

クリプトコックスによる実験的肝肉芽腫における フィブロネクチンの局在について

金子 健彦
信州大学医学部第2病理学教室
(指導: 発地 雅夫教授)

On the Localization of Fibronectin in Experimental Hepatic Granulomas Induced by *Cryptococcus neoformans*

Takehiko KANEKO

Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Masao HORCHI)

In order to investigate the role of fibronectin (FN) in granulomatous inflammation, the electron microscopic immunoperoxidase method for FN was performed using hepatic granulomas of rats induced by *Cryptococcus neoformans* and stimulated peritoneal macrophages.

In the hepatic granulomas, macrophages engulfing the fungus cells were closely packed together with interdigitation. FN was detected multifocally on the attached surfaces of macrophages. On the surfaces of a few cultured peritoneal macrophages which were attached to each other, FN was also revealed at the adhesion sites.

It was concluded that FN might play an important role in the mutual close attachment of macrophages, especially in such granulomas as those occurring in cryptococcal infection. *Shinshu Med. J.*, 37: 49-61, 1989

(Received for publication September 13, 1988)

Key words: *Cryptococcus neoformans*, granulomatous lesion, macrophage, fibronectin, electron microscopic immunoperoxidase method

肉芽腫性病変, マクロファージ, フィブロネクチン, 電顕酵素抗体法

I 緒 言

Cryptococcus neoformans は、自然界に広く分布する酵母状真菌で¹⁾²⁾、疫学的には腐生菌としてハトの排泄物中に多く含まれ、重要な感染源をなすことで知られている³⁾⁴⁾。本菌は、宿主の感染防御能がよく保たれた状態では、全身性感染を引き起こすことはまれである⁵⁾⁶⁾。しかし、宿主の免疫能が低下したいわゆる compromised host では、時として血行性に全

身播種をおこす⁷⁾⁸⁾。本菌による感染巣の組織病変は多彩であるが、異物反応に近い肉芽腫性病変や嚢胞様病変が主体である³⁾⁹⁾。

近年、この組織病変の発生機序に関する研究が盛んに行われている¹⁰⁾⁻¹²⁾。また、肉芽腫性病変において、細胞の接着を促進するフィブロネクチン (FN) の重要性が報告されている¹³⁾⁻¹⁷⁾。しかしクリプトコックス症の病変における FN の検討は、いまだなされていない。そこで著者は実験的に作成したラットのクリプト

コックス肝肉芽腫における構成細胞の相互接着面に注目し、FNの局在を電顕酵素抗体法を用いて明らかにし、構成細胞が接着する際のFNの重要性について考察を試みた。さらに、ラットの腹腔より採取したマクロファージ(M ϕ)についても同様に相互接着面におけるFNの局在を検討した。

II 材料と方法

A 材料

1 実験動物

10~11週齢のWistar系雄ラット(n=6, 静岡県実験動物農業協同組合)を使用した。実験中は室温22~23°C, 湿度50~60%で飼育し、配合飼料MM-2(船橋農場)と水道水を自由に摂取させた。

2 使用菌株と菌浮遊液の作製

山梨医科大学微生物学教室の継代株 *Cryptococcus neoformans* MCY-2002株を使用した。この株の血清型はA型であり、厚い莢膜を有する¹⁸⁾、すでに報告されたこの菌株の静注実験では肝臓、脾臓、肺に肉芽腫性病変を形成し、腎、脳に嚢胞様病変を形成する。また肝臓の肉芽腫の個数は接種後1~2週後に最大となる¹⁹⁾。

前記菌株をSabouraud寒天培地に於て、30°C約7日間培養し、集落が十分に形成されたところで、滅菌生理食塩水を用いて、10⁸/mlの菌浮遊液を作成した。

B 実験方法

1 肝肉芽腫の作製と検索

菌浮遊液0.5mlをラット(n=3)の尾静脈より注入し、2週間後に屠殺した。エーテル麻酔下に開腹し、肝臓をperiodate-lysine-paraformaldehyde(PLP)²⁰⁾固定液で灌流したのち切除して一部を電顕酵素抗体法の材料とした。他の一部は4% 磷酸緩衝パラホルムアルデヒド液で固定し、通常の方法によりパラフィン切片を作製してhematoxylin-eosin(H.E.)およびmucicarmine染色を行った。

2 腹腔M ϕ の採取と検索

ラット(n=3)の腹腔よりM ϕ を採取し、相互接着面におけるFNの局在を、*in vivo*と同様に検索した。その際クリプトコックスの菌体でM ϕ を刺激するA群と刺激しないB群の2つを設けた。

すなわち、未処置ラットの腹腔内に10%プロテオース・ペプトン(大五栄養化学)水溶液10mlを注入し、3日後脱血したのち、4°Cのハンクス液(阪大微研)30mlを腹腔内に注入した。振盪後再び腹腔内の液を回収して細胞を採取した。ハンクス液にて2回洗浄し

たのち、1%トリパンブルー生食水による色素試験で生きた細胞数を血球計算盤を用いて数え、EagleのMEMに10%ウシ胎児血清(Flow Laboratories, USA)を加えた培養液にて最終濃度を10⁷/mlに調整した。Tissue culture chamber/slides, No.4804(LAB-TEK, Miles)に滴下し、位相差顕微鏡(Nikon, DIAPHOT TMD型, ELWD)で観察した。このうちの一部にalpha-naphthyl butyrateを基質とした非特異的エステラーゼ染色²¹⁾を施行した。対照として基質を除いて同様に染色したものをを用いた。A群では、培養液中に前記*in vivo*の実験と同様に調整したクリプトコックスの菌浮遊液を2滴ずつ滴下した。これらのchamber/slidesを庫内温度37°C, CO₂濃度5%のインキュベーター(TABAI, LNA-111)内に24時間静置した²²⁾⁻²⁴⁾。こののちハンクス液で洗浄し、一部を電顕酵素抗体法の材料として使用した。残りを磷酸緩衝2.5%グルタルアルデヒド溶液で4°C1時間前固定し、磷酸緩衝2%四酸化オスミウム溶液で4°C2時間、後固定を行ったのち上昇エタノール系列で脱水し、Quetol-812(日新EM)に包埋したのち、60°Cで24時間重合した。ライヘルトOm-U3型超ミクロトームで、ダイヤモンドナイフ(DIATOME, Switzerland)を使用し、干渉色シルバー・ゴールドの厚さに切られた超薄切片を作製後、1%酢酸ウラニール水溶液とクエン酸鉛で二重染色し、日立HS-9型透過型電子顕微鏡で観察した。

C 電顕酵素抗体法

1 使用抗体

1次抗体としてウサギ抗ヒトFNのF(ab')₂分画(Cappel Lab.)を使用し、2次抗体としてhorseradish peroxidase(HRP)を標識したヤギ抗ウサギIgGのF(ab')₂分画(Cappel Lab.)を使用した。

抗体は、すべて1%ウシ血清アルブミン(Sigma, USA)添加PBSで希釈した。対照は1次抗血清に代えて正常ウサギIgGのF(ab')₂分画を用いた。FNは多くの哺乳類の間でcross-reactivityをもっていることが知られており²⁵⁾、抗ヒトFN抗体はラットを含むいくつかの哺乳類のFNとcross-reactivityをもつことが報告されている²⁵⁾。今回使用したヒトのFNに対する1次抗体については、SDS-PAGE²⁶⁾とelectrophoretic transfer²⁷⁾の手法を用いてWestern blot法によりラットのFNに対してcross-reactivityを検定し確認した(Fig. 1)。

2 肝肉芽腫の検索

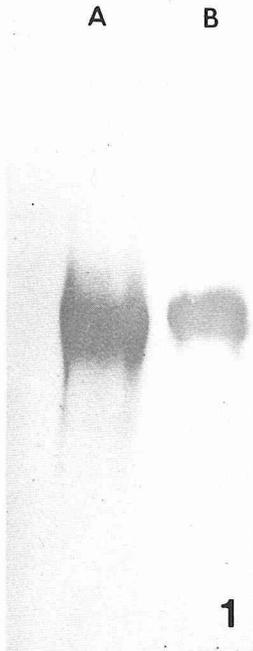


Fig. 1 Immunoblot analysis of human fibronectin and rat plasma. Human fibronectin (lane A) and rat plasma (lane B) were separated by SDS-PAGE (6.0% gel), then transferred electrophoretically to a nitrocellulose sheet and stained with anti-human fibronectin antibody followed by peroxidase conjugated anti-rabbit IgG antibody.

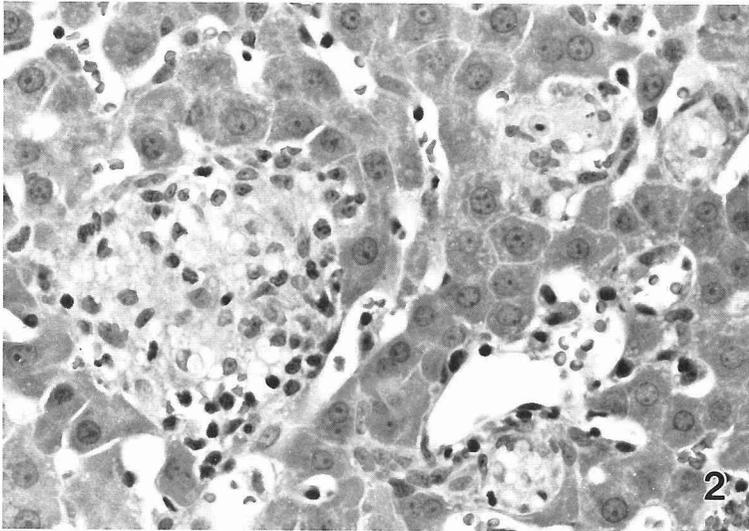
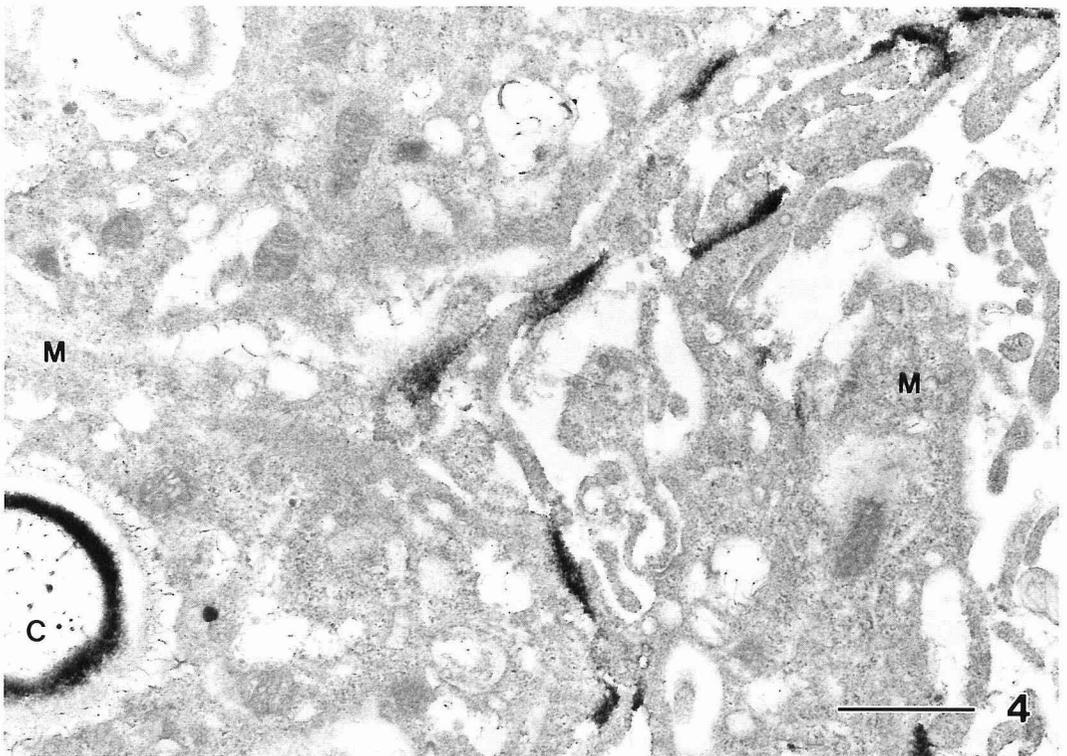
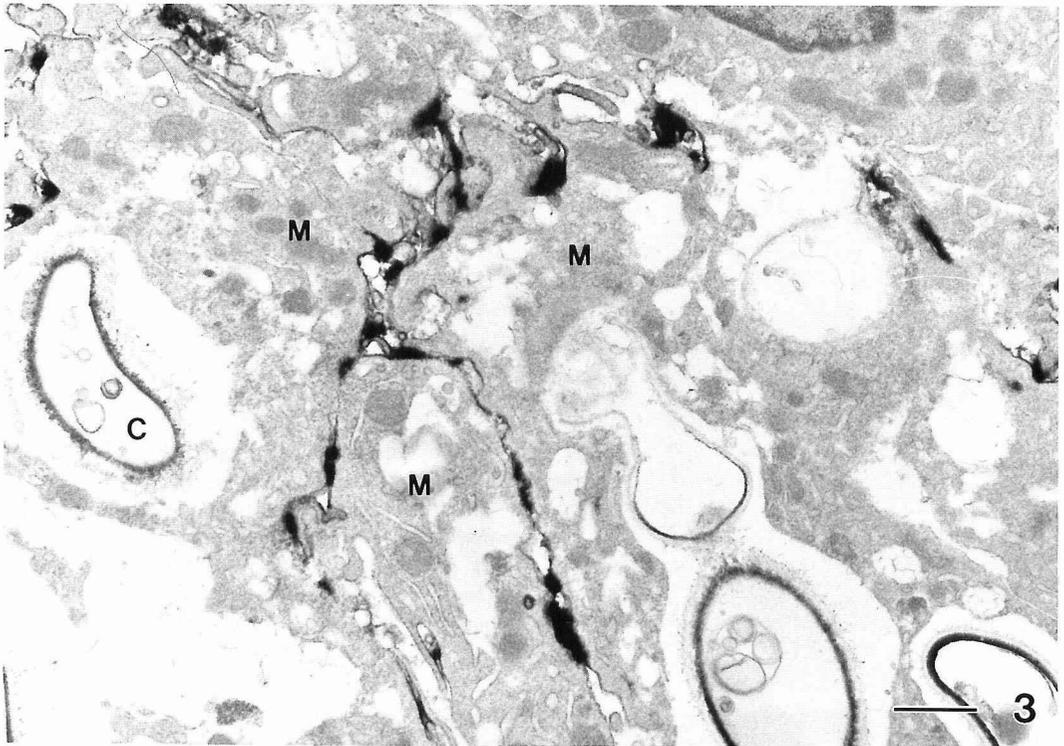


Fig. 2 Light photomicrograph of hepatic granulomas composed of macrophages engulfing fungus cells, 14 days after inoculation of *C. neoformans*. H. E., $\times 100$

細切した肝組織を PLP 固定液にて12時間固定したのち、10%サッカロース添加 PBS、15%サッカロース添加 PBS および20%サッカロース添加 PBS で順次4°C12時間ずつ洗浄した。さらに20%サッカロースと5%グリセリン添加 PBS に4°Cで1時間浸透した

のち、OCT コンパウンド (Lab-Tek, Miles) に包埋し、ドライアイス-アセトン中で凍結した。Cryostat (American Optical) を用いて厚さ $6\mu\text{m}$ の切片を製作し、ネオプレン塗布スライドガラスに貼付したのち、室温で30分間乾燥した。10% サッカロース 添加 PBS



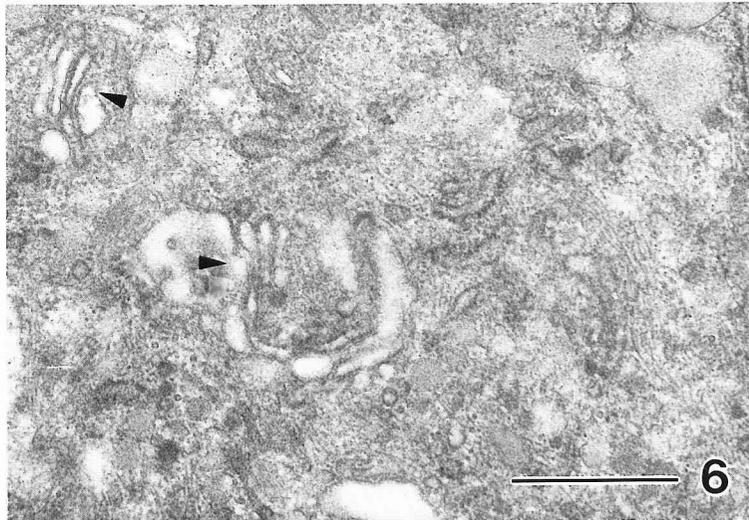
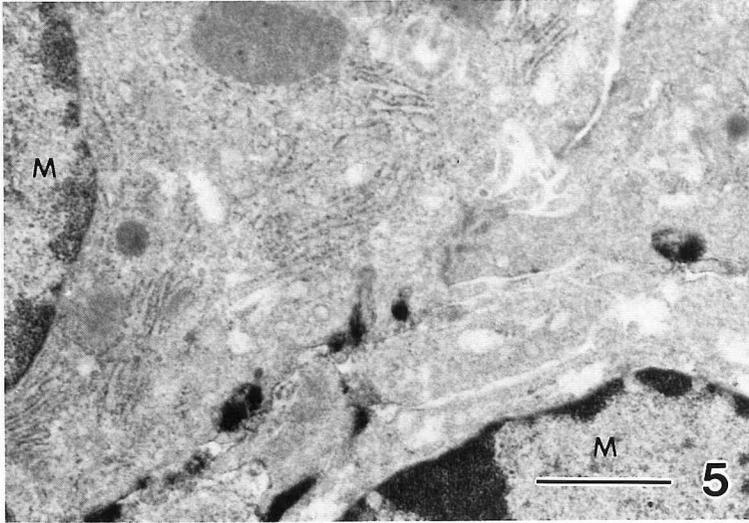


Fig. 3 Electron photomicrograph of immunoperoxidase staining for FN of hepatic granulomas 14 days after inoculation. Positive stain of FN is observed multifocally on the surface of aggregated macrophages (M). Macrophages phagocytose yeast cells (C). $\times 11,000$ bar : $1\mu\text{m}$

Fig. 4 Electron photomicrograph of immunoperoxidase staining for FN of hepatic granulomas 14 days after inoculation. Positive stain of FN is multifocally observed. Macrophages (M) phagocytosing yeast cells (C) are aggregated with interdigitation. $\times 18,000$ bar : $1\mu\text{m}$

Fig. 5 Electron photomicrograph of immunoperoxidase staining for FN of hepatic granulomas 14 days after inoculation. Positive stain of FN is multifocally observed on the surface of macrophages (M). No positive stain of FN is observed at endoplasmic reticulum. $\times 18,000$ bar : $1\mu\text{m}$

Fig. 6 Electron photomicrograph of immunoperoxidase staining for FN of hepatic granulomas 14 days after inoculation. No positive stain of FN is observed at Golgi's apparatus of macrophage (arrow head). $\times 22,000$ bar : $1\mu\text{m}$

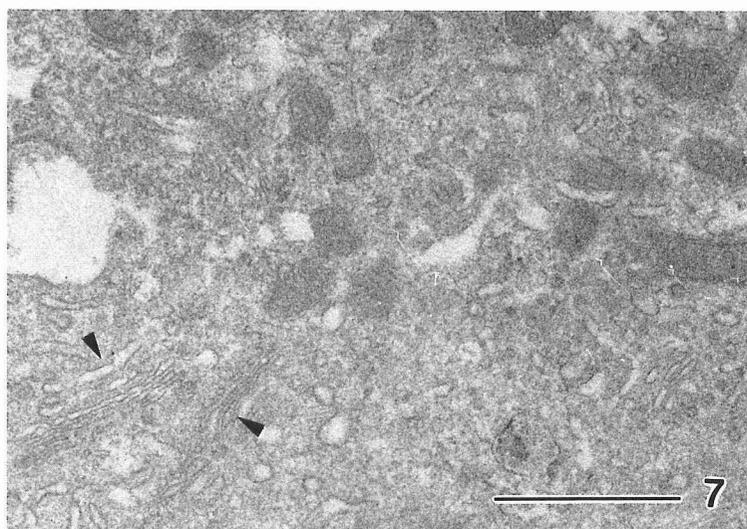


Fig. 7 Electron photomicrograph of immunoperoxidase staining for FN of hepatic granulomas 14 days after inoculation. No positive stain of FN is observed at Golgi's apparatus of hepatic cell (arrow head). $\times 24,000$ bar : $1\mu\text{m}$

で、 4°C 5分間ずつ3回洗浄したのち、室温で10%非感作ヤギ血清と10分間反応させた。次いで一次抗体を 4°C 湿室中で12時間反応させたのち、10%サッカロース添加 PBS で約12時間洗浄し、2次抗体を 4°C 湿室中で12時間反応させた。10%サッカロース添加 PBS で10分間ずつ3回洗浄したのち、1%グルタルアルデヒド PBS 溶液で 4°C 10分間固定した。洗浄後、20mg の3,3'-diaminobenzidine (DAB, free base, Sigma 社) を 1ml の ethyleneglycol monomethylether (EGMME, 半井) に溶解したものをトリス塩酸緩衝液 100ml に加えた incomplete Graham-Karnovsky's solution に、endogenous peroxidase による反応を阻止する目的で 65mg アジ化ナトリウム (Sigma) を添加した中で 30分間浸透させたのち、30%過酸化水素水 10 μl を加えた complete Graham-Karnovsky's solution 中で10分間発色させた。磷酸緩衝 2%四酸化オスミウム溶液で室温で2時間固定したものを、上昇エタノール系列で脱水後、切片上に Qet-ol-812 を満たしたゼラチンカプセルを倒立させ包埋し、 60°C で24時間重合した。次にガスバーナーで加熱してブロックをスライドガラスより剥がした。これより超薄切片を作製し、1%酢酸ウラニール水溶液とクエン酸鉛で染色したのち、日立 HS-9 型透過型電子顕微鏡で、電子染色を施さない切片と比較観察した²⁸⁾。

3 腹腔 M ϕ の検索

Tissue culture chamber/slides 上の培養細胞を PLP 固定液にて12時間固定したのち、10% サッカロース添加 PBS で洗浄した。その後、*in vivo* の実験と同様に抗体と反応させて超薄切片を作製した。クエン酸鉛で染色したのち、電子染色を施さない切片と比較観察した。

III 結 果

A 肝肉芽腫の検索結果

1 光学顕微鏡的所見

生菌接種2週間後のラットの肝内には、肉芽腫が散在性に認められた (Fig. 2)。Mucicarmine 染色では、肉芽腫内に多数の菌要素が観察された。

2 電子顕微鏡的所見

肉芽腫の構成細胞はクリプトコックスの菌体をしばしば貪食しており (Fig. 3, 4)、細胞質には糸粒体 (Fig. 3, 4, 5) のほか、小胞体 (Fig. 5) が認められた。

大部分の構成細胞には、相互に pseudopods を絡ませた interdigitation を介する接着 (Fig. 3, 4) を認めたが、一部は構成細胞相互が interdigitation を介さずに細胞全周にわたり密着していた。肉芽腫周囲には、糸粒体が豊富な肝細胞がみられた。

3 電顕酵素抗体法の所見

クリプトコックス肝肉芽腫における FN の局在

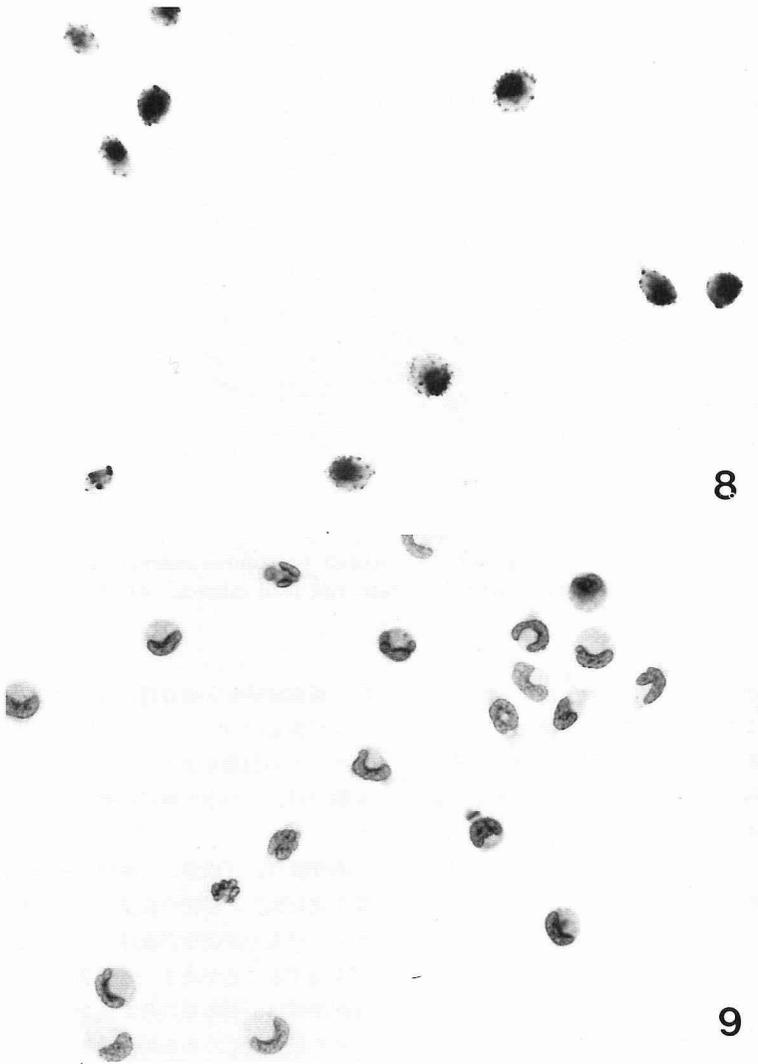


Fig. 8 Light photomicrograph of non-specific esterase staining of peritoneal cells. Granular reaction products are diffusely observed in the cytoplasm. $\times 100$

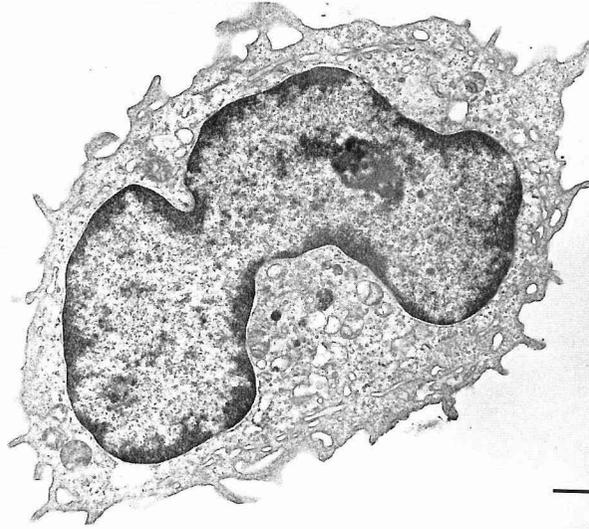
Fig. 9 Light photomicrograph of non-specific esterase staining of peritoneal cells without substrate of alpha-naphthyl butyrate. No positive reaction can be seen. $\times 100$

肉芽腫構成細胞相互の接着面において、 $M\phi$ の表面に部分的に、FN の陽性像が得られた。陽性像は接着面でスポット状に認められた。また、相互接着面の細胞膜両方に陽性像がまたがる部分と、細胞膜の片方に認められるものの2種があった。貪食したクリプトコックスの莢膜に接した細胞質には陽性像を認めなかった (Fig. 3, 4)。

肉芽腫構成細胞の細胞質内の粗面小胞体 (Fig. 5) と Golgi 装置 (Fig. 6) に FN の陽性像を認めなかった。

同時に観察された肉芽腫周囲の肝細胞では、細胞表面に FN の陽性像を認めたが、細胞質中の小胞体や Golgi 装置 (Fig. 7) に FN の陽性像を認めなかった。

B 腹腔 $M\phi$ の検索



— 10

Fig. 10 Electron photomicrograph of cultured peritoneal macrophage with pseudopods stained with uranyl acetate and lead citrate. $\times 6,200$
bar : $1\mu\text{m}$

1 光学顕微鏡的所見

採取された細胞は合計 4.05×10^7 個であった。トリパンブルー色素試験による生きた細胞の比率は、無作為に抽出した4視野平均で85.8%であった。位相差顕微鏡では、Tissue culture chamber/slides に付着した $M\phi$ が観察された。非特異的エステラーゼ染色では、 $M\phi$ の細胞質内の酵素活性部位に濃褐色、びまん性、顆粒状に陽性像が認められた(Fig. 8)。対照には、陽性像を認めなかった (Fig. 9)。

2 電子顕微鏡的所見

採取された細胞は概ね円形もしくは楕円形であった。核は馬蹄形のものも多く、核表面にいくつかの陥凹も認められた。また細胞質に小胞体と糸粒体を認めた (Fig. 10)。また細胞表面には多くの pseudopods が存在した。

3 電顕酵素抗体法の所見

A群B群ともに、大部分の $M\phi$ の相互接着面は、interdigitation を介さないもので、FN の陽性像は認められなかった (Fig. 11, 12)。しかし、細胞表面の一部を相互に密着させた部分のいくつかには、FN の陽性像が認められた (Fig. 13)。

IV 考 察

ヒトのクリプトコックス症における組織反応は症例によって異なり、また臓器によっても多彩であるが³⁾

9)、嚢胞様病変と肉芽腫性病変の2つが基本的なパターンである¹⁾²⁾³⁾。これまで報告された動物実験でも、この2つの組織反応が主体となっている¹⁰⁾²⁹⁾³⁰⁾。本実験では、その中で特に肝臓の肉芽腫性病変を検討した。

肉芽腫は、「成熟した単核食細胞 ($M\phi$ やあるいは類上皮細胞) の緻密な組織化された集団であり、壊死あるいは他の炎症性白血球の浸潤のような付随的な所見を有することがある。」と定義されている³¹⁾³²⁾。つまり肉芽腫は、ある種の起炎体を排除もしくは処理するための炎症反応である³²⁾。今回の実験では、構成細胞が互いに強く接着した小集団で、クリプトコックス菌体を貪食もしくは包囲した細胞応答であり、Adamsの言う³¹⁾成熟型肉芽腫である。

肝肉芽腫の構成細胞の同定について最近 Baba¹⁹⁾は本実験と同じ条件で作製したラットの肝肉芽腫を用い、細胞質内の内因性ペルオキシダーゼの局在により構成細胞の同定を試みた。その結果、肝肉芽腫の構成細胞は、浸出性 $M\phi$ が10.3%、内因性ペルオキシダーゼ陰性の $M\phi$ が27.3%、クッパー細胞が52.9%その他の炎症性細胞が9.5%であった。したがって、本実験で観察した肉芽腫の構成細胞も、このような構成からなっているものと考えられる。

近年、 Manson 住血吸虫感染症¹³⁾⁻¹⁵⁾、サルコイド症¹⁶⁾およびカラギーナンやグルカンによる実験的肉芽

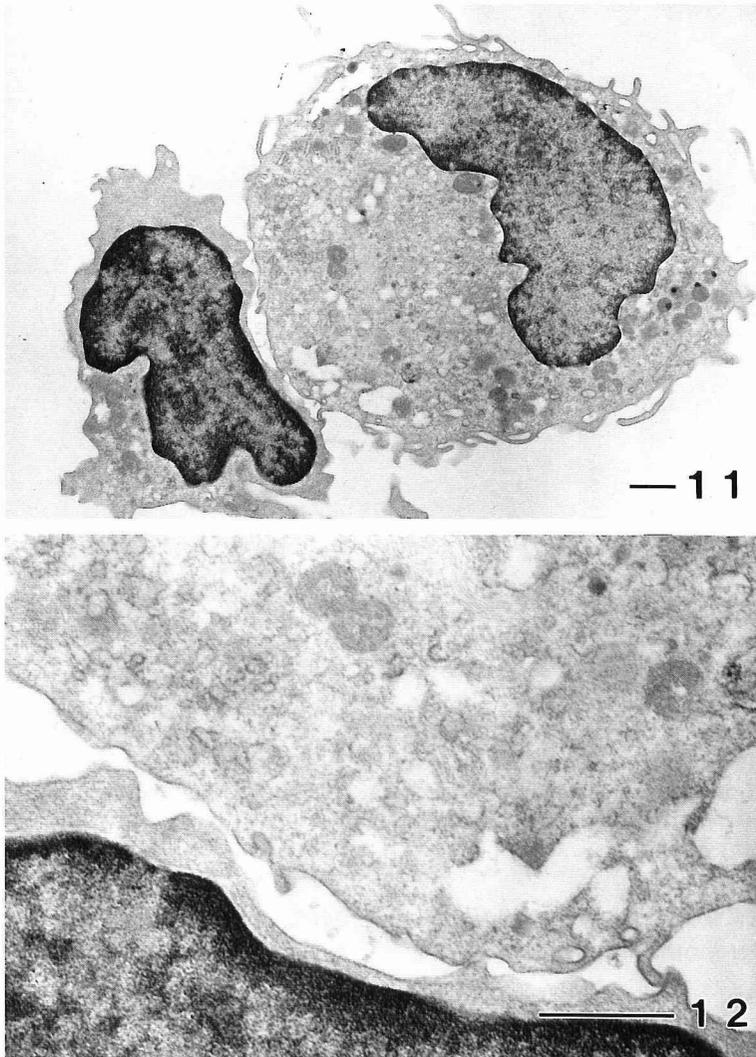


Fig. 11 Electron photomicrograph of immunoperoxidase staining for FN of peritoneal macrophages. No positive stain of FN is observed (Group A), $\times 5,900$ bar : $1\mu\text{m}$

Fig. 12 High magnification of Fig. 10. $\times 18,000$ bar : $1\mu\text{m}$

腫性病変¹⁷⁾などで FN の重要性が報告されている。いずれも、組織化学的手法を用いて FN の局在を検索している。Nishimura ら³³⁾はマンソン住血吸虫感染症の虫卵を中心とした類上皮型肝肉芽腫において、FN が虫卵の周囲と周囲の肉芽腫部分に存在することを、蛍光抗体法によって確認した。Nishimura らはこの FN が肉芽腫の構成細胞である M ϕ によって産生された可能性を推測している。カラギーナンやグル

カンによって作成した肉芽腫について、本実験と同様の方法で検索した Nakamura と Hotchi の報告¹⁷⁾では、肉芽腫の構成 M ϕ の表面に FN の部分的陽性像を認めたが、本実験と同様、細胞質内には FN の陽性像を認めなかったことから、FN が血漿由来である可能性を考えた。

西村³⁴⁾は、サルコイド症患者血漿の FN 値は正常範囲内にあるが、治療によって症状や検査所見が改善さ

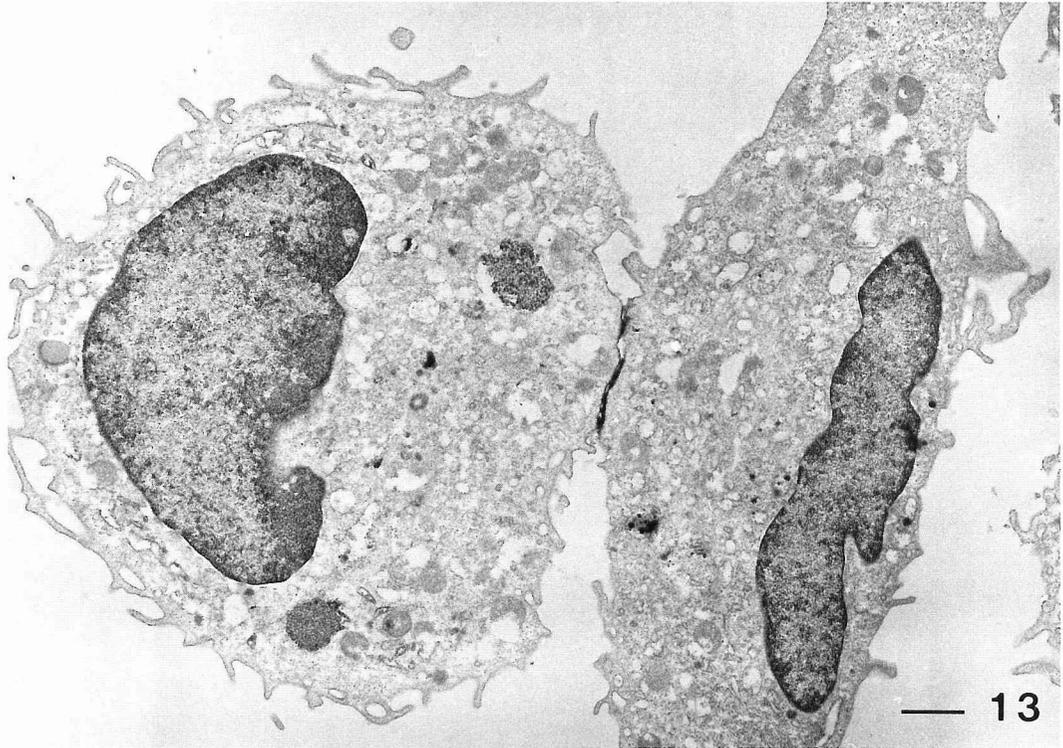


Fig. 13 Electron photomicrograph of immunoperoxidase staining for FN of peritoneal macrophages. Positive stain of FN is observed on the surface of macrophages at the attachment site (Group A). $\times 7,100$
bar : $1\mu\text{m}$

れると FN 値が低値を示すことを報告しており、肉芽腫性炎症と血漿 FN との間に何らかの関係があることを示唆している。また Deno ら³⁵⁾は、血漿中の FN が組織中へ移行することを報告しており、肉芽腫性病変においても血漿中から肉芽腫の構成細胞へ FN が移行した可能性を示唆していると考えられた。

本実験の肝肉芽腫では、接着部の $M\phi$ 表面において部分的に FN の陽性像が得られ、Nakamura と Hotchi の報告¹⁷⁾と一致した。またその陽性像は肉芽腫を構成するいずれの $M\phi$ にも観察され、特定の $M\phi$ に限られているということにはなかった。この結果は、FN がクリプトコックス肉芽腫においても、その構成細胞相互の接着に重要な役割を果たしていることを示唆している。

非特異的エステラーゼ染色の陽性像は、得られた腹腔細胞が単球系であることを示唆している。電子顕微鏡的観察の結果、概ね馬蹄形の核をもつ円形もしくは楕円形の細胞の表面には多数の pseudopods が観察

された。この所見は、いずれも $M\phi$ の形態学的特徴³⁶⁾と合致するものである。これらの $M\phi$ は、プロテオース・ペプトンの腹腔内投与によって得られた炎症性の $M\phi$ であり、未熟な $M\phi$ と考えられるが、 $M\phi$ のもつ機能、活性、特性は充分保たれているとされている²³⁾。

電顕酵素抗体法の結果、一部の腹腔 $M\phi$ の相互接着面に FN の陽性像を認めた。この事実は FN が腹腔 $M\phi$ 相互の接着時にも重要な役割を果たしていることを示唆するものと考えられる。しかしながら多くの腹腔 $M\phi$ の相互接着面には、FN の陽性像を認めなかった。腹腔 $M\phi$ の相互接着は肝肉芽腫構成細胞と異なり、細胞の表面全体にわたるものではなく、また inter-digitation を介するものでもない。つまり、肉芽腫のような $M\phi$ の特殊な集合体を形成するのではなく、いわば偶然の接着に過ぎない。したがって、それだけ FN の関与も乏しいことが考えられる。これに対して、肝肉芽腫構成細胞の相互接着は、細胞の表面全体にお

よび、しばしば interdigitation を介する強いものである。このような、クリプトコックスを処理するために集まった Mφ 相互の強い接着のために、FN がより有効な作用をしているものと考えられる。

FN は細胞質の Golgi 装置と小胞体に局在すると報告されている³⁷⁾³⁸⁾。本実験では FN の陽性像は、接着面の Mφ の表面だけに局在しており Golgi 装置と小胞体には認められなかった。したがって本実験では、肝内の肉芽腫については血液中に存在する FN が使われ、培地上では培養液のウシ胎児血清中に存在する FN が使われた可能性が考えられる。Clement³⁸⁾によれば FN は肝細胞において細胞質内の Golgi 装置と小胞体に局在すると報告されている。しかしながら今回の実験では、肉芽腫周囲の肝細胞の Golgi 装置や小胞体にも FN の陽性像が得られなかった。ゆえに Mφ は FN を産生したが、微量である、あるいは細胞質内では抗体による認識が困難な構造をとっている等、なんらかの理由により細胞質内に FN の陽性像が得られなかった可能性も否定できない。

V 結 語

Cryptococcus neoformans の静注によって作成したラットの肝肉芽腫について FN の関与を検討するため、肉芽腫構成細胞と、別に腹腔より採取した Mφ を材料とし、FN の局在を電顕酵素抗体法を用いて検索し以下の結果を得た。

1 肝肉芽腫の構成細胞の相互接着面に一致して FN の陽性像が得られた。

2 一部の培養ラット腹腔 Mφ の相互接着部分にも、FN の陽性像を認めた。

以上の結果より、Mφ がクリプトコックス感染巣において肉芽腫の様な強固な相互接着を必要とする場合には、FN が重要かつ不可欠な役割を果たしているものと考えた。

本論文の一部を、第76回日本病理学会総会(1987年3月、東京)、第31回日本医真菌学会総会(1987年11月、東京)、第77回日本病理学会総会(1988年5月、札幌)および第10回国際医真菌学会(1988年6月、バルセロナ、スペイン)において発表した。

稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導御校閲を賜りました恩師発地雅夫教授に深甚なる謝意を表します。同時に本研究に際し、直接御指導御助力下さいました中村智次先生、馬場健先生、佐野健司先生をはじめとする病理学教室諸兄に深く感謝致します。また使用抗体の検定に際して御助力をいただきました脂質生化学教室岡野照先生に、心から感謝の意を表します。さらに、標本作製に御協力いただいた丸山教子氏、当教室羽山正義技官、滝沢淳子技官、今井文衛技術補、香山哲子技術補、総合研究室市川良治技官、亀谷清和技官および丸子中央総合病院病理検査室宮澤富士江、高田礼子、山浦恵子の諸氏に厚く御礼申し上げます。また原稿の準備に御協力いただいた当教室市川寿恵氏に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Salfelder, K. : Cryptococcosis. In : Baker, R.D. (ed.), The pathologic anatomy of mycoses. Dritter Band, Fuenfter Teil, pp.383-464, Springer-Verlag, Berlin, 1971
- 2) Kwon-Chung, K. J. : Cryptococcosis. In : Emmons, C.W., Binford, C.H., Utz, J.P. and Kwon-Chung, K. J. (ed.), Medical mycology. 3rd ed., pp.206-229, Lea and Febiger, Philadelphia, 1977
- 3) Rippon, J.W. : Medical Mycology : The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2nd ed., pp.532-558, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1982
- 4) Emmons, C.W. : Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). Am J Hyg, 62 : 227-232, 1955
- 5) Houk, V.N. and Moser, K.M. : Pulmonary cryptococcosis must all receive amphotericin B?. Ann Intern Med, 63 : 583-596, 1965
- 6) Haugen, R.K. and Baker, R.D. : The pulmonary lesions in cryptococcosis with special reference to subpleural nodules. Am J Clin Pathol, 24 : 1381-1390, 1954
- 7) Zimmerman, L.E. and Rappaport, H. : Occurrence of cryptococcosis in patients with malignant disease of reticuloendothelial system. Am J Clin Pathol, 24 : 1050-1072, 1954

- 8) Kaplan, M.H., Rosen, P.P. and Armstrong, D. : Cryptococcosis in a cancer hospital. Clinical and pathological correlates in forty-six patients. *Cancer*, 39 : 2265-2274, 1977
- 9) 金子健彦, 加藤匡志, 崔 進, 阿部章彦, 発地雅夫 : 最近の剖検例からみた深在性真菌症とその組織病変について. *真菌誌*, 28 : 241-249, 1987
- 10) 伊藤 誠 : 気管内接種法によるマウスの実験的肺クリプトコックス症の病理組織学的研究. *信州医誌*, 34 : 586-604, 1986
- 11) Miyaji, M. and Nishimura, K. : Defensive role of granuloma against fungal infections. In : Arai, T. (ed.), *Filamentous microorganisms*, pp.263-277, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1985
- 12) 渋谷和俊, 浅地 聡, 直江史朗, 内田勝久, 山口英世 : マウスによるクリプトコックス症発症機序の解析に関する研究. *真菌誌*, 28 : 349-359, 1987
- 13) Aladnani, M.S. : Concomitant immunohistochemical localization of fibronectin and collagen in schistosome granulomata. *J Pathol*, 147 : 77-85, 1985
- 14) Grimaud, J.A., Boros, D.L., Takiya, C., Mathew, R.C. and Emonard, H. : Collagen isotypes, laminin, and fibronectin in granulomas of the liver and intestines of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Am J Trop Med Hyg*, 37 : 335-344, 1987
- 15) Parise, E.R., Summerfield, J.A., Hahn, E., Wiedmann, K.H. and Doenhoff, M.J. : Basement membrane proteins and type III procollagen in murine schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 79 : 663-670, 1985
- 16) Peyrol, S., Takiya, C., Cordier, J.F. and Grimaud, J.A. : Organization of the connective matrix of the sarcoid granuloma. Evolution and cell-matrix interactions. *Ann NY Acad Sci*, 465 : 268-285, 1986
- 17) Nakamura, T. and Hotchi, M. : Ultrastructural cytochemical studies on the cell coat of macrophages and the localization of fibronectin in granuloma formation. *Acta Pathol Jpn*, 37 : 1707-1718, 1987
- 18) Kagaya, K., Yamada, T., Miyakawa, Y., Fukazawa, Y. and Saito, S. : Characterization of pathogenic constituents of *Cryptococcus neoformans* strains. *Microbiol Immunol*, 29 : 517-532, 1985
- 19) Baba, T. : Electron microscopic cytochemical analysis of hepatic granuloma induced by *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 104 : 37-46, 1988
- 20) McLean, I.W. and Nakane, P.K. : Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 22 : 1077-1083, 1974
- 21) Yam, L.T., Li, C.Y. and Crosby, W.H. : Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol*, 55 : 283-290, 1971
- 22) 野本龜久雄 : マクロファージの分離. 右田俊介 (編), *免疫実験操作法A*, pp.463-464, 日本免疫学会, 金沢, 1975
- 23) 今井勝行 : マクロファージ単離法. *生体の科学*, 37 : 388-389, 1986
- 24) 権藤久司 : I. マクロファージの採取と同定法. 日本細菌学会教育委員会 (編), *細菌学技術叢書5*, マクロファージの機能と機能測定法, pp.56-60, 菜根出版, 東京, 1985
- 25) Kuusela, P., Ruoslahti, E. Engvall E. and Vaheri A. : Immunological interspecies cross-reactions of fibroblast surface antigen (fibronectin). *Immunochem*, 13 : 639-642, 1976
- 26) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685, 1970
- 27) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 : 4350-4354, 1979
- 28) 名倉 宏, 小松遼至 : 電顕酵素抗体法の染色手技～電子顕微鏡観察～. 渡辺慶一, 中根一穂 (編), *酵素抗体法*, 改訂版, pp.137-164, 学際企画, 東京, 1985

- 29) Watabe, T., Miyaji, M. and Nishimura K. : Studies on relationship between cysts and granulomas in murine cryptococcosis. *Mycopathologia*, 86 : 113-120, 1984
- 30) Nishimura, K. and Miyaji, M. : Histopathological studies on experimental cryptococcosis in nude mice. *Mycopathologia*, 68 : 145-153, 1979
- 31) Adams, D.O. : The biology of the granuloma. In : Ioachim, H.L. (ed.), *Pathology of Granulomas*, pp.1-20, Raven Press, New York, 1983
- 32) 発地雅夫 : 肉芽と肉芽腫. *リウマチ*, 25 : 47-55, 1985
- 33) Nishimura, M., Asahi, M., Hayashi, M., Takazono, I., Tanaka, Y., Kohda, H. and Urabe, H. : Extracellular matrix in hepatic granulomas of mice infected with *Schistosoma mansoni*. Qualitative and quantitative analysis. *Arch Pathol Lab Med*, 109 : 813-818, 1985
- 34) 西村正幸 : フィブロネクチンと肉芽腫性炎症. *最新医学*, 39 : 2021-2025, 1984
- 35) Deno, D.C., Saba, T.M. and Lewis, E.P. : Kinetics of endogenously labeled plasma fibronectin : incorporation into tissues. *Am J Physiol*, 245 : R564-R575, 1983
- 36) Rhodin, J. A. G. : *Histology. A Text and Atlas*, pp.156-158, Oxford University Press, New York, 1974
- 37) Yamada, S.S., Yamada, K.M. and Willingham, M.C. : Intracellular localization of fibronectin by immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 28 : 953-960, 1980
- 38) Clement, B., Rissel, M., Peyrol, S., Mazurier, Y., Grimaudo, J. A. and Guillouzo, A. : A procedure for light and electron microscopic intracellular immunolocalization of collagen and fibronectin in rat liver. *J Histochem Cytochem*, 33 : 407-414, 1985

(63. 9. 13 受稿)