

人体好中球顆粒の電顕的細胞化学

川 原 一 祐

信州大学医学部第一病理学教室 (主任: 河合博正教授)

Electron Microscopic Cytochemistry of Human Neutrophil Granules

Ichisuke KAWAHARA

Department of Pathology, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. H. KAWAI)

緒 言

好中球の電子顕微鏡による観察は最近さかんに行われて来ている。しかしこれら細胞にみられる顆粒については未だ不明のことが多い。特に人体好中球の顆粒に対する知見は, Rinehart (1955)¹⁾, Besiss (1956)²⁾, Watanabe (1957)³⁾, 市川 (1958)⁴⁾, Capone (1964)⁵⁾, Bainton (1966)⁷⁾ らにより報告されているが一致をみない。

本研究の目的は好中球顆粒の形態的变化を細胞化学的な方法を用いて電子顕微鏡的に観察し, 光顕的好中性顆粒, アズール顆粒, 特殊顆粒の成熟推移を検索した。

材料及び方法

材料は人体白血病患者47例(急性骨髄性白血病22例, 慢性骨髄性白血病5例, 他の白血病20例), 骨髄腫23例, 貧血16例, 其の他10例, 合計96例の人体骨髄を検索した。骨髄は胸骨及び腸骨から穿刺により採取した。各骨髄の一部は光顕観察のため塗沫標本を作成し, 他は電顕観察用とした。

(電子顕微鏡用のもの)

採取材料は1.25%グルタルアルデヒド, カロディレート緩衝液 pH 7.2, 又はセーレンセン磷酸緩衝液 pH 7.2, で4°C以下の前固定, 10分, 後細切し再び新鮮同固定液で10分固定, 緩衝液 pH 7.2 で3回, 計30分間から1晩洗浄, さらに細切して下記反応液に浸漬した。浸漬後再度上記緩衝液 pH 7.2 で洗浄し, オスミウム酸, 同緩衝液 pH 7.2 で1時間後固定をした。以後アルコール脱水, エポン包埋し, L. K. B. ultratome で薄切, クエン酸鉛, 酢酸ウラニールで電子染色, 又は無染色にて鏡検, 撮影した。電子顕微鏡は日立 (HU-11A型), 同 (HS-8型) を使用した。

使用した反応液

1) Peroxidase⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾

20% Alcohol 100 ml

3, 3-Diaminobenzidium tetrachloride 0.3 g
3.8% ZnSO₄·7H₂O 1 ml
NaC₂H₃O₂·3H₂O 1 g
3% H₂O₂ 0.7 ml
1N-NaOH 1.5 ml

2) Acid phosphatase
(以下 AcPase と記す)¹⁰⁾

0.1M tris maleate buffer (pH 5.0) 5 ml
D. W. 5 ml
1.25% β-glycerophosphate-Na 5 ml
0.1% Pb (NO₃)₂ 10 ml

3) Alkaline phosphatase
(以下 AlPase と記す)¹⁰⁾¹¹⁾

K. Na tartrate 2 g
Tris-HCl buffer (pH 7.6) 45 ml
0.04M Na₂-phenyl-phosphate 5 ml
2% MnCl₂ 1 ml
2% MgCl₂ 1 ml
0.1M Pb (NO₃)₂ 2.5 ml

及び AlPase¹²⁾¹³⁾

0.2M Tris-HCl buffer (pH 8.5) 1.4 ml
0.1M β-glycerophenyl-phosphate 2.0 ml
0.015M MgSO₄ 2.6 ml
0.5% Lead Citrate (Pb₃(C₆H₅O₇)₂·3H₂O) ... 4.0 ml

上記反応液は各々7% sucrose で高調化し37°C及び室温にて1~30分の浸漬時間を適当に選択した。対照例は基質を含まない反応液及び反応液を通さないものゝ2種を用いた。

(光顕用のもの)

1) Peroxidase, McJunkin 氏法¹⁴⁾¹⁵⁾

2) AcPase, 朝長正允氏法¹⁶⁾

3) AlPase, 朝長正允氏法¹⁶⁾

常に光顕と対比しつつ電顕観察を行った。

結 果

〔I〕 好中球顆粒の形成

好中球の顆粒は骨髓芽球ではあまりみられないが正常のものでは前骨髓球の段階で出現し、骨髓球、後骨髓球、桿状核球、分葉核球に著明な分布がみられる。顆粒の発生については多くの学者 (Bessis (1956)²⁾, Watanabe (1957)³⁾, Ichikawa (1958)⁴⁾, Bainton (1966)⁷⁾ が述べているごとく主に前骨髓球、骨髓球らのゴルジー体で形成される。形成の様式はゴルジー腔で蓄積された内容がゴルジー小胞端から分芽して限界膜におもわれた初期顆粒となる。

好中球では初期顆粒の段階で形態的に分類出来ることはないが後述のごとく酵素活性からは分類が可能な高電子密度のアズール顆粒と低電子密度の特殊顆粒とに分けられよう。前骨髓球、骨髓球で形成される顆粒は高電子密度のアズール顆粒に相当するものが多い。骨髓球、後骨髓球では低電子密度の特殊顆粒の形成がみられる。後骨髓球、桿状核球、分葉核球等では高電子密度顆粒及び低電子密度の特殊顆粒が混在してみられ、分葉核球では低電子密度の特殊顆粒の分布比率が増加する。

成熟した高電子密度顆粒は主として球状形で直径は0.3~1.0 μ 程度である。1層の限界膜におもわれ、内容は高電子密度で比較的均質である。

成熟特殊顆粒は球形状から桿状形と多彩な形態をみることが出来る。大きさも長径が0.1~1.0 μ 等である。この顆粒も1層の限界膜におもわれ、内容は低電子密度である。桿状核球、分葉核球で分布比率の増加がみられる。

〔II〕 好中球の酵素

1) Peroxidase

骨髓芽球：ほとんど活性がないが急性白血病細胞では一部アズール顆粒に活性がみられる。

前骨髓球：ゴルジー囊小胞内側、粗面小胞体内腔、核膜の一部、アズール顆粒に活性がみられる。アズール顆粒は一部のものに分芽状態ですでに活性のみられるものがある。成熟アズール顆粒では辺縁から内面へと密な活性をみる。

骨髓球：ゴルジー囊小胞内側、粗面小胞体内腔、高電子密度顆粒にそれぞれ活性がみられる。低電子密度の特殊顆粒には活性がない。兩種顆粒はこの点からも区別が可能である。

後骨髓球、桿状核球、分葉核球：高電子密度顆粒に活性がみられるが、その分布比率は低下している。その他諸小器官には活性がみられない。

急性骨髄性白血病細胞：主にみられる細胞は骨髓芽

球性、前骨髓球性のものである。微細構造上で強い異形性がみられる。前骨髓球性のもものでは高電子密度のアズール顆粒が増生し、顆粒の膨化、空胞化、内容の萎縮、内容が限界膜外へ流出するもの等がみられる。グリコーゲン粒子が細胞辺縁の一部に集簇しているものをみることがある。

活性は核膜の一部、ゴルジー囊小胞内側、粗面小胞体内腔、アズール顆粒、アツェル小体等にみられる。アズール顆粒の活性態度は内容に不規則な明暗がみられ、正常前骨髓球にみられるアズール顆粒の活性が辺縁に強く同心円状に均質な活性分布を示すのとやゝ異なる態度を示すことがある。空胞化した部分には活性がなく、萎縮したもの、限界膜外へ流出したもの等には活性がみられる。

慢性骨髄性白血病細胞：こゝでは好中球の各成熟段階に相当する細胞がみられる。つまり骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球性等で急性骨髄性白血病細胞でみられた顆粒の変化がほとんど同様にみられる。

活性は核膜腔の一部、ゴルジー囊小胞内側、粗面小胞体内腔、アズール顆粒にみられる。アズール顆粒における活性の不均等性は急性骨髄性白血病細胞ほど著明ではない。特殊顆粒には活性がみられない。

2) AcPase

骨髓芽球：活性は核膜腔の一部にみられる。他の諸小器官では活性がほとんどみられない。

前骨髓球：活性は核小体周囲、核膜腔、ゴルジー囊小胞、粗面小胞体内腔、糸粒体の一部（主として隔壁 (Crista) にそった部分）、アズール顆粒等にみられる。アズール顆粒の活性はゴルジー体からの分芽状態で稀にみられる。成熟アズール顆粒では活性の強弱の差は個々まちまちであるが、顆粒辺縁に強い傾向がみられる。全然活性があらわれないものも又存在する。

骨髓球、後骨髓球：活性は核小体周囲のクロマチン、核膜腔の一部、ゴルジー囊小胞内側、中心小体、粗面小胞体内腔、高電子密度顆粒、未熟な特殊顆粒の一部にそれぞれみられる。高電子密度顆粒の活性には強弱の差がみられ、全然活性のあらわれないものもみられる。

桿状核球：活性は核膜腔、ゴルジー囊内腔、高電子密度顆粒、未熟な特殊顆粒の一部等にみられる。高電子密度顆粒の活性は他の細胞でみられたように活性の強弱の差及び活性のあらわれないもの等がみられる。特殊顆粒で活性のみられるものは比較的小型顆粒で、顆粒内の一部に限局した活性としてみられる場合が多い。糸粒体の活性は隔壁 (Crista) に接してみられる場合が多い。

分葉核球：活性は核膜腔，粗面小胞体，一部の特殊顆粒，食飲顆粒，一部の高電子密度顆粒等にみられる。高電子密度顆粒はまれにみられ，形態的に空胞化，内容の萎縮したものをみることが出来る。活性は比較的弱く活性が全然あらわれないものも存在する。特殊顆粒は未熟顆粒から比較的大型のミエリン構造がみられる顆粒まで活性がみられる。この顆粒の場合も活性は限局性にみられ，又強弱の差及び活性のないもの等を見ることがある。食飲顆粒にも活性がみられ，顆粒周囲の間質，顆粒内側の辺縁及び内容の一部等に強くみられる。

急性骨髄性白血病細胞：骨髄芽球性のものゝ活性は核膜腔，粗面小胞体，糸粒体の一部，稀に未熟なアズール顆粒等にみられる。微細線維構造 (fibrillar formation) に活性はない。前骨髄球性のものゝ活性は核小体周囲，核膜腔，ゴルジー嚢内腔，中心小体，粗面小胞体，一部の糸粒体，アズール顆粒，アウエル小体等にみられる。アズール顆粒の形態が多彩であることは前述の通りである。活性は個々により強弱の差がみられる。一般に内容にはほど活性がある。微細線維構造 (fibrillar formation) には活性がみられない。

慢性骨髄性白血病細胞：骨髄芽球性，前骨髄球性等の所見は急性骨髄性白血病の場合と大差がない。骨髄球性のものゝ活性は核小体周囲，核膜腔，ゴルジー嚢内腔，中心小体，粗面小胞体，一部の糸粒体等にみられる。粗面小胞体は拡大したものをよくみるが，この内腔に活性をみることがある。高電子密度顆粒はやはり活性の強弱が個々においてみられる。特殊顆粒では未熟な顆粒にやはり限局的な活性がみられる。微細線維構造 (fibrillar formation) に活性はみられない。

3) AIPase

骨髄芽球：活性は核小体，核膜腔に集簇的にみられる。他の諸小器官には著明な活性がみられない。

前骨髄球：活性は核小体，核膜腔，ゴルジー嚢内腔，粗面小胞体，一部の糸粒体等である。強い活性がみられるのは核小体，粗面小胞体内腔である。高電子密度アズール顆粒にはほとんど活性がみられない。原形質膜に密な沈着像がみられるが，これは活性があるのか，或いは吸着によるものか判然としない。

骨髄球，後骨髄球：活性は核膜腔，粗面小胞体内腔，一部の糸粒体，一部の特殊顆粒の限界膜及び内容，一部の胞体間質等にみられる。高電子密度顆粒には活性がみられない。強い活性はやはり粗面小胞体内腔である。

桿状核球：活性は核膜腔，ゴルジー嚢内腔，粗面小

胞体，一部の糸粒体，一部の特殊顆粒等にみられる。活性のみられる特殊顆粒は球状，桿状，分葉状と多彩な形態を示す大型顆粒で長径が $0.4\sim 0.8\mu$ 程度のものである。活性は点状，斑状として顆粒の限界膜及び内容にみられる。この種の顆粒には AcPase の活性がみられなかったものである。

分葉核球：活性は核膜腔，ゴルジー嚢内腔，粗面小胞体内腔，一部の糸粒体，一部の特殊顆粒等にみられる。活性がみられる特殊顆粒は桿状核球と同様である。

急性骨髄性白血病細胞：骨髄芽球性の活性は核小体，粗面小胞体，一部の糸粒体等にみられる。微細線維構造 (fibrillar formation)，アウエル小体等に活性がみられない。前骨髄球性の活性は核小体，核膜腔，ゴルジー嚢内腔，粗面小胞体内腔，一部の糸粒体等にみられる。高電子密度のアズール顆粒，アウエル小体，微細線維構造 (fibrillar formation) 等に活性はみられない。

慢性骨髄性白血病細胞：骨髄芽球，前骨髄球性の所見は急性骨髄性白血病の場合にみられたものとほぼ同様である。骨髄球性では上記のほか特殊顆粒に活性がみられる。この特殊顆粒は AcPase の活性がなかった大型不整形顆粒で，桿状核球，分葉核球等にも同種の顆粒がある。しかし骨髄球のものより形態的に異形性が強くなる傾向がある。

〔Ⅲ〕 好中球の顆粒

1) 高電子密度顆粒 (アズール顆粒)

高電子密度のアズール顆粒の形成は前述のごとく正常においては前骨髄球の段階でゴルジー嚢小胞から分芽されて顆粒となるものである。急性又は慢性骨髄性白血病細胞ではしばしばこの未熟な顆粒が骨髄芽球でもみられることがある。この顆粒を成熟度の観点からみれば，形成期，成長期，成熟期，消退期等に分けることが出来る。

(形成期) 初期顆粒はゴルジー嚢小胞から分芽された状態で顆粒となり，薄い1層の限界膜でおおわれる。この時期の内容の電子密度はあまり高くない。均質な基質の中に微細粒子を内包している。形態的には類球形状で直径は約 $0.05\sim 0.07\mu$ のものである。酵素活性については一部で Peroxidase の活性がみられる。AcPase の活性は著明ではない。

(成長期) 顆粒は類球形状で，直径は約 $0.08\sim 0.7\mu$ 程度のものである。内容の電子密度は中央部から高まりを示し，顆粒辺縁部とある程度の明暗を示しつつ高電子密度部が増大し，緊満性の高電子密度顆粒となつてゆく。Peroxidase の活性はゴルジー嚢小胞内及び

分芽の状態からみられるものがあるが、顆粒個々によって活性強弱の差は十分認められるものである。この期の顆粒ではほとんど全てに Peroxidase の活性があらわれる。AcPase の活性は分芽状態ではあまりみられず、この期の顆粒から活性がみられるようになる。活性は顆粒の辺縁部が高く、内部に低い傾向がみられる。

(成熟期) この段階では顆粒は種々の形態をとるのがみられる。顆粒の直径は $0.3\sim 0.8\mu$ 程度のもが多い。形態的には緊満性、球形状のもので内容の電子密度が均等なもの、内容の電子密度に濃淡を示し、一部高電子部分に結晶様構造をもっているもの、限界膜と内容の間に空隙を作るもの、顆粒内に空胞を作るものミエリン構造をとるもの、線状層状構造の一部に伸長性を示しアウエル小体様になるもの等々多彩である。特にミエリン構造をとるもので限局性に AcPase 活性が強いものをみることがある。

(消退期) 顆粒内容の萎縮が著明となり、不規則な空胞を作り消滅してゆくもの、又これ等の一部に限界膜外へ流出して、胞体内の空胞へ注入したり、又胞体内へ直接流出し、あるものは流出後低電子密度の顆粒に移行を思わせる像をみることがある。これ等と形態的ならびに酵素活性の態度が類似した顆粒が骨髓球から分葉核球においても分布がしばしばみられる。

2) 特殊顆粒

特殊顆粒はアズール顆粒と比較してその電子密度が低いこと、長さもやゝ小型の傾向があり、成熟顆粒で $0.1\sim 0.7\mu$ 程度のもが多数を占める。この顆粒は Peroxidase の活性がない点で高電子密度アズール顆粒と区別出来る。特殊顆粒の形成がみられる主な細胞は骨髓球、後骨髓球であり、桿状核球、分葉核球で著明な分布がみられる。形成様式はアズール顆粒が前骨髓球、骨髓球等でみられたものと同様で、ゴルジー囊小胞から分芽されて顆粒になるものである。前述のごとく人の場合、アズール顆粒の移行するものをみることがある。形態的に特殊顆粒は限界膜におもわれ、類球状のもが多いが不規則な形態を示すこともしばしばみられる。このことはアズール顆粒がおもむね球形状をしている点と差がみられる。顆粒の成熟についてみれば未熟顆粒は低電子密度の内容をもち稀薄な基質中に微細な粒子を包含し、軽度な縞をみる。形態的には類球形が多いが、かなり多彩な形態がある。限界膜はアズール顆粒の膜より薄い傾向をみる。この未熟顆粒の分布は骨髓球から分葉核球に至る細胞のゴルジー体近辺に分布している。成熟顆粒は限界膜に接して内容が充満し、微細粒子は比較的均等で、内容の縞は軽

度である。形態的には類球状のもが多いが、やはりかなりの多形性をみる。その長さは $0.1\sim 0.6\mu$ 程度のもが多数を占める。桿状核球、分葉核球等のゴルジー体以外の細胞質によく分散している。消退期顆粒は限界膜の肥厚があり、内容は萎縮し、限界膜と遊離がみられ、部分的な空胞形成等がみられる。大きさについては成熟顆粒と大差がない。

特殊顆粒の酵素活性については形態的にも多少の特異性がある。AcPase 陽性顆粒 (S1 型)、AlPase 陽性顆粒 (S2 型)、両酵素とも陰性顆粒 (S3 型) 等に分けてみた。

(S1 型) ごく未熟な顆粒には活性がなく、未熟から成熟に至る段階の顆粒に活性がみられ、ほぼ球状のもが多い。直径は $0.1\sim 0.3\mu$ 程度である。活性は顆粒の一部に限局してみられることが多く、個々で活性の強弱の差が大きい。骨髓球から分葉核球に至る細胞に分布している。

(S2 型) この顆粒は大型で形態的には不整形である。成熟から消退期顆粒に活性が多い。活性は限界膜、内容等にみられる。桿状核球、分葉核球に多い。

(S3 型) 成熟した顆粒で、両酵素 (AcPase, AlPase) の活性がみられないものがある。顆粒の形態は桿状を示すことが特徴的で、大きさも多彩である。これ以外に球形状の顆粒もみられ、活性を示す顆粒と形態的に区別がつかない場合もしばしばみられる。

〔IV〕 白血病細胞における顆粒

1) アズール顆粒

急性骨髓性白血病群 (AML)、慢性骨髓性白血病群 (CML)、非白血病群 (Control) に分けて各群の前骨髓球を主体にアズール顆粒の大きさ (長径) を計測して比較してみると fig. 1 のごとく分布曲線が得られる。

Control における分布は長径が 0.3μ と 0.8μ にピークをもつ 2 相性がみられ、分布の幅は $0.1\sim 1.0\mu$ まである。

CML では長径が 0.4μ に 1 つのはっきりしたピークがみられ、 0.7μ を低値に再び増加の傾向があり、2 相性近似の形を示す。分布の幅は $0.1\sim 1.2\mu$ でやゝ伸長する。

AML では長径が 0.3μ をピークとする完全な 1 相性がみられ、分布の幅も $0.1\sim 1.5\mu$ とさらに伸長される。

つまり白血病では顆粒のばらつきが Control よりも著明で、AML が最も強い不揃性を示すものである。

酵素活性の出現率についてみれば fig. 2 のごとくである。

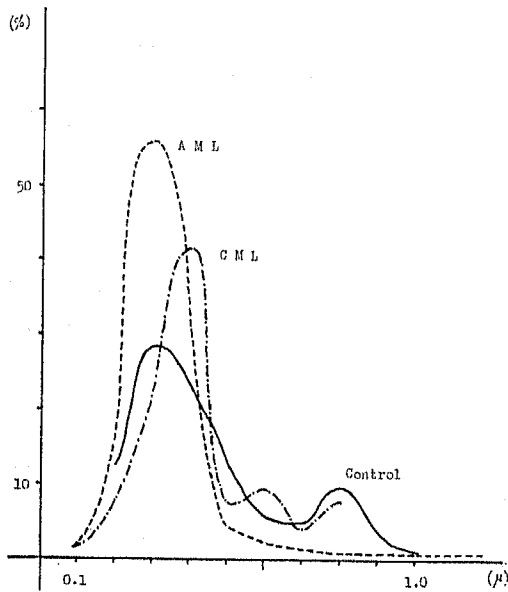


fig. 1. Azurophil granules (Promyelocyte)

	Peroxidase	AcPase	AlPase
AML	94.1	37.3	0
CML	98.6	25.5	0
Control	96.3	21.5	0

fig. 2. Azurophil granules (%)

Peroxidase については AML 94.1%, CML 98.6%, Control 96.3% と大差がみられず、ほとんどの顆粒に活性がある。AcPase については AML 37.3%, CML 25.5%, Control 21.5% の順である。AlPase については全く活性がみられない。これは各群とも共通している。

形態的にみれば、AML が最も多彩である。特に消退期顆粒の出現が目立ち、内容の萎縮、空胞化及び消滅像をみることもある。CML にもこれ等の変化がみられるが出現率は低下の傾向である。

2) 特殊顆粒

AML, CML, Control, 各群の骨髓球にあらわれる特殊顆粒の大きさ(長径)を計測してみると fig. 3 のごとく分布曲線が得られる。

Control における分布は 0.2 μ と 0.6 μ にピークを持つ 2 相性がみられる。分布の幅は 0.1~0.8 μ 程度である。

CML では 0.3 μ にピークがみられ 1 相性となる。分布の幅は 0.1~0.6 μ 程度である。

AML では 0.15~0.2 μ にピークがみられ、これ又完全な 1 相性である。分布の幅は 0.05~0.35 μ 程度である。

白血病では特殊顆粒のばらつきが少なく、アズール顆粒と逆の結果が得られ、AML, CML, と小型の特殊顆粒 (S1 型, S3 型) が多く分布している。Control では白血病にみられる S1 型, S3 型に加えて S2 型の分布がある。

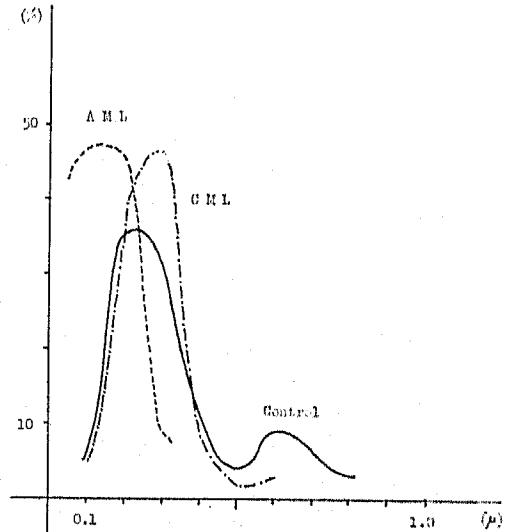


fig. 3. Specific granules (Myelocyte)

特殊顆粒の酵素活性の出現率をみれば fig. 4 の如くである。

Peroxidase については、特殊顆粒は全く各群とも活性がみられない。AcPase は S1 型顆粒にみられ、AML は 12.2%, CML は 7.6%, Control は 5.0% の順に減少がみられる。AlPase は S2 型顆粒にみられ、AML は 4.5%, CML は 3.7%, Control は 14.4% となり白血病細胞では著明な低下がみられる。

形態的には白血病細胞での特殊顆粒は S2 型の減少がある。

	Peroxidase	AcPase	AlPase
AML	0	12.2	4.5
CML	0	7.6	3.7
Control	0	5.0	14.4

fig. 4. Specific granules (%)

考 按

1) 顆粒形成の機序

好中球には多くの学者が述べているごとく²⁰⁾²⁴⁾⁷⁾高電子密度顆粒と低電子密度顆粒がみられる¹⁷⁾¹⁸⁾。人の好中球の顆粒は電顕的に骨髓芽球にはほとんどみられないが、白血球細胞ではしばしば高電子密度アズール顆粒が出現する¹⁰⁾²⁰⁾。アズール顆粒が形成されるのは主に前骨髓球及び骨髓球である²⁰⁾²¹⁾。この初期顆粒は前骨髓球及び骨髓球のゴルジ小胞から分芽されて形成されるものである⁷⁾。Bainton⁷⁾らによればアズール顆粒はゴルジ体の凹面側で形成されると云われるが人の前骨髓球におけるアズール顆粒の形成にはこのように判然とした結果は得られないようである。高電子密度のアズール顆粒は類球形で1層の限界膜におもわれ、Peroxidase, AcPaseの活性がみられる。Fedorko²⁰⁾らの H³-Lysine を用いた観察によれば家兎骨髓球で H³-Lysine は粗面小胞体からゴルジ体へ移動し、次いで顆粒に入ることが判っている。人の場合も初期顆粒の内容はまづこの機序に従うものと考えられる。成熟段階でも粗面小胞体との接触があり、その他間質からも内容の提供が推定出来る。一方このアズール顆粒は人の前骨髓球及び骨髓球で形成され、後骨髓球以後では形成像が見当らなくなって来る⁶⁾。桿状核球や分葉核球でみられる高電子密度の顆粒は中毒顆粒であるとするむきもある²⁵⁾。しかしこれ等成熟球にみられる高電子密度の顆粒には Peroxidase 及び AcPase の活性がみられ、又形態的にもアズール顆粒と類似している。全て成熟球における高電子密度顆粒が中毒顆粒であるか否かはさらに詳細な検索を待たねば結論出来ない。一方特殊顆粒は骨髓球以後の細胞で形成される⁷⁾。形成機序はアズール顆粒とは同様に骨髓球以後の細胞のゴルジ小胞から分芽されて顆粒となる。人におけるこれ等の顆粒は低電子密度で、形態は多彩である。骨髓球、後骨髓球では主に球状小型の低電子密度顆粒の形成がみられる。AcPase の活性があるものを S1 型顆粒とし、AlPase の活性があるものを S2 型顆粒、AcPase, AlPase とともに活性がみられないものを S3 型顆粒とすると桿状核球、分葉核球では大型低電子密度で形態が多彩な S2 型と桿状不整形の S3 型が多くみられる。

2) 顆粒形態と酵素活性

高電子密度アズール顆粒

アズール顆粒は前骨髓球のゴルジ小胞から分芽後高電子密度の顆粒となるが、内容の電子密度は中央部から高まり、限界膜に接した部では内容の微細粒子の分布は粗である。この段階は顆粒の成長期であり、大

きさも成熟期のものよりやゝ小型の傾向がある。成熟期に至れば内容の電子密度は限界膜に接した部分まで高まり、おもむね均質な高電子密度の内容が充満した球状形となる。成熟期から消退期にかけては色々な変化がみられ、一部は空胞化、内容の萎縮、又一部ではミエリン構造をとるもの、さらに線状層板構造をとりながら伸長性を示し、アウエル小体へ移行してゆくもの等があると考えられる²⁸⁾²⁹⁾。白血球細胞では顆粒の大小不整があり、AML では長さも 0.1~1.2 μ と幅広い分布がみられる。しかし分布曲線からみて長さ 0.3~0.4 μ 程度の顆粒が非常に多い。CML をも含めて微細構造上では内容の空胞化したもの、萎縮したものが多くアズール顆粒の変化は強い。酵素活性ではアズール顆粒は Peroxidase が最も強くほとんどのものに活性がみられ、初期顆粒からあらわれる。又 AcPase の活性もかなりみられ、顆粒の限界膜に接した辺縁部に強く、中央部が粗になる傾向がある。アズール顆粒の AcPase 出現率は AML が最も高く、CML, Control の順に低下してゆく。このことからアズール顆粒は lysosome 系の顆粒で白血球で AcPase の活性が多くなることが認められる³⁰⁾³¹⁾³²⁾。アズール顆粒では AlPase の活性が AML, CML, Control 各群ともみられなかった。これ等酵素の動態を考えるに Peroxidase は前骨髓球及び骨髓球の核膜腔、粗面小胞体からゴルジ小胞で濃縮されて顆粒に移行するものと推定され³¹⁾、Watson³³⁾ によると蛋白質合成の場である小胞体と核膜が発生的に同起源であると云うこととも一致して考えられる。又 AcPase は核色質結節部、核膜腔、粗面小胞体からゴルジ小胞で濃縮されやはり顆粒へ移行しているものと推定出来る。顆粒により AcPase 活性の強弱及び有無がみられる点は、顆粒内で酵素が不活化して貯留されることも考えられる¹⁰⁾。一部でアズール顆粒の限界膜が破れ、内容が流出するものを認めたがこの内容にも Peroxidase, AcPase の活性がみられ、又貪食液胞内へ顆粒内容が注入される点からも lysosome として貯留顆粒 (Storage granules) の性格を有しているものと考えられる³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾。白血球では細胞の腫瘍化により分裂能及びそれにとりなり新陳代謝が高まることが予想され³⁷⁾、これにつれてアズール顆粒の貯留物質の消費も高まり、顆粒の変化を促進するものと考えられる。

特殊顆粒

低電子密度で Peroxidase 陰性の顆粒が骨髓球以後の細胞にみられる。これ等は高電子密度アズール顆粒とは別種の顆粒と考えられる¹⁸⁾²⁴⁾²⁶⁾。形態的には多彩で、酵素活性の点からも多少異種の顆粒の混在がうか

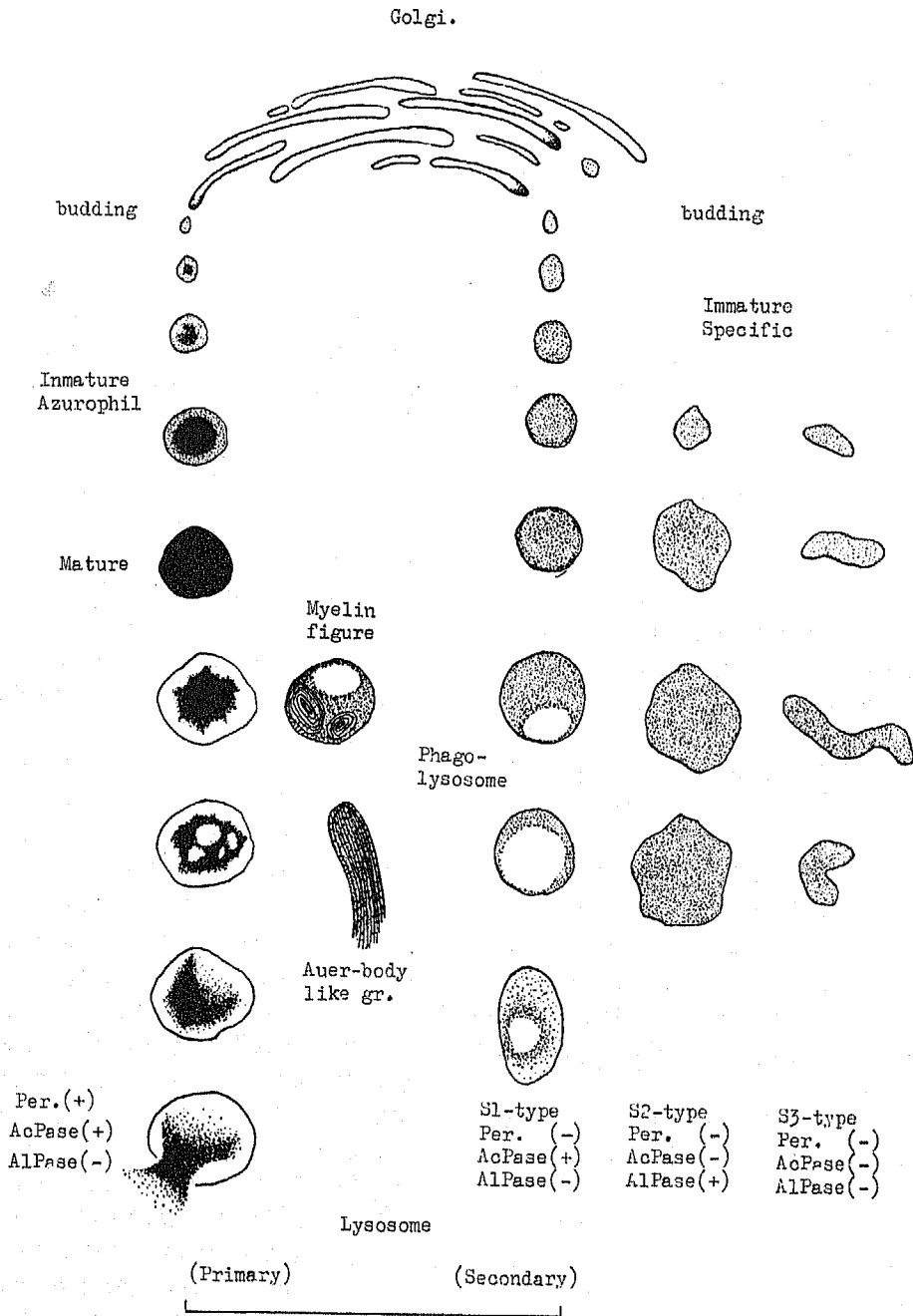


fig. 5.

とされる。これ等の顆粒は起源的に異種であると云う所見は得られない。細胞の時期的な相違によって異性質化される可能性が大きい。特殊顆粒を分泌産物とする見解もあるが²²⁾、骨髓球及び後骨髓球では類球形小型特殊顆粒 (S1 型) に AcPase 活性がみられ、活性

態度もアズール顆粒と異り限局性の活性が特徴的である。このことより人の場合、特殊顆粒も lysosome に相当するものと云える。桿状核球、分葉核球では低電子密度、やゝ大型、多形性がみられる特殊顆粒 (S2 型) がみられる。この S2 型顆粒は AlPase 陽性

で、AcPase 陰性のものである。Bainton²²⁾らは家兎における骨髓球の未熟特殊顆粒に AlPase の活性をみているが、人の場合、顆粒の大きさ及び形態から考えてむしろ成熟特殊顆粒に AlPase の活性がみられる。S1 型と S2 型特殊顆粒では顆粒形成のうへで別の起源を想定させるものは得られず、むしろ細胞の時期的な差異による変化と考えられる。又この時期に AcPase, AlPase とともに陰性の顆粒 (S3 型) がみられるが酵素の不活化によるものか、非常に弱い活性が固定操作で破壊されたものか、その本態は不明であるが、形態的に桿状で迂曲した顆粒には一致して活性がみられない。AlPase の推移については核小体、核色質結節、核膜腔、粗面小胞体からゴルジ小胞、顆粒と移行されるものと推定される。広義の lysosome には AcPase 活性のゴルジ小胞、貪喰液胞、貯留顆粒、多胞体、粗大リゾソーム (Cytolysome)、自喰液胞、残有小体等々多くの構造が含まれている³⁰⁾。このうち物質消化に関係なく AcPase や他の lysosome 系酵素の活性があるものを1次リゾソーム (Primary lysosome) と云い、これに対し酵素が作用するための基質もあり、消化作用を行っているものを2次リゾソーム (Secondary lysosome) と分ける説がある⁴⁰⁾⁴¹⁾。この考えからすれば高電子密度アズール顆粒は貯留顆粒で Primary lysosome である⁴²⁾。S1 型特殊顆粒は貪喰、消化を行う Secondary lysosome であろう。アズール顆粒から S1 型特殊顆粒へ移行する像が多数みられない点からして AcPase はアズール顆粒から細胞質へ放出され、S1 型特殊顆粒へ吸収されることが考えられる。これは AcPase 活性態度がアズール顆粒で比較的びまん性な活性を示すのに対し、S1 型特殊顆粒が限局性な活性を取ることも推定される。AlPase 活性の至適 pH について、反応液の pH は重要な要素で pH 9.0~9.8 が酵素作用について最も適当である³⁰⁾。しかしこの pH では鉛の沈着が強く、吸着現象と活性の鑑別上難があり、pH 7.6 のものと対比しつつ検索したものである。

3) 好中球でみられる酵素活性

骨髓芽球から分葉核球にみられる細胞内の小器官と酵素活性を一覧すると次表のごとくである。

	Peroxidase	AcPase	AlPase
核小体			+
核色質結節		+	
核膜腔	+	+	+
粗面小胞体	+	+	+
ゴルジ小胞	+	+	+

中心小体		+	
糸粒体		+	+
リボソーム		+	+
貪喰液胞		+	
胞体		+	
アズール顆粒 (高電子密度顆粒)	++	+	
アウエル小体 (特殊顆粒)	+	+	
S1 型		+	
S2 型			+
S3 型			

結 語

好中球の顆粒を形態的及び酵素活性の面から観察すれば、顆粒には Heterogeneity が認められる。即ち高電子密度顆粒では幼若球のアズール顆粒、成熟球にあらわれる中毒顆粒があり、又低電子密度特殊顆粒では AcPase 陽性の S1 型、AlPase 陽性の S2 型、両酵素とも陰性の S3 型等がみられる。

Peroxidase 陽性顆粒はアズール顆粒及び中毒顆粒である。成熟球にみられる高電子密度顆粒が全て中毒顆粒か否かは不明である。

AcPase 陽性顆粒はアズール顆粒、中毒顆粒及び S1 型特殊顆粒である。これ等は lysosome の範疇に入るものである。

AlPase 陽性顆粒は S2 型特殊顆粒である。この顆粒は成熟球で多くみられ、白血病細胞では少ない。

3 酵素とも陰性の顆粒は S3 型特殊顆粒である。これは酵素が欠除しているのか、又は弱い活性が固定操作で破壊されたものかは不明である。

顆粒の大きさによる分布曲線を見ると、アズール顆粒及び特殊顆粒とも白血病群は1相性を示すのに対し、非白血病群は2相性である。

酵素活性の出現率では、AcPase はアズール顆粒、特殊顆粒とも白血病群が非白血病群より高い。AlPase は特殊顆粒において白血病群が非白血病群より低い。3 種酵素とも陰性の S3 型特殊顆粒では白血病及び非白血病群において大差がない。

稿を終るにのぞみ、御指導と御校閲を賜った河合博正教授、終始御助言と御指導を頂いた浅野正英助教授に深く謝意を表するとともに、材料提供に御協力を頂いた信大小児科 (赤羽太郎教授)、小田内科 (小田正幸教授) の方々に感謝致します。

この論文の要旨は第26回日本電子顕微鏡学会 (東京 1970) において発表した。

文 献

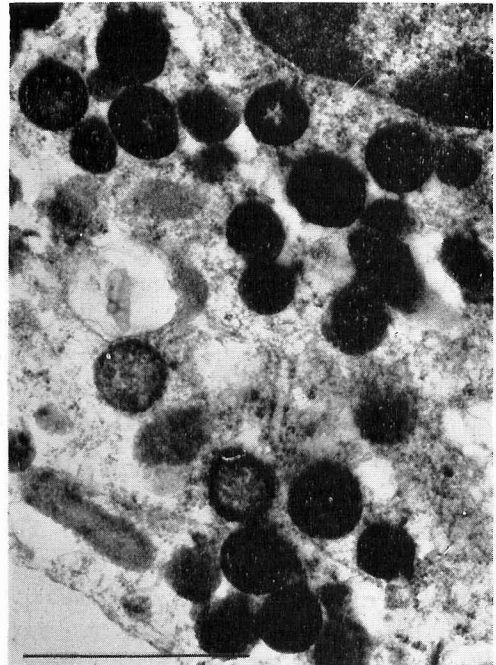
- 1) Rinehart, J. F.: Electron microscopic studies of sectioned white blood cells and platelets with observation on the derivation of specific granules from mitochondria. *Amer. J. Clin. Path.* 25: 605, 1955.
- 2) Besiss, M.: The granulocytic series, *Cytology of the blood and blood forming organs*. p. 373, 1956. Grune & Stratton. New York
- 3) Watanabe, Y.: Observation of white blood cells with electron microscopy. *J. Electron. Microscopy.* 5: 46, 1957.
- 4) 市川康夫: マウス好中球細胞(正常及び白血病)の顆粒形成過程の電顕的観察(二種の顆粒発生像), *日血会誌*, 21: 885, 1958.
- 5) Besiss, M. and Thiery, J. P.: Electron microscopy of human white blood cells and their stem cells. *Int. Rev. Cytol.* 12: 199, 1961.
- 6) Capone, R. J., Weinreb, E. L. and Chapman, G. B.: Electron microscope studies on normal human myeloid elements. *Blood.* 23: 300, 1964.
- 7) Bainton, D. F. and Farquhar, M. G.: Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes, Two types derived from opposite face of the golgi complex in developing granulocytes. *J. Cell Biol.* 28: 277, 1966.
- 8) Graham, R. C. Jr. and Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 291, 1966.
- 9) Kaplow, L. S.: Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dehydrochloride. *Blood.* 26: 215, 1965.
- 10) 山田英智・山内亮子: 血球の微細構造とその分化, *日血会誌*, 29: 530, 1966.
- 11) Mølbert, E. R. G.: The demonstration of alkaline phosphatase in the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7: 387, 1960.
- 12) Mayahara, H., Hirano, H., Saito, T. and Oga-
wa, K.: The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie.* 11: 88, 1967.
- 13) 小川和朗・齊藤多久馬・平野 寛・馬屋原宏: 高アルカリ性 pH 領域における諸種フォスファターゼ活性検出のためのクエン酸鉛法, *解剖学会誌*, 42: 40, 1967.
- 14) McJunkin, F. A.: A benzidine-polychrome stain for blood. *J. Amer. med. Ass.* 74: 17, 1920.
- 15) 河合 恵: ベルオキシダーゼ(オキシダーゼ)反応, *臨床病理, 臨時増刊特集*, 13: 37, 1967.
- 16) 朝長正允: 白血球ホスファターゼ染色, *臨床病理, 臨時増刊特集*, 13: 41, 1967.
- 17) 渡辺(陽): 血球の電子顕微鏡的観察, *日血会誌*, 19: 327, 1956.
- 18) 渡辺(陽): 血液, 造血器, 電子顕微鏡による細胞組織図譜, 1: pp. 144-195, 医学書院, 東京.
- 19) 石井善一郎・浅野正英・赤羽太郎: 血球の電顕像, *信州医誌*, 12: 1, 1963.
- 20) Asano, M. and Kawahara, I.: Ultramicroscopic characteristics of bone marrow cells in human chronic myeloid leukemia. *Med. J. Shinshu Univ.* 13: 103, 1968.
- 21) Wetzel, B. K., Horn, R. G. and Spicer, S. S.: Fine structural studies on the development of heterophil, eosinophil and basophil granulocytes in rabbits. *Lab. Invest.* 16: 349, 1967.
- 22) Bainton, D. F. and Farquhar, M. G.: Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. II. Cytochemistry and electron microscopy of the bone marrow cells. *J. Cell Biol.* 39: 299, 1968.
- 23) Fedorko, M. E. and Hirsh, J. G.: Cytoplasmic granules formation in myelocytes and electron microscope radioautographic study on the mechanism of formation of cytoplasmic granules in rabbit heterophil myelocytes. *J. Cell Biol.* 29: 307, 1966.
- 24) Wetzel, B. K., Horn, R. G. and Spicer, S. S.: Cytochemical localization of non-specific phosphatase activity in rabbit myeloid elements. *J. Histochem. Cytochem.* 11: 812, 1963.
- 25) McCall, C. E.: Lysosomal and ultrastructural changes in human "Toxic" neutrophils during bacterial infection. *J. exp. Med.* 129: 267, 1969.

- 26) 伊藤 享：骨髓性白血病の電子顕微鏡的観察，ウイルス感染を思わせる像，日血会誌，21：631，1958.
- 27) Wetzel, B. K., Spicer, S. S. and Horn, R. G. : Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in cells of rabbit blood and bone marrow. *J. Histochem. Cytochem.* 15 : 311, 1967.
- 28) Asano, M. : The use of electron microscopy in the diagnosis and decision on the therapeutic effect on acute myeloid leukemia. 6th. International Congress for Electron microscopy, Kyoto, Japan, 1966. Ueda, R. Editor, Vol. 2., pp. 711-712, Maruzen, Tokyo,
- 29) Kondo, K., Yoshitake, J. and Takemura, K. : The fine structure of Auer-bodies. *J. Electron Microscopy.* 15 : 237, 1966.
- 30) de Duve, C., Pressman, B. C., Geanetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. : Tissue fraction studies (V) Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60 : 604, 1955.
- 31) Novikoff, A. B. : Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2 : 179, 1956.
- 32) 小川和朗：リゾソーム（ライソソーム）の組織，細胞化学，特に疾病との関連について，診療，21：40，1968.
- 33) Watson, M. L. : The nuclear envelope, Its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1 : 257, 1955.
- 34) Weissman, G. : Lysosomes. *New Engl. J. Med.* 273 : 1084, 1965.
- 35) Horn, R. G., Spicer, S. S. and Wetzel, B. K. : Phagocytosis of bacteria by heterophil leukocytes, Acid and alkaline phosphatase cytochemistry. *Amer. J. Path.* 45 : 327, 1964.
- 36) Zucker-Franklin, D. and Hirsch, J. G. : Electron microscope studies on the degranulation of rabbit peritoneal leukocytes during phagocytosis. *J. exp. Med.* 120 : 569, 1964.
- 37) Quie, P. G., White, J. G., Holmes, B. and Good, R. A. : In vitro bacterial capacity of human polymorphonuclear leukocytes ; diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J. Clin. Invest.* 46 : 668, 1967.
- 38) Tewari, H. B. and Bourne, G. H. : Histochemical evidence of metabolic cycles in spinnal ganglions cells of rat. *J. Histochem. Cytochem.* 10 : 42, 1962.
- 39) 小川和朗：電子顕微鏡の細胞化学，酵素組織化学，pp. 471-496, 1958, 朝倉書店，東京.
- 40) de Duve, C. : From cytases to lysosome. *Fed. Proc.* 23 : 1045, 1964.
- 41) Novikoff, A. B., Essner, E. and Quintana, N. : Golgi apparatus and lysosomes. *Fed. Proc.* 23 : 1010, 1964.
- 42) Elliott, A. M. : Primary lysosomes in *Tetrahymena pyriformis*. *Science.* 149 : 640. 1965.

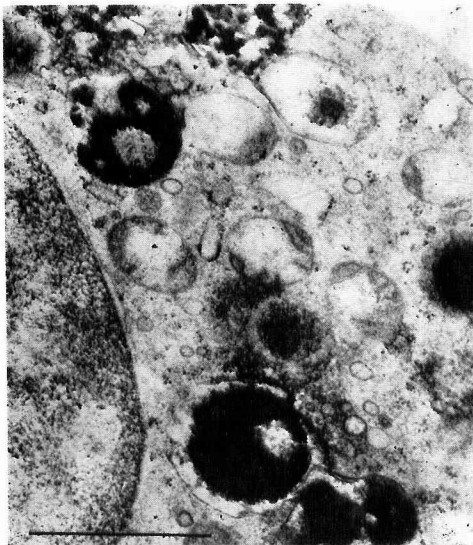
(昭和44年12月15日 受付)



(写真1) ゴルジ小胞, アズール初期顆粒(分芽状態)から Peroxidase 陽性, AML, 前骨髄球, $\times 48,000$



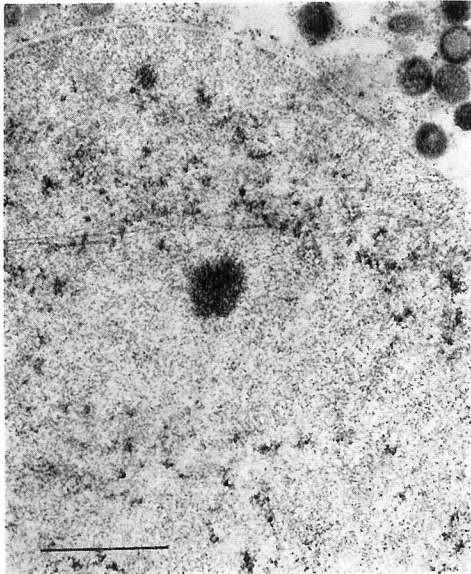
(写真2) 成長期, 成熟期アズール顆粒に peroxidase 陽性, Peroxidase は顆粒辺縁から中央部へと電子密度を増す, CML, 前骨髄球, $\times 50,000$



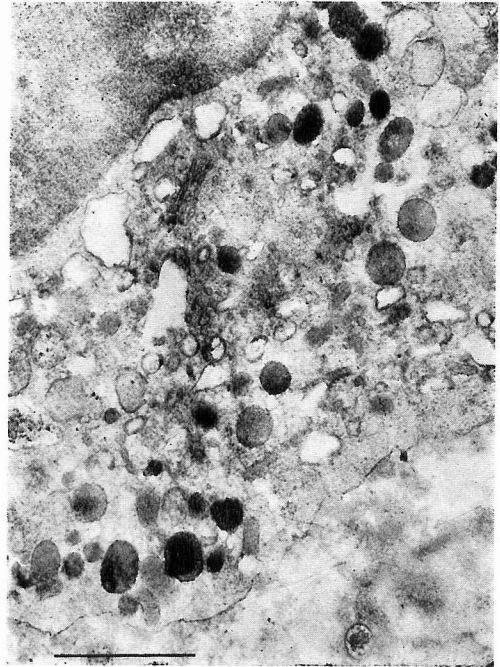
(写真3) 消退期アズール顆粒, 内容の萎縮, 空胞化がみられ, 顆粒内容に Peroxidase 陽性, AML, 前骨髄球, $\times 41,000$



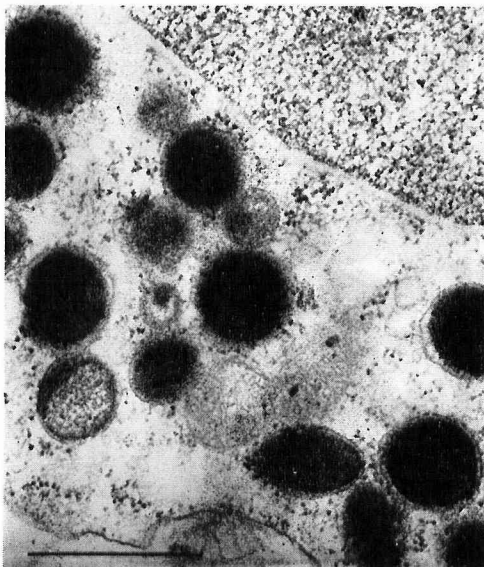
(写真4) 高電子密度のアズール顆粒と低電子密度の特殊顆粒がみられる。アズール顆粒の内容が空胞へ流入している。Control, 骨髄球, $\times 48,000$



(写真5) AcPase は核小体周囲, アズール顆粒に陽性, CML, 骨髓球, $\times 29,000$



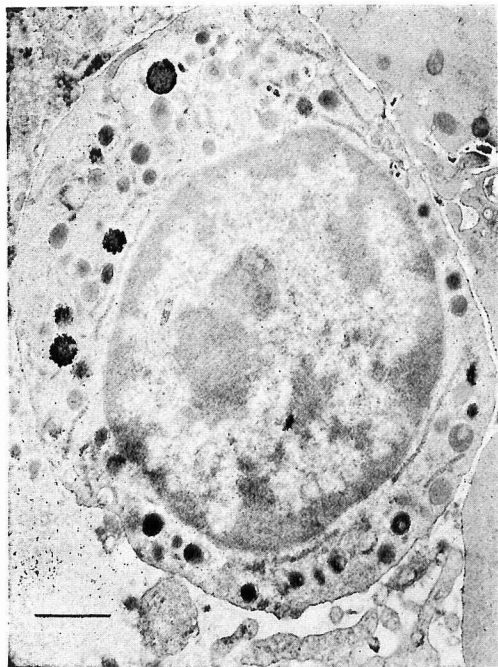
(写真6) ゴルジ小胞, アズール顆粒, 特殊顆粒に AcPase 陽性, Control, 骨髓球, $\times 32,000$



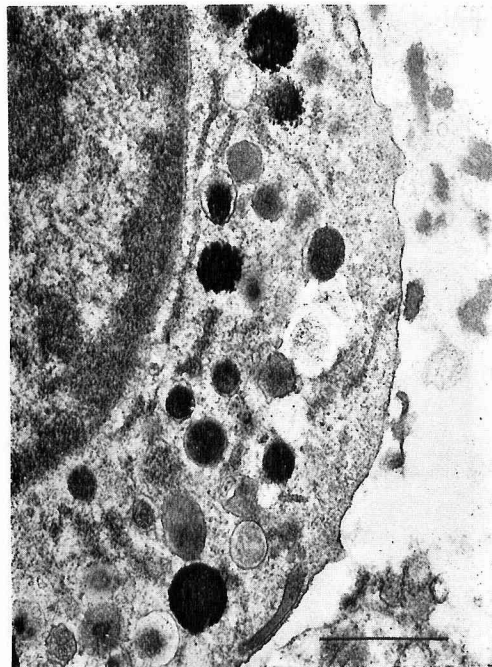
(写真7) アズール顆粒に微細な点状として AcPase 陽性, CML, 骨髓球, $\times 40,000$



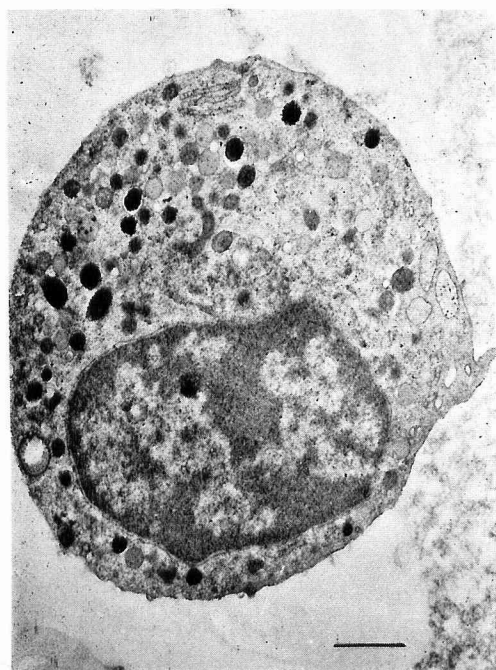
(写真8) ミエリン構造を取る顆粒及び特殊顆粒に AcPase 陽性, Control, 骨髓球, $\times 21,400$



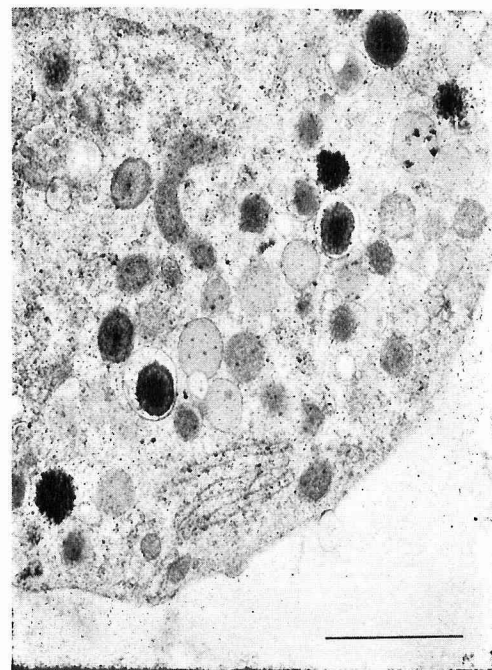
(写真9) アズール顆粒, 粗面小胞体に AcPase 陽性, Control, 前骨髄球, $\times 18,400$



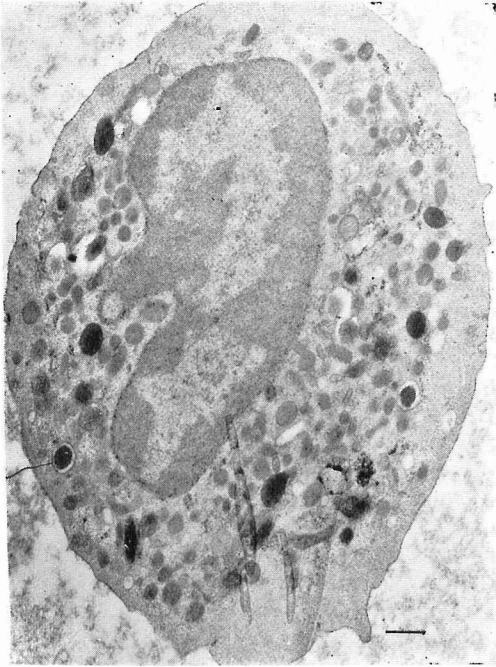
(写真10) 同左細胞, $\times 29,000$



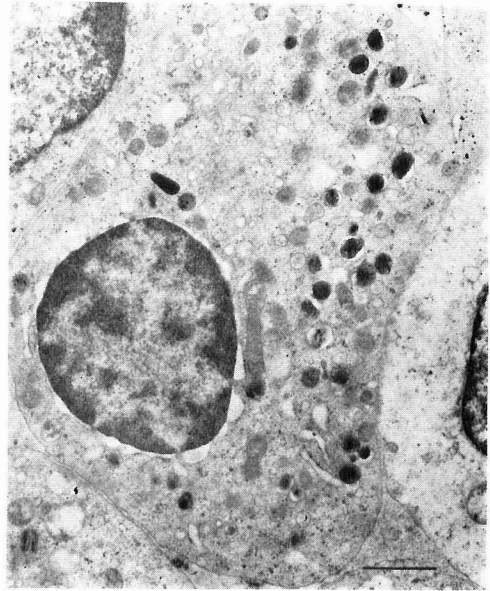
(写真11) 高電子密度顆粒, 低電子密度特殊顆粒, 粗面小胞体, 糸粒体に AcPase 陽性, Control, 前骨髄球, $\times 15,900$



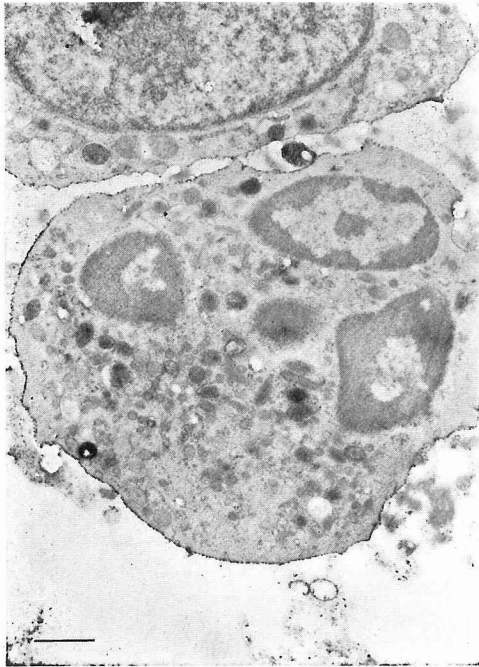
(写真12) 同左細胞, $\times 32,000$



(写真13) 核膜腔, 高電子密度顆粒, 低電子密度特殊顆粒, 粗面小胞体, 糸粒体に AcPase 陽性, Control, 後骨髓球, $\times 10,000$



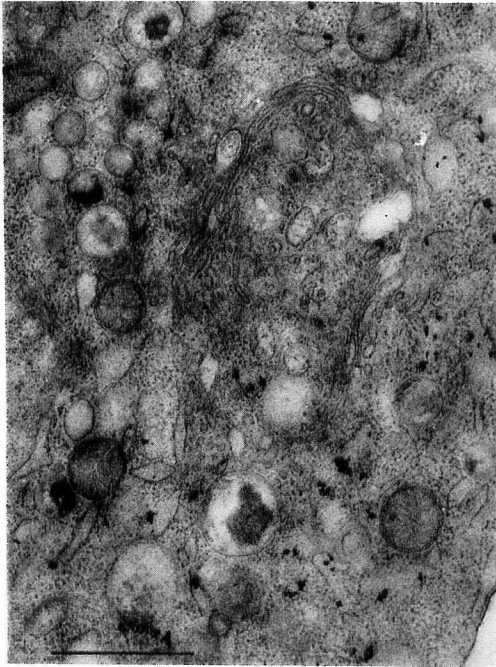
(写真14) 核色質結節部, 高電子密度顆粒, 低電子密度特殊顆粒, 粗面小胞体, 糸粒体に AcPase 陽性, CML, 骨髓球, $\times 16,800$



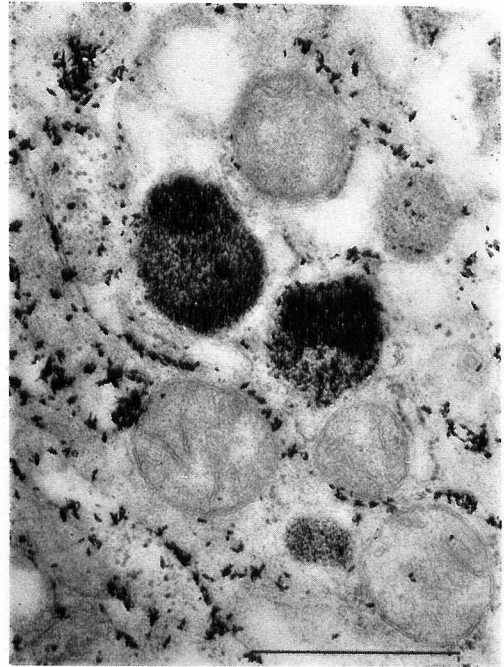
(写真15) 核膜腔, 特殊顆粒に AcPase 陽性, Control, 分葉核球, 15,000



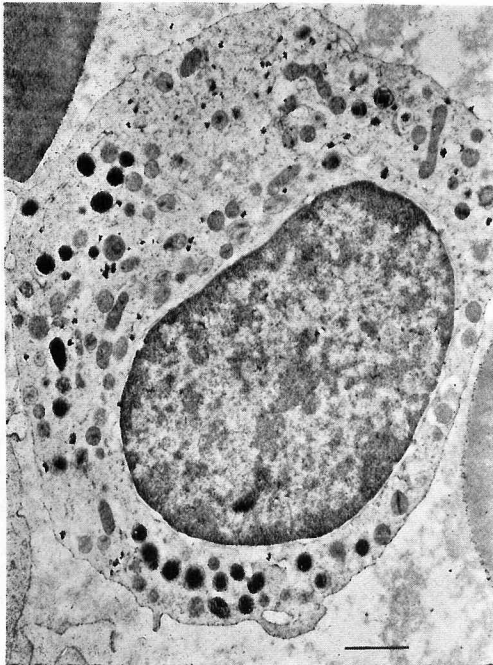
(写真16) 同左細胞, $\times 48,000$



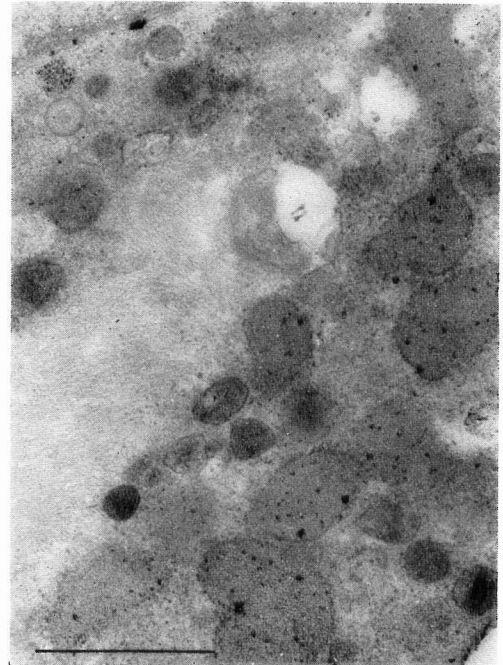
(写真17) ゴルジ小胞, 粗面小胞体に AlPase 陽性, Control, 骨髓球, $\times 32,000$



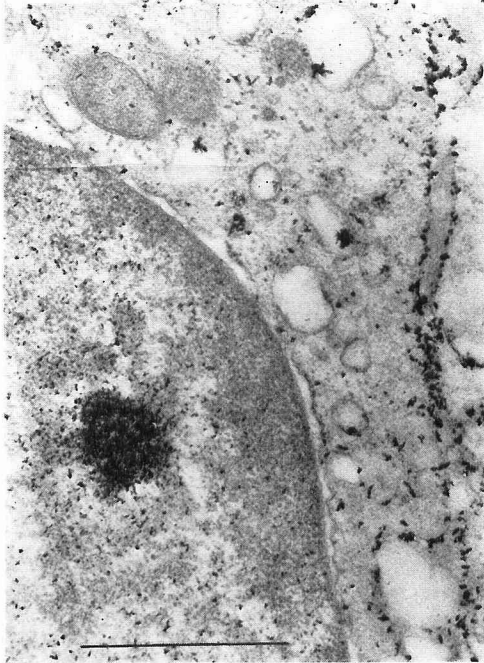
(写真18) 特殊顆粒, 粗面小胞体に AlPase 陽性, Control, 後骨髓球, $\times 48,000$



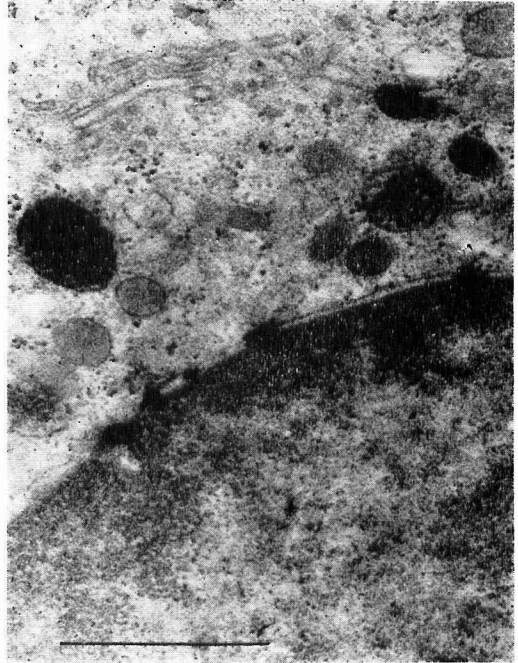
(写真19) 特殊顆粒, 粗面小胞体, 糸粒体に AlPase 陽性, Control, 骨髓球, $\times 15,000$



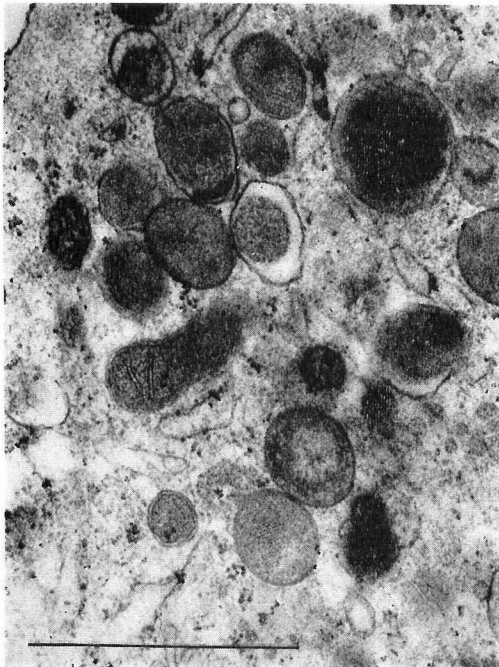
(写真20) 核膜腔, 特殊顆粒, 糸粒体に AlPase 陽性, AML, 骨髓球, $\times 41,000$



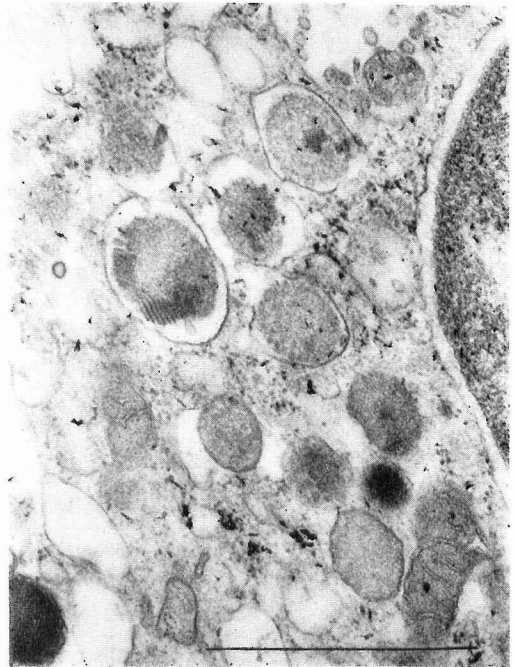
(写真21) 核小体, 粗面小胞体に AlPase 陽性, AML, 骨髓球, $\times 48,000$



(写真22) 核膜腔に AlPase 陽性, AML, 骨髓球, $\times 50,000$



(写真23) 特殊顆粒に AlPase 陽性, 糸粒体, 粗面小胞体にも陽性, Control, 分葉核球, $\times 60,000$



(写真24) 特殊顆粒に AlPase 陽性, Control, 分葉核球, $\times 62,000$