

被免疫ラットおよび幼体ラット脾臓の誘導能

鈴木明郎・川上 泉

福岡市 九州大学理学部生物学教室

昭和 38 年 3 月 18 日受領

種々の動物組織を両生類胚の予定表皮に作用させるとき、それぞれの組織は特定の部域性を持った誘導をおこす (Holtfreter, 1934; Chuang, 1938; Toivonen, 1940, 等)。これらの誘導物質がオルガナイザーの誘導物質と同質のものであるかどうかという点には多くの問題を残しているとしても、これらの研究は初期発生における誘導現象の解明に大きな手がかりを与えるものと考えられる。

ところで、誘導能の組織特異性、例えば、骨髄 (Toivonen, 1953, 等)、9日目の鶏胚汁 (Woellwarth, 1956; Kawakami *et al.*, 1960)、腹水肝癌 (Kawakami, 1958; Kawakami and Iyeiri, 1962a) 等が強い中胚葉性の誘導作用を持ち、肝臓 (Chuang, 1938, 等) が神経性の誘導能を持つこと、さらに X-線照射等の細胞分裂能を低下させるような処理によって骨髄の中胚葉性誘導能が神経性に変ること (Kawakami and Mifune, 1957) 等を考察するとき、一応、増殖性の組織は中胚葉性の誘導効果を持つ傾向にあり、逆に非増殖性のものはより神経性の傾向を持つように思える。このことに関して、Kawakami and Iyeiri (1960, 1962a) は神経性の誘導を引き起す ribosome と中胚葉性の誘導を引き起す新成構造蛋白のあることを指摘し、さらにこの新しく生産された構造蛋白はある条件の下で神経性に变化し、さらには誘導能を失う可能性があるとして述べている。

もし、上述したごとく増殖性の組織、すなわち、蛋白合成の盛んな組織が非増殖性の組織より強い中胚葉性の誘導能を示すことが正しいとすれば、抗原刺激に反応して細胞分裂による肥大を示す抗体形成の場でもある脾臓は抗体生産の過程において、より中胚葉性の誘導能を獲得し、さらに幼体の脾臓はその増殖性のゆえに成体のものより強い中胚葉性の誘導能を示すものと考えられる。従って、本実験ではこの予想の正しいかどうかを証明しようとした。

材料および方法

試料組織を得るために、同じ親から生まれた雌で

体重 120g 程度の成体ラット (Wistar-King) を使用した。抗原としては 0.14M NaCl に懸濁したアルブミンを用い、Freund adjuvant と一緒に抗原量が 120mg になるように筋肉に注射し、その後 10 日目に同じ方法で第一回目の半量の抗原を再び注射した。脾臓はこの後 4 日目に切り取り、重さを測定した後 90% alcohol で固定した。なお、幼体の脾臓としては生後 2 日目のものを使用した。

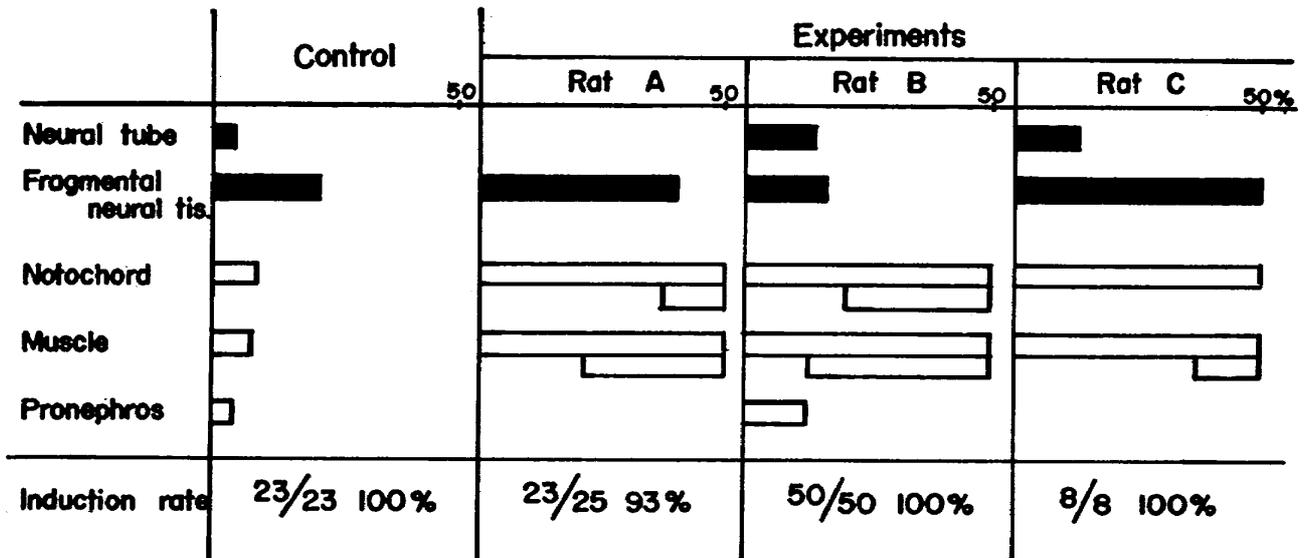
誘導実験は *Triturus pyrrhogaster* の原腸胚予定表皮で試料組織を包み、外植法で培養した。脾臓は alcohol で固定してあるため、予定表皮に包む前に Holtfreter の液中で十分に洗い、リンパ球に富む白色脾髄とその間質部、すなわち赤色脾髄とに分けて誘導原としたが、幼体の脾臓ではこれらの分離が困難であったためそのまま使用した。外植体は 9 日間 22°C で培養した後ブアン氏液で固定した。外植体はボラックス・カーミンで全体染色し、パラフィン切片にした後、さらにブラウシュワルツで B 染色した。

結 果

抗原を注射された 3 匹の動物はいずれも、予想された如く、脾臓の異常肥大を示した。すなわち、対照の脾臓が 0.55g 以下であったのに対して、実験動物では 0.75—1.00g の値を示した。その組織学的観察では赤色脾髄・白色脾髄共に細胞数の著しい増加が見られ、特に、前者における細網内皮系の発達は良く、分裂も盛んであった。一方、幼体の脾臓は赤色脾髄と白色脾髄の明確な区別はなく、erythrolytic function と共に myeloid function もあり、従って、myeloid elements も多く、分裂も盛んである。

誘 導 実 験

1) 赤色脾髄の場合：正常な成体ラットの赤色脾髄は髄尾的誘導能を示すことが Iyeiri and Kawakami (1962) によって報告されている。彼等の実験によると、23例中 5 例に神経組織が見られ、それぞれ 1 例づつ神経管を伴った脊索と筋肉および前腎を伴った脊索が見られた。その他の外植体は 1 例の筋節を除いては、未分化な中胚葉性細胞を含むだけである。

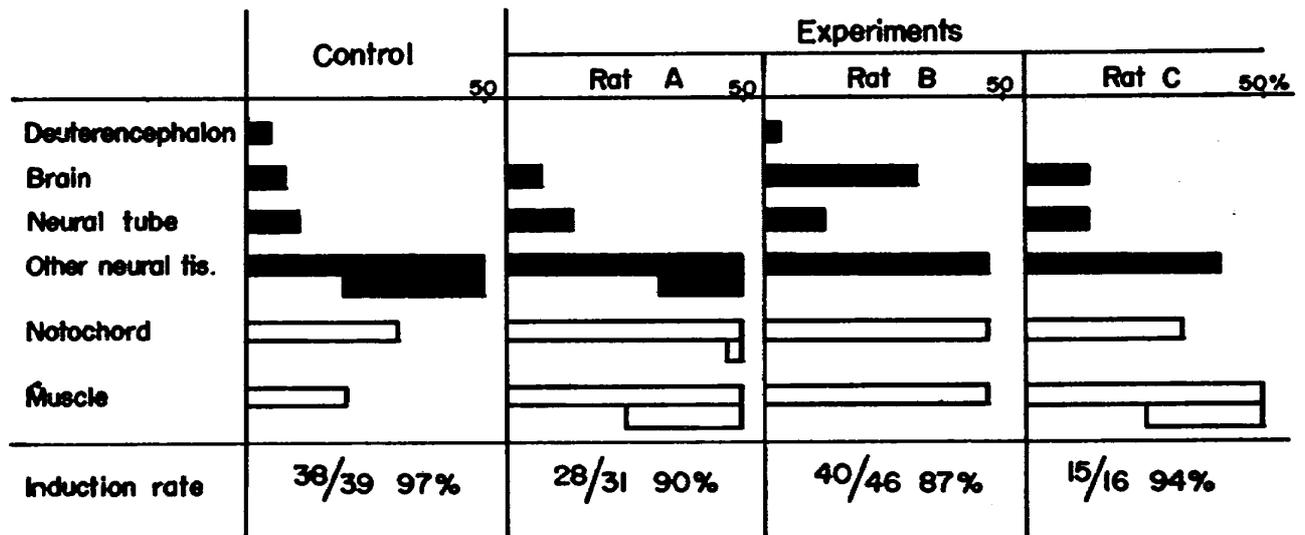


第1図 正常成体ラット脾臓及び被免疫ラット脾臓の赤色脾臓による誘導。
図は誘導されたものの百分率を示す。

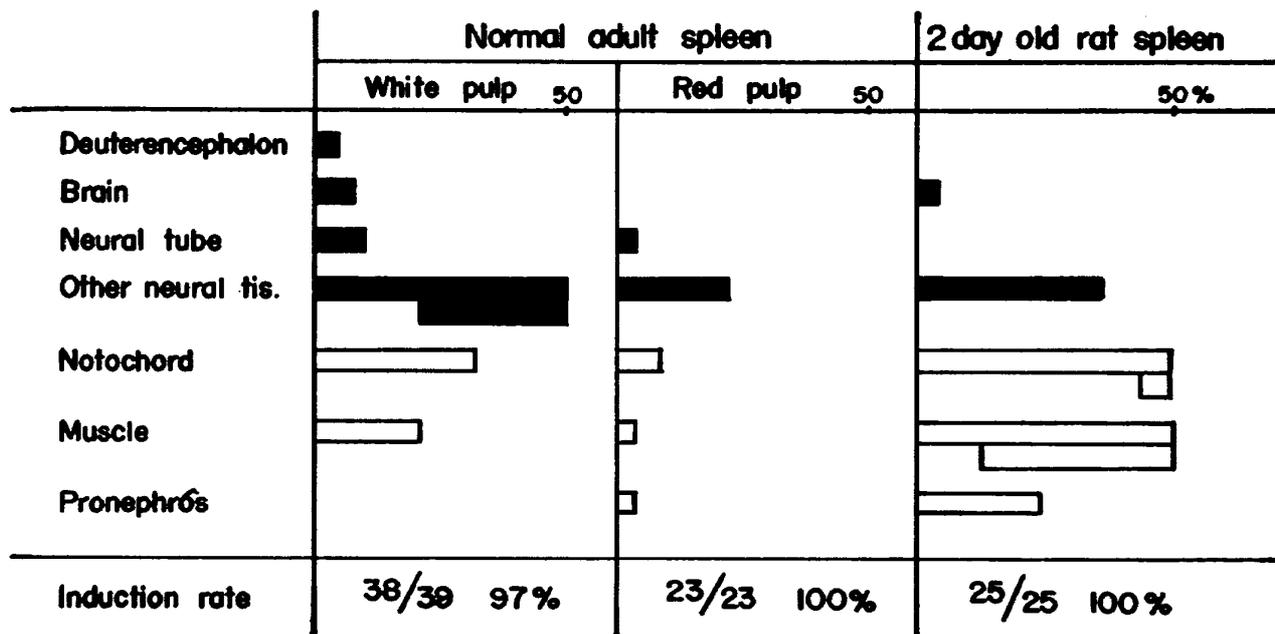
一方、免疫された3匹のラットから得られたものでは正常に比較して良く分化した組織を誘導し、強い中胚葉性の誘導能を示した。しかも、第1図でもわかるように個体による誘導能の差はほとんどなかった。ラットAの場合を例に取つて、その誘導分布を説明すると、23例中9例に神経組織が見られたが、いずれも脊索もしくは筋肉等の中胚葉組織に伴つて誘導された。筋原細胞・筋肉および筋節等明らかに中胚葉性組織と同定出来るものは79%の高頻度で誘

導され、その大部分は筋肉であった。このように赤色脾臓は免疫化されることによって非常に強い中胚葉性の誘導能を獲得するようになることを示している。

2) 白色脾臓の場合: 結果は第2図に示されるように、一見しては著しい誘導能の差が対照と実験群との間に見られないようであるが、詳細に検討すると中胚葉性の誘導能にかなりの差があることがわかる。ラットBの場合を例にとると、対照と比較して



第2図 正常成体ラット脾臓及び被免疫ラット脾臓の白色脾臓による誘導。
図は誘導されたものの百分率を示す。



第3図 正常成体ラット及び幼体ラット脾臓による誘導。
 図は誘導されたものの百分率を示す。

神経性の誘導にはほとんど変化はないが、脊索の誘導は対照が32%に見られるのに対して、ラット B の場合には54%の率で誘導されている。さらに筋肉および筋節等の中胚葉性の誘導像は対照では20%の外植体に見られるが、実験では46%で約2倍の率で誘導されている。即ち、正常な白色脾臓の誘導能が頭髄尾的であるのに対して、免疫化されたものでは髄尾的となり、より神経性の弱い誘導能を示すようになる。

3) 幼体脾臓の場合：幼体の脾臓は非常に強い中胚葉性の誘導能を示した。神経性の誘導像は25例中10例に見られたが、その分化は貧弱で分化した脳は1例(4%)だけであつた。一方、中胚葉性の組織は22の外植体(88%)に誘導され、その大部分は筋肉組織であつた。また、脊索も56%の率で誘導された。従つて、幼体の脾臓は骨髄に似た強い中胚葉性の誘導能を持つものである。

考 察

中胚葉性誘導因子は神経性のものに比較して不安定であり、物理的・生理的条件のもとでより変化し易いことが指摘されている。Chuang (1940)によると、マウス腎臓の中胚葉母細胞誘導因子は数分間100°Cで処理することによって消失するが、神経性

誘導因子には変化がない。Yamada (1958)も同様の熱処理によって強い中胚葉性の誘導能をもつモルモット骨髄がより多くの神経組織を誘導するようになることを報告している。また、X-線処理、nitrogen mustard-N-oxide 処理によつてモルモット骨髄の誘導能は神経性に移行することが知られている(Kawakami and Mifune, 1957)。一方、正常の肝臓組織の誘導能は強い神経性で中胚葉組織をほとんど誘導しないのであるが、腹水肝癌組織では中胚葉性の組織をかなりの程度に誘導することが Kawakami and Iyeiri (1962a) によつて報告されている。

X-線処理および nitrogen mustard-N-oxide 等による処理によつて、骨髄の誘導能が前述した如く変化することはこの組織の分裂活性の変化、即ち低下に起因するものように思える。このことはX-線照射(500 r)によつてマウス骨髄の分裂指数がいちじるしく減少すること(Karfeel, 1961)、骨髄(Toivonen, 1953)や9日目鶏胚汁(Kawakami and Iyeiri, 1960; Kawakami et al., 1960, 1961)等の増殖性組織が中胚葉性の誘導能を持ち、肝臓等の非増殖性組織が神経性の誘導能を持つことによつて支持され得る。

本実験の結果もこのような観点から説明され得る

ものと考えられる。すなわち、被免疫ラットの赤色脾臓がより中胚葉性の強い誘導能を示したことはこの組織の分裂活性の増加によるものであろう。このことは被免疫ラットの脾臓が対照に比較して40—80%の肥大を示し、組織学的にもその細網内皮系がいちじるしく発達していること、および抗原注射後3日目にはその分裂指数が対照の2倍以上の値を示す組織学的観察(著者未発表)によつて支持される。

一方白色脾臓の場合、その大きさの増大と数の増加にもかかわらず、その誘導能が予想ほど中胚葉化しなかつたのであるが、このことは同じ増殖性であると思える他のリンパ組織が強い神経性誘導能を示すこと(Kawakami and Iyeiri, 1962)と併せ考えると、リンパ組織の誘導能について今後例外的なものとして考察する必要があることを示している。

生後2日目の幼体脾臓はいまだ赤色脾臓・白色脾臓の明確な分化が見られず、また、機能的にも erythrolytic function を有すると共に myeloid function も強く myeloid elements を多量に含んでいる。従つて、強い増殖活性を示している組織であることが考えられる。このことによつて幼体脾臓の骨髓にも似た強い中胚葉性の誘導能は説明され得る。

以上のような本実験の結果は、これらの組織の分裂活性の増加、すなわち、その結果として生産される新生蛋白によるものと考えられるが、白色脾臓の場合を考えると、増殖性と共に細胞生理学的特異性をも考慮される必要性のあることが暗示される。

ともあれ、この実験結果について答えらるべき多くの問題を残しているとしても、癌組織(Kawakami and Iyeiri, 1962 a)、再生肝(Kawakami and Iyeiri, 1962 b)等と同様に、このような実験は組織のもつ誘導物質の細胞生理的役割を分析するのに手掛りを与えるものと信ずる。

要 約

1) アルブミンを抗原として免疫化された成体ラットの脾臓と幼体の脾臓の誘導効果を正常な成体ラットの場合と比較して、その変化を細胞生理学的観点から考察した。

2) 被免疫化ラットの脾臓は重さにおいて60—80%の増加を示し、それに伴つて、その誘導能は中胚葉化の傾向を示した。特に、赤色脾臓においてはそ

の傾向がいちじるしく、対照が髓尾的な誘導を示すのに対して実験群は非常に強い中胚葉性の誘導効果を与えた。

3) 幼体の脾臓は骨髓に似た非常に強い中胚葉性の誘導能を示した。

4) 以上の結果から、免疫化された脾臓の、特に、赤色脾臓の誘導能がより中胚葉化したこと、幼体の脾臓が成体のものより強い中胚葉性の誘導能を示したことはそれらの細胞増殖性に関係づけて考えられる。

文 献

- CHUANG, H. H. (1938) Spezifische Induktionsleistungen von Leber und Niere im Explantationversuch. *Biol. Zentrbl.* 58: 472-480.
- (1940) Wertere Versuche über die Veränderung der Induktionsleistungen von gekochten Organteilen. *Roux' Arch.* 140: 26-38.
- HOLTFRETER, J. (1934) Über die Verbreitung induzierender Substanzen und ihre Leistungen im Tritonkeim. *Roux' Arch.* 132: 307-383.
- IYEIRI, S. AND I. KAWAKAMI (1962) Inductive effect of various rat tissues upon amphibian presumptive epidermis. *Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ.*, ser. E. 3: 117-147.
- KARFEEL, Z. (1961) Changes in mitotic index. The incidence of chromosomal aberrations and proportion of mitotic phases in the bone marrow of mouse irradiated with different doses of X-ray. *Folia Biologica.* 7: 129-136.
- KAWAKAMI, I. (1958) Inductive effect of rat ascites hepatoma on the amphibian competent ectoderm. *Gann.* 49: 177-191.
- , AND S. IYEIRI (1960) Separation of embryonic inductive agents from the non-ribonucleoprotein fraction of chick embryo extract. *J. Exp. Zool.* 145: 243-250.
- , —— (1962a) Comparative analysis of inductive agents in rat normal liver and ascites hepatoma. *J. Exp. Zool.*, 149: 117-126.
- , —— (1962b in press) Inducing capacities of regenerating rat liver with special reference to those of cell components. *Embryologia.*
- , —— AND A. MATSUMOTO (1961) Embryonic inductions by microsomal fractions

- separated with sodium deoxycholate. *Embryologia*. 6: 1-12.
- , ———— AND N. SASAKI, (1960) Analysis of inductive agents in chick embryo extract using *Triturus gastrula* ectoderm as reactor. *J. Exp. Zool.* 144: 33-42.
- AND S. MIFUNE (1957) Studies on the inductive effects on amphibian embryos of fresh mouse tissues. II. Modification of the inductive effect of tissues by total body X-irradiation. *Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ.*, ser. E. 2: 149-158.
- TOIVONEN, S. (1940) Über die Leistungsspezifität der abnormen Induktoren im Implantationsversuche bei Triton. *Ann. Acad. Sci. Fenn.*, A, 55: 7-150.
- (1953) Bone marrow of the guinea pig as a mesodermal inductor in implantation experiments with embryos of *Triturus*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1: 96-104.
- WOELLWARTH, C. V. (1956) Die induzierende Wirkung von rohem, flüssigem Hühnerembryonalextrakt auf Gastrulaektoderm von Triton. *Roux' Arch.* 148: 504-517.
- YAMADA, T. (1958) A progressive change in regional inductive effects of the bone marrow caused by heat-treatment. *Embryologia*. 4: 175-190.
- ABSTRACT** SUZUKI, A. AND I. KAWAKAMI (Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka) Modification of the Inducing Capacity of Rat Splenic Tissue by Immunizing Donor Animals. *Zool. Mag.* 72:

110-114. (1963)

It is known that animal tissues have the capacity to induce tissue differentiation when they act upon amphibian presumptive ectoderm, and that the inductive effects are characteristic for each tissue. It is also well known that the mesoderm-inducing effect is unstable and becomes modified to a neural-inducing state under certain conditions, such as heating and X-ray irradiation. Such a modification of a tissue-specific inductive capacity by physiological conditions adds special interest to a search for the cyto-physiological meaning of the inductive agents in adult mammalian cells. In order to discover the relation between cell multiplication in animal tissues and the nature of its inductive effect, the present experiment was performed using as inductor splenic tissues removed from rats immunized against albumin and a 2-day-old rat.

The spleen of immunized rats was hypertrophied (about twice as heavy as that of a normal rat), and the inductive effect of the tissue had changed to become more mesodermal, especially in the case of red pulp (Fig. 1). The spleen of the 2-day-old rat also gave a stronger mesodermal effect than the adult tissue (Fig. 3).

These results are discussed in connection with the multiplicative activity of the immunized rat tissues; that is, the authors conclude that the increase in mesoderm-inducing effectiveness might be due to protein newly produced as the result of an increase in cell division activity. (Received March 18, 1963)