

生後早期のマウス肝臓における成熟好中球の細胞死 : 組織学的観察

須田満寿美, 園田 祐治, 板野ちか子, 竹本 琢司, 岩月 宏彦,
佐々木和信

生後早期の ICR マウスを用いて, 肝臓造血終末期の顆粒球系細胞の運命を光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡で観察した。出生直後の肝臓は多数の赤血球系や顆粒球系の造血細胞を含むが, 生後 3 日以降その数は急速に減少する。生後早期の肝臓では, 顆粒球系白血球の多くは肝臓被膜下ならびに小葉間結合組織中に集積し, 成熟好中球が主体で, 生後 5 日以降細胞死の兆候を呈する好中球が増加する。細胞死の兆候は特に核に顕著で, 染色質が濃縮し, 核内膜へ高度に半月状に凝集して, アポトーシスに特徴的な核形態を呈する。細胞質では周辺が断片化し, 濃縮した細胞質内でライソゾーム顆粒が腫大する。細胞死の兆候を呈する好中球はマクロファージに取り込まれ消化分解される。新生児期の肝臓における好中球のプログラム細胞死が肝臓造血の終末期を特徴づけると考えた。

(平成 7 年 7 月 6 日採用)

Cell Death of Mature Neutrophils in the Neonatal Liver of the Mouse : A Histological Study

Masumi SUDA, Yuji SONODA, Chikako ITANO,
Takuji TAKEMOTO, Hirohiko IWATSUKI and Kazunobu SASAKI

Blood cell production in the fetal liver declines in late gestational life, and liver hemopoietic cells disappear shortly after birth. To clarify the fate of hemopoietic cells in the neonatal liver, we examined ICR mouse livers from 0 to 20 days after birth by light and electron microscopy. In the neonatal liver, a large number of granulocytes accumulated in the interlobular and subcapsular connective tissue, and the majority of the granulocytes could be classified as mature neutrophils. Erythroid cells formed erythroblastic islands, and the islands were scattered throughout the liver parenchyma. After three days of age, liver hemopoietic cells including erythroblasts and neutrophils markedly decreased in number. The neutrophils accumulating in the subcapsular and interlobular connective tissue showed various signs of cell death. The major signs appeared in their nuclei; condensation and margination of chromatin to form peripheral crescents, and nuclear dissolution. Marked distension of the perinuclear cisternae was noted. The peripheral cytoplasm was fragmented, and the condensed cytoplasm contained swollen lysosomal granules. The apoptotic

neutrophils were engulfed and removed by phagocytes. Neutrophils with the morphological appearance of apoptosis were seen within liver macrophages, and highly degraded neutrophil constituents were often present. Programmed cell death of neutrophilic granulocytes is considered to characterize the terminal stage of liver hemopoiesis. (Accepted on July 6, 1995) *Kawasaki Igakkaishi* 21(2):71-80, 1995

Key Words ① Liver hemopoiesis ② Cell death ③ Neutrophils
④ Neonatal mouse

はじめに

哺乳動物の胎子において、終生の造血器官である骨髄が形成される以前、肝臓が主要な造血器官である¹⁾。マウスでは肝臓造血は胎生11日に始まって、生後、骨髄の発達とともに造血器官としての役割を終える。肝臓における造血は始め赤血球生成が主体であるが、巨核球の分裂増加や顆粒白血球生成も同時におこなわれる^{2),3)}。我々は肝臓における赤血球生成の発達と消退の経過を、特に赤芽球島の形態変化を中心として超微形態レベルで明らかにした⁴⁾。しかしながら、肝臓で生成された顆粒球がどのような推移で肝臓から消失するのか、その経過はあきらかではない。本研究は、肝臓造血の終末期の顆粒白血球とくに好中球について、その運命を光顕と電顕観察によって形態学的に明らかにすることを目的とする。

材料と方法

用いた動物はICRマウスで、恒常環境下(22±2°C)で固形飼料(オリエンタル酵母工業, NMF)と自由飲水によって飼育した。

動物は生後0日, 3日, 5日, 6日, 7日, 8日, 9日および20日の各期で、それぞれ5から10匹, 総計50匹を用いた。動物は所定の齢期で体重測定後、クロロホルム麻酔のもと直ちに肝臓を摘出、その重量を測定した。

光顕観察用として、摘出した肝臓はツェンカー・ホルマリン・酢酸(20:2:1)混合液で6時間固定し、アルコール系列で脱水後、パラフ

インに包埋した。厚さ5μmの連続組織切片を作成し、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。

電顕観察用としては、肝臓を肝葉に分け、肝葉を約1ミリ角の組織塊に細切し、カルノフスキー液(4%パラフォルムアルデヒドと5%グルタルアルデヒドの0.1Mカコジル酸緩衝混合液)にて室温で3時間固定後、1%四酸化オスミウム液(0.15Mカコジル酸緩衝液pH7.4)で4°Cで90分後固定し、0.5%酢酸ウランの生理

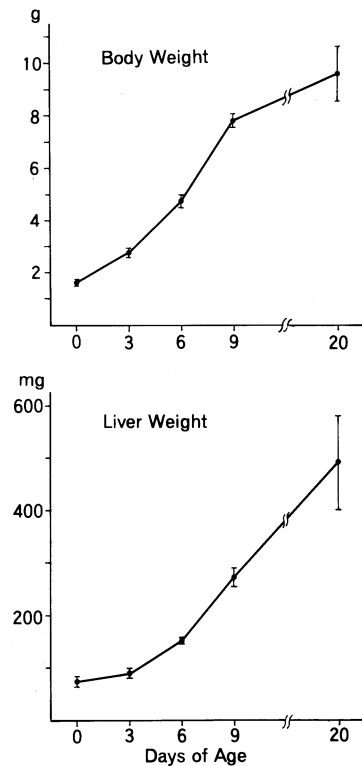


Fig. 1. Body weight and liver weight in early postnatal mice. Each point represents the mean, and vertical bars indicate standard deviations.

食塩水液に一晩浸漬した。組織片はアルコール脱水後、エポン812(TAAB社)に包埋した。120 nmの超薄切片を作成し、クエン酸鉛で電子染色して透過型電子顕微鏡(JEM-2000EX II)で観察した。

成 績

1. 生後早期の肝臓重量の変化

生後0日から9日までのマウスの体重と肝臓重量は Figure 1 に示したように、いずれも著しく増加する。体重は生後0～3日、3～6日、6～9日でいずれも約1.7倍ずつ増加し、生後9日で生後0日の4.9倍の7.8±0.2 gとなる。生後20日の体重は9.6±1.1 gである。一方、肝臓重量は特に生後3～20日の間で著しく増加し、生後9日で272±19 mg、生後20日で490±90 mgとなる。

生後0から3日の肝臓の組織切片では小葉間

静脈と中心静脈の断面が多数含まれるが、小葉間結合組織は未発達である。生後6日以降に小葉間動脈、静脈、胆管を含む小葉間結合組織が発達し、肝小葉構造が明瞭になる。生後0日の肝臓内には造血系細胞が多数含まれるが、造血系細胞の数は肝臓重量が増加するのに反比例して、3日以降特に急速に減少し、生後9日以降肝臓内にはきわめて少数が散在するのみである (Fig. 2)。

2. 各系造血細胞の肝臓内分布

生後0日の肝臓内の造血系細胞には赤芽球、巨核球および多形核白血球がふくまれ、各系の造血細胞は生後早期の肝臓内でそれぞれ全く異なった分布を呈する。すなわち、赤芽球は小葉内で十数個が集合し細胞塊を形成する。赤芽球塊では中央にマクロファージが位置し、赤芽球島を形成する。赤芽球島は肝臓小葉内に広くびまん性に散在する。巨核球は赤芽球島のような

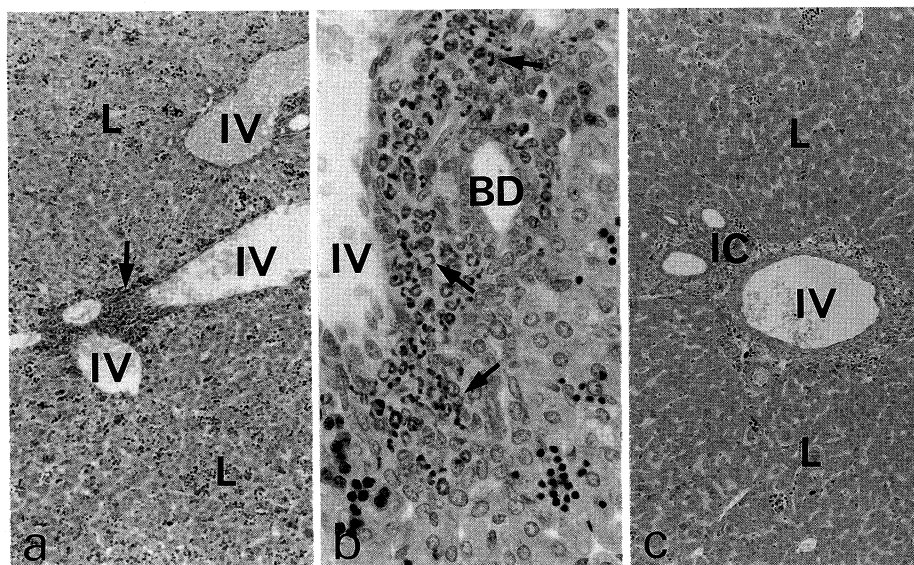


Fig. 2. Photomicrographs of livers at day 0 (a, b) and nine days of age (c). H-E staining.
 (a) Day 0. Liver lobules (L) contain numerous hemopoietic cells. An arrow indicates leukocyte accumulation in the interlobular connective tissue. IV: interlobular vein. (×110)
 (b) Day 0. Accumulation of polymorphonuclear leukocytes (arrows) in the connective tissue between the interlobular vein (IV) and the bile duct (BD). (×430)
 (c) Nine days of age. Hemopoietic cells in the hepatic lobules (L) and in the interlobular connective tissue (IC) are markedly decreased in number. IV: interlobular vein. (×110)

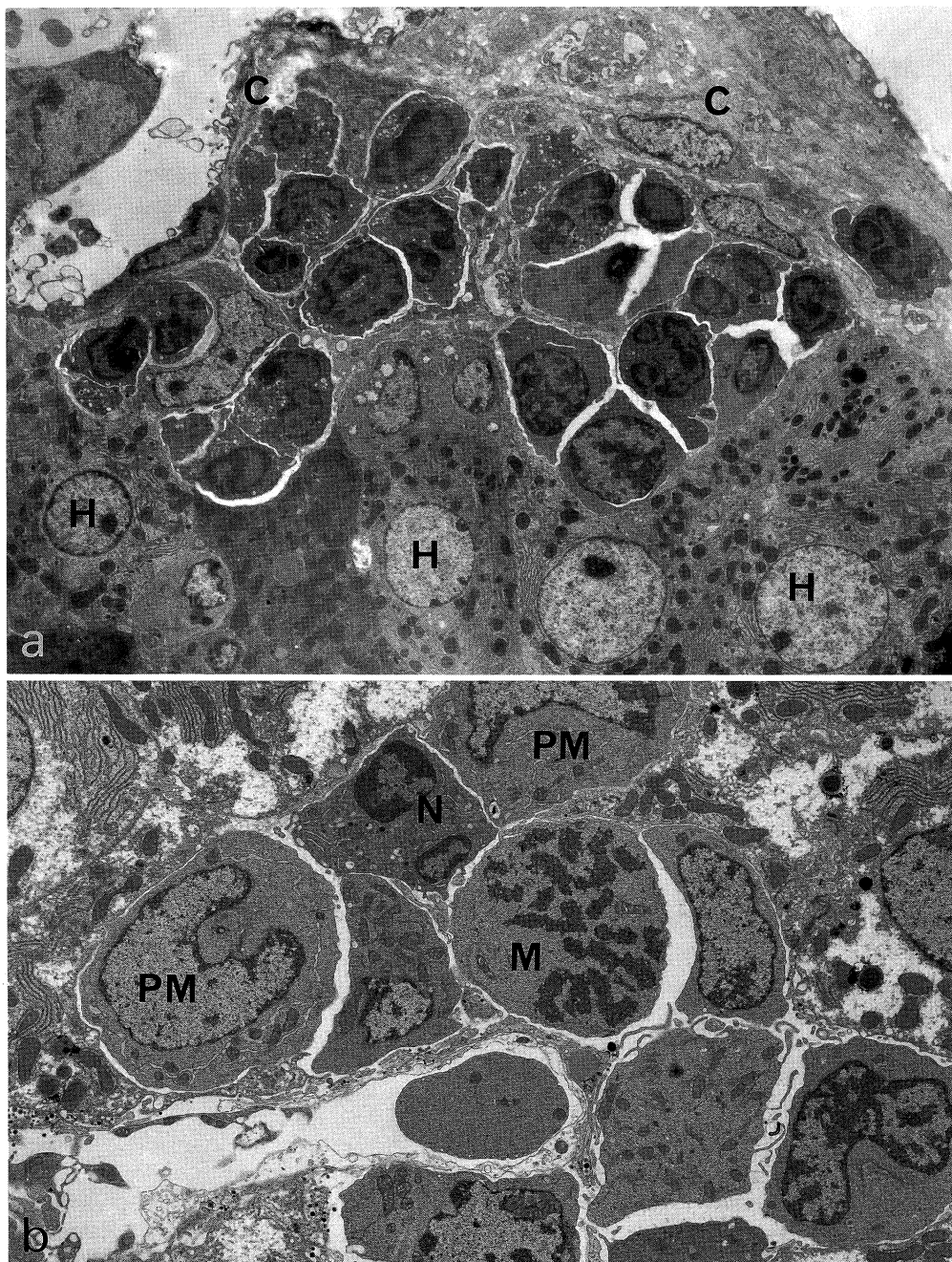


Fig. 3. Electron micrographs of neutrophil accumulations.

(a) Five days of age. Numerous neutrophils are noted in the subcapsular connective tissue. C : capsule, H : hepatocyte. ($\times 2,100$)

(b) Day 0. Neutrophil accumulation in the neonatal liver contains a few promyelocytes (PM) in addition to mature neutrophils (N). The mitosis of a neutrophilic granulocyte (M) is noted. ($\times 4,000$)

細胞集団を形成することなく、個々単独で、肝臓小葉内にびまん性に散在する。肝臓小葉内の赤芽球島ならびに巨核球の数は生後3日以降急激に減少する。一方、多形核白血球は小葉間結合組織や肝臓を覆う漿膜下疎性結合組織内に集合し、小葉内には極めて少ない (Fig. 2b)。こ

のような白血球集団には好中球系白血球がもっとも多く、集団中に好酸球や赤芽球がわずかに混在することもあるが、巨核球はほとんど含まれない。

3. 肝臓結合組織中の多形核白血球に見られる超

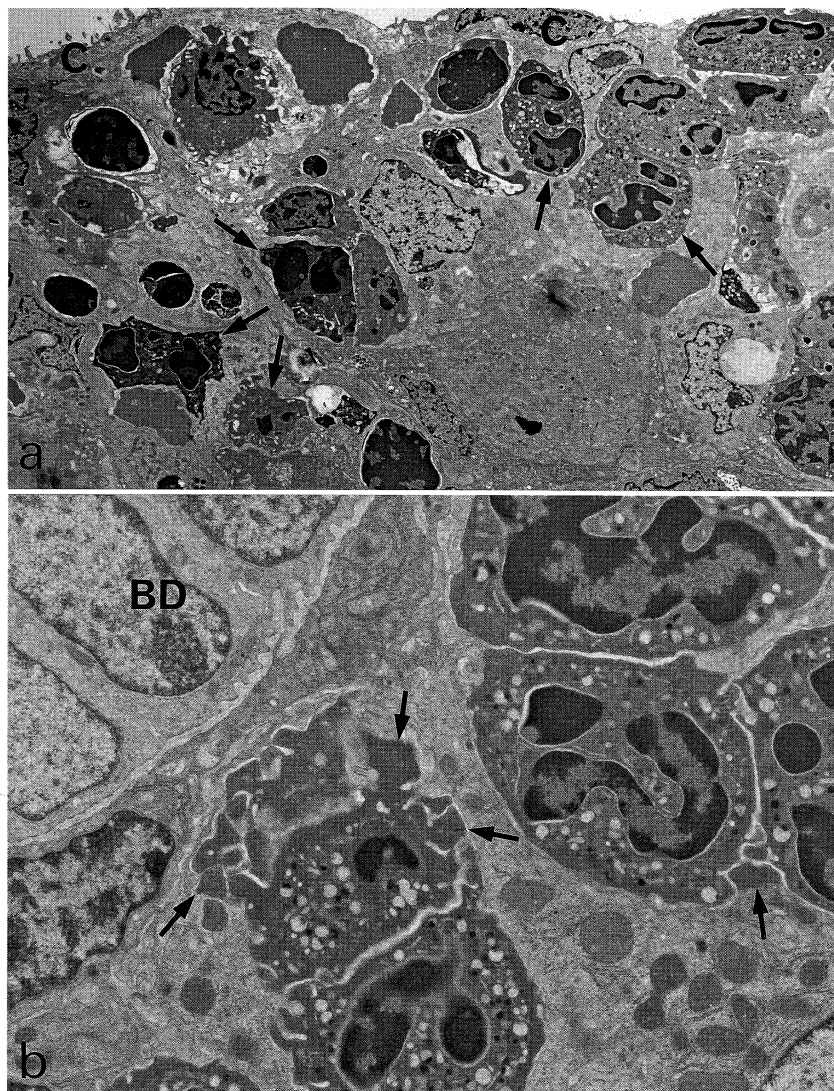


Fig. 4. Livers at eight days of age.

(a) Subcapsular connective tissue.

Neutrophils showing signs of cell death (arrows) are frequently noted.

C : capsule. ($\times 2,400$)

(b) Interlobular connective tissue.

Arrows indicate fragmented cytoplasm of neutrophils. BD : bile duct.

($\times 6,400$)

微形態変化

Figure 3a に肝臓被膜下の白血球集積を示す。このような白血球集団は主として好中球から構成され、出生直後は幼弱な前骨髄球を含んだ種々の分化段階の顆粒白血球系造血細胞からなる。生後日数とともに成熟好中球が増加し、変性兆候を呈する好中球がやがて集団の多数を占めるようになる。

1) 幼弱顆粒球系白血球と成熟好中球—生後0日

生後0日の肝臓結合組織中には成熟好中球に混じって、電顕レベルで明調な腎臓形核の前骨髄球や骨髄球さらに後骨髄球が含まれ、主として好中球系の各成熟段階の造血細胞が核分裂像を伴って認められる (**Fig. 3b**)。前骨髄球や骨髄球は異染色質の乏しい明調な核を有し、細胞質には自由リボソーム、滑面小胞体の他にライソゾーム顆粒が含まれる。球形を呈する顆粒が大多数をしめ、直径が300 nm以下で約200 nmの小型顆粒がもっとも多い。このような幼弱な顆粒球系造血細胞は生後急速に肝臓から消失する。

成熟好中球の分葉核では、異染色質が核膜にそって不規則な凝集塊を形成する。細胞質には多数のライソゾーム顆粒を含む。顆粒は直径80から160 nmの小型顆粒がもっとも多く、ついで幅80, 長さ300 nmの杆状顆粒が多い。

2) 成熟好中球の死とマクロファージによる取り込み—生後3～9日

変性兆候を呈する好中球は、肝臓結合組織の白血球集積中に出生直後から出現するが、その頻度は生後5日以後増える (**Fig. 4a**)。好中球の変性兆候は核・細胞質のいずれにも出現する。変性兆候は超微形態的に細胞質の断片化、核の変化ならびにライソゾーム顆粒の変化の3点が主体である。

細胞質の断片化

結合組織に集積した好中球では、細胞質辺縁部の断片化がみられる (**Fig. 4b**)。細胞質断片は500 nmから1 μ m径の球ないし不整多角形で、自由リボソームを内部に含むが、ライソゾーム

顆粒は含まれない。細胞質断片は好中球より離脱し、それによって好中球は小型化する。

核の変化

好中球の分葉核では異染色質が強度に凝集し、内核膜にかこまれる核内容が萎縮する。そのため、外核膜と内核膜の間の核膜槽が拡大する (**Fig. 5a**)。小型の核葉は破碎・崩壊し、大型の核葉のみが不整形を呈して変性好中球内に残る。残存した核葉では、はじめ染色質が内核膜に添って半月形に凝集し、凝集染色質と染色質間域との境界が明瞭になり、アポトーシスに特徴的な核の形態を呈する (**Fig. 5c**)。アポトーシス好中球はマクロファージに取り込まれる。

ライソゾーム顆粒の変化

核内容が濃縮するとともに、細胞質のライソゾーム顆粒は直径200から300 nmの球状ないし幅100, 長さ300 nmの楕円液胞状に膨大する (**Fig. 5a**)。膨大したライソゾーム顆粒を含む細胞質は電子密度が高い細胞質基質でみだされ暗調になる (**Fig. 5b, c**)。

以上の一連の細胞死の過程において、はじめに辺縁細胞質の離脱によって変性好中球は小型化し、ついで小型核葉の崩壊によって、核葉が減少する。残存する核葉では染色質が強度に凝集、核の周囲を腫大したライソゾーム顆粒が取り囲む。

肝被膜下や小葉間結合組織内にふくまれるマクロファージは大型の食胞を含む。食胞の内容は赤芽球核に由来するものもあるが、アポトーシス好中球を取り込んだ食胞も少なくない。濃縮核と腫大したライソゾーム顆粒を含む変性萎縮好中球が径約3 μ m程度の球形封入体内に含まれることが多く (**Fig. 5c**)、食胞内で好中球の消化・分解が進行する。このようなマクロファージは生後7～9日の肝結合組織内に多数含まれ、変性好中球はマクロファージに取り込まれることによって、肝臓被膜下ならびに小葉間結合組織内で除去・処理される。成熟好中球の細胞死の過程と食細胞内での消化を **Figure 6** に模式的に示す。

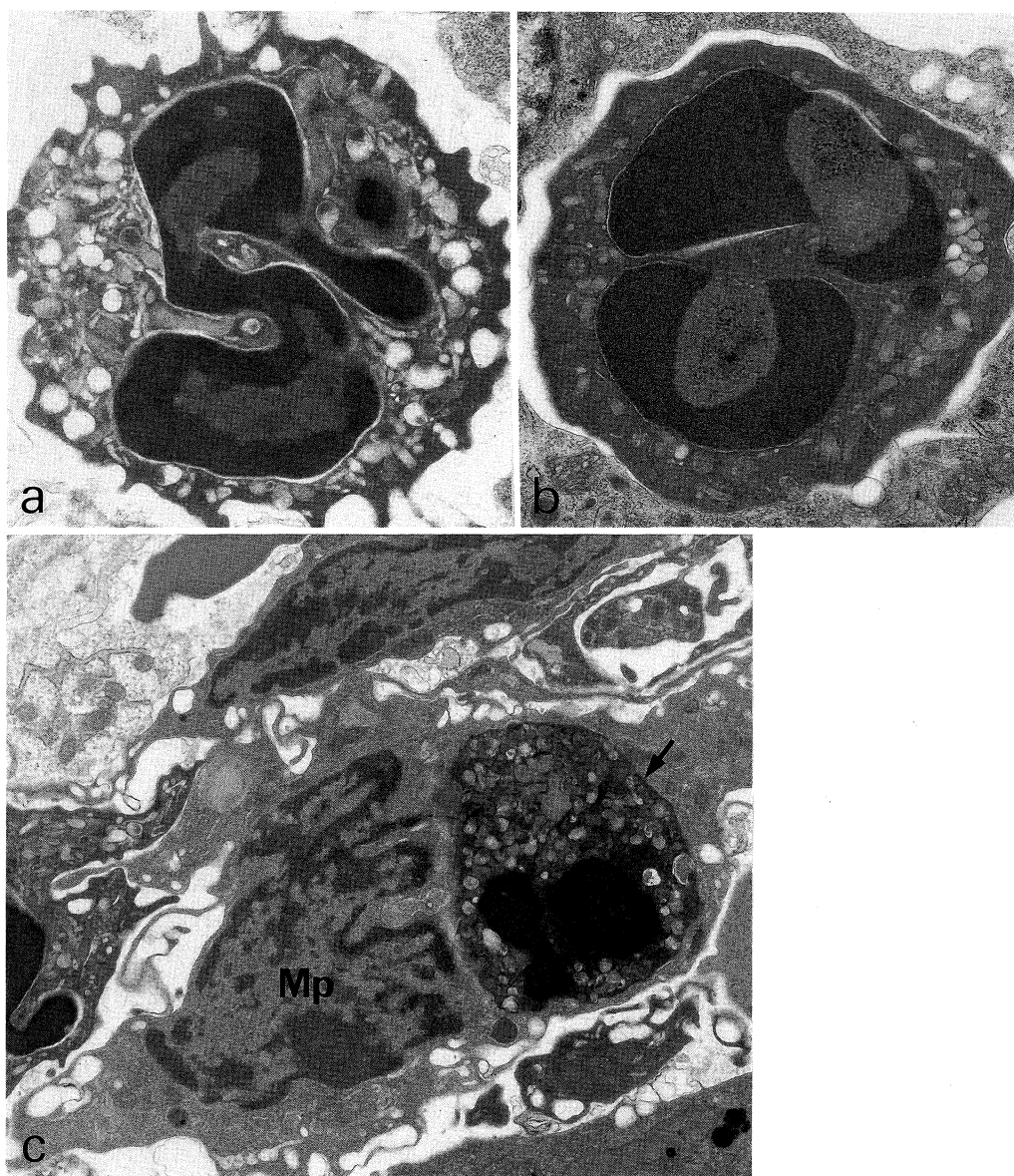


Fig. 5. Dying neutrophils.

- (a) Eight days of age. Distention of the perinuclear cisternae and swollen lysosomal granules are noted. ($\times 15,000$)
- (b) An apoptotic neutrophil at six days of age. The nuclear chromatin forms typical peripheral crescents. ($\times 14,000$)
- (c) Eight days of age. Neutrophil residue (an arrow) is seen in the cytoplasm of a macrophage (Mp). ($\times 9,600$)

考 察

哺乳動物の肝臓では骨髓造血が発生する以前

の胎生期に、赤血球系造血を始めとして各種の造血が活発に営まれ、産生された各種の血液細胞は胎子内を循環する。マウスにおいては、骨髓での造血は胎生後期から出生直後に発生し、

骨髄の発達にともない生後早期に肝臓内の造血系細胞は急速にその数を減少し、肝臓造血はまもなく終熄する。マウス肝臓造血を構成する主要な造血細胞である赤芽球と顆粒球系白血球とは、成績で述べたように、肝臓内における造血巣の局在において明瞭な違いがある。ヒト胎児肝臓での顆粒球系造血と間葉組織との密接な関連は古くから報告されており²⁾、マウスにおいても顆粒球系白血球は肝臓被膜下結合組織ならびに小葉間結合組織などの結合組織に集中増殖する。一方、赤芽球は中心マクロファージを取り囲む赤芽球島を形成し、赤芽球島は肝臓小葉内に分布し、特に結合組織との関係は認められない。従って、赤血球造血と顆粒球系白血球造血とは同じ肝臓内ではあっても別個の造血環境のもとで血球生成がおこなわれている。赤血球系の造血では中心マクロファージが鉄を含む栄養源を周囲の赤芽球に供給するといわれる⁵⁾。脾臓や骨髄などの造血組織の支持細胞とくに線維芽細胞は顆粒球生成に関与し⁶⁾、GM-CSF、G-CSF および各種のインターロイキンを産成することが知られている⁷⁾。肝臓顆粒球系造血細胞の被膜下ならびに小葉間結合組織への集積は、線維芽細胞における顆粒球形成を促進するサイトカインの産生と関連すると考えるのが妥当であろう。胎生期にBFU-Eなどの赤血球系の造血細胞やCFU-GMなど好中球系の造血細胞は、それぞれ造血環境形成の中心となるマクロファージや線維芽細胞の周辺へと集積し、肝臓が生後早期に急速に肝臓小葉構造を発達させるのに伴い、胎生期には混在していた造血巣が明瞭に分離するようになると思われる。

肝臓造血の終末期において、赤血球系・顆粒球系の血液細胞の辿る運命も明らかに異なる。我々がすでに報告したように、赤血球生成の基本的な単位である赤芽球島はマウスで胎生14日に肝細胞索内に形成され、島は肝臓造血の終末期まで肝臓内に存在する⁴⁾。出生直後の肝臓では、赤芽球は中心マクロファージが細胞表面に形成する細胞窩から離脱することによってその島構造を解体し、この島の消失により肝臓の赤

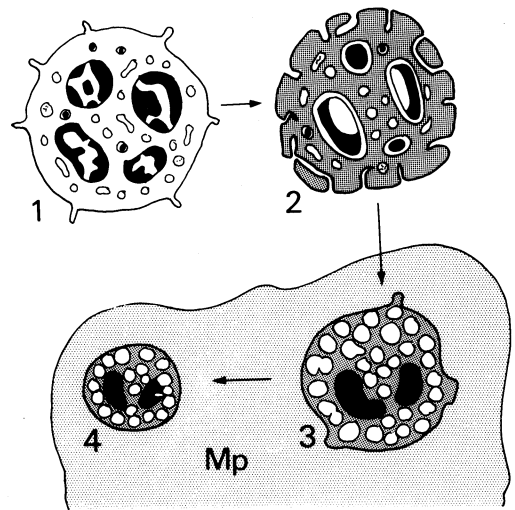


Fig. 6. Schematic summary of mature neutrophil death and its digestion process.

1. A mature neutrophil
2. An apoptotic neutrophil and fragmentation of its peripheral cytoplasm.
- 3 & 4. Apoptotic neutrophils phagocytized by a macrophage (Mp). Digestion of the engulfed neutrophil ensues in macrophage phagolysosomes.

血球生成が終熄する。それに対し、肝臓で生成され結合組織内に集合する好中球は、成績で述べたように結合組織中で細胞死に陥りマクロファージによって取り除かれる。

細胞死に関して、壊死とアポトーシスの2つの形態が存在することが広く知られている^{8)~10)}。病理的な条件下に見られる細胞死の経過である壊死は、核染色質の不規則な凝集、細胞質・細胞小器官の膨化、細胞膜、核膜および細胞小器官膜の破綻を特徴とする。一方、生理的な条件下でみられる細胞死であるアポトーシスは、細胞の小型化と核染色質の圧縮凝集、細胞質の断片化が特徴で、変性細胞は食細胞に取り込まれ消化分解される。炎症にともなう局所に多数出現する好中球はアポトーシスに陥り、細胞内容を周囲の組織に拡散することなく、マクロファージが除去処分するといわれる^{11), 12)}。肝臓造血終末期に肝臓内に残存する好中球は、Figure 6に示したようにアポトーシスの過程で細胞死にいたり、マクロファージにとりこまれる。

個体発生の過程で生ずるプログラム細胞死の多くは、アポトーシスの過程を経ると言われている^{13), 14)}。終生の造血器官である骨髄は、マウスにおいては胎生の後期から出生直後にかけて造血を開始する。我々がすでに報告したように、多数の好中球がマウス出生直後の骨髄腔に集合し¹⁵⁾、集合した好中球は骨髄腔内で細胞死にいたり、マクロファージにとりこまれる^{16), 17)}。マウス骨髄におけるかかる好中球細胞死を今回の肝臓での観察と関連させて考えると、骨髄造血以前の胎生期髄外造血組織で生成された好中球が、この時期に全身レベルで広範囲に細胞死にいたり、マクロファージによって処分され、肝臓好中球に替わって骨髄で生成される好中球が循環好中球の主流になると考えられる。胎生期に髄

外で生成された好中球から骨髄性好中球への切り替えに関連して、循環系に入らず生後早期の肝臓内に残存する好中球は、肝臓における顆粒球系幹細胞もふくめて、プログラムされた自殺メカニズムのもとに細胞死にいたり、肝臓での顆粒球生成が終熄すると考えた。

謝 辞

川崎医科大学組織電子顕微鏡センターの上平賢三氏と須田泰司氏の技術援助に心から感謝する。本研究の一部は文部省科学研究費 (No. 07670043, 1995) ならびに川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 5-801, 1993; No. 6-804, 1994) の援助で行った。

文 献

- 1) Tavassoli M : Embryonic and fetal hemopoiesis : an overview. *Blood cells* 17 : 269—281, 1991
- 2) Enzan H, Takahashi H, Kawakami M, Yamashita S, Ohkita T : Light and electron microscopic observations on hepatic hematopoiesis of human fetus. (I) Granulocytopoiesis in the hepatic mesenchymal tissue. *Acta Pathol Jap* 28 : 411—426, 1978
- 3) Matsumura G, Sasaki K : Megakaryocytes in the yolk sac, liver and bone marrow of the mouse : a cytometrical analysis by semithin light microscopy. *J Anat* 167 : 181—187, 1989
- 4) 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 : a semithin light and electron-microscopic study. *Acta Anat* 147 : 75—82, 1993
- 5) Marton PF : Ultrastructural study of erythrophagocytosis in the rat bone marrow. II. Iron metabolism in reticulum cells following red cell digestion. *Scand J Haematol Suppl.* 23 : 27—48, 1975
- 6) Ploemacher RE, Piersma AH, Brockbank KGM : The nature and function of granulopoietic microenvironments. *Blood Cells* 10 : 341—367, 1984
- 7) Abboud CN, Liesveld JL, Lichtman MA : The architecture of marrow and its role in hematopoietic cell lodgment. *In* The hematopoietic microenvironment. The functional and structural basis of blood development. ed by Long MW and Wicha MS, Baltimore, John Hopkins Univ Press, pp 2—20, 1993
- 8) Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR : Cell death : The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251—306, 1980
- 9) Walker NI, Harmon BV, Gobé GC, Kerr JFR : Patterns of cell death. *Meth Achiev Exp Pathol* 13 : 18—54, 1988
- 10) Arends MJ, Wyllie AH : Apoptosis : Mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32 : 223—254, 1991
- 11) Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C : Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. *J Clin Invest* 83 : 865—875, 1989

- 12) 本間隆義, 浜崎多美子: 好中球とアポトーシス. 川崎医学会誌20補: 49—57, 1994
- 13) Lockshin RA, Zakeri Z: Programmed cell death and apoptosis. *In* Current Communications in Cell & Molecular Biology. 3. Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death. ed by Tomei LD and Cope FO, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 47—60.
- 14) Hurle JM: Cell death in developing systems. *Meth Achiev Exp Pathol* 13: 55—86, 1988.
- 15) Sasaki K, Matsumura G, Ito T: Light and electron microscopy of bone marrow hemopoiesis in late embryonal and early postnatal mice: a qualitative and quantitative study. *Arch Histol Jap* 47: 239—250, 1984
- 16) 佐々木和信, 岩月宏彦, 須田満寿美, 板野ちか子: マウス骨髄造血の発生と好中球の細胞死: HPMA 切片による光顕ならびに電子顕微鏡観察 (抄録). *解剖誌* 66: 68, 1993
- 17) Sasaki K, Iwatsuki H, Suda M, Itano C: Accumulation and massive cell death of polymorphonuclear neutrophils in the developing bone marrow of the mouse: a histological study. *Acta Anat.* 153: 111—118, 1995