

ラット肺からの type II cell の単離法

川崎医科大学 人体病理学教室 II

山 成 憲 子, 小 林 博 久
真 鍋 俊 明, 山 下 貢 司

(昭和57年1月19日受付)

Isolation of Type II Cells from Rat Lung

Noriko Yamanari, Hirohisa Kobayashi
Toshiaki Manabe and Koshi Yamashita

Department of Human Pathology II
Kawasaki Medical School

(Accepted on January 19, 1982)

Type II cell 内で産生される surfactant の分析を行うためには、純度の高い type II cell 群を得なければならない。我々はラット肺を用いて、純度の高い type II cell の単離法を検討した。

方法は大きく分けて、I) 血液・肺胞内脱落細胞の除去、II) 上皮細胞の剝離、III) type II cell の単離の三段階に分けられる。III) において、Ficoll による比重遠心（比重1.070）のみで得られた type II cell の純度は 50.6% であり、他の報告と比べ低い値であった。ナイロンメッシュカラムと比重遠心を併用する方法では、純度は $75.6 \pm 8.0\%$ に上昇した。またナイロンメッシュカラムを用いることにより、surfactant 分析時に障害となる macrophage の混入を 30.8% から 1.5% に下げることができた。さらに比重液をアラビアゴムに変え、同様の操作を行うと、純度 $76.6 \pm 7.7\%$ 、type II cell 収穫数 $24.5 \pm 26.8 \times 10^5$ 個/2匹、viability $69.3 \pm 6.8\%$ を得た。

以上により、上皮細胞を剝離後、ナイロンメッシュカラムを通し、さらにアラビアゴム比重液で分離する方法が最良と考えられた。

In order to biochemically analyze surfactant materials produced by type II cells, high purity of isolated type II cells is required. The purpose of this communication is to describe our method of isolating type II cells from rat lung in high concentration.

The method consists of (I) elimination of blood cells and alveolar free cells, (II) detachment of epithelial cells, and (III) isolating of type II cells. Special attention was paid to (III). With Ficoll density centrifugation (density 1.070), the purity of type II cells was 50.6%, which was lower than the figures reported by other investigators. By using nylon mesh column before Ficoll density centrifugation, $75.6 \pm 8.0\%$ purity was obtained. Furthermore, several trials were done using gum arabic instead of Ficoll. Combination of nylon mesh column and gum arabic density centrifugation yielded the purity of $76.7 \pm 7.7\%$, total type II cell

number being $24.5 \pm 26.8 \times 10^5$ cells/2rats and viability $69.3 \pm 6.8\%$. The nylon mesh column was used to eliminate macrophages by adhesion. Thereby, we succeeded in reducing contamination by macrophages from 30.8% to 1.5%.

We consider the use of nylon mesh column to be a key in obtaining the high purity of type II cells.

I 緒 言

肺表面活性物質 (surfactant) は肺胞表面に存在し、表面張力を下げることによって呼吸時の肺胞虚脱を防ぐ物質である。諸々の研究の結果、肺胞表面に存在する type II cell が surfactant を合成し、分泌することが明らかになってきた。この直接的証拠は40種類以上の細胞から構成されている肺から、少数である type II cell を単離し調べることによって得ることができる。従って surfactant の産生部位、合成部位を調べるためには、type II cell の単離方法を確立することが必要不可欠と言える。また surfactant 分子とその機能の間には多少のギャップがあり、その差異を調べるためにも機能部位と産生部位での surfactant 成分を分離して調べる手段、つまり肺胞洗浄法 (alveolar wash) と type II cell 単離法とが必要とされる。

Type II cell 単離法については、すでに数種類の報告がある。1974年、Kikkawa and Yoneda¹⁾ はラット肺を使い初めて type II cell の単離に成功し、しかも95%の高純度で type II cell を単離可能と報告した。しかし、Masonら²⁾ はラット肺で、Pfleger³⁾ はハムスター肺で追試実験を行ない、高純度が得られない点、再現性が悪い点から改良を加え、それぞれ60~67%、67~72%の純度の単離方法を報告している。我々はいずれの方法をも試みたが、同様の単離率を得ることができなかった。Masonらの方法²⁾ では上皮細胞の剥離ができにくい点、また比重遠心時、いずれの方法の比重でも type II cell の純度が低かった点などからも、各研究室の状況に適合した単離方法を確立することが必要であると思われた。

この報告は、我々の研究室でのラット肺から

の type II cell の単離方法を述べたものである。上皮細胞を剥離後、ナイロンメッシュカラムを通し、更に比重1.070のアラビアゴム比重液で遠心単離する方法であるが、ほぼまちがいをなく76.6%の純度で type II cell を集めることに成功した。

II 材料及び方法

1) 試 薬

① solution A: 塩化ナトリウム 128 mM, 塩化カリウム 5 mM, リン酸緩衝液 2.5 mM, 塩化カルシウム 1.9 mM, 硫酸マグネシウム 1.2 mM, HEPES 緩衝液 17 mM, そしてグルコース 5.5 mM を含む溶液。pH は 7.4。

② solution B: solution A から塩化カルシウムと硫酸マグネシウムを除いた溶液。pH は 7.4。

③ 0.3%トリプシン溶液: トリプシン (1:250, Difco Lab.) を solution A に溶解し、デオキシリボヌクレアーゼ (DNase) (30 µg/ml) (Sigma Chemical Co.) を加えた溶液。

④ 0.1%トリプシンインヒビター溶液: soybean トリプシンインヒビター (Sigma Chemical Co.) を solution A に溶解し DNase (30 µg/ml.) を加えた溶液。

⑤ 1%硫酸バリウム浮遊液: 硫酸バリウム (レリーフ診断用、伏見製薬所) を solution A に浮遊させた。

⑥ Ficoll 比重液: Ficoll 400 (Pharmacia Fine Chemicals) を solution A に溶解し、必要とする比重に調整した。

⑦ アラビアゴム比重液: アラビアゴム粉 (Sigma Chemical Co.) 30 g を水 100 ml に溶解し、90°C 以上の湯浴中で15分間加温して泡を除く。室温まで冷やし、3,000 rpm, 15分遠

心後上清を採取する。15°C で水を加えて比重 1,090 に調整した後、飽和水酸化ナトリウムで pH 7.4 とする。浸透圧が 280~290 mOsm. になるように塩化ナトリウムを加えた後、使用比重に生食で調整した。

2) 単離操作及び比重の決定

150~250 g の Wistar 系雌ラット 2 匹を 1 回の実験に用いる。

体重 100 g あたり ペントバルビタール 0.15 ml (50 mg/ml) とヘパリン 0.15 ml (10,000 units/ml) を腹腔内注射し麻酔を行なう。麻酔後気管にカニューレを挿入し、開胸、腹部大動脈切断後、solution B で右心室より灌流を行なう。肺が白くなったら肺胞内の空気を抜き、カニューレを通して solution B で肺胞を洗浄する。その後 0.3% トリプシン溶液 10 ml を肺胞内に満たし、肺を胸腔から取り出しシャーレに移す。肺組織を気管支からはずし、ハサミで細切。その肺を 100 ml の三角フラスコに移しトリプシン溶液 20 ml と 1% 硫酸バリウム溶液 1 ml を加え、36°C 湯浴中で 20 分攪拌する。0.1% トリプシンインヒビター溶液 40 ml を加え、攪拌をやめ更に 20 分湯浴中に置く。組織細胞浮遊液はガーゼ、ナイロンメッシュ (メッシュ 150, 270) でろ過し、ろ液を 2,000 rpm, 15 分室温で遠心し、solution B で 1 回洗浄後再び浮遊させる。比重と混入細胞を検討した後は、細胞浮遊液をナイロンストッキングを充填したカラム (2×30 cm) に入れ、35°C で 20 分間静置後 solution B でカラム内の細胞を流出させ、2,000 rpm, 15 分間室温で遠心する。沈渣として回収した細胞は solution B 10 ml に浮遊させ Ficoll もしくはアラビアゴム比重液 15 ml に重層し、4°C で 2,000 rpm, 1 時間遠心する。遠心後、界面の細胞を吸引し solution A を加えて 2,500 rpm, 15 分間室温で遠心し、solution A でもう一度洗浄する。

比重遠心時の比重を決定するために、トリプシン処理で取り出した細胞浮遊液を、他の報告をもとに任意に選定した比重 1,059, 1,070, 1,074, 1,078 (4°C) の Ficoll 比重液あるいは

比重 1,070 (4°C) のアラビアゴム比重液に重層し分離する。分離された細胞に対し、それぞれ全細胞数、viability 及び type II cell の純度と細胞数を求める。

なお使用したガラス器具はすべてシリコン処理をしたものを用いた。

3) 同定及び細胞数の算定

Type II cell の同定は光学及び電子顕微鏡により行なった。光顕のレベルでは、smear を風乾した後マイヤーのヘマトキシリンで核染色 (15 分) を行ない、水洗、色出し (15 分) 後通常のパパニコロー染色を行ない検索した。電顕では、ペレット状の細胞を 3.5% グルタルアルデヒド・カコジレート緩衝液 (pH 7.4) と 1% 四酸化オスミウム・カコジレート緩衝液 (pH 7.4) で二重固定を行ない、アルコール、プロピレンオキシドで脱水後エポンに包埋した。超薄切片は酢酸ウラニウムとクエン酸鉛で二重染色し、Hitachi H-500 で検索した。

細胞の viability は trypan blue dye exclusion test で判定した。全細胞数は計算盤にて算定し、パパニコロー変法で染色した smear にて 500 細胞を検索して求めた type II cell の純度から type II cell 数を計算した。

III 結 果

1) 同 定

パパニコロー変法で染色した場合、濃青色の顆粒状物質を含む細胞を type II cell と同定

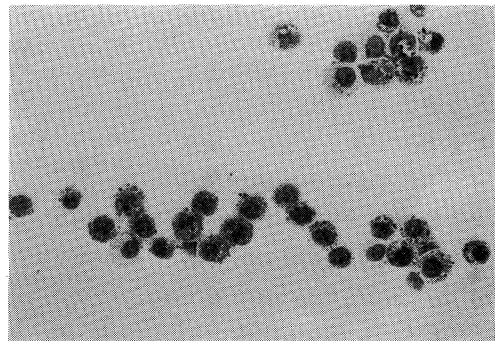


Fig. 1. Isolated type II cells. Note numerous dense granules with clear halo. (Modified Papanicolaou stain, original ×400)

した。この顆粒が濃青色に染まり、周囲に透明帯 (clear halo) を持っているのが特徴的であった。Macrophage と思われる細胞は、一般に、この顆粒状物質を有していない。このことは、alveolar wash 中の macrophage を同法で染めた場合に negative となることから明らかであった (Fig. 1)。

同時に得た電顕用切片の検索では定型的な lysosome を含まず、lamellar inclusion body を含有し、microvilli を持っていることを type II cell の条件として同定した (Fig. 2)。

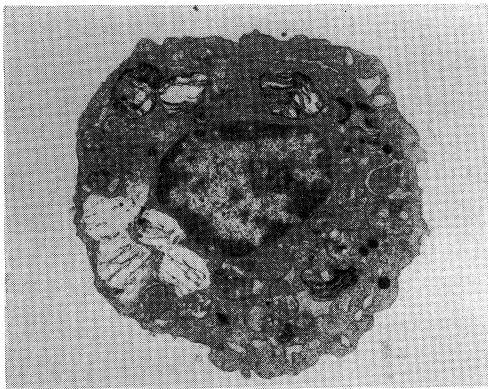


Fig. 2. Electron micrograph of a type II cell. ($\times 9000$)

両者 (光顕および電顕検索) における細胞率は同水準であったので、パパニコロー変法で同定した細胞が確かに type II cell であろうと見なしてよいと思う。以下の研究における type II cell 同定および算定はパパニコロー変法によった。

2) Type II cell 単離の比重決定

Fig. 3 に、トリプシン処理により肺から剝離された細胞を各 Ficoll 比重液で分離した結果を示してある。Type II cell の純度は比重 1,070 の時 50.6% であって最も良い値を示した。しかし、比重 1,074, 1,078 との間にそれほど差異はなかった。しかし、Type II cell の細胞数

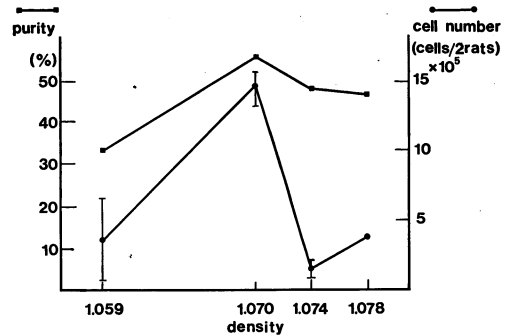


Fig. 3. Purity and cell number of type II cells at various densities.

については、比重 1,070 の時 14.6×10^5 個/2 匹であって、他の比重の時に比べ格段により収穫数を得た。

比重遠心前の細胞成分は主に type II cell, macrophage, lymphocyte と少数の ciliated cell が含まれていた。また、比重遠心後の主な混入細胞も macrophage と lymphocyte であった。

3) 混入細胞除去の検討

単離した type II cell を用いて surfactant の研究を行なうためには、type II cell と同大で、しかも同様のリン脂質 (大半は貪食物) を含んでいる可能性のある macrophage を十分除去しなければならない。我々は macrophage に硫酸バリウムを貪食させてから比重遠心法で除去する試みを行なったが、type II cell の純度が低く (50.6%)、Table 1 の左のように混

Table 1. Elimination of contaminating cells

	density centrifugation	nylon mesh column + density centrifugation
macrophages	62.2% (30.8)%	6.4% (1.5)%
lymphocytes	26.8 (13.2)	46.0 (10.8)
ciliated cells	2.7 (1.3)	35.2 (8.2)
unknown cells	8.3 (4.1)	12.4 (2.9)
total	100.0 (49.4)	100.0 (23.4)
	type II cell (50.6)	type II cell (76.6)
	total (100.0)	total (100.0)
number of type II cells	14.6 \pm 1.1 $\times 10^5$ cells/2rats	8.43 \pm 5.34 $\times 10^5$ cells/2rats

入細胞の大半が macrophage であった。Type II cell の純度を高める方法として、細胞浮遊液を遠心分離の前にナイロンメッシュカラムを通し、macrophage を除く操作を加えた後、遠心分離を試みた。その結果は **Table 1** の右の通りである。混入細胞中の macrophage の比率は、遠心分離だけの時の 62.2% からナイロンメッシュカラムと遠心分離併用の時には 6.4% と激減した。収穫した type II cell の細胞数は遠心分離だけの時には 14.6×10^5 個/2 匹、ナイロンメッシュカラムと遠心分離併用の時には 8.43×10^5 個/2 匹であった。

4) Type II cell の純度および viability (**Table 2**)

ナイロンメッシュカラムと遠心分離 (Ficoll 比重液) 併用により type II cell の純度は 50.6% から 75.6% に上昇し、全分離細胞中の macrophage の混入率は 30.8% から 1.5% に

Table 2. Comparison of the harvest of the type II cells by two different gradients

		Ficoll	Gum arabic
type II cell	purity (%)	75.6±8.0	76.6±7.7
	cell number ($\times 10^5$ cells/2rats)	8.43±5.34	24.5±26.8 38.0±30.3*
viability (%)		64.1±9.7	69.3±6.8

* number corrected by body weight and amount of available lung tissue

減少した。この時の細胞の viability は 64.1% であった。さらに viability を上げるために、比重液を Ficoll からアラビアゴムに変え、ナイロンメッシュカラムと遠心分離併用で分離を行なった。Viability は 69.3% で Ficoll 使用時より若干良かった。Type II cell の純度は 76.6% で Ficoll 使用時とほとんど差はなかったが、得られた type II cell の細胞収穫数は 24.5×10^5 個/2 匹で、Ficoll 使用の場合に比べ約 3 倍多数の type II cell を得た。これは、Ficoll による遠心分離だけの場合の細胞収穫数

(**Table 1** 参照: 14.6×10^5 個/2 匹) と比べても良い結果を得た。

IV 考 察

組織中に存在する多種類の細胞集団から一種類の上皮細胞だけを単離する場合には、技術上、種々の困難が存在するのは当然であり、肺組織から肺胞上皮細胞の一つである type II cell を単離する場合もその例外ではない。type II cell の単離法については、すでに数種類の報告^{1)~4)}がある。トリプシンを用いた肺胞洗浄液から type II cell を単離する方法⁴⁾もあるが、多くの場合、まず肺組織を細切する方法を伴う。この方が細胞を数多く集めることができ得るからである。

細胞単離法に伴う問題点としては、(1) 細胞の同定法、(2) 細胞収穫数、(3) 収穫細胞の純度、(4) 再現性、および (5) 収穫細胞の生存率 (viability) があげられる。Kikkawa and Yoneda¹⁾ が初めて用いたパバニコロー変法は、追試諸家の認める一番実用的信頼性のおける type II cell 同定法であり、我々の研究の結果もそれを支持する。優れた細胞単離法は、(2) から (5) の条件のすべてについて高い数値を与えるものである。Kikkawa and Yoneda の原法¹⁾では、収穫細胞数 4.0×10^5 cells/rat (100g)、純度 $95 \pm 3\%$ 、viability (trypan blue dye exclusion test) 95% を得るといふ。Mason ら²⁾ およびその他の人々は、これの追試実験を行ない、再現性が不良である事を知り、原法を改良し、Mason ら²⁾ は $8.3 \sim 8.8 \times 10^6$ cells/rat (180~250 g) の収穫数、65~67% の純度、Pfleyer³⁾ は 4×10^6 cells/syrian hamster (90~150 g)、67~72% の純度、Fisher and Furia⁵⁾ は 4×10^8 cells/g. of lung tissue、72.7% の純度を得たと報告している。

我々の研究室で、Kikkawa and Yoneda の第二法⁶⁾、Mason らの方法²⁾、Pfleyer の方法³⁾を試みてみたが、いずれも彼らの報告した収穫数、純度を得ることはできなかつた。それは手技の修熟度、使用する動物の種類・大きさ・購

入先の違い等にもよるが、研究室の環境、使用試薬の微妙な差が影響していると考えられる。故に、各研究室で実験条件に適合した単離方法を確立することが必要であると思われた。

単離法を改良するにあたって考慮に入れられたのは、すでに述べられた問題点の何を最も重要視するかということである。それは、この単離法を使用する研究者が、如何なる目的に単離した細胞を用いようとするかという点に焦点をあわせて吟味すべきである。我々は収穫数もさることながら、type II cell の純度を上げて、macrophage の混入をできるだけ避けることを第一目標とした。

我々の単離操作は、大別して、次の三段階に分けられる。

第一段階は血液、肺胞内脱落細胞の除去で、血液は灌流により、また脱落細胞は肺洗浄により除去することにした。血液除去の如何は、第二段階でのトリプシン作用に影響するし、脱落細胞の除去は、最終的な type II cell の純度を左右する。

第二段階では、トリプシン処理により細胞に damage を与えず、できるだけ多数の上皮細胞を剥離させることをねらった。トリプシン濃度は Mason ら²⁾ 同様 0.3% とし、トリプシン溶液を作用させる時には、細切した肺をトリプシン溶液に加え、攪拌しながら 36°C で 20 分間おくこととした。この方法で、他の報告者の方法では得にくい高い水準、すなわち収穫細胞数 $4.8 \sim 14.4 \times 10^7$ 個/2 匹を得ることができた。

第三段階においては、分離した諸細胞の中から type II cell だけを単離するのに努めた。4 種類の Ficoll 比重液で分離した結果は、比重 1.070 の時純度 50.6% で、しかも得られた type II cell の細胞数も 14.6×10^5 個/2 匹と最も良かった。しかし、surfactant の研究に支障をきたす macrophage が多く混入し、純度が良くなかった。その理由としては、(1) macrophage が type II cell とよく似た比重をもっていること、(2) macrophage にバリウムを貪食させ比重を大きくしてみても、すべての

macrophage が分離液以上の比重をもつようにはならないことがあげられる。比重を少し変化させたり、バリウム貪食時間を延ばしてみても、純度を上げることができなかった。そこで macrophage の粘着性に着目し、比重遠心の前にナイロンメッシュカラムを通してみることにした。これにより、type II cell の純度を 50.6% から 75.6% まで上昇させることに成功した。また macrophage の混入比率を 6.4%、つまり全細胞中のわずか 1.5% という低いところまで下げることができた。この時の viability は 64.1% で、ナイロンメッシュカラムの過程を用いなかった場合とかわらなかつた。Viability を上げるために、比重液を Ficoll から細胞毒性が少ないといわれるアラビアゴムに変え、同様の操作を行なったところ、type II cell の純度 76.6%、viability 69.3% (ごくわずかに viability の増加)、type II cell 収穫数 24.5×10^5 個/2 匹という成績を得た。収穫した type II cell の細胞数にばらつきが多いのは、動物の体重差や使用したラット肺に感染巣をもつものも実験に使用したためである。従って、切除した部分を考慮に入れ概算すると細胞数は 38.0×10^5 個/2 匹 (Table 2) となり、個々のラットでの収穫数のばらつきも少なくなることを付記しておきたい。

Trypan blue dye exclusion test による viability 測定については、疑問をもつ人も少なくないし、測定誤差も、判定基準や手技の修熟度などによってかなり左右される。故に、 O_2 消費、グルコース消費量などを行なって、さらに詳しく検討する必要はある。

最後に、トリプシン処理について意見を述べたい。トリプシンは細胞剥離の目的で使用されるが、細胞の機能にも影響を及ぼす。Finkelstein and Mavis²⁾ は、トリプシンを使って単離した type II cell では NADPH cytochrome c reductase 活性が 1/4 に低下したと報告している。従って、type II cell 単離法には、まだ種々な問題点が残されているといわねばならない。それぞれ目的に応じて、この方法を改良していかなければならないだろう。

ここで述べた単離法は、肺内の脂質の分析観察を type II cell 内における脂質の分析観察へというふうに、研究をマクロレベルから微小環境内レベルに推進させるのに役立つ。脂質代謝に介入する macrophage を 1.5% にひき下げ、type II cell 純度を 76% までも上昇させるのに成功した本法は、単離した type II cell 内ですでに合成された surfactant 脂質を、定性的ならびに定量的に研究する場合に活用されるべき手技として推奨に値するものと信ずる。

本方法を開発するために、我々は手技の三段

階の条件を上記述べたように一つ一つ吟味したが、type II cell を高い純度で多数収穫するのに成功したのは、細胞浮遊液をナイロンメッシュカラムにかけ、type II cell の収穫数を下げることなく、混入 macrophage をナイロンメッシュに効果的に吸着させて除去した結果であると思う。

本研究は川崎医科大学、昭和55年及び56年度プロジェクト研究費（55—709, 56—603）の援助を受けた。

文 献

- 1) Kikkawa, Y. and Yoneda, K.: The type II epithelial cell of the lung. I. Method of isolation. *Lab. Invest.* 30: 76—84, 1974
- 2) Mason, R. J., Williams, M. C., Greenleaf, R. D. and Clements, J. A.: Isolation and properties of type II alveolar cells from rat lung. *Am. Rev. resp. Dis.* 115: 1015—1026, 1977
- 3) Pfleger, R. C.: Type II epithelial cells from the lung of syrian hamsters: Isolation and metabolism. *Exp. mol. Pathol.* 27: 152—166, 1977
- 4) 城戸優光, 杉山浩太郎: 肺胞II型細胞の分離と培養. *日界面医誌* 8: 60—63, 1977
- 5) Fisher, A. B. and Furia, L.: Isolation and metabolism of granular pneumocytes from rat lung. *Lung* 154: 155—165, 1977
- 6) Kikkawa, Y., Yoneda, K., Smith, F., Packard, B. and Suzuki, K.: The type II epithelial cells of the lung. II. Chemical composition and phospholipid synthesis. *Lab. Invest.* 32: 295—302, 1975
- 7) Finkelstein, J. N. and Mavis, R. D.: Biochemical evidence for internal proteolytic damage during isolation of type II cell alveolar epithelial cells. *Lung* 156: 243—254, 1979