



# 黄色腫細胞の発生機序に関する実験的研究

山本, 桂三

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1974-07-03

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0311

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000311>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



〔 9 〕

|         |                         |
|---------|-------------------------|
| 氏名・（本籍） | やまもと けいぞう 山 本 桂 三（兵庫県）  |
| 学位の種類   | 医 学 博 士                 |
| 学位記番号   | 医 博 ろ 第 249 号           |
| 学位授与の要件 | 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当 |
| 学位授与の日付 | 昭 和 49 年 7 月 3 日        |
| 学位論文題目  | 黄色腫細胞の発生機序に関する実験的研究     |

審 査 委 員    主 査    教 授    佐 野 栄 春

教 授    岡 本 彰 祐    教 授    杉 山 武 敏

## 論 文 内 容 の 要 旨

黄色腫は網内系細胞中に脂質の蓄積を来たす疾患であるが、その脂質が由来や脂質滴の存在する泡沫細胞の発生機序については未だ不明の点が多い。そこで家兎実験的黄色腫につき血中脂質と黄色腫細胞形成の過程を経時的に追い電顕的観察を行うことにした。更に血清リポ蛋白のモデルとして西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼを黄色腫細胞の周辺に注入し、その取り込みの態度から黄色腫細胞及びその脂質滴の発生機序につき若干の考察を加えた。

### 実験材料と方法

実験の高脂血症の作成法；家兎飼育食にコレステロール末 2.5%，ヤシ油 5%，オリーブ油 5%を添加したコレステロール特別食を作り、これを体重約 2.5kgの雄性家兎に連日経口投与した。

一般電顕的観察；コレステロール食投与 2 か月，4 か月，5 か月後にそれぞれ家兎腰部皮膚を採取し，Karnovsky 固定，オスミウム酸が二重固定後，Aquon 脱水を行い，エボンに置換包埋，ウラン，鉛の二重染色後，日立 HS-8 型電子顕微鏡にて観察した。

ペルオキシダーゼ注射群；特別食投与 5 か月後の家兎腰部皮膚に horseradish peroxidase（Type II）溶液（生理的食塩水 1 cc 当り 50 mg）を皮内注射し，10 分，30 分，60 分後に同部位の皮膚を採取した。電顕処理は一般電顕観察と同様であり，ペルオキシダーゼ反応は Graham-Karnovsky 法に従った。

### 実験結果

肉眼的変化；コレステロール食投与後 2，4，5 か月で鼻部には黄色腫丘疹の発生を見たが，採取部位の腰部皮膚は肉眼的に著変がなかった。

血清脂質；コレステロール食投与 2 か月後から総コレステロール値の急激な上昇を認めた。

血清脂質分画；コレステロール食投与後3か月の家兎につき血清リポ蛋白の分析を行ったところ、カイロミクロン22.4%， $\beta$ -リポ蛋白67.8%，pre- $\beta$ -リポ蛋白（一部 $\alpha$ 分画も含まれる）9.8%であった。またコレステロールの78%がエステル型であった。

一般電顕的所見；コレステロール食投与後2か月後の真皮毛細血管の内皮細胞には直径1500Åまでのpinocytotic vesicleと思われる小胞が存在するものの他の細胞内小器管には乏しい。また内皮細胞間の間隙も認めなかった。血管外皮細胞では、細胞質内に多数のpinocytotic vesicleと直径0.6~2 $\mu$ の脂質滴と思われる空胞が認められ、この脂質滴の中には辺縁部に中等度電子密度の物質を残すもの、無構造物質が充満しているものもある。

コレステロール食投与後4か月後には毛細血管周辺に多数の泡沫細胞を認め、その細胞質内には脂質滴のほか、直径500~1500Åのpinocytotic vesicle, coated vesicleが多数存在し、種々の大きさの二次ライソゾームも認められる。全経過を通じて細胞外に脂質滴は認められなかった。

injected peroxidaseの細胞内取り込み所見；注射後10分では泡沫細胞の細胞膜外面に密に接し、とくに細胞突起の延長及び細胞膜の彎入に従って陽性物質が現われてくる。更に細胞質周辺の直径500~1500Åの小胞に陽性反応を示す。注射30分後では種々の像を呈し、細胞膜に接する陽性物質のほか、細胞質周辺の多数の小胞及び細胞質中央の小胞に陽性反応を呈し、その小胞の中には二次ライソゾームと接するものもある。60分後となると細胞膜に接する陽性物質はほとんど消失し、細胞質内では大小種々の一部では明らかに空胞化した二次ライソゾームに陽性反応を示す。しかしながら脂質滴には陽性反応は認められなかった。

対照の生食のみ注射したものとペルオキシダーゼ反応施行時にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加しないものでは、いずれもペルオキシダーゼ反応は陰性であった。

#### 考えとまとめ

本研究では家兎にコレステロール食を投与し、2か月後全例に高コレステロール血症を証明した。かかる高脂血症を伴う家兎皮膚の電顕観察では、血管内皮細胞に変化はないが、まず血管外皮細胞に脂質滴と思われる空胞が発生し、その後血管周囲の組織球に空胞を生じてくる所見を得た。これは先人の報告所見とはほぼ一致するものであるが、多少異なる点としては内皮細胞と外皮細胞の間、あるいは外皮細胞及び組織球周囲の間質に脂質滴様の像をほとんど見ていないことと、pinocytotic vesicleの大きさがやや小さい事が指摘される。しかしながら血清由来の脂質がいかなる形であれ、ともかく血管壁を通過し、pinocytosisで外皮細胞、組織球に取り込まれ、いくつかの過程を経て泡沫化するという事は充分推測できる。

血流中の脂質は蛋白と結合し、リポ蛋白として可溶性ないし安定化されている。リポ蛋白には $\alpha$ 、 $\beta$ 、pre- $\beta$ とカイロミクロンの4種類があるが、それぞれの大きさと血管壁の透過を考察してみると、まずカイロミクロンは肝外組織の血管内皮細胞でlipoprotein lipaseの働きを受け、遊離脂肪酸とグリセライドに加水分解され、その異化が始まる。生じた遊離脂肪酸は血中にもどり、グリセライドは内皮細胞の小胞に取り込まれそれを通過するといわれる。本実験においては皮膚血管内皮細胞に変化を認めないので、血清リポ蛋白が内皮細胞内で分解されないとすると血管外へ出ないか、出るとするとそのままの形で内皮細胞間の間隙を通るものと考えざるをえない。その上内皮細胞間に大きな間隙を認めなかったということか

ら、血管壁を通過するとすればそのリポ蛋白はカイロミクロンより小さい  $\beta$  ないし pre- $\beta$  が主なものであろうと考えるのが妥当であろう。

従来より実験的黄色腫家兎における高脂血症を示す主要血清脂質はエステル型コレステロールであり、黄色腫皮膚の主要脂質も遊離とエステル型のコレステロールとされ、本実験でも全く同様所見であった。そこでコレステロールの代謝について考えてみるに、Werb & Cohn の報告では血清リポ蛋白の遊離コレステロールは大喰細胞の膜面の遊離コレステロールと交換されて自由に動くが、コレステロール・エステルは細胞内に貪食されると lysosomal cholesterol esterase により遊離コレステロールに加水分解され、遊離コレステロールが細胞外に排出されている。また cholesterol esterifying activity は大喰細胞内には見られないとされている。

一方電顕的に細胞内コレステロールのエステル型、遊離型の固定保存法としてはそれぞれ Aquon 脱水法、digitonin 処理法がある。今回の実験結果では Aquon 脱水法によるも脂質滴中の脂質の保存は極めて少なく、わずかに周辺部に中等度電子密度の物質が認められたに過ぎなかった。また広根は digitonin 処理による電顕的観察で黄色腫細胞中に脂質の保存を認めている。これらのことから脂質滴内には遊離コレステロールが多く蓄積していて、エステル型は少量であると推測できる。

周辺に注射されたペルオキシダーゼに対する泡沫細胞の態度は、まず500~1500Å の pinocytotic vesicle として細胞内に取り込み、二次ライソゾームに統合し、lysosomal enzyme により消化している。血清リポ蛋白に対する泡沫細胞のとり込み方もほぼこれと同じ過程と考えられる。

#### む す び

実験的家兎黄色腫の泡沫細胞につき、電顕的観察を行い、とくにリポ蛋白の細胞内取り込みのモデルとして西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼを皮内注射し、泡沫細胞の態度を検討し次の結果を得た。1) 泡沫細胞は血清由来の脂質を血管外皮細胞と組織球が貪食することにより生ずる。2) 泡沫細胞の脂質の取り込みは pinocytosis であり、それが二次ライソゾームに統合されて脂質滴化する。3) 脂質滴の内容は遊離コレステロールが大部分で、エステル型コレステロールは少ない。

### 論文審査の結果の要旨

黄色腫は網内系細胞に脂質が蓄積を来す疾患であるが、その脂質の由来については局所産生説も全く否定しすることはできないが、従来より多くの臨床的事実から血清脂質由来説が遙かに有力であり、近年 Fredrickson による血清リポ蛋白の解析から黄色腫が再分類されていることも周知のところである。そこで著者が家兎の実験的黄色腫につき血中脂質と黄色腫細胞形成過程を経時的に追い電顕的観察を行い、とくに血清リポ蛋白の黄色腫細胞へのとりこみの機序をそのモデルとしてペルオキシダーゼ標識を用いて検討している。

まず家兎にコレステロール食を連日与えると、2か月後から総コレステロールの急激な上昇、脂質分画では  $\beta$ -リポ蛋白の著明な上昇を認め、コレステロールの78%はエステル型であったとしている。次いでコレステロール食 2, 4, 5 か月後の腰部皮膚をとり、電顕試料に供している。電顕的には Karnovsky

固定—オスミウム酸二重固定後、コレステロールの固定保存法として Aquon 脱水法を行いエポンに置換包埋、ウラン、鉛の二重染色を施し観察している。

その結果、コレステロール食投与2か月後の真皮毛細血管では内皮細胞に直径 1500Å までの大きさの pinocytotic vesicle と思われる小胞を認めるが、内皮細胞の間隙はなく、外皮細胞では細胞質内に多数の pinocytotic vesicle と脂質滴と思われる小空胞が認められた。4か月後には毛細血管周辺に多数の泡沫細胞を認め、その細胞質内には脂質滴のほか、多数の pinocytotic vesicle, coated vesicle が存在し、種々の大きさの二次ライソゾームも認められるという所見を得ている。

次いで horseradish peroxidase をコレステロール食投与5か月後の家兎皮膚に皮内注射し、経時的に細胞内取りこみを観察している。10分後では peroxidase は泡沫細胞の細胞膜面に密に接し、とくに細胞突起の延長及び細胞膜の彎入に従って認められ、更に細胞質周辺には pinocytotic vesicle と小空胞に出現する。30分後には上記のほかに二次ライソゾームと接した小胞内にみられ、60分後ではすべて細胞質内に入り、空胞化した二次ライソゾームに陽性反応を呈する。

以上の実験成績は先人の報告とほぼ一致するものであるが、多少異なる点として血管内皮細胞と外皮細胞の間、あるいは外皮細胞及び組織球周辺の間質に脂質滴様の像をほとんどみないこと、pinocytotic vesicle の大きさのやや小さいことを挙げている。しかしながら血清由来の脂質から血管壁を通過し、pinocytosis により外皮細胞及び組織球に取りこまれることは充分推測できるところで、著者は血清脂質の分画成績と合わせ考え、血管壁を通過するものは  $\beta$ - ないし pre- $\beta$  リポ蛋白が主なものであろうとしている。

また従来より実験的黄色腫家兎の主要血清脂質はエステル型コレステロールとされ、本実験でも全く同様であったが、電顕的検索で細胞内コレステロールのエステル型の固定保存法とされる Aquon 脱水法を用いるも、脂質滴中の脂質の保存は極めて少なかったことと、遊離型の固定保存法とされる digitonin 処理法によれば黄色腫細胞中に脂質が保存を証明しようという文献的考察より、脂質滴中の脂質は遊離型コレステロールが主なもので、これは細胞中のライソゾームエステラーゼの作用によるものであろうとしている。

泡沫細胞の周辺に注射されたペルオキシダーゼに対してはまず 500~1500 Å の pinocytotic vesicle として細胞内に取りこみ、二次ライソゾームに統合し、ライソゾーム酵素により消化されるという所見をえたが、この結果から血清リポ蛋白に対する泡沫細胞のとりこみ方もほぼ同じ過程であろうと推論している。

以上を総括すると、1) 泡沫細胞は血清由来の脂質を血管外皮細胞と組織球が貪食することにより生じる。2) 組織球の脂質の取りこみは pinocytosis であり、それが二次ライソゾームに統合されて脂質滴化する。3) 脂質滴の内容は遊離コレステロールが大部分でエステル型コレステロールは少ない。

本研究は黄色腫の成因につき、その血清脂質の細胞内取りこみの機序を、実験的に検討したものであるが、黄色腫の成因として二大主流ともいふべき脂質代謝異常と網内系細胞病理の橋わたしとして極めて有意義な業績といえる。

よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。