

Staphylococcus aureus Cowan I株(SpA  
CoI)刺激によるBリンパ球の形質細胞への分化に関する研究：形態学および免疫生化学的検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9064">http://hdl.handle.net/2297/9064</a>

# Staphylococcus aureus Cowan I 株 (SpA CoI) 刺激による Bリンパ球の形質細胞への分化に関する研究

—形態学および免疫生化学的検討—

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 服部絢一教授)

山 村 真 由 美

(昭和58年2月25日受付)

Mitogen 刺激のもとで、形質細胞が Bリンパ球より分化することを確認するために、本研究を行った。T-cell independent の B-cell specific mitogen かつ polyclonal B-cell activator として知られる Staphylococcus aureus Cowan I (以下 SpA CoI と略) を用いて、ヒト末梢血 Bリンパ球を 7~10 日間培養した。この間出現する細胞を、光学、位相差及び電子顕微鏡下で経時的に観察した。並行して、<sup>3</sup>H-thymidine (以下 <sup>3</sup>H-TdR と略) の取り込み率、免疫グロブリン産生細胞 (immunoglobulin producing cell, 以下 Ig-PC と略) 数及び上清 Ig 量を測定した。予備実験より、いろいろの濃度の Tリンパ球は、SpA CoI 刺激のもとで 3 日間培養時の Bリンパ球の <sup>3</sup>H-TdR の取り込み率にも、7 日間培養時の Ig-PC 数及び上清 Ig にも影響を与えないことがわかった。これらの観察は、十分に SpA CoI が T-cell independent の B-cell mitogen であることを立証した。リンパ芽球様細胞は 3 日目より増加し、5 日目に最高値 (約 68%) を占めたが、その後急速に減少した。他方、小~中リンパ球は、上述したようなリンパ芽球様細胞の変動状態と鏡像を示めず経時変化を呈した。少数の形質細胞様細胞が 5 日目より出現し、7 日目に最高値 (約 25%) に達した。形質細胞様細胞は以下のような形態学的特徴を備えていた。つまり、ギムザ染色上は、核周明庭をもつ強い好塩基性に染まる細胞質、偏在性の粗剛な核網をもついわゆる“車軸状の核”の特徴を示し、電子顕微鏡下では、形質細胞に特徴的なよく発達した粗面小胞体とその一部の内腔の拡張が認められた。さらに、免疫生化学的にも、これらの形質細胞様細胞が細胞質内に Ig を保有し、培養上清中に Ig を遊出することを確認した。以上の結果から、T-cell independent の B-cell specific mitogen である SpA CoI 刺激のもとで、Bリンパ球が形質細胞へ分化することが強く示唆された。

---

**Key words** Staphylococcus aureus Cowan I strain (SpA CoI), B lymphocyte, Plasma cell, Immunoglobulin, Electron microscopy.

---

形質細胞が免疫グロブリン (immunoglobulin, 以下 Ig と略) を産生する細胞であることはよく知られていることである<sup>1)2)</sup>。形質細胞の発生由来に関しては、従来より間葉結合織由来説<sup>3)4)</sup>とリンパ球由来説<sup>5)</sup>とがあるが、免疫学の発達に伴い、最近では、形質細胞をはじめ抗体産生細胞のほとんどが、Bリンパ球に由来するものと考えられている。Bリンパ球は、生体の免疫反応の中で、抗原情報の伝達を受け、増殖、分化し形質

細胞へと変化し、抗体を産生して抗原の処理を行うと推定されている<sup>6)9)</sup>。

生体内のリンパ球の免疫反応の解明の一手段として、種々の細胞分裂促進物質 (mitogen) が用いられ、とくに、Bリンパ球の成熟過程の in vitro での解明には、従来より pokeweed mitogen (以下 PWM と略)<sup>10)~13)</sup> がよく使用されている。しかし、その解析には主に免疫生化学的方法が用いられ、mitogen を使用しての B

---

In Vitro Development of Plasma Cells from B Lymphocytes Following the Stimulation with Staphylococcus Aureus Cowan I Strain (SpA CoI). Morphological and Immunohistochemical Study. **Mayumi Yamamura**, Department of Internal Medicine (III), Director: Prof. K. Hattori, School of Medicine, Kanazawa University.

リンパ球の分化成熟過程を、形態学的に詳細に観察した報告はきわめて少ない。わずかに、Douglasら<sup>14)15)</sup>がPWM刺激のもとでリンパ球を培養して電子顕微鏡的観察を行い、リンパ球と形質細胞の関係を示唆しているにすぎない。しかし、PWMはT cell dependentのB cell mitogenであるため、必ずしもBリンパ球のみの変化を観察しているとは限らない。したがって、形質細胞がBリンパ球由来であることを確認するためには、Bリンパ球のみを選択的に刺激するT cell independentのB cell specific mitogenが必要となる。最近、このようなmitogenとして、Nocardia water soluble mitogen (以下NWSMと略)<sup>16)</sup>、Bacterial lipopolysaccharide (以下LPSと略)<sup>17)</sup>、Staphylococcal protein A (以下SpAと略)<sup>18)</sup>等が知られるようになった。とくに、SpAについては、1976年Forsgrenら<sup>18)</sup>がprotein Aを豊富に保有するStaphylococcus aureus Cowan I株 (以下SpA Colと略)がT cell independentのB cell specific mitogen活性のあることを報告して以来、Ringdén<sup>19)</sup>、Romagnani<sup>20)21)</sup>、Kasahara<sup>22)23)</sup>などにより検討され、polyclonal B cell activatorとしての作用も有することが明らかにされてきている。

本研究は、Douglasら<sup>14)15)</sup>が報告したリンパ球と形質細胞の関係を形態学的に、より明確にするために行われた。まず、SpA Colが前述のようなT cell independentのB cell specific mitogenかつpolyclonal B cell activatorであることを確認した。その後、これをmitogenとしてヒト末梢血Bリンパ球を刺激し、Bリンパ球が形質細胞へと分化する過程を、光学顕微鏡、位相差顕微鏡、及び電子顕微鏡により観察した。その結果、形質細胞のBリンパ球由来を、形態学的に強く示唆する所見が得られたので報告する。

### 材料及び方法

#### I. リンパ球の分離とT及びBリンパ球の精製法

正常人よりヘパリン加静脈血を採取し、carbonyl-ironを10%加え、37°C、60分間振盪後、貪食細胞を磁石で除去した。次に、Ficoll-Conray (比重1.077)比重遠心法にてリンパ球を分離、pH 7.3のリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, 以下PBSと略)で3回洗浄後、RPMI-1640培地に再浮遊し、未分画リンパ球を得た。トリパンブルー染色による生細胞率は98%以上であった。得られた未分画リンパ球についてノイラミニターゼ処理羊赤血球<sup>24)</sup>を用いて、Eロゼット法を2回行い、pellet及び中間層より精製T、Bリンパ球を得た。

#### II. T及びBリンパ球の同定法

上記の操作により得られた、T及びBリンパ球の純度の検定は、Tリンパ球についてはEロゼット形成細胞数<sup>25)</sup>、Bリンパ球については蛍光抗体法による細胞表面Ig陽性細胞数<sup>26)</sup>の算定により行った。なお単球の混入は、ペルオキシダーゼ染色反応<sup>27)</sup>により算定を行った。その結果、精製Tリンパ球分画ではEロゼット形成細胞は96%以上、細胞表面Ig陽性細胞は3%以下、単球の混入は0.5%以下であった。精製Bリンパ球分画では細胞表面Ig陽性細胞は94%以上、Eロゼット形成細胞は5%以下、単球の混入は2%以下であった。以上より、T及びBリンパ球はそれぞれ十分に精製されていると考えられた。

#### III. 培養方法

培養は抗生剤(ペニシリン100 $\mu$ /ml、ストレプトマイシン100 $\mu$ g/ml)、2-メルカプトエタノール(終濃度 $5 \times 10^{-5}$ M)を含む10%FCS加RPMI-1640培地にて行った。DNA合成測定には、マイクロプレート法を、上清中のIg量の測定及び形態学的観察には試験管法を用い、培養は37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%airの培養恒温器中で行った。

DNA合成の測定には、マイクロウェル中にリンパ球浮遊液を0.2mlずつ分注し、mitogenを加え、培養終了後16時間前に<sup>3</sup>H-thymidine (以下<sup>3</sup>H-TdRと略)を0.5 $\mu$ Ci加えた。次に、semiautomatic multiple sample precipitatorにより、リンパ球をWhamann口紙上に集め、口紙を一昼夜60°Cにて乾燥の後、シンチレーション液(DPO 5g+POPOP 100mg/lトルエン)8mlに溶解させ、取り込まれた<sup>3</sup>H-TdRを液体シンチレーションカウンターで測定した。放射活性はcounts per minute (以下cpmと略)とstimulation index (以下S.I.と略、S.I.=mitogen添加時の<sup>3</sup>H-TdRの取り込み率/mitogen非添加時の<sup>3</sup>H-TdRの取り込み率)で表わした。

#### IV. SpA Colに対する基礎的条件の検討

SpA Colは笠原ら(自治医科大学、医動物学教室)より提供されたLOT-808を用いた。

##### 1. SpA Colの至適濃度の検討

SpA Colの至適濃度を決定するために、 $1 \times 10^5/0.2$ mlのリンパ球に、0.001から0.005、0.01、0.05及び0.1% $v/v$ までの各濃度のSpA Colを5 $\mu$ l加え、マイクロプレート上で3日間培養し、<sup>3</sup>H-TdRの取り込み率を検討した。その結果、図1に示すように0.001~0.005% $v/v$ の間でdose response curveを描いて<sup>3</sup>H-TdRの取り込み率が増加したので、0.005% $v/v$ を至適最終濃度として以下の実験を行った。

##### 2. 至適リンパ球数の検討

SpA Col刺激における至適リンパ球数を定めるため、

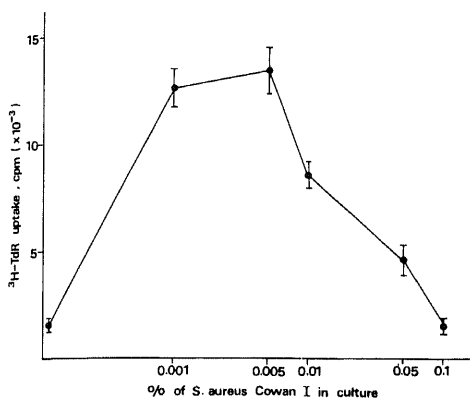


Fig. 1. Effect of SpA Col of different concentrations on <sup>3</sup>H-TdR uptake by B lymphocytes on day 3 of culture.

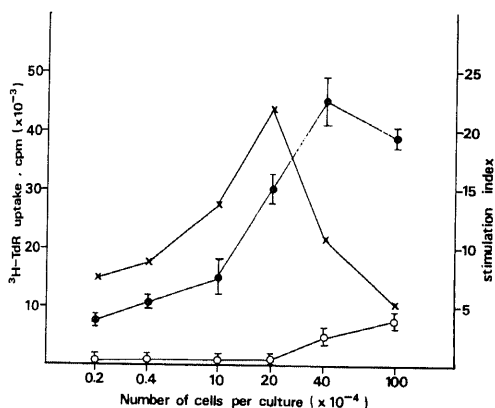


Fig. 2. Effect of B lymphocytes of different number on <sup>3</sup>H-TdR uptake and stimulation index (S.I.) on day 3 of culture with and without SpA Col. ●: <sup>3</sup>H-TdR uptake with SpA Col. ○: <sup>3</sup>H-TdR uptake without SpA Col. ×: S.I.

マイクロプレート法を用い、Bリンパ球を1ウェル(0.2 ml)当り、 $2 \times 10^3$ から $1 \times 10^6$ 個までの各細胞数に調整して、これにSpA Colを0.005% $v/v$ になるように加え、SpA Colに対する反応性をみた。図2に示すように、リンパ球数を増加させると<sup>3</sup>H-TdRの取り込み率は上昇するが、同時にbackgroundも増加することから、cpmが高値を示し、かつS.I.の高い $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5/0.2 \text{ ml}$  ( $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ )の間を至適細胞数とした。以下の実験で、DNA合成の測定には $1 \times 10^5/0.2 \text{ ml}$ を、上清Ig定量と形態学的観察の培養には $1 \times 10^6/\text{ml}$ を用いた。

#### V. 免疫グロブリン産生細胞 (Ig producing cell, 以下Ig-PCと略)の算定法

Kearneyら<sup>28)</sup>の方法により、蛍光抗体法で細胞質内Igを染色した。すなわち回収したBリンパ球をPBSにて細胞数を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、スライドガラスに塗抹した。その後冷風下で乾燥し、5%水酢酸加エタノールで $-20^\circ\text{C}$ 、20分間固定、さらに、冷PBSで充分洗浄の後、FITC標識ヤギ抗ヒトIg血清(PBSで40倍希釈にて使用)で $37^\circ\text{C}$ 、1時間染色し、再びPBSで洗浄した。蛍光顕微鏡下で500~1,000個観察し、蛍光の認められる細胞を数え、百分率を算定し、回収された細胞数よりIg-PC数を絶対数として表わした。

#### VI. 培養上清Igの定量法

抗体吸着ラテックス液(抗IgG-L, 抗IgM-L)を用いて、笠原ら<sup>29)</sup>の方法でラテックス凝集反応(Latex Fixation Test, 以下LFT法と略)により培養液中に産生されるIgMとIgGを半定量した。すなわちPBS(pH 7.3)で適宜希釈した培養上清100  $\mu\text{l}$ を反応板にとり、これに、抗Ig-Lを50  $\mu\text{l}$ 加え反応板をゆるやかに動かしながら3分間混和した。反応板に生じるラテックス粒子の凝集状態を観察し、凝集の見られなくなった段階前の検体の希釈倍数を凝集終値とし、標準抗原液であらかじめ求められた抗Ig-Lの感度に乗じてIgの濃度を算定した。

#### VII. SpA ColのB cell specific mitogenとしての評価

SpA ColがB cell specific mitogenであることを確認する目的で、次の実験を行った。

##### 1. SpA ColのB cell mitogenとしての作用の検討

精製Bリンパ球を $1 \times 10^5/0.2 \text{ ml}$ に調整後、これに0.005% $v/v$ のSpA Colを加えて培養し、3、5及び7日目に<sup>3</sup>H-TdRの取り込み率を測定した。

##### 2. SpA Colのmitogen作用に対するTリンパ球の影響の検討

精製したBリンパ球数を $1 \times 10^5/0.2 \text{ ml}$ に一定にして、これにTリンパ球数を、 $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 及び $1 \times 10^5$ と漸次増加して加え、0.005% $v/v$ のSpA Colの存在下で、3日間培養、一定数のBリンパ球に対するTリンパ球の影響を<sup>3</sup>H-TdRの取り込み率で検討した。

#### VIII. SpA ColのT cell independentのpolyclonal B cell activatorとしての評価

SpA ColがT cell independentのpolyclonal B cell activatorであることを確認する目的で次の実験を行った。

##### 1. SpA Colのpolyclonal B cell activatorとしての作用の検討

精製Bリンパ球を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、これに

0.005% $\nu$ のSpA Colを加えて培養し、3日、5日、7日及び10日目に、Ig-PC数の算定と共に、培養上清のIg量を測定した。

## 2. SpA Colの polyclonal activator 作用に対する T リンパ球の影響の検討

精製した B リンパ球数を  $1 \times 10^6$ /ml に一定にして、これに T リンパ球を  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  及び  $1 \times 10^6$  と漸次増加して加え、0.005% $\nu$ の SpA Col の存在下で、7日間培養し、一定数の B リンパ球に対する T リンパ球の影響を上清 Ig 量で検討した。

## IX. 経時的形態学的観察

培養3、5及び7日目にリンパ球浮遊液を回収して、1,000 rpm, 5分間遠心して得られた pellet を以下の形態学的観察に供した。

### 1. ギムザ染色による観察

血液塗抹標本作製の要領で標本を作製し、ギムザ染色を行い、リンパ球の形態学的変化を観察した。

### 2. 位相差顕微鏡による影響

位相差観察用の薄層標本を作製し、直ちに位相差顕微鏡（日本光学製、対物レンズ dark medium $\times 40$ ,  $\times 100$ , 緑色フィルター使用）下で観察し、ネオパン F を使用し写真撮影を行った。

### 3. 電子顕微鏡による観察

pellet 上に5%グルタルアルデヒド液を滴下し、2時間4°Cで浸漬固定したのち、PBS (pH 7.3) 中で資料を細切し、1%オスミウム酸液にて2時間、後固定した。引き続き順次高濃度のエタノール系で脱水し、エポキシ樹脂にて包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を行い、日本電子 J.E.M.-100 B 電子顕微鏡で観察し、写真を撮影した。

## X. 形態学的なリンパ芽球様細胞の出現率(芽球化率, %)

電子顕微鏡を用いて、細胞100個を観察し、その細胞質、核の大きさや形、N/C比、核クロマチンの形態、核小体からリンパ芽球様細胞の出現率(芽球化率, %)を算定した。

## XI. 形質細胞様細胞の出現率の算定

電子顕微鏡を用いて、細胞100個を観察し、その細胞質内のGolgi装置、粗面小胞体の発達程度および配列状態、核の位置、核クロマチンの形態より、形質細胞様細胞の出現率(%)を算定した。

## 成 績

### I. SpA Col の B cell specific mitogen としての評価

1. SpA Col の B cell mitogen としての作用 (図3)

精製 B リンパ球に SpA Col を加えて培養し、経時的に $^3\text{H}$ -TdR の取り込み率をみると、3日目で最大の取り込み率を示した (図3)。

### 2. SpA Col の mitogen 作用に対する T リンパ球の影響の検討

次に、一定数の B リンパ球に、T リンパ球数を漸次増加して加え、再構成した、精製 T, B リンパ球の混合系を3日間培養すると、図4に示すように、 $^3\text{H}$ -TdR の取り込み率は T リンパ球の存在に影響を受けず一定であり、SpA Col が直接 B リンパ球を刺激する T cell independent の B cell specific mitogen であることが確認された。

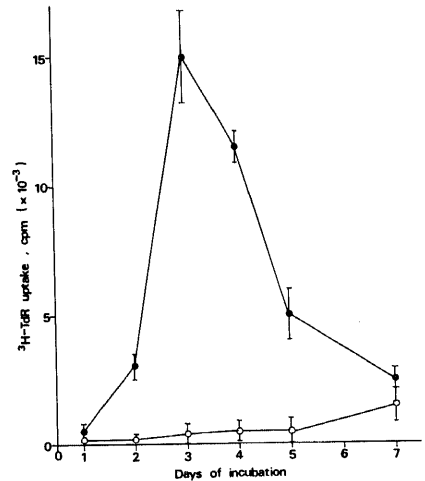


Fig. 3. Sequential changes in  $^3\text{H}$ -TdR uptake by B lymphocytes. ●:  $^3\text{H}$ -TdR uptake with SpA Col. ○:  $^3\text{H}$ -TdR uptake without SpA Col.

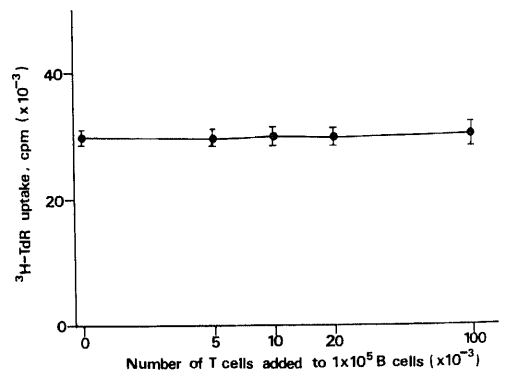


Fig. 4. Effect of T lymphocytes of different number on  $^3\text{H}$ -TdR uptake on day 3 of B lymphocytes culture with SpA Col.

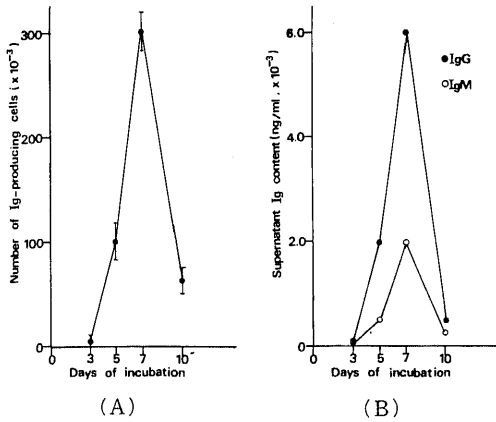


Fig. 5. Sequential changes in Ig-producing cells (A) and Ig content (B) in the supernatant of B lymphocytes culture with SpA Col.

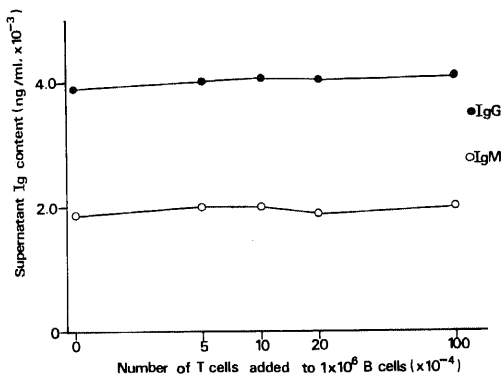


Fig. 6. Effect of T lymphocytes of different number on Ig content in the supernatant on day 7 of B lymphocytes culture with SpA Col.

## II. SpA Col の T cell independent の polyclonal B cell activator としての評価

1. SpA Col の polyclonal B cell activator としての作用の検討 (図 5)

精製 B リンパ球に SpA Col を加え、3日、5日、7日及び10日間培養し、出現する Ig-PC 数 (IgA + IgM + IgG) ならびに培養液中に産生される Ig (IgG または IgM) 量を測定すると、共に5日目で増加しはじめ、7日目で最大になり、以後急速に減少した (図 5)。なお、精製 T リンパ球分画には、Ig-PC 及び上清 Ig は検出されなかった。

2. SpA Col の polyclonal activator 作用に対する T リンパ球の影響の検討 (図 6)

次に一定の B リンパ球に、T リンパ球数を漸次増加

して加えて再構成した、精製 T、B リンパ球の混合系を7日間培養した。図 6 に示すように、上清 Ig 量は、IgM、IgG ともに T リンパ球の存在に影響を受けず一定であり、SpA Col が B リンパ球を直接刺激する T cell independent の B cell activator であることが確認された。

## III. 経時的形態学的変化

1. ギムザ染色所見 (図 7)

3日目：リンパ球は大型化し、細胞質は好塩基性に染まり、核網は繊細で、核小体の明瞭なリンパ芽球様細胞が目立つようになった (図 7-a)。一部の細胞では細胞質内に空胞が見られた (図 7-b)。

5日目：3日目に見られたようなリンパ芽球様細胞のほかに、さらに大型化したリンパ芽球様細胞が増加した (図 7-c)。また、少数ながら、細胞質がより好塩基性に染まり、多少の核周明庭、核の偏在をみ、核網は繊細で核小体を有する未熟な形質細胞様の細胞が出現し始めた (図 7-d)。

7日目：リンパ芽球様細胞は減少し、小型化し、粗な核網を呈した成熟リンパ球に近い細胞が増加した (図 7-e)。しかし、細胞質の強い好塩基性、著明な核周明庭、核の偏在、車軸状の粗剛な核網等で特徴づけられる成熟した形質細胞様の細胞が多数認められるようになった (図 7-e, f)。

2. 位相差顕微鏡所見 (図 8)

3日目：細胞質、核ともに大型化し、細胞質内に光輝性顆粒をもち、核網は繊細で、核小体の明瞭なリンパ芽球様細胞が多くなった。細胞質には偽足様突起が認められ運動性に富んでいた (図 8-a, b)。

5日目：細胞質、核はさらに大きくなり、細胞質内の光輝性顆粒は増加し、細胞質の偽足様突起のより著明なリンパ芽球様細胞が増加してきたが、運動性は3日目に比べて不活発になった (図 8-c)。しかし一部には、細胞質内に桿状の糸粒体が発達し、核は偏在性だが、クロマチン凝集は弱く、核小体の認められる未熟な形質細胞様細胞が出現し始めた (図 8-d)。

7日目：細胞質、核は小型化し、クロマチン凝集の強い成熟リンパ芽球様細胞が多く認められるようになった。同時に、細胞質内に桿状を呈した多数の糸粒体が Golgi 野を取り囲むように噴水状に配列し、核は偏在性で、核の辺縁にクロマチン凝集の強い、成熟した形質細胞様細胞が多数認められるようになった。これらの細胞では、細胞質の偽足様突起はほとんど認められなかった (図 8-e)。この頃になると少数ながら、多数の細胞も認められるようになった (図 8-f)。

3. 電子顕微鏡的所見 (図 9~11)

3日目：ギムザ所見及び位相差所見と同様に、大型

化したリンパ芽球様細胞が目立つようになった。このような細胞では、細胞質、核ともに大型化し、細胞質内の構造は、多数の比較的大きな楕円形ないし類円形の糸粒体と散在性に少数の小管状あるいは小空胞状を呈する粗面小胞体が認められる程度で単純であった。しかしポリゾームは大量に認められた。核は変形したものが多く、クロマチンは凝集を示さず、核小体は明瞭であった(図9-a, b, c, d)。

5日目: 3日目に見られたような大型のリンパ芽球様細胞(図10-a, b)のほかに、細胞質や核は大型であるが、細胞質内には、層板状配列を呈するよく発達した粗面小胞体が見られ、クロマチンが核膜の辺縁部にやや凝集する傾向を示す未熟な形質細胞様細胞が認められるようになった(図10-c, d)。

7日目: 細胞は全体に小型化し、リンパ芽球様細胞は減少した。一方、細胞質内に粗面小胞体の発達が比較的弱い未熟な形質細胞様細胞と考えられるものから、Golgi装置及び粗面小胞体の発達の著しい、成熟した形質細胞と考えられるものまで、種々の成熟段階の形質細胞様細胞が増加した。図11-aに未熟な形質細胞様細胞を示すが、このような細胞では、細胞質内に、小管状あるいは小空胞状を呈する粗面小胞体は比較的多数存在するが、層板状配列を示すものは少なかった。核はほぼ中央にあり、クロマチン凝集は弱く、核小体も明瞭であった。図11-bには図11-aに示した細胞よりやや成熟した、中間移行段階にあると考えられる形質細胞様細胞を示した。すなわち、このような細胞では、細胞質内に層板状配列を示すよく発達した粗面小胞体が認められ、クロマチン凝集も著明であるが、核小体はまだ明瞭であった。図11-c, dには、成熟した形質細胞様細胞を示した。これらの細胞では、細胞質、核はともに小型化し、細胞質内に比較的多数の糸粒体、よく発達したGolgi装置、Golgi装置を除く細胞質全域に層板状配列を示す著しく発達した粗面小胞体が見られた。核は偏在し、クロマチンは核膜辺縁に凝集し、いわゆる車軸状構造を呈し、核小体は認められなかった。

#### IV. 形態学的観察による、リンパ芽球様細胞及び形質細胞様細胞の出現率の経時的変化(図12)

培養リンパ球は上述したような形態学的特徴から次の3群、すなわち1)群: 非芽球化細胞と思われる直径5~8 $\mu$ の小あるいは中リンパ球、2)群: 芽球化細胞と思われる直径15~30 $\mu$ の大型のリンパ芽球様細胞、3)群: 分化した細胞と思われる直径10~20 $\mu$ の形質細胞様細胞に大別できた。これらの3群の細胞の経時的変化は、図12に示した。3日目には小あるいは中リンパ球は35~45%、リンパ芽球様細胞は55~65%を占め、

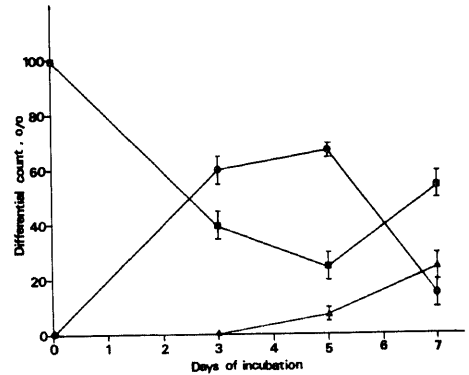


Fig. 12. Sequential morphological changes in B lymphocytes in culture with SpA Col. ■: lymphocytes ●: lymphoblastoid cells. ▲: plasmacytoid cells.

形質細胞様細胞は見られなかった。5日目には小あるいは中リンパ球は20~30%、リンパ芽球様細胞は65~70%、形質細胞様細胞は5~10%を占めた。7日目には小あるいは中リンパ球は50~60%、リンパ芽球様細胞は10~20%となり、一方、形質細胞様細胞は20~30%と増加した。

#### V. 形態学的観察によるリンパ芽球様細胞及び形質細胞様細胞の出現率と免疫生化学的成績の対比(図3, 図5, 図12)

$^3\text{H-TdR}$  取り込み率により、DNA合成の経時的変化を見ると、3日目には $^3\text{H-TdR}$ の取り込み率は最高となった。一方、形態学的に観察し、算定したリンパ芽球様細胞の出現率はこれより少し遅れ、5日目で最高に達した。3日目には、Ig-PC及び上清Igの出現はほとんど認められず、形態学的にも全く認められなかった。5日目には、Ig-PC及び上清Igが増加しはじめるのに並行して、形態学的にも未熟な形質細胞様細胞が出現しはじめ、5~10%を占めるようになった。その後急速にIg-PC及び上清Igが増加し、7日目で最高になった。同時に形態学的にも形質細胞様細胞の占める割合が20~30%と急激に増加した。

#### 考 察

形質細胞が蛋白合成能を持つことは、従来より、大型のGolgi装置を有すること、あるいは、この細胞が炎症あるいは腫瘍化した時に、Russell小体を含有することからも、想定されていた。1955年Coonsら<sup>11)</sup>により、蛍光抗体法を用いて、抗体産生細胞内における特異抗体の局在性が観察され、その細胞が形質細胞であることが報告されて以来、種々の検討が加えられた。

今日では形質細胞が抗体を産生する細胞であることは異論のないところである<sup>2)</sup>。

形質細胞の発生由来に関しては、前述のように、間葉結合織由来（骨髄網内系細胞由来）とリンパ球由来がある。前者には Rohr<sup>3)</sup>に代表される網内系の幼若細胞より発生するという説と、天野<sup>4)</sup>に代表される細血管周囲の外膜細胞から発生するという説の2説がある。後者は Michels<sup>5)</sup>により提唱されたものであるが、これら両説とも、あくまで形態学的観察のみで推測の域をでなかった。しかし近年の免疫学の発達に伴い、リンパ球は、機能の相異から、B リンパ球と T リンパ球に分けられるようになった。とくに B リンパ球の機能分化については、Preud'homme<sup>6)</sup>、Parkhouse<sup>7)</sup>、Vitteta<sup>8)</sup>、Howard<sup>9)</sup> 多くの人の業績により、B リンパ球が抗原刺激をうけて機能的分化をとげ、Ig を産生するようになるという考えが、ほぼ定着してきたが、まだ完全な解明をみたわけではなかった。このような B リンパ球の機能的分化の研究過程において、ヒトでは *in vitro* における抗体産生系を確立することが必要であった。1960年、Nowell<sup>10)</sup>が植物の種子より抽出された赤血球凝集素 (Phytohemagglutinin, 以下 PHA と略) 添加により、培養リンパ球が芽球化をおこすことを報告した。以来、種々のリンパ球の芽球化、分化、成熟を促進する物質が知られるようになり、ヒトの *in vitro* における抗体産生系が確立できるようになった。この中で、非特異的な B リンパ球の activator として、PWM が従来、*in vitro* でのヒトの B リンパ球の機能分化の解析のモデル<sup>10)11)</sup>として、多く用いられてきた。しかし、その後、PWM で誘導される B リンパ球の Ig 産生細胞への分化には、T リンパ球の関与が必要であることが判明した<sup>12)13)</sup>。形質細胞が B リンパ球由来であることを直接証明するためには、T リンパ球を含まない実験系で、T cell independent の B cell specific mitogen, 例えば、NWSM<sup>14)</sup>、LPS<sup>17)</sup>、SpA<sup>18)~23)</sup>等を用いる必要性がでてきた。今日では、これらの mitogen を加えた培養系で B リンパ球を培養すると、細胞内 Ig や培養上清中 Ig の増加が免疫生化学的に証明されたことから、B リンパ球から形質細胞が分化するものと推定されている。一方、B リンパ球の分化に関する形態学的な研究は、それ程多くはない。Douglas<sup>14)15)</sup>は未分画リンパ球と T cell dependent の B cell mitogen である PWM を用いた培養系の細胞につき、経時的形態学的な変化を観察して、形質細胞の B リンパ球由来を示唆している。しかし形態学的変化と免疫生化学的变化の対比検討は行っていないので、彼等の結論は推測の域をでていないと言える。

かかる観点から、著者は、mitogen として T cell

independent の B cell specific mitogen かつ polyclonal B cell activator である SpA Col と T リンパ球を除いた B リンパ球とを用いて培養し、形態学的変化と共に、免疫生化学的变化も追求することにより、B リンパ球と形質細胞の関係を解明しようと企てた。

まず、SpA Col が T cell independent の B cell specific mitogen かつ polyclonal B cell activator であることを確認するために、精製 T, B リンパ球を分離し、一定数の B リンパ球に、T リンパ球を漸次増加して加えた T, B リンパ球の再構成系を作製した。これに SpA Col を加えて培養し、3日後、DNA 合成を<sup>3</sup>H-TdR の取り込み率で、また免疫能は7日間培養後、蛍光抗体法で Ig-PC 数を、LFT により上清中に遊出した Ig 量を測定することにより検討した。その結果、T リンパ球を増加しても、<sup>3</sup>H-TdR の取り込み率、Ig-PC 数、Ig 量は一定であった。これは SpA Col が T リンパ球の存在により影響を受けない、すなわち T cell independent の B cell specific mitogen であり、かつ polyclonal B cell activator であることを<sup>18)23)</sup>明示している。

次に、精製 B リンパ球に SpA Col を加え培養し、3, 5, 7 日後にそれぞれ培養リンパ球を取り出し、経時的な形態学的変化と共に、<sup>3</sup>H-TdR の取り込み率、Ig-PC 数及び上清の Ig 量の変動を追求した。その結果、出現する細胞は次の3群、すなわち形態学的には 1) 芽球化しない小~中リンパ球、2) 大型のリンパ芽球様細胞、3) 中~大型の形質細胞様細胞に大別できた。小~中リンパ球は図 12 に示すように、培養3日目には約 40% に減り、5日目には、さらに減って約 25% となるが、7日目には約 56% と増加した。この小~中リンパ球の変動は、SpA Col により芽球化しないもの、芽球に転化したもの、芽球化細胞の小型化したもの<sup>31)</sup>の代数的総和であろう。大型のリンパ芽球様細胞については、上述の小~中リンパ球の変動曲線とほぼ鏡像を示したが、3日目の大型細胞はギムザ染色上では、リンパ芽球の特徴を具備し、位相差顕鏡下では、偽足様突起を出没させ、運動性に富むことが確認された。電子顕微鏡下では、多くの、比較的大きな楕円状ないし類円形の糸粒体と散在性に少数の小管状あるいは小空胞状の粗面小胞体が認められた。5日目には、細胞はより大型化し、運動性は不活発になる傾向が認められ、培養7日目には、やや小型化した。

一般に、リンパ球培養では、DNA 合成は、培養 24 時間<sup>32)</sup>から 36 時間<sup>33)</sup>で開始され、細胞分裂は 42 時間から 48 時間に始まり、72 時間で最高値を示す<sup>34)</sup>と言われている。本実験でも、<sup>3</sup>H-TdR の取り込み率は培養3日目



DNA 合成が形態学的変化に先行するという結果が得られた。

形質細胞様細胞に関しては、図 12 に示すように、培養 3 日目には、全く出現せず、5 日目に少数現われ、7 日目に約 25% と増加した。培養 5 日目に現われた形質細胞様細胞は、ギムザ染色上、好塩基性に染まる細胞質、比較的狭い核周明庭、比較的大きな偏在性の核、明らかな核小体を含む繊細な核網等の特徴を示し、未熟な形質細胞と思われた。これを電子顕微鏡下で観察すると、細胞質内には、形質細胞に特徴的な粗面小胞体の層板状配列が認められ、またクロマチンが核膜の辺縁に凝集する傾向が見られた。培養 7 日目には、ギムザ染色上、核周明庭の著明化、核の小型化、核網の粗剛化等、成熟した形質細胞の特徴を備えた細胞が多数観察された。位相差顕微鏡下では、Golgi 野を取り囲むように噴水状に配した多数の糸粒体<sup>35)~38)</sup>が見られた。また、電子顕微鏡下では、細胞質内に比較的多数の糸粒体、よく発達した Golgi 装置、粗面小胞体の層板状配列等が認められ、特に粗面小胞体の一部の内腔が、拡張し、中に無定物質の充満する像もみられた<sup>39)~42)</sup>。クロマチンの核膜辺縁の凝集はさらに著明となり、成熟した形質細胞に類似した核構造を示した。培養 7 日目には、上述した成熟形質細胞様細胞に混じて、Golgi 装置、粗面小胞体、核クロマチンの未発達な、未熟な形質細胞と思われる細胞を含め、種々の成熟段階の形質細胞様細胞が、同時に認められた。

以上の SpA Col を用いた培養系で出現する 3 種類の細胞の形態学変動については、培養日数に差はあるものの、PWM を使用した Douglas ら<sup>14)15)</sup>の成績にほぼ一致している。すなわち、彼等は、培養 60~72 時間目で、リンパ芽球様細胞の出現率が最大となり、全体の 50~60% に達するが、そのような細胞に混じて未熟な形質細胞様細胞も見られることを報告している。さらに 7~10 日目には、形質細胞様細胞が 10~20% を占めるようになることを認めている。しかし彼等は既述のように、形質細胞様細胞を Ig 産生能で確かめてはいない。

この形態学観察と同時に測定した Ig-PC 数と上清中 Ig 量については、図 5 に示すように形質細胞様細胞の出現に一致して、培養 3 日目には全く認められず、5 日目に増加し始め、7 日目に急増してピークに達し、10 日目には減少を示した。in vivo と違って 10 日目に Ig-PC 数と上清中 Ig 量が減少したことは、今後検討を要するが、今のところ培養日数が長くなるにつれ、形質細胞様細胞の変性が起ったためではないかと考えている。

in vitro において、SpA Col 刺激のもとで培養した

B リンパ球の形態学的変化を検討した結果、B リンパ球が形質細胞様細胞へと培養 5 日目頃から分化を開始し、また、7 日目の培養系では、未熟なものから成熟したものまで、種々の成熟段階の形質細胞様細胞が混在することを観察した。同時に、免疫生化学的にもこれらの形質細胞様細胞は Ig 産生能があることを確認した。以上の観察により、形質細胞が B リンパ球由来であることを証明した。

## 結 論

免疫反応系における形質細胞の B リンパ球由来説を確かめる目的で、T cell independent の B cell specific mitogen かつ polyclonal B cell activator である SpA Col を用いて、T リンパ球を除いた B リンパ球を 7~10 日間培養し、この間に現われる細胞を、光学顕微鏡、位相差顕微鏡、及び電子顕微鏡下で観察した。同時に<sup>3</sup>H-TdR の取り込み率、Ig-PC 数、培養上清中の Ig 量を測定し、これらの成績を、対比検討することにより、出現した細胞の同定を行い、次の結果を得た。

1. 観察期間中に培養系に出現する細胞としては小~中リンパ球、大型のリンパ芽球様細胞、ならびに中~大型の形質細胞様細胞の 3 群が区別された。
2. リンパ芽球様細胞は 3 日目より急激に増加し、5 日目には最高値(約 68%)を示し、その後、急速に減少したが、他方小~中リンパ球の変動状態は、ほぼリンパ芽球様細胞の変動曲線と鏡像を示した。
3. 形質細胞様細胞は培養 5 日目に少数出現し、7 日目に最高値(約 25%)に達した。この細胞は、ギムザ染色所見、位相差ならびに電子顕微鏡的所見、及び免疫グロブリン産生能によって同定されたが、この細胞の変動曲線が培養上清中の免疫グロブリン量とよく相関を示したことも、この細胞の免疫グロブリン産生能を示す一証とみなされる。

以上の結果は、SpA Col 刺激のもとで、B リンパ球が芽球化して、多クローン性の免疫グロブリンを産生する形質細胞へ分化していく過程を明示するもので、形質細胞の B リンパ球由来を示唆した。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師服部純一教授に深甚の謝意を表します。また直接、御指導、御援助を戴いた中村忍講師ならびに輸血部原田実根講師をはじめ、第 3 内科 3 研グループの諸先生及び教室員の皆様深く感謝いたします。最後に多大な御助言や、貴重な SpA Col、抗体吸着ラテックス液を提供していただきました、自治医科大学医動物学教室の笠原先生ほか教室員の皆様心から御礼申し上げます。なお本論文の要旨は、第 44 回日本血液学会総会(1982 年)、及び第 23 回日本臨床細胞学会総会(1982 年)において発表しました。

## 文 献

- 1) Coons, A. H., Luduc, E. H. & Connolly, J. M.: Studies on antibody production. I. Method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.*, **102**, 49-60 (1955).
- 2) 渡辺慶一: 抗体産生細胞の機能と形態学的識別. 代謝, **14**, 2089-2102 (1977).
- 3) Rohr, K.: Blut- und Knochenmarksmorphologie der Agranulocytosen. (Ergebnisse fortlaufender Sternalmarkuntersuchungen). *Folia Haemat.*, **55**, 305-367 (1936).
- 4) 天野重安・平田もとゑ・藤井淳子: 炎症細胞に関する研究, 第4報, 血管外膜細胞からの形質細胞形成について. 日病会誌, **34**, 26-27 (1944).
- 5) Michels, N. A.: Plasma cell; critical review of its morphogenesis, function and developmental capacity under normal and under abnormal conditions. *Arch. Path.*, **11**, 775-793 (1931).
- 6) Preud'homme, J. L., Brouet, J. C. & Seligmann, M.: Membrane-bound IgD on human lymphoid cells, with special reference to immunodeficiency and immunoproliferative diseases. *Immunol. Rev.*, **37**, 127-151 (1977).
- 7) Parkhouse, R. M. & Cooper, M. D.: A model for the differentiation of B lymphocytes with implications for the biological role of IgD. *Immunol. Rev.*, **37**, 105-126 (1977).
- 8) Vitetta, E. S. & Uhr, J. W.: IgD and B cell differentiation. *Immunol. Rev.*, **37**, 50-88 (1977).
- 9) Howard, M. C., Fidler, J. M., Baker, J. & Shortman, K.: Antigen-initiated B lymphocyte differentiation. XIII. Different B cell subsets give different AFC-production kinetics and respond in different functional assays. *J. Immunol.*, **122**, 309-319 (1979).
- 10) Schmidtke, J. R. & Dixon, F. J.: Immune response to a hapten coupled to a nonimmunogenic carrier. *J. Exp. Med.*, **136**, 392-397 (1972).
- 11) Wu, L. Y. F., Lawton, A. R. & Cooper, M. D.: Differentiation capacity of cultured B lymphocytes from immunodeficient patients. *J. Clin. Invest.*, **52**, 3180-3189 (1973).
- 12) Fauci, A. S. & Pratt, K. R.: Activation of human B lymphocytes. I. Direct plaque-forming cell assay for the measurement of polyclonal activation and antigenic stimulation of human B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **144**, 674-684 (1976).
- 13) Keightley, R. G., Cooper, M. D. & Lawton, A. R.: The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. *J. Immunol.*, **117**, 1538-1544 (1976).
- 14) Douglas, S. D., Hoffman, P. F., Borjeson, J. & Chessin, L. N.: Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro: III. Fine structural features of lymphocyte transformation by pokeweed mitogen. *J. Immunol.*, **98**, 17-30 (1967).
- 15) Douglas, S. D. & Fudenberg, H. H.: In vitro development of plasma cells from lymphocytes following pokeweed mitogen stimulation: A fine structural study. *Exp. Cell Res.*, **54**, 277-279 (1968).
- 16) Lethibichthuy, Ciorbaru, R. & Brochier, J.: Human B cell differentiation. I. Immunoglobulin synthesis induced by Nocardia mitogen. *Eur. J. Immunol.*, **8**, 119-123 (1978).
- 17) Melchers, F., Braun, V. & Galanos, C.: The lipoprotein of the outer membrane of Escherichia coli: A lymphocyte mitogen. *J. Exp. Med.*, **142**, 473-482 (1975).
- 18) Forsgren, A., Svedjelund, A. & Wigzell, H.: Lymphocyte stimulation by Protein A of Staphylococcus aureus. *Eur. J. Immunol.*, **6**, 207-213 (1976).
- 19) Ringdén, O., Rynnel-Dagöö, B., Waterfield, E. M., Möller, E., Möller, G.: Polyclonal antibody secretion in human lymphocytes induced by killed staphylococcal bacteria and lipopolysaccharide. *Scand. J. Immunol.*, **6**, 1159-1169 (1977).
- 20) Romagnani, S., Amadori, A., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Maggi, E. & Ricci, M.: Different mitogenic activity of soluble and insoluble Staphylococcal protein A (SpA). *Immunology*, **35**, 471-478 (1978).
- 21) Romagnani, S., Del Prete, G. F., Maggi, E., Falagiani, P. & Ricci, M.: T cell independence of immunoglobulin synthesis by human peripheral blood lymphocytes stimulated with SpA-containing staphylococci. *Immunology*, **41**, 921-927 (1980).
- 22) Kasahara, T., Kin, K., Itoh, Y., Kawai, T., Morita, M. & Shioiri-Nakakano, K.: Cellular cooperation in lymphocyte activation. I. Cooperative and noncooperative responses of human T and B lymphocytes to various mitogens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **58**, 260-273 (1979).

- 23) Kasahara, T., Harada, H., Ogata, K., Kawai, T. & Shioiri-Nakano, K.: Stimulation of immunoglobulin production from human B lymphocytes by *Staphylococcus aureus*. Effects of monocytes and ConA-induced suppressor cells. *Microbiol. Immunol.*, **25**, 1345-1356 (1981).
- 24) Galili, U. & Schlesinger, M.: The formation of stable E rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or sheep red blood cells. *J. Immunol.*, **112**, 1628-1634 (1974).
- 25) 矢田純一・橘武彦: ヒトリンパ球 subpopulation の分別. ヒツジ赤血球結合性リンパ球と補体結合性リンパ球の証明法. 免疫実験操作法 A, 451-454 (1972).
- 26) Papamichail, M., Brown, J. C. & Holborow, E. J.: Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes. *Lancet*, **2**, 850-853 (1971).
- 27) 橘武彦・吉田明子: ヒトの T 細胞, B 細胞の測定 (改良法). 免疫実験操作法 A, 455-462 (1974).
- 28) Kearney, J. F. & Lawton, A. R.: B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, **115**, 671-676 (1975).
- 29) Kasahara, T., Harada, H., Enomoto, H., Itoh, Y., Kawai, T. & Shioiri-Nakano, K.: A simple and rapid latex fixation test for measuring immunoglobulins produced in cell cultures. *J. Immunol. Methods*, **47**, 113-120 (1981).
- 30) Nowell, P. C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research*, **20**, 462-466 (1960).
- 31) Gowans, J. L. & Knight, E. J.: The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc. Roy. Soc., (Biol)*, **159**, 257-282 (1964).
- 32) Bender, M. A. & Prescott, D. M.: DNA, and protein synthesis, and the onset of mitosis in human leukocytes in vitro. *Blood*, **20**, 103 (1962).
- 33) Bender, M. A. & Prescott, D. M.: DNA synthesis and mitosis of cultures of human peripheral leukocytes. *Exp. Cell Res.*, **27**, 221-229 (1962).
- 34) Nadler, H. L., Dowben, R. M. & Hsia, D. Y.: Enzyme changes and polyribosome profiles in phytohemagglutinin stimulated lymphocytes. *Blood*, **34**, 52-62 (1969).
- 35) 花岡正男: 形質細胞の位相差顕微鏡像. 日血会誌, **16**, 173 (1953).
- 36) Ackerman, G. A. & Bellios, N. C.: A study of the morphology of the living cells of blood and bone marrow in vitral films with the phase contrast microscope. I. Normal blood and bone marrow. *Blood*, **10**, 3-16 (1955).
- 37) Discombe, G.: Phasecontrast microscopy in the clinical laboratory. A critical study. *Acta. Hematol.*, **3**, 151-162 (1950).
- 38) 花岡正男: 血液の位相差顕微鏡像. 日血会誌, **19**, 341-358 (1956).
- 39) Braunsteiner, H., Fellingner, K. & Pakesch, F.: Demonstration of a cytoplasmic structure in plasma cells. *Blood*, **8**, 916-922 (1953).
- 40) 渡辺陽之輔・高松道雄・大迫六郎: 形質細胞の微細構造について. 電子顕微鏡, **4**, 146-151 (1956).
- 41) 土肥清一・花岡正男・天野重安: 形質細胞の電子顕微鏡微細構造について—小胞体, Golgi 体, 中心小体および染色系—. 日血会誌, **19**, 3-8 (1956).
- 42) Welsh, R. A.: Light and electron microscopic correlation of the periodic acid-Schiff reaction in the human plasma cell. *Am. J. Pathol.*, **40**, 285-296 (1962).

## 写 真 説 明

Fig. 7. Morphological changes in Giemsa-stained smears.

(a & b) Large lymphoblastoid cells on day 3, characterized by the large nucleus with fine chromatin structure and multiple, prominent nucleoli. Many vacuoles are occasionally visible as shown in Fig. 7-b.  $\times 1,000$ .

(c) A large lymphoblastoid cell on day 5, characterized by the large nucleus with the prominent nucleolus and numerous vacuoles in the cytoplasm.  $\times 1,000$ .

(d) An immature plasmacytoid cell on day 5, characterized by the paranuclear hale, the eccentric, relatively large nucleus with fine chromatin structure and multiple nucleoli.  $\times 1,000$ .

(e & f) Mature plasmacytoid cells on day 7, characterized by the dense basophilic cytoplasm with the paranuclear hale, the eccentric and small nucleus with dense chromatin structure, the so-called "cart-wheel nucleus", and no nucleolus.  $\times 1,000$ .

Fig. 8. Morphological changes seen under a phase contrast microscope.

- (a & b) Actively moving lymphoblastoid cells on day 3, with many radiant granules in the cytoplasm and cytoplasmic projections. The characteristics of the nucleus, nucleolus and chromatin structure were the same as in Fig. 7-a & b.  $\times 1,000$ .
- (c) A larger lymphoblastoid cell on day 5, with more radiant granules but fewer cytoplasmic projections. The mobility became slower.  $\times 1,000$ .
- (d) An immature plasmacytoid cell on day 5, with many rod-shaped mitochondria. The characteristics of the nucleus, nucleolus and chromatin structure were the same as in Fig. 7-d.  $\times 1,000$ .
- (e & f) Mature, not mobile plasmacytoid cells on day 7, with numerous rod-shaped mitochondria in fountain-like arrangement, and no cytoplasmic projections or shortness if at all present. The characteristics of the nucleus, nucleolus and chromatin structure were the same as in Fig. 7-e & f.  $\times 1,000$ .

Fig. 9. Electron microscopic structure of lymphoblastoid cells on day 3, characterized by the large, euchromatic nucleus with one prominent nucleolus, and numerous polysomes and mitochondria, but scanty rough-surfaced endoplasmic reticulum (rER) in the cytoplasm. (a, b & c)  $\times 5,000$ .

000.  
(d)  $\times 6,000$ .

Fig. 10. Electron microscopic structure of lymphoblastoid cells and immature plasmacytoid cells on day 5.

- (a & b) Lymphoblastoid cells, showing the same characteristics as those on day 3 (Fig. 9).  $\times 5,000$ .  
(c & d) Immature plasmacytoid cells, characterized by relatively large euchromatic nucleus and a fairly large amount of rER with lamellar arrangement in the cytoplasm.  $\times 5,000$ .

Fig. 11. Electron microscopic structure of plasmacytoid cells of different stages appearing on day 7.

- (a) A lymphoblast-like plasmablastoid cell, characterized by the relatively large euchromatic nucleus with one prominent nucleolus and a fairly large amount of non-lamellar rER in the cytoplasm.  $\times 6,000$ .  
(b) An immature plasmacytoid cell, characterized by the relatively large heterochromatic nucleus with one nucleolus and well developed lamellar rER in the cytoplasm.  $\times 6,000$ .  
(c & d) Mature plasmacytoid cells, characterized by the small eccentric, heterochromatic nucleus, the prominent Golgi apparatus and dominating lamellar rER in the cytoplasm.  $\times 6,000$ .

***In Vitro* Development of Plasma Cells from B Lymphocytes Following the Stimulation with a *Staphylococcus Aureus* Cowan I Strain — A Morphological and Immunochemical Study** Ma-yumi Yamamura, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., **92**, 305—321 (1983)

**Key words:** *Staphylococcus aureus* Cowan I strain (SpA CoI), B lymphocyte, Plasma cell, Immunoglobulin, Electron microscopy

#### Abstract

A study was made to confirm the theory that plasma cells develop from B lymphocytes on mitogenic stimulation. Human peripheral B lymphocytes were cultivated for 7 to 10 days with a *Staphylococcus aureus* Cowan I strain (SpA CoI), a T-cell independent B-cell specific mitogen and also a polyclonal B-cell activator. The cells appearing during this period were observed sequentially under the light-, phase-, and electron microscopes. In parallel, their  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) uptake, the number of immunoglobulin producing cells (Ig-PC) and the content of Ig in the supernatant were measured. Preliminary experiments showed that T lymphocytes of several concentrations did not influence  $^3\text{H}$ -TdR uptake of B lymphocytes cultured for 3 days with the

strain SpA CoI, Ig-PC or Ig content in the supernatant of 7-day culture. These observations fully supported that SpA CoI was a T-cell independent B-cell specific mitogen. Lymphoblastoid cells started to increase on the 3rd day of culture, showed the maximum (approximately 68%) on the 5th day, and thereafter, rapidly decreased. On the other hand, small to medium-sized lymphocytes showed a sequential change in a mirror image of that of lymphoblastoid cells as mentioned above. A few plasmacytoid cells appeared on the 5th day and showed the maximum (approximately 25%) on the 7th day. Plasmacytoid cells were designated by morphological criteria as follows: the dense basophilic cytoplasm with paranuclear hale, the eccentric "cast-wheel nucleus" with dense chromatin structure in Giemsa-stained smear and well-developed rough-surfaced endoplasmic reticulum (rER), partially cisternal dilatation in electron microscopic structure. Furthermore, immunochemical study revealed that plasmacytoid cells possessed Ig in the cytoplasm and released Ig into culture supernatant. These results strongly suggest that B lymphocytes are capable of differentiating into plasma cells in culture with the strain SpA CoI that is a T-cell independent B-cell specific mitogen.

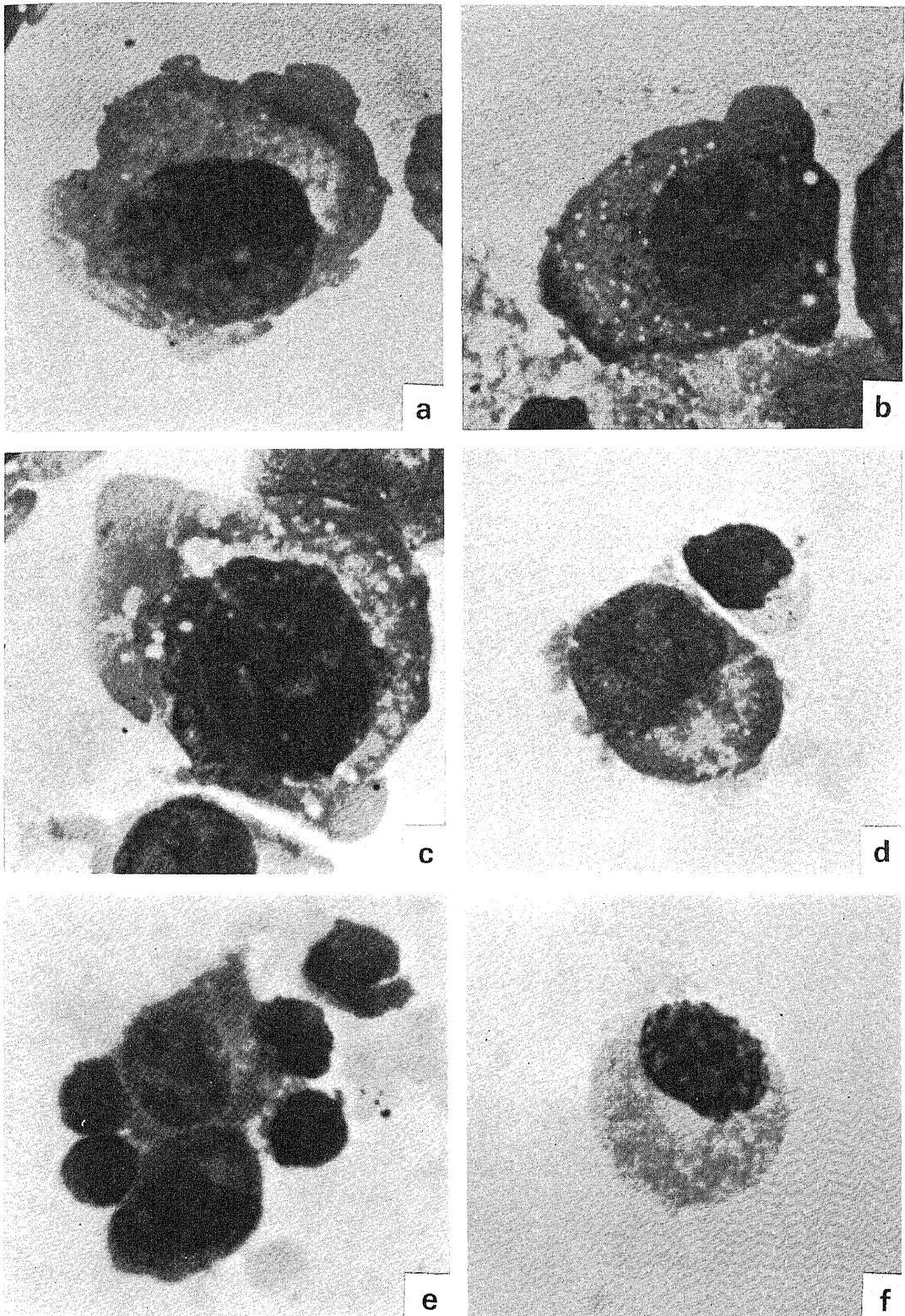


Fig. 7.

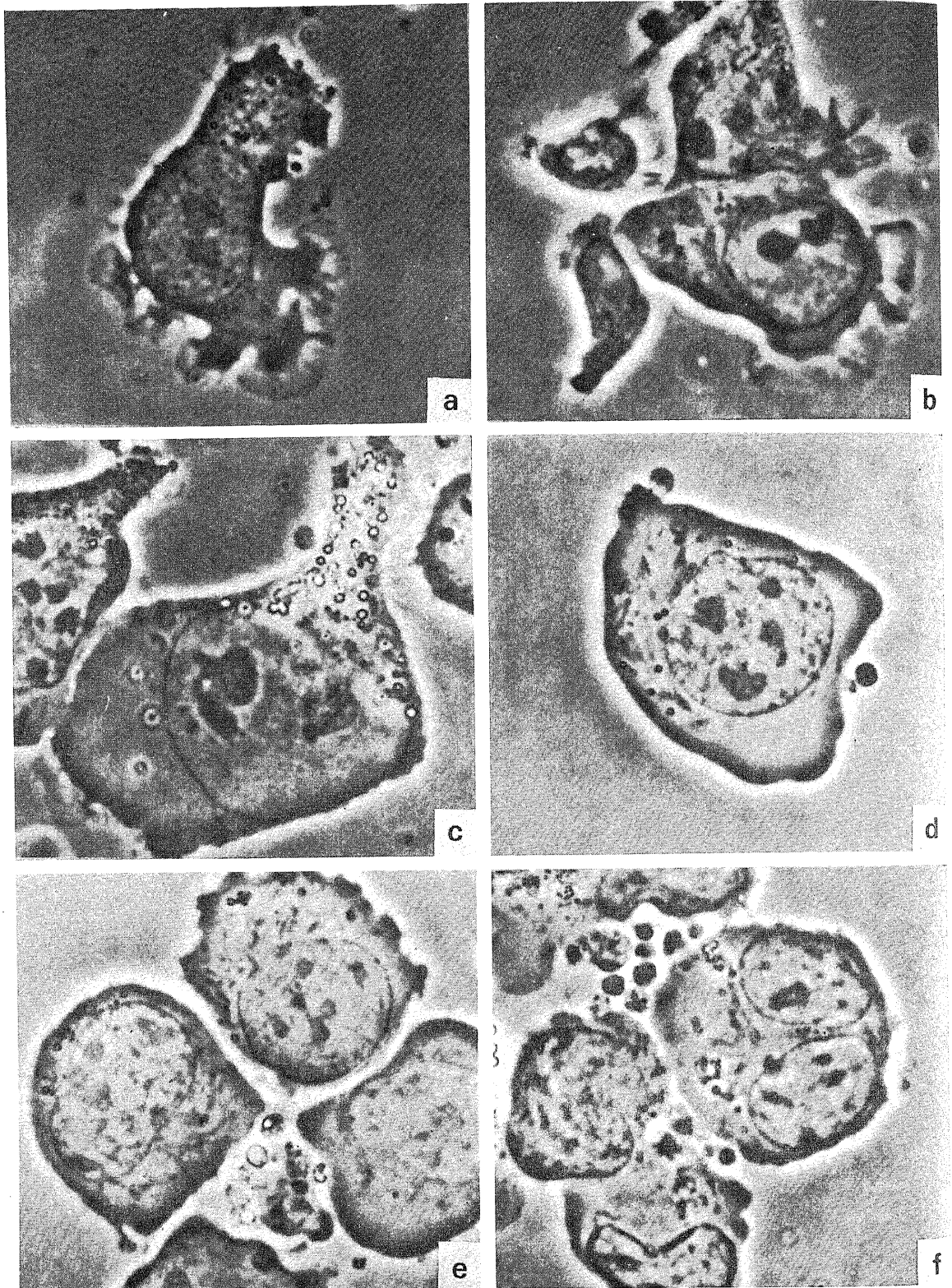


Fig. 8.

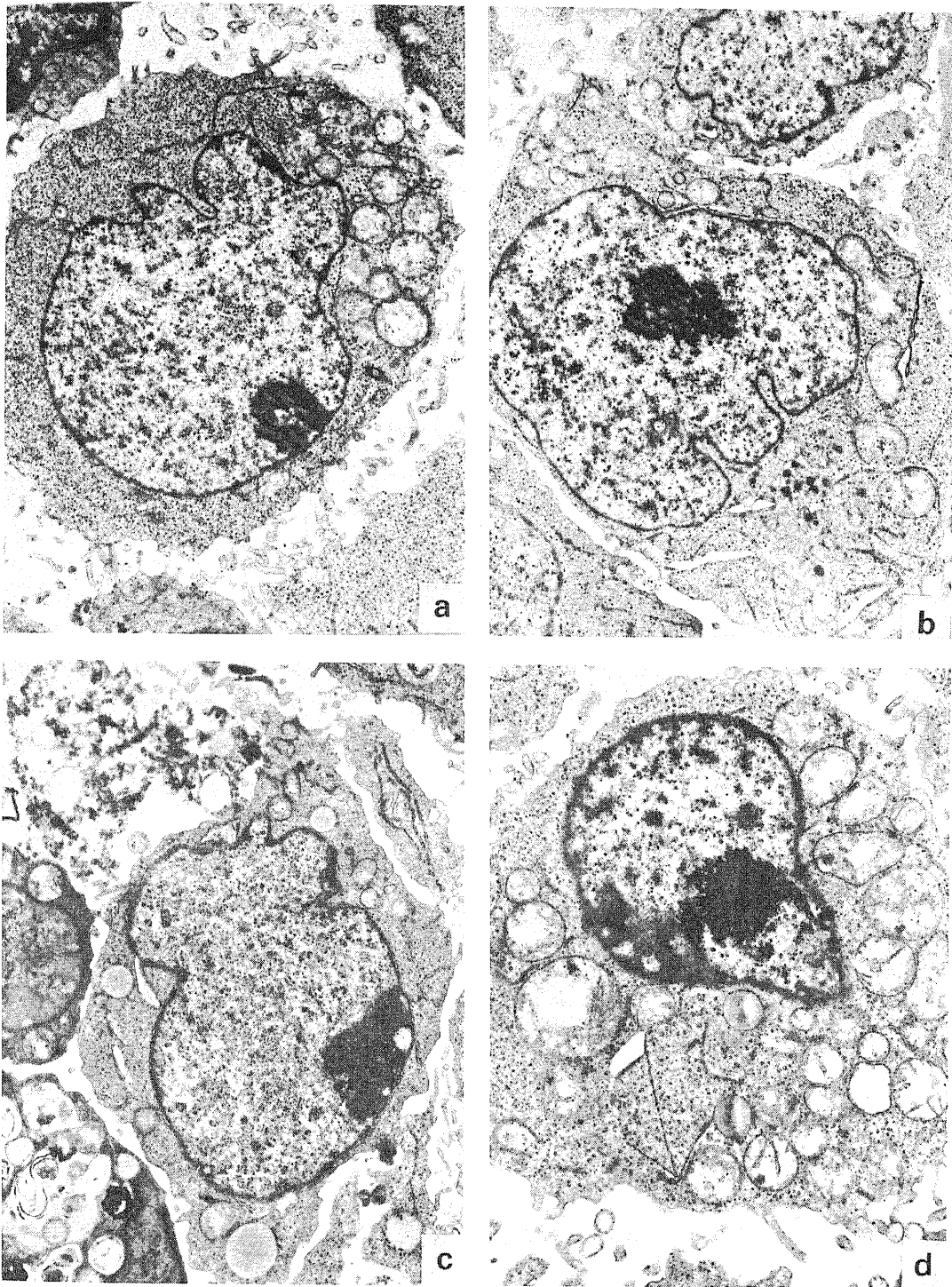


Fig. 9.



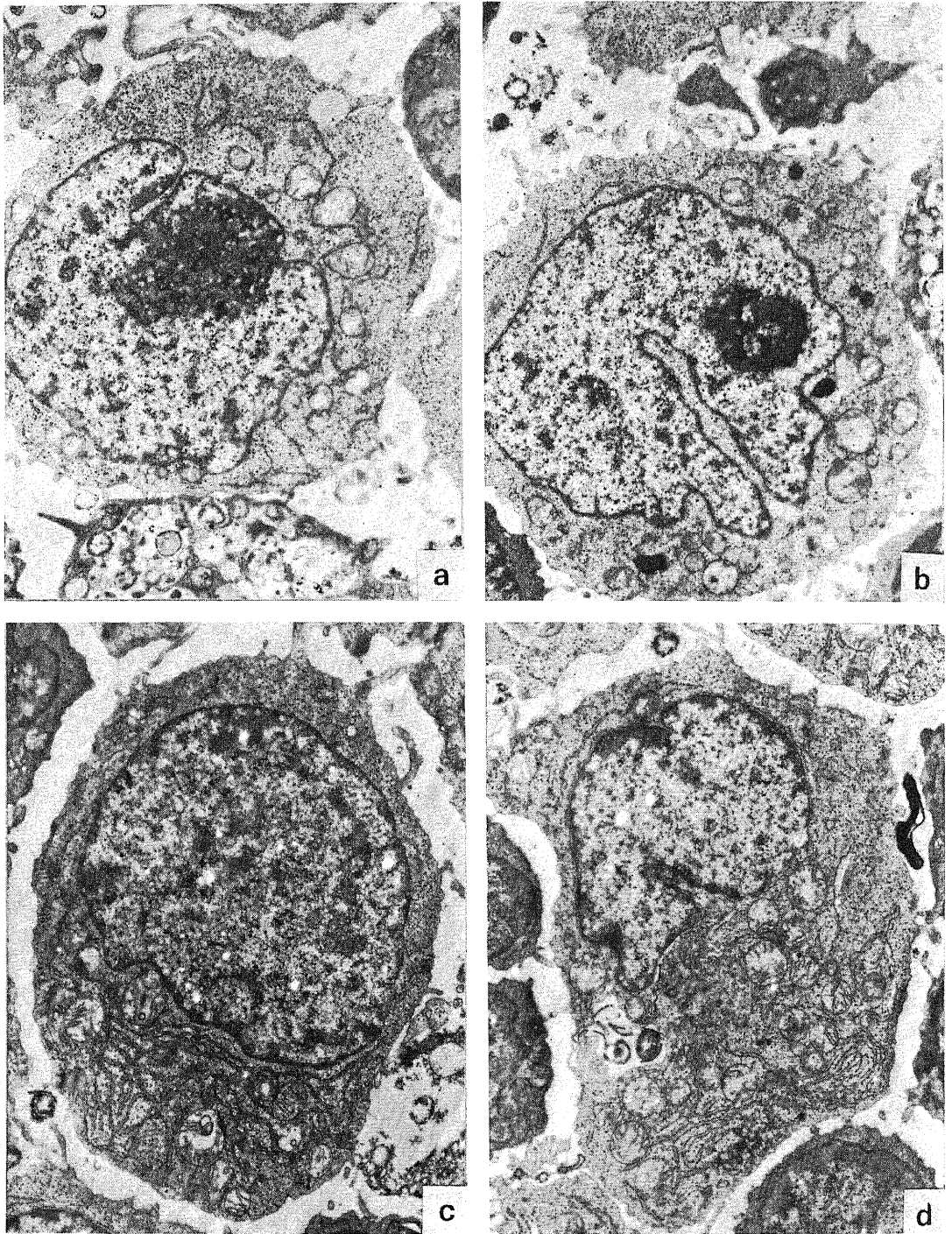


Fig. 10.

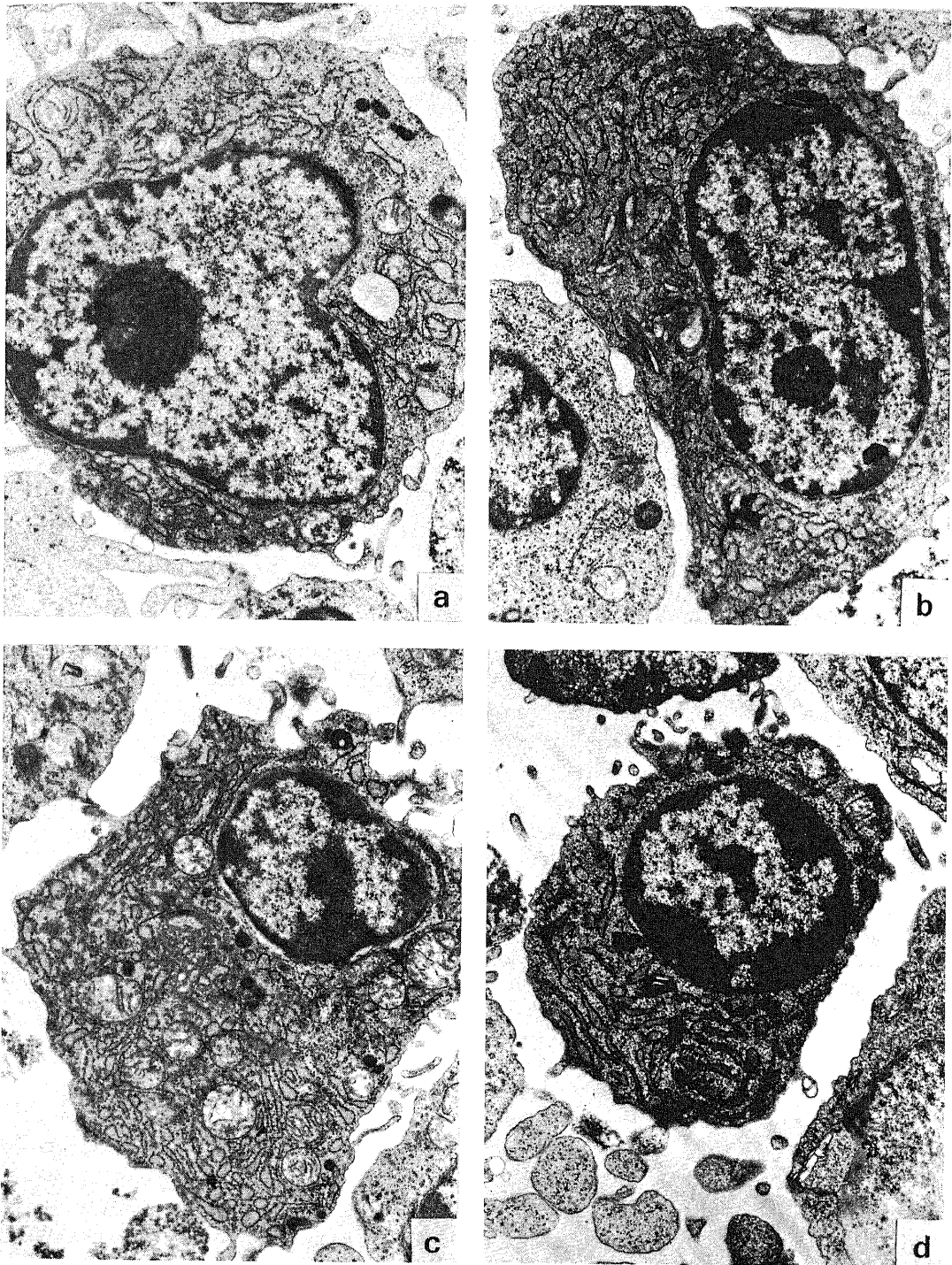


Fig. 11.