

マウス骨髓赤芽球島の三次元立体構造観察

野津 英司, 園田 祐治, 佐々木和信

赤芽球島は骨髓造血部に存在する赤血球造血の形態学的な基本構造である。電子顕微鏡観察およびF4/80免疫染色厚切り切片からの三次元立体構築により、骨髓赤芽球島の島中心細胞の形態を生後早期のマウスで観察した。島中心細胞は径0.2から0.7 μm の細長い索状細胞質突起を周囲の造血細胞間に多数伸展する。赤芽球は索状突起の周囲に集積し、突起はその先端が分岐して赤芽球を補足することが、三次元観察から明らかになった。

(平成20年7月15日受理)

Three-dimensional Analysis of the Erythroblastic Islands of Mouse Bone Marrow

Eiji NOTSU, Yuji SONODA, Kazunobu SASAKI

The bone marrow hematopoietic compartment contains numerous erythroblastic islands as a morphological unit of erythropoiesis. The fine structure of the central cells of these islands was studied by means of electron microscopy and three-dimensional reconstruction from F4/80 immunostained thick paraffin sections. The central cells had numerous long and slender cell processes, 0.2 ~ 0.7 μm in diameter, on their cell surfaces and cord-like processes branched, extending in-between surrounding erythroblasts. The three-dimensional computerized reconstruction showed that erythroblasts accumulated around the cord-like processes, and the processes bifurcated at the end and captured erythroblasts. (Accepted on July 15, 2008) *Kawasaki Medical Journal* 34(4):247-253, 2008

Key Words ① Bone marrow ② Central cells of erythroblastic islands
③ F4/80 immunostaining ④ Three-dimensional reconstruction
⑤ Mouse

はじめに

骨髓は成熟動物の主たる造血組織であり、骨髓造血部には赤血球生成の形態学的な単位として赤芽球島が多数含まれている^{1)~5)}。我々はマウス大腿骨骨髓における造血の形成過程を観察

し、骨髓支質細胞のひとつである細網細胞の周囲に赤芽球が胎生後期から集積しはじめ、生後早期には島中心細胞とその周囲に集合する赤芽球とによって赤芽球島が形成されることを報告した⁶⁾。脾臓や胎子肝臓では、造血細胞はマクロファージの周囲に集積し、島中心細胞の表面に赤芽球を格納する特異な細胞ソケット構造が

形成される⁷⁾。一方骨髄では、骨髄支質細胞の中でもマクロファージではなく、とくに細網細胞周囲に造血細胞が集積する。従って、赤芽球島中心細胞の由来は造血組織によって異なり、島中心細胞と周囲の造血細胞との形態学的な関連も、種々の造血組織で異なる可能性がある。しかしながら、島中心細胞の周囲を造血細胞が密に取り囲むために、島中心細胞と造血細胞の詳細な関係を形態学的に観察するのは容易ではない^{2), 8), 9)}。本研究では、生後早期のマウス骨髄の電子顕微鏡による観察と F4/80 免疫染色厚切り切片標本による 3 次元立体観察をあわせて行い、骨髄における赤芽球島中心細胞と赤芽球との関連を形態学的に明らかにすることを試みた。

材料と方法

生後 0 日及び生後 8 日と 9 日の ICR マウス新生子合計 34 匹を用いた。マウスは氷温水により麻酔後、大腿骨を摘出し、光顕標本と透過および走査電顕標本を作製した。

A. 光学顕微鏡観察

両側大腿骨を摘出し、エボン切片および免疫染色用のパラフィン切片を作製した。

1) 準超薄エボン切片

大腿骨の両骨端部を切断した後、2% グルタルアルデヒド-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4, 4℃) で 4 時間浸漬固定した。次いで、1% 四酸化オスミウム-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4, 4℃) で 3 時間後固定し、エタノール系列で脱水後、エボン 812 樹脂に包埋した。厚さ約 1 μm の切片を作成し、トルイジンブルーで染色して光顕観察した。

2) F4/80 モノクロナール抗体による免疫染色

大腿骨骨髄を大腿骨ごと 4% パラホルムアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 4℃) で 4 時間浸漬固定し、パラフィンに包埋した。厚さ 4 μm および 80 μm の切片を作成し、抗マクロファージ抗体 F4/80 を用い、免疫組織

化学染色をアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法 (ABC 法) で行った。すなわち、非特異的染色を阻止するため、脱パラフィン切片を VECTASTAIN ABC Elite kit (Vector Laboratories, CA, USA) のブロッキング血清に 37℃ で 10 分間浸漬し、リン酸緩衝生理食塩水で 200 倍に希釈した F4/80 抗体に 37℃, 2 時間反応させた。次いで、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するため、0.3% H₂O₂ 含有メタノールに 10 分間浸漬し、ビオチン標識二次抗体に 37℃ で 1 時間、ペルオキシダーゼ標識アビジンに 37℃ で 5 分間反応後、0.005% H₂O₂ 含有 0.1% ジアミノベンチジン-50mM トリス緩衝液 pH 7.6 で発色させた。

B. 骨髄赤芽球島の三次元立体構築

厚さ約 80 μm の F4/80 免疫染色標本で島中心細胞を観察し、ステージコントローラ (Mitani Co., Fukui, Japan) を使用して、Z 軸方向に 0.5 μm ずつ移動させた約 100 枚の光顕連続写真を撮影した。撮影した画像から、Photoshop (Adobe Systems Inc., CA, USA) を使用して島中心細胞の輪郭と周囲の赤芽球の輪郭をトレースし、Delta Viewer (Delta Viewer プロジェクトチーム：奈良女子大学和田昌昭教授によるフリーソフト) によって、赤芽球島中心細胞と周囲の赤芽球の三次元立体構築を行った。

C. 透過ならびに走査電子顕微鏡観察

生後 8 日および 9 日のマウスを 2% グルタルアルデヒド-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で灌流固定した後、両側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨は以下のように処理し、透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡観察の標本を作製した。

透過電顕標本は、摘出した大腿骨を 2% グルタルアルデヒド-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で 1 時間浸漬固定後、1% 四酸化オスミウム-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 時間固定し、エタノール系列で脱水後、エボン 812 樹脂に包埋した。エボン包埋した大腿骨

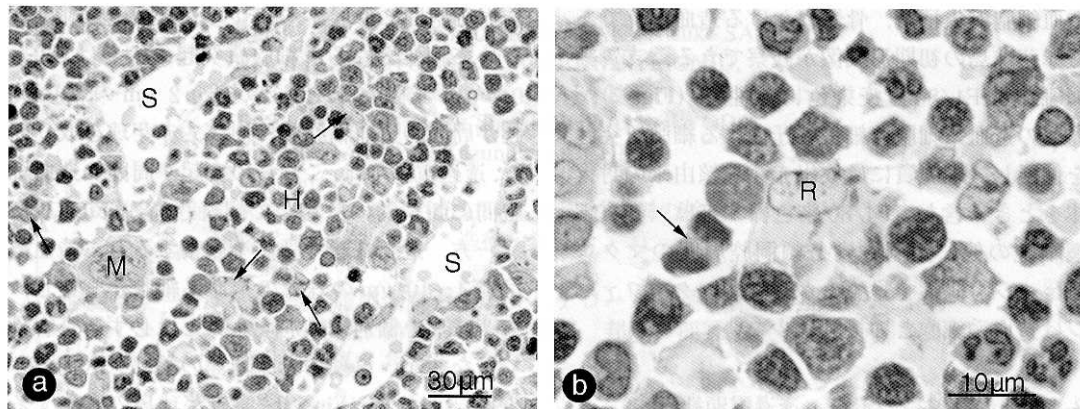


Fig. 1. 大腿骨骨髄. 生後8日. 1 μm エボン切片. トルイジンブルー染色

a. 低倍率写真. 類洞 (S) と造血部 (H) が区別できる. 造血部には, 巨核球 (M) を含め様々な造血細胞が多数観察され, 造血細胞の間に骨髄支質細胞 (矢印) が散在する.

b. 高倍率写真. 骨髄支質細胞 (R) は楕円形の明調核を持ち, 周囲に造血細胞が集積し, 造血細胞の分裂像 (矢印) も見られる. 細胞の輪郭は不明瞭である.

から, ダイヤモンドナイフを用い, ウルトラカット S (Leica, AG., Wien, Austria) で厚さ約 100 nm の骨髄超薄切片を作成し, 単孔グリッドにのせ酢酸ウランならびにクエン酸鉛で電子染色した. 切片は, 電子顕微鏡 JEM-2000EXII (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) にて 80 kV の加速電圧で観察した.

走査電顕標本は, 摘出した大腿骨をカミソリ刃で縦断し, 2% グルタルアルデヒド-0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に1時間浸漬した. 次いで, 1% 四酸化オスミウム-0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で2時間固定し, 1% タンニン酸-0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に一晩, 1% 四酸化オスミウム-0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に1時間浸漬し, 導電染色を施した. アルコール系列により脱水後, トピチルアルコールを浸透させ凍結乾燥し, 電子顕微鏡 JSM-6340F (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) にて 10 kV の加速電圧で観察した.

本研究は, 川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 06-052, 2006年), 川崎医科大学動物実験指針に基づき実施された.

成 績

A. 生後早期マウス大腿骨骨髄赤芽球島の光顕

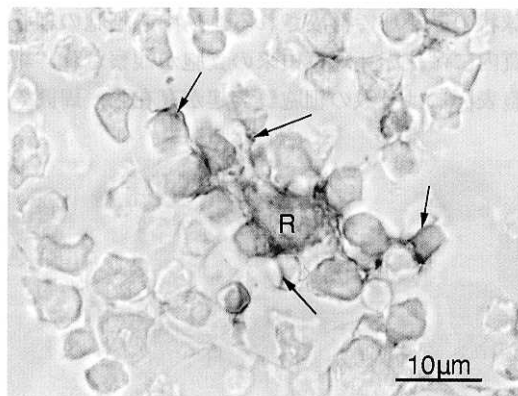


Fig. 2. 赤芽球島 F4/80免疫染色. 生後8日. 4 μm パラフィン切片.

島中央部に位置する支質細胞 (R) は, F4/80染色に陽性であり, 細胞輪郭および細長い細胞質突起 (矢印) を明確に観察することが出来る. 突起は造血細胞の間に伸び, 造血細胞周囲を部分的に囲む.

観察

生後8日のマウス大腿骨骨髄は, 造血系細胞および支質細胞からなる造血部と, 類洞からなる血管部が明瞭に区別される (Fig. 1a). 造血部には多数の造血系細胞が密集し, 分葉もしくは杆状核を持つ顆粒球系細胞や種々の成熟段階の赤芽球および巨核球が混在する (Fig. 1b). 造血細胞の間に散在する支質細胞は, 長径 7.0~10.4 μm の楕円形の明調核を有する (Fig. 1b). その周囲には赤芽球を中心とする

造血細胞が集積し、骨髄における造血単位である赤芽球島の初期形成像が観察できる。支質細網細胞はF4/80免疫染色に陽性で (Fig. 2), 周囲の造血系細胞に細長い迂曲する細胞質突起を伸展し、細胞質には放出赤芽球核由来の封入体をときに含む。F4/80染色標本では、支質細網細胞の他に類洞腔内と類洞腔周囲のマクロファージも陽性を呈するが、骨髄マクロファージは造血系細胞との接触は少ない。

B. 骨髄赤芽球島の走査・透過電顕観察

生後8日および9日の大腿骨骨髄造血部を透過電顕で観察すると、個々の赤芽球島を容易に識別できる (Fig. 3a)。赤芽球島は、細長い島中心細胞と、その周囲に集積する径4~8 μm の球状の赤芽球で構成される。島中心細胞の細胞質内には、赤芽球核由来の食胞が観察され、細胞表面には多数の細胞質突起が存在し、周囲の

造血細胞間に伸展する。そのため、細胞輪郭はきわめて複雑となる。細胞質突起の太さは0.2~0.7 μm と様々であるが、径0.2 μm の細い突起が周囲の造血細胞間に伸び、赤芽球を取り囲む。透過電顕では、これらの突起が周囲の造血細胞間に断片的に散在して観察される (Fig. 3a)。

一方、走査電顕で骨髄を観察すると、造血部は径4~10 μm の球形の造血系細胞が密集し、赤芽球島を個別に識別することは必ずしも容易ではないが、単独の赤芽球島の輪郭を区別できる場合もある (Fig. 3b)。赤芽球島の密集する造血細胞間には、太さ0.2~0.7 μm の索状の島中心細胞の細胞質突起が、分岐しながら造血細胞間を複雑に迂曲して走行する様子を観察することが出来る (Fig. 3c)。しかしながら走査電顕観察では、島中心細胞の全体を観察することは難しく、迂曲伸展する細胞質突起を含めた島中心細胞の全体像を形態学的に把握するた

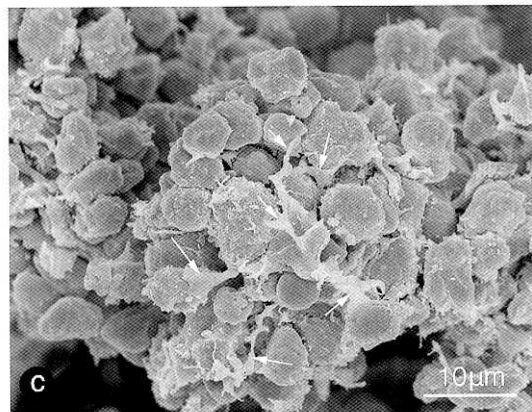
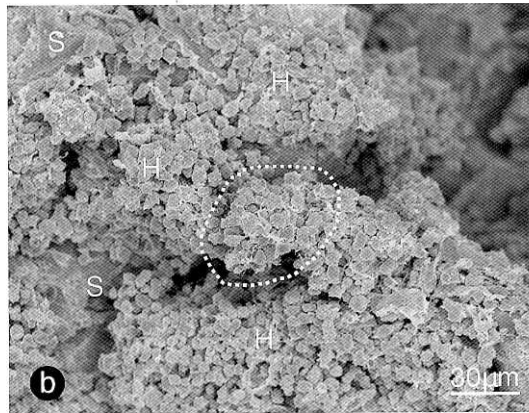
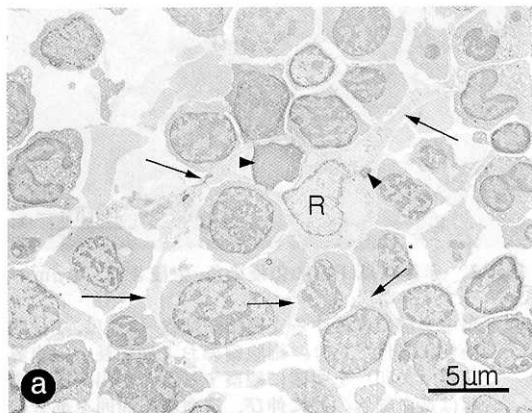


Fig. 3. 骨髄造血部.

- 赤芽球島の透過型電子顕微鏡写真。島中心細胞 (R) の細胞質内には複数の食胞 (矢頭) が確認できる。周囲の造血細胞の間に細長い細胞質突起 (矢印) を伸ばすが、透過電顕観察では突起を断片的にしか観察できない。
- 走査型電子顕微鏡による低倍率写真。骨髄造血部 (H) と類洞 (S) が識別できる。骨髄造血部は多数の球状の造血細胞で満たされる。境界は鮮明ではないが、部位によっては赤芽球島 (点線) を個別に識別できる。
- 赤芽球島の走査型電子顕微鏡写真。密集する造血細胞間に、伸展した島中心細胞の細長い細胞質突起 (矢印) が認められるが、中央部の島中心細胞の観察は困難である。

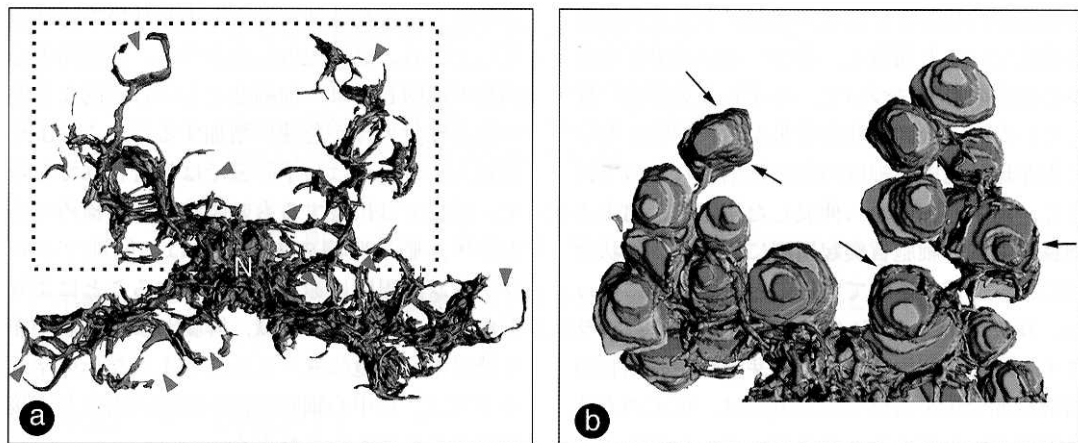


Fig. 4. 赤芽球島中心細胞の三次元立体構築.

- a. 島中心細胞, 核周部 (N) 細胞質から細長い索状の細胞質突起が多数伸び, 突起は周囲の造血細胞を挟むように先端が二分岐する (矢頭).
- b. 島中心細胞と赤芽球. a. の点線部に赤芽球 (赤色) を記入した, 島中心細胞表面の索状突起が赤芽球間に迂曲して伸展し, 赤芽球は突起の周囲にまつわりつくように集積する. 突起の先端は分岐して赤芽球を補足する (矢印).

め, 厚切り免疫切片による光顕三次元構築を行った.

C. 赤芽球島の三次元立体構築

生後 9 日の骨髄赤芽球島の三次元立体像を Figure 4 に示す. 赤芽球島中心細胞全体の輪郭は, 核周囲の紡錘形の細胞質表面より細い索状細胞質突起が多数伸び, きわめて複雑な形態をとる (Fig. 4a). 索状の細胞質突起は, 分岐しながら周囲の造血細胞間を伸び, その周囲に赤芽球が付着する (Fig. 4b). 赤芽球は島中心細胞の核周部ではなく, 主に索状細胞質突起を軸としてその周囲に集積し, 索状突起は赤芽球を補足するように先端が二分岐することもある (Fig. 4b).

考 察

成績に示したように, 骨髄の赤芽球島においては, 島中心細胞はその細胞表面に極めて多数の索状細胞質突起を有し, 周囲の赤芽球は島中心細胞の核周囲細胞体ではなく, 索状細胞質突起の周囲に集積・補足されている事が明らかになった.

古くから赤血球造血の形態学的単位として知

られる赤芽球島の形態について, Bessis¹⁾はヒト骨髄を透過型電子顕微鏡で観察し, 多数の細胞質突起を有する島中心細胞は星形の細胞輪郭を呈し, 赤芽球が島中心細胞の周囲に位置していることを報告している. 古典的な赤芽球島の形態モデルでは赤芽球が中心細胞の周囲に一重に並び, 赤芽球のリングが中心細胞の周囲に形成される¹⁾. 厚切り切片免疫染色法で報告したように^{7), 10)}, 胎子肝臓および脾臓の赤芽球島中心細胞は, 膜状の一次突起と一次突起から伸びる指状の二次突起が形成され, これらの突起により島中心細胞の細胞体にソケット状の構造が形成される. 赤芽球はこのソケット構造に格納されており, 胎子肝臓および脾臓では, これまでの赤芽球島の形態モデルとほぼ同様と見なすことができるが, 骨髄赤芽球島の形状は異なる.

Weiss²⁾は, ラット骨髄赤芽球島中心細胞を超微形態レベルで観察し, 赤芽球が赤芽球島中心細胞の窪みに抱えられていると報告している. また, Canevaら⁹⁾は, ヒト骨髄赤芽球島中心細胞を観察し, 島中心細胞が多数の突起を周囲の造血細胞間に伸ばしていることを報告しており, 突起により造血細胞を納める小腔が形成されることを述べている. Kashimura⁸⁾は, ラット骨髄の走査電子顕微鏡観察を行い, 島中

心細胞が舌状および翼状の突起により造血細胞を抱えていると報告し、骨髄における赤芽球島中心細胞の形態について、必ずしも見解は一致していない。今回の観察結果から、骨髄において赤芽球は島中心細胞の窩に格納されるのではなく、島中心細胞から伸展した複雑に迂曲する細長い索状の細胞質突起周囲に集まり、索状突起によって補足されていることが明らかになった。我々が行ったF4/80免疫染色によるパラフィン厚切り切片を用いて赤芽球島中心細胞の細胞輪郭全体を観察した本方法は、従来の方法に欠けていた視点を補う点で、その有用性を評価することが出来る。

すでに報告したように、造血開始期の骨髄では、細網細胞を中心に赤芽球が集積を始める。骨髄も含めて造血組織における赤芽球島中心細胞の共通した特徴は、細胞質に多数の一次および二次ライソゾームを含有することである⁴⁾。Wickramasinghe⁵⁾は、骨髄細網細胞を、貪食能を有する細網細胞と貪食能を持たない細網細胞

に分類し、貪食性細網細胞を赤芽球島中心細胞としている。既に報告したように、骨髄島中心細胞の細胞質には、加齢とともに特異的な形態の結晶様封入体が急速に増加する¹¹⁾。このような封入体の出現は胎子肝臓では報告されておらず、脾臓では出現するもののその数は極めて少ない¹¹⁾。胎子肝臓の赤芽球島は、胎性マクロファージの周囲に赤芽球が集合することにより形成される¹²⁾。胎子肝臓、脾臓および骨髄の赤芽球島中心細胞にみられるこのような形態学的な差異は、島中心細胞の前駆細胞の由来と密接に関連するとみなされよう。

謝 辞

川崎医科大学電子顕微鏡センターの須田泰司主任技術員、川崎医科大学解剖学教室の須田満寿美氏ならびに板野ちか子氏の技術援助に心から感謝する。本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費(NO. 18-215T, 19-204Y, 20-202S)の援助によって行われた。

References

- 1) Bessis MC : Living Blood cells and Their Ultrastructure. 1st ed, New York, Springer-Verlag. 1973, pp 87 - 89
- 2) Weiss L : The hematopoietic microenvironment of the bone marrow : an ultrastructural study of the stroma in rats. Anat Rec 186 : 161 - 184, 1976
- 3) Gulati GL, Ashton JK, Hyun BH : Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis. Hematol Oncol Clin North Am 2 : 495 - 511, 1988
- 4) Parveen T : Pathology of Bone Marrow and Blood Cells. 1st ed, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2004, pp 2 - 11
- 5) Wickramasinghe SN : Histology for Pathologists. 3rd ed, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2007, pp 799 - 836
- 6) 野津英司, 園田祐治, 佐々木和信 : 骨髄造血初期におけるF4/80陽性細網細胞とマクロファージの組織学的ならびに三次元立体構築による観察. 解剖誌 82 : 53 - 60, 2007
- 7) Sonoda Y, Sasaki K : Three-dimensional surface structure of macrophages in fetal and adult mouse liver : an immunohistochemical light microscopic study. Cells Tissues Organs 184 : 166 - 171, 2006
- 8) Kashimura M : Scanning electron microscopy studies of bone marrow. Scan Electron Microsc Pt 1 : 445 - 53, 1982
- 9) Caneva L, Soligo D, Cattoretti G, et al. : Immuno-electron microscopy characterization of human bone marrow stromal cells with anti-NGFR antibodies. Blood Cells Mol Dis 21 : 73 - 85, 1995
- 10) 園田祐治, 野津英司, 佐々木和信 : マウス造血組織における赤芽球島中心細胞の三次元立体構築による比較観察. 解剖誌 83 : 60, 2008

- 11) Sasaki K, Matsumura G, Ito T : Crystalloid-containing macrophages in the bone marrow and red pulp of the mouse, with particular relation to age, sex and hydrocortisone administration : qualitative and quantitative electron microscopy. Arch Histol Jap 46 : 381 - 391, 1983
- 12) 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