、M-Ad をマウスに経口感染を惹起せしめ、同様にウイルスの分離、蛍光抗体法による検索及び血中抗体価の測定をおこない、同じような結果が得られたとしている。

兄玉⁷⁰⁾は自から開発した独創的な蛍光抗原法によって小児腸重積症の発生機構を考察する目的で、M-Ad の感染実験をおこなっているが、それによると、経口接種後7～10日目頃より回腸の粘膜固有層の他、腸間膜リンパ節の髄質と思われる場所に存在する円形細胞の細胞質に特異蛍光を認め得るようになるとし、更に詳細な検討の結果、それがアデノウイルスに対する抗

体保有細胞に一致するとした。更に血中抗体価の上昇期、腸間膜リンパ節の腫脹する時期及びアデノウイルス抗体保有細胞が腸管壁や腸間膜リンパ節に認められるようになる時期が非常によく一致するところから、回腸を中心とする腸管壁及び腸間膜リンパ節がアデノウイルス抗体産生の有力な場である可能性が大なることも指摘している。

正木²⁴⁾は、胸腺が免疫における高次の中枢組織であることから、M-Ad をマウスに経口感染させ、感染に際しての胸腺の役割を蛍光抗原法で検討しているが、それによると、感染の初期、即ち血中抗体の上昇も認められず、また、アデノウイルス抗体保有細胞が腸管壁、腸間膜リンパ節及び脾臓に認められない時期に既に胸腺で認められたと報告している。

本研究は、正木の実験の臨床例として、ヒト胸腺にもアデノウイルス抗体保有細胞が果たして分布しているかどうかを検討したわけであるが、その際特に先天性心疾患患者の胸腺を材料として用いた理由は、開心術に際して従来小さな胸腺のブロックが得られながらも、それをただ放棄しており、且つまた先天性心疾患患者は風邪に罹り易く⁶³⁾、従ってアデノウイルス感染の機会も多いことが考えられたからである。

その結果、既に述べたように、ヒト胸腺でも、検索総数67症例中51症例、即ち76%においてアデノウイルス抗体保有細胞を見出し得たわけである。アデノウイルス抗体保有細胞は、主に髄質、小葉間結合組織及び皮髓移行部に認められ、標本全体にわたって散在して認められる散在型、即ちS型と数個の細胞から10数個、多い場合には20数個が集まっている集合型、即ちG型とが認められた。このG型を更に3～5個、5～10個及び10数個以上集合しているものによって、それぞれG₁、G₂及びG₃と分類しその結果を表1にまとめてみた。しかしながら、S型やG型が一体何を示唆しているかについては今後の検討に俟たねばならない。興味あることは、心疾患別に検討した際、表2に示すようにVSD症例ではその全例においてアデノウイルス抗体保有細胞を認めたにもかかわらず、ASD及びTF症例ではそれぞれ65%、83%に抗体保有細胞を認めたに過ぎなかったことである。

次に、ヘマトキシリン・エオジン染色及び隣接切片で、アデノウイルス抗体保有細胞の同定を行ったところ、それは形質細胞と組織好酸球であった。

ところで胸腺においても抗体産生がおこなわれ、その結果としてアデノウイルス抗体保有細胞が胸腺にみ

られるようになったのか、胸腺でも他のリンパ節と同様に抗体産生がおこなわれているとすると、抗原がどのようにして胸腺に達し、胸腺を刺戟しているのか、組織好酸球が抗体産生にどんな役割を果たしているのかといった点は殊に問題のあるところである。

胸腺が免疫反応をおこなうか否かについては相対する2つの論議が今日までなされてきた。その第1は試験に抗原を接種して組織学的に検討してみると、血中の抗体価上昇期に一致して所属リンパ節及び脾臓では抗体や形質細胞の増殖が認められるが、胸腺では抗体や形質細胞が証明されないこと⁷³⁾、あるいは、抗原刺戟を受けた所属リンパ節、脾臓細胞をとり出し、それを *in vitro* で培養してみると抗体産生がそこでは明らかにおこなわれているにもかかわらず、胸腺ではそれを認めることができない⁶⁵⁾ といった理由から、胸腺は免疫反応を何等おこなっていないのではないかとする考え方である。もう1つの考え方は、元来胸腺には blood-thymus barrier なるものが存在し、抗原が直接胸腺に達することはできず、従ってそこでは、免疫反応はおこなわれ得ないのではないかとされてきたが、Marshall⁶⁶⁾ らによって実験的に胸腺内に TAB vaccine あるいは diphtheria toxoid を直接注射し、それによって抗原刺戟をすると、胸腺の髄質や小葉間結合組織及び皮髄移行部に多数の形質細胞が出現し、2次小節の形成すらみられ、而もこういった細胞出現の場所近くには血管が多いこと、また栗屋⁶⁷⁾、Sherman⁶⁸⁾ らによっても同じような所見が報告され、更に Svtomoldarsky⁶⁹⁾ らが Freud adjuvant をラットの足蹠皮下や腹部皮下に反復接種した際、胸腺にも所属リンパ節と同様に2次小節と形質細胞の出現することを確認するに及び適当量の抗原が反復作用する時は(寛容性の問題も絡み複雑であるが^{70),71)} 胸腺でもいわゆる blood thymus barrier が開き、抗原が胸腺内に侵入しそれを刺戟して、そこに形質細胞を生ぜしめるに至るもので、胸腺でも明らかに免疫反応がおこなわれ得るとする考え方である。

浜田・戸部による M-Ad を用いてのマウスの感染実験の中で、はなはだ興味のある知見は吸入感染実験に関するもので、その際には抗体価は他の感染群と同様に上昇するにもかかわらず、回腸を中心とする下部消化管及び腸間膜リンパ節よりはウイルスの分離が全くできなかったことである。更に児玉⁷²⁾ は同吸入感染実験群の回腸壁及び腸間膜リンパ節を蛍光抗原法で検討し、アデノウイルスに対する特異抗体保有細胞は認

められなかったとしている。この吸入感染群では一体何処で抗体産生がおこなわれているのであろうか。あるいは胸腺及び胸腔内リンパ節であるのかもしれないが、この点に関する検討はなされておらず、この実験からは胸腺での抗体産生を示唆するに足る充分な根拠は得られていない。

本研究でソケイ部リンパ節を6症例について蛍光抗原法で検討したが、IgG、IgM 及び IgA 保有形質細胞がそれぞれ認められた。それにもかかわらず、アデノウイルス抗体保有細胞は全く認めることができなかった。このような点をも併せ考えると、抗体産生に対する胸腺の役割について、1つの示唆が与えられるように思われる。

本研究でヒト胸腺に認めた特異蛍光保有細胞の存在する場合は、Marshall らの報告ともよく一致し、髄質小葉間結合組織及び皮髄移行部であり、更に正木のおこなった実験成績を併せると、胸腺でもアデノウイルスに対する抗体産性は確かにおこなわれているように思われる。

胸腺に形質細胞が存在することについては既に多くの^{49),72-75)} 報告があり、本実験においても亦アデノウイルス抗体保有細胞は形質細胞の中でも IgG 保有細胞であろうと考えている。即ち、蛍光抗原法で認められる特異蛍光保有細胞類似の細胞が、抗 IgG で染色すると隣接切片の同一場所と思われる所に、特異蛍光を保有して認められるからである。抗 IgA 及び抗 IgM ではこういったことは認められない。また胸腺以外の場所、例えば消化管でもやはりアデノウイルス抗体保有細胞は一致する。

以上のことから、多くの研究者によって見出され、また本実験でも見出し得た胸腺内の形質細胞の中にアデノウイルス抗体保有細胞が存在することは充分考えられる。

次に提起される重要な問題は、アデノウイルス抗原がいかにして胸腺に達したかである。この点については従来、ウイルスのような抗原が blood thymus barrier を越えて直接胸腺内に入ることはないと考えられてきたが、これはウイルスのような抗原を直接確認する方法がなかったことによる。児玉との協同研究によると FITC を標識したアデノウイルス A 抗原をマウスの尾静脈に注射すると、それは30分ですでに胸腺のマクロファージと思われる大型の細胞によって貪食される。そしてその後、24時間経ってもなお、ほとんどのアデノウイルス A 抗原は胸腺にとどまっていた。

この点については更に現在なお慎重に検討中であるが、とにかくアデノウイルス抗原が胸腺に容易に達し得ることを示す興味ある事実といえよう。

組織好酸球が抗体産生にいかなる役割を果しているかに関しては、結論的にいって不明である。特に、蛍光抗体法同様蛍光抗原法を用いて検討をおこなう場合には、好酸球が酸性色素に親和性を持つ細胞であるがため⁷⁶⁾に、蛍光色素を用いた染色結果に対しては特に注意を要し、急な結論を下してはならないのが常識である。そこで本実験に際しては、蛍光抗原法の特異性を確認するために、実験成績の第4節で述べたような項目の検討を更におこない、それにより蛍光抗原法で認められた蛍光保有細胞は、非特異的な染色によるものでなく、アデノウイルス抗体あるいは抗原抗体複合物保有細胞であると考えて然るべきことを明らかにした。

1915年に Wenbery と Siguin は、はじめて好酸球が抗原を貪食して抗体を産生する可能性のあることを指摘している⁷⁶⁾し、また適当な抗原刺激をおこなうと、末梢リンパ節や腹腔の浸出液中に好酸球が増加してくることも亦今日では明らかにされているところである。この好酸球の抗原刺激に対する反応と作用については、その後ラジオオートグラフィー、蛍光抗体法及び電子顕微鏡等の研究手段が新たに開発される伴ない、一層の成果が得られるに至っている。

即ち、Speirs⁷⁷⁾らは、あらかじめ tetanus toxoid を皮下に注射して免疫しておいたマウスの腹腔内に triteated tetanus toxin を注入して腹腔浸出液中の細胞をラジオオートグラフィーで観察し、好中球とともに好酸球にも多くそれがとりかまれていることを認め、また Sobsen⁷⁸⁾はウマの脾臓 ferritin であらかじめ感作しておいたモルモットの腹腔内に ferritin を注射して24時間後の浸出液を電子顕微鏡学的に調べ好酸球と多核白血球の細胞質内に抗原抗体複合物がとりかまれているのを認めている。このような事実から、好酸球は少くとも好中球と同様に抗原抗体複合物を貪食するものと思われる。Litt⁸¹⁾は、主に蛍光法を用いて好酸球の役割に関する一連の研究をおこなっているが、後は bovine serum albumin を赤色蛍光色素で染色し、家兎抗血清は緑色蛍光色素で染色し、その複合物を作ると黄色を呈することに注目して、その複合物をモルモットの腹腔内に注射した際の好酸球の態度を究明、それがこの黄色の複合体をよく貪食しているのを認めている。併し標識抗体及び混合物はとりこまれ

ることはなかったという。

このようなことはヒト血中の好酸球でも認められ、可溶性複合体は好酸球によく貪食され得るものと考えてよいようである。Rappaport⁷⁶⁾は egg albumin に対する reagin を含んだ human globulin と rabbit anti-egg albumin precipitating antibodies を FITC で標識してアトピー疾患患者の鼻粘膜を検索しているが、その際に上皮性細胞や組織球のみならず好酸球もよく染色されていたとしている。そしてその特異性に関しても、reagin を含んだ非動化しない globulin で染色しておくとき in vivo, in vitro で抗原刺激を受けた組織の好酸性顆粒の可染度が減弱すること、非動化した globulin や rabbit anti-egg albumin serum で染色した際にも、その顆粒の染色程度に全く差異のないことをあげ、特異的であるとしているようである。また Acher⁸⁰⁾ は好酸球の顆粒が多核白血球の細胞質内顆粒と多くの点で似ており、且つライソゾーム様構造を呈し、抗原抗体複合物の貪食中はそれが減少するとしている。好酸球に関するもう1つの興味ある所見は Litt⁸¹⁾ によって示されているが、彼はモルモットの足蹠に hemocyanin を注射した際、4時間後に既に好酸球が所属リンパ節内に現われ、12時間後には最高値に達し、そのまま24時間持続したとしている。またその他末梢リンパ節や腹腔内浸出液中の好酸球に関しては多くの成績が報告されている⁸²⁾⁻⁸⁷⁾。

ヒト胸腺や1部動物の胸腺に好酸球が存在するという報告があつて⁸⁸⁾も、その役割に関しては検討が未だなされていない点に鑑み、本研究では連続切片を家兎抗アデノウイルスA抗原血清で染色し、抗原側の検索をおこなったところ、蛍光抗原法で染色された細胞に類似した細胞が染色されてくることを見出した。そこで同一切片での蛍光抗原法と蛍光抗体法両者の同時検索は不可能であるので、連続切片を用いることによって、胸腺の好酸球が抗原抗体複合物を貪食している所見を更に捉えることができたのである。しかしそれ以上の点については、現時点では不明で、今後の大きな研究課題と思われる。

最後に、胸腺に存在するアデノウイルス抗体保有細胞である形質細胞の抗体の性質を検討する為に、家兎抗ヒト IgG, IgM 及び IgA 血清で連続切片を染色し、胸腺に存在する形質細胞の92.8%までが抗 IgG で染色され、従って圧倒的に IgG 保有形質細胞の多いことを知った。なおその際、5.6%のものが抗 IgM で染色され、抗 IgA で染色されるものは殆どなかった。

そして従来の胸腺の免疫グロブリン分布に関する報告と、IgG保有細胞の%に関してはよく一致した。連続切片での検索成績、更には分布の状況から考えて、胸腺に分布するアデノウイルス抗体保有細胞も亦IgG保有細胞であると考えてよいであろう。

結 論

1. 著者は、児玉らが開発した螢光抗原法を用いて、ヒト胸腺（先天性心疾患患者）のアデノウイルス抗体保有細胞の有無を検索した。
2. 検索症例67例中、51例のヒト胸腺にアデノウイルス抗体保有細胞あるいは抗原抗体複合物を貪食していると思われる細胞を見出した。
3. 前者は、形質細胞であり、後者は組織好酸球である。両者とも、主として胸腺の髄質と小葉間結合組織に、散在性あるいは集団的にみられた。
4. 同一切片に対して、抗 IgG、抗 IgM および抗 IgA 特異家兎血清を用いて、螢光抗体法により検索したところ、ヒト胸腺に出現する形質細胞はその大半が IgG 保有細胞であり、アデノウイルス抗体保有細胞も亦、IgG 保有細胞である。
5. 組織好酸球の有するアデノウイルス抗体に関する螢光に関しては、慎重な検索を重ねたが、それが特異螢光であり、従って抗原抗体複合物の貪食によるものと思われる。
6. 生検により得られたソケイリンパ節については、好酸球の存在は確認され得るが、螢光抗原法で全例において、特異螢光を認めなかった。またアデノウイルス抗体を有する形質細胞も認められなかった。
7. 以上、アデノウイルス感染に際してのヒト胸腺の免疫学的役割についての若干の知見を得ることが出来た。

本研究の一部は、第23回日本アレルギー学会総会（昭和48年11月27日、東京）及び第17回日本胸部外科学会関西地方会シンポジウム「胸腺」(昭和49年6月28日、京都)において発表した。

稿を終るにあたり、貴重な資料を提供していただいた兵庫県立尼崎病院外科部長城谷均博士、大津赤十字病院外科部長岡本好史博士、京都大学外科学第2講座助手村岡隆介博士、種々御指導いただいた京都大学解剖学教室尾曾越文亮教授、京都大学ウイルス研究所花岡正男教授、有益な示唆をいただいた京都大学外科学第2講座木村忠司名誉教授（現愛媛大

学教授）京都大学ウイルス研究所植竹久雄所長、御指導と原稿の御校閲をいただいた京都大学外科学第2講座日笠頼則教授に深甚の謝意を表する。

本研究は、京都大学ウイルス研究所浜田忠弥助教授（現新潟大学細菌学教室教授）、コロラド大学病理学教室陳世沢博士、京都大学外科学第2講座戸部隆吉助教授、児玉宏助手、正木直也学士等の協同研究の一部であり、終始御指導、御鞭達いただいた協同研究者各位に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) Gardner, P.S., Knox, E.G., Court, S.D.M. et al.: Virus infection and intussusception in childhood., Brit. Med. J., 2: 679~700, 1962.
- 2) Ross, J.G. and Potter, C.W.: A possible causal factor in intussusception in infancy. Lancet, 1: 81, 1961.
- 3) Gardner, P.S.: Adenovirus and intussusception. Brit. Med. J., 2: 495~496, 1961.
- 4) Ross, J. G., Potter, C. W., & Zachary, R. B.: Adenovirus infection in association with intussusception in infancy. Lancet, 2: 221~223, 1962.
- 5) Bell, J.M., and Steyn, J.H.: Virus in lymph nodes of children with mesenteric adenitis and intussusception. Brit. Med. J., 2: 700~702, 1962.
- 6) White, D.O. and Solomon, J.R.: Adenovirus and intussusception., Med. J. Aust., 1: 447~449, 1966.
- 7) Potter, C. W.: Adenovirus infection as an aetiological factor in intussusception of infants and young children. J. Path. Bact., 88: 263, 1964.
- 8) 石井慶蔵, 斎藤 誠, 寺田 真, 沢田 徹: 幼児の腸重積症—その病原的観察を中心として—。診断と治療, 55: 323~326, 1967.
- 9) 弓削静彦, 柴田匡之, 星子哲彦, 松瀬仙史他: 乳幼児腸重積症とアデノウイルスとの関連。日本臨床外科学会誌, 31: 93~97, 1970.
- 10) Kjellen, L.: Studies on an unidentified group of cytopathic agents. Arch. Ges. Virusforsch., 6: 45, 1955.
- 11) 戸部隆吉, 岩本怜, 吉田睦広, 鳥井昭三: 所謂軽症虫垂炎について。第90回近畿外科学会, 昭36, 京都。(日本外科学会誌, 67: 219, 昭41)
- 12) 戸部隆吉: 虫垂炎のウイルス学的検索。第14回日本アレルギー学会総会, 昭39, 名古屋。(アレルギー, 14: 71, 昭40)
- 13) Tobe, T.: Inapparent Virus infection as a trigger of appendicitis. Lancet, 1: 1343~

- 1346, 1965.
- 14) 戸部隆吉：虫垂炎の Trigger としてのウイルス感染。日本医事新報, 2166: 27-31, 昭40.
- 15) 戸部隆吉, 堀越雄二郎：虫垂炎の成因—虫垂炎の Trigger としてのウイルス感染。外科治療, 14: 415-421, 昭41.
- 16) 戸部隆吉, 堀越雄二郎, 浜田忠弥, 浜島義博：Enterovirus 殊に Cocksachie B5 型ウイルス感染猿に対する免疫組織学的研究。第16回日本アレルギー学会総会, 東京, 昭41。(アレルギー, 15: 1055-1056, 昭41.)
- 17) 戸部隆吉：ウイルス性虫垂炎について。—Cocksachie B5 型ウイルス経口感染猿に対する免疫組織学的研究の示唆するもの。外科診療, 9: 791-796, 昭42.
- 18) Tobe, T., Horikoshi, Y., Hamada, C. and Hamashima, Y.: Virus infection as a trigger of appendicitis: Experimental Investigation of Cocksachie B5 virus infection in Monkey Intestine. Surgery, 62: 927-934, 1967.
- 19) 浜田忠弥, 戸部隆吉：マウスアデノウイルス感染における腸管抵抗性。ウイルス学の進展—1969—, 63-81, 昭和44.
- 20) 戸部隆吉, 児玉 宏, 正木直也, 浜田忠弥, 陳世澤：腹部外科領域におけるウイルス学の諸問題。日本医事新報, 9-13, 昭47.
- 21) 児玉 宏, 正木直也, 戸部隆吉, 浜田忠弥：螢光抗原法—抗アデノウイルス抗体保有細胞を鏡検する試み。医学のあゆみ, 83: 540-545, 昭47.
- 22) 児玉 宏：小児腸重積症の成因に関する研究。日・外・宝, 41: 160-167, 昭47.
- 23) Masaki, N., Kodama, H., Tobe, T., Chen, S. T. and Hamada, C.: Fluorescent antigen technique. The 4th International Congress of Histochemistry and Cytschemistry., 23 Aug, Kyoto, 1972.
- 24) 正木直也：消化器外科領域におけるアデノウイルス感染症—の研究虫垂炎並びに小児腸重積症の検討—(日・外・宝, 投稿中).
- 25) Middleton, G.: Thymic structure. Brit. Med. J., 28: 236, 1967.
- 26) 大谷敏夫：胸腺肥大症の臨床。小児科, 1: 112-117, 1960.
- 27) 小林 登, 早川 浩：胸腺と感染免疫ならびに原発性免疫不全症候群。最新医学, 28: 1329-1339, 昭48.
- 28) 小林 登：胸腺の正常と異常, 胸腺の新しい意義。小児科臨床, 17: 126-139, 昭和39.
- 29) Ginsberg, H.S., Pereira, H.G., Balentine, R.C. and Wilcox, W.C.: A proposed terminology for the adenovirus antigen and viron morphological subunits. Virology, 28: 782-783, 1966.
- 30) Pereira, H.G., Allison, A.C. and Forthing, C. P.: Study of adenovirus antigen by immunoelectrophoresis. Nature., 183: 895-896, 1959.
- 31) Allison, A.C., Pereira, H.G. and Forthing, C. P.: Investigation of adenovirus antigens by agar diffusion technique. Virology, 10: 316, 1960.
- 32) Huebner, B.J., Pereira, H.G., Allison, A.C., Hollinshead, A.C. and Turner, H.C.: Production of type-specific C antigen in virus-free hamster tumor cells induced by adenovirus type 12. Proc. Nat. Acad. Sci., 51: 432-439, 1964.
- 33) Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89: 362-364, 1955.
- 34) Eagle, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 130: 432-437, 1959.
- 35) 中井準之助, 岡本道雄：組織培養—基礎と応用—。東京, 朝倉書店, p. 26, 昭45.
- 36) Klemperer, H.G. & Pereira, H.G.: Study of adenovirus antigens fractionated by chromatography on DEAE-cellulose. Virology, 9: 536, 1959.
- 37) Haruna, I., Yaoi, H., Kono, R. and Watanabe, I.: Separation of adenovirus by chromatography on DEAE-cellulose. Virology, 13: 264, 1961.
- 38) Wilcox, W. C. and Ginsberg, H. S.: Purification and immunological characterization of type 4 and 5 adenovirus subunit antigen. Proc. Natl. Acad. Sci., 47: 512-526, 1961.
- 39) Valentine, R.C. and Pereira, H.G.: A-antigens and structure of the adenovirus. J. Med. Biol., 13: 13-20, 1965.
- 40) Maizel, J.V. Jr., White, D.O. and Scharff, M. D.: The polypeptide of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of viron. Virology, 36: 126-136, 1968.
- 41) Gessler, A.E., Bender, C.E. and Parkinson, M.C.: A new rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteination. Trans. N.Y. Acad. Sci., 18: 701, 1956.
- 42) Kohn, J.: A simple method for the concentration of fluids containing protein. Nature, 183: 1055, 1959.
- 43) Kobat, E.A. & Mayer, M.M.: Experimental Immunochemistry. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, P 22, 1911.
- 44) 浜島義博, 京極方久：免疫組織学。医学書院,

- 東京, 1968.
- 45) Ouchterlony, Ö. : Geldiffusion Techniques, Immunological Methods. (ed. Achroyd, J.F.) Blackwell Sci. Publ., Oxford, p.55. 1964.
 - 46) Coons, A.H. and Kaplan, M.H. : Localization of antigen in tissue cells. II Improvement in a Method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med., **91** : 1-13, 1950.
 - 47) 浜島義博, 安田健次郎 : 螢光抗体法・酵素抗体法・医学書院, 東京1971.
 - 48) Coons, A. H., Leduce, E. H. and Connelly, J.M. : Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. J. Exp. Med., **102** : 49-60, 1955.
 - 49) Shih-Tse Chen, Takayoshi Tobe, Yoshinari Isobe and An-Fu Chiu. : Cellular sites of immunoglobulins. VI. Localization of immunoglobulin in the human thymus. Immunol., in press.
 - 50) White, R.G. : Antibody production by single cells. Nature, **182** : 1383-1384, 1958.
 - 51) Hiramoto, R.V. and Hamlin, M. : Detections of two antibodies in single plasma cells by the paired fluorescence technique. J. Immunol., **95** : 241-224, 1965.
 - 52) Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R.H. and Ward, J.G. : Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **84** : 750-573, 1953.
 - 53) Bornard, E.C. & Paccaud, M.F. : Abdominal adenovirus and appendicitis. Helvetica Med. Acta, **33** : 164-171, 1966.
 - 54) Yunis, E.J. and Hashida, Y. : Adenovirus and intussusception. Electron microscopic demonstration of adenovirus in appendix vermiformis in a case of ileocecal intussusception. Pediatrics, **51** : 566-570, 1973.
 - 55) Ginsberg, H.S. : Adenovirus. Am. J. Clin. Patho., **57** : 771-776, 1972.
 - 56) Eddy, B.E., Grubbs, G. E. and Young, R. D. : Tumor immunity in hamsters infected with adenovirus type 12 or Simian Virus 40. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **117** : 575-579, 1964.
 - 57) Trentin J.J. et al. Immunization of hamsters and histoisogenic mice against transplantation of tumors induced by human adenovirus type 12. Proc. Am. Ass. Cancer Res., **5** : 64, 1964.
 - 58) Huebner, R.J., Rowe, W.P., and Lane, W.T. : Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus type 12 and 8. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **48** : 2051-2058, 1962.
 - 59) Huebner, R. J., Rowe, W. P., Turner, H. C. and Lane, W.T. Specific adenovirus complement-fixing antigens in virus-free hamster and rat tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **50** : 379-389, 1963.
 - 60) Hartley, J.W. and Rowe, W.P. : A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. Virology, **11** : 645-647, 1960.
 - 61) Hashimoto, K., Sugiyama, T., Yoshikawa, M. and Sasaki, S. : Intestinal resistance in the experimental enteric infection of mice with a mouse adenovirus. 1. Growth of the virus and appearance of a neutralizing substance in the intestinal tract. Jap. J. Microbiol., **14** : 381-395, 1970.
 - 62) 児玉 宏 : 小児腸重積症の成因に関する研究. 日・外・宝, **41** : 160-167, 1972.
 - 63) 本田 真 : 先天性心臓病の肺合併症の診療—呼吸器感染症について—. 小児科, **13** : 294-300, 1972.
 - 64) Yoffey, J.M. and Courtice, F.C. : Lymphatics, Lymph and Lymphoid Tissue. P.344, Edward Arnold, London, 1956.
 - 65) Askonas, B.A. and White, R.G. : Sites of antibody production in guinea-pig. Relation between in vitro synthesis of anti-ovalbumin and γ -globulin and distribution of antibody containing plasma cells. Brit. J. Exp. Path., **37** : 61-74, 1956.
 - 66) Marshall, A.H.E. and White, R.G. : The immunological reactivity of the thymus. Brit. J. Exp. Path., **42** : 379-385, 1961.
 - 67) 栗屋和彦 : 抗原の直接注射によるモルモット胸腺における2次小節の形成・日血会誌., **26** : 164, 1963.
 - 68) Sherman, J.D., Adner, M.M. and Dameshek, W. : Direct injection of the thymus with antigenic substances. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **115** : 866-870, 1964.
 - 69) Svet-Moldavsky, G. J. and Raffkina, L. I. : Thymus-lymphatic nodes interrelations following injection of Freund's adjuvant. Nature, **197** : 52-53, 1963.
 - 70) Nossal and Ada. : Antigens, Lymphoid Cells, and The Immune Response., Academic Press, New York and London, pp. 196-216, 1971.
 - 71) 小林忠義, 渡辺 裕, 秋山武久, 土屋雅春, 玉置審一 : 胸腺—その基礎と臨床—・医学書院, pp. 93-96, 東京, 1968.
 - 72) Macfarlane Burnet. : Cellular Immunology Books 1 and 2. Melbourne University Press,

- Cambridge University Press., Melbourne and Cambridge. pp. 351-354, 1971.
- 73) Van Furth, R., Schuit, H.R.E. and Hijmans, W. : The formation of immunoglobulins by human tissues in vitro. III. Spleen, lymphnodes, bone marrow and thymus. *Immunology*, **11** : 19-27, 1966.
 - 74) 横路謙次郎・伊藤隆明 : 抗体産生と胸腺の役割. 代謝, **9** : 1112-1119, 1972.
 - 75) Tomasi, T.B. Jr. and Yurchak, A.M. : *J. Immunol.*, **108** : 1132, 1972.
 - 76) Rappaport, B.Z. . Antigen-antibody reactions in allergic human tissues III Immunofluorescent study of allergic nasal mucosa *J. Immun.*, **93** : 792-797, 1964.
 - 77) Speirs, R. S. and Speirs, E. E. : Cellular localization of radioactive antigen in immunized and nonimmunized mice. *J. Immunol.*, **90** : 561-571, 1963.
 - 78) Sobesin, S.M. . A function of eosinophil. Phagocytosis of antigen-antibody complex. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **112** : 667-670, 1963.
 - 79) Litt, M. : Studies in experimental eosinophilia VI Uptake of immune complex by eosinophils. *J. Cell. Biol.*, **23** : 355-361, 1964.
 - 80) Archer, R.K. : On the function of eosinophils in the antigen-antibody reaction. *Brit. J. Haemat.*, **11** : 123-129, 1965.
 - 81) Litt, M. : Studies in experimental eosinophilia VII. Eosinophils in lymph nodes during the first 24 hr. following primary antigenic stimulation. *J. Immunol.*, **93** : 807-813, 1964.
 - 82) Roberts, A.N. : Cellular localization and quantitative of tritiated antigen in mouse lymph nodes during early primary immune response. **49** : 889-909, 1966.
 - 83) Cohen, S.G. and Sapp, T.M. : Experimental eosinophilia X. Relation of antigen-antibody complex size and protein molecular weight to cell responses. *J. Allergy*, **36** : 415-422, 1965.
 - 84) 畔柳武雄, 大高裕一, 松橋 直 : 臨床免疫学叢書 6., p.96-117, 医学書院, 東京, 1973.
 - 85) Speirs, R.S. and Speirs, E.E. . Cellular reaction to reinjection of antigen. *J. Immunol.*, **92** : 540-549, 1964.
 - 86) Connell, J.T. : Morphological changes in eosinophil in allergic disease. *J. Allergy*, **41** : 1-9, 1968.
 - 87) Parish, W.F. : Investigation on eosinophilia. *Brit.J. Derm.*, **82** : 42-64, 1970.
 - 88) Karasawa, K. : Changes in the amount of myelocytes in the thymus during its accidental involution in young rabbits. *Bull. Yamaguchi Med. School.*, **3** : 81-87, 1955.
 - 89) Barrett, J.T. . Textbook of immunology an introduction to immunochemistry and immunobiology. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1970.